

Studien zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NtcA
in *Synechococcus elongatus* PCC 7942

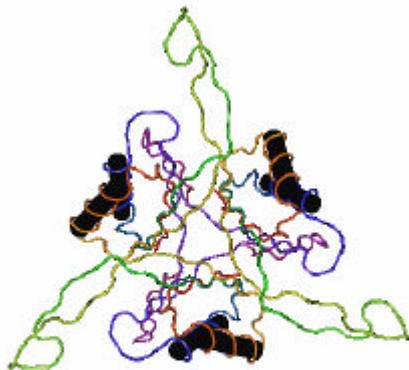
Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften

am Institut für Mikro- und Molekularbiologie

der Justus-Liebig-Universität

Giessen



vorgelegt von Mohammed Fadi Al-Dehni
aus Damaskus-Syrien

Giessen, Februar 2005

Studien zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NtcA
in *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften
am Institut für Mikro- und Molekularbiologie
der Justus-Liebig-Universität
Giessen

vorgelegt von Mohammed Fadi Al-Dehni
aus Damaskus-Syrien

Giessen, Februar 2005

*Meinen Eltern Muna und Samir
und meiner Freundin Laura*

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Forchhammer

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Beck

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2005

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1. Cyanobakterien.....	1
2. Kurzbeschreibung von <i>S. elongatus</i>	2
3. Das P_{II}-Protein	2
3.1 Das P _{II} -Protein in <i>E. coli</i>	2
3.2 Das P _{II} -Protein in Cyanobakterien.....	3
4. Stickstoff-Stoffwechsel in Cyanobacteria	4
4.1 Die Assimilation von Stickstoff	4
4.2 Glutaminsynthetasen	5
4.3 Glutamatsynthetasen	7
5. Der globale Stickstoffregulator NtcA	7
6. Regulation der N-Assimilierung (Ntr System) in Enterobakterien.....	8
7. C-Stoffwechsel in Cyanobakterien.....	11
8. Nährstoffmangel in Bakterien.....	12
9. Die Beziehung zwischen P_{II} und dem globalen Stickstoffregulator NtcA	13
10. Transkription des <i>glnB</i>-Gens	13
11. Ziele dieser Arbeit	14
B. Materialien und Methoden.....	15
1. Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	15
2. Anzuchtbedingungen.....	20
2.1 Kultivierung von Cyanobakterien	20
2.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	20
3. Molekulargenetische Methoden.....	21
3.1 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen zur Hitzeschock-Transformation.....	21
3.2 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	21
3.3 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen zur Elektroporation.....	22
3.4 Elektroporation-Transformation.....	22
3.5 Transformation von Plasmiden in <i>S. elongatus</i> -Stämmen	22
3.5.1 Transformation von Plasmiden nach Golden <i>et al.</i> , 1987	23
3.5.2 Transformation der Plasmide mittels Konjugation.....	23

4. Biochemische Methoden	25
4.1 Bestimmung der <i>Luciferase</i> -Aktivität in <i>S. elongatus</i> -Zellen.....	25
4.2 Reinigung von NtcA	25
4.3 Bestimmung der NtcA-Konzentration nach Bradford.....	26
4.4 Protein-DNA-Interaktionsstudien.....	27
4.4.1 Protein-DNA-Interaktionsstudien mittels <i>Biacore</i>	27
4.4.1.1 Herstellung der biotinylierten DNA-Fragmente für die <i>Biacore</i> -Experimente.....	27
4.4.1.2 Immobilisierung der 5'-biotinilierten DNA-Fragmente auf dem SA-Chip.....	28
4.4.1.3 Messung der Interaktion von NtcA mit DNA bzw. mit PII	28
4.4.2 Protein-DNA-Interaktionsstudien mittels Gel-Retardations-Experimenten.....	29
4.4.2.1 Herstellung des 123 bp <i>Shift</i> -Fragmentes durch PCR	29
4.4.2.2 Radioaktive Markierung des DNA-Fragments.....	30
4.4.2.3 Der <i>Shift</i> -Reaktionsansatz	30
4.5 NtcA-ATPase Reaktion.....	31
4.6 Norit A-Test.....	32
5. Dünnschichtchromatographie	32
5.1 Dünnschichtchromatographie mittels Polygram <i>Cel 300 PEI</i> -Platten.....	32
6. Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase-chain-reaction PCR</i>)	33
6.1 PCR für Isolierung und Klonierung bestimmter DNA-Fragmente	33
6.2 Gerichtete Mutagenese PCR (nach Kirsch und Joly, 1998).....	34
7. Klonierungen	36
7.1 Klonierung der pFAM1 und pFAM2 Konstrukte.....	36
7.2 Klonierung der <i>glnN</i> -Konstrukte	37
7.3 Klonierung der mutierten <i>glnN</i> -Promoter Konstrukten.....	38
7.4 Klonierung von NtcA in den Expressionsvektor	38
C. Ergebnisse	40
I Untersuchungen der Expression der Stickstoff-regulierten Gene <i>glnB</i> und <i>glnN</i>	40
1. Expression des NtcA-abhängigen <i>glnB</i>-Promoters	40
1.1 Herstellung der <i>luxAB:glnB</i> Reporterfusion.....	41
1.2 Transformation der Konstrukte in <i>S. elongatus</i> -Stämme	42
1.3 Bestimmung der <i>glnB</i> -Promoteraktivität in <i>S. elongatus</i> -Stämme.....	42
1.3.1 Analyse der <i>glnB</i> -Expression in <i>S. elongatus</i> -Stämmen bei Nitrat und Ammoniumwachstum.....	42
1.3.2 Analyse der <i>glnB</i> -Expression in <i>S. elongatus</i> -Stämmen bei Stickstoffentzug	44
1.3.2.1 <i>glnB</i> -Expression bei Stickstoffmangel in WT Zellen.....	45
1.3.2.2 <i>glnB</i> -Expression unter Stickstoffmangel in MP2 und MNtcA Zellen.....	45
1.4 <i>glnB</i> -Expression unter Stickstoffmangel in MP2-A Zellen.....	47
2. Expression des <i>glnN</i> Promoters	48
2.1 Analyse der <i>glnN</i> -Expression in <i>S. elongatus</i> -Stämmen.....	50
2.1.1 <i>glnN</i> -Expression unter Nitratwachstumsbedingungen.....	50
2.1.2 <i>glnN</i> -Expression Unter Ammoniumwachstumsbedingungen	51
2.1.3 <i>glnN</i> -Expression unter Stickstoffmangel.....	53
2.1.3.1 <i>glnN</i> -Expression unter Stickstoffmangel in WT-Zellen.....	53
2.1.3.2 <i>glnN</i> -Expression unter Stickstoffmangel in P _{II} und NtcA-defizienten Zellen.....	54

2. 2 Die <i>glnN</i> - Expression in MP2-A Stamm	56
3. Analyse der NtcA-Bindestelle in der <i>glnN</i>-Promoterregion in <i>S. elongatus</i>	58
3.1 Veränderung der putativen NtcA Bindestelle in der <i>glnN</i> -Promoterregion.....	58
3.2 Analyse der Expression der mutierten <i>glnN</i> -Promoter.....	59
3.2.1 Expression unter Nitratwachstumsbedingungen	59
3.2.2 Expression unter Ammoniumwachstumsbedingungen	61
3.2.3 Expression unter Stickstoffmangelbedingungen.....	62
3.2.3.1 Expression unter Stickstoffmangelbedingungen in WT-Zellen.....	62
3.2.3.2 Expression unter Stickstoffmangelbedingungen in MP2 und MNtcA.....	63
II Interaktionsstudien zwischen P_{II} und NtcA	65
1. Überproduktion und Reinigung von NtcA.....	65
1.1 Überexpression von His ₆ -NtcA aus <i>S. elongatus</i>	65
1.2 Aufreinigung von His ₆ -NtcA.....	66
1.3 His ₆ -NtcA Konzentrationbestimmung durch Absorptionsmessung	69
2. P_{II}-NtcA-Interaktionsstudien mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse.....	71
2.1 Prinzip der Interaktionsmessung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse	71
2.2 Immobilisierung von 5'-biotinilierten DNA-Fragmenten auf einem Streptavidin-Chip (SA-Chip)	72
2.3 Messung der Bindung von NtcA an die DNA-Fragmente	73
2.3.1 Effekt von ATP auf die NtcA-DNA-Bindung	74
2.3.2 Effekt von 2-Oxoglutarat, Mg ²⁺ und ATP auf die NtcA-DNA-Bindung.....	75
2.3.3 Effekt von P _{II} auf die NtcA-DNA-Bindung	77
3. Gel-Retardations-Experimente	80
3.1 Herstellung des DNA-Shift-Fragments	80
3.2 Optimierung der NtcA-DNA Bindungsbedingungen.....	81
3.2.1 Der Effekt von Magnesium und 2-Oxoglutarat auf den <i>NtcA-Shift-Assay</i>	82
3.2.2 Der Effekt von P _{II} auf die spezifische NtcA-DNA-Bindung.....	84
4. UV-Crosslinking-Experimente.....	87
4.1 ATP-NtcA-Reaktion.....	88
4.2 Effekt neuer Faktoren auf die ATP-NtcA-Reaktion.....	90
4.3 Optimierung der ATP-NtcA Reaktion.....	91
4.4 Untersuchung auf mögliche Effekt der Puffer auf die ATP-NtcA-Reaktion.....	92
4.5 Norit A-Test.....	93
4.6 Charakterisierung der X-P-Bande	94
4.7 Effekt von P _{II} auf die ATP-NtcA-Reaktion.....	95
4.8 Untersuchung der ATP-NtcA-Reaktion mittels Dünnschicht-chromatographie.....	96
D. Diskussion.....	100
1. Analyse der nicht kanonischen NtcA-Bindestelle des <i>glnN</i>-Promoters	100
2. DNA-Repressor im Bereich des <i>glnN</i>-Promoters	101

3. Die regulatorische Beziehung zwischen P_{II} und NtcA <i>in vivo</i>	102
3.1 Analysen eines kanonischen NtcA-Promoters	102
3.2 Analysen eines nicht kanonischen NtcA-Promoters	104
4. Der Einfluss von P_{II} auf NtcA <i>in vitro</i>	107
4.1 Analyse der DNA-Bindung von NtcA	108
4.2 ATPase-Reaktion von NtcA.....	109
4.3 Analyse einer neuen ATPase-Aktivität von NtcA.....	110
E. Zusammenfassung	112
Anhänge	114
Literaturverzeichnis	126

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca.	Circa
cpm	Zerfälle pro Minute
d	Tag
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
d.h.	das heißt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Et al.</i>	und andere
G	Erdbeschleunigung
GOGAT	Glutamin: α -Oxoglutarat Aminotransferase (Glutamat-Synthase)
GS	Glutamin Synthetase
H	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Nm	Nanomolar
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
r	Resistenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
2-OG	Zwei-Oxoglutarat
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel

A. Einleitung

1. Cyanobakterien

Cyanobakterien sind prokaryotische oxygene phototrophe Bakterien, die Chlorophyll a und Phycobiline, aber kein Chlorophyll b besitzen. Sie stellen eine der großen Gruppen der Bakterien dar und weisen eine entfernte Verwandtschaft zu den Gram-positiven Bakterien auf. Sie waren die ersten phototrophen Organismen auf der Erde, die Sauerstoff produzieren, und sind deshalb dafür verantwortlich, dass die Erdatmosphäre mit Sauerstoff angereicht wurde. Auch heute spielen die Cyanobakterien eine große Rolle im N- und C-Kreislauf der Erde.

Während der Evolution entwickelten Cyanobakterien einen effizienten Mechanismus, um sich an Veränderungen in der Umwelt anpassen zu können. Diese Fähigkeit basiert auf molekularen Mechanismen der Umwelt-Wahrnehmung, diese Umweltsignale werden in der Zelle gewandelt und führen über Signaltransduktionsmechanismen zu den entsprechenden Antworten.

Cyanobakterien lassen sich in fünf morphologische Gruppen einteilen: einzellige, die sich durch binäre Teilung oder durch multiple Teilung vermehren; filamentöse, die differenzierte, Heterocysten genannte Zellen enthalten, diese sind gerundete Zellen, die meistens entlang eines Filaments verteilt sind (wie *Anabaena* sp). Heterocysten sind die einzigen Orte in Cyanobakterien, in denen Stickstofffixierung stattfindet; filamentöse nicht heterocystische Formen. Bei einigen filamentösen Cyanobakterien erfolgt die Fragmentierung der Fäden durch die Bildung von Hormogonien, die sich von den Filament trennen, andere Arten bilden Sporen oder Akineten, die den Mikroorganismus während lebensbedrohenden Umweltveränderungen wie Trockenheit oder Gefrieren durch den Zerfall der äußeren Wand und das Auswachsen einen neuen vegetativen Filaments keimen schützen.

Das Wachstum von Cyanobakterien basiert auf der Anwesenheit von anorganischem Nährstoff. Nitrat oder Ammoniak werden als Stickstoffquelle verwendet, Licht als Energiequelle, und CO₂ als Kohlenstoffquelle.

2. Kurzbeschreibung von *S. elongatus*

Der Stamm *Synechococcus elongatus* PCC 7942

(*Anacystis nidulans* bzw. Stamm R2 genannt)

(Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria

www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/) ist

ein einzelnes, stäbchenförmiges obligat phototrophes

Bakterium aus der Gruppe der *chroococcales*

Cyanobakterien. *S. elongatus* ist im Gegensatz

zu *Anabaena* nicht in der Lage, Stickstoff zu fixieren.

Jedoch können Ammonium, Nitrit, Nitrat und Cyanat als Stickstoffquelle verwendet werden.

Als Speicherstoff wird Glykogen akkumuliert, das in Dunkelperioden als Energiequelle zur

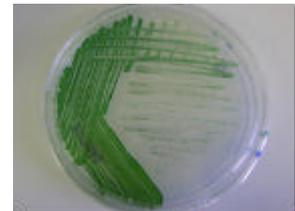
Regeneration von Reduktionsäquivalenten und ATP dient. Wachstum erfolgt in einem

Bereich von 12°C bis 42°C bei alkalischen pH Werten (pH 7 bis 10). Im Gegensatz zu vielen

anderen Stämmen, ist *S. elongatus* leicht zu transformieren (Golden *et al.*, 1989; Porter,

1986). Es sind genetische Werkzeuge etabliert und die Physiologie gut untersucht. Deshalb ist

er für molekularbiologische Untersuchung sehr gut geeignet.



3. Das P_{II}-Protein

Die P_{II}-Signaltransduktionsproteine gehören zu der am weitesten verbreiteten und am besten

konservierten Signalproteinen nicht nur in Bakterien, sondern auch in Archaea, Algen und

Pflanzen. Die Aufgabe der P_{II}-Proteine besteht in der Koordination der Kohlenstoff- und

Stickstoffassimilation, sowie auch die Regulation verschiedene zellulärer Prozesse

(Genexpression, Transportsystem). Die P_{II}-Proteinfamilie ist in drei Gruppen eingeteilt, GlnB,

GlnK und NifI. GlnB und GlnK- sind sehr ähnlich und weit verbreitet. Hingegen wurde NifI

Protein nur in Archaea und einigen anaeroben Bakterien gefunden (Arcondeguy *et al.*, 2001).

3.1 Das P_{II}-Protein in *E. coli*

P_{II} liegt als ein homotrimeres Protein mit einer Molekularmasse von 12,3 kDa je Untereinheit

vor, wobei jede Untereinheit als Antwort auf Signale des Kohlenstoff und-

Stickstoffstoffwechsels modifiziert werden kann. Aus der kompakten Struktur ragt je

Untereinheit eine acht Aminosäuren-lange Schleife, bezeichnet als "T-Loop" heraus. An der

Spitze des T-Loops befindet sich bei Aminosäuresequenz 51 ein Tyrosinrest, der durch die Uridyltransferase uridyliert oder deuridyliert werden kann, und für die Interaktion mit den Rezeptoren, wie z.B. (ATase) und der Kinase/Phosphatase NtrB notwendig ist (Jiang *et al.*, 1997).

Die Uridylierung von P_{II} erfordert ATP und 2-Oxoglutarat, die synergistisch an P_{II} und an P_{II}-UMP binden (Kamberov *et al.*, 1995), wobei 2-Oxoglutarat das Signalmolekül des Kohlenstoffstoffwechsels darstellt. Die Ligandierung jeder Untereinheit mit 2-Oxoglutarat bewirkt bereits eine Konformationsänderung von P_{II}, so dass keine Interaktion mit der ATase und mit NtrB möglich ist (Jiang *et al.*, 1999).

Nur der Komplex aus P_{II}-Protein, ATP und 2-Oxoglutarat stellt das Substrat für die Uridyltransferase (Merrik und Edwards, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997) dar.

In *E. coli* existiert ein anderes Protein, GlnK das 67% Aminosäureidentität mit dem P_{II}-Protein aufweist. GlnK kommt auch als Trimer vor. Es wird durch die Uridyltransferase modifiziert und auch von der Adenyltransferase aktiviert. Unter Stickstoffmangel wird die Expression von GlnK stark aktiviert (Van Heeswijk *et al.*, 1996; Atkinson und Ninfa, 1998). GlnK ist vermutlich an der Regulation der Expression stickstoffregulierter Gene beteiligt, wobei P_{II} und GlnK hinsichtlich ihrer Funktionen nicht gegeneinander austauschbar sind (Atkinson und Ninfa, 1998). Möglicherweise wirkt GlnK auch als "memory" Protein, das die Reaktion der Zelle auf eine kurzzeitige Ammoniumzufuhr nach langem Stickstoffmangel verzögert (Van Heeswijk *et al.*, 1996).

3.2 Das P_{II}-Protein in Cyanobakterien

Das erste P_{II}-Protein in Cyanobakterien wurde im Stamm *Synechococcus elongatus* PCC 6301 von Harrison *et al.*, 1990 identifiziert. Es ist ein 12.5 kDa Protein, dessen N-terminale Aminosäuresequenz Homologie zum P_{II}-Protein der Proteobakterien aufweist. Das entsprechende Gen (*glnB*) wurde in *S. elongatus* identifiziert (Tsinoremas *et al.*, 1991). Forchhammer und Tandeau de Marsac (1994) zeigten, dass die Modifikation von P_{II}, im Gegensatz zu der Uridylierung bei Enterobakterien, durch Phosphorylierung erfolgt. Jede Untereinheit des trimeren 36 kDa Proteins kann an dem Serylrest 49 phosphoryliert werden (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995). Die Sequenzumgebungen des Serylrestes (RYRGSEY) spiegeln das Erkennungsmotiv (RXS) eukaryotischer cAMP abhängiger Kinasen wider (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995). Es gibt vier mögliche Zustände von P_{II}: unphosphoryliert oder mit einer, zwei oder drei phosphorylierten Untereinheiten. Der Phosphorylierungsgrad des P_{II}-Proteins hängt in aller ersten Linie von Stickstoffstatus ab. Ist

Nitrat die einzige Stickstoffquelle, liegen in der Zelle hauptsächlich die phosphorylierten Formen des P_{II} - Proteins vor. In Gegenwart von Ammonium liegt P_{II} in unmodifizierter Form vor. Die größte Modifizierung wird unter N-Mangel erreicht (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994). Neben der Stickstoffversorgung beeinflusst auch die CO_2 -Versorgung und die Beleuchtung den Modifikationszustand des P_{II} -Proteins. Romero *et al.*, (1985) zeigten, dass die Nitratassimilation mit der CO_2 -Fixierung koordiniert ist. In der P_{II} -defizienten Mutante MP2, in der das Gen für das P_{II} -Protein durch Insertion einer Kanamycinkassette ausgeschaltet worden ist (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995), ist die Nitratassimilation nicht mehr mit der CO_2 -Fixierung koordiniert. Des Weiteren ist auch die zelluläre Glycogenmenge in MP2 bei Stickstoffversorgung erhöht. Auch die Aktivität der Glutaminsynthetase sowie der Nitrat- und der Nitritreduktase ist in MP2 höher als im Wildtyp. Bei Wachstum auf Ammonium ist die Aktivität der Reduktasen in Wildtyp wie auch in MP2 reduziert. Die Glutaminsynthetaseaktivität in der Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp zweifach erhöht. Des Weiteren ist der MP2-Stamm in der Regulation des Methylammoniumtransportes gestört (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995). In der Mutante MP2-A ist das P_{II} -Protein nicht mehr phosphorylierbar, da in diesem Stamm der Seryl 49-Rest von P_{II} durch Alanin ausgetauscht wurde (Lee *et al.*, 2000). Dieser Stamm ist nicht mehr fähig, Nitrat, das in niedriger Konzentration im Medium vorhanden ist, aufzunehmen. All dies zeigt, dass P_{II} in vielfältiger Weise an der Regulation der N-Assimilation beteiligt ist.

4. Stickstoff-Stoffwechsel in Cyanobacteria

4.1 Die Assimilation von Stickstoff

Die Trockenmasse der Cyanobakterien besteht bis zu 11% aus organisch gebundenem Stickstoff (Wolk, 1973). Stickstoff ist eines der wichtigsten Nährstoffe für Bakterien und wirkt häufig für das Wachstum in freier Natur limitierend. Stickstoff kann in Form verschiedene Verbindungen genutzt werden, wobei jedoch Ammonium die bevorzugte Stickstoffquelle der meisten Bakterien ist, inklusive Cyanobakterien. Cyanobakterien können die Stickstoffquellen Ammonium, Nitrat und Nitrit zum Wachstum nutzen. Darüber hinaus können einige Arten molekulare Stickstoff N_2 fixieren oder organischen Stickstoff (z.B. Glutamin, Arginin, Harnstoff) aufnehmen. Nitrat, die in der Umwelt häufigste gebundene Stickstoffquelle, wird über das hochaffine NrtABC-Transport-System transportiert, das zur Familie der ABC-Transporter (*ATP-binding Cassette*) gehört (Omata *et al.*, 1993). In *S. elongatus* PCC 7942 sind die Gene, die das NrtABCD-Transportsystem und die Nitrat- und

Nitritreduktase kodieren, im *nirA* Operon, *nirA-nrtABCD-narB*, lokalisiert. Das aufgenommene Nitrat wird dann durch das Enzym Nitratreduktase (NarB) zu Nitrit und anschließend durch das Nitritreduktase (NirA) zu Ammonium reduziert (Luque *et al.*, 1994). In *S. elongatus* PCC 7942 gibt es für die Nitrit-Assimilation ein spezifisches Aufnahmesystem (Maeda *et al.*, 1998a).

Ammonium wird mit Hilfe des GS/GOGAT-Weges in organische Substanzen assimiliert. Glutamat und Glutamin sind die universellen Stickstoffdonatoren für biosynthetische Reaktionen. Es gibt zwei Hauptwege für die Umwandlung des Stickstoffs zu Glutamat und Glutamin. Der wichtigste Weg ist der Glutaminsynthetase/Glutamatsynthase (GS/GOGAT) Zyklus. Ammonium wird mit Hilfe des GS/GOGAT-Weges in organische Substanzen assimiliert, wobei die ATP-abhängige Glutaminsynthetase die Reaktion Ammonium und Glutamat zu Glutamin katalysiert (Merrick und Adwards, 1995).



Die Glutamatsynthase katalysiert die Bildung von zwei Molekülen Glutamat aus Glutamin und 2-Oxoglutarat unter Verbrauch von 2 Redoxäquivalente ($2 e^-$).



Glutamin wird nicht nur für die Proteinsynthese benötigt, sondern auch für die Synthese anderer stickstoffhaltiger Metabolite, wie z.B. Purine und Pyrimidine. Die Aminogruppe des Glutamats wird über Transaminierungsreaktion zur Synthese anderer Aminosäuren benutzt. Neben der Synthese neuer Proteine wird Glutamat auch zur Tetrapyrrol-Synthese benötigt, die zur Bildung der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll und Phycobiline führt (Abb. 1).

4.2 Glutaminsynthetasen

Die wichtige Form der GS ist die Glutaminsynthetase I (GSI), die klassische prokaryotische Form, ein dodecameres Enzym mit identischen Unterheiten von ca. 55 kDa, die durch das *glnA*-Gen kodiert wird. Die Kristallstruktur GSI zeigt, dass sie aus 12 identischen Untereinheiten besteht, und in zwei in einander gelegten sechseckigen Ringen angeordnet sind. Diese Ringe sind miteinander über hydrophobe Interaktionen und Wasserstoff-Bindungen zwischen den Untereinheiten verknüpft (Yamashita *et al.*, 1989).

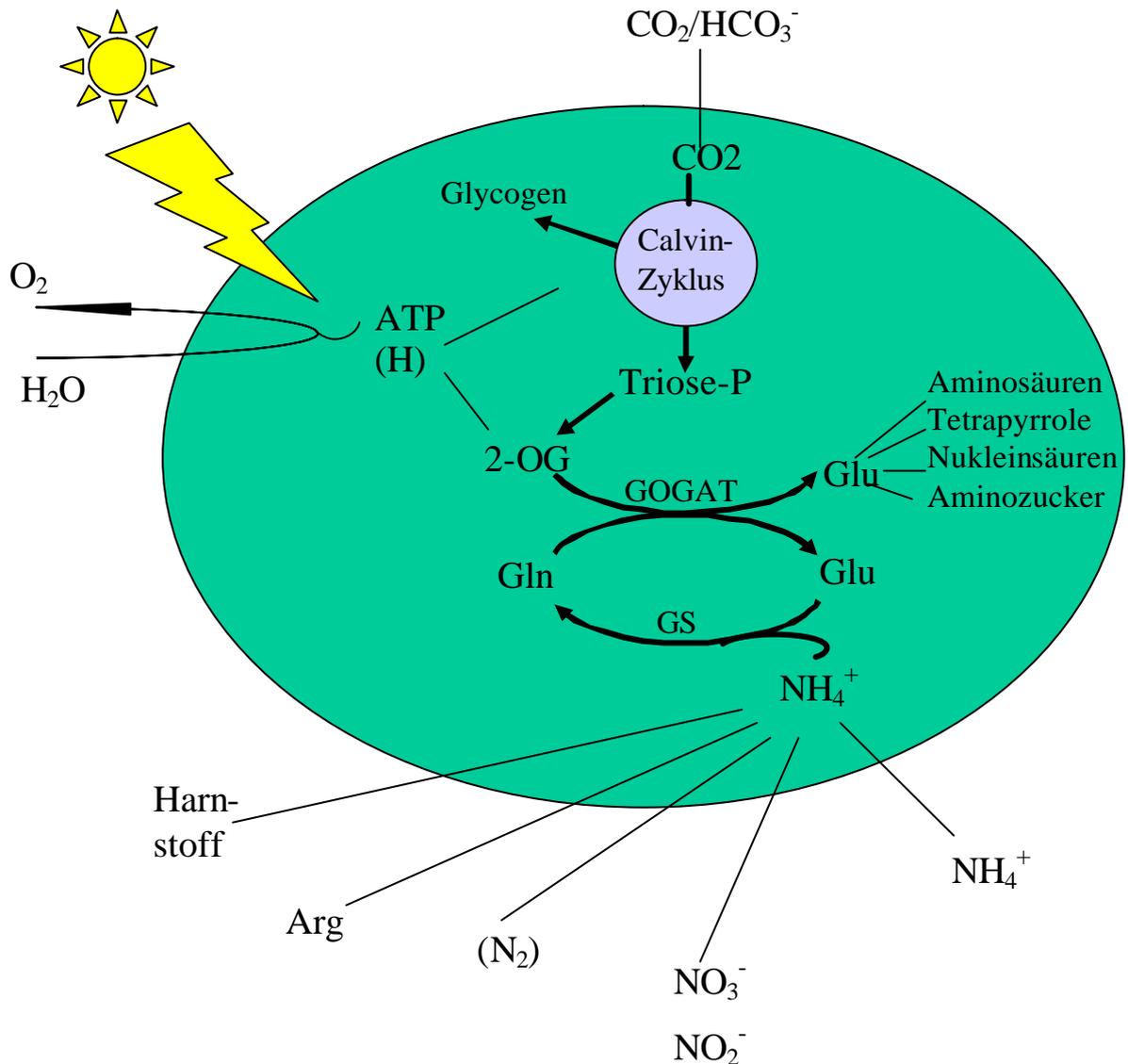


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stickstoff-Stoffwechsels in Cyanobakterien

Eine zweite Form von GS ist die eukaryotische Form (GSII), ein Oktamer, das aus Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 36 kDa besteht (Merrick. *et al.*, 1995). GSII wird vom *glnII* Gen kodiert. In Bakterien wurden Enzyme dieses Typs in Gattungen der Familie *Rhizobiaceae* (Carlson und Chlem, 1986) und in der Gattung *Streptomyces* (Behrmann *et al.*, 1990) gefunden. Es gibt Hinweise, dass die GSII in *Rhizobium leguminosarum* posttranslational Modifiziert sein könnte (Manco *et al.*, 1992).

Eine dritte Form von GS ist die GSIII, kodiert vom *glnN* Gen, dieses Enzyme wurde ursprünglich in den beiden obligat anaeroben Bakterien *Bacteroides fragilis* (Hill *et al.*, 1989) und in *Butyrivibrio fibrisolvens* (Goodman und Woods, 1993) identifiziert. Die GSIII

ist ein hexameres Enzym, dessen identischen Untereinheiten eine molekulare Masse von 75 kDa aufweisen.

4.3 Glutamatsynthesen

Die Glutamatsynthese wird oft als GOGAT (Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase) bezeichnet. Das Enzym besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten mit den Molekularmassen 53 kDa und 135 kDa, die durch die *gltBD* Gene kodiert werden. In *E. coli* sind die *gltBD* Gene Mitglieder des Lrp Regulons (*leucine-responsive regulatory protein*). Lrp spielt eine Rolle in der Repression der GOGAT-Synthese in reichen Medien, in denen Stickstoff in Form von Aminosäuren, Nukleinsäuren sowie auch Ammoniak enthalten sind (Merrick *et al.*, 1982). Der *glt*-Locus ist in *Azorhizobium sesbaniae* (Donald *et al.*, 1988. und Hilgert *et al.*, 1987), *Rhizobium meliloti* (Botsford. *et al.*, 1990) und *Azospirillum brasilense* (Mandal *et al.*, 1993) charakterisiert worden. In *Bacillus subtilis* sind die GOGAT Untereinheiten durch die Gene *gltA* und *gltB* kodiert (Bohannon *et al.*, 1985).

5. Der globale Stickstoffregulator NtcA

In Cyanobakterien wird die Transkription stickstoffregulierter Gene nicht, wie in Enterobakterien, durch das Zwei-Komponenten-System NtrB/NtrC aktiviert, sondern durch den Transkriptionsaktivator NtcA (Vega-Palas *et al.*, 1992). NtcA ist an der Aktivierung der Transkription stickstoffregulierter Gene, wie z.B. dem *nirA* Operon, *glnA*, *glnN* und *amt1* beteiligt. NtcA ist ein Schlüsselement für die globalen Stickstoffkontroll Prozesse, der zur Familie der CRP/FNR-Transkriptionfaktoren gehört. NtcA besitzt in sein C-terminal ein Helix-Turn-Helix-Motiv zur Bindung an die DNA. Alle untersuchten stickstoff-regulierten Gene weisen in der Promoterregion ein konserviertes palindromisches Sequenzmotiv auf, die "NtcA-Box", an die diese Box das NtcA Protein bindet. In NtcA-regulierten Promotoren ersetzt diese NtcA-Box die kanonische -35 Box. Im -10 Bereich (Pribnow-Box) findet sich außerdem die Sequenz TAN₃T, so dass sich die Konsensus-Sequenz GTAN₈TACN₂₂TAN₃T ergibt. Im filamentösen Cyanobakterien ist NtcA auch an der Regulation der Heterocysten-Differenzierung beteiligt, z.B. in *Anabaena* sp. Stamm PCC 7120 (Meeks und Elhai, 2002). Zur Regulation der NtcA-Aktivität wurde vor kurzem gezeigt, dass NtcA durch 2-Oxoglutarat reguliert werden könnte, durch Stimulierung der spezifischen Bindung von NtcA an DNA. (Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002 a). *In vivo* konnte auch durch Transkriptionstudien gezeigt

werden, dass NtcA-abhängige Transkriptionsinitiation nur in Gegenwart von 2-Oxoglutarat möglich ist (Tanigawa *et al.*, 2002).

Auch Gene, die nicht direkt mit der Stickstoffregulation in Zusammenhang stehen, werden durch NtcA gesteuert. So z.B. *rbcLS* in *Anabaena* sp. Stamm PCC 7120, sowie in *S. elongatus* PCC 7942, welche für die große und kleine Untereinheit der RubisCO kodieren (Aldehni *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist das *gor*-Gen, das für das Antioxidans-Protein Glutathion-Reduktase kodiert (Jiang *et al.*, 1997), das unter NtcA-Kontroll steht.

Ein anderer Transkriptionsfaktor NtcB, das zur LysR Familie gehört, wird für die Expression des *nirA*-Operon benötigt. (Aichi *et al.*, 1997) Nitrit wirkt dabei als positiver Effektor auf NtcB. Für die Wirkung von NtcB ist jedoch die Bindung von NtcA an *nir A*-Promoter nötig (Kikuchi *et al.*, 1996 und Maeda *et al.*, 1998b).

Für die Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität wurde in dem Stamm *Synechocystis* PCC 6803 gezeigt, dass die Anwesenheit von Ammonium zu einer direkten Inaktivierung der GS-Aktivität führt (Merida *et al.*, 1991). Untersuchungen aus *Synechocystis* PCC 6803 zeigten, dass die GS-Aktivität durch Protein-Protein Interaktion mit zwei Inaktivierungsfaktoren (IF7 und IF17) inhibiert wird. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Expression der entsprechenden Gene (*gifA* und *gifB*), welche die Faktoren IF7-IF17 kodieren, unter der Kontrolle des globalen Stickstoffregulators NtcA stehen (Dominguez *et al.*, 2000). Ist Stickstoff im Medium im Überschuss vorhanden, liegt NtcA in einer inaktiven Form vor und kann dadurch weder die Expression von *glnA* aktivieren noch die von *gifA* und *gifB* reprimieren. Im Fall von Stickstoffmangel liegt NtcA in einer aktiver Form vor, wodurch die Expression von *glnA* positiv und die von *gifA* und *gifB* negativ reguliert wird. Für die Regulation der anderen Form der Glutaminsynthetase (GSIII)-Aktivität wurde gezeigt, dass die Stickstoffmangel-induzierte Expression des *glnN* Gens nicht in einer NtcA defizienten Mutante und in MP2 stattfindet. Das bedeutet, dass für die Aktivierung von *glnN*, P_{II} und die Bindung von NtcA an den *glnN* Promoter, der Ähnlichkeit zum NtcA-Bindemotiv aufweist, benötigt wird (Sauer *et al.*, 2000).

6. Regulation der N-Assimilierung (Ntr System) in Enterobakterien

Die Regulation der Stickstoffassimilierung ist in *E. coli* und in verwandten Organismen gut untersucht. Das globale Stickstoff regulatorische (Ntr) System besteht aus vier Proteinen:

- Das *glnD* Genprodukt, Uridylyltransferase/ Uridylyl-Removase (UTase/UR)
- Das *glnB* Genprodukt, das trimere signaltransduzierende Protein P_{II}

- Das Zweikomponenten-Regulationssystem, das aus einer Sensor-Histidin Protein Kinase (NtrB) und einem Response-Regulator Protein (NtrC) besteht.

Niedrige intrazelluläre Glutamin-Konzentrationen (N-Mangel-Signal) führen zur UTase-katalysierten Umwandlung von P_{II} und UTP zu P_{II}-UMP und PPi (Kamberov *et al.*, 1994, 1995, Jiang *et al.*, 1998) (Abb.2). Im Gegensatz dazu wird bei erhöhten Glutaminkonzentrationen (+N Zunahme-Signal) die UTase-Aktivität durch Bindung des Effektormoleküls Glutamin gehemmt, und es kommt in Folge dessen durch die UR-Aktivität zu einer Abspaltung des UMP-Restes von P_{II} (Abb.2) (Jiang *et al.*, 1998a). Darüber hinaus wird das unmodifizierte P_{II}-Trimer zusätzlich durch die Bindung von 2-Oxoglutarat (C-Signal) gehemmt (Liu und Magasanik, 1995; Jiang *et al.*, 1998a, 1998b, 1999). Ausgehend vom P_{II}-Protein wird dann das Signal (Glutamin / 2-Ketoglutarat) in Abhängigkeit vom P_{II}-Uridylierungsgrad über zwei Koordinierte Transduktionskaskaden übertragen:

A: Die Aktivität der Glutaminsynthetase unterliegt über reversible Adenylierung einer direkten N-Kontrolle, die durch die Adenyltransferase (ATase) katalysiert wird (Jaggi *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 1998b). Die Adenylierungsreaktion (GS Inaktivierung) wird dabei durch P_{II} stimuliert, während die Deadenylierung (GS-Aktivierung) in Gegenwart von P_{II}-UMP erfolgt (Abb. 2).

B: Zum anderen reguliert P_{II} über die Aktivität des NtrBC- Zweikomponentensystems die vom alternativen Sigma-Faktor RpoN (σ^{54} -Polymerase)-abhängige Expression des Glutaminsynthetase-Gens *glnA* (Ninfa und Magasanik *et al.*, 1986a) und aller weiteren Gene des Ntr-Regulons.

Unter Stickstoffgesättigten Bedingungen interagiert nicht-uridyliertes P_{II} mit NtrB. Durch diese Wechselwirkung wird NtrB zu einer spezifischen NtrC-P Phosphatase, die die Dephosphorylierung von NtrC katalysiert und NtrC dadurch inaktiviert (Merrick und Edwards, 1995). NtrB und NtrC sind Vertreter der Histidin-Kinase / Phosphatase und der Response-Regulator-Zweikomponenten-Familie (Stock *et al.*, 1989; Parkinson und Kofoid, 1992; Parkinson, 1993; Stewart *et al.*, 1998). Die Sensorkinase NtrB katalysiert unter N-Mangelbedingungen in einem ersten Schritt die Phosphorylierung eines eigenen Histidin-Restes. In einem zweiten Schritt wird die Phosphorylgruppe dann auf einen Aspartat-Rest des Transkriptionsaktivators NtrC übertragen, der darauf in seiner aktiven Form vorliegt (Weiss

und Magasanik 1988; Ninfa und Bennett, 1991; Sanders *et al.*, 1992; Ninfa *et al.*, 1993). Bei hohen intrazellulären Glutaminkonzentrationen (+N-Signal) wird NtrC-P durch die NtrB-Phosphatase-Aktivität wieder inaktiviert.

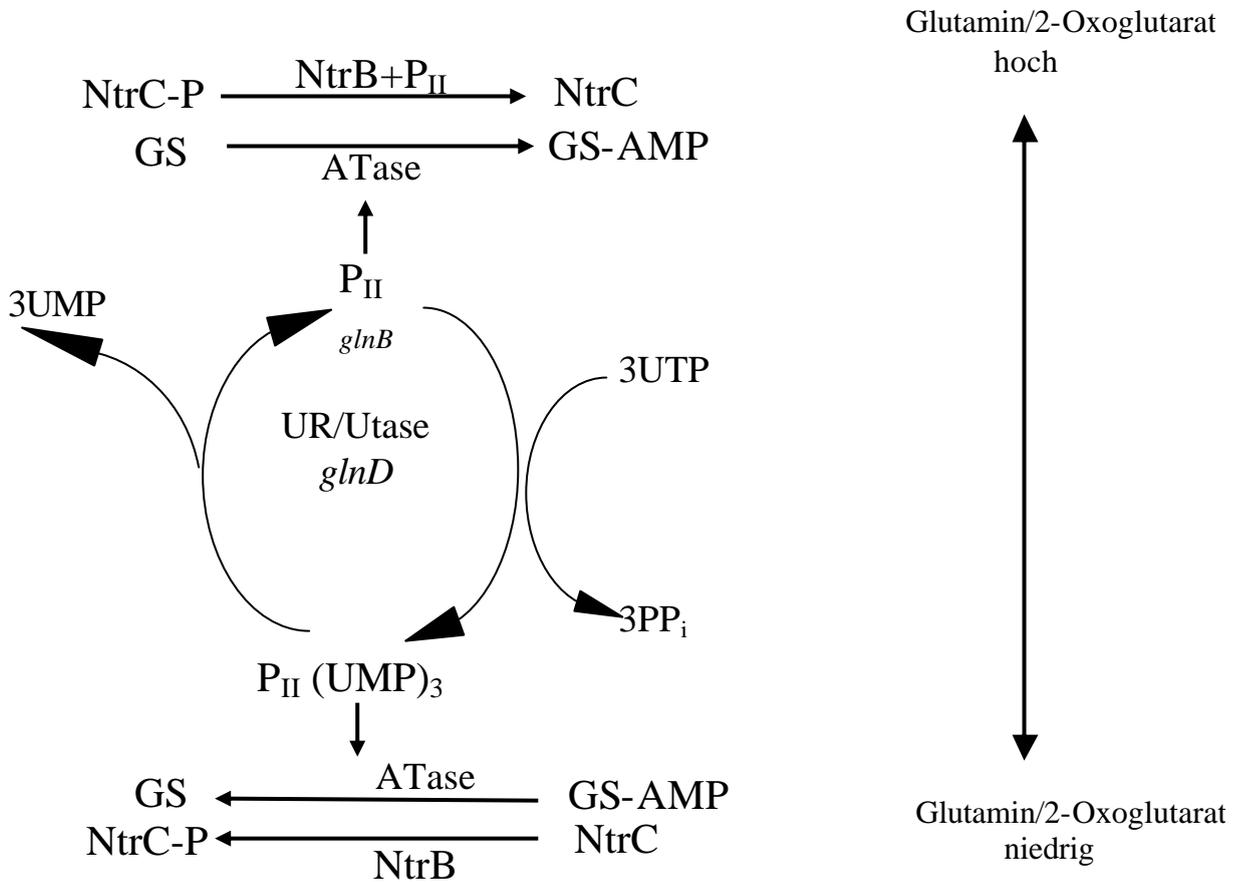


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Funktionsweise des enterobakteriellen Ntr-Systems. Die Abbildung zeigt die an der Stickstoffregulation beteiligten Komponenten und die bekannten regulatorischen Prozesse. Die Beschreibung der Abbildung ist im Text. (Abb. Aus Arcondeguy *et al.*, 2001)

GS: Glutaminsynthetase-

UTase/UR: Uridylyl-transferase/Uridylyl-removase-

ATase: Adenylytransferase.

Für die N-abhängige Regulation der NtrB-Aktivität wird das Signaltransduktionsprotein P_{II} benötigt. Das native unmodifizierte P_{II} interagiert bei ausreichenden Mengen von gebundenem Stickstoff mit NtrB, inhibiert die Kinase-Aktivität und stimuliert die Phosphatase-Aktivität des bifunktionellen Enzyms (Ninfa und Magasanik 1986; Atkinson *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1998, 1999). Dies führt zur Dephosphorylierung von NtrC-P und somit zur Inhibierung der Transkriptionsaktivierung. Unter N-Mangel-Bedingungen kann P_{II}

aufgrund seines uridylierten Zustandes nicht mit NtrB interagieren, wodurch die Kinase-Aktivität des Enzyms überwiegt und NtrC phosphoryliert wird (Abb. 2).

Zusätzlich zur Glutamin-abhängigen Regulation des Zweikomponenten-Systems führen erhöhte 2-Oxoglutarat-Mengen jedoch zu einer Inhibierung der P_{II} -NtrB-Interaktion (Jiang *et al.*, 1998c, 1999). Somit besitzt die Verfügbarkeit einer guten C-Quelle (die einen Anstieg der intrazellulären 2-Oxoglutarat-Konzentration zur Folge hat) auch in Gegenwart von Glutamin einen Einfluss auf die Regulation des N-Stoffwechsels und führt unter diesen Umständen zu einer verstärkten N-Assimilierung. Neue Untersuchungen zeigten, dass *E. coli* neben P_{II} ein weiteres P_{II} -homologes Protein besitzt, welches als GlnK bezeichnet wird (Van Heeswijk *et al.*, 1996). Während P_{II} unabhängig vom N-Status in gleichen Mengen in der Zelle vorkommt, unterliegt die Expression des *glnK*-Gens einer NtrC-vermittelten N-Kontrolle (Van Heeswijk *et al.*, 1996, Atkinson und Ninfa, 1998). GlnK kann in Abhängigkeit von der Glutamin-Konzentration durch GlnD uridyliert werden, und ist wie GlnB in der Lage, sowohl die ATase- als auch die NtrB-Aktivität zu regulieren (Van Heeswijk *et al.*, 1996, Atkinson und Ninfa, 1998). Da in *E. coli* *glnK*-Mutanten die N-Regulation nicht beeinträchtigt ist, bleibt die genaue Funktion von GlnK bislang im unklaren. Es wird jedoch vermutet, dass GlnK als eine Art "Erinnerungs-Protein" agiert und somit als Puffer des Ntr-Signaltransduktionssystems gegen geringfügige Änderungen der N-Verfügbarkeit dient.

Phosphoryliertes NtrC wirkt als Transkriptionsaktivator für das Gen der Glutaminsynthetase *glnA* (Arcondéguy *et al.*, 2001).

7. C-Stoffwechsel in Cyanobakterien

Alle Cyanobakterien können CO_2 über den reduktiven Pentosephosphatweg (Calvinzyklus) fixieren. Dabei wird CO_2 durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RubisCo) mit Ribulose-1,5-Bisphosphat zu einer intermediären C_6 -Verbindungen, die sofort zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerol (3-PGA) hydrolysiert und dann zu zwei Glyzerinaldehydphosphat (GAP) Molekülen umgesetzt wird. Aus sechs erzeugten 3-PGA Molekülen wird eines für anabole Zwecke abgezweigt und die anderen 5 Moleküle werden über die Bildung von Ribulose-1,5 Bisphosphat dem Calvin-Zyklus wieder zugeführt. Das 3-PGA-Molekül, das für anabole Reaktionen zur Verfügung steht, wird entweder für die Synthese von Zuckern und Glykogen verwendet, oder geht über Reaktionsschritte der Glykolyse und Teile des Zitronensäure-Zyklus (TCA-Zyklus) in die Synthese anderer organischer Zellbausteine ein.

In Cyanobakterien ist der TCA-Zyklus unvollständig, da die beiden Enzyme, Succinat- und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase fehlen (Stanier *et al.*, 1977). Das im TCA-Zyklus erzeugte 2-Oxoglutarat (2-OG) geht ausschließlich in den GS/GOGAT-Weg ein (Lea *et al.*, 1982). Das 2-OG bildet damit den zentralen Schnittpunkt zwischen C- und N- Stoffwechsel.

Cyanobakterien besitzen mehrere Aufnahmesysteme, die anorganische Kohlenstoffverbindungen, C_i (CO_2 und HCO_3^-), in die Zelle transportieren (Shibata *et al.*, 2001). Bei C_i -Knappheit exprimieren die Zellen hochaffine Bikarbonat-Transporter. Unter erhöhter CO_2 -Konzentration nimmt deren Aktivität wieder ab.

8. Nährstoffmangel in Bakterien

Seit 3,5 Milliarden Jahren gibt es Bakterien (Prokaryoten) auf der Erde. Das Geheimnis ihres Erfolges, Überleben zu können, ist die Fähigkeit, sich sehr schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Es gibt kaum ein Lebensraum, den sie nicht für sich erobern könnten. Selbst unter extremsten Bedingungen wie Kälte, Hitze, sauren Quellen oder mit Nährstoff-Limitierung können sie existieren. Der natürliche Lebensraum bietet seinen Bewohnern selten die optimale Versorgung für das Wachstum, deshalb müssen die Bakterien sich immer an die Umweltsveränderungen anpassen. z.B. das Ausbleichen der Zellen nach Nährstoffentzug ist eine charakteristische Eigenschaft des Anpassungsprozesses. So verursacht z.B. Stickstoffmangel in *S. elongatus* Farbveränderungen der Zellen (von blau-grün zu gelb-grün dann langsam hell-gelb) sowie auch Änderungen an Genexpressionprozessen. Dabei wird die Synthese einiger Proteine spezifisch durch Stickstoffmangel reguliert (wie P_{II}). Andere Proteine reagieren allgemein durch Nährstoffmangel, diese Veränderungen ermöglichen den Zellen weiter überleben zu können. Wenn den Zellen des nicht-diazotrophischen Cyanobakteriums *S. elongatus* der Stickstoff entzogen wird, wird die intensive blau-grüne Kultur rasch gelb-grün, dann langsam vollständig hell-gelb. Dieser Prozess der Chlorose kann in drei Stufen aufgeteilt werden:

Stufe 1 ist die sofortige Antwort auf Stickstoffentzug und ist durch die Degradation der Phycobiliproteine sowie auch durch die Abnahme der mRNAs und den Phycobiliproteinen identifiziert (Sauer *et al.*, 1999).

In Stufe 2 erfolgt der Abbau von Chlorophyll a.

Nach Abschluss der degradativen Prozesse (Stufe 1 und 2) gehen die Zellen in einen Ruhezustand (Stufe 3), in dem sie monatelang den Nährstoffmangel überdauern können. Phase 3 fängt unmittelbar an, wenn die Zellen vollständig Chlorophyll a degradiert haben und keine metabolische Aktivität mehr zu sehen ist.

9. Die Beziehung zwischen P_{II} und dem globalen Stickstoffregulator NtcA

In der NtcA-defizienten Mutante MNtcA ist der Phosphorylierungsgrad von P_{II} erheblich geringer als in Wildtyp. In der Mutante MNtcA lag P_{II} selbst 20 h nach Stickstoffentzug nahezu unphosphoryliert vor (Sauer *et al.*, 1999). Das bedeutet, dass die P_{II} -Kinase möglicherweise unter NtcA Kontrolle steht. Auch die Expression von *glnN* (GSIII) ist unter Stickstoffentzug spezifisch erhöht, in P_{II} -defizienten Mutanten ist diese Induktion allerdings nicht zu sehen (Sauer *et al.*, 2000).

Sauer untersuchte in seiner Doktorarbeit die Veränderung des Proteinsynthese-Musters in *S. elongatus* bei Stickstoffmangel, und konnte zeigen, dass viele Proteine, deren Abundanz sich nach Stickstoffentzug NtcA-abhängig verändert, in einer P_{II} -defizienten Mutante nicht auf N-Mangel reagierten, was auf eine P_{II} -vermittelte Aktivierung von NtcA unter Stickstoffmangelbedingungen hindeutet.

10. Transkription des *glnB*-Gens

Für das *glnB* Gen wurden zwei Transkriptionsstartpunkte identifiziert (Lee *et al.*, 1999) (Abb.3).

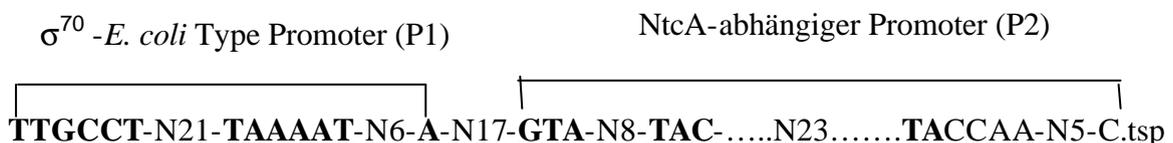


Abbildung 3 zeigt den Beiden Transkriptionsstartstellen in der *glnB*-Promoterregion in *S. elongatus*.

- Die Startstelle 1 (tsp1) gehört zu einem konstitutiven Promoter (P1), der 120 bp stromaufwärts vom *glnB* Start-Codons entfernt liegt und eine klassische “-35“ und “-10“ Box aufweist.
- Die Startstelle 2 (tsp2) mit dem dazugehörigen zweiten Promoter (P2) befindet sich stromabwärts der Startstelle 1 und 53 bp stromaufwärts vom *glnB* Start-Codon. Sie steht unter der Kontrolle von NtcA und hat eine kanonische “NtcA-Box“.

11. Ziele dieser Arbeit

Zu Beginn der Arbeit war die Beziehung zwischen dem transkriptionellen Aktivator NtcA und dem Signal-Protein P_{II} noch in Wesentlichen ungeklärt. Auch die für die Expression des *glnN*-Gens notwendigen Faktoren waren noch mitgehend unbekannt.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit bestand in der Bearbeitung der folgenden Punkte:

- 1) Identifizierung der Beziehung zwischen P_{II} als Signaltransduktion-Protein und NtcA als Transkriptional Aktivator, und zwar durch Analyse der Transkription des *glnB*-Genes unter verschiedenen Bedingungen.
- 2) Aufklärung der strukturellen Grundlagen der Regulation der Transkription des *glnN* - Genes in *S. elongatus* sowie Untersuchung der Rolle von P_{II} auf die Regulation des *glnN*-Genes.

Mit diesem Projekt sollen neue Einblicke in die mechanistische Grundlage der stickstoff-abhängigen Transkriptionsregulation in Cyanobakterien erarbeitet werden

B. Materialien und Methoden

1. Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Tabelle 2 enthält die Nukleotidsequenzen der eingesetzten Oligonukleotide und Tabelle 3 die verwendeten Plasmide.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Literatur
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Wildtyp	Kuhlemeier <i>et al.</i> , 1983
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	<i>glnB::kan^r</i>	Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	<i>ntcA::kan^rbleo^r</i>	Sauer <i>et al.</i> , 1999
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2-A	S49 von P _{II} durch Alanin ausgetauscht	Lee <i>et al.</i> , 2000
WT-FAM1580	Insertion des pFAM1580 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM1	Insertion des pFAM1 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM2	Insertion des pFAM2 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-431	Insertion des pFAM-431 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-314	Insertion des pFAM-314 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-226	Insertion des pFAM-226 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-176	Insertion des pFAM-176 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-120	Insertion des pFAM-120 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-112	Insertion des pFAM-112 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-103	Insertion des pFAM-103 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-93	Insertion des pFAM-93 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-84	Insertion des pFAM-84 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-431R	Insertion des pFAM-431R im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit

WT-FAM-431K	Insertion des pFAM-431K im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-84R	Insertion des pFAM-84R im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
WT-FAM-84K	Insertion des pFAM-84K im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
MP2-FAM1580	Insertion des pFAM1580 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM1	Insertion des pFAM1 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM2	Insertion des pFAM2 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-431	Insertion des pFAM-431 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-314	Insertion des pFAM-314 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-226	Insertion des pFAM-226 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-176	Insertion des pFAM-176 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-120	Insertion des pFAM-120 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-112	Insertion des pFAM-112 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-103	Insertion des pFAM-103 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-93	Insertion des pFAM-93 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-84	Insertion des pFAM-84 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-431R	Insertion des pFAM-431R im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-431K	Insertion des pFAM-431K im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-84R	Insertion des pFAM-84R im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MP2-FAM-84K	Insertion des pFAM-84K im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2	Diese Arbeit
MNtcA-FAM1580	Insertion des pFAM1580 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM1	Insertion des pFAM1 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM2	Insertion des pFAM2 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-431	Insertion des pFAM-431 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-314	Insertion des pFAM-314 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-226	Insertion des pFAM-226 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit

MNtcA-FAM-176	Insertion des pFAM-176 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-120	Insertion des pFAM-120 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-112	Insertion des pFAM-112 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-103	Insertion des pFAM-103 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-93	Insertion des pFAM-93 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-84	Insertion des pFAM-84 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-431R	Insertion des pFAM-431R im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-431K	Insertion des pFAM-431K im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-84R	Insertion des pFAM-84R im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MNtcA-FAM-84K	Insertion des pFAM-84K im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MNtcA	Diese Arbeit
MP2-A-FAM1	Insertion des pFAM1 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2-A	Diese Arbeit
MP2-A-FAM2	Insertion des pFAM2 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2-A	Diese Arbeit
MP2-A-FAM-431	Insertion des pFAM-431 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2-A	Diese Arbeit
MP2-A-FAM-84	Insertion des pFAM-84 im Genom <i>S. elongatus</i> PCC 7942 MP2-A	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>supE44 lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac, [F⁺ proAB, lacIZM15Tn10(Tet)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻, ompT, hsdB, (r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm, (DE3)</i>	Grodberg und Dunn, 1988
<i>Escherichia coli</i> HB101		Boyer <i>et al.</i> , 1969

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen verwendeter Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5`-3`)
PAM1580Seqf	TTCTACAAACTCCCGGATCC
PAM1580Seqr	GGTGAGTTGTTCAAATCAGGC
glnBP1	GGCTCGATAAAGTCGACAGG
glnBP2	GGGGCTAGCGTAGACAGCGAATTTTCGATTG
glnN pr1	GCTCTAGACCCGGGCTCGAGCTA

glnN pr2	GCTCTAGACTGGCCCTTGGTTCTGTAT
glnN pr3	GCTCTAGACATCAAATCTGGCCC
glnN pr4	GCTCTAGATTAGGCTTTTCATCAAAT
glnN pr5	GCTCTAGAGGCGATAACTTAGGC
glnN pr6	GCTCTAGACGCAAGGAGGCGATAACTTAGG
glnN pr7	GCTCTAGACCCATCCTTGTCCTGTCGGCTTC
glnN pr8	GCTCTAGACCTCTAATTTTCTCTTCAAAGG
glnN pr9	GCTCTAGAGCATCCTTCATAGGGTGCTGGC
Pu.glnN pr1	GGTTCTGTATCTTTTCTTACGATCGAGC
Pu.glnN pr2	CCTTGCTTCTCATTCTTTTCTAGCG
NtcA-Pr1	CCATATGCTGGCCAACGAAAATTCTCTGC
NtcA-Pr2	CAAGCTTGGAATCCCTGAGTTGGAGTG
glnB.biac-Pr1	Biotin-CCTGATCTTTCAGCAGTGGCTG
glnB.biac-Pr2	GGCAAACGGCCCCGGTCAGCGATTC
glnN.biac-Pr1	Biotin-GATTACAATTGCGATCGCAGAC
glnN.biac-Pr2	CTTTTGAAGAGAAAATTAGAGG
glnN-gelshift-pr1	GATTACAATTGCGATCGCAGAC
glnB-gelshift-pr2	CCTGATCTTTCAGCAGTGGCTG
NtcA-XhoI Pr2	CCTCGAGGGGAGCCTCAGCAACGGAATC

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pMP1B	pBluescript SK (+/-) + <i>glnB</i> aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Forchhammer und Hedler, 1997
pAM1580	Reporterplasmid	Michel <i>et al.</i> , 2001; Andersson <i>et al.</i> , 2000
pUD00003	pBluescript SK + <i>glnN</i> aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Dirmeier, Diplomarbeit 1998
pT7-7	Expressionsvektor	Tabor und Richardson, 1985
pET-15b	Expressionsvektor mit His ₆ -Tag	Novagen
pRK2013	Helferplasmid für die Konjugation; trägt tra-Gene	Figurski und Hellsinki, 1979
pRL542	Helferplasmid für die Konjugation	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
pRL443	<i>Conjugal</i> plasmid für die Konjugation	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

pMP1A	pBluescript SK (+/-) + <i>glnB</i> aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pT7-7 NtcA	PT7-7 + <i>ntcA</i> aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pET-15bNtcA	pET-15b + <i>ntcA</i> aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM1	pAM1580 + <i>glnB</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM2	pAM1580 + verkürzte <i>glnB</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-431	pAM1580 + <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-314	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-226	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-176	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-120	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-112	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-103	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-93	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-84	pAM1580 + verkürzte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-431K	pAM1580 + punktmutierte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-431R	pAM1580 + punktmutierte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-84K	pAM1580 + verkürzte und punktmutierte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit
pFAM-84R	pAM1580 + verkürzte und punktmutierte <i>glnN</i> -Promoter aus <i>S. elongatus</i> PCC 7942	Diese Arbeit

2. Anzuchtbedingungen

2.1 Kultivierung von Cyanobakterien

Für die Kultivierung des Cyanobakteriums *S. elongatus* (WT, MP2, MNtcA) unter Nitratwachstumbedingungen wurde das modifizierte BG11^N-Medium nach Görl *et al.*, (1998) verwendet. Wenn Ammonium als Stickstoffquelle verwendet wurde, wurde NaNO₃ durch 5 mM NH₄Cl ersetzt und das Medium mit 20 mM HEPES pH 7,8 gepuffert (BG11^A). Die Zellen wurden photoautotroph bei 30°C und einer konstanten Beleuchtung von 12 µM E (Osram LUMILUX deLuxe) in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml Nährmedium auf einem Schüttelinkubator (110-120 U/min) angezogen.

Um Zellen in stickstofffreies Medium zu überführen, wurden die Zellen erst in BG11^N Medium angezogen und durch Zentrifugation (10 min bei 3000 g) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen im demselben Medium aber ohne Stickstoff BG11⁰ (das Medium BG11⁰ wurde mit 20 mM HEPES pH 7,8 gepuffert) resuspendiert und wie zuvor weiterinkubiert.

Zur Aufrechterhaltung der Mutation in den Mutanten MP2 und MNtcA wurde bei der Anzucht der Stammkulturen dem Medium zusätzlich 30 µg/ml Kanamycin zugegeben. Für die MP2-A wurde dem Medium 30 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Streptomycin hinzugefügt. Für alle Cyanobakterienstämme die mit dem Plasmid pAM1580 oder seinen Varianten transformiert wurden, wurde dem Medium außerdem 5 µg/ml Chloramphenicol zugegeben.

Zur Anzucht auf festem Nährmedium wurde dem BG11^A -oder BG11^N-Medium 0.9 % (w/v) Gel-Rite (Roth) zugesetzt.

2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37°C in LB-Medium (Miller *et al.*, 1972). Die Antibiotika und Supplemente wurden in den üblichen Konzentrationen verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5% (w/v) Agar zugegeben. Die Massenzunahme wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen zur Hitzeschock-Transformation

Diese Methode ist anwendbar auf die meisten *E. coli*-K12-Stämme wie beispielsweise DH1, DH5x, XL1-Blue und deren Derivate. Die kompetenten Zellen können mehrere Monate gelagert werden, dürfen aber nicht aufgetaut und wieder tiefgefroren werden. Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock-Transformation werden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Zellen wurden bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert, bis sie eine optische Dichte von etwa 0,5 erreicht haben. Die Zellen wurden dann in SS34 Zentrifugenbecher überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 150 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml kaltem RFII-Puffer aufgenommen und in eiskalte Eppendorfcups aliquotiert (je 100 µl). Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 aufbewahren. Die Kompetenz der Zellen ließ sich mit Transformationen von 1 bis 0.01 µg eines Plasmids hoher Kopiezahl testen.

RFI: 100 mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, pH 5,8, 15% Glycerin

RFII: 10 mM Mops pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin.

3.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde kurz auf Eis aufgetaut. Dann wurde das Plasmid (2-5 ng) in einem Endvolumen von 10 µl zugegeben. Die Probe wurde kurz gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Der Transformationsansatz wurde 45 Sekunden bei 42°C inkubiert und schließlich noch mal für 2 min zurück auf Eis gestellt. Es wurde 800 µl von LB-Medium zugegeben. Anschließend wurde die Transformationsansatz eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Je nach erwarteter Transformationseffizienz und eingesetzter Plasmidmenge wurden 40-200 µl der transformierten *E. coli*-Zellen auf einer LB-Selektionsplatte ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C ausgewertet werden.

3.3 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen zur Elektroporation

Hier muss die im Medium vorhandene hohe Salzkonzentration durch mehrere Waschschrirte verringert werden. Ein zu hoher Salzanteil würde bei der Elektrotransformation zu einem Kurzschluss führen. Es wurde ein 1000 ml-Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium gefüllt und mit 5 ml einer Übernacktkultur beimpft. Der Kolben wurde bei 37°C unter Schütteln mit 180 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 erreicht ist. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher überführt und für 20 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 500 ml kaltem ddH₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 250 ml kaltem Wasser aufgenommen. Schließlich wurde das Zellsediment nach erneuter Zentrifugation in 10 ml kaltem 10%-igem Glycerin gewaschen und wieder zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 10%-igem Glycerin aufgenommen und aliquotiert (100 µl) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen können nun direkt für eine Elektroporation verwendet oder bei -70°C für mehrere Monate gelagert werden.

3.4 Elektroporation-Transformation

Es wurden 10 µl Plasmid-DNA (ca. 10 pg) oder Ligationsansatz (bis 30 ng) auf Eis mit 40 µl der kompetenten Zellen gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Transformationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt bei 1,8 kV, 25 µF, 10 ms (*E. coli*-Pulser BIO RAD). Die Probe wurde direkt nach der Transformation mit 500 µl LB-Medium gemischt und für 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl auf LB-Selektionsplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5 Transformation von Plasmiden in *S. elongatus*-Stämmen

Für die Transformation der Konstrukte in die *S. elongatus*-Stämme (WT, MP2, MNtcA, MP2-A) wurden zwei Methoden verwendet. Zuerst wurden die Konstrukte nach Golden *et al.*, (1987) ins *S. elongatus* transformiert. Diese Methode gelang nur bei dem Wildtypstamm. Für die Transformation in MP2, MNtcA und MP2-A mussten die Plasmide aus *E. coli* mittels Konjugation eingebracht werden (Elhai *et al.*, 1997).

3.5.1 Transformation von Plasmiden nach Golden *et al.*, 1987

Zuerst wurden 50 ml des *S. elongatus*-Stamms bis zu einer OD₇₅₀ von ca. 0,3 in BG11^N Medium angezogen. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min bei Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in 500 µl BG11^N-Medium resuspendiert. Zu 50 µl Zellsuspension wurde ca. 10 µl DNA (1,5 µg DNA in H₂O) zugegeben. Die Ansätze wurden 12-18 h bei 30°C ohne Licht inkubiert. Dann wurden 400 µl frisches BG11^N-Medium zugegeben und die Ansätze wurden 2-3 Stunde ans Licht gestellt. Anschließend wurden 100 µl Portionen auf 5 µg / ml Chloramphenicol-BG11^N-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei ca. 30°C im Licht inkubiert.

Nach ca. 3 Wochen sollten Einzelkolonien erscheinen. Die Einzelkolonien wurden gepickt und auf 5 µg / ml Chloramphenicolplatten ausgestrichen.

3.5.2 Transformation der Plasmide mittels Konjugation

Die MP2, MNtcA und MP2-A Stämme sind schlecht transformierbar, deshalb mussten die Plasmide aus *E. coli* mittels triparentaler Konjugation in diese Stämme eingebracht werden. Die verwendete Plasmide besitzen durch ihr Replikon eine breite Wirtsspezifität und tragen die *mob*-Region (mobilization). Diese kodiert für ein Mobilisierungsprotein, das den zum Transfer notwendigen Einzelstrangbruch des Plasmids einleitet. Für die Konjugation werden weiterhin die *tra*-Gene benötigt. Diese werden bei der Konjugation von dem Plasmid des so genannten Helferstammes HB101 (pRL442) oder HB101 (pRK2013) bereitgestellt. Die insgesamt 25 Gene innerhalb des *tra*-Operons sind für den Aufbau der F-Pili zuständig, die den zum Plasmidtransfer notwendigen Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzelle herstellen.

I-Vorbereitung von *E. coli*-Stämmen

Das *conjugal* Plasmid (pR443) wurde in *E. coli* HB101 transformiert. Es entstand der Stamm *E. coli* HB101pRL443. Das Hilfsplasmid (pRL542 oder pRK2013) und das *cargo*-Plasmid (im unser Fall pAM1580 oder seine Varianten) wurden in einem *E. coli* HB101-Stamm eingebracht, daraus entstand der Stamm *E. coli* HB101pRL542 pAM1580.

Von einer Übernachtskultur der Stämme HB101pRL443 und HB101pRL542pAM1580 wurden am nächsten Tag 1 : 20 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 angezogen. 1,5 ml von

beiden Stämmen wurde entnommen und 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit frischem LB-Medium zweimal gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen.

II- Vorbereitung der *S. elongatus* -Stämme (WT, MP2, MP2-A, MNtcA)

Die *S. elongatus*-Zellen wurden bis zu einer OD₇₅₀ von etwa 0,4-0,6 angezogen. Dann wurden die Zellen 3 min bei 5000 rpm und bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl frisches BG11^N Medium (für WT, MP2, MP2-A) bzw. BG11^A (für MNtcA) resuspendiert.

III- Der Konjugationsprozess

Die beiden Pellets der *E. coli* Stämme HB101pRL443 und HB101pRL542pAM1580 wurden zusammen mit 200 µl *S. elongatus*-Zellen gemischt und ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben (ca. 250 µl) wurden auf 5% LB-GN-Platten ausplattiert und im Lichtschrank bei 30°C für 1 Tag inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit 1 ml BG11^N-bzw. BG11^A-Medium abgewaschen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Dann wurden die Zellen einmal mit 0,9 % NaCl gewaschen und kurz zentrifugiert (5000 rpm, 1 min). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 0,9%iger NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden auf BG11^N-bzw. BG11^A-Platten ausplattiert (200 µl in jeder Platte). Die Platten wurden im Lichtschrank bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antibiotika in 1 ml BG11^N (für WT, MP2, MP2-A) bzw. 1 ml BG11^A (nur für MNtcA) unter die Gelschicht gespritzt und die Platten für 3 Wochen weiter inkubiert. Die Antibiotika sollten folgende Endkonzentrationen für die *S. elongatus*-Zellen haben:

5 µg / µl Chloramphenicol für WT-Zellen

5 µg / µl Chloramphenicol + 25 µg / µl Kanamycin für MP2 und MNtcA

5 µg / µl Chloramphenicol + 25 µg / µl Kanamycin + 10 µg / µl Streptomycin für MP2-A

Nach ca. 3 Wochen sollten Einzelkolonien erscheinen. Die Einzelkolonien wurden gepickt und auf Selektionplatten ausgestrichen.

4. Biochemische Methoden

4.1 Bestimmung der *Luciferase*-Aktivität in *S. elongatus* -Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Luciferase*-Expression als Maß für die Transkriptionseffizienz bestimmt. *Luciferasen* sind Enzyme, die ein Substrat, das Luceferin, unter der Emission von Licht umsetzen. Die hier verwendete *Luciferase* ist die *Vibrio harveyi Luciferase* (*luxAB*-Gene) (Michel *et al.*, 2001). Die Reaktion wird von dem Enzym *Luciferase* katalysiert. Ein langkettiges aliphatisches Aldehyd (*Dodecanal*) wird mit Hilfe von Flavinmononucleotid (FMN) und O₂ unter Lichtentwicklung oxidiert. Die Reaktion kann wie folgt ausgedrückt werden:



Das erzeugte Licht kann mittels eines Luminometers gemessen werden. Zur Messung der Lichtmenge wurde 1 ml der Cyanobakterien-Kultur mit einer OD₇₅₀ von 0,45 in ein 4 ml Röhrchen (SARSTEDT) pipettiert und mit 5 µl Dodecanalpuffer (Dodecanalstammlösung 50 mM) für 2 Sekunden gemischt. Hier ist die Endkonzentration von Dodecanal 0,25 mM. Das Röhrchen wurde in ein Luminometer (Berthold) gestellt. Die Lichtemission wurde in einem Zeitintervall von 30 Sekunden über einem Zeitraum von 20 Minuten gemessen. Die maximale Lichtemission, die nach 15 bis 20 min detektiert wurde, wurde als Messwert benutzt. Der Messwert ergibt sich in relativen Lichteinheiten (RLU: *relativ light unit*).

Dodecanalstammlösung (50 mM):

Es wurden 94 µl Dodecanallösung mit 906 µl DMSO in einer Eppendorf-Cup pipettiert (Dodecanal Endkonzentration 500 mM). Daraus wurde eine Stammlösung von 50 mM Dodecanallösung durch 1 : 10 Verdünnung in H₂O hergestellt.

4.2 Reinigung von NtcA

Mit einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 pET-15bNtcA wurde eine Tageskultur (1 l LB-Medium) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C angezogen. Dann wurde die Expression des *ntcA*-Gens durch Zugabe von 0,5 mM IPTG gestartet und die Zellen für 4 Stunden bei 32°C inkubiert. Die induzierten *E. coli* BL21 pET-15bNtcA-Zellen wurden am Ende der Expression mit 0,5 mM IPTG durch Zentrifugation

geerntet. Das Zellpellet (4,4 g) wurde in 22 ml kaltem Zellaufbruchs-puffer A (20 mM NaH_2PO_4 pH 7, 0,4 M NaCl, 10% Glycerin) resuspendiert. Zuerst wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt. Hierfür wurde das SS34-Gefäß, in dem sich die Zellsuspension befindet, in ein mit Eis gefülltes Glas gestellt, um die Erwärmung der Lösung zu vermeiden. Die Ultraschallsonde des Sonifiers (Bandelin Sonoplus GM70) wurde in die Zellsuspension gestellt und die Zellen für einmal 40 Sekunden bei Cycle 70 sonifiziert. Dann wurden die Zellen mittels *French-Press* aufgebrochen (dreimalige Passage bei 16.000 psi). PMSF (Hemmung von Serinproteasen) wird erst unmittelbar vor der Behandlung mit Ultraschall zugegeben. Es folgte eine fraktionierte Zentrifugation (10 min bei 5.000 rpm und 30 min bei 12.500 rpm) (BECKMAN J2-21-Zentrifuge).

Die Aufreinigung von NtcA-His₆ erfolgte über eine Ni-NTA Säule (Säulenbettvolumen 20µl, Qiagen). Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde auf die Ni-NTA Säule (2 x 10 ml) überführt. Als Waschpuffer wurde ein Puffer mit 50 mM NaH_2PO_4 , 0,3 M NaCl, 50 mM Imidazol bei pH 8 verwendet. Als Elutionspuffer wurde ein Puffer mit 50 mM NaH_2PO_4 , 0,3 M NaCl, 250 mM Imidazol bei pH 8 verwendet. Während der gesamten Aufreinigungsschritte der Chromatographie betrug die Flussrate 2,5 ml/min und die Fraktionen wurden in einem Volumen von 3 ml gesammelt. Die NtcA-Fraktionen wurden vereinigt. Das NtcA wurde mit einem Lagerpuffer über Nacht dialysiert.

NtcA-Lagerpuffer:

NaH_2PO_4	20 mM pH 7
NaCl	0.95 M
Glycerin	50 %

Das gereinigte His-NtcA-Protein wurde bei -20°C aufbewahrt.

4.3 Bestimmung der NtcA-Konzentration nach Bradford

Es wurden 798 µl Aqua dest. in eine 1 ml Küvette gegeben und 2 µl von His₆-NtcA zugegeben. Zu diesem Mix wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Roti[®]-Quant, Roth) hinzugefügt und gut mit der Probe vermischt. Als Leerwert wurden 798 µl Aqua dest. in eine 1 ml Küvette gegeben und mit 2 µl NtcA-Lagerpuffer vermischt, zu denen wurde 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben und gut gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Der Faktor, der für

die Bradford-Lösung durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve bestimmt wurde, betrug während der laufenden Arbeit 17,5. Die Gesamtproteinkonzentration berechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{OD_{595} * 17.5}{V_{NtcA}} = \frac{0.205 * 17.5 *}{2} = 1.79 \text{ mg / ml}$$

4.4 Protein-DNA-Interaktionsstudien

4.4.1 Protein-DNA-Interaktionsstudien mittels *Biacore*

Für die Interaktionsmessungen zwischen NtcA und P_{II} wurde das Gerät *BIACORE X* verwendet. Dieses besteht aus einer zentralen Meßeinheit mit automatischen Pipettiersystem, gesteuert von einem Computer mit spezieller Software *BIAsimulation*. Fließgeschwindigkeit des Puffers, Temperatur, sowie auch die Probeninjektion können über den Computer gesteuert werden.

4.4.1.1 Herstellung der biotinylierten DNA-Fragmente für die *Biacore*-Experimente

Es wurden über PCR zwei 5'-End-biotinierte Fragmente hergestellt (Abb. 4):

- Das erste 135 bp Fragment A, das keine NtcA-Bindestelle enthält, wurde aus dem Bereich des *glnN*-Promoters durch Verwendung des Plasmides FAM-431 und des beiden Primern, eines am 5'-End-biotinierten Primers (*glnN.biac-pr1*), eines zweiten unmodifizierte Primer (*glnN.biac-pr2*) über PCR hergestellt.
- Das zweite 123 bp Fragment B, das eine NtcA-Bindestelle in der Mitte des Fragments enthält, wurde aus dem Bereich des *glnB*-Promoters durch Verwendung eines am 5'-Ende biotinierten Primers (*glnB.biac-pr1*), und eines zweiten unmodifizierten Primers (*glnB.biac-pr2*) und als *template* das Plasmid pFAM1 über PCR hergestellt.

Die biotinierte DNA wurde aus dem Agarosegel mit Hilfe des Qiagen Kits (Gel-Extraktion) gereinigt und in Puffer (50 mM HEPES pH 7,5 und 100 mM NaCl) gelöst. Anschließend wurden die beiden Fragmente auf einem Streptavidinchip (SA) immobilisiert.

Fragment A (135 bp)

5`Biotin-GATTACAATT GCGATCGCAG ACTCTGCATC CTCATAGGG
 TGCTGGCATT TTCCAGTCTT TTGAGAACTG AAAATAAGTA
 ATTA AAAAACC CTATAAATCA AGGCTGATGA TAACCTCTAA
 TTTTCTCTTC AAAAG

Fragment B (123 bp)

5`Biotin-CCTGATCTTT CAGCAGTGGC TGATTAAAAT GTAGACAGCG
 AATTTTCGAT TGCTGTAGCA GTAACTACAA CTGTGGTCTA
 GTCAGCGGTG TTACCAAAGA ATCGCTGACC GGGGCCGTTT GCC-3`

Abbildung 4: Die beiden Fragmente, die für die *Biacore*-Experimente verwendet wurden.

4.4.1.2 Immobilisierung der 5´-biotinierten DNA-Fragmente auf dem SA-Chip

Die Immobilisierung der DNA für die Messung erfolgte über kovalente Bindung zwischen biotinyliertem DNA-Fragment und einem Chip mit SA-Oberfläche. Das biotinylierte DNA-Fragment A (ca. 2 µg) wurde auf der einen Fließzelle (Fc₁) eines SA-Chips, das zweite biotinylierte DNA-Fragment B auf der zweiten Fließzelle (Fc₂) des SA-Chips immobilisiert. Während der 10-minütigen Injektion von insgesamt 2 µg DNA mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 µl/min über den Chip wurde die SA-Oberfläche mit DNA gesättigt.

DNA-Injektionspuffer (50 µl): 50 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 µg DNA.

4.4.1.3 Messung der Interaktion von NtcA mit DNA bzw. mit PII

Ni-NTA-aufgereinigtes NtcA-His₆ wurde im *Biacore X* – Gerät über einen SA-Chip mit immobilisierter DNA geleitet, um mögliche NtcA-DNA-Bindung und NtcA-P_{II} Interaktionen zu untersuchen.

Das SA-Chip mit der entsprechenden DNA wurde an das Gerät angedockt und das System mit dem Laufpuffer (1x TBE) gespült. Die Temperatur wurde auf 24,5°C und die Fließgeschwindigkeit auf 80 µl/min gestellt. Die Injektion von 120 µl (100 + 20 µl) erfolgte in der Regel mit einer NtcA-Konzentration von 8 ng/µl. Es wurde der Puffer von Wray *et al.*, 1998 (50 mM Hepes pH 7; 50 mM Natriumacetat; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 100 µg / ml

BSA) verwendet. Die Probe floß über die beiden Fließzellen des SA-Chips. Der gesamte Messverlauf wurde von der Software in einem Sensorgramm dargestellt. Anschließend erfolgte durch einmaliges Waschen mit 0,05% SDS oder mit 0,5% SDS im Falle stärkere Bindung, um den Chip für weitere Messungen verwenden zu können. Eine typische Injektionsprobe ist hier gezeigt:

Injektionsprobe (140 µl)

Puffer nach Wray	von 1x	100,6	µl	
NtcA	von 40 ng/µl	28	µl	Endkonzentration 8 ng/µl
2-OG	10 mM	2,8	µl	Endkonzentration 0.2 mM
PII	100 ng/µl	7	µl	Endkonzentration 5 ng/µl
ATP	50 mM	1,6	µl	Endkonzentration 0.6 mM

4.4.2 Protein-DNA-Interaktionsstudien mittels Gel-Retardations-Experimenten

Um die spezifische Wechselwirkung zwischen Proteinen und DNA-Fragmenten zu untersuchen, kann man den Effekt ausnutzen, dass proteingebundene DNA gegenüber freier DNA eine Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität aufweist. Die Wanderung von Nukleinsäuren in einem Polyacrylamidgel wird durch Komplexbildung mit Proteinen retardiert. Der entstandene *band-shift* ist stark abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration.

4.4.2.1 Herstellung des 123 bp *Shift*-Fragmentes durch PCR

Zur Herstellung des ds 123 bp *Shift*-Fragmentes wurden die Primer glnB.biac-Pr2 und die Primer glnB-gelshift-pr2 verwendet. Als *template* wurde das Plasmid pFAM1 verwendet. Das 123 bp *Shift*-Fragment ist das gleiche Fragment A, das in den *Biacore*-Experimenten eingesetzt wurde, allerdings ohne Biotin. Es besitzt nur eine klassische Erkennungsstelle für NtcA mit der palindromen Sequenz GTA-N₈-TAC. Das Fragment wurde aus einem 1%iges Agarosegel isoliert und mit Hilfe des Qiagen Kit Gel-Extraktion gereinigt. Die DNA wurde in 40 µl H₂O gelöst. Die erhaltene DNA beträgt 64 µg/ml.

4.4.2.2 Radioaktive Markierung des DNA-Fragments

Für *Gelshift*-Experimente war es notwendig, Oligonukleotide mit [γ - ^{32}P]-ATP radioaktiv zu markieren. Ein Reaktionsansatz für die Markierung hatte folgende Zusammensetzung:

Markierungsansatz (15 μl):

8	μl DNA-Fragment (ds)	ca. 500 ng
1.5	μl T4-PNK-Puffer (10 x)	
2	μl [γ - ^{32}P]-ATP	10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
2	μl T4-PNK	(10 U)
1.5	μl H_2O	

Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei 37°C.

Der terminale Phosphatrest von ATP wird dabei auf die 5-OH-Gruppe des DNA-Fragments übertragen. Da der größte Teil des [γ - ^{32}P]-ATP nicht in das DNA-Fragment eingebaut wird, muss die uninkorporierte Radioaktivität mit Hilfe des Nukleotid *Removal-Kits* von Qiagen (mittels G50 *micro-Column*) entfernt werden. Mit Hilfe von Szintillationsmessungen wurde eine spezifische Radioaktivität von 19.301 cpm/ μl (DNA: 10 ng/ μl) ermittelt.

4.4.2.3 Der *Shift*-Reaktionsansatz

NtcA und DNA-Fragment wurden in einem Reaktionspuffer pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden auf einem nativen 6%igen TBE-Gel in 1x TBE-Puffer aufgetragen. Eine bessere elektrophoretische Auftrennung wird erreicht, indem das polymerisierte Gel für eine Stunde Vorlauf unterzogen wird und die Probentaschen vor Befüllung erneut mit Elektrophoresepuffer ausgespült werden. Der Vorlauf des Gels sowie die Auftrennung von gebundener und freier DNA wurden bei einer Spannung von 80 bis 120 Volt durchgeführt. Das Gel wurde mit Hilfe eines Trockners (1,5 Stunde bei 70°C) auf Whatman-Papier getrocknet. Die qualitative Auswertung des *Gelshifts* erfolgte durch Autoradiographie mittels *Molecular Imager FX* und *Screen Eraser* (beide Bio-Rad).

Shift-Ansatz (20 µl)

5x Puffer H (s.u.)		4	µl	
NtcA (verdünnt mit 1x Puffer H)	von 5 ng/µl	2	µl	Endkonzentration 0,5 ng/µl
2-OG	10 mM	1,2	µl	Endkonzentration 0,6 mM
PII	100 ng/µl	2	µl	Endkonzentration 10 ng/µl
ATP	10 mM	2	µl	Endkonzentration 1 mM
DNA	1 ng/µl, 2000 cpm/µl	2	µl	= 4000 cpm/20µl
MgCl ₂	100 mM	1	µl	Endkonzentration 5 mM
H ₂ O		5,8	µl	

5x Puffer H (Wray *et al.*, 1998): 250 mM Hepes pH 7; 250 mM Natriumacetat; 5 mM DTT; 5 mM EDTA; 500 µg/ml BSA; 125 µg/ml lacksperm DNA; 25% Glycerol.

4.5 NtcA-ATPase Reaktion

Eine unbekannt Reaktion zwischen NtcA und ATP wurde während den NtcA-*Cross Linking*-Experimenten entdeckt. Diese Reaktion ist stark abhängig von Magnesium. Als Reaktionspuffer wurde Puffer H (50 mM Hepes pH 7; 50 mM Natriumacetat, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% Glycerol) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz für die NtcA-ATPase Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

NtcA-ATPase-Reaktionsansatz (20 µl)

5x Puffer H		4	µl
*ATP	0.1 µCi/µl – 1 mM	2	µl Endkonzentration: 0.2 µCi/20 µl- 100µM
NtcA	1 µg/µl	2	µl
2-OG	10 mM	1	µl
MgCl ₂	100 mM	2	µl
H ₂ O		12	µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl SDS-Auftragspuffer gemischt und auf einer 16%igen SDS-PAGE aufgetragen und für ca. 1 Stunde laufen gelassen. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt. Mit Hilfe des Trockners wurde das Gel auf Whatman-Papier getrocknet. Das Gel-Papier wurde zwei Tage auf den *Screen* gelegt. Anschließend erfolgte die Auswertung des Gels durch Autoradiographie mittels *Molecular Imager FX* (Bio-Rad).

Für die Behandlung der Proben durch UV-Strahlung wurden die Reaktionsansätze in eine UV-Platte pipettiert, dann wurde die Platte auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer UV-Handlampe (254 nm) 40 min bestrahlt. Dann wurden die Proben auf das 16%ige SDS-Gel aufgetragen.

4.6 Norit A-Test

Es wurden 20 μl ATP-NtcA-Reaktion mit γ - ^{32}P -ATP hergestellt (siehe Absatz 4.5). Diese Probe wurde 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Radioaktivität der 20 μl Probe durch die Szintillationsmessung bestimmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 125 μl eiskalter Norit A-Lösung (950 mM HCl; 90 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 2 mM NaH_2PO_4 , 4% (w/v) Norit A) gestoppt und kurz zentrifugiert (4 min bei 14000 g). Von ca. 100 μl Überstand wurden 75 μl entnommen und die Menge des freigesetzten Phosphats durch Szintillationsmessung bestimmt.

5. Dünnschichtchromatographie

Um heraus zu finden, ob das NtcA-Protein ATP hydrolysieren kann, wurde die Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Hier wurden die TLC Platten von Polygram Cel 300 PEI/UV₂₅₄ (20 x 20 cm) genutzt.

5.1 Dünnschichtchromatographie mittels Polygram Cel 300 PEI-Platten

Es wurde 20 μl der Proben wie in Absatz 4.5 von NtcA-ATP-Reaktionen hergestellt. Von denen wurden nur 2 μl auf die TLC-Platten aufgetragen. Zuerst wurde auf die Platte eine schwache Startlinie mit Bleistift gezeichnet, die 1,5 cm weit von dem Rand der Platte entfernt war. Auf dieser Startlinie wurden 12 Stellen mit Bleistift in Abstand von 1,5 cm punktiert. Dann wurden 2 μl Probe (2x 1 μl) auf die Punkte pipettiert. Die Konzentration der Radioaktivität beträgt pro Ansatz einen Wert von 0.02 μCi . Zusätzlich wurden als Standards je 2 μl einer 5 mM ATP-, ADP-, und ATP-Lösung aufgetragen. Nach dem Auftragen lässt man das Lösungsmittel der Proben vollständig abdunsten (etwa 10 Minuten) oder hilft mit einem Fön nach. Die Entwicklung des Chromatogramms sollte auf jeden Fall erst erfolgen, wenn das Lösungsmittel der aufgetragenen Proben vollständig verdampft ist. Die Platte wurde in einer gesättigten Dünnschichtkammer entwickelt. Dazu wurde der Boden der Kammer auf ca. 1 cm Höhe (entspricht 100 ml von Fließmittel in der Kammer) mit Fließmittel gefüllt. Die

Platte wurde in die Kammer, und somit in das Fließmittel, langsam und vorsichtig gestellt, damit die Plattenschicht nicht verletzt wird. Verletzte Schichten führen zu ungleichmäßig geformten Flecken. Durch Kapillarkräfte steigt das Fließmittel in der Dünnschichtplatte nach oben und nimmt damit die in den Proben enthaltenen Substanzen mit. Aufgrund der verschiedenen Verteilungskoeffizienten können die Proben aufgetrennt werden. Die Platte wurde für ca. 2 Stunden in die TLC-Kammer gestellt. Kurz vor der Ankunft des Fließmittels am Rand der Platte wurde die Platte entnommen und mit einem Fön getrocknet. Die Auswertung der TLC Platte erfolgte durch Autoradiographie mittels *Molecular Imager FX* und *Screen Eraser* (Bio-Rad) und für die Standardproben durch eine UV-Handlampe (254 nm). Als Fließmittel wurde hier ein Phosphatpuffer [0,5 M KH_2PO_4 pH 3,4] verwendet.

6. Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase-chain-reaction PCR*)

Mit Hilfe der PCR können kleinste Mengen spezifischer DNA-Sequenzen amplifiziert und nachgewiesen werden. In dieser Arbeit kommt das PCR-Verfahren zum Einsatz bei:

- PCR für Isolierung und Klonierung bestimmter DNA-Fragmente
- Gerichtete Mutagenese PCR (nach Kirsch und Joly, 1998)

6.1 PCR für Isolierung und Klonierung bestimmter DNA-Fragmente

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die DNA-Ansätze mit Hilfe der PCR in einem DNA Thermal Cycler (PCRSprint) in einem Gesamtvolumen von 50 μl durchgeführt. Die PCR erfolgte unter Verwendung der *Taq*-Polymerase (*BioLabs*) in Gegenwart der vom Hersteller empfohlenen Puffer und Konzentrationen an Desoxinukleotiden und Oligonukleotiden. Als DNA-*Template* wurde Plasmid-DNA (0,5-10 ng pro Reaktion) oder genomische DNA (bis 100 ng pro Reaktion) verwendet. Zur Amplifikation von DNA aus Bakterienzellen wurden die Zellen einer Kolonie in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 30 μl H_2O resuspendiert. Die Zellen wurden durch 3 minütiges Erhitzen in der Mikrowelle (800 Watt) aufgebrochen. Die Ansätze wurden kurz auf den Eis gestellt. Anschließend wurden die restlichen Reaktionsansätzen zugegeben.

Verwendete Programme:

	Temp.	Zeit	Zyklus.Nr
Initial-Denaturierung	94°C	2 min	1 x
Denaturierung	94°C	15 Sek	20 x – 30 x
Hybridisierung	45°C - 65°C ^(A)	30 Sek	
Ketten-Verlängerung	72°C	1 min / kb	
End-Verlängerung	72°C	7 min	1 x
Kühlung	4°C		

A: ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer.

Im Anschluß erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte mit Hilfe des *PCR-Purifikation-Kit* (QIAGEN).

6.2 Gerichtete Mutagenese PCR (nach Kirsch und Joly, 1998)

Die gerichtete PCR-Mutagenese (*site directed mutagenesis*) wurde durchgeführt, um die Veränderung der putativen NtcA-Bindestelle in der *glnN*-Promoterregion durch Punktmutation herzustellen. Zur Erhaltung einer Punktmutation wurde Primer mit einer oder mehreren Basenfehlpaarungen (*mismatch*-Primer) verwendet. Mit Hilfe der *Software* Vector NTI wurden diese *mismatch Primer* geplant und bei MWG bestellt.

Die Einführung der Punktmutation mittels PCR-Mutagenese läuft in zwei PCR-Reaktionen ab. In der ersten PCR werden zwei Oligonukleotide verwendet, wobei der erste Primer die gewünschte Mutation enthält, während der andere Primer keine Mutation enthält. Aus der ersten PCR entstand ein etwa 200 bp langer, doppelsträngiger *Megaprimer*. Dieser *Megaprimer*, der nun die gewünschte Mutation enthält, wurde mit dem *PCR-Purifikation-Kit* (QIAGEN) gereinigt und in die zweite PCR eingesetzt. Die zweite PCR dient unter Einsatz des Megaprimers und des Wildtyp-*Templates* der Amplifikation des Plasmids mit entsprechender Mutation. Anschließend wurde das Wildtyp-Plasmid mit *DpnI* verdaut. Danach wurde das PCR-Produkt durch Fällung aufkonzentriert und durch Elektrotarnsformation in *E. coli XL1 blue* eingebracht. Die richtigen Transformanten wurden durch Sequenzierung ermittelt.

PCR I

Ziel dieses Schrittes ist es, die Punktmutation im Bereich der nicht kanonischen NtcA-Bindestelle im *glnN*-Promoter in Form eines Megaprimers herzustellen. Folgender Pipettieransatz wurde verwendet:

Ansatz der PCR I (50 μ l):

Pfu-Puffer	10 x	5 μ l
dNTP's	2 mM	1 μ l
Mutageneseprimer	4 μ M	1 μ l
Gegenprimer	4 μ M	1 μ l
<i>Template</i> (pFAM-431)	20 ng / μ l	2 μ l
Pfu-Polymerase	1 U / μ l	1 μ l
H ₂ O		39 μ l

Die PCR-Reaktion wurde wie in Abschnitt 6.1 durchgeführt. Das PCR I Produkt wurde elektrophoretisch (1 % Agarosegel) auf die korrekte Länge überprüft. Mit Hilfe eines Qiagen-*kits* wurde das DNA-Fragment aufgereinigt und anschließend in die PCR II als *megaprimer* eingesetzt.

PCR II

Wie vorher erwähnt wird die zweite PCR durchgeführt, um das gesamte Plasmid mit der entsprechenden Mutation zu amplifizieren.

Ansatz der PCR II (50 μ l):

Pfu-Puffer	10 x	5 μ l
dNTP's	2 mM	2 μ l
Megaprimer	20 ng / μ l	10 μ l
<i>Template</i> (pFAM-431)	40 ng / μ l	3 μ l
Pfu-Polymerase	1 U / μ l	2 μ l
H ₂ O		28 μ l

Die PCR-Reaktion wurde wie folgendes durchgeführt:

	Temp.	Zeit	Zyklus.Nr
Initial Denaturierung	95°C	2 min	1 x
Denaturierung	95°C	50 Sek	8 x
Hybridisierung	55°C	50 Sek	
Ketten-Verlängerung	68°C	25 min	
Denaturierung	95°C	50 Sek	8 x
Hybridisierung	55°C	50 Sek	
Ketten-Verlängerung	68°C	25 min + 10 Sek	
End-Verlängerung	68°C	7 min	1 x
Kühlung	4°C		

7. Klonierungen

7.1 Klonierung der pFAM1 und pFAM2 Konstrukte

Das Konstrukt pFAM1 ist aus dem Vektor pAM1580 (10806 bp) (Andersson *et al.*, 2000) entstanden. Zunächst wurde das Plasmid pMP1A hergestellt. Es unterscheidet sich vom Plasmid pMP1B dadurch, dass das 1.5 kb *PstI-glnB* Genfragment sich in umgekehrter Orientierung befindet (Forchhammer und Hedler, 1997). Dann wurde das 659 bp *XhoI* Fragment, das den gesamten *glnB*-Promoter und einen Teil des *glnB* Gens bis 183 bp stromabwärts vom TTG Start-Codon enthält, aus dem Plasmid pMP1A geschnitten, und in die *XhoI* Schnittstelle des Plasmids pAM1580 eingesetzt. Damit entstand das Plasmid pFAM1 (11465 bp). (Anhang 1)

Das zweite Konstrukt pFAM2, in dem der Promoter P1 fehlt, wurde aus dem Plasmid pFAM1 hergestellt: Zuerst wurde das 356 bp Fragment unter Verwendung der Oligonukleotide *glnBPr1* und *glnBP2* durch PCR Amplifikation aus dem Plasmid pFAM1 gewonnen. Der Primer *glnBP2* bindet an einer Stelle 24 bp stromaufwärts von der *NtcA*-Bindestelle des *glnB* Promoters 2 und direkt stromabwärts des σ^{70} -ähnlichen Promoter, und hat eine *NheI* Schnittstelle. Der Primer *glnBPr1* bindet an die „multiple cloning site“ in pFAM1 und hat eine *Sall* Schnittstelle. Das amplifizierte Produkt wurde mit *Sall* und *NheI* geschnitten und in die *Sall*- *NheI*-Schnittstellen des Plasmids pAM1580 kloniert, damit entstand das Plasmid pFAM2 (11136 bp). (Anhang 2)

7.2 Klonierung der *glnN*-Konstrukte

Es wurden 9 Konstrukte des *glnN*-Promoters mit dem *luxAB*-Reporter gen hergestellt. Zuerst wurde das wichtige Konstrukt (pFAM-431), das den gesamten *glnN*-Promoter vor *luxAB* aufweist, hergestellt. Aus diesem Konstrukt wurden alle anderen 8 Konstrukte hergestellt.

Für das erste Konstrukt (pFAM-431) wurde die gesamte Promoterregion des *glnN*-Gens (454 bp) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SmaI* und *XbaI* aus dem Plasmid pUD00003 (Diplomarbeit von Ulrike Dirmeier) isoliert. Dieses Fragment wurde aus einem 1 %igen Agarosegel entnommen, gereinigt und in die *XbaI*-*StuI* Schnittstellen der pAM1580 kloniert. Dabei entstand das Hauptplasmid pFAM-431 (11248 bp) (Anhang 3).

Für das zweite Konstrukt (pFAM-84) wurde aus dem Plasmid pFAM-431 entstanden. Dafür wurde der Primer *glnN* pr1 und der Primer *glnN* pr2 verwendet. Der Primer *glnN* pr1 bindet direkt an die *XbaI*-Schnittstelle von pFAM-431. Der zweite Primer bindet an einer Stelle 14 bp stromaufwärts von der *NtcA*-Bindestelle des *glnN*-Promoters und hat eine *XbaI* Schnittstelle. Nach der PCR-Amplifikation des gesamten Plasmids pFAM-431 wurde das erhaltene Fragment aus dem 0,7%igen Agarosegel entnommen, gereinigt und mit *XbaI* geschnitten und das Fragment zusammenligiert. Damit entstand das Plasmid pFAM-84 (10905 bp). (Anhang 4)

Die anderen 7 Plasmide wurden durch PCR-Amplifikation aus dem Plasmid pFAM-431 gewonnen. Dafür wurden die Primer (*glnN* pr3, *glnN* pr4, *glnN* pr5, *glnN* pr6, *glnN* pr7, *glnN* pr8, *glnN* pr9), die an verschiedene *glnN*-Promoterregionen binden (Abb. 5). Alle diese Primer haben jeweils am 5'-Ende die *XbaI*-Schnittstelle. Als 3'-Primer wurde der Primer pAM1580seqr verwendet, der ca. 15 bp stromabwärts der einzige *Sall*-Schnittstelle von pFAM-431 bindet. Nach der PCR-Amplifikation wurden diese Fragmente (160, 170, 197, 205, 261, 311, 399 bp) erhalten. Nun um die Fragmente mit *XbaI* und *Sall* gut zu schneiden, wurden die erhaltenen Fragmente mit dem sogenannten T-Vektor (pGEM-T Vektor) ligiert. Dann wurden die Fragmente, die im T-Vektor kloniert wurden, mit *XbaI* und *Sall* geschnitten, und in den gleichen Schnittstellen von pAM1580 ligiert. Daraus entstanden die genannte Plasmide (pFAM-93, pFAM-103, pFAM-112, pFAM-120, pFAM-176, pFAM-226, pFAM-314).

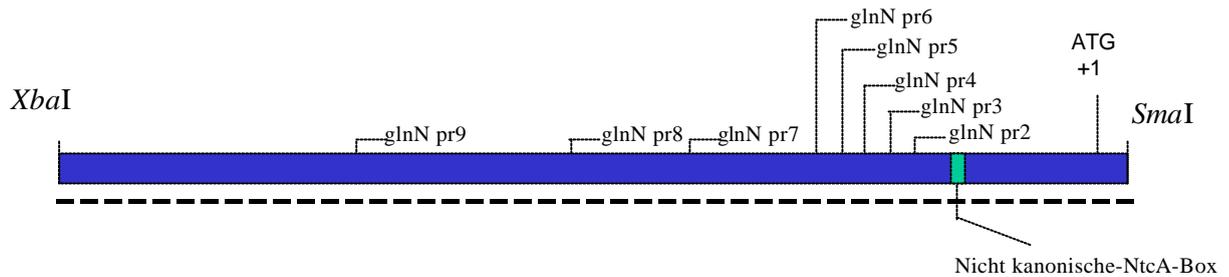


Abb. 5: Schematische Darstellung der *glnN*-Promoterregion, die vor das *luxAB*-Reportergen kloniert wurde, sowie auch der entsprechenden Primer, die für alle *glnN*-Konstrukte verwendet wurden. Ein Strich entspricht 10 bp. Der ganze Promoter ist 456 bp lang.

7.3 Klonierung der mutierten *glnN*-Promoter Konstrukten

Alle vier neuen Konstrukte wurden mittels Mutagenese PCR (Kirsch und Joly, 1998) kloniert. Zuerst wurden zwei 5'-Primer benutzt: pu.glnNpr1, der eine perfekte NtcA-Bindestelle, und pu.glnNpr2, der keine NtcA-Bindestelle besitzt. Die beiden Primer binden direkt an die nicht perfekte NtcA-Bindestelle des *glnN*-Promoters. Als 3'-Primer wurde der Primer pAM1580seqr verwendet, der ca. 15 bp stromabwärts der einzige *Sall*-Schnittstelle von pFAM-431. Zunächst wurde eine PCR mittels pu.glnNpr.1 und pAM1580seqr in pFAM-84 amplifiziert. Dadurch wurde ein ca. 135 bp Fragment gewonnen, das eine perfekte NtcA-Bindestelle hat. Mittels des anderen Primernpaares: pu.glnNpr 2 und pAM1580seqr wurde ein ca. 135 bp Fragment gewonnen, das keine NtcA Bindestelle hat. Diese neuen Fragmente wurden als Megaprimer benutzt, und per PCR wurde das Plasmid pFAM-84 bzw. das Plasmid pFAM-431 amplifiziert (6.2). Nach der Amplifikation wurden die PCR Produkte mit *DpnI* (schneidet nur im Wildtyp Plasmide nicht aber in PCR Produkte) gespalten und mit Qiagen (*PCR-Purification kit*) gereinigt und durch Fällung aufkonzentriert. Durch Elektroporation wurden die erhaltene Plasmide in *XLI* blue Zellen transformiert. Die richtigen Konstrukte wurden mittels Restriktion und Sequenzierung identifiziert. Damit wurde die genannte Plasmide (pFAM-84R, pFAM-84K, pFAM-431R und pFAM-431K) erhalten.

7.4 Klonierung von NtcA in den Expressionsvektor

Das *ntcA*-Gen wurde in zwei Überexpressionsvektor (pT7-7 und pET15-b) kloniert. Zuerst wurde *ntcA* in den Expressionsvektor pT7-7 kloniert. Dafür wurde das *ntcA*-Gene aus Chromosomaler DNA von R2 durch PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide NtcA-Pr1, NtcA-Pr2 amplifiziert. Der Primer NtcA-Pr1 bindet direkt an der Start-Codon ATG von NtcA und

hat eine Schnittstelle von *NdeI*. Dann wurde das erhaltende *ntcA*-fragment (672 bp) aus dem 1 % Agarosegel isoliert und mit dem pGEM-T-Vektor ligiert, wodurch den Plasmid pGEM-TNtcA entstand. Das *ntcA* Gen in Plasmid pGEM-TNtcA wurde nach Restriktion mit *Sall* und *NdeI* in die entsprechenden Schnittstellen des Expression-Plasmides pT7-7 kloniert, wodurch den Plasmid pT7-7NtcA entstanden (Anhang 5).

Das *ntcA*-Gen wurde auch in den 6 His-tag Überexpressionsvektor pET15-b kloniert. Dazu wurde das *ntcA*-Gene aus Chromosomaler DNA von R2 durch PCR und mit Hilfe der Primer NtcA-Pr1, NtcA-XhoI Pr2 amplifiziert. Der zweite Primer bindet am Ende des Gens und hat eine Schnittstelle von *XhoI*. Dann wurde das erhaltende *ntcA*-fragment (672 bp) aus dem 1 % Agarosegel isoliert und mit dem pGEM-T-Vektor ligiert, wodurch den Plasmid pGEM-TNtcA entstand. Das *ntcA*-Gen in Plasmid pGEM-TNtcA wurde nach Restriktion mit *XhoI* und *NdeI* in die entsprechenden Schnittstellen des Expression-Plasmides pET15-b kloniert, wodurch den Plasmid pET15-bNtcA entstanden (Anhang 6).

C. Ergebnisse

I Untersuchungen der Expression der Stickstoff-regulierten Gene *glnB* und *glnN*

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die verschiedenen stickstoffregulierten Gene insgesamt vom Transkriptionsfaktor NtcA kontrolliert werden, trotzdem aber unterschiedliche Expressionmuster aufweisen.

Eine wirkungsvolle moderne Methode, die Veränderungen des Genexpressionsmusters zu untersuchen, ist die Verwendung von *luxAB*-Reporter Fusionen. Mit dieser Methode wurden bereits spezifische Genexpressionsmuster bei verschiedenen Stressbedingungen erfolgreich untersucht (Andersson *et al.*, 2000). Mit Hilfe von Reporter genen (*luxAB*) ist es möglich, die beteiligten Promoterelemente detailliert zu untersuchen und neue Einblicke für den Mechanismus der NtcA Aktivierung zu bekommen.

1. Expression des NtcA-abhängigen *glnB*-Promoters

Um die *glnB*-Expression in *S. elongatus* zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt die Transkriptionshäufigkeit von *glnB* unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Für das *glnB* Gen wurden zwei Transkriptionsstartpunkte identifiziert (Lee *et al.*, 1999) (Abb. 3). Im *glnB* Promoter zeigte sich eine kanonische NtcA Bindestelle, die unter Bedingungen von Stickstoffentzug aktiv ist (Lee *et al.*, 1999) (Abb. 6).

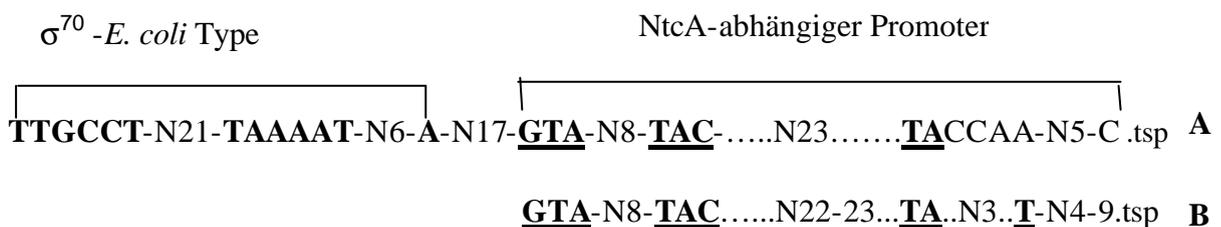


Abbildung 6: Sequenzvergleich der *glnB*-Promoterregion von *S. elongatus* mit der kanonischen „NtcA-Box“.

A: NtcA-Box vom *glnB* Promoter

B: kanonische NtcA- Box

1.1 Herstellung der *luxAB:glnB* Reporterfusion

Es wurden zwei Konstrukte des *glnB*-Promoters mit dem *luxAB*-Reportergen hergestellt: Das Konstrukt pFAM1 besteht aus dem gesamten *glnB*-Promoterbereich (P1+P2), während in dem zweiten Konstrukt (pFAM2) die Sequenzen des σ^{70} Promoters deletiert wurden, damit nur die NtcA- abhängige Startstelle (P2) erhalten ist. Das heißt, dass in pFAM2 die Transkription nur vom NtcA- aktivierten Promoter 2 abhängt (Abb.7).

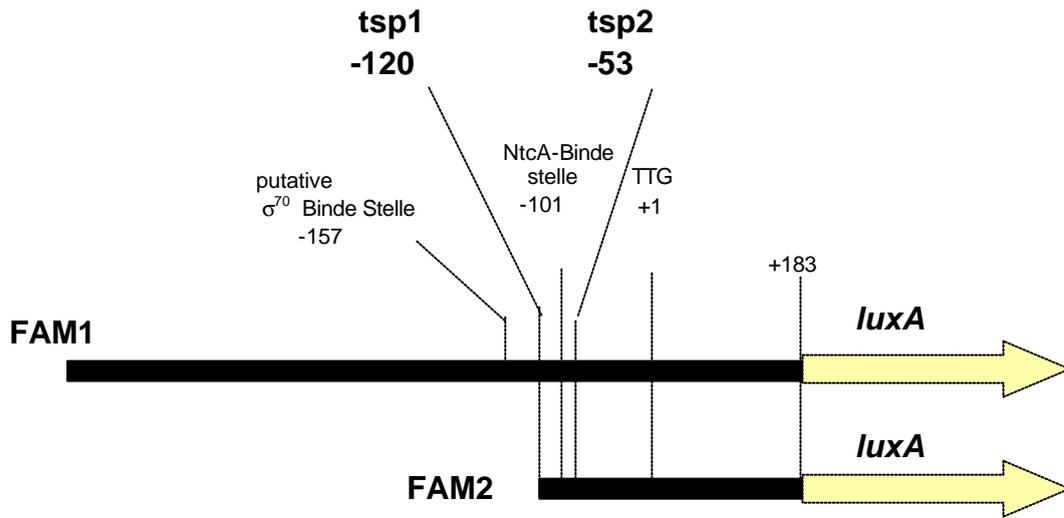
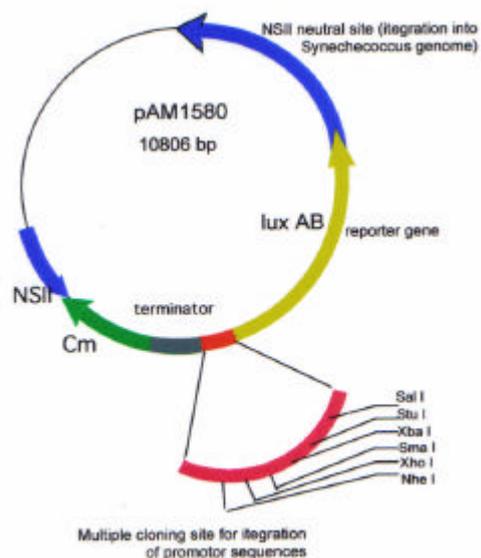


Abbildung 7 zeigt die beiden Konstrukte pFAM1 und pFAM2, die die *glnB* Promoterregion vor *luxAB*-Reportergen enthalten.

Das erste Konstrukt pFAM1 ist aus dem Vektor pAM1580 (der *luxAB* Gene enthält) (Abb. 8) und dem *glnB*-tragenden Plasmid pMP1A entstanden, während das zweite Konstrukt pFAM2 aus dem ersten Konstrukt durch PCR entstand. (mehr über die Klonierungsstrategie Absatz B.7.1).

Abbildung 8 zeigt das Stammvektor pAM1580, aus dem die beiden Konstrukte pFAM1, pFAM2 entstanden sind.



1.2 Transformation der Konstrukte in *S. elongatus*-Stämme

Die Konstrukte pFAM1 und pFAM2 wurden anschließend in Wildtypzellen, in eine P_{II}- und in eine NtcA-defiziente Mutante sowie in eine P2-A Mutante des Stamms *S. elongatus* transformiert. Als Kontrolle wurde der Vektor pAM1580 in die gleichen Cyanobakterienstämme transformiert, wobei das Plasmid über homologe Rekombination in die "Neutral Site II" ins Genom der Cyanobakterien integriert werden konnte. Für die Transformation der Konstrukte in die *S. elongatus*-Stämme wurden verschiedene Methoden probiert. Es war nicht möglich, bei MP2, MNtcA und MP2-A Stämmen Transformanten nach der klassischen Methode (Golden *et al.*, 1987) oder nach der Elektroporationsmethode (Mühlenhoff *et al.*, 1996) zu erhalten. Dies gelang bei Wildtyp Zellen, wobei die beiden Transformanten WT-FAM1 und WT-FAM2 erzeugt wurden. Für die Transformation in MP2 und MNtcA mussten die Plasmide aus *E. coli* mittels di- oder triparentaler Konjugation eingebracht werden (Elhai *et al.*, 1997). Die Transformanten von MP2 wurden MP2-FAM1 und MP2-FAM2 genannt, und die von MNtcA MNtcA-FAM1 und MNtcA-FAM2 bezeichnet. Das gleiche gilt auch für die Transformanten MP2-A-FAM1 und MP2-A-FAM2.

1.3 Bestimmung der *glnB*-Promoteraktivität in *S. elongatus*-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Luciferase*-Expression als Maß für die Transkriptionseffizienz des *glnB*-Promoters bestimmt. Von den erhaltenen rekombinanten Stämmen wurde dazu die *Luciferase*-Aktivität bei verschiedener Stickstoff-Versorgung ermittelt. Es wurde 1 ml der Zellkulturen einer optischen Dichte (OD₇₅₀) von 0.45 angesetzt und mit Decanal gemischt, anschließend wurde die *luxAB*-Aktivität mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

1.3.1 Analyse der *glnB*-Expression in *S. elongatus*-Stämmen bei Nitrat und Ammoniumwachstum

Mit Hilfe der NtcA- und P_{II}-defizienten Mutanten sowie der Mutante MP2-A konnte nun die Regulation der *glnB* Expression analysiert werden. Dazu wurden die erhaltenen rekombinanten Stämme (WT-FAM1 / WT-FAM2 / MP2-FAM1 / MP2-FAM2 / MP2-A-FAM1 / MP2-A-FAM2) in nitrathaltigem Medium und in ammoniumhaltigem Medium herangezogen, wobei die rekombinanten Stämme von MNtcA (MNtcA-FAM1 / MNtcA-FAM2) nur in ammoniumhaltigem Medium wachsen können, da die MNtcA nicht im

nitrat-haltigen Medium wachsen kann (Vega *et al.*, 1990). Dann wurde die *luxAB*-Aktivität gemessen (Tabelle 4):

- Im Wildtyp-Hintergrund ist die *Luciferase*-Aktivität von Konstrukt FAM1 deutlich stärker als FAM2. Diese Beobachtung bestätigt frühere Analysen des *glnB*-Promoters, wonach die meiste Expression unter Nitrat- oder Ammoniumwachstumsbedingungen von Promoter 1 stammt (Luque *et al.*, 1994)
- In ammoniumgewachsenden Zellen zeigt das Konstrukt FAM2 eine sehr starke Repression. Die *Luciferase*-Aktivität war sehr niedrig im Vergleich zum promoterlosen Kontrollstamm WT-AM1580. Das deutet darauf hin, dass nur unter diesen Bedingungen eine aktive Repression stattfindet, die zur Unterdrückung der Hintergrundexpression führt.
- In der P_{II}-defizienten Mutante war die Repression bei Anzuchten in Ammonium ähnlich wie beim Wildtyp. Der signifikanteste Unterschied zwischen Wildtyp und P_{II}-defizienten Zellen war eine achtfache Zunahme in der *luxAB*-Expression im nitratwachsenden MP2-FAM2 Stamm. Das könnte bedeuten, dass in dieser Mutante die NtcA-abhängige Expression bei Wachstum auf Nitrat erhöht ist. Somit könnte P_{II} bei Nitrat als Repressor der NtcA-Aktivität fungieren. Im Gegensatz dazu ist beim Konstrukt FAM1 kein Unterschied zwischen der P_{II}-defizient Mutante und Wildtyp zu sehen. Das bedeutet, dass sich die P_{II} Mutation nicht auf die Aktivität des konstitutiven σ^{70} -abhängigen Promoters auswirkt.
- Bei NtcA-defizienten Zellen, die nur in ammoniumhaltigem Medium wachsen können, ist unter diesen Wachstumsbedingungen die *Luciferase*-Aktivität in MNtcA-FAM1 die Hälfte vom WT-FAM1. Hingegen war die starke Repression der *luxAB*-Expression im FAM2-Konstrukt nicht zu sehen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Repression durch NtcA vermittelt wird. Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass die Ammoniumrepression der *glnB*-Expression NtcA braucht und unabhängig von P_{II} ist.
- Bei der Mutante MP2-A ist die *Luciferase*-Aktivität des Konstrukts FAM1 unter Nitratwachstumsbedingungen zweieinhalb mal stärker als in WT-FAM1. In FAM2 ist sie 25-mal stärker als in WT-FAM2, d.h. im MP2-A Hintergrund ist die *luxAB*-Aktivität stärker als in WT-Hintergrund. Unter Ammoniumwachstumsbedingungen, in denen P_{II} im WT immer in unphosphorylierter Form vorhanden ist, ist die *luxAB*-Aktivität in den FAM1-Konstrukte der beiden Stämmen WT und MP2-A nahezu

gleich, während in dem MP2-A-FAM2-Stamm eine deutliche höhere Aktivität wie den WT zeigt.

<u>Genetischer Hintergrund</u>	<u>Biolumineszenz RLU x 10³</u>	
	<u>NO₃⁻</u>	<u>NH₄⁺</u>
WT-FAM1	48.6± 8.5	22.1± 1.1
WT-FAM2	2.0± 0.8	< 0.1
MP2-FAM1	43.2± 4.3	16.1± 4.3
MP2-FAM2	17.6± 1.6	< 0.1
MNtcA-FAM1	-	8.9± 0.8
MNtcA-FAM2	-	10.1± 0.6
MP2-A-FAM1	120.1± 27.5	24.2± 6.4
MP2-A-FAM2	31.1± 12.5	1.0± 0.3
WT-AM1580	1.2± 0.7	1.3± 0.2

Tabelle 4: Expression der *glnB-luxAB* Fusion, die ins Genom von *S. elongatus*-Stämmen (WT, MP2, MNtcA, und MP2-A) integriert wurde. Die Reporterstämme wurden über mehrere Generationen hinweg entweder in nitrat- oder ammoniumhaltigen Medien angezogen. Die Werte stellen die Mittelwerte für 3 bis 4 Messungen sowie auch ihre Standardabweichungen dar. RLU: *relative light units*

1.3.2 Analyse der *glnB*-Expression in *S. elongatus*-Stämmen bei Stickstoffentzug

Zur Analyse der *glnB*-Expression und des NtcA-Aktivierungsmechanismus in stickstofffreien Medium wurden die Zellen von allen erhaltenen rekombinanten Stämme außer von MNtcA (da sie nicht in Nitrat wachsen kann) in nitrat oder ammoniumhaltigem Medium angezogen und durch Zentrifugation in stickstofffreies Medium überführt. Die Stämme von MNtcA wurden von ammoniumhaltigem Medium auf Stickstoffmangel-Medium geshiftet. Dann wurde die *luxAB*-Aktivität in verschiedenen Zeiträumen gemessen.

1.3.2.1 *glnB*-Expression bei Stickstoffmangel in WT Zellen

Nach der Überführung des WT-FAM1-Stammes von nitrathaltigem Medium auf Stickstoff-freies Medium kam es, wie in Abb. 9 gezeigt, zu einer raschen Aktivierung des *Luciferase*-Reporters. Ein ähnliches Aktivitätsniveau ist auch im WT-FAM2-Stamm zu sehen. Die beiden genannten Stämme erreichten einige Stunden nach dem Shift eine ähnliche maximale Aktivität, wobei die maximale Aktivität von WT-FAM1 das 10-fache und von WT-FAM2 das 250-fache im Vergleich zu den nitratwachsenden Zellen. Die maximale Aktivität war zwischen 8 und 40 Stunden nach dem Stickstoffentzug zu beobachten. Danach sankt die Aktivität wieder ab. Das gleiche Ergebnis kam bei der Überführung der gleichen Stämme von ammoniumhaltigem Medium auf Stickstoffmangel-Medium zustande, wobei die maximale Aktivität innerhalb der ersten 15 Stunden erreicht wurde. Die Tatsache, dass unter dieser Bedingung die Aktivität im WT-FAM2-Stamm, der nur den NtcA-abhängigen *glnB* Promoter enthält, gleich hoch ist wie im WT-FAM1-Stamm mit beiden Promotern, bedeutet, dass die Transkription unter Stickstoffentzugsbedingungen in erster Linie von dem NtcA-abhängigen Promoter 2 ausgeht.

1.3.2.2 *glnB*-Expression unter Stickstoffmangel in MP2 und MNtcA Zellen

Um herauszufinden, ob P_{II} für die Expression von *glnB* unter Stickstoffmangel benötigt wird, wurden auch die Stämme von MNtcA und MP2 (MP2-FAM1 / MP2-FAM2 / MNtcA-FAM1 / MNtcA-FAM2) in Stickstoffmangel-Medium überführt, und zwar von nitrat- oder ammoniumhaltigem Medium für MP2-Stämme und von nur ammoniumhaltigem Medium für MNtcA Stämme. Im Vergleich zum Wildtyp und beim Shift von nitrathaltigem Medium ins Stickstoffentzug-Medium war die P_{II} -defiziente Mutante unfähig, die *glnB-luxAB* Expression zu erhöhen. Der gleiche Befund ist beim Shift der Zellen von ammoniumhaltigem Medium auf Stickstoffmangel-Medium zu beobachten, woraus gefolgert werden muss, dass P_{II} für die Aktivierung von NtcA nötig ist. Wie bei der P_{II} -defizienten Mutante ist auch bei der NtcA-Mutante keine Induktion der *glnB-luxAB*-Aktivität zu sehen. Anstatt der Induktion kam es zu einer schwachen Reduktion, die bei langer Inkubationszeit auftritt (Abb. 9).

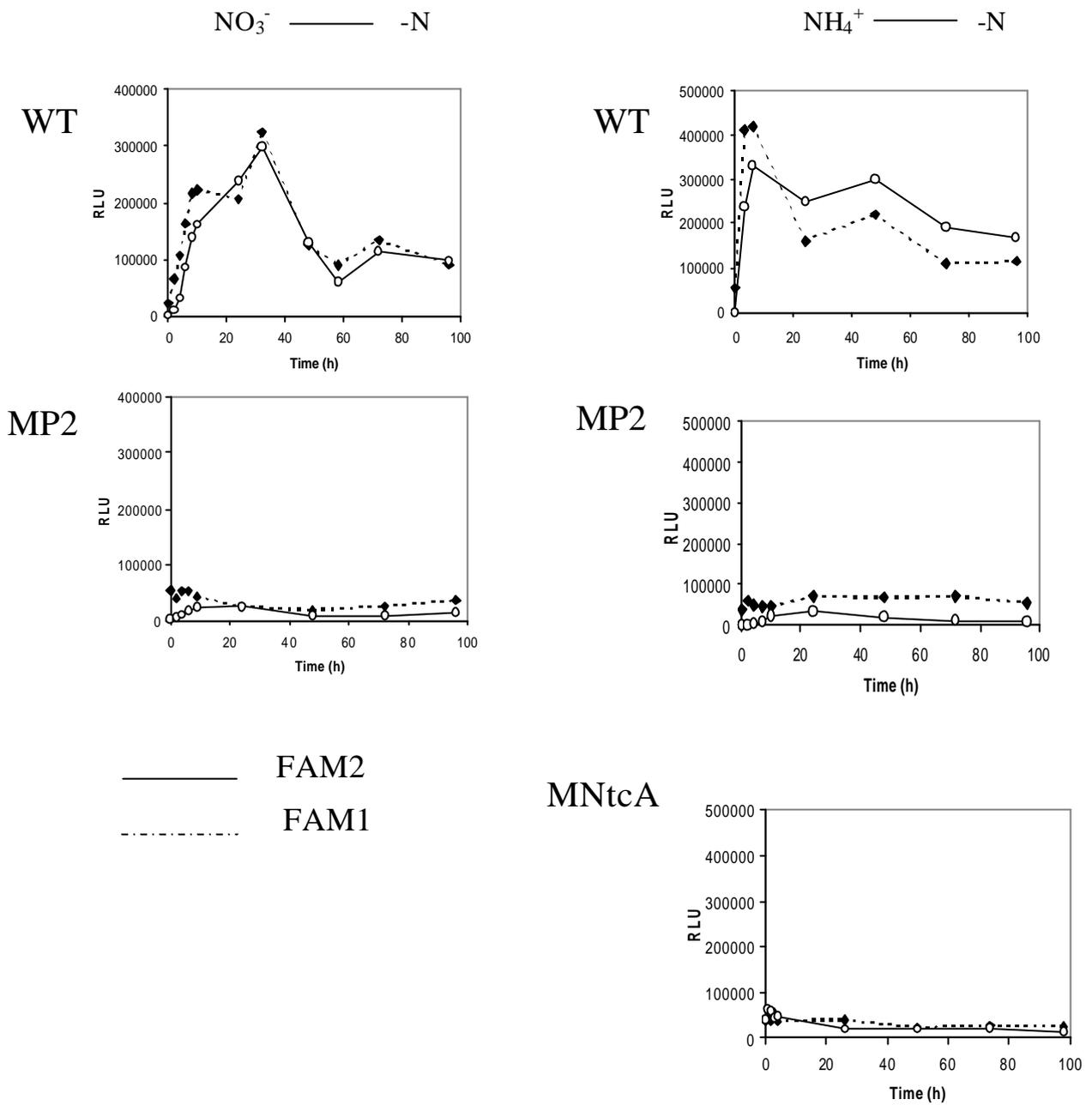


Abbildung 9: Expression der *glnB-luxAB* Reporter Fusion unter Stickstoffentzugsbedingungen von *S. elongatus* in Wildtyp WT, P_{II}-defizienter Mutante (MP2) und NtcA-defizienter Mutante (MNtca). Nach der Initiation des Stickstoffentzugs zum Zeitpunkt t=0 wurde die *luxAB*-Aktivität von den Reporterstämmen über einen Zeitraum von 100 Stunden gemessen. Es wurden Zellen von nitrathaltigem Medium in Stickstoffmangel-Medium und von ammoniumhaltigem Medium in Stickstoffmangel-Medium überführt. Unabhängige Experimente zeigen ähnliche Resultate. Jeweils ein Experiment je Bedingung wird hier dargestellt.

FAM1 : durchgezogene Linie FAM2 : punktierte Linie

1.4 *glnB*-Expression unter Stickstoffmangel in MP2-A Zellen

In der Mutante MP2-A ist P_{II} nicht phosphorylierbar. Um herauszufinden, ob die phosphorylierte Form von P_{II} eine Rolle bei der Regulation der *glnB*-Expression unter Stickstoffentzugbedingungen spielt, wurden die Stämme MP2-A-FAM1 und MP2-A-FAM2 zuerst in nitrat- oder ammoniumhaltigem Medium angezogen, dann in stickstoffmangel-Medium überführt. Abbildung 10 zeigt die *luxAB*-Aktivität für die beiden Transformanten. Nach dem Shift ins Stickstoffmangel-Medium kam es zu einer mäßigen Aktivierung des *Luciferase*-Reporters in beiden Konstrukten. Die maximale Aktivität war innerhalb der ersten 10 Stunden zu sehen, dann sank die Aktivität wieder ab. Während die Aktivierung in den ersten acht Stunden ähnlich war, war die Expression anschließend jedoch deutlich geringer als in Wildtyp. Das bedeutet, um die maximale NtcA-Aktivität unter Stickstoffmangelbedingungen zu erhalten, ist die phosphorylierte Form von P_{II} nötig.

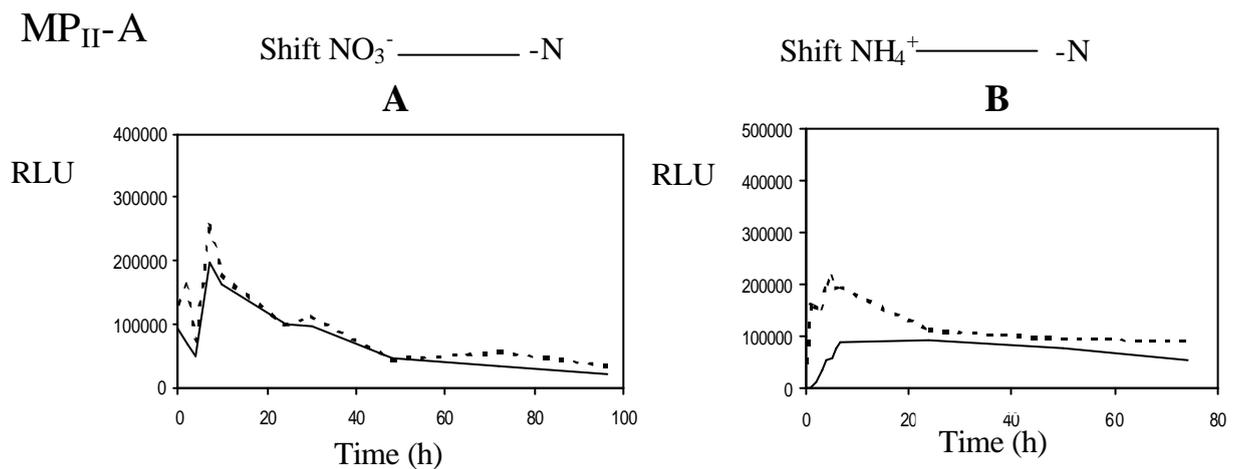


Abbildung 10: Expression der *glnB-luxAB* Reporter Fusion unter Stickstoffentzug von *S. elongatus* in MP2-A. Nach der Initiation des Stickstoffentzugs zum Zeitpunkt t 0 werden die *luxAB*-Aktivitäten der Reporter Stämmen über einen Zeitraum von 100 Stunden gemessen. Es wurden Zellen von nitrathaltigem Medium in Stickstoffmangel-Medium (**A**) und von ammoniumhaltigem Medium in Stickstoffmangel-Medium (**B**) überführt. FAM1 : durchgezogene Linie FAM2 : punktierte Linie

2. Expression des *glnN* Promoters

In *Synechocystis* PCC 6803 wurde gezeigt, dass die Expression des *glnN*-Gens bei Stickstoffmangelbedingungen stark induziert wird (Dominguez *et al.*, 1997). Ein ähnliches Resultat wurde später für *S. elongatus* berichtet, dass nämlich die Stickstoffmangel-induzierte Expression des *glnN*-Gens nicht in NtcA- und P_{II}-defizienten Zellen stattfindet (Sauer *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass die Bindung von NtcA an einem Bereich stromaufwärts des *glnN*-Start-Codons, der der kanonischen NtcA-Bindestelle ähnlich ist (Abb. 11), die *glnN*-Expression aktivieren könnte. *Gelshift*-Experimente mit der *glnN*-Promoterregion und NtcA führten allerdings zu einem negativen Ergebnis (J.Sauer Dissertation 2001). Um herauszufinden, ob NtcA wirklich an den *glnN* Promoterbereich bindet und die Transkription aktiviert, und ob P_{II} eine Rolle für die Aktivierung des *glnN*-Genes unter unterschiedlichen Stickstoffbedingungen spielt, wurden ähnliche Experimente wie für den *glnB*-Promoter für den *glnN*- Promoterbereich durchgeführt. Zuerst wurde hier der gesamte 448 bp lange Bereich stromaufwärts des *glnN* Gens vor den *luxAB*-Reporter kloniert (pFAM-431). Darüber hinaus wurde ein verkürztes Konstrukt hergestellt, bei dem die ganze Sequenz stromaufwärts der nicht kanonischen NtcA-Box deletiert wurde (pFAM-84). Des Weiteren wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, in denen die *glnN*-Promotorregion von Konstrukt pFAM-431 schrittweise verkürzt wurde. Allerdings enthalten alle Konstrukte noch die nicht kanonische NtcA-Box (pFAM-93 / pFAM-103 / pFAM-112 / pFAM-120 / pFAM-176 / pFAM-226 / pFAM-314) (Abb. 12). In alle diesen Konstrukten dient *luxAB* als Reporter gen.



Abb. 11: Sequenzvergleich der *glnN*-Promoterregion von *S. elongatus* mit der kanonischen NtcA-Box

Dann wurden alle diese Konstrukte in *S. elongatus*-Stämme transformiert und zwar in WT, in die P_{II}-und die NtcA-defiziente Mutante. Genau wie bei den *glnB*-Konstrukten (Absatz C.1.2)

mussten hier auch die Transformationen in den WT-Stamm nach der Methode von Golden *et al.*, 1987, und in den MP2- und MNtcA-Stämme mittels Konjugation erfolgen. Dadurch konnten alle Konstrukte in den verschiedenen genannten *S. elongatus*-Stämmen erhalten werden. Von den erhaltenen rekombinanten Stämmen wurde anschließend die *Luciferase*-Aktivität bei verschiedener Stickstoffversorgung bestimmt.

Xba I

TCTAGACAAT GACAGTTCAG AGCAGAGTCT CCCAGTTACA GCCCATTGCT

GGTTGGGGGA AGGACTGAAT CTGCCCTTTG ACCAGCTTGG CTGATTACAA

pFAM-314

TTGCGATCGC AGACTCTGCA TCCTTCATAG GGTGCTGGCA TTTCCAGTC

TTTTGAGAAC TGAAAATAAG TAATTAATAA CCCTATAAAT CAAGGCTGAT

pFAM-226

GATAACCTCT AATTTTCTCT TCAAAGGAA TTAAATTCT TGCGACTGAT

pFAM-176

TGCAACCCAT CCTGTCACT GTCGGCTTCA AATCTAGGGT TCAAAGGATT

pFAM-120

pFAM-112

pFAM-103

pFAM-93

CTTGGTGC GA TCGCAAGGAG GCGATAACTT AGGCTTTTCA TCAAATCTG

pFAM-84

GCCCTTGGTT CTGTATCTTT TCTAGCGATC GAGCTGGTCA CCATTGAGTA

tsp

+1

CGATCAATTG ACTAGCTTTT TTGGGAAAGT CCATGAGCGG CAACGCAGCC

CGGG

Sma I

Abb. 12: Nukleotidsequenz der *glnN*-Promoterregion (448 bp) in *S. elongatus*.

Die nicht kanonische NtcA-Bindestelle ist durch Fettschrift hervorgehoben. Der Transkriptionsstartpunkt (*tsp*) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, die -10 Sequenz ist eingerahmt. Das erste A des ATG Start-Codons des *glnN*-Gens ist hier mit +1 Stelle gekennzeichnet. Alle anderen eingezeichneten Pfeile zeigen den Anfang der verkürzten *glnN*-Promoterregion in Bezug zum Start-Codon +1, die vor das *luxAB*-Reporter gen in pAM1580 kloniert wurden. Der Name des Konstrukts steht über dem Pfeil, ebenfalls die Nukleotidzahl in Bezug zum Start-Codon +1.

2.1 Analyse der *glnN*-Expression in *S. elongatus*-Stämmen

2.1.1 *glnN*-Expression unter Nitratwachstumsbedingungen

Um die *luxAB*-Aktivität in den verschiedenen erhaltenen Konstrukten im WT und der P_{II} -defizienten Mutante zu messen, wurden alle 9 Konstrukte zuerst in nitrathaltigem Medium bis zu einer OD_{750} von 0.45 angezogen. Dann wurde 1 ml von den Kulturen entnommen, und ihre *luxAB*-Aktivität mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Zuerst wurden die beiden Konstrukte mit Wildtyp Hintergrund gemessen: pFAM-431, das den gesamten *glnN*-Promoter vor dem *luxAB* Reportergen enthält, und das verkürzte Konstrukt pFAM-84, bei dem die gesamte Sequenz stromaufwärts der nicht-kanonischen NtcA-Box deletiert wurde (Abb. 13). Hier ergab sich jedoch ein überraschender Befund: wenn die Sequenz stromaufwärts der nicht-kanonischen NtcA-Box fehlt (bei pFAM-84), so ist eine 4 bis 5-fach höhere Grundaktivität zu verzeichnen. Deshalb ist zu vermuten, dass an der *upstream*-Sequenz des *glnN*-Promoters ein Repressor bindet. Um herauszufinden, ob dieser Repressor von P_{II} abhängt, oder ob P_{II} eine Rolle bei der Regulation der *glnN*-Expression spielt, wurde auch die *luxAB*-Aktivität den gleichen Konstrukten in der P_{II} -defizienten Mutante gemessen. Hier ist zu sehen, dass dieser Repressor nicht von P_{II} abhängt, da die *luxAB*-Aktivität im MP2-FAM-84 Stamm eine 5-fach höhere Grundaktivität im Vergleich zu MP2-FAM-431 aufweist. Wobei im Allgemeinen ist die *luxAB*-Aktivität in MP2 höher als im Wildtyp. Das bestätigt die Theorie, die bei den *glnB*-Untersuchungen aufgestellt wurde (Absatz C.1.3.1), dass das P_{II} Protein als Repressor beim Wachstum auf Nitrat eine Rolle spielen könnte. Um jetzt die Stelle des Repressors, der an die DNA bindet, zu finden, wurden alle anderen 7 Konstrukte hergestellt und ihre *luxAB*-Aktivität in WT und MP2 bei Wachstum auf Nitrat gemessen. Wie in Abb. 13 gezeigt, ist in WT-Zellen die maximale *luxAB*-Aktivität in pFAM-84 zu sehen. Dann nimmt die Aktivität mit der Länge der *glnN* Promoterregion ab. Die geringste Aktivität ist bei den pFAM-314 und pFAM-431 Konstrukten zu sehen, was darauf hindeutet, dass der Repressor zwischen dem Bereich -226 und -314 bindet. Die Aktivität in den gleichen Konstrukten von MP2 zeigen auch, dass in pFAM-314 und in pFAM-431 die geringsten *luxAB*-Aktivitäten zu sehen sind, wobei in allen anderen Konstrukten kein signifikanter Unterschied zu sehen ist. Das unterstützt die Vermutung, dass die Bindestelle des Repressors im Bereich zwischen -226 und -314 stromaufwärts des *glnN*-Start-Codons liegt.

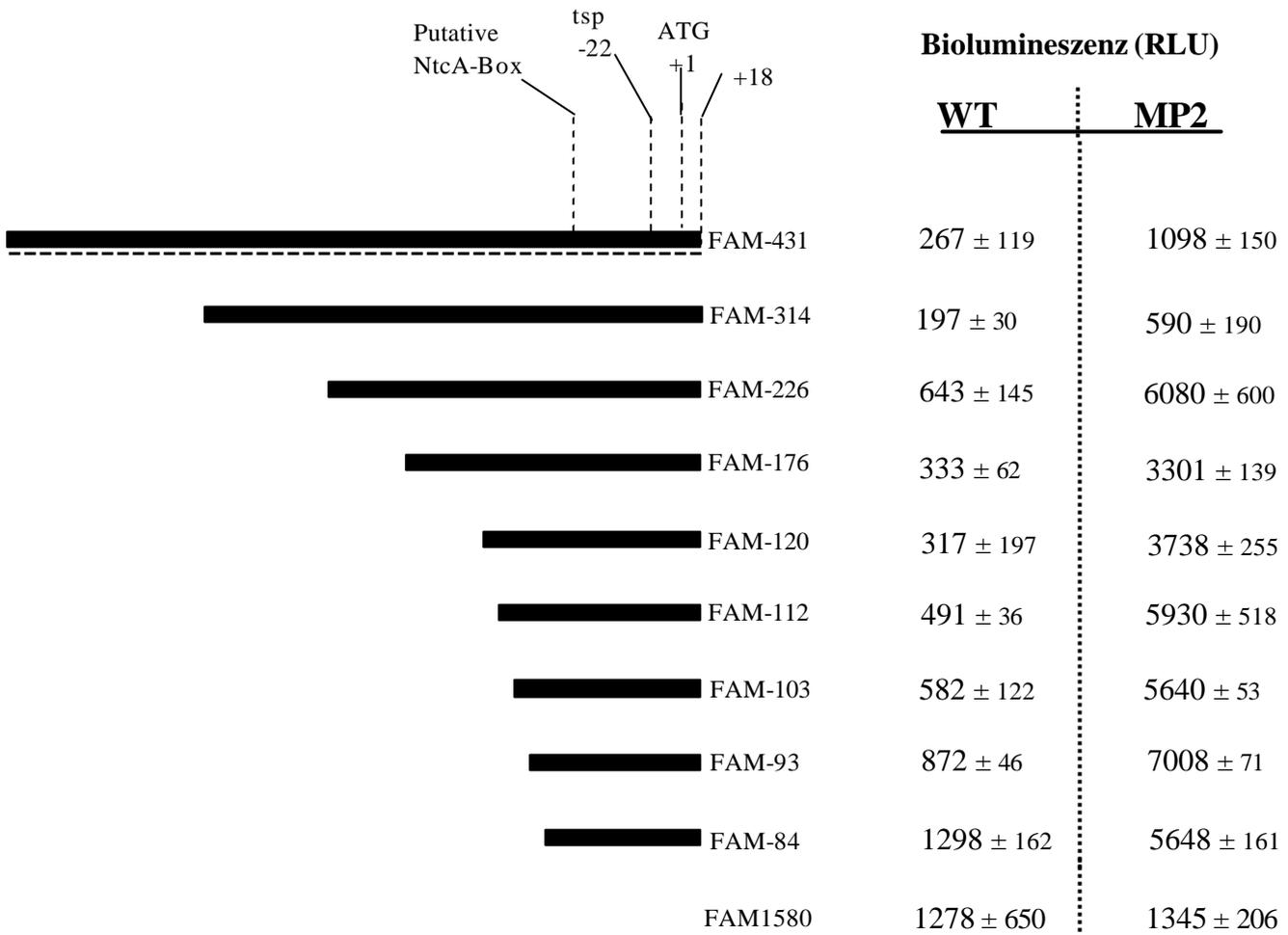


Abbildung 13: Expression der *glnN-luxAB* Fusionen, die ins Genom von *S. elongatus*-Stämmen (WT und MP2) integriert wurden. Hier ist die *luxAB*-Aktivität bei **Nitrat** gewachsenen Zellen gezeigt. Die Zahlen, die hinter die jeweiligen Konstrukte geschrieben sind, zeigen die Basensequenz stromaufwärts des Start-Codons +1 der *glnN*-Promoterregion, die vor das *luxAB*-Reportergen kloniert wurde. Das erste A des ATG Start-Codons der *glnN*-Gene ist hier als +1 Stelle bezeichnet. Die Werte stellen die Mittelwerte von 24 Messungen sowie auch ihre Standardabweichungen dar. Zur Bestimmung des Maßes des *glnN*-Promoters wurde hier jeder Strich bei FAM-431 mit 10 bp gezeigt. RLU: *relative light unit*.

2.1.2 *glnN*-Expression Unter Ammoniumwachstumsbedingungen

Es wurde früher gezeigt, dass die *glnN*-Expression in ammoniumwachsenden Zellen im *Synechocystis* Stamm PCC 6803 sehr stark reprimiert ist (Reyes *et al.*, 1997). Später wurde der gleiche Zusammenhang in *Pseudanabaena* PCC 6903 (Jose *et al.*, 1998) festgestellt. Um den Effekt von Ammonium auf die *glnN*-Expression in *S. elongatus* zu finden, wurden alle 9 Konstrukte des *glnN*-Promoters von den verschiedenen Stämmen (WT, MP2, MNtcA) in ammoniumhaltigem Medium angezogen und ihre *luxAB*-Aktivität bestimmt.

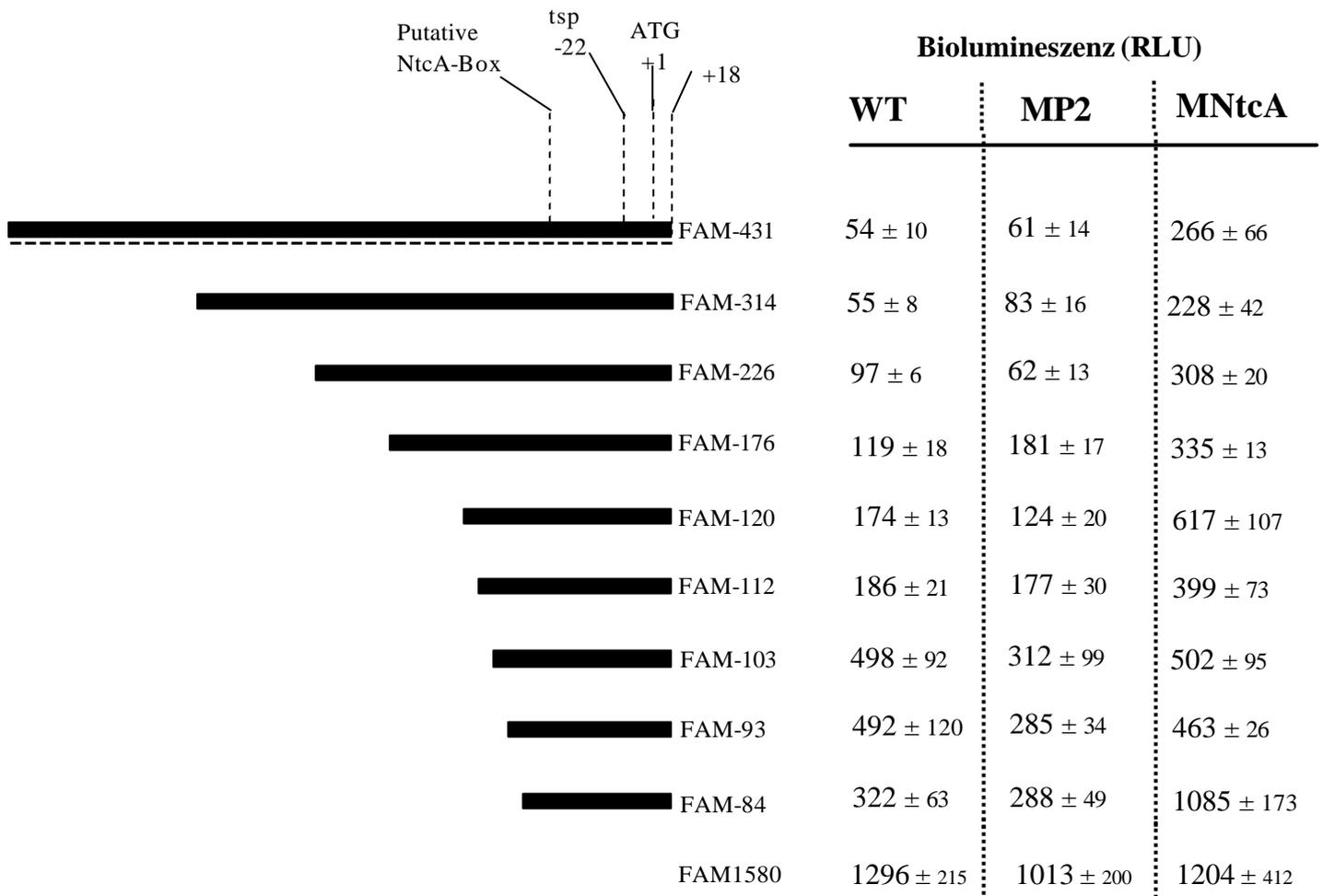


Abbildung 14: Expression der *glnN-luxAB* Fusionen, in WT, MP2 und MNtCA Hintergrund. Hier ist die *luxAB*-Aktivität bei Ammonium gewachsenen Zellen gezeigt. Die Promoterelemente sind wie in Abbildung 13 gezeigt. Die Werte stellen die Mittelwerte von 2-4 Messungen sowie auch ihre Standardabweichungen dar.

Abb. 14 zeigt den Effekt von Ammonium auf die *glnN*- Expression. Klar zu sehen ist, dass die *luxAB*-Aktivität im WT und in MP2 im Vergleich zu den Stämmen, die in nitrathaltigem Medium wachsen, stark reprimiert ist. Das bedeutet, dass Ammonium die *glnN*-Expression unabhängig von P_{II} reprimiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen WT und MP2 ist nicht zu sehen. Andererseits ist der Repressor, der zwischen -226 und -314 bindet, ist hier im Gegensatz zu bei Nitratwachstumsbedingungen nicht zu sehen, Da die *luxAB*-Aktivität durch Ammonium reprimiert ist.

In den MN_{NtcA}-Stämme unter Ammoniumwachstumsbedingungen sind die *luxAB*-Aktivität in ca. 2-4 fache höher als in WT und P_{II}. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Ammonium-repression der *glnN*-Expression NtcA braucht und unabhängig von P_{II} ist.

2.1.3 *glnN*-Expression unter Stickstoffmangel

In Sauer *et al.*, (2000) wurde früher gezeigt, dass die Expression des *glnN* Gens in *S. elongatus* unter Stickstoffmangelbedingungen in NtcA- und P_{II}-defizienten Zellen nicht stattfindet. Um nun die Expression des *glnN* Gens unter Stickstoffmangelbedingungen besser zu analysieren und um herauszufinden, ob P_{II} und/oder NtcA für die Expression von *glnN* benötigt wird, wurden alle 9 *luxAB:glnN* Stämme in nitrathaltigem Medium angezogen und durch Zentrifugation in Stickstoffmangelmedium überführt. Genau wie in Abschnitt B.4.1 wurde die *luxAB*-Aktivität gemessen.

2.1.3.1 *glnN*-Expression unter Stickstoffmangel in WT-Zellen

Nach der Überführung aller 9 Konstrukte von nitrathaltigem Medium in Stickstoffmangelmedium kam es, wie in Abb. 15 gezeigt, zu einer raschen Aktivierung der *glnN*-Promoteren in allen Stämmen, außer in den Stämmen FAM-314 und FAM-431. Diese Aktivierung betrug das 100-bis 500 fache des Wertes im Vergleich zu den gleichen Stämme bei nitratwachsenden Zellen (Abbildung 15). Die erhaltene maximale Aktivität war zwischen 30 und 60 Stunden nach dem Stickstoffentzug zu sehen. Nachher sank die Aktivität wieder ab. Die anderen Stämme FAM-314 und FAM-431 zeigen sehr niedrige Aktivität, da sie eine Stelle für einen vermuteten Repressor aufweisen. Dieser Repressor bleibt immer noch aktiv unter Stickstoffmangelbedingungen.

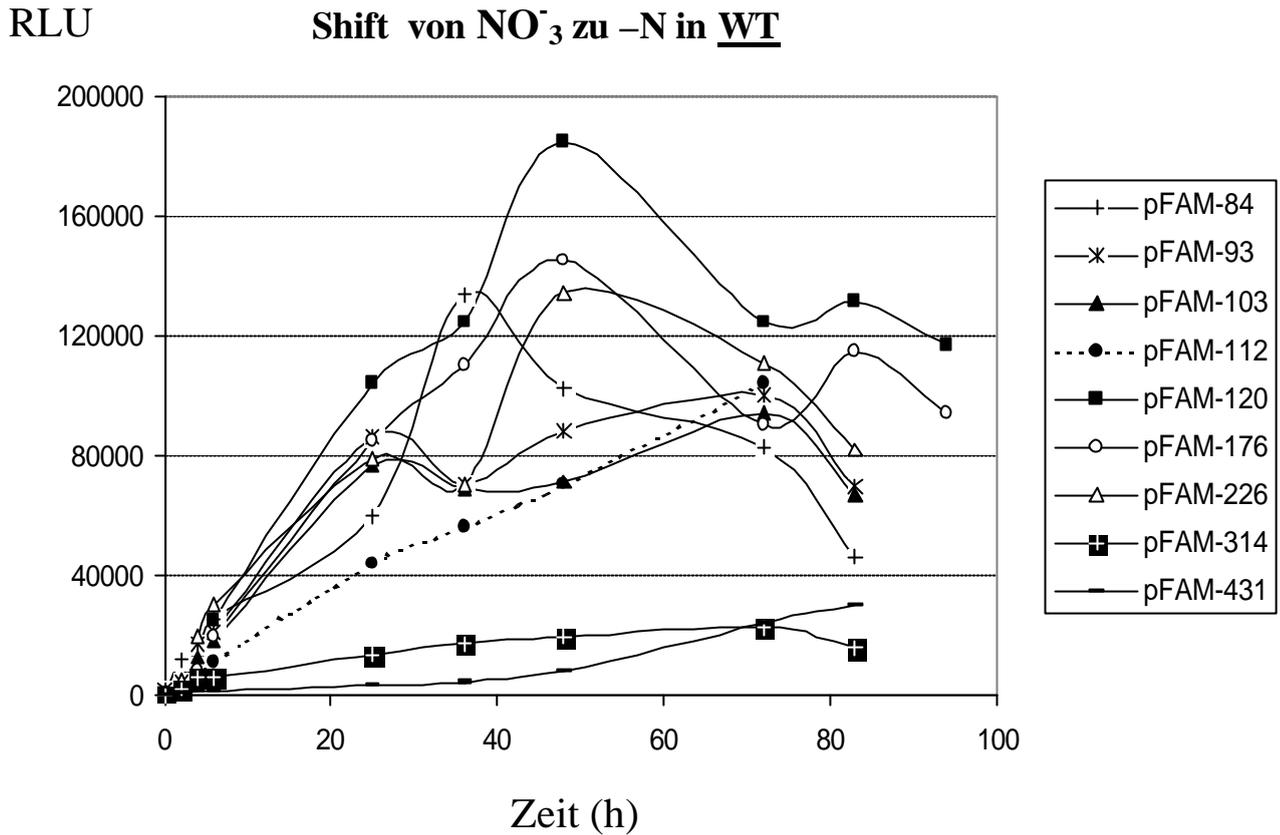


Abbildung 15: Expression der *glnN-luxAB*-Reporter-Fusionen unter Stickstoffmangelbedingungen von *S. elongatus* im Wildtyp (WT). Nach der Initiation von Stickstoffmangel zum Zeitpunkt $t = 0$, wurde die *luxAB*-Aktivität von den Reporterstämmen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 100 Stunden gemessen. Kulturen wurden von nitrathaltigem Medium in Stickstoffmangel-Medium überführt. 2-3 Unabhängige Experimente zeigen ähnlichen Resultaten, eine Repräsentation wurde für je Stamm hier gezeigt. RLU: *relative light unit*

2.1.3.2 *glnN*-Expression unter Stickstoffmangel in P_{II} und *NtcA*-defizienten Zellen

Es wurden auch alle 9 Stämme der P_{II} -defizienten Mutante von nitrathaltigem Medium im stickstofffreien Medium und $MNtcA$ -Zellen von ammoniumhaltigem Medium ins stickstofffreie Medium überführt. Wie in Abbildung 16 gezeigt waren die *luxAB*-Aktivität in den beiden P_{II} - und *NtcA*-Mutante, im Vergleich zum Wildtyp unfähig die starke Aktivität unter Stickstoffmangelbedingungen zu erreichen, woraus gefolgert werden muss, dass genau wie für das *glnB* Gen, P_{II} für die Aktivierung von *NtcA* nötig ist.

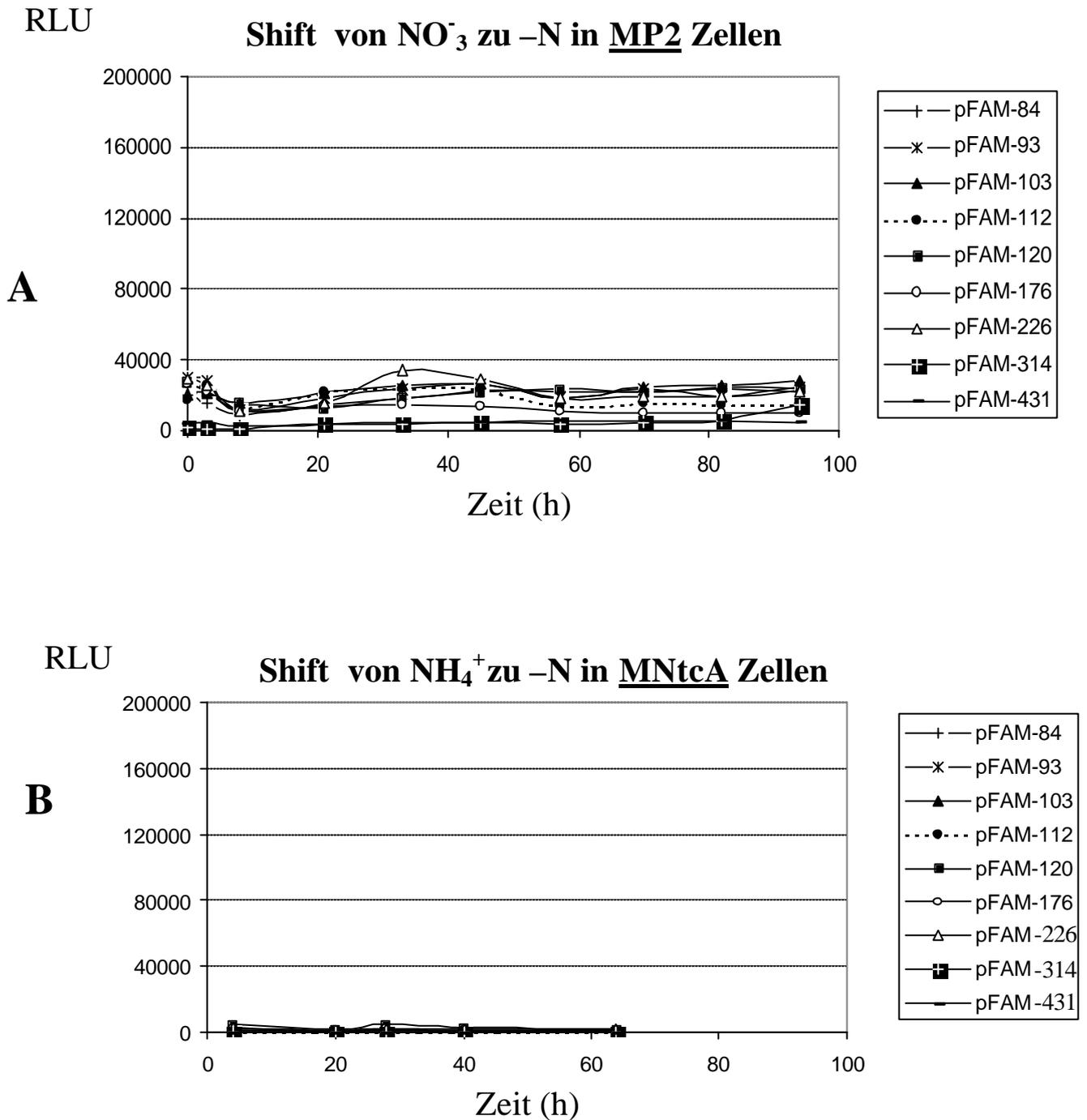


Abbildung 16: Expression der *glnN-luxAB*-Reporter-fusionen unter Stickstoffmangelbedingungen von *S. elongatus* in MP2 (**A**) und MNtcA (**B**)-Stämmen. Bei MP2 Stämmen wurden die Zellen von nitrathaltigem Medium zu Stickstoffmangelmedium geschiftet. Bei MNtcA wurden die Zellen von ammoniumhaltigem Medium zu Stickstoffmangelmedium geschiftet. 2-3 Unabhängige Experimente zeigen ähnlichen Resultaten, eine Repräsentation wurde für je Stamm hier gezeigt. RLU: *relative light unit*.

2. 2 Die *glnN*- Expression in MP2-A Stamm

Um herauszufinden, ob die phosphorylierte Form von P_{II} eine Rolle bei der *glnN*-Regulation spielt, wurden nur das lange und das kurze Konstrukt pFAM-84 und pFAM-431 in die MP2-A transformiert. Anschließend wurde die *luxAB*-Aktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gemessen. Hier zeigen sich jedoch folgende interessante Befunde (Abb. 17):

1. Unter Wachstumsbedingungen mit Nitrat sind die *luxAB*-Aktivität in den beiden Konstrukten höher als im WT Stamm. Von anderer Seite ist der Repressor, der in dem langen Konstrukt pFAM-431 bindet, nicht sehr aktiv im Vergleich zu WT oder zu MP2.
2. Im Vergleich zu Nitratwachstumsbedingungen ist die *luxAB*-Aktivität unter Ammoniumwachstumsbedingung nur schwach verringert (im Vergleich zu WT). Das heißt, dass die Ammoniumrepression im MP2-A weniger stark als im WT ist.
3. Bei Stickstoffentzug und nach Shift der Zellen von nitrathaltigem Medium in stickstofffreies Medium steigt die Aktivität mit der Zeit langsamer als in WT. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Konstrukten zu sehen. Eine maximale *luxAB*-Aktivität ist zwischen 50 und 60 Stunden nach Shift zu beobachten. Diese maximale Aktivität in den beiden Konstrukten des MP2-A-Stammes entspricht der Aktivität des langen Konstrukts pFAM-431 im Wildtyp-Stamm (Abb. 18).

Zusammenfassend lässt sich sagen; um die maximale Aktivität des *glnN*-Gens unter Stickstoffmangelbedingungen zu erreichen, ist die phosphorylierte Form des P_{II} -Proteins erforderlich.

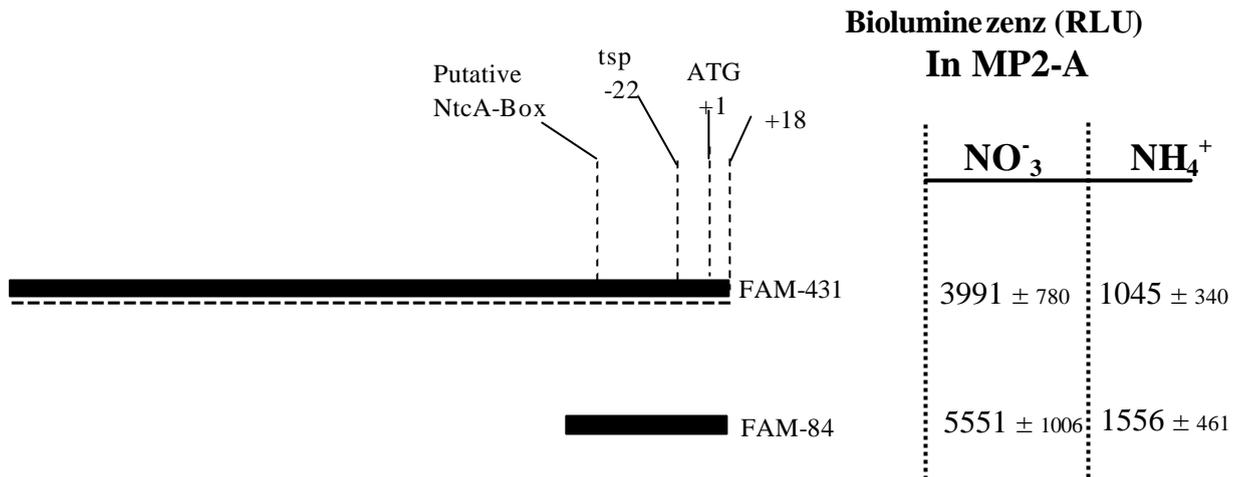


Abbildung 17 zeigt die *luxAB*-Aktivität der beiden Konstrukte pFAM-84 und pFAM-431 des MP2-A Stammes unter Nitrat- und Ammoniumwachstumsbedingungen. Die Promotorelemente sind wie die in Abbildung 13 gezeigt. Die Werte stellen die Mittelwerte von 2-4 Messungen sowie auch ihre Standardabweichungen dar.

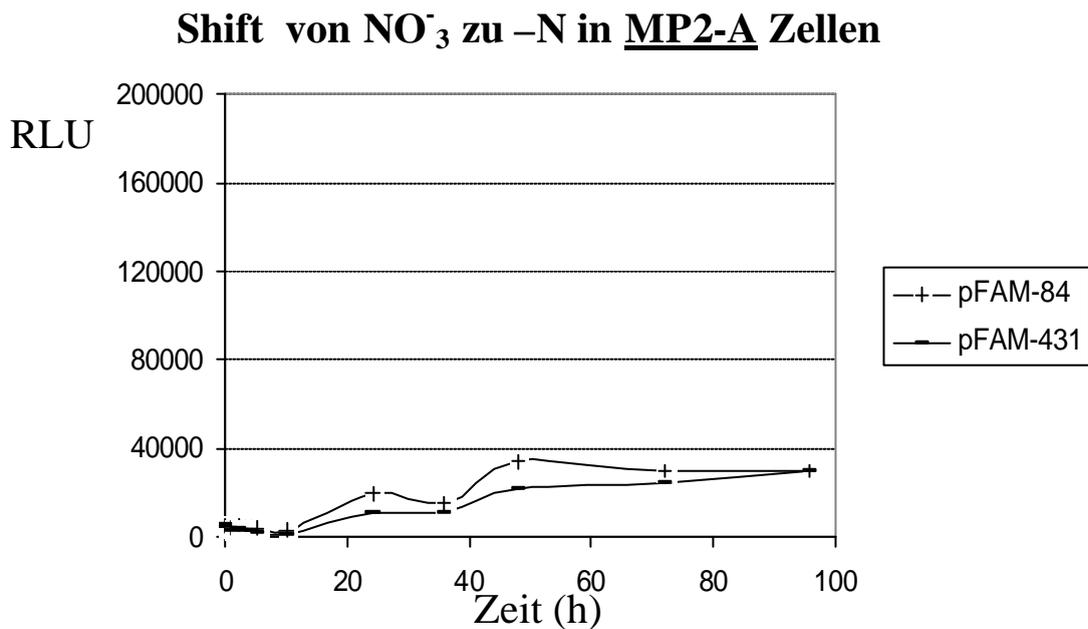


Abbildung 18: Expression der *glnN-luxAB* Reporter Fusionen unter Stickstoffentzugbedingungen von *S. elongatus* in MP2-A Stämme. Die Zellen wurden von nitrathaltigem Medium zu Stickstoffmangelmedium geschiftet. Die Bedingungen von den Experimenten sind wie in Abbildung 15 gezeigt. 2 Unabhängige Experimente zeigen ähnlichen Resultaten, eine Repräsentation wurde für je Stamm hier gezeigt. RLU: *relative light unit*

3. Analyse der NtcA-Bindestelle in der *glnN*-Promoterregion in *S. elongatus*

Die letzten Experimente haben gezeigt, dass NtcA für die Aktivierung des *glnN*-Promoters nötig ist, obwohl der *glnN*-Promoter keine perfekte NtcA-Bindestelle besitzt (Abb. 11). Es wurde früher durch NtcA Gel-Retardationsanalyse mit DNA-Fragmenten, die verschiedene Sequenzen der NtcA-Bindestelle enthalten, gezeigt, dass die Affinität der NtcA-DNA-Bindung an einer perfekten Stelle höher ist als an einer nicht perfekten (Jiang *et al.*, 2000 und Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002 b). In Übereinstimmung damit ist die NtcA-abhängige *luxAB*-Aktivität der *glnB*-konstrukte deutlich höher als die der *glnN*-Konstrukte, da der *glnB*-Promoter eine perfekte NtcA-Bindestelle besitzt. Um nun fest zu stellen, ob NtcA an den *glnN*-Promoter bindet und ob die Expression der *glnN*-Promoter von NtcA abhängig ist, wurden zwei neue Konstrukte hergestellt. In dem ersten Konstrukt wurde die nicht perfekte NtcA-Bindestelle des *glnN* Promoters in eine perfekte NtcA-Bindestelle umgewandelt. In dem zweiten Konstrukt wurde die nicht perfekte NtcA-Bindestelle ganz zerstört (Abbildung 19).

3.1 Veränderung der putativen NtcA Bindestelle in der *glnN*-Promoterregion

Alle vier neuen Konstrukte wurden mittels Mutagenese PCR (Kirsch und Joly, 1998) aus dem pFAM-431 und dem pFAM-84 kloniert. (für die Klonierungsstrategie siehe Abschnitt B. 7.3). Die richtigen Konstrukte wurden mittels Restriktion und Sequenzierung identifiziert.

Am Ende sind vier neue Konstrukte hergestellt, die wie folgt benannt worden (Abb. 19):

- pFAM-84R und pFAM-431R: beide enthalten eine perfekte NtcA Bindestelle.
- pFAM-84K und pFAM-431K: in diesen Konstrukten ist die NtcA-Bindestelle zerstört.

Alle diese neuen Konstrukte wurden in den Wildtyp, und in die MP2 und MNtcA-Stämme transformiert, und ihre *luxAB*-Aktivität unter unterschiedlichen Bedingungen bestimmt.

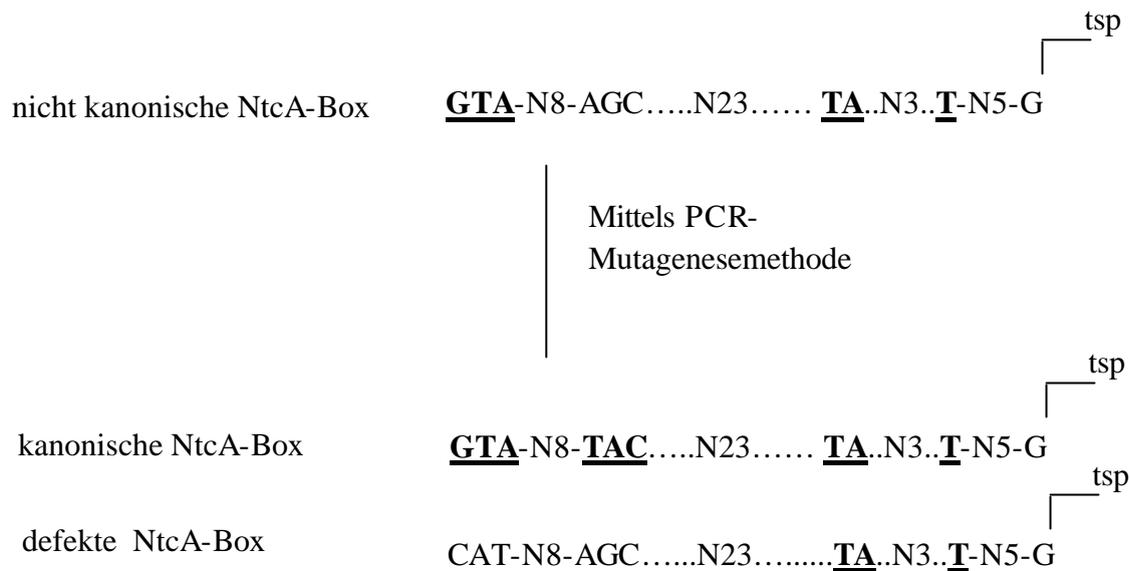


Abbildung 19: Die Schematische Darstellung beschreibt die Umklonierung der nicht perfekten-NtcA-Box in den *glnN* Promoterregion von *S. elongatus* zu perfekte NtcA-Box oder zur zerstörten NtcA-Box.

3.2 Analyse der Expression der mutierten *glnN*-Promoteren

3.2.1 Expression unter Nitratwachstumsbedingungen

Zuerst wurde die *luxAB*-Aktivität unter Nitratwachstumsbedingungen im Wildtyp und MP2-Stamm bestimmt, und wie in Abbildung 20 gezeigt ist, konnten signifikanten Unterschieden zwischen dem Wildtyp *glnN*-Promoter und dem Promoter mit der perfekten NtcA-Box festgestellt werden.

- In WT-Stämme ist die Aktivität in den Konstrukten pFAM-84R und pFAM-431R ca. 2-bis 3-fache höher als bei den ursprünglichen Konstrukten pFAM-84 und pFAM-431. Andererseits ist auch der Repressor, der zwischen -226 und -314 bindet, in dem perfekten NtcA Promoter noch aktiv und gleich stark wie im Wildtyp-Promoter.
- In der zerstörten NtcA-Box sind die Werte der *luxAB*-Aktivität in den beiden Konstrukten pFAM-84K und pFAM-431K im Vergleich zur perfekten NtcA-Box oder zum Wildtyp Promoter sehr niedrig. Das beweist, dass die nicht kanonische NtcA-Box tatsächlich für die *glnN*-Promoter-Aktivierung verantwortlich ist.

- In allen MP2-Stämmen mit Ausnahme der Konstrukte mit der zerstörten NtcA-Box ist die *luxAB*-Aktivität höher als in Wildtyp-Stämmen. Die größte *luxAB*-Aktivität findet man in dem Konstrukt mit der perfekten NtcA-Box (pFAM-84R). Zusammenfassend lässt sich sagen; Durch die Ersetzung der nicht kanonischen NtcA-Box im *glnN*-Promoter durch eine kanonische kommt es zu einer deutlich erhöhten *luxAB*-Aktivität.

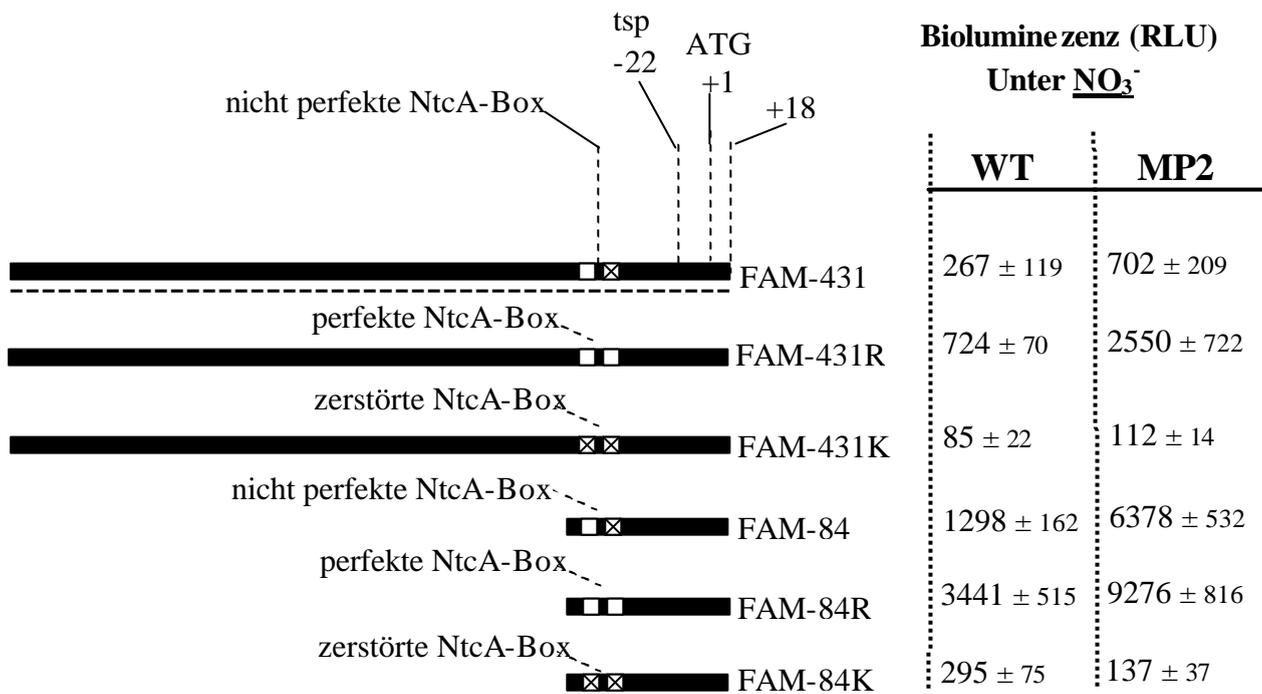


Abbildung 20 zeigt die *luxAB*-Aktivität bei verschiedenen durch mutation veränderten NtcA-Bindestellen in der *glnN*-Promoterregion im Wildtyp und in MP2-Stämmen von *S. elongatus* unter Nitratwachstumsbedingungen. Die Promoterelemente sind wie in Abbildung 13 dargestellt. Es sind sowohl die Mittelwerte für 3-4 Messungen als auch ihre Standardabweichungen angegeben.

3.2.2 Expression unter Ammoniumwachstumsbedingungen

Um den Effekt von Ammonium auf die zerstörte NtcA-Box zu finden, wurden die Zellen des Wildtyp-Promoters als auch der zerstörten NtcA-Box in ammoniumhaltigem Medium angezogen und ihre *luxAB*-Aktivität gemessen, wie in Abbildung 21 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der perfekten und zerstörten NtcA-Box in Wildtyp- und MP2-Zellen beobachtet werden, und zwar weder in dem langen als auch in dem kurzen Konstrukt. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die Werte in den kurzen Konstrukten in Wildtyp- oder in MP2-Zellen höher als in den langen Konstrukten sind. In den MNtcA-Stämme sind die *luxAB*-Aktivität in ca. 2-4 fache höher als in WT und MP2-Stämme. Das befestigt die Idee, dass die Ammonium-repression der *glnN*-Expression NtcA braucht und unabhängig von P_{II} ist.

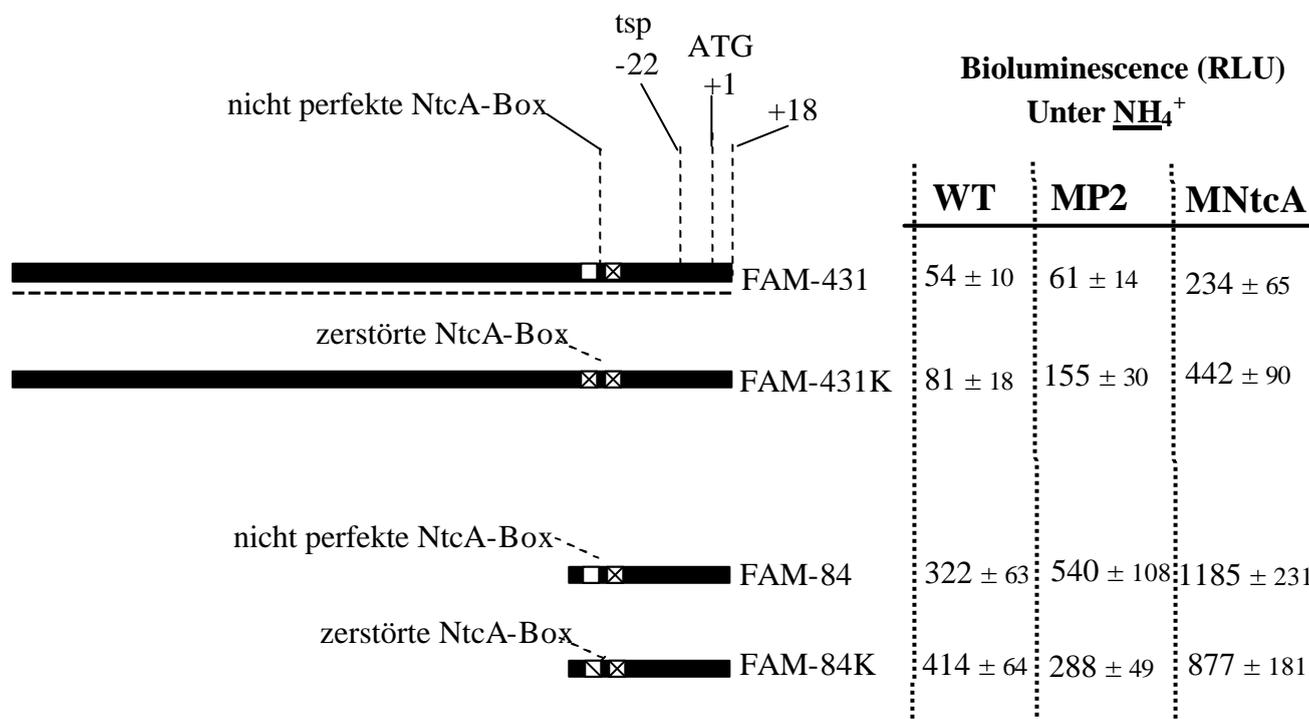


Abbildung 21 zeigt die *luxAB*-Aktivität bei den verschiedenen NtcA-Bindestellen in der *glnN*-Promoterregion im Wildtyp und MP2-Stämmen von *S. elongatus* unter Ammoniumwachstumsbedingungen. Die Promoterelemente sind genau wie in Abbildung 13 gezeigt. Die Werte stellen die Mittelwerte für 3-4 Messungen sowie auch ihre Standardabweichung dar.

3.2.3 Expression unter Stickstoffmangelbedingungen

3.2.3.1 Expression unter Stickstoffmangelbedingungen in WT-Zellen

Spielt die NtcA-Bindestelle (perfekte oder nicht perfekte) eine Rolle bei der *glnN*-Regulation bei Stickstoffentzug? Um diese Frage zu beantworten, wurden alle neuen vier Konstrukte (WT-FAM-84R, WT-FAM-431R, WT-FAM-84K und WT-FAM-431K) und auch die beiden Konstrukte WT-FAM-84, WT-FAM-431, von nitrathaltigem Medium auf stickstofffreies Medium überführt und ihre *luxAB*-Aktivität zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigte sich folgendes:

- Eine rasche und starke NtcA-Aktivierung zeigen die Konstrukte, die eine perfekte NtcA-Bindestelle besitzen. Die maximale Aktivität ist innerhalb der ersten 40 Stunden zu sehen und beträgt bei FAM-431R das ca. 20-fache von FAM-431, und FAM-84R das ca. 6-fache von FAM-84.

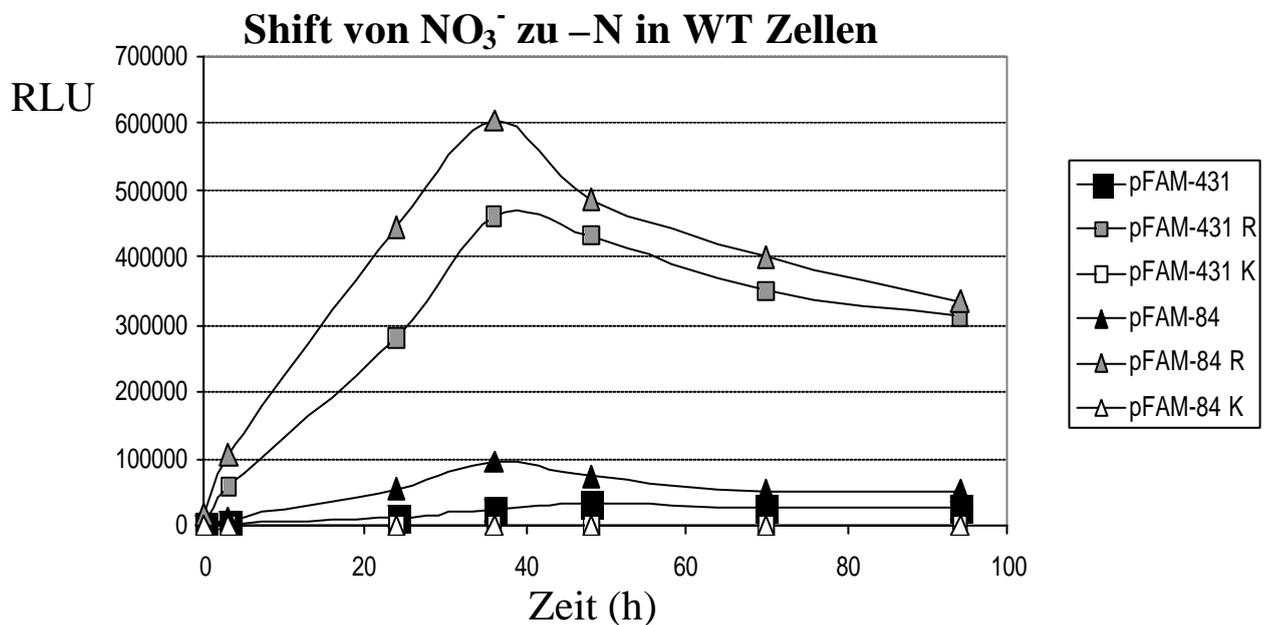


Abbildung 22: Expression der *glnN-luxAB* Reporter-Fusionen unter Stickstoffentzugsbedingungen von *S. elongatus* in WT-Zellen. Nach der Initiation des Stickstoffentzugs zum Zeitpunkt 0, wurde die *luxAB*-Aktivität der Reporter-Stämme innerhalb von 100 Stunden gemessen. Die Zellen wurden von nitrathaltigem Medium in Stickstoffmangel-Medium überführt. Unabhängige Experimente zeigten ähnliche Resultate. Jeweils ein Experiment je Bedingung wird hier dargestellt. Die Linien mit den Dreiechen zeigen die kurzen Konstrukte. Die Linien mit den Quadraten zeigen die langen Konstrukte. R: hat perfekte NtcA-Bindestelle. K: hat zerstörte NtcA-Bindestelle

- Der Repressor, der zwischen -226 und -314 bindet, zeigt schwächere Auswirkung wenn die nicht perfekte NtcA-Bindestelle in eine perfekte Bindestelle umgewandelt wurde. Er beträgt das ca. vier fache bei dem Wildtyp-Promoter innerhalb der ersten 40 Stunden nach dem Shift (zwischen FAM-431 und FAM-84) und nur das ca. 1.3 fache zwischen FAM-431R und FAM-84R.
- In den Konstrukten FAM-84K und FAM-431K ist keine Steigerung in der Aktivität unter Stickstoffentzug zu sehen.

3.2.3.2 Expression unter Stickstoffmangelbedingungen in MP2 und MNtcA

Durch die vorangegangenen Versuche (Absatz C.2.1.3) ist bekannt, dass P_{II} für die NtcA Aktivierung unter Stickstoffmangel notwendig ist. Um herauszufinden, ob die maximale NtcA-Aktivität bei Stickstoffentzug nur von P_{II} herrührt, wurden auch die neuen Konstrukte von MP2 von nitrathaltigem Medium in stickstofffreies Medium und von MNtcA von ammoniumhaltigem in stickstofffreies Medium geschiftet und ihre *luxAB*-Aktivität gemessen. Man sieht klar, dass es keine deutliche *luxAB*-Aktivität in den MP2 und MNtcA-Konstrukten (Abb. 23) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 22) gibt. Um nun herauszufinden, ob die gesamte maximale Aktivität unter Stickstoffentzug nur von P_{II} kommt, wurde die Skala verfeinert (Abb. 24). Hier wurden die maximalen RLU-Werte nur bis 16.000 gezeigt, da in MP2 und MNtcA keine höheren Werte als 16.000 zu beobachten sind. In Abbildung 24 erkennt man, dass bei MP2 die *luxAB*-Aktivität langsam ansteigt, und zwar in allen Konstrukten außer bei denjenigen, die eine zerstörte NtcA-Box besitzen. In MNtcA ist keine Steigerung der *luxAB*-Aktivität nach dem Shift zu sehen. Das heißt, dass NtcA alleine eine schwache Steigerung in der Aktivität unter Stickstoffentzug bewirkt. Diese Aktivierung ist P_{II} -unabhängig und beträgt etwa 1/10 bis 1/20 des Wildtyp-Werts.

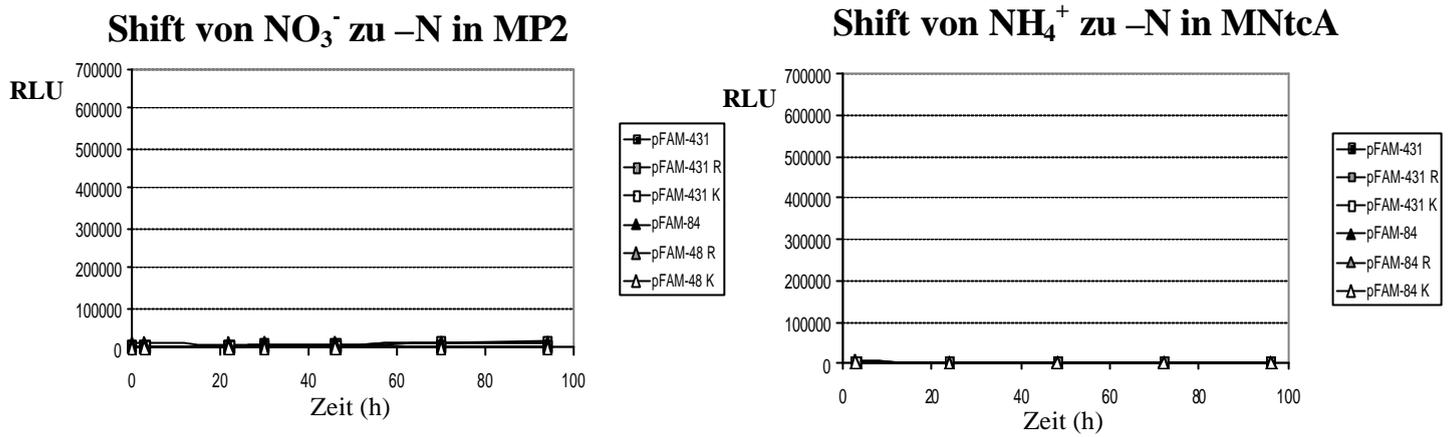


Abbildung 23 zeigt die *luxAB*-Aktivität nach Shift auf stickstoffreies Medium in MP2 und MNtcA. Die Experimente wurden unter den Bedingungen, wie in Abb. 22 dargestellt, durchgeführt. Unabhängige Experimente zeigten ähnliche Resultate. Jeweils ein Experiment je Bedingung wird hier dargestellt.

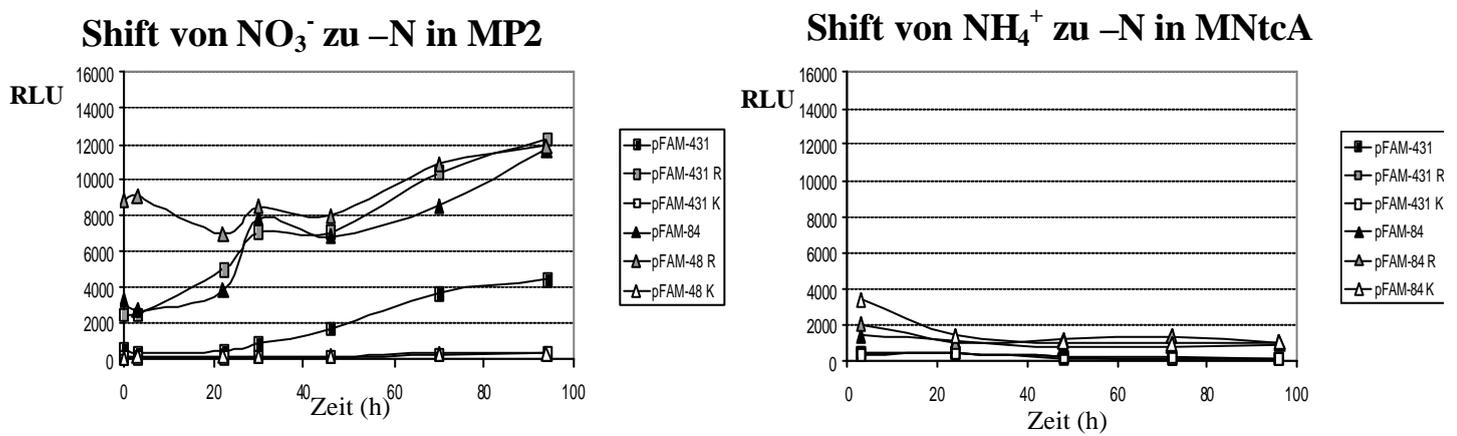


Abbildung 24 entspricht der Abbildung 23, nur die Skalen wurden verfeinert.

II Interaktionsstudien zwischen P_{II} und NtcA

1. Überproduktion und Reinigung von NtcA

Zur Aufreinigung von NtcA aus *S. elongatus* wurde das *ntcA*-Gen in zwei Überexpressionsvektoren kloniert. Zuerst wurde das *ntcA*-Gen in den Überexpressionsvektor pT7-7 kloniert (B 7.4). Daraus entstand das Expressionsplasmid PT7-7NtcA. NtcA wurde dann im *Escherichia coli*-Stamm BL21 überexprimiert. In diesem Expressionssystem gewährleistet der virale, aus dem Bakteriophagen T7 stammende Promoter F10 eine hohe Transkriptionseffizienz. Eine effiziente Translation wird durch eine Ribosomenbindungsstelle (RBS, auch als *Shine-Dalgarno* Sequenz bezeichnet) vor dem Startkodon erreicht. Darüber hinaus ist die Transkription nicht von der bakteriellen, sondern von der viralen T7-Polymerase abhängig, deren Gen ins Genom der *E. coli*-BL21 Zellen integriert ist. Dann wurde das überproduzierte Protein NtcA mittels einer Heparin-Säule gereinigt. Da das aufgereinigte NtcA Protein nicht funktionsfähig war, wurde das *ntcA*-Gen in den His₆-Tag Expressionsvektor pET-15b (ein Vektor mit einem T7-Promoter) kloniert (B 7.4). Es entstand das Expressionsplasmid pET-15bNtcA, in dem der N-Terminus des NtcA-Proteins mit 6 Histidinresten fusioniert wurde. Das Überexpressionsplasmid pET-15bNtcA wurde anschließend in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert. Das rekombinante Protein mit den Histidinresten am N-Terminus wurde anschließend über eine Nickel-NTA (Ni-NTA) Säule aufgereinigt. Das gereinigte His₆-NtcA-Protein war in *Gelshift*- und *Biacore*- Experimenten funktionsfähig.

1.1 Überexpression von His₆-NtcA aus *S. elongatus*

Das Expressionsplasmid pET-15bNtcA wurde in *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Von ca. 35 Transformanten wurden von zwei Klonen Übernachtskulturen angesetzt. Am nächsten Tag wurden die beiden Kulturen überprüft, ob sie His₆-NtcA überexprimieren können. Dazu wurde eine 30 ml Kultur von *E. coli* BL21 pET-15bNtcA bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Anschließend wurde 0,5 mM IPTG zugesetzt und die Kultur für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Von der Kultur wurde das Äquivalent von 1 ml einer OD₆₀₀ von 0,5 entnommen und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in 30 µl 2 x SDS Auftragsbuffer gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Davon wurden 15 µl auf einem 15%igem SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie

gefärbt. Wie in Abb. 25 gezeigt, ist eine klare Zunahme des His₆-NtcA-Proteins in den zweiten Klon pET-15bNtcA2 zu erkennen. Das mit einem His₆-Tag versehene NtcA sollte etwa eine Größe von 25 kDa haben. Mit diesem Klon wurde weiter gearbeitet und das His₆-NtcA-Protein über die Ni-NTA-Säule gereinigt.

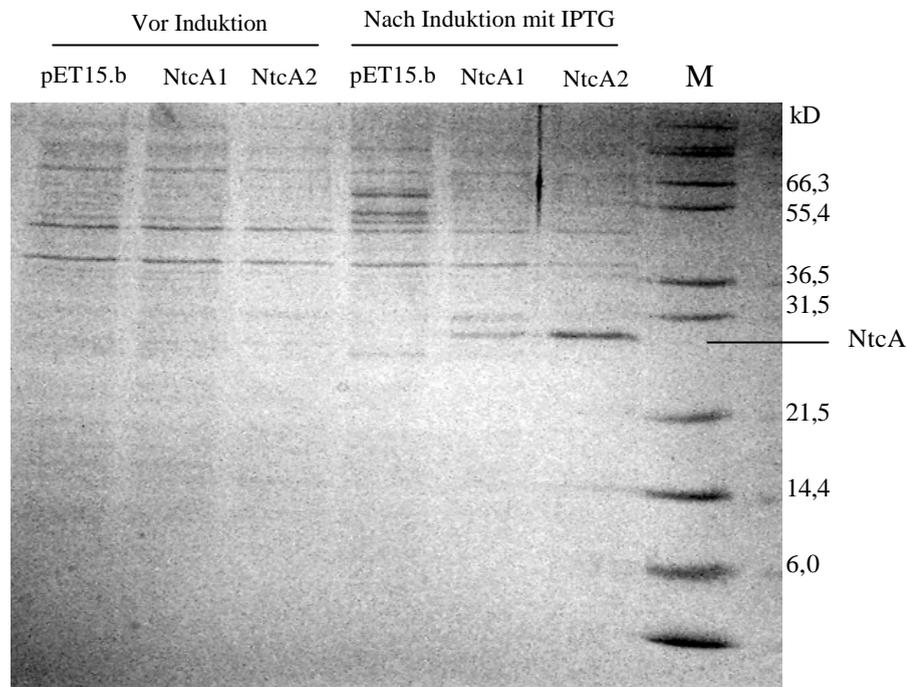


Abbildung 25: Überexpression von His₆-NtcA in *E. coli* BL21-Zellen. Die Proben wurden in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt.

1.2 Aufreinigung von His₆-NtcA

Mit einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 pET-15bNtcA wurde eine Tageskultur (1 l LB-Medium) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C angezogen. Dann wurde die Expression des *ntcA*-Gens durch Zugabe von 0,5 mM IPTG gestartet und die Zellen für 4 Stunden bei 32°C inkubiert. Die induzierten Zellen wurden am Ende der Expression durch Zentrifugation geerntet. Weitere Details zu den folgenden Methoden und Materialien für die Aufreinigung von His₆-NtcA sind in dem Punkt B 4.2 beschrieben. Das Zellpellet wurde in Zellaufbruchpuffer resuspendiert. Nachdem der Zentrifugationschritte wurde das Proteingehalt der Pellets und der Überstände bestimmt. Die Analyse der Überexpression des His₆-NtcA erfolgte auf einem 15%igem SDS-Gel (Abb. 26).

Das Gel zeigte eine deutliche Zunahme des His₆-NtcA-Proteins in der 5. Spur, die den Überstand der zweiten Zentrifugation entspricht. Es ist gut zu erkennen, dass sich eine deutliche Menge des Proteins im Überstand der zweiten Zentrifugation befindet. Die Aufreinigung von His₆-NtcA erfolgte über eine Ni-NTA-Säule. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem linearen Imidazol-Gradienten (50 bis 250 mM). His₆-NtcA eluierte bei etwa 250 mM Imidazol. Die Elutionsschritte dieser Affinitätschromatographie sind in Abbildung 27 gezeigt.

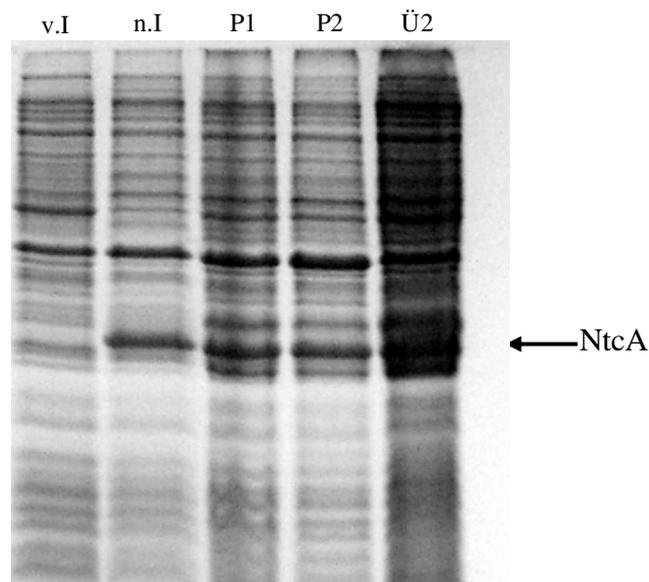


Abbildung 26: Überexpression von His₆-NtcA. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem 15%igem SDS-Gel. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Es ist zu sehen, dass sich das Protein nach den beiden Zentrifugationsschritten im Überstand Ü2 befindet. v.I: vor Induktion; P1: Pellet von der ersten Zentrifugation; n.I: nach Induktion mit IPTG; P2: Pellet von der zweiten Zentrifugation; Ü: Überstand von der zweiten Zentrifugation

Abbildung 27 zeigt das Elutionsprofil der His₆-NtcA Aufreinigung über die Ni-NTA Säule. Je 10 µl der gesammelten Fraktionen wurden auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und auf den Gehalt an His₆-NtcA untersucht. Das Gel wurde mit Coomassie blau gefärbt (Abb. 28), und zeigt deutlich, dass das His₆-NtcA-Protein hauptsächlich in den Fraktionen 57 bis 63 eluiert.

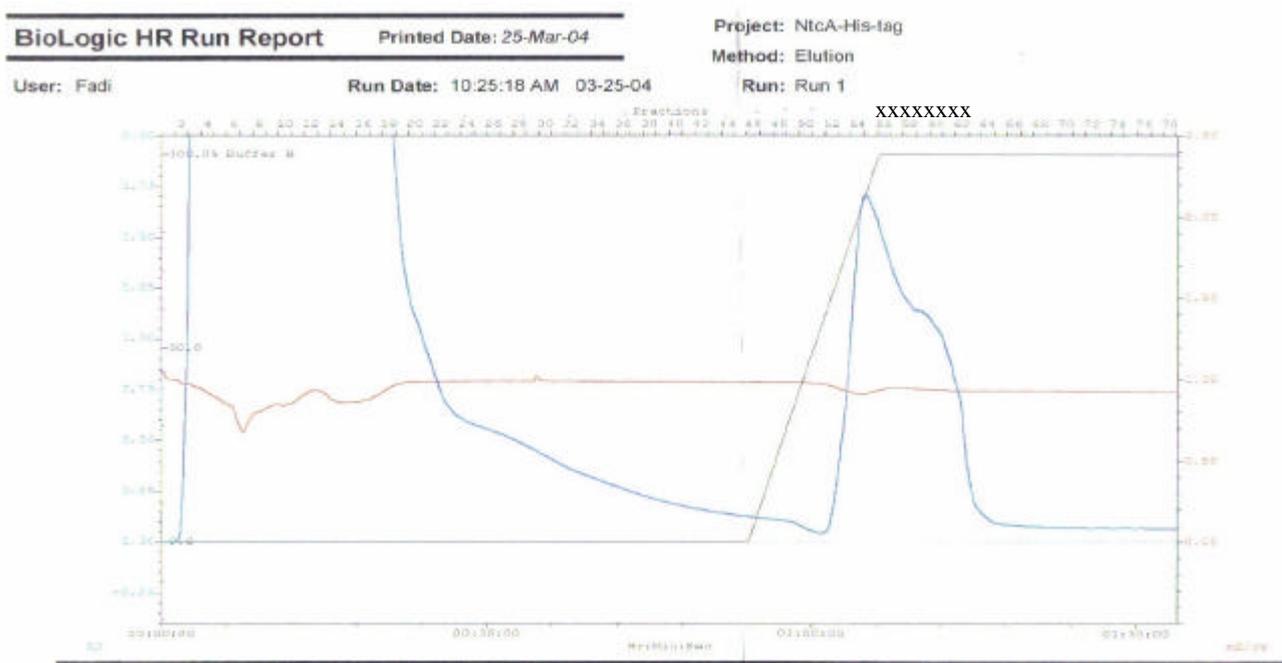


Abbildung 27: Elutionsprofil der His₆-NtcA Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule. Die blaue Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Die Fraktionen, die His₆-NtcA-Protein enthalten, sind mit x markiert (durch 15%iges SDS-Gel detektiert).

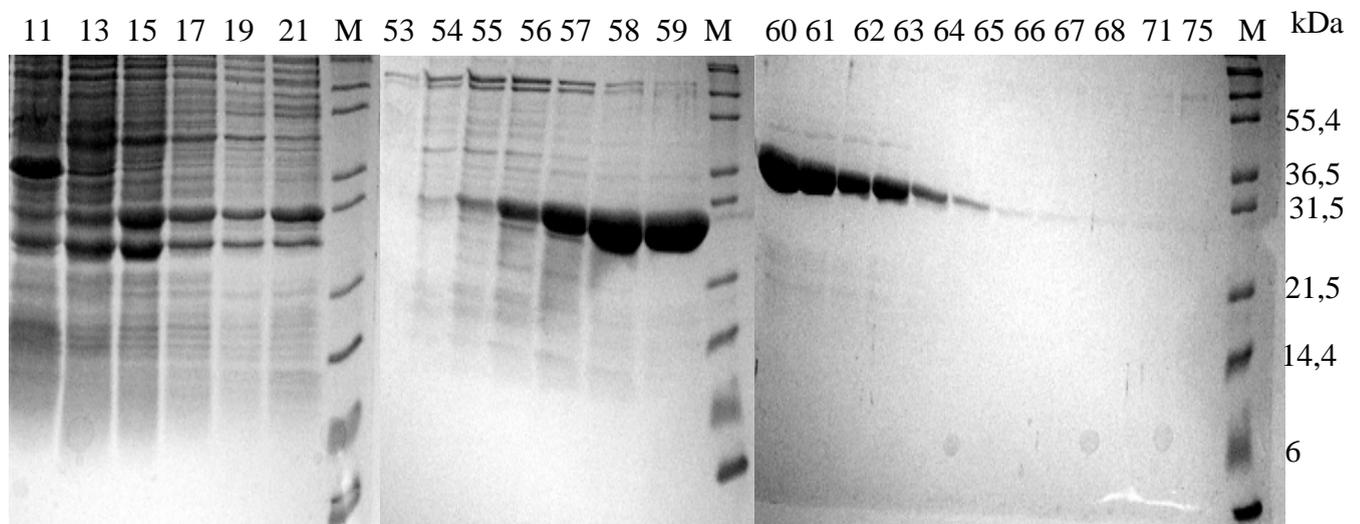


Abbildung 28: Fraktionen der His₆-NtcA Aufreinigung, aufgetrennt in einem 15%igem SDS-Gel. Das Gel ist mit Coomassie gefärbt und zeigt deutlich die Elution des His₆-NtcA-Proteins in den Fraktionen 56-63.

Die Fraktionen von 58 bis 63 werden anschließend vereinigt (ca. 21 ml). Dann wurde das His₆-NtcA-Protein in einen Glycerin-haltigen Lagerbuffer über Nacht dialysiert. Das Protein kann in diesem Puffer bei -20°C aufbewahrt werden.

Die erhaltenen 3 ml der His₆-NtcA-Lösung haben eine Konzentration nach Bradford von 1,79 mg/ml bzw. 68 µM (mittels Bradford bestimmt). Das Gel in Abb. 29 zeigt die Reinheit des His₆-NtcA-Proteins in einem Coomassie-gefärbtem 15%igem SDS-Gel (A). 1 µl der aufgereinigtem His₆-NtcA wurde nach einer SDS-Gel (15%) mit Silber gefärbt (Abb. 29 B).

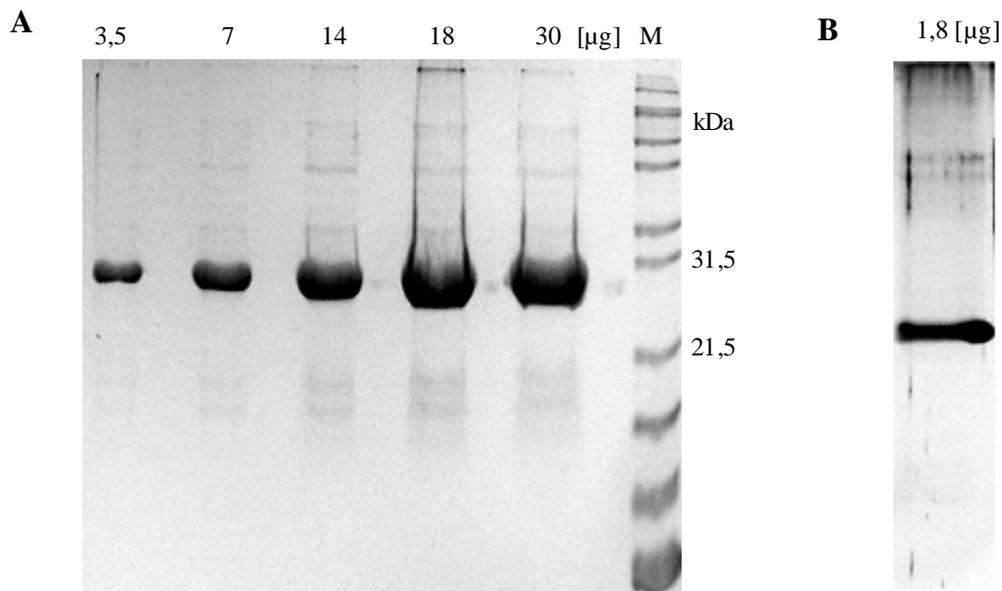


Abbildung 29: Verschiedene Mengen des gereinigten His₆-NtcA in einem SDS-Gel. (A) Das Gel zeigt die Reinheit des Proteins in einem 15%igem Coomassie-gefärbte Gel. (B) 1,8 µg von His₆-NtcA in einem Silber-gefärbten 15%igem SDS-Gel.

1.3 His₆-NtcA Konzentrationbestimmung durch Absorptionmessung

Abbildung 30 zeigt das Spektrum des gereinigten NtcA von 220 bis 350 nm. Man sieht, dass das Absorptionsmaximum bei 260 nm ist (wobei die Nukleinsäuren ihr Maximum bei 260 nm haben). Das heißt, dass das gereinigte His₆-NtcA mit Nukleinsäuren unreinigt ist. Das Molekulargewicht von His₆-NtcA und den theoretischen Extinktionskoeffizienten lassen sich mit Hilfe von *Vector NTI* Programm ermitteln:

Analyse des His ₆ -NtcA	
Länge	229aa (with 6-His)
Molekulargewicht	25765.71 m.w.
1 Mikrogramm =	38.811 pMoles
Molare Extinktionskoeffizient	3960
1 A[280] entspricht	6.51 mg/ml
1 A[280] von 1 mg/ml	0,15 AU
Isoelektrischer Punkt	8.78

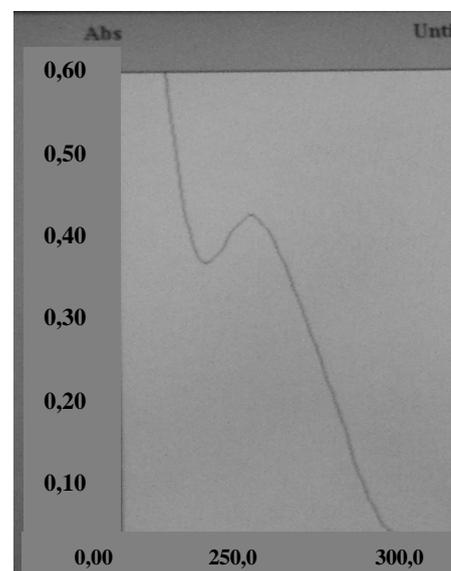
Messung	260 nm	280 nm	Verdünnung	R
His ₆ -NtcA	0,423	0,242	1:10	0,572

Verhältnis $R = A_{280} / A_{260}$

R sollte größer als 1 sein, wenn keine Nucleinsäuren in der Lösung vorliegen würden.

Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren) entspricht 50 µg / ml ds DNA bzw. 40 µg / ml ss DNA oder RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Bei einer Proteinkonzentration von 0,179 mg/ml nach Bradford erwartet man eine Absorption bei 280 nm von 0,0274. Tatsächlich wurde aber eine Absorption bei 280 nm von 0,242 erhalten. Das heißt, dass das gereinigte His₆-NtcA mit Nucleinsäure verunreinigt ist, und zwar mit 210,15 µg/ml ds DNA bzw. 160,92 µg/ml ss DNA oder RNA.

Abbildung 30: Spektrum des gereinigten His₆-NtcA von 220 bis 350 nm



2. P_{II}-NtcA-Interaktionsstudien mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse

Mit Hilfe von Biosensoren, die auf physikalischen Prinzipien beruhen, kann eine biomolekulare Interaktionsanalyse durchgeführt werden. In diesem Fall wurde die *Biacore*-Maschine (*Biacore X*) benutzt, um kleinste Massenveränderungen zu detektieren, die einer Bindung eines Interaktionspartners entsprechen. Aus dem Assoziations- und Dissoziationsverhalten der Interaktionspartner kann die Beziehung zwischen den beiden Proteinen unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden.

2.1 Prinzip der Interaktionsmessung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse

Funktionelle Aspekte biologischer Wechselwirkungen können genau analysiert werden, indem die Interaktion einer nicht markierten Probe mit einem immobilisierten Liganden (Protein, Peptid, DNA) gemessen wird. Ein Reaktand, der sogenannte Rezeptor, wird auf der Dextranoberfläche eines Sensorchips gebunden. Der zweite Reaktand, der Analyt, strömt über die Oberfläche des Sensorchips. Die Bindung des Analyten kann durch Massenänderung an der Oberfläche des Sensors gemessen werden. Dadurch kann in der Assoziationsphase eine Signaländerung erzeugt werden. Nachdem der Bindungsprozess beendet ist, kann man die Dissoziationsphase verfolgen. Am Ende bekommt man ein sogenanntes Sensorgramm, das aus drei Phasen besteht:

- Assoziationsphase: zeigt die Bindung des Analytes an den Liganden
- Dissoziationsphase: stellt die Stärke der Bindung zwischen dem Analyten und dem Liganden dar
- Regenerationsphase: in dem der Analyt den Liganden vollständig verlässt.

Der Winkel des reflektierten Lichts ändert sich, wenn Proteine oder DNA an der Oberfläche des Chips gebunden werden, bzw. wenn ein Bindungspartner mit den gebundenen Liganden interagiert (Szabo *et al.*, 1995). Das Messergebnis, d.h. die Änderung des Reflektionswinkels, wird von der Computersoftware als RUs *Resonance Units* bezeichnet. Temperatur, Fließgeschwindigkeit des Puffers und das Volumen der Probeninjektion können durch den Rechner bestimmt werden.

2.2 Immobilisierung von 5'-biotinilierten DNA-Fragmenten auf einem Streptavidin-Chip (SA-Chip)

Um die DNA auf einem Sensorchip zu binden, muss das 3' oder 5' Ende der DNA mit einem Biotinmolekül verknüpft werden, damit die DNA mittels des Biotinrestes kovalent an eine Streptavidinoberfläche binden kann (Gunnarson *et al.*, 1999). Es wurden über PCR zwei 5'-End-biotinierte DNA-Fragmente hergestellt (B 4.4.1.1).

- Fragment A (135 bp) enthält keine NtcA-Bindestelle.
- Fragment B (123 bp) enthält eine NtcA-Bindestelle in der Mitte des Fragments.

Anschließend wurden die beiden Fragmente auf zwei Fließzellen eines Streptavidin (SA)-Chips immobilisiert. Das biotinylierte DNA-Fragment A wurde auf der Fließzelle Fc₁ (flow cell 1) immobilisiert, während das zweite Fragment B auf der zweiten Fließzelle Fc₂ immobilisiert wurde. Für das Fragment A war ein Anstieg der Resonance-Units (RU) von etwa 1115 zu verzeichnen, während die Bindung des zweiten Fragments B eine Änderung von 1175 RU bewirkte. Abbildung 30 zeigt die Bindungskurve der beiden Fragmente A und B auf dem SA-Chip. Weitere Details zu den folgenden Methoden und Materialien für die *Biacore*-Experimente sind in dem Punkt B 4.4.1. beschrieben.

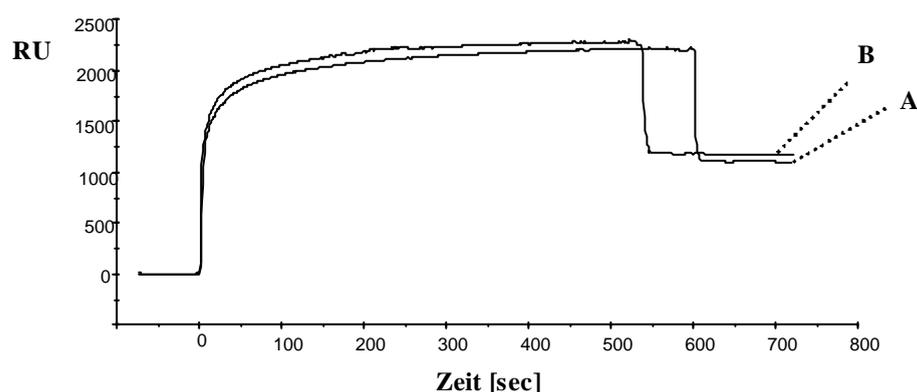


Abbildung 31: Immobilisierung der beiden 5'-biotinylierten DNA-Fragmente auf einem SA-Chip. (A) Bindung von Fragment A auf der Fc₁. (B) Bindung von Fragment B auf der Fc₂. Bedingungen: 10 minütige Injektion von insgesamt 2 µg DNA mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 µl/min.

2.3 Messung der Bindung von NtcA an die DNA-Fragmente

Da keine Bindung von His₆-NtcA an die DNA durch die Verwendung der Bindungspuffer (12 mM Hepes pH 8; 4 mM Tris-HCl pH 8; 60 mM KCl; 1mM DTT; 250 µg/ml BSA) nach Vazquez-Bermudez *et al.*, (2002a) festgestellt wurde, wurden andere Bindungspuffer (Puffer H: 50 mM Hepes pH 7; 50 mM Natrium Acetat; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 100 µg/ml BSA) nach Wray *et al.*, (1998) verwendet. Mit diesem Puffer konnte eine Bindung von His₆-NtcA an die DNA festgestellt werden. Später wurden alle Interaktionsstudien mit diesem Puffer in den *Biacore*-Experimenten durchgeführt. Zunächst konnte mit Puffer H bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 bis 30 µl/min eine Bindungskurve von His₆-NtcA auf die spezifischen (mit NtcA-Bindestelle) und unspezifischen (ohne NtcA-Bindestelle) DNA-Fragmente erstellt werden. Es war kein Unterschied bei der Stärke der Bindung von His₆-NtcA an die spezifische oder unspezifische DNA zu sehen. Deshalb wurde die Fließgeschwindigkeit auf 80 µl/min erhöht. Zu Beginn der Probeninjektion konnte im Verlauf der Kurve eine starke Assoziation von 898±50 RU bei der unspezifischen DNA-Zelle (Fc₁) und von 1119±30 RU bei der spezifischen DNA Zelle (Fc₂) erreicht werden. Nach Ende der Probeninjektion folgt eine langsame Dissoziationsphase (Abb. 32-A). Mit Hilfe des Computers konnte der Unterschied der His₆-NtcA-Bindung an Fragment A und B gemessen werden; er lag bei ca. 216± 24 RU (Abb. 32-B).

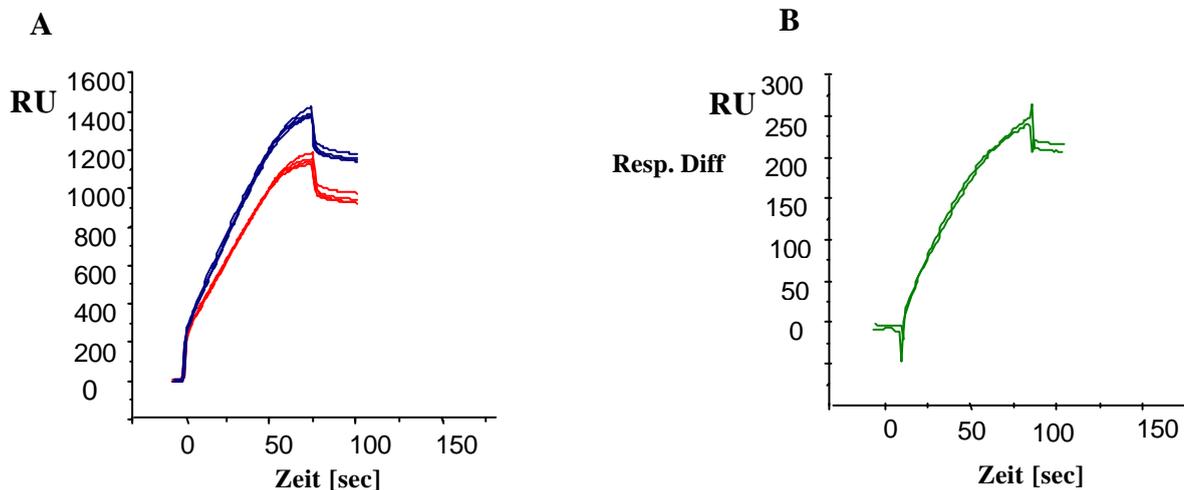


Abbildung 32: Bindungskurve von His-NtcA an die beiden Fragmente A und B. Es wurden 100 µl (8 ng/µl His₆-NtcA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 µl/min über den SA-Chip mit gebundener biotinylierter DNA geleitet. (A) Während His₆-NtcA eine Zunahme von 1119± 30 RU bei der Bindung an Fragment B erreicht (blaue Kurve entspricht Fc₂), ist bei der Bindung an Fragment A eine Zunahme von 898± 50 RU zu sehen (rote Kurve entspricht Fc₁). (B) Zeigt die Differenzkurve von A. jede Kurve ist hier in 4 Messungen zusammen gestellt.

Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung von His₆-NtcA wurde das Protein TnrA anstatt des His₆-NtcA verwendet. TnrA ist ein Transkription-Aktivator und spielt eine große Rolle bei der globalen Stickstoffregulation in *Bacillus subtilis* (Wray *et al.*, 1996). Genau wie in den letzten Experimenten wurden 100 µl (8 ng/µl von TnrA) über den SA-Chip mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 µl/min geleitet. Abbildung 33-A zeigt die Bindungskurven von TnrA an die DNA in Fc₁ und Fc₂ (Fragment A und B). Hier ist auch ein Unterschied bei der Bindungsstärke des TnrA zu sehen. TnrA bindet mit ca. 104 RU stärker an Fragment B (Abb. 33-B). Bei diesem Unterschied handelt sich aber nicht um eine spezifische Bindung. Der Unterschied könnte daher kommen, dass in Fc₂ mehr DNA als in Fc₁ gebunden ist (ca. 60 RU mehr als in Fc₁; siehe Abb. 31). Daraus kann gefolgert werden, dass die in Abb. 32 gezeigte bevorzugte Bindung von NtcA an Fc₂ keine echte spezifische Bindung darstellt.

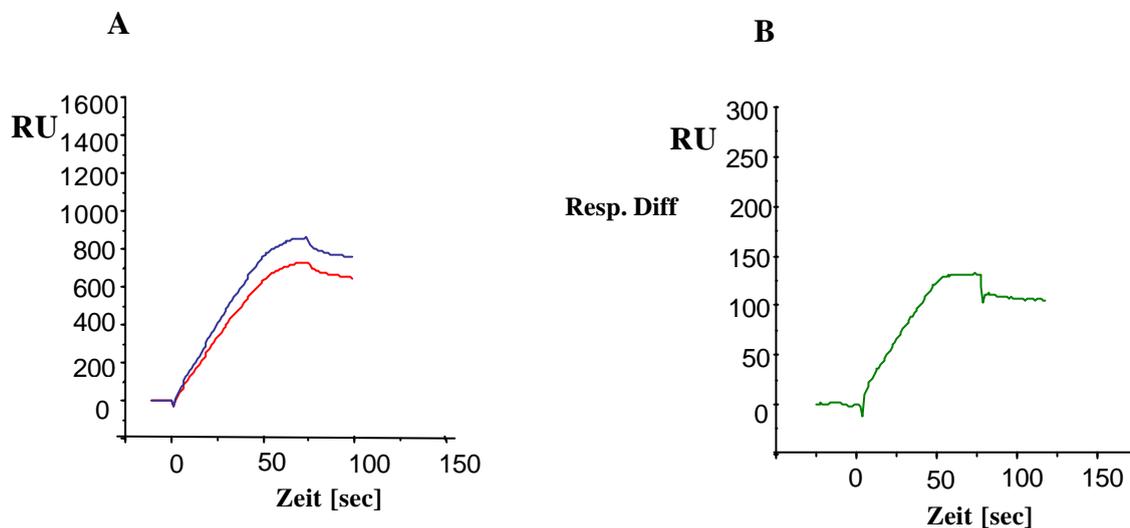


Abbildung 33: Bindungskurve von TnrA an beide Fragmente A und B. Es wurden 100 µl (8 ng/µl TnrA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 µl/min über den SA-Chip mit gebundener biotinylierter DNA geleitet. (A) Während TnrA eine Zunahme von 763 RU bei der Bindung an den Fragment B erzeugt (blaue Kurve), ist bei der Bindung an den Fragment A eine Zunahme von 649 RU zu sehen (rote Kurve). (B) Die Differenzkurve von A.

2.3.1 Effekt von ATP auf die NtcA-DNA-Bindung

Um den Effekt von ATP auf die NtcA-DNA-Bindung zu analysieren, wurden die gleichen Experimente durchgeführt, diesmal in Anwesenheit von 0,5 mM ATP. Wie in Abbildung 34 dargestellt, wurde die Bindung von His₆-NtcA an die DNA durch Zugabe von 0,5 mM ATP verstärkt, und zwar um 1683 ± 24 RU bei dem Fragment B, und um 1440 ± 30 RU bei dem

Fragment A (Abb. 34-A). Dadurch liegt die Differenzkurve ohne Einfluss von ATP bei 216 ± 24 RU und in der Gegenwart von ATP bei 270 ± 30 RU (Abb. 34-B). Das heißt, dass die ATP die NtcA-Bindung an beide Fragmente erhöht, unabhängig davon, ob die DNA eine NtcA-Bindestell enthält oder nicht.

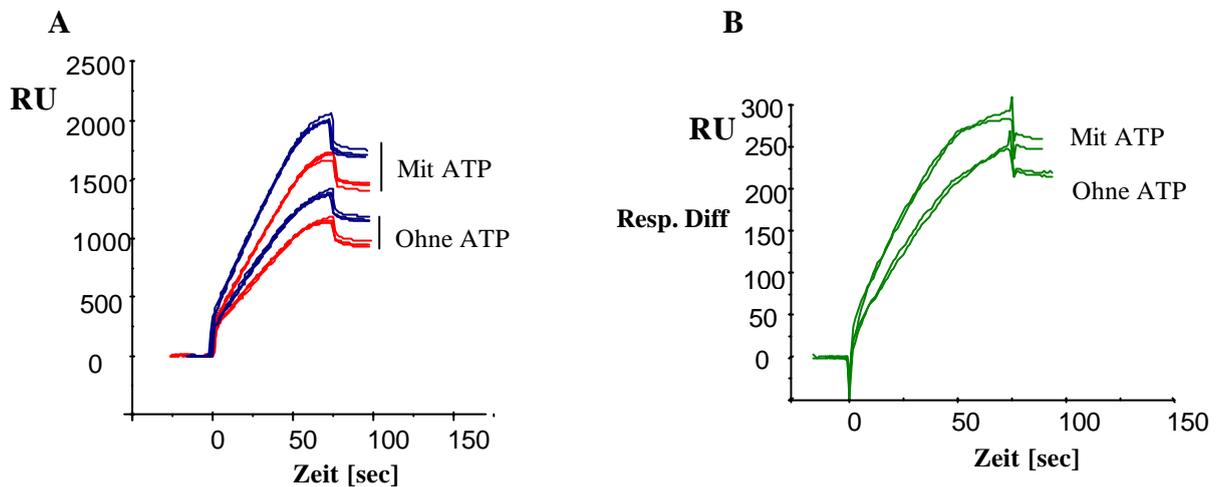


Abbildung 34: Bindungskurve von His₆-NtcA an beide Fragmente A und B in Gegenwart von 0,5 mM ATP. Es wurden 100 μ l (8 ng/ μ l His₆-NtcA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 μ l/min über den SA-Chip mit gebundener biotinylierter DNA geleitet. (A) Während His₆-NtcA eine Zunahme von 1683 ± 24 RU bei der Bindung an Fragment B erzeugt (blaue Kurve), ist bei der Bindung an Fragment A eine Zunahme von 1440 ± 30 RU zu sehen. (B) Die Differenzkurve von A. Jede Kurve ist hier in 2-3 Messungen zusammen gestellt.

2.3.2 Effekt von 2-Oxoglutarat, Mg²⁺ und ATP auf die NtcA-DNA-Bindung

Herrero *et al.*, 2001 zeigte, dass die Affinität der NtcA-Bindung an das DNA-Fragment der *glnA*-Promoterregion um das 5-fache zunimmt, wenn 2-OG und Mg²⁺ vorhanden sind. (0,6 mM 2-OG und 5 mM Mg²⁺). Um zunächst den Effekt von 2-OG alleine auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung zu analysieren, wurde das gleiche Experiment von Absatz 2.3.1 durchgeführt, diesmal aber in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von 2-OG. Wie in Abbildung 35-A dargestellt steigt bei zunehmender Konzentration von 2-OG die Bindung von His₆-NtcA an die DNA. Die beste Bindung ist bei 5 mM 2-OG zu sehen. Durch die Differenzkurven sieht man, dass His₆-NtcA die DNA am besten bei 1 mM 2-OG (Abb. 35 -B) erkennt.

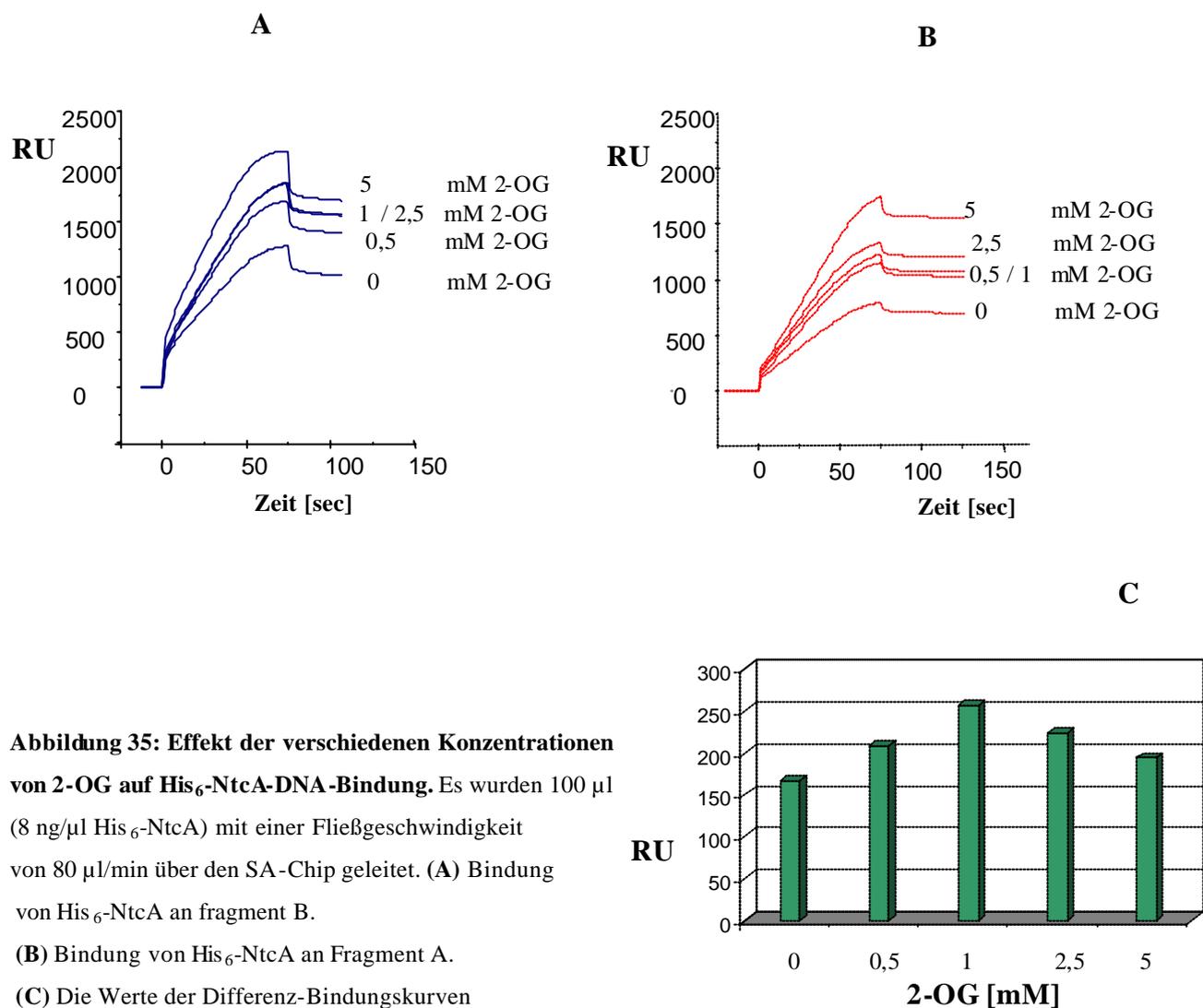


Abbildung 35: Effekt der verschiedenen Konzentrationen von 2-OG auf His₆-NtcA-DNA-Bindung. Es wurden 100 μ l (8 ng/ μ l His₆-NtcA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 μ l/min über den SA-Chip geleitet. **(A)** Bindung von His₆-NtcA an fragment B.

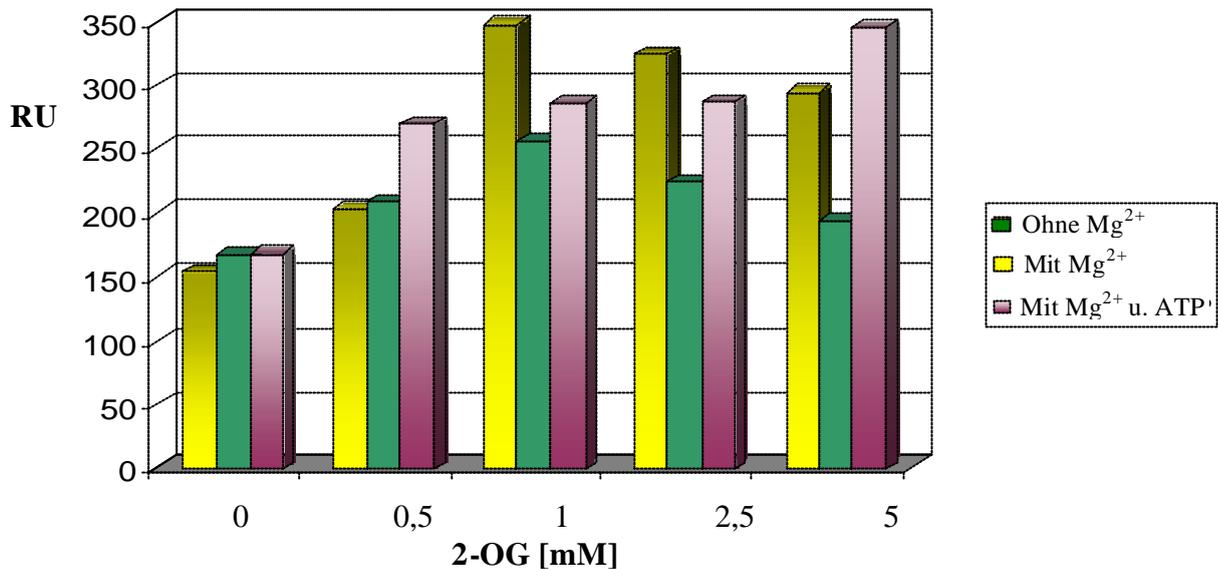
(B) Bindung von His₆-NtcA an Fragment A.

(C) Die Werte der Differenz-Bindungskurven

werden in einem Balkendiagramm dargestellt. **(D)** Effekt von Mg²⁺ und ATP mit verschiedenen Konzentrationen von 2-OG auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung. Hier sind die Werte der Differenzkurven dargestellt. 5 mM Mg²⁺, 0,5 mM ATP. Für die Bindungskurven siehe Anhang 7-8-9.

Dann wurde der Effekt von Mg²⁺ bei verschiedenen Konzentrationen von 2-OG untersucht, und zwar einmal in Abwesenheit von ATP und einmal in Gegenwart von 0,5 mM ATP. Abbildung 35-D zeigt, dass durch Zugabe von Mg²⁺ oder Mg²⁺ und ATP zusammen bei Abwesenheit von 2-OG kein signifikanter Unterschied bei der Bindung von His₆-NtcA zu registrieren ist. Das heißt, dass 2-OG nötig ist, um die Bindung von His₆-NtcA an die DNA zu verstärken. Die stärkste Bindung zeigt sich bei 1 mM 2-OG und 5 mM Mg²⁺ oder bei 5 mM 2-OG, 5 mM Mg²⁺ und 1 mM ATP (Abb. 35-D).

D



Legende: siehe Abbildung 35-D.

2.3.3 Effekt von P_{II} auf die NtcA-DNA-Bindung

Nach der Identifizierung der Bedingungen der His₆-NtcA-DNA-Bindung stellt sich eine interessante Frage: Hat P_{II} Einfluss auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung? Um diese Frage zu beantworten, wurden die folgenden *Biacore*-Experimente durchgeführt. Zwei verschiedene Formen von P_{II} wurden hier verwendet, Wildtyp-P_{II} (P_{II}-WT) und P_{II}-D. In der P_{II}-D Form ist das Serin 49 gegen Asparaginsäure ausgetauscht worden. P_{II}-D simuliert die phosphorylierte Form von P_{II} (Lee *et al.*, 2000). Zuerst wurde der Effekt von P_{II}-WT ohne Zugabe von ATP oder 2-OG untersucht. Abbildung 36-A zeigt, dass bei steigenden Konzentrationen der P_{II}-WT-Form die His₆-NtcA-DNA-Bindung sinkt. Je mehr P_{II}-WT zugegeben wird, desto stärker ist die Verringerung der Bindung. Diese Verringerung ist unabhängig von ATP oder 2-OG, da diese Bindung von His₆-NtcA an die DNA in Anwesenheit / oder in Abwesenheit von ATP und 2-OG sich bei Zugabe von 8 μM von P_{II}-WT um das ca. 7-fache verringert.

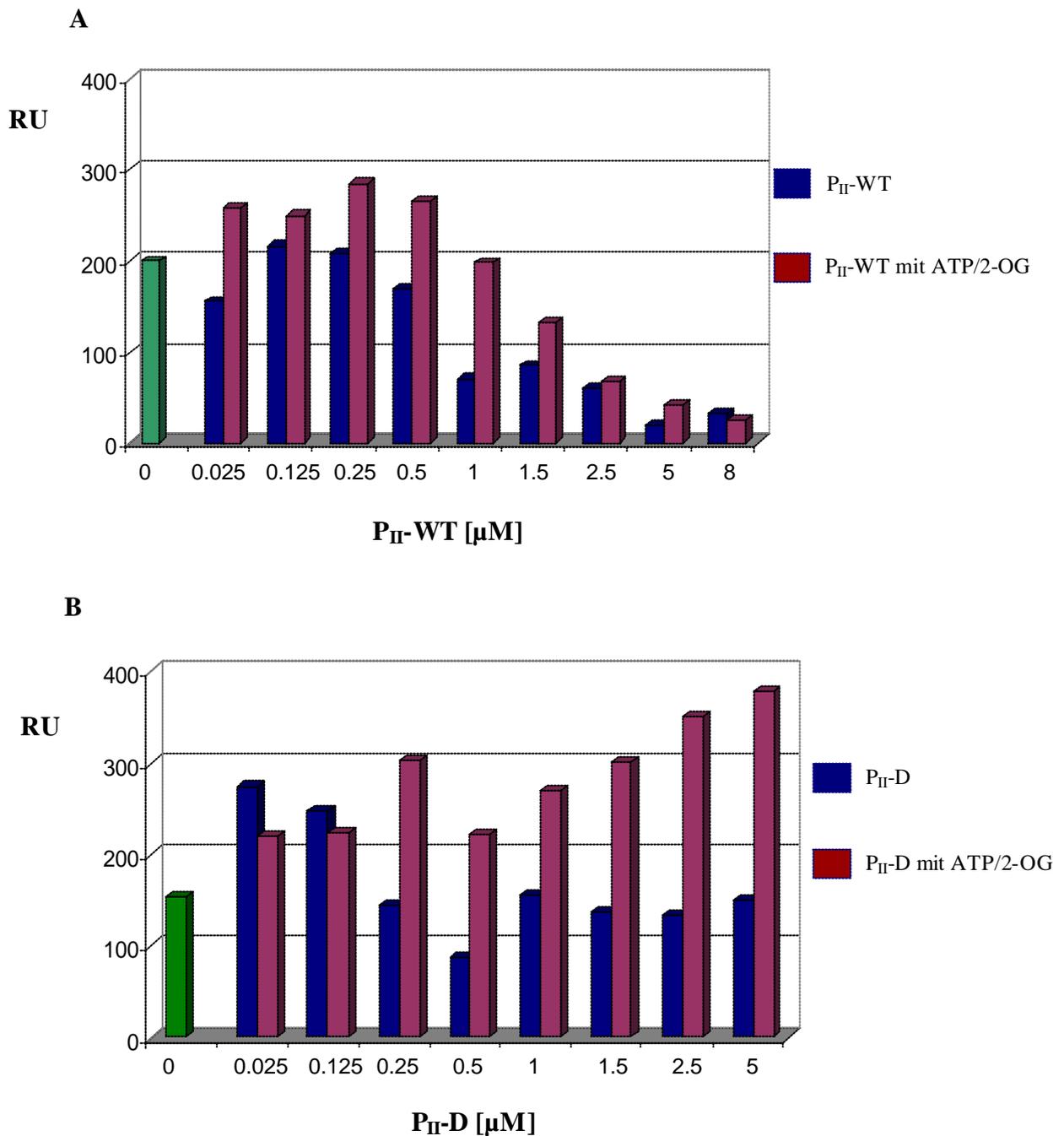


Abbildung 36: Effekt der verschiedenen Konzentrationen von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung. Es wurden 100 µl (8 ng/µl His₆-NtcA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 µl/min über den SA-Chip geleitet. Hier ist nur die Differenz gezeigt. **(A)** zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des P_{II}-WT ohne (blaue Säulen) oder mit 2-OG und ATP (rote Säulen). **(B)** zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des P_{II}-D ohne (blaue Säulen) oder mit 2-OG und ATP (rote Säulen). 0,2 mM 2-OG; 0,6 mM ATP; His₆-NtcA allein ist in den grünen Säulen ohne ATP und 2-OG dargestellt. Für die Bindungskurven siehe Anhang 10-11

In Anwesenheit von P_{II}-D und ohne ATP und 2-OG ist trotz der Zugabe von höheren P_{II}-D Konzentrationen kein signifikanter Effekt zu sehen (Abb. 36-B). Der starke Effekt von P_{II}-D ist nur in Anwesenheit von ATP und 2-OG zu sehen, da sich hier bei steigenden P_{II}-D Konzentrationen die Bindung von His₆-NtcA an die DNA signifikant erhöht. Bei einer Zugabe von 5 µM P_{II}-D verstärkt sie sich bis auf das ca. 2,4-fache. Das heißt, dass P_{II}-D eine positive Rolle für die Bindung von His₆-NtcA nur in Anwesenheit von ATP und 2-OG spielt, während P_{II}-WT einen negativen Effekt auf die Bindung von His₆-NtcA ausübt, sogar ohne ATP und 2-OG.

Um nun herauszufinden, ob ATP und 2-OG zusammen notwendig sind, um den positiven Effekt von P_{II}-D zu erhalten, wurde der Effekt von P_{II}-D (100 µM) einmal mit ATP (0,6 mM) allein und einmal mit 2-OG (0,2 mM) allein untersucht. Wie Tabelle 3 zeigt, erhöht die Zugabe von P_{II}-D in Anwesenheit von ATP die Bindung um das 1,3-fache, während die Zugabe von P_{II}-D in Anwesenheit von 2-OG die Bindung um das 0,22-fache verringert. Bei Zugabe von P_{II}-D in Anwesenheit von 2-OG und ATP erhöht sich die Bindung bis auf das 1,4-fache. Die Zugabe von P_{II}-D alleine hat keinen Effekt. Das gleiche Experiment wurde mit P_{II}-WT durchgeführt. Tabelle 3 zeigt, dass P_{II}-WT immer die Bindung verringert, unabhängig, ob ATP oder 2-OG vorhanden sind oder nicht. Die Verringerung ist unterschiedlich, d.h. P_{II}-WT verringert die Bindung:

- bei Abwesenheit von ATP und 2-OG um das ca. 0,29-fache,
- bei Anwesenheit von ATP allein um das ca. 0,45-fache,
- bei Anwesenheit von 2-OG allein um das ca. 0,26-fache,
- bei Anwesenheit von ATP und 2-OG um das ca. 0,38-fache.

	-ATP -2OG	+ ATP	+ 2OG	+ ATP+ 2OG
NtcA	181 ± 29	270 ± 40	212 ± 40	221 ± 25
NtcA + P_{II}-WT	52 ± 11	122	56	84 ± 22
NtcA + P_{II}-D	155 ± 7	356 ± 37	47	316 ± 49

Tabelle 3: Effekt von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung. Es wurden 100 µl (8 ng/µl His₆-NtcA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 µl/min über den SA-Chip geleitet. Hier ist nur die Werten von den Differenzkurven gezeigt (2,5 µM P_{II}-D, 2,5 µM P_{II}-WT, 0,2 mM 2-OG, 0,6 mM ATP). Für die Bindungskurven siehe Anhang 12

3. Gel-Retardations-Experimente

Die *Gelshift*-Experimente mit His₆-NtcA wurden aus zwei Gründen durchgeführt. Zum einen, um die Funktionsfähigkeit des gereinigten His₆-NtcA-Proteins zu überprüfen und zum anderen, um die Einwirkung von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA Bindung zu untersuchen. Mit anderen Worten: um die Beziehung zwischen His₆-NtcA und P_{II} zu analysieren. Die Durchführung der *Gelshift*- Experimente erfolgte folgendermaßen:

- Zuerst wurde ein DNA-Fragment hergestellt, das eine spezifische NtcA-Bindestelle enthält. Als Kontrolle wurde ein anderes Fragment, das keine NtcA-Bindestelle enthält, hergestellt. Die beiden Fragmente wurden mit radioaktivem γ -³²P am 5'-Ende des Fragments markiert.
- Dann wurde die Bedingung der His₆-NtcA-Bindung an die spezifische Bindungsstelle optimiert, und zwar durch Verwendung verschiedener Puffer und unterschiedlicher Konzentrationen von 2-OG und Mg²⁺.
- Anschließend wurde die Einwirkung von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung durch Verwendung der beiden P_{II}-Formen, P_{II}-WT und P_{II}-D, untersucht.

3.1 Herstellung des DNA-Shift-Fragments

Als DNA-Sequenz für die Bindungsstudien wurden zwei DNA-Fragmente hergestellt:

- Fragment 1 (123 bp): wurde aus dem Plasmid pFAM1 hergestellt, in dem sich die NtcA-Bindestelle GTAN8TAC in der Mitte des Fragments befindet.
- Fragment 2 (135 bp): wurde aus dem Bereich -226 bis -314 der *glnN*-Promoterregion hergestellt und enthält keine NtcA-Bindestelle.

Diese Fragmente sind die gleichen Fragmente, die für die *Biacore*-Experimente verwendet wurden. Die radioaktiven Markierungen der 5'-Enden beider Fragmente wurden mit Hilfe von (γ -³²P)-ATP und der T4-Polynukleotidkinase durchgeführt. Die radioaktiven Fragmente wurden über eine Säule gereinigt. Weitere Details für die Entstehung und Reinigung der Fragmente und für die *Shift*-Experimente sind in Abschnitt B 4.4.2 beschrieben.

3.2 Optimierung der NtcA-DNA Bindungsbedingungen

In den durchgeführten *Shift*-Experimenten wurde die spezifische Bindung des gereinigten His₆-NtcA an seine DNA-Bindestelle untersucht und die Bedingungen dieser spezifischen Bindung wurden optimiert. Zuerst wurde der Puffer A (12 mM Hepes pH 8; 4 mM Tris-HCl pH 8; 60 mM KCl; 1mM DTT; 250 µg/ml BSA; 100 µg/ml Lacksperm DNA; 8% Glycerol) als Bindungspuffer nach Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002 verwendet. Trotz der Verwendung verschiedener His₆-NtcA-Konzentrationen konnte keine spezifische Bindung an das DNA-Fragment 1 festgestellt werden. Deshalb wurde der Bindungspuffer H (50 mM Hepes pH 7; 50 mM Natrium Acetat; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 100 µg/ml BSA; 25 µg/ml lacksperm DNA; 5% Glycerol) nach Wray *et al.*, 1998 verwendet. Hier konnte die Bindung von verschiedenen His₆-NtcA-Konzentrationen an das spezifische DNA-Fragment 1 festgestellt werden (Abb. 37). Das Gel zeigt die Bindung von His₆-NtcA an das DNA-Fragment. Hier war die Bindung nicht ausreichend, wie etwa die Bindung von His₆-NtcA an das Promoter-Fragment *gor* (*glutathion reductase*-Gene), das auch eine kanonische NtcA-Bindestelle hat (Wisen *et al.*, 1999). Während die *Shift*-Experimente von Wisen *et al.*, einen kompletten *Shift* bei ca. 130 nM His₆-NtcA und einen schwachen *Shift* bei ca. 13 nM His₆-NtcA zeigten, war bei dem gereinigten His₆-NtcA von uns ein schwacher *Shift* bei 100 nM His₆-NtcA und kein *Shift* bei 10 nM zu sehen. Ein kompletter *Shift* war auch nicht zu sehen (Abb. 37).

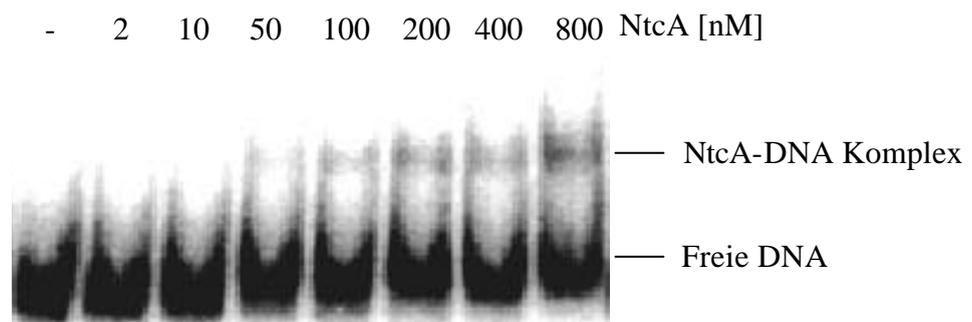


Abbildung 37: Autoradiogramm des *Shift*-Assays von His₆-NtcA, mit radioaktiv-markierten ds-123 Fragment (2 nM), unter verschiedenen His₆-NtcA-Konzentrationen (Dimer) von 0 bis 800 nM in 20 µl Endvolumen. Elektrophorese (6%iges PAA-Gel) wurde bei 80 V für 4 Stunden durchgeführt. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach 30 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

3.2.1 Der Effekt von Magnesium und 2-Oxoglutarat auf den *NtcA-Shift-Assay*

Herrero *et al.*, (2001) zeigte, dass die Affinität der NtcA-Bindung an das DNA-Fragment der *glnA*-Promoterregion um das 5-fache zunimmt, wenn 2-OG und Mg^{2+} vorhanden sind. Und zwar bei 0,6 mM 2-OG und 5 mM Mg^{2+} . Um einen besseren His₆-NtcA-*Shift* zu erhalten, wurde der *Gelshift-Assay* bei Anwesenheit von 5 mM Mg^{2+} und unterschiedlichen 2-OG-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 38). Das Gel zeigt eine bessere Bindung von His₆-NtcA an die DNA in Gegenwart von 2-OG und 5 mM Mg^{2+} . Der beste *Shift* ist bei einer Konzentration von 8 bis 10 mM 2-OG zu sehen.

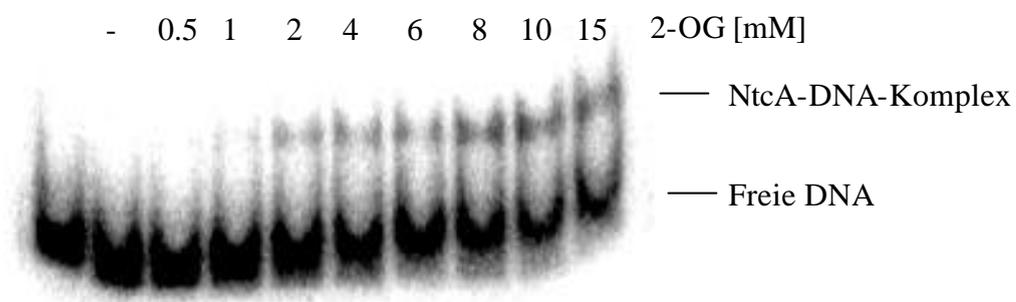


Abbildung 38: Autoradiogramm des His₆-NtcA *Shift-Assay* unter verschiedenen 2-OG-Konzentrationen, bei 5 mM Mg^{2+} und 10 nM His₆-NtcA (Dimer), 30 Minuten Inkubation bei 30°C. Das Autoradiogramm wurde wie bei Abb. 37 hergestellt.

Nun wissen wir, dass der beste His₆-NtcA-*Shift* bei 10 mM 2-OG zu sehen ist. Es steht aber noch aus, den Effekt von unterschiedlichen His₆-NtcA-Konzentrationen unter 10 mM 2-OG zu analysieren. Deshalb wurde ein Experiment mit verschiedenen His₆-NtcA-Konzentrationen (von 2 bis 800 nM) bei 10 mM 2-OG und 5 mM Mg^{2+} durchgeführt (Abb. 39). Das Gel zeigt einen besseren *Shift* mit der Steigerung der His₆-NtcA-Konzentration bis zu einem *Shift* von ca. 90 % bei 800 nM NtcA.

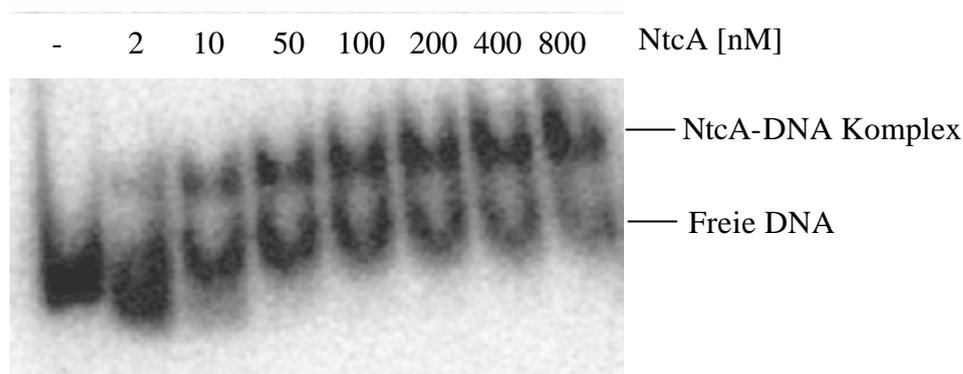


Abbildung 39: Autoradiogramm des His₆-NtcA *Shift-Assays* unter verschiedenen His₆-NtcA-Konzentrationen, bei 10 mM 2-OG und 5 mM Mg²⁺. Das Autoradiogramm wurde wie bei Abb. 37 hergestellt.

Um nun den Effekt von Mg²⁺ auf den His₆-NtcA-*Shift* in Anwesenheit von 10 mM 2-OG zu analysieren, wurde ein *Shift*-Experiment unter unterschiedlichen Konzentrationen von Mg²⁺ bei 10 mM 2-OG und 10 nM His₆-NtcA durchgeführt (Abb. 40). Im Gel ist kein Unterschied im His₆-NtcA-*Shift* mit oder ohne Mg²⁺ zu sehen.

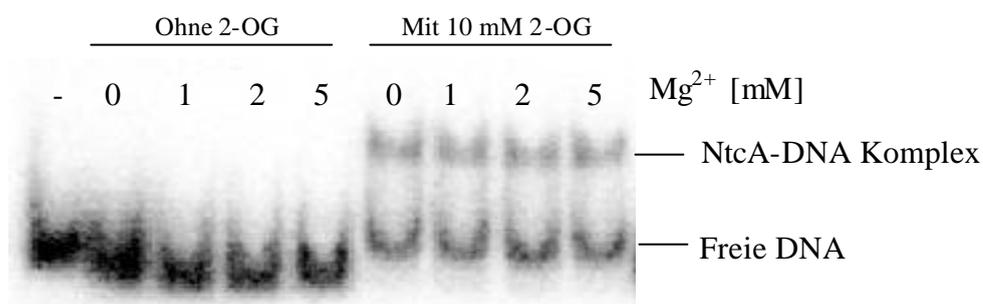


Abbildung 40: Autoradiogramm des His₆-NtcA *Shift-Assays* unter verschiedenen Mg²⁺-Konzentrationen, mit oder ohne 10 mM 2-OG und 10 nM His₆-NtcA (Dimer). 30 min Inkubation bei 30°C. Das Autoradiogramm wurde wie in Abb. 37 erhalten.

Mit diesen Bedingungen (10 mM 2-OG, 5 mM Mg²⁺ und 10 nM His₆-NtcA) wurde die spezifische Bindung von His₆-NtcA untersucht. Mit anderen Worten: um herauszufinden, ob His₆-NtcA spezifisch an seine Bindestelle bindet, wurde ein nicht radioaktiv-markiertes spezifisches DNA-Fragment und ein ebenfalls nicht radioaktiv-markiertes unspezifisches DNA-Fragment (als Kompetitor-DNA) zu dem His₆-NtcA-*Shift-Assay* zugegeben (Abb. 40). Als nicht radioaktiv-markiertes spezifisches DNA-Fragment wurde das Fragment 1 verwendet, das eine NtcA-Bindestelle enthält. Zu einer bestimmten Menge (2 nM) des radioaktiv-markierten DNA-Fragments 1 wurde einmal die 100-fache und ein anderes Mal die 1000-fache Menge des gleichen aber nicht radioaktiv-markierten DNA-Fragments

hinzugegeben. Als Kontrolle wurde das Fragment 2 verwendet, das keine NtcA-Bindestelle enthält. Hier ist der His₆-NtcA-DNA-Komplex durch Zugabe des 100-fachen, oder 200-fachen oder 1000-fachen des unspezifischen Kompetitor-DNA-Fragmentes 2 nicht verschwunden. Das heißt, dass His₆-NtcA nur spezifisch an die His₆-NtcA-Bindestelle bindet (Abb. 41).

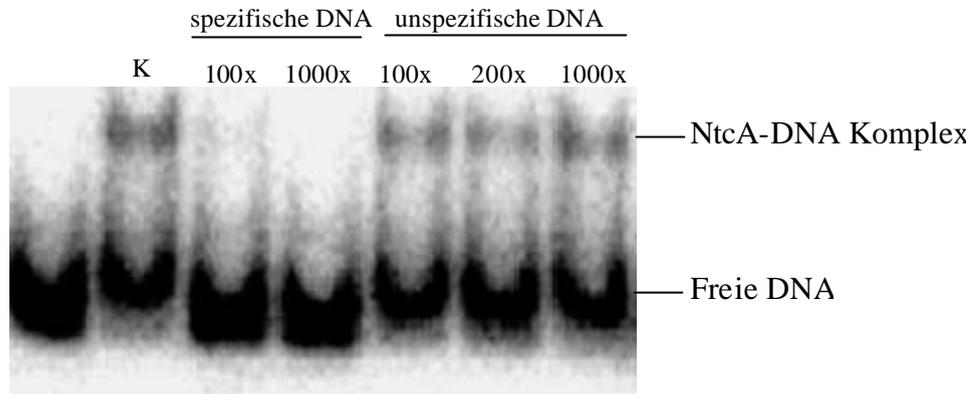


Abbildung 41: Spezifische Bindung von His₆-NtcA an das Fragment 1, das eine NtcA-Bindestelle enthält.

Die Bindung von 10 nM His₆-NtcA (Dimer) an (γ -³²P) ATP-markierte DNA-Fragment 1 wurde durch Zugabe von nicht markiertem spezifischem DNA-Fragment 1 verhindert. Das Autoradiogramm wurde wie in Abb. 37 erhalten. K: Kontrolle ohne Zugabe von nicht radioaktiv-markierter DNA.

3.2.2 Der Effekt von P_{II} auf die spezifische NtcA-DNA-Bindung

Nach der Identifizierung der Bedingungen für eine optimierte His₆-NtcA-DNA-Bindung stellt sich eine interessante Frage: Hat die P_{II}-WT- oder die P_{II}-D-Form einen Einfluss auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung? Um diese Frage zu beantworten, wurden die folgenden *Gelshift*-Experimente durchgeführt:

Zuerst wurde der Effekt von P_{II}-WT und P_{II}-D bei geringer 2-OG-Konzentration ohne Zugabe von ATP oder Mg²⁺ analysiert. Dazu wurde dem His₆-NtcA-*Shift*-Ansatz 200 ng (ca. 270 nM) von P_{II}-WT oder P_{II}-D unter Verwendung von 0,5 mM 2-OG oder 3 mM 2-OG in Gegenwart von 10 nM His₆-NtcA zugegeben (Abb. 42 A). Um die Effekte von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung besser zu analysieren, wurde die Menge von Radioaktivität im Bereich des His₆-NtcA-DNA-Komplexes mit Hilfe des Phospho Imagers gemessen und die Werte in einer Tabelle dargestellt (Abb. 42 B). Wie in Abbildung 42 erkennbar ist, sieht man, dass die Zugabe von P_{II}-WT die His₆-NtcA-DNA-Bindung um das ca. 1,3-fache erhöht, während durch Zugabe von P_{II}-D die spezifische Bindung um das ca. 1,74-fache erhöht wird.

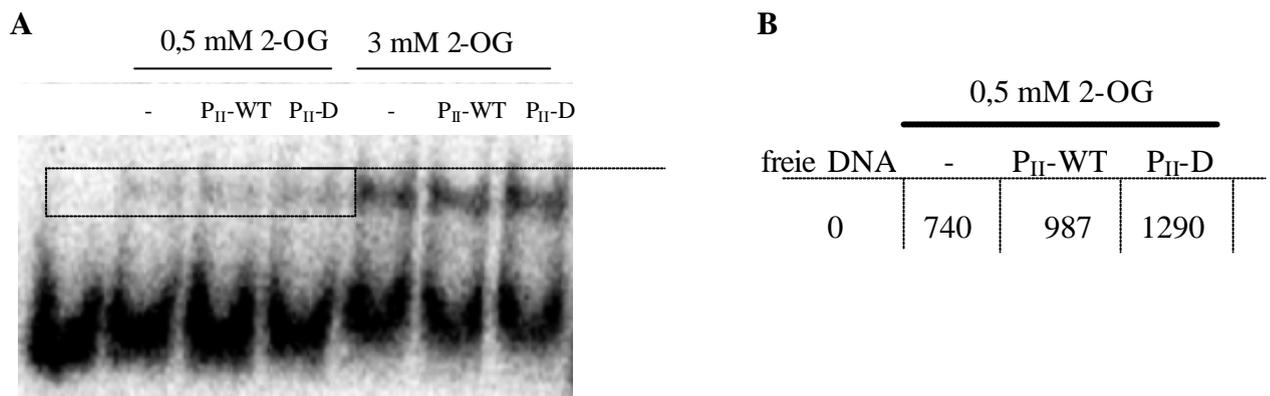


Abbildung 42: Effekt von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung in Abwesenheit von ATP und Mg²⁺. (A) Autoradiogramm des Gels. (B) Die radioaktiv-markierten His₆-NtcA-DNA-Komplexe im Bereich von 0,5 mM 2-OG wurden mit dem Phosphoimager gemessen und in einer Tabelle gestellt. Das Autoradiogramm wurde wie in Abb. 37 beschrieben, erhalten (10 nM His₆-NtcA (Dimer), 270 nM P_{II}).

Um den Effekt von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung in Anwesenheit von ATP zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment durchgeführt, aber diesmal unter Zugabe von 1 mM ATP. Wie in Abbildung 43 dargestellt ist, ist zu sehen, dass die Zugabe von P_{II}-WT die His₆-NtcA-DNA-Bindung um das ca. 1,42-fache erhöht, während durch Zugabe von P_{II}-D die spezifische Bindung um das ca. 3-fache erhöht wird. Das heißt, dass P_{II}-D die Affinität der His₆-NtcA-DNA-Bindung in Anwesenheit von 1 mM ATP stärker erhöht als in Abwesenheit von ATP

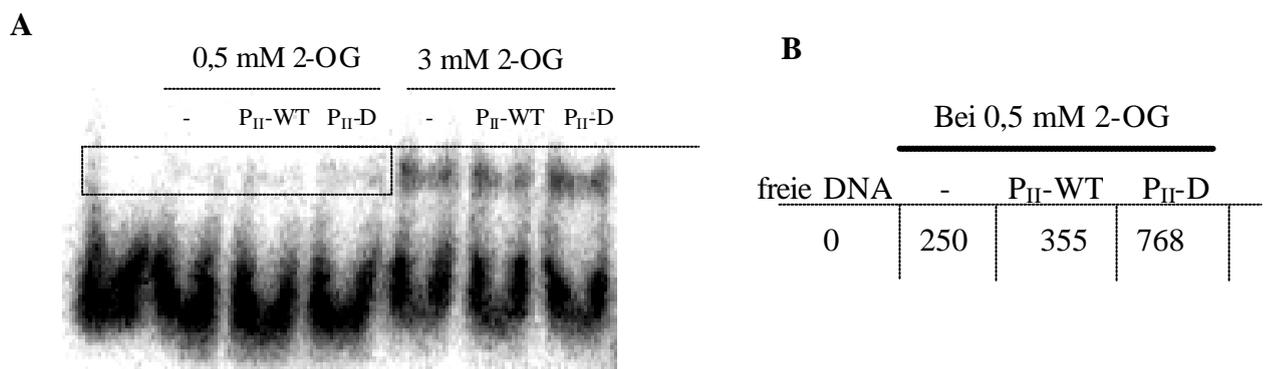
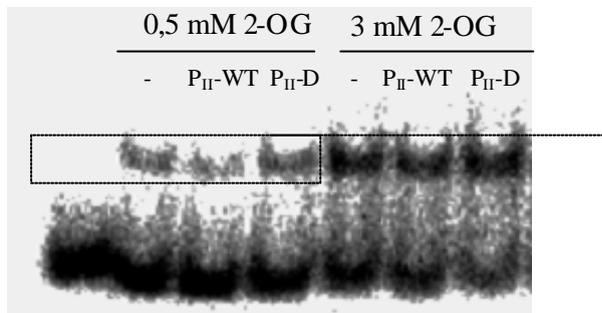


Abbildung 43: Der Effekt von P_{II} auf die His₆-NtcA-DNA-Bindung in Anwesenheit von 1 mM ATP. (A) Autoradiogramm des Gels. (B) Die radioaktiv-markierten His₆-NtcA-DNA-Komplexe im Bereich von 0,5 mM 2-OG wurden mit dem Phosphoimager gemessen und in einer Tabelle gestellt. Das Autoradiogramm wurde wie in Abb. 37 beschrieben, hergestellt (10 nM His₆-NtcA (Dimer), 270 nM P_{II}).

Um den Effekt von P_{II} auf den His_6 -NtcA-DNA-Shift in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} zu analysieren, wurde das gleiche letzte Experiment durchgeführt, diesmal aber unter Zugabe von 1 mM ATP und 5 mM Mg^{2+} . Wie in Abbildung 44 deutlich wird, verringert die Zugabe von P_{II} -WT die His_6 -NtcA-DNA-Bindung um einen Faktor von ca. 0,76. Währenddessen wird durch Zugabe von P_{II} -D die spezifische Bindung um das ca. 1,23-fache erhöht. Das heißt, nur unter diesen Bedingungen (1 mM ATP, 5 mM Mg^{2+} , 0,5 mM 2-OG) ist eine Verringerung der Affinität der His_6 -NtcA-DNA-Bindung durch P_{II} -WT zu sehen. Ansonsten erhöht P_{II} -WT die Affinität der Bindung in Anwesenheit von Mg^{2+} .

A



B

Freie DNA	0,5 mM 2-OG		
	-	P_{II} -WT	P_{II} -D
0	1379 ±59	1042 ±2	1706 ±134

Abbildung 44: Der Effekt von P_{II} auf die His_6 -NtcA-DNA-Bindung in Anwesenheit von 1 mM ATP und 5 mM Mg^{2+} . (A) Autoradiogramm des Gels. (B) Die radioaktiv-markierten His_6 -NtcA-DNA-Komplexe im Bereich von 0,5 mM 2-OG wurden mit dem Phosphoimager gemessen und in einer Tabelle gestellt. Das Autoradiogramm wurde wie in Abb. 37 beschrieben, hergestellt (10 nM His_6 -NtcA(Dimer), 270 nM P_{II}). Die Werte stellen die Mittelwerte für 2- unabhängige Experimente sowie auch ihre Standardabweichungen dar.

4. UV-Crosslinking-Experimente

Biacore-Experimente zeigten, dass die Bindung von NtcA an DNA unter Anwesenheit von ATP höher ist als ohne Beteiligung von ATP. Hier stellt sich die Frage, ob ATP direkt an NtcA bindet. Um diese Frage zu beantworten, wurden UV-Crosslinking-Experimente für ATP-NtcA durchgeführt.

Für die UV-Crosslinking-Experimente wurde der gleiche Puffer wie bei den *Biacore*- und *Gelshift*-Experimenten verwendet. Mit Hilfe des γ - ^{32}P -ATP wurden die Proben mit einem Endvolumen von 20 μl 30 Minuten mit UV-Licht ($\lambda=254\text{ nm}$) bestrahlt. Danach wurden sie in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und autoradiographisch dargestellt. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse eines ATP-NtcA UV-Crosslinking-Experiments. In der ersten Spur der Abbildung 45-A sieht man eine radioaktive Bande in NtcA-Höhe, was die Bindung zwischen radioaktivem ATP und NtcA erklärt. Interessant ist, dass eine neue Bande im Gel zu sehen ist (in unteren Bereich des Gels). Erstaunlicherweise entsteht diese Bande nur in Anwesenheit von Mg^{2+} und NtcA zusammen. Bei Entstehung dieser Bande wird die ATP-NtcA-Bindung sehr schwach. Hier ist kein eindeutiger Effekt von P_{II} auf die NtcA-ATP-Bindung oder auf diese neue Bande in diesem Gel festzustellen. Der einzige Effekt von WT- P_{II} ist, dass die ATP-NtcA Bindung bei Anwesenheit von WT- P_{II} ein bisschen schwächer ist als ohne WT- P_{II} (Abb. 45-B). Dieser Effekt ist unabhängig von Mg^{2+} .

Die neu entstehende unbekannte Bande wirft die Frage auf, ob es sich um ein Reaktionsprodukt von ATP handelt, das durch NtcA entsteht. Dieses Produkt zeigt sich als eine Bande im Gel.

Es wurden mehrere Experimente durchgeführt, um die Bedingungen der Entstehung dieser Bande zu identifizieren und die Bande selbst zu charakterisieren. (Weitere Details zu den folgenden Methoden und Materialien für die UV-Crosslinking-Experimente sind in dem Punkt B 4.5 beschrieben).

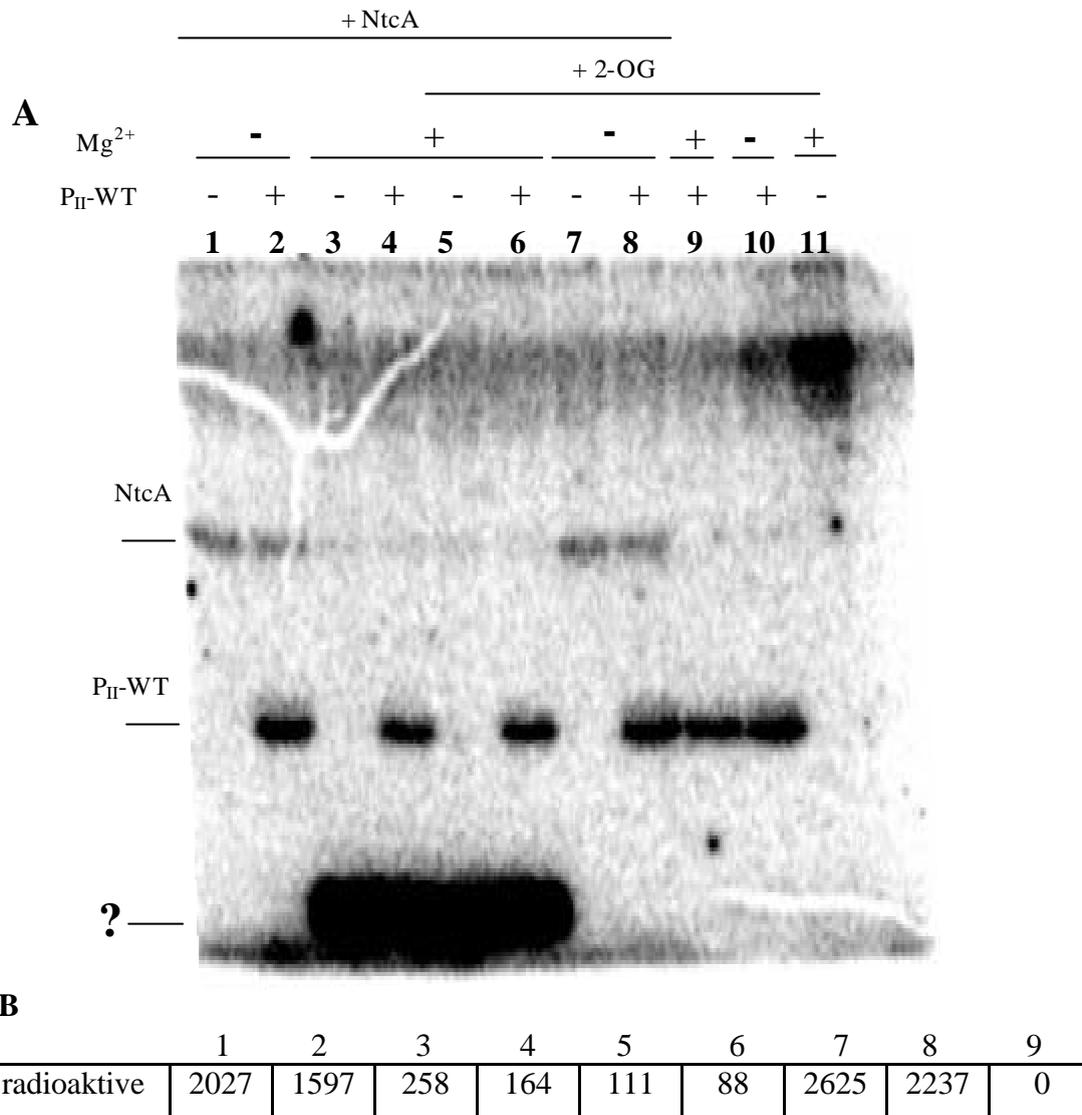


Abb. 45: Autoradiogramm des ATP-NtcA UV-Crosslinking-Experiments. Mit einem Endvolumen von 20 μ l wurden die Proben 30 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt und auf 15%igem SDS-Gel aufgetragen. **(A)** Das Gel wurde für 1 Stunde getrocknet und in Screen für 3 Tage aufbewahrt. Mit Hilfe des Phosphoimagers wurde das Autoradiogramm des Gels sichtbar gemacht. **(B)** Die radioaktive Stärke der ATP-NtcA-Crosslinking-Bande des Gels von A wurde mit Hilfe der Software des Phosphoimagers gemessen. Die Werte wurden in einer Tabelle eingetragen. Bedingungen: in Puffer B wurden 4 μ g NtcA und 4 μ g P_{II}-WT zusammenpipetiert, 10 min bei RT inkubiert, 5 min bei 95°C mit SDS-Auftragspuffer aufgekocht, 5 mM Mg²⁺; 0,6 mM 2-OG; 0,2 μ Ci γ -³²P-ATP.

4.1 ATP-NtcA-Reaktion

Zuerst wollten wir wissen, ob diese Bande ein radioaktives Phosphat oder ATP sein könnte. Deshalb wurde das letzte Experiment (UV Crosslinking Experiment Abb. 45) durchgeführt, nun aber einmal mit γ -³²P-ATP und ein weiteres Mal mit α -³²P-ATP. Die Proben wurden auf ein großes 16%iges Polyacrylamid Gel aufgetragen. Abbildung 46 zeigt, dass die neue Bande

durch Verwendung von α - ^{32}P -ATP verschwunden ist. Das bedeutet, dass diese Bande nicht ATP oder AMP ist. Es könnte sein, dass es sich um radioaktives $^{32}\text{P}_i$ handelt. Um herauszufinden, ob die Bande freies Phosphat ist oder nicht, ließen wir das ATP (γ - ^{32}P -ATP oder α - ^{32}P -ATP) mit alkalischer Phosphatase reagieren und trugen es sodann auf das gleiche Gel auf. In Abbildung 46 sieht man, dass diese Bande auch kein freies radioaktives Phosphat ist, da das Phosphat, das durch die alkalischen Phosphatase-Reaktionen entsteht, nicht in der gleichen Höhe der neuen Bande ist.

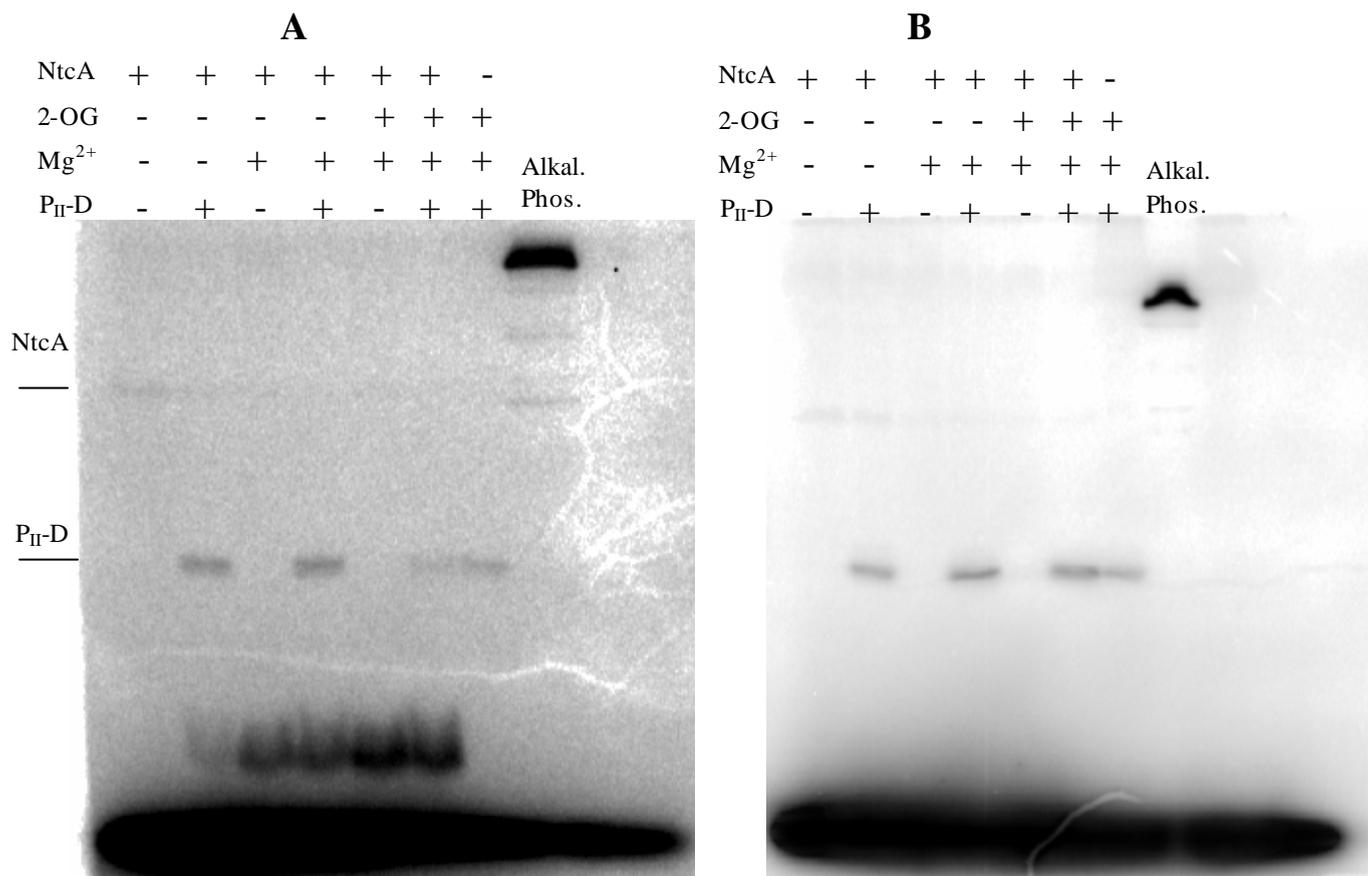


Abbildung 46. Autoradiogramm des ATP-NtcA-UV-Crosslink Experiments.

Mit einem Endvolumen von 20 μl wurden die Proben 30 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt und auf ein 16%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde 1 Stunde getrocknet und in einem Screen für 3 Tage aufbewahrt. Mit Hilfe des Phosphoimager wurde das Autoradiogramm des Gels sichtbar gemacht. Die Reaktionen wurden mit γ - ^{32}P -ATP (**A**) und mit α - ^{32}P -ATP (**B**) durchgeführt. Bedingungen: in Puffer B wurden 4 μg NtcA und 4 μg P_{II}-D zusammenpeptitiert, 10 min bei RT inkubiert, 5 min bei 95°C mit SDS-Auftragspuffer aufgekocht, 5 nM Mg²⁺; 0,6 mM 2-OG; 0,2 μCi γ - ^{32}P ATP. Alkal. Phos. : Alkalische Phosphatase.

Durch die letzten Experimente sieht man, dass die neue Bande weder radioaktives ATP, ADP oder freies ^{32}P ist. Die einzige Möglichkeit, die Entstehung dieser Bande zu erklären, ist, dass ein neuer Faktor X, der durch die ATP-NtcA-Reaktion und in Anwesenheit von Mg^{2+} entsteht, diese neue Bande bildet.



Andere interessante Aspekte dieses Experiments sind:

- Bei Zugabe von $\text{P}_{\text{II-D}}$ (zweite Spur von der Abb. 46-A) ist diese Bande zu sehen, obwohl hier kein Mg^{2+} vorhanden ist. Dies könnte bedeuten, dass die $\text{P}_{\text{II-D}}$ -Form die ATP-NtcA-Reaktion anregt, während die Zugabe von $\text{P}_{\text{II-WT}}$ keine Rolle bei der Entstehung dieser Bande spielt (Abb. 45).
- Bei Zugabe von 2-OG verstärkt sich diese neue Bande (Spur 3-5 von Abb. 46-A).

Nun wissen wir, dass verschiedene Faktoren (Mg^{2+} , 2-OG, $\text{P}_{\text{II-D}}$, X) bei der ATP-NtcA-Reaktion eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Bande spielen. Es bleibt noch die Charakterisierung dieser Bande unter verschiedenen Bedingungen.

4.2 Effekt neuer Faktoren auf die ATP-NtcA-Reaktion

In den letzten Experimenten wurde die ATP-NtcA-Reaktion unter UV-Strahlung durchgeführt. Deshalb ist nicht klar, ob UV-Crosslinking eine Rolle bei der Entstehung dieser Bande spielt. Darum wurde ein neues Experiment mit und ohne UV-Strahlung unter Zugabe verschiedener Elemente, wie z.B. Kalzium (Ca^{2+}) und Mangan (Mn^{2+}) durchgeführt. Abbildung 47 zeigt, dass die ATP-NtcA-Reaktion ohne UV-Crosslinking (Spur 2 und 13) auch zur Entstehung dieser Bande führt. Sie ist hier sogar stärker als mit UV-Crosslinking. Diese Bande entsteht nicht bei Zugabe von Ca^{2+} (Spuren 5 und 6) oder Mn^{2+} (Spuren 9, 10).

UV	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mn ²⁺										+	+	+	
Ca ²⁺					+	+		+			+		
2-OG	+	+	+			+				+	+	+	+
Mg ²⁺	+	+	+	+			+	+			+	+	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

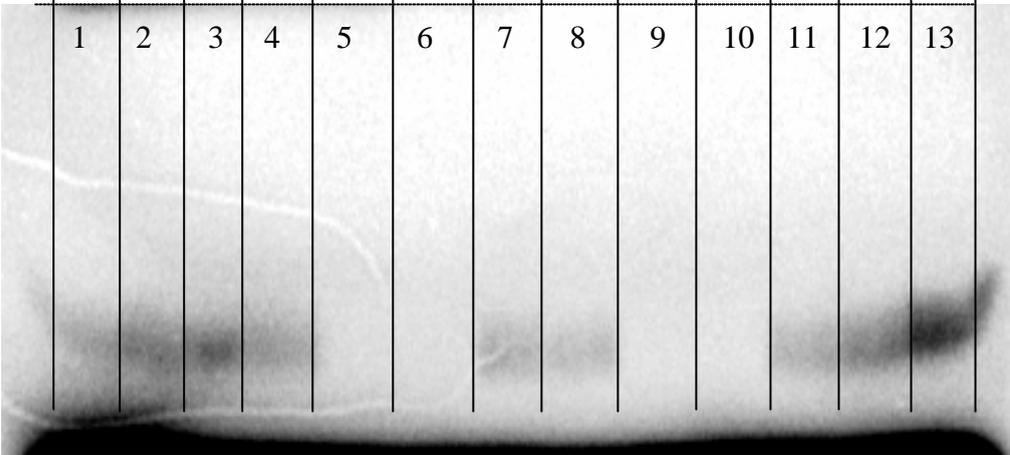


Abbildung 47: Autoradiogramm des ATP-NtcA Reaktion unter verschiedenen Bedingungen. Mit einem Endvolumen von 20 μ l wurden die Proben auf 16%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde 1 Stunde getrocknet und in einem Screen für 3 Tage aufbewahrt. Mit Hilfe des Phosphoimager wurde das Autoradiogramm des Gels sichtbar gemacht. Die Reaktionen wurden mit γ -³²P-ATP durchgeführt.

Bedingungen: in Puffer B wurden 4 μ g NtcA eingesetzt. 10 min bei RT inkubiert, 5 min bei 95°C mit SDS-auftragspuffer aufgeköcht. 5 mM Mg²⁺; 0,6 mM 2-OG; 0,2 μ Ci γ -³²P ATP, 5 mM Ca²⁺; 5 mM Mn²⁺.

Spur 3 wurde mit nativen Auftragspuffer anstatt SDS verwendet. UV-Crosslink: 30 min auf Eis. Die Proben in Spur 12 und 13 wurden 30 min bei 30°C inkubiert.

4.3 Optimierung der ATP-NtcA Reaktion

Verschiedene Faktoren wie Temperatur, Inkubationszeit und Konzentrationen von Mg²⁺ und 2-OG könnten eine Rolle bei der ATP-NtcA-Reaktion spielen. Deshalb wurden verschiedene Experimente bei unterschiedlichen Konzentrationen von Mg²⁺ oder 2-OG, unterschiedlichen Temperaturen und langen Inkubationszeiten durchgeführt. Abbildung 48-A zeigt den Effekt von unterschiedlichen Konzentrationen von Mg²⁺ oder 2-OG. Bei Zugabe von 10 mM Mg²⁺ erhält man die stärkste Bande. Fügt man mehr als 10 mM Mg²⁺ hinzu, verstärkt sich die Bande nicht (Daten nicht gezeigt). Bei Anwesenheit von 0,5 mM 2-OG zeigt sich ein positiver Effekt auf die Stärke der Bande. Höhere Konzentrationen von 2-OG, die über einen Wert von 0,5 mM hinausgehen, spielen keine große Rolle, um die Bande zu verstärken. Das

heißt, dass die optimalen Bedingungen 10 mM Mg^{2+} und 0,5 mM 2-OG sind. Abbildung 48-B zeigt den Effekt von unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 37°C. Je länger die Inkubationszeit ist, desto stärker ist die Bande. Die stärkste Bande entwickelte sich über Nacht (20 Stunden). Abbildung 48-C zeigt den Effekt von verschiedenen Temperaturgraden. Die optimale Temperatur für die ATP-NtcA-Reaktion liegt bei 37°C.

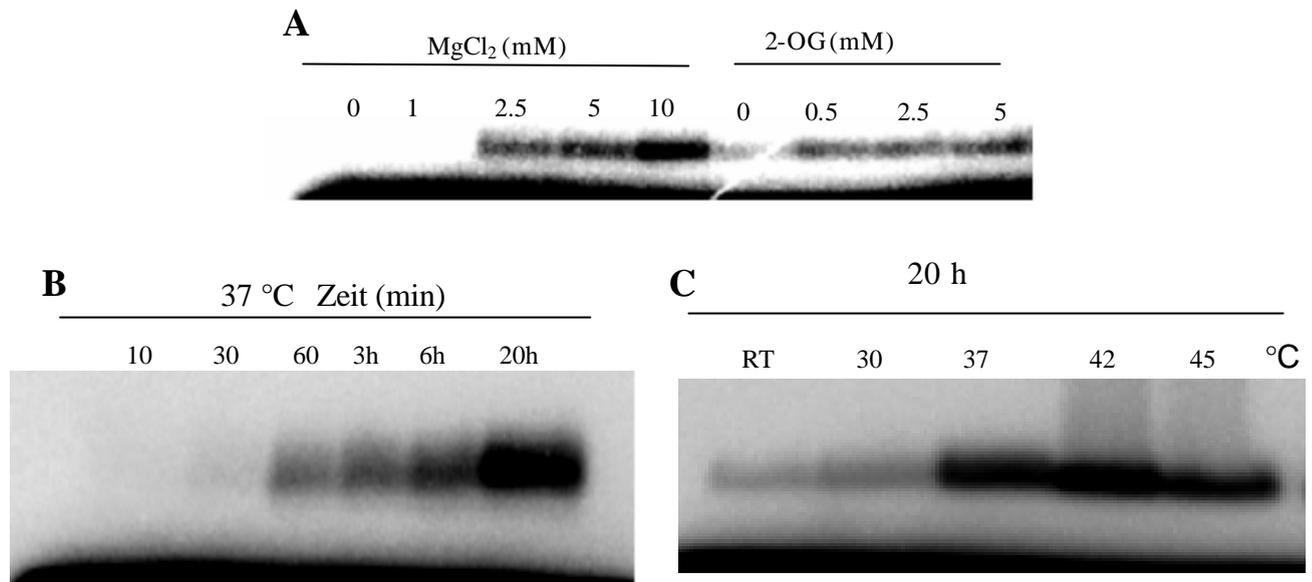


Abbildung 48. Autoradiogramm der ATP-NtcA-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen.

Mit einem Endvolumen von 20 μ l wurden die Proben auf 16%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde 1 Stunde getrocknet und in einem Screen für 3 Tage aufbewahrt. Mit Hilfe des Phosphoimager wurde das Autoradiogramm des Gels sichtbar gemacht. Die Reaktionen wurden mit γ -³²P-ATP durchgeführt.

Bedingungen: in Puffer B wurden 2 μ g NtcA verwendet. (A) Unterschiedliche Konzentrationen von Mg^{2+} und 2-OG. (B) Unterschiedliche Temperaturen und bei 0,5 mM 2-OG und 10 mM Mg^{2+} . (C) Unterschiedliche Inkubationszeiten in Gegenwart von 0,5 mM 2-OG und 10 mM Mg^{2+} .

4.4 Untersuchung auf mögliche Effekt der Puffer auf die ATP-NtcA-Reaktion

Um herauszufinden, ob die neue entstandene Bande wirklich aus einer ATP-NtcA-Reaktion herrührt und nicht aus irgendeinem Puffereffekt, wurde die ATP-NtcA-Reaktion mit Puffer B durchgeführt. Bei dem aber in jeder Reaktion eine Komponente gegen eine neue ausgetauscht wurde. Als Kontrolle wurde die ATP-NtcA-Reaktion mit einem ganz anderen Puffer durchgeführt. Puffer H besteht aus: 50 mM Hepes pH 7, 50 mM Natriumacetat, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% Glycerol. In dem folgenden Experiment wurde jede Komponente des Puffers B gegen eine andere Komponente ausgetauscht, d.h. Hepes gegen Tris, Natriumacetat gegen

Natriumchlorid, β -Mercaptoethanol gegen DTT, und Saccharose gegen Glycerol. Wie Abbildung 50 zeigt, dass die Bande immer noch da ist. Der Puffer H spielt keine Rolle bei der Entstehung dieser Bande.

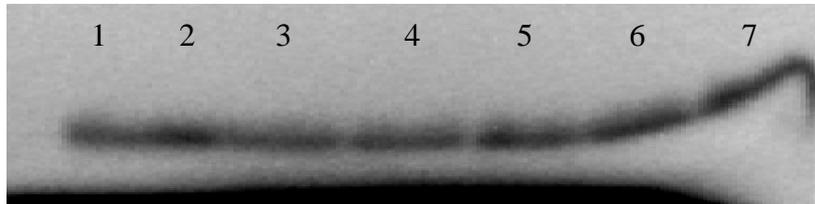


Abbildung 50. Autoradiogramm des ATP-NtcA Reaktion unter verschiedenen Pufferbedingungen.

Mit einem Endvolumen von 20 μ l wurden die Proben auf 16%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde 1 Stunde getrocknet und in einem Screen für 3 Tage aufbewahrt. Mit Hilfe des Phosphoimager wurde das Autoradiogramm des Gels sichtbar gemacht. Die Reaktionen wurden mit γ - 32 P-ATP durchgeführt. 1) Puffer B. 2) Tris anstatt Hepes. 3) NaCl gegen NaAC. 4) β .mercaptoethanol gegen DTT. 5) ohne EDTA. 6) Saccharose gegen Glycerol. 7) mit Tris-Puffer: 50 mM Tris pH 7; 50 mM NaCl; 1 mM β .mercaptoethanol; 5% Glycerol. Es wurden 2 μ g NtcA verwendet, 2 Stunden bei 37°C inkubiert, 10 mM Mg^{2+} ; 0,5 mM 2-OG; 0,2 μ Ci γ - 32 P-ATP.

4.5 Norit A-Test

Um die ATP-NtcA-Reaktion weiter zu charakterisieren, wurde ein Norit A-Test nach Kennelly *et al.*, 1993, durchgeführt. In diesem Test binden große Moleküle wie ATP oder ADP im Gegensatz zu Pi oder PPI an Aktivkohle (Calendar und Berg, 1966). Das gebundene ATP bzw. ADP ist durch Zentrifugation abtrennbar, freies Phosphat verbleibt im Überstand.

Eine ATP-NtcA-Reaktion mit γ - 32 P markiertem ATP wurde bei 37°C für 6 Stunden durchgeführt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von saurer Norit A-Lösung bei 0°C gestoppt. Nach der Zentrifugation wurden 75 μ l von den ca. 100 μ l Überstand entnommen, und die Menge an Radioaktivität durch Szintillationsmessung bestimmt. Zur Kontrolle wurde eine ATP-NtcA-Reaktion ohne Mg^{2+} durchgeführt (für Norit A-Test Details siehe Absatz B.4.5.1 in Material und Methoden).

Tabelle 4 zeigt die Menge an freigesetzte Radioaktivität vor und nach der Behandlung mit der Norit A-Lösung. Es ist zu sehen, dass die Menge bei Anwesenheit von Mg^{2+} nach der Behandlung das 3-fache des Werts wie bei Abwesenheit von Mg^{2+} erreicht.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass der Überstand freigesetztes Phosphat enthält. Dies heißt aber nicht, dass dieses freigesetzte Phosphat direkt aus der ATP-NtcA-Reaktion entsteht, da diese Reaktion kein freigesetztes Phosphat produziert (siehe Abb. 46). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass das freigesetzte Phosphat indirekt von X-Pi stammt, eventuell wird durch Hydrolyse in der sauren Norit A-Lösung X-Pi zu X und Pi getrennt.

	+Mg ²⁺	-Mg ²⁺
Vor Behandlung	17906 ± 592	17143 ± 67
Nach Behandlung	2325 ± 117	818 ± 42

Tabelle 4: Norit A-Test.

Hier wurden die 20 µl radioaktiv ATP-NtcA-Reaktionen vor der Behandlung mit der Norit A-Lösung gemessen. Dann wurden 75 µl des Überstandes nach der Behandlung mit der Norit A-Lösung entnommen und im Szintillationsgerät die Menge an radioaktiv-markiertem Phosphat gemessen. Die Werte stellen die Mittelwerte für zwei Messungen sowie auch ihre Standardabweichungen dar.

4.6 Charakterisierung der X-P-Bande

Um die chemischen Eigenschaften der X-P Bande zu identifizieren, wurde diese Bande aus dem Gel geschnitten und mit verschiedenen chemischen Materialien gemischt. Das heißt, dass das Gelstück in sehr kleine Stücke geschnitten und in 100 µl Isopropanol, Methanol, Wasser oder Chloroform gelegt wurde. Die Proben wurden 2 Stunden im Schüttler inkubiert und anschließend zentrifugiert.

Der Überstand wurde entnommen, getrocknet und in 40 µl Wasser gelöst. 20 µl davon wurden mit alkalischer Phosphatase für 1 Stunde behandelt. Anschließend wurden alle Proben auf das Gel aufgetragen. Abbildung 51 zeigt, dass die X-P Bande in Wasser, Isopropanol, und Methanol löslich ist, hingegen nicht in Chloroform. Andererseits ist zu sehen, dass die X-P Bande durch alkalische Phosphatase gespalten werden kann.

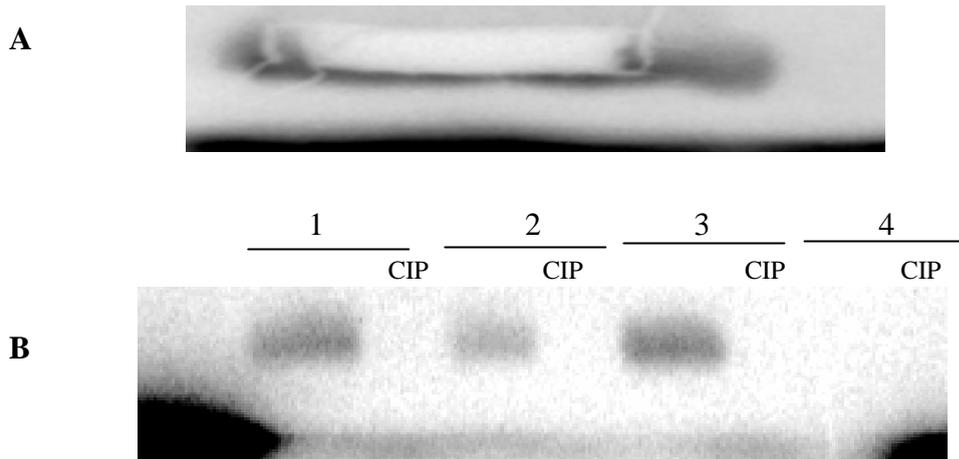


Abbildung 51. (A) Die X-P Bande wurde aus dem Gel geschnitten und in verschiedenen Materialien gelöst. (B) Gelstücke wurden in Isopropanol (1) Methanol (2) Wasser (3) oder Chloroform (4) gelegt. Die Überstände wurden getrocknet und mit Wasser gelöst. Die Hälfte wurde mit CIP behandelt und auf das Gel aufgetragen, die andere Hälfte wurde direkt auf das Gel aufgetragen. ATP-NtcA-Reaktion wurde mit 10 mM Mg^{2+} und 1 mM 2-OG durchgeführt. Inkubation: 3 Stunde; 37°C. CIP. Alkalische Phosphatase.

4.7 Effekt von P_{II} auf die ATP-NtcA-Reaktion

Nach der Bestimmung der Bedingungen der Entstehung dieser Bande durch die ATP-NtcA-Reaktion, stellt sich die wichtige Frage, ob P_{II} -WT oder P_{II} -D eine Rolle bei der ATP-NtcA-Reaktion spielen. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten der Effekt von P_{II} untersucht. Zuerst wurden für die ATP-NtcA-Reaktionen (ohne Zugabe von Mg^{2+} und 2-OG) 2 μ g P_{II} (P_{II} -WT oder P_{II} -D) hinzugegeben. In Abbildung 52-A sieht man, dass die Bande der ATP-NtcA-Reaktion bei Zugabe von P_{II} -D in Abwesenheit von Mg^{2+} ganz schwach entsteht, während bei Zugabe von P_{II} -WT die Bande nicht zu sehen ist. Diese Bande verstärkt sich bei Zugabe von 1 mM Mg^{2+} und sie verstärkt sich noch mehr bei Zugabe von 1 mM Mg^{2+} und 1 mM 2-OG (Abb. 52-A). Um herauszufinden, ob sich diese Bande bei steigenden Konzentrationen von P_{II} -D oder P_{II} -WT ändert, wurde die ATP-NtcA-Reaktion in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von P_{II} (1 μ g, 3 μ g, 7 μ g) durchgeführt. In Abbildung 52-B sieht man, dass bei steigenden Konzentrationen von P_{II} -D die Bande stärker wird, während sie bei steigenden Konzentrationen von P_{II} -WT allmählich schwächer wird und schließlich verschwindet. Das heißt, dass die scheinbar phosphorylierte Form von P_{II} (P_{II} -D) einen positiven Effekt auf die ATP-NtcA-Reaktion hat, während das unphosphorylierte P_{II} (P_{II} -WT) einen negativen Effekt auf die ATP-NtcA-Reaktion hat.

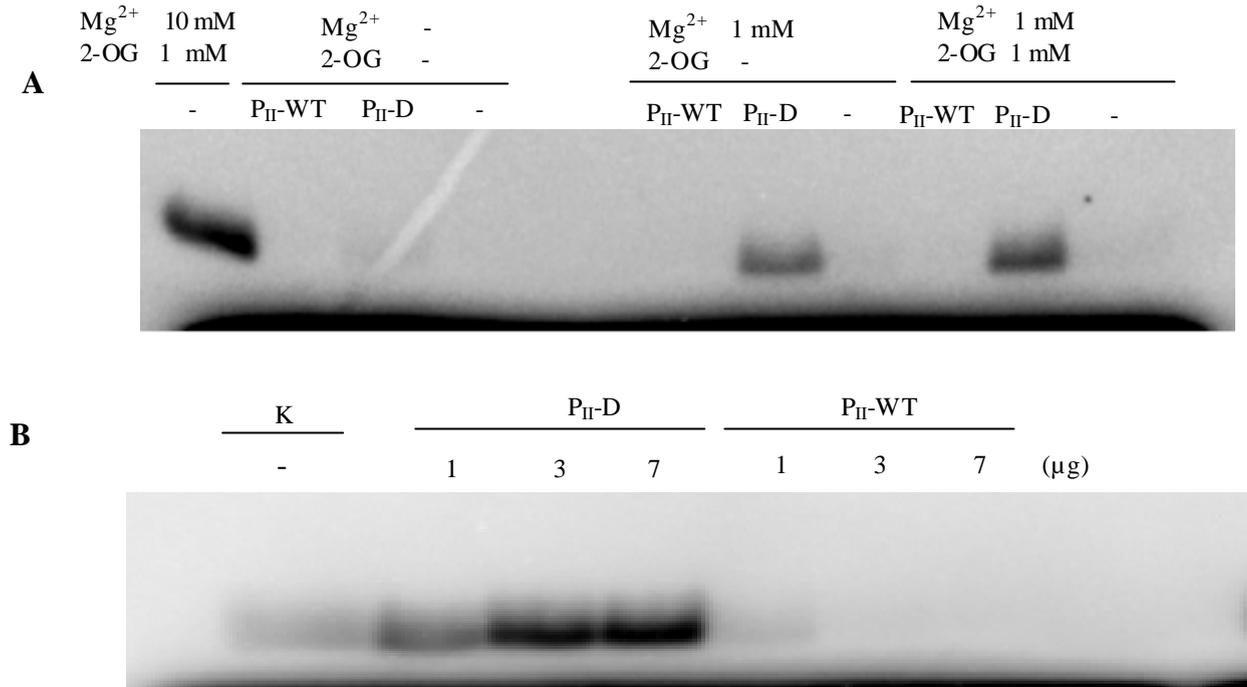


Abbildung 52: Effekt von P_{II} auf die ATP-NtcA-Reaktion

Mit einem Endvolumen von 20 μl wurden die Proben auf 16%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde 1 Stunde getrocknet und in einem Screen für 3 Tage aufbewahrt. Mit Hilfe des Phosphoimager wurde das Autoradiogramm des Gels sichtbar gemacht. Die Reaktionen wurden mit γ -³²P-ATP durchgeführt. **(A)** Es wurden 2 μg von P_{II} (P_{II}-WT oder P_{II}-D) und 2 μg von NtcA verwendet. Bedingungen: die Reaktionen wurden in Puffer B durchgeführt. Inkubation: 3 Stunden bei 37°C. Die Proben wurden mit SDS-Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. **(B)** bei unterschiedlichen Konzentrationen von P_{II} (P_{II}-WT oder P_{II}-D) und unter 1,8 mM Mg²⁺ und 1 mM 2-OG.

4.8 Untersuchung der ATP-NtcA-Reaktion mittels Dünnschicht-chromatographie

Ein klassisches Verfahren zur Verfolgung der ATP-NtcA-Reaktionen ist die chromatographische Trennung der Substrate und Hydrolyseprodukte aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität. Zur Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden wurden PEI-Cellulose-beschichtete Dünnschichtplatten verwendet. Es wurden 2 μl der 20 μl ATP-NtcA-Reaktion, die im ersten Versuch benutzt wurden (Abb 45), auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und für ca. zwei Stunden inkubiert.

Abb. 54 zeigt folgendes Ergebnis: Die Spuren 1 und 3 stellen die ATP-NtcA-Reaktion in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Mg²⁺ dar. Der einzige sichtbare Unterschied ist eine neue Bande (mit „?“ markiert). Diese Bande ist immer zu sehen in Anwesenheit von Mg²⁺ und NtcA, während sie in allen anderen Ansätzen nicht vorhanden ist.

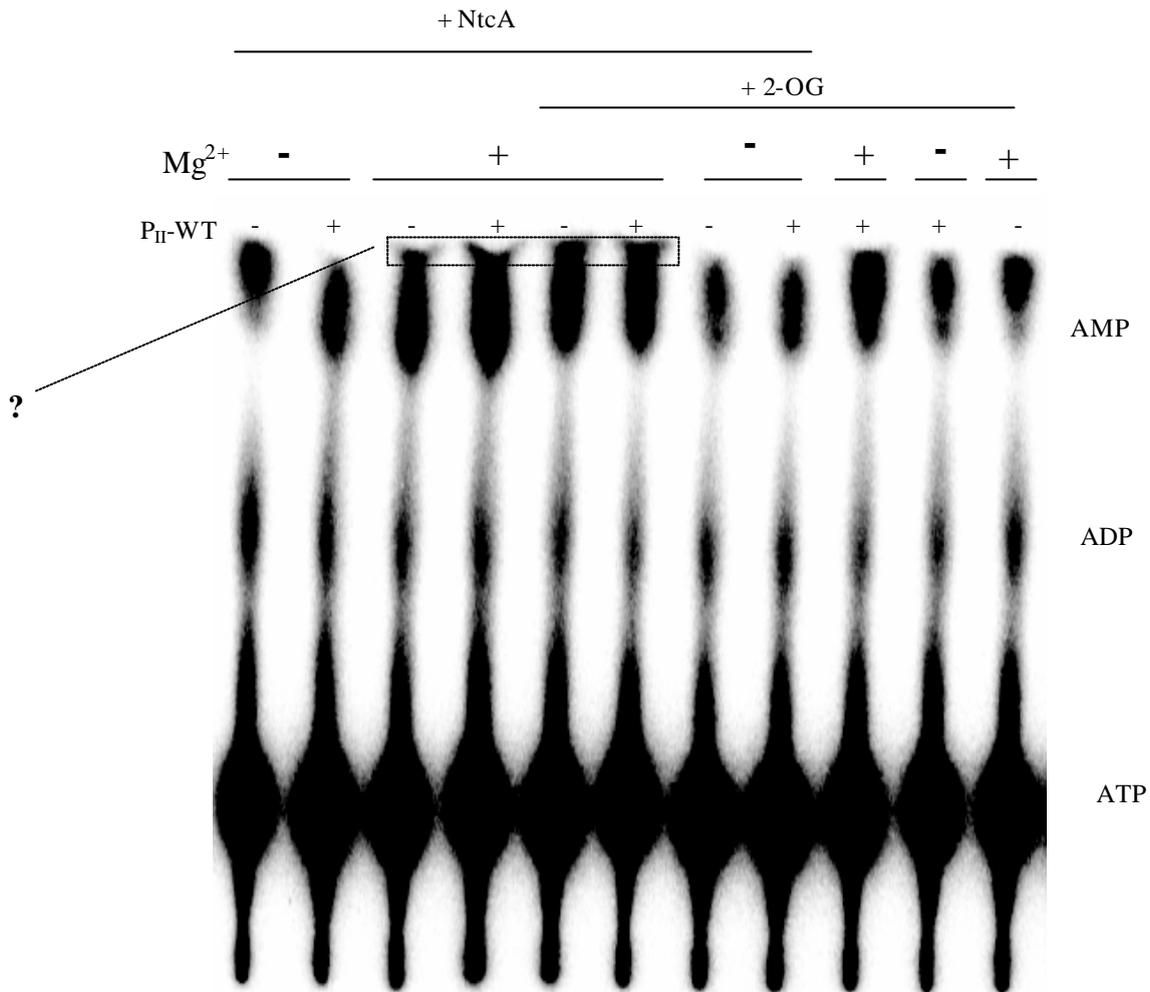


Abbildung 54. Autoradiogramm der ATP-NtcA Reaktion auf einer TLC-Dünnschichtplatte. Es wurden 2 μl der 20 μl ATP-NtcA-Reaktion, die im ersten Versuch benutzt wurden (Abb. 45), auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (2 x 1 μl) und für ca. zwei Stunden inkubiert. Die Reaktionen wurden mit γ -³²P-ATP durchgeführt. Die Platte wurde mit einem Fön getrocknet und über Nacht auf dem Screen gelassen. Mit Hilfe des Phosphoimagers wurde das Autoradiogramm erstellt. Als Marker wurden kalte Nukleotide aufgetragen und mit UV-Licht entwickelt.

Die gleiche Analyse wurde mit α -³²P-ATP durchgeführt. Dafür wurden auch hier 2 μl der Ansätze von Versuch 2 (Abb. 46) auf die Dünnschichtplatten aufgetragen und für ca. 2 Stunde inkubiert. Abb. 55 zeigt, dass die ATP-NtcA-Reaktion ADP produziert. Das radioaktive ADP wird in Gegenwart von Mg²⁺ sichtbar, da hier α -³²P-ATP verwendet wurde (Spure 3), und wird bei Zugabe von P_{II}-D verstärkt. Andererseits ist zu sehen, dass die alkalische Phosphatase das gesamte ATP zu radioaktivem Phosphat umwandelt.

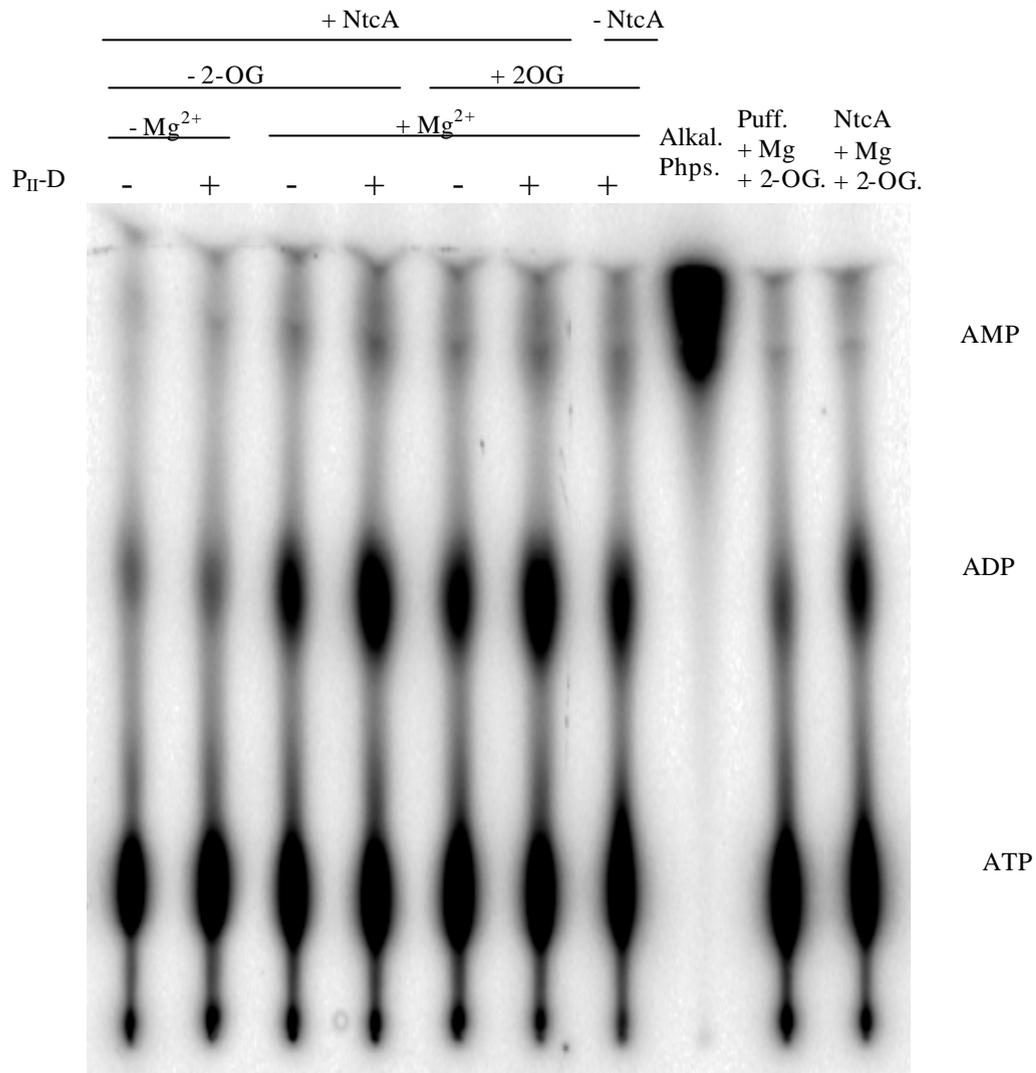


Abbildung 55. Autoradiogramm der ATP-NtcA-Reaktion auf einer TLC-Dünnschichtplatte. Es wurden 2 μ l der 20 μ l ATP-NtcA-Reaktion, die im zweiten Versuch benutzt wurden (Abb. 46). Die Bedingungen des Experiments wurden wie bei Abb. 54 durchgeführt.

Nun wurden in einem Gel die verschiedenen Möglichkeiten der Entstehung dieser Bande gezeigt. In Abb. 56-A wurden die ATP-NtcA-Reaktionen mit γ -³²P-ATP und oder mit α -³²P-ATP in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Mg²⁺ durchgeführt. Dann wurde diese Bande aus dem Gel isoliert und auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Abb. 56-B zeigt das Ergebnis: man sieht, dass die Bande, die aus dem Gel isoliert wurde, nur an zwei verschiedenen Orten in der Dünnschichtplatte sichtbar wird: 1. im Bereich des Phosphats; 2. am Startpunkt, an dem die Probe aufgetragen wurde. Währenddessen wandert das ATP, das auch aus dem Gel isoliert wurde, in der Dünnschichtplatte bis zur ATP-Höhe. Es könnte gut sein, dass die X-Pi Bande während der Isolierung aus dem Gel teilweise zu X und Pi zerstört wurde. Deshalb sieht man

an zwei Orten radioaktive Punkte: das radioaktive Pi ganz oben in der Platte, sowie auch die (nicht gewanderte) X-Pi Bande ganz unten am Startpunkt der Platte Abb. 55-B.

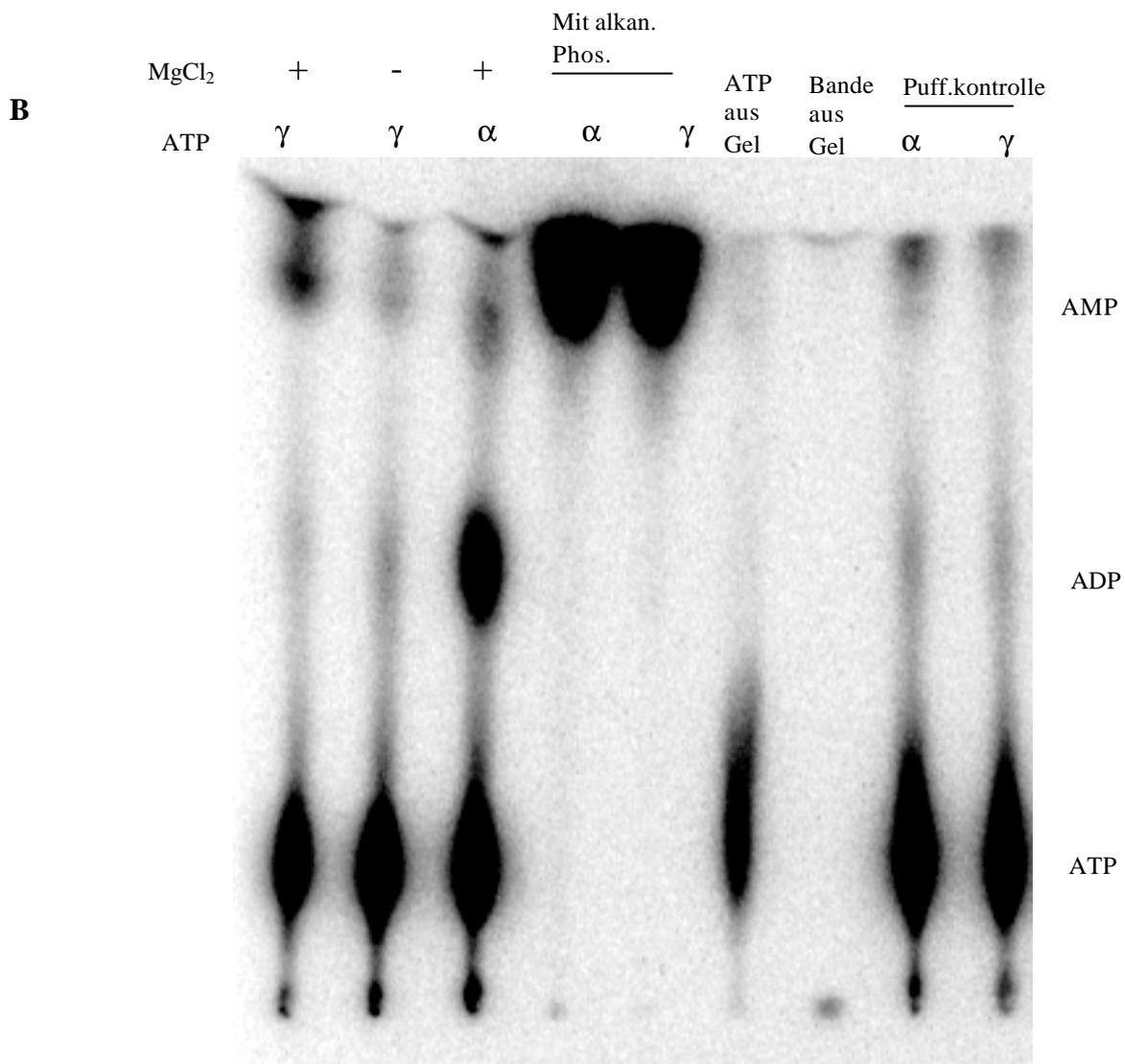
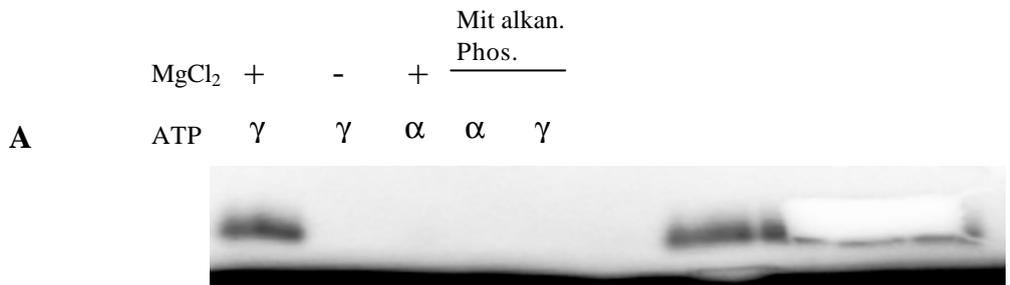


Abbildung 56: Autoradiogramm der ATP-NtcA-Reaktion auf einer TLC Dünnschichtplatte. Es wurden 20 µl ATP-NtcA-Reaktion durchgeführt. **(A)** Davon wurden 16 µl auf das SDS-Gel aufgetragen. **(B)** 2 µl davon wurden auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Hier wurden die Reaktionen mit α-³²P-ATP oder γ-³²P-ATP durchgeführt. Mit Hilfe des Phosphoimmagers wurde das Autoradiogramm erstellt. Als Marker wurden kalte Nukleotide aufgetragen und mit UV-Licht entwickelt.

D. Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über die regulatorische Beziehung zwischen P_{II} und NtcA unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bekannt. Durch die Analysen der *glnB-glnN*-Promoterregion mittels *Luciferase*-Reportergen und durch *Gelshift*- und *Biacore* Experimente konnten die Beziehung zwischen P_{II} und NtcA genauer analysiert und identifiziert werden.

1. Analyse der nicht kanonischen NtcA-Bindestelle des *glnN*-Promoters

Da im *glnN*-Promoter kein *Gelshift* mit NtcA zu erhalten war (Sauer Dissertationen), lag die Vermutung nahe, dass ein anderer Faktor für die NtcA-DNA-Bindung nötig ist. Um nun herauszufinden, ob ein anderer Faktor für die Transkription der *glnN*-Promoter notwendig ist, wurde die nicht-kanonische NtcA-Box einmal in eine kanonische NtcA-Box umgewandelt und ein anderes mal wurde sie (Absatz C.I.3). Folgende Befunde wurden beobachtet:

- Erstens: Unter Nitratwachstumsbedingungen lag im Allgemeinen der Unterschied zwischen der kanonischen und der nicht-kanonischen NtcA Bindestelle darin, dass die *lux*-Aktivität in den Konstrukten der kanonischen NtcA –Bindstelle um das ca.2-3-fache stärker war als in den Konstrukten der nicht-kanonische NtcA-Bindestelle. Das heisst, dass NtcA die kanonische Bindestelle besser als die nicht kanonische erkennt. Das bestätigt frühere *in vitro* Analysen der Wirkung von NtcA (Jiang *et al.*, 2000)
- Zweitens: Im Konstrukten, bei denen die NtcA-Box beseitigt wurde, sind die *luxAB*-Werte sehr niedrig im Vergleich zur Anwesenheit der kanonischen oder nicht-kanonischen NtcA-Bindestelle. Das zeigt, dass die nicht-kanonische NtcA-Bindestelle tatsächlich für die *glnN*-Promoter Aktivierung verantwortlich ist.
- Drittens: Unter Stickstoffentzugsbedingungen zeigten Konstrukte der kanonischen NtcA-Bindestelle in Wildtypzellen eine starke Aktivierung im Vergleich zu Konstrukten, die eine nicht-kanonische NtcA-Bindestelle haben. Andererseits zeigten die Konstrukte mit einer zerstörten NtcA-Bindestelle keine Steigerung in der *lux*-Aktivität. Bei MP2 und MNtcA-Zellen ist keine Aktivierung wie in Wildtyp zu sehen, aber bei höherer Auflösung sieht man, dass es unter Stickstoffmangelbedingungen eine zweite schwache Aktivierung gibt. Diese Aktivierung braucht NtcA und ist unabhängig von P_{II} .

2. DNA-Repressor im Bereich des *glnN*-Promoters

Erste Promoterstudien unter Verwendung von *luxAB-glnN* Reporterkonstrukten zeigten, dass stromaufwärts der nicht kanonischen NtcA-Box ein DNA-Element lokalisiert ist, welches einen reprimierenden Effekt auf die *glnN*-Expression unter stickstoff-gesättigten Bedingungen ausübt (Absatz C.2.1.1). Die ersten Experimente zeigten, dass in einem Konstrukt, in dem die Sequenzen stromaufwärts der nicht-kanonischen NtcA-Box in *glnN* deletiert waren, eine erhöhte *Luciferase*-Aktivität und eine beschleunigte Induktion der *Luciferase*-Aktivität nach Einsetzen des N-Mangels zu verzeichnen ist. Dies lässt den Schluss zu, dass dieser Promoter eine putative Repressorbindungsstelle enthält. Anschließend wurde die Stelle dieser DNA-Repressorelemente mittels Verkürzung der Promoter identifiziert. Die Repressorstelle lag zwischen -226 und -314 bp upstream des Start-Kodons. Dies bestätigt die Vermutung, dass NtcA an verschiedenen N-regulierten Promoteren zusammen mit anderen Faktoren wirkt.

Dieser Repressor verringert die *luxAB*-Aktivität um das ca. 5-fache bei Nitratwachstum. Die gleiche 5-fache Verringerung geschieht innerhalb der ersten 40 Stunden nach dem Shift der Zellen ins stickstofffreie Medium. Erstaunlicherweise zeigt dieser Repressor eine schwächere Auswirkung (bis um das ca. 1,3 fache) wenn die nicht-kanonische NtcA-Bindestelle in eine kanonische Bindestelle umgewandelt wurde. Dieser Repressor ist unabhängig von P_{II}, da seine Wirkung in MP2 auch zu sehen ist. Im Bereich der DNA-Repressorbindestelle wurde eine palindromische Sequenz gefunden (Abb.57). Diese Sequenz enthält viele Basen von Deoxy-Adenin oder-Tymin, die für Entstehung einer wesentlichen DNA-Krümmung verantwortlich sind. Diese DNA-Krümmung ist häufig wichtig für die Transkription in Cyanobacteria (Asayama *et al.*, 1999; Asayama *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 1997). Deshalb könnte es sein, dass diese Sequenz eine Rolle für die Bindung des Repressors auf die DNA spielen könnte.

ACTCTGCATCCTTCATAGGGTGCTGGCATTTCCCAGTCCTTTTGAGAACTGAAAAT
AAGTAATTA AAAACCCTATAAATCAAGGCTGATGATAACCT

Abbildung 57: Diese Palindromische Sequenz wurde im Bereich der Repressorbindestelle (zwischen -226 und -314) der *glnN*-Promotersregion entdeckt.

3. Die regulatorische Beziehung zwischen P_{II} und NtcA *in vivo*

Es wurden *luxAB*-Reporteranalysen in zwei verschiedenen Promoterregionen durchgeführt, von denen eine eine kanonische NtcA-Bindestelle hat (*glnB*-Promoter), und die andere eine nicht-kanonische NtcA-Bindestelle (*glnN*-Promoter).

3.1 Analysen eines kanonischen NtcA-Promoters

Durch die Verwendung von *luxAB*-Reporter-Fusionen konnte die *glnB*-Genexpression bei verschiedenen Stickstoffbedingungen erfolgreich untersucht werden. Durch die Analyse der *luxAB-glnB*-Expression, die in Absatz (C.I.1) erklärt wurde, wurden folgende Befunde beobachtet:

- Erstens: Bei Nitratwachstumsbedingungen war der signifikante Unterschied zwischen Wildtyp und den P_{II} -defizienten Zellen eine achtfache Zunahme in der *luxAB*-Expression im MP2-FAM2 Stamm. Somit ist es möglich, dass P_{II} in Anwesenheit von Nitrat als Repressor der NtcA-Aktivität fungiert. Interessant ist, dass sich die P_{II} -Mutation nicht auf die Aktivität des konstitutiven σ^{70} -abhängigen Promoters auswirkt, da beim Konstrukt FAM1 kein Unterschied zwischen der P_{II} -defizient Mutante und Wildtyp zu sehen ist.
- Zweitens: Unter Ammoniumwachstumsbedingungen ist kein Unterschied zwischen Wildtyp und P_{II} -defizienten Zellen zu sehen. Der signifikante Befund ist, dass die starke Repression der *luxAB*-Expression durch Ammonium in WT-FAM2 oder in MP2-FAM2 beobachtet abwesend beim MNtcA-FAM2 Stamm ist. Das bedeutet, dass die Ammoniumrepression NtcA braucht und unabhängig von P_{II} ist.
- Drittens: Bei der Mutante MP2-A sind die Werte der *luxAB*-Aktivität in den beiden Konstrukten FAM1 und FAM2 unter Nitratwachstumsbedingungen höher als im Wildtyp und in der P_{II} -defizienten Mutante. Dies könnte bedeuten, dass die unphosphorylierte P_{II} -A Form einen positiven Effekt auf die *luxAB*-Expression unter Nitratbedingungen hat.
- Bei der Überführung der Zellen von nitrat- oder ammoniumhaltigem - Medium zu stickstofffreiem Medium waren die P_{II} - und NtcA-defizienten Mutanten unfähig, die *glnB-luxAB* Expression zu erhöhen. Die im Vergleich zum WT verringerte Induktion in MP2-A weist darauf hin, dass die phosphorylierte Form von P_{II} nötig ist um die maximale NtcA-Aktivität unter Stickstoff-mangelbedingungen zu erhalten.

Aus diesen Befunden kann ein Modell für die NtcA-P_{II} Interaktion im Bereich des *glnB*-Promoters vorgestellt werden (Abbildung 58):

- 1) Unter Ammoniumwachstumsbedingungen ist P_{II} in unphosphorylierter Form vorhanden und die zelluläre Konzentration von 2-OG ist niedriger als bei Nitratwachstum. Die Ammoniumrepression braucht NtcA und ist unabhängig von P_{II}.
- 2) unter Nitratwachstumsbedingungen ist P_{II} in phosphorylierter und unphosphorylierter Form vorhanden. P_{II} hat einen negativen Effekt auf die *glnB*-Expression, und NtcA wirkt damit gering aktivierend.
- 3) Unter Stickstoffmangelbedingungen ist P_{II} in phosphorylierter Form vorhanden. 2-OG ist viel höher als unter Nitratwachstumsbedingungen. P_{II} führt zu einer Steigerung der *glnB*-Expression und NtcA wirkt unter dieser Bedingungen stark aktivierend.

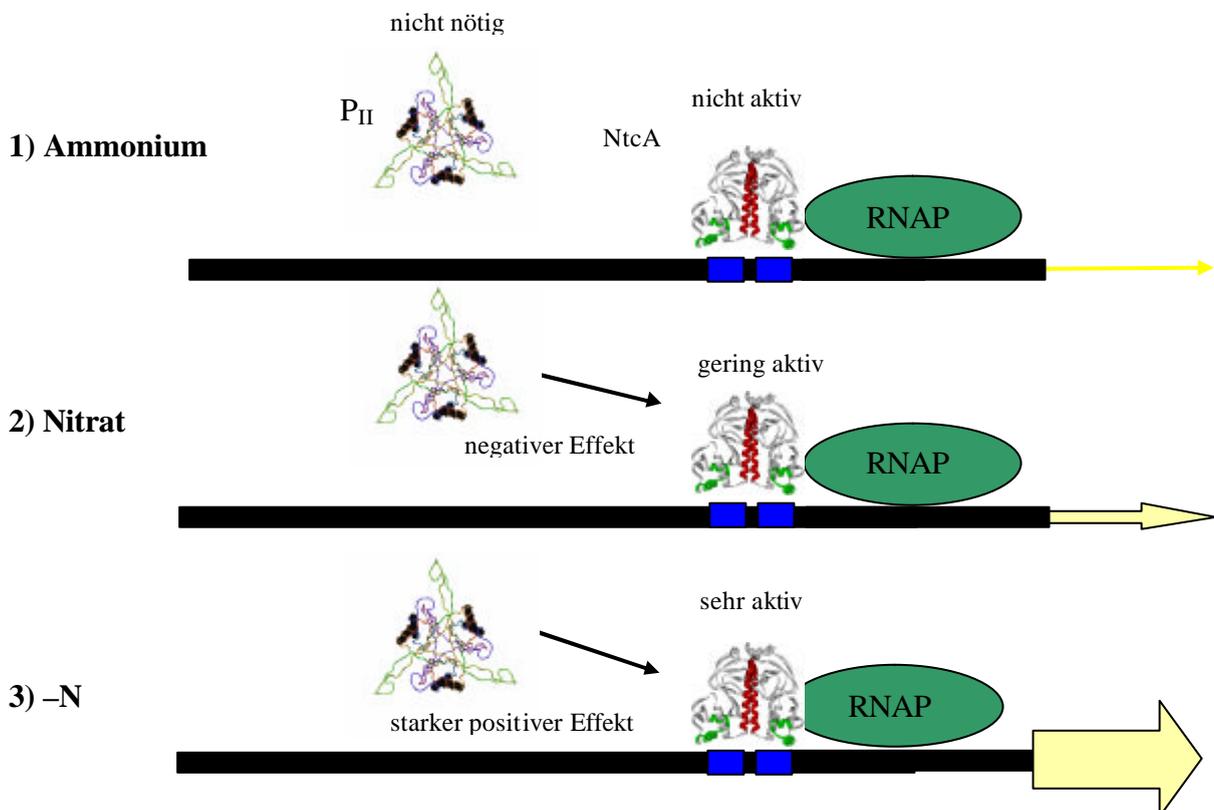


Abbildung 58: Bildhafte Darstellung für die NtcA-P_{II} Interaktion im Bereich des *glnB*-Promoters bei unterschiedlicher Stickstoffversorgung. RNAP: RNA Polymerase, Das Modell wurde mit Hilfe von <http://swissmodel.org> hergestellt

3.2 Analysen eines nicht kanonischen NtcA-Promoters

Im *glnN*-Promoter ist keine kanonische NtcA-Bindestelle wie beim *glnB*-Promoter vorhanden, sondern eine nicht kanonische NtcA-Bindestelle, die sich in zwei Positionen von konsensusmotiv unterscheidet. Durch die mutierte Analyse der *glnN*-Promoter (C.I.3.2) ist zu erkennen, dass NtcA tatsächlich für die Aktivierung des *glnN*-Promoters nötig ist. Nun um rauszufinden, ob P_{II} für die Aktivierung der Genexpression an nicht kanonischen NtcA-Promoter notwendig ist, wurden die Experimente für die Analyse der *glnN*-Expression mittels *luxAB*-Reporter-Fusionen (C.I.2.1) unter verschiedenen Stickstoffversorgungsbedingungen durchgeführt. Folgende Befunde wurden beobachtet:

- Erstens: Unter Nitratwachstumsbedingungen lag der Unterschied zwischen Wildtyp und den P_{II}-defizient-Stämmen im Allgemeinen darin, dass MP2 immer eine 5-bis 10-Fache höhere *luxAB*-Aktivität hat. Dies ist in allen Konstrukten zu beobachten. Das bestätigt die Theorie, die bei *glnB*-Untersuchungen aufgestellt wurde, dass das P_{II} Protein die NtcA-Aktivität bei Wachstum auf Nitrat reprimieren könnte.
- Zweitens: Unter Ammoniumwachstumsbedingungen ist kein Unterschied zwischen Wildtyp und P_{II}-defizienten Zellen zu sehen. Interessant war hier, dass die *luxAB* Werte in den MNtcA-Stämmen das ca. 5 fache erreichen als beim WT- oder bei den MP2-Stämmen. Das heißt, dass die Ammoniumrepression NtcA braucht und unabhängig von P_{II} ist.
- Drittens: Bei der Mutante MP2-A sind die Werte unter Nitratwachstum höher als beim WT oder beim MP2. Dies könnte bedeutet, dass (wie beim *glnB*-Promoter) die unphosphorylierte P_{II}-A Form einen positiven Effekt auf die *luxAB*-Expression unter Nitratbedingungen hat.
- Viertens: Bei der Überführung der Zellen von nitrat- oder ammoniumhaltigem Medium in stickstofffreies Medium waren (wie beim *glnB*-Promoter) die P_{II}- und NtcA-defizienten Zellen unfähig, die *glnN-luxAB* Expression zu erhöhen, woraus gefolgert werden muß, dass, genau wie für das *glnB* Gen, P_{II} für die Aktivierung von NtcA nötig ist. Von den MP2-A Shift Experimenten ist zu erkennen, dass, um die maximale Aktivität des *glnN* Gens unter Stickstoffmangelbedingungen zu erreichen, die phosphorylierte Form des P_{II}-Proteins erforderlich ist.
- Fünftens: Der Repressor, der zwischen dem Bereich -226 und -314 bindet, ist beim Nitratwachstum in WT und in MP2 sowie auch unter Stickstoffentzugsbedingungen in WT-Stämmen aktiv.

Aus diesen Befunden kann ein Modell für die NtcA-P_{II} Interaktion im Bereich des *glnN*-Promoters vorgestellt werden (Abbildung 59):

- 1) Unter Ammoniumwachstumsbedingungen ist P_{II} in unphosphorylierter Form vorhanden, und die zelluläre Konzentration von 2-OG ist niedriger als bei Nitratwachstum. NtcA reprimiert unabhängig von P_{II} die *glnN*-Expression.
- 2) Unter Nitratwachstumsbedingungen ist P_{II} in phosphorylierter und unphosphorylierter Form vorhanden. Zwei reprimierte Effekte sind hier zusehen: der erste stammt von der P_{II}, der zweite kommt von dem Repressor, der im Bereich -226 bis -314 bindet. NtcA wirkt damit gering aktivierend.
- 3) Unter Stickstoffmangelbedingungen ist in phosphorylierter Form vorhanden. 2-OG ist viel höher als unter Nitratwachstumsbedingungen. P_{II} führt zu einer Steigerung der *glnN*-Expression, NtcA wirkt unter dieser Bedingungen stark aktivierend. Der Repressor, der im Bereich -226 bis -314 bindet, bleibt hier aktiv.

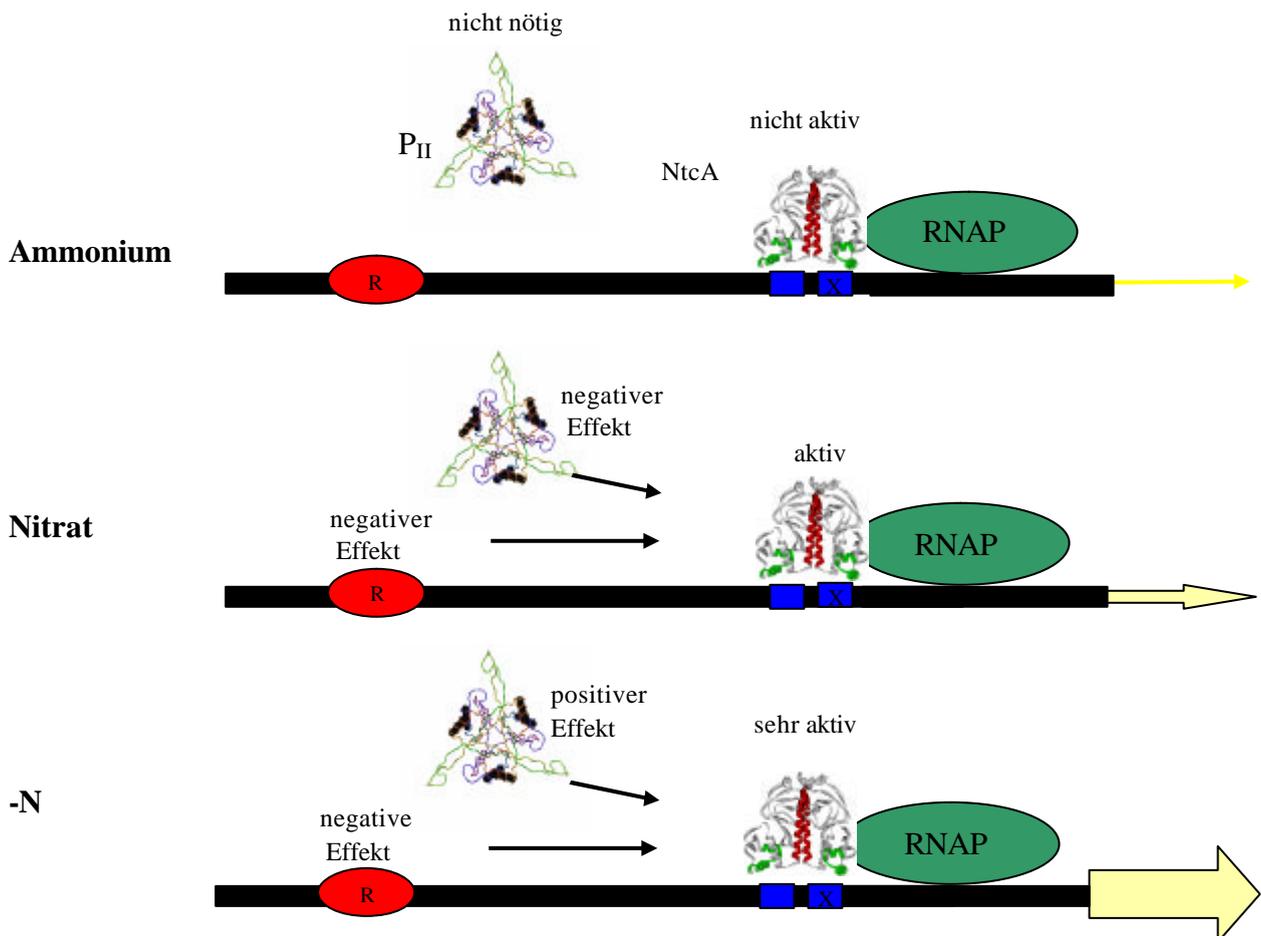


Abbildung 59: Bildhafte Darstellung für die NtcA-P_{II} Interaktion im Bereich des *glnN*-Promoters bei unterschiedlicher Stickstoffversorgung. R: Repressor. RNAP: RNA Polymease

Frühere Studien, die in unserem Labor oder von anderen Gruppen durchgeführt wurden, zeigten, dass NtcA nicht von P_{II} -Regulation kontrolliert wird. Diese Schlussfolgerung wurde gezogen bei der Beobachtung, dass die Repression der NtcA-abhängigen Gene wie *glnA* (kodiert für GSI) und *nir* Operon (kodiert für Nitrataufnahme und Reduktion) bei Ammonium in P_{II} -defizienten Mutanten von *S. elongatus* nicht gestört ist (Forchhammer und Tandeau de Marsac 1995, Lee *et al.*, 2000). Die P_{II} -unabhängige Ammoniumrepression wurde hier durch *glnB*- und *glnN-luxAB* Reporterfusionen bestätigt. Die P_{II} -unabhängige Regulation von NtcA unter Ammonium könnte mit der Bindung von 2-OG an NtcA im Zusammenhang stehen. *In vitro* Studien zeigten: Wenn das Niveau der 2-OG niedrig ist, wie unter Ammoniumwachstumsbedingung (Muro-Pastor *et al.*, 2001), bleibt NtcA noch fähig mit einer reduzierten Affinität an ihre NtcA-Bindestelle zu binden (Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002), ist aber dabei unfähig die Transkription zu aktivieren (Tanigawa *et al.*, 2002). Auf diese Weise könnte NtcA möglicherweise die Transkription unter Ammoniumwachstum hindern. Dies würde erklären, warum es in diesen Stämmen (WT-FAM2 und MP2-FAM2) eine starke Ammoniumrepression gibt. Unter Nitratwachstumsbedingungen ist der 2-OG-Spiegel höher als bei Ammoniumwachstum, und damit erhöht sich die NtcA-Affinität an ihre NtcA-Bindestelle und NtcA initiiert die Transkription. Unter Stickstoffmangelbedingungen ist die zelluläre 2-OG Konzentration noch höher als unter Nitratwachstumsbedingungen, damit erhöht sich die NtcA-Affinität an ihre Bindestelle weiter.

Andererseits wurde gezeigt, dass Sigmafaktoren auch eine Rolle bei der Regulation Stickstoff-abhängiger Gene (wie *glnN*, *glnB*) spielen. Zum Beispiel ist die *glnN*-Expression in eine *SigE*-Mutante von *Synechocystis* PCC 6803 unter Stickstoffmangelbedingungen geringer als im Wildtyp (Muro-Pastor *et al.*, 2001). *Primer extension*-Analysen der *glnB*-Promoter in *Synechocystis* PCC 6803 zeigten, dass der *glnB*-Promoter 2 spezifisch unter Stickstoffmangelbedingungen von *SigC* erkannt wird (Asayama *et al.*, 2004). Deshalb ist zu vermuten, dass auch in *Synechococcus* unter Stickstoffmangelbedingungen ein spezifischer Sigmafaktor vorhanden ist, der im *glnN*-Promoterbereich bindet und die Transkription zusammen mit NtcA initiiert.

Durch *in vivo* Analysen (*luxAB*-Reporterfusionen) konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Genexpression durch NtcA unter Stickstoffentzugsbedingungen P_{II} erfordert. Dieser Befund ist auch durch andere verschiedene Analysen gestützt worden:

- Die Expression des *glnN* Gens nimmt spezifisch unter Stickstoffentzugsbedingungen zu, diese Zunahme ist abwesend bei P_{II}-defizienten Zellen (Sauer *et al.*, 2000).
- 2-D PAGE Analysen zeigten, dass die Proteine, deren Synthese spezifisch unter Stickstoffentzugsbedingungen induziert wird, nicht nur von P_{II} sondern auch von NtcA beeinflusst werden. Die beiden P_{II}-defiziente und NtcA-defizienten Mutanten waren unfähig, die Synthese dieser Proteine, die normalerweise in WT unter Stickstoffentzug induziert oder reprimiert werden, zu induzieren oder zu reprimieren (aldehyni *et al.*, 2003)
- Auch Paz-Yepes *et al.*, 2003 konnten zeigen, dass in P_{II}-defizienten Mutanten die Induktion der NtcA-abhängigen Gene *amt1* (Ammoniumpermease), *glnA*, *ntcA* und des *nir* Operons unter Stickstoffentzug vermindert ist.

Andererseits wurde durch *luxAB*-Reporterfusion-Analysen in MP2-A Stämmen gezeigt, dass die phosphorylierte Form des P_{II} erforderlich ist, um die maximale *luxAB*-Aktivität im *glnB*- oder *glnN*-Promoter unter Stickstoffmangelbedingungen zu erreichen. Dieser Befund wurde später durch RNA/DNA Hybridization Analysen durch Paz-Yepes *et al.*, 2003 bestätigt. Die Effizienz der Induktion der Genexpression bei der nicht phosphorylierte Mutante P2-A war wesentlich geringer als bei WT. Dagegen hatte die Effizienz der Induktion der Genexpression in der P_{II}-D und P_{II}-E Mutante ein höheres Niveau. Das heißt, dass die phosphorylierte Form des P_{II} mit NtcA unter Stickstoffentzugsbedingungen interagiert. Unklar bleibt aber noch die molekulare Basisfunktion der Interaktion zwischen P_{II} und NtcA.

4. Der Einfluss von P_{II} auf NtcA *in vitro*

In vivo Analysen zeigten, dass P_{II} und NtcA miteinander interagieren. Aber es ist nicht klar, ob diese Interaktion eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist, oder möglicherweise, ob P_{II} unter Stickstoffentzugsbedingung einen anderen Faktor (Faktor X) stimuliert, der positiv NtcA reguliert, oder einen Faktor inhibiert, der NtcA inaktiviert. Deshalb wurden verschiedene *in vivo* Experimente (wie *Gelshift* und *Biacore*) durchgeführt, um besser die direkte oder indirekte Beziehung zwischen P_{II} und NtcA aufzuklären.

4.1 Analyse der DNA-Bindung von NtcA

Der Vorteil bei *Biacore*-Experimente ist, dass man die Resultate sehr schnell bekommt (im Gegensatz zu *Gelshift*). Man kann auch die Interaktion zwischen den beiden Proteinen unter verschiedenen Bedingungen untersuchen. Für die Interaktionsstudien zwischen P_{II} und NtcA wurden verschiedene Möglichkeiten der Interaktion durchgeführt. Wie in Absatz C.II.2.3 gezeigt wurde, wurde zunächst das NtcA und P_{II} zusammen über Chip-gebundene DNA geleitet. folgende Befunde wurden erhalten:

Bei Zugabe von steigenden Konzentrationen der P_{II}⁰ Form sinkt die spezifische NtcA-DNA-Bindung. Je mehr P_{II}⁰ zugegeben wird, desto stärker ist die Verringerung der Bindung. Diese Verringerung ist unabhängig von ATP oder 2-OG.

In Abwesenheit von ATP und 2-OG ist trotz der Zugabe von steigenden Konzentrationen der P_{II}-D Form kein signifikanter Effekt zu sehen. Den positiven Effekt sieht man nur in Anwesenheit von ATP und 2-OG. Später wurde gezeigt, dass ATP allein ausreicht, um den positiven Effekt von P_{II}-D zu sehen.

Ein positiver Effekt von P_{II}-D auf die DNA-Bindung von NtcA konnte nur in Anwesenheit von ATP gesehen werden. Im *Biacore*-Test zeigte P_{II}⁰ immer einen negativen Effekt auf die NtcA-DNA-Bindung. Diese Befunde deuten auf einen direkten Effekt von P_{II} auf NtcA hin, aber es bleibt unklar, ob P_{II} NtcA bindet oder nicht. Deshalb wurden andere *Biacore*-Experimente durchgeführt. Hier wurde NtcA-Protein auf den Chip gebunden, wobei P_{II} über den NtcA-Chip geführt wurde. Trotz der Verwendung verschiedener Faktoren wie ATP, Mg²⁺, 2-OG, Ca²⁺, Mn²⁺, unterschiedlichen P_{II}-Konzentrationen, sowie verschiedene Fließgeschwindigkeiten konnte keine direkte Bindung zwischen P_{II} und NtcA nachgewiesen werden, im Gegensatz zur Bindung zwischen P_{II} und NAGK (Maheswaran *et al.*, 2004). Weitere *Biacore*-Experimente wurden durchgeführt. Hier wurde NtcA auf die Chip-fixierte DNA gebunden und anschließend P_{II} über den NtcA-DNA Komplex geführt. Auch hier war trotz der Verwendung verschiedener Faktoren keine direkte Bindung zu sehen.

Biacore-Experimente zeigten, dass die P_{II}-D Form einen positiven Effekt auf die NtcA-DNA-Bindung hat. dagegen zeigte die P_{II}⁰ Form einen negativen Effekt. Um festzustellen, ob das Resultat von *Biacore* eine signifikante Bedeutung hat, wurde der Effekt von P_{II} auf die NtcA-DNA-Bindung mittels *Gelshift*-Assay untersucht.

Bei Anwesenheit oder Abwesenheit verschiedener Bindungsfaktoren (wie ATP, Mg^{2+} , 2-OG) wurde der Effekt von P_{II} auf die NtcA-DNA-Bindung untersucht (Absatz A.3). Folgende Befunde wurden beobachtet:

Erstens: Bei geringer 2-OG-Konzentration und ohne Zugabe von ATP oder Mg^{2+} erhöhen die beiden Formen des P_{II} (P_{II}^0 und P_{II-D}) die Affinität der NtcA-DNA-Bindung.

Zweitens: Bei geringer 2-OG-Konzentration und in Anwesenheit von ATP und ohne Zugabe von Mg^{2+} erhöhen die beiden Formen des P_{II} (P_{II}^0 und P_{II-D}) die Affinität der NtcA-DNA-Bindung.

Drittens: während bei geringer 2-OG Konzentration und in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} , die P_{II-D} Form die Affinität der NtcA-DNA-Bindung erhöht, verringert die Zugabe von WT- P_{II} die NtcA-DNA-Bindung.

Ohne 2-OG ist kein NtcA-DNA-Shift zu registrieren. Es ist auch keinen Effekt von P_{II} auf die NtcA-DNA-Bindung nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Bei einer höheren Konzentration von 2-OG ist auch der Effekt von P_{II} auf die NtcA-DNA-Bindung schwer zu quantifizieren, da in diesem Fall ein sehr guter NtcA-DNA-Shift zu sehen ist. Deswegen wurden die Experimente unter geringer Konzentration von 2-OG (0,5 mM) durchgeführt. Nur bei gemeinsamer Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} sieht man einen negativen Effekt von P_{II}^0 auf die NtcA-DNA-Bindung. Ansonsten hat P_{II} (P_{II}^0 und P_{II-D}) immer einen positiven Effekt auf die NtcA-DNA Bindung. Andererseits ist hier bei *Gelshift*-Experimenten kein Supershift zu sehen. Das heißt, P_{II} interagiert direkt mit NtcA, aber diese Interaktion ist zu schwach, um einen Supershift zu erzeugen. Um den Effekt von P_{II} auf NtcA-DNA-Bindung zu verbessern, sind noch möglicherweise andere Bindungsfaktoren (wie ADP/cAMP, oder Kalzium) erforderlich.

4.2 ATPase-Reaktion von NtcA

Durch die ATP-NtcA *Cross-Linking* Experimente wurde eine neue Bande (später X-Pi genannt) entdeckt. Diese Bande entsteht nur in Anwesenheit von Magnesium, radioaktivem ATP und NtcA. Anschließend wurden einige Eigenschaften dieser Bande charakterisiert:

- Sie ist unabhängig von UV-*cross-linking*.
- Sie ist sehr abhängig von Magnesium und nicht von Mangan oder Kalzium.
- Sie verstärkt sich bei Zugabe von 2-OG.

- Sie ist sichtbar nur bei Verwendung von γ - ^{32}P -ATP und nicht bei α - ^{32}P -ATP.
- Sie besteht aus zwei Elementen, Phosphor P_i und X Faktor, und ist durch alkalische Phosphatase spaltbar.
- Sie reagiert auf die Anwesenheit von P_{II} (positiv mit $\text{P}_{\text{II-D}}$ und negativ mit P_{II}^0).
- Sie ist lösbar in Wasser, Methanol, Aceton, aber nicht in Chloroform.
- Die optimale Temperatur für die Entstehung dieser Bande liegt zwischen 37°C und 42°C , und sie verstärkt sich bei längerer Inkubationszeit der Reaktion.

In dieser ATPase-Reaktion könnte es sein, dass NtcA ATP zur ADP und P_i spaltet. Das erzeugte ADP wurde mit α - ^{32}P -ATP mittels TLC-Analyse nachgewiesen. Jedoch handelt es sich bei dem abgespaltenen Phosphat nicht um Orthophosphat, da die Markierung mit alkalischer Phosphatase spaltbar ist. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass NtcA das γ -Phosphat von ATP auf ein Molekül X überträgt. Dieses X- P_i Produkt erzeugt eine distinkte radioaktive Bande im SDS Gel. Andererseits könnte es sich um Pyrophosphat (PP_i) handeln. Es sind aber noch mehrere Experimente (wie z.B. Maldi TOF Analyse) erforderlich, um die chemische Natur der Bande aufzuklären.

4.3 Analyse einer neuen ATPase-Aktivität von NtcA

In Anwesenheit von NtcA und radioaktivem ATP und Mg^{2+} wurde eine neue Bande in SDS Gelen entdeckt. P_{II} wirkt auf diese Bande in unterschiedlicher Weise:

- Die Entstehung dieser Bande wird durch die $\text{P}_{\text{II-D}}$ Form begünstigt, sogar ohne Mg^{2+} . In Anwesenheit von $\text{P}_{\text{II-D}}$ verstärkt sich diese Bande bei Zugabe von Mg^{2+} und sie verstärkt sich weiter bei Zugabe von Mg^{2+} und 2-OG zusammen.
- Diese Bande wird schwächer bei Zugabe von P_{II}^0 und verschwindet bei höherer Konzentration von WT- P_{II} unabhängig von Mg^{2+} und 2-OG.

Das heißt, es wurde zwei Effekte von P_{II} auf die ATPase-Reaktion von NtcA identifiziert: einen positiven Effekt, der von der $\text{P}_{\text{II-D}}$ Form stammt, und einen negativen Effekt, der von der P_{II}^0 kommt.

Nach der Durchführung aller *in vivo* und *in vitro* Experimente lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die ähnlich phosphorylierte Form von P_{II} (P_{II} -D) einen positiven Effekt auf NtcA hat, während die unphosphorylierte Form von P_{II} einen negativen Effekt hat.

Der positive Effekt der ähnlichen phosphorylierten Form von P_{II} ist zu sehen bei:

- Induktion der *lux*-Aktivität unter Stickstoffentzugsbedingung,
- Einer höheren Affinität der NtcA-DNA Bindung in *Gelshift*-Experimente in Anwesenheit von P_{II} -D,
- Einer höheren Affinität der NtcA-DNA Bindung in *Biacore*-Experimente in Anwesenheit von P_{II} -D und ATP,
- Verstärkung der Entstehung der Bande bei der ATPase-Reaktion von NtcA in Anwesenheit von P_{II} -D.

Der negative Effekt der unphosphorylierten Form der P_{II} ist zu sehen bei:

- Verringerung der Affinität der NtcA-DNA Bindung in *Gelshift*-Experimenten bei Anwesenheit von P_{II}^0 und ATP und Mg^{2+} ,
- Verringerung der Affinität der NtcA-DNA Bindung in *Biacore*-Experimenten bei Anwesenheit von P_{II}^0 ,
- Verringerung der Entstehung der Bande der ATPase-Reaktion von NtcA in Anwesenheit von P_{II}^0 .

E. Zusammenfassung

Die Assimilation von Stickstoffverbindungen ist in Cyanobakterien für ihr Wachstum von zentraler Bedeutung. Die Expression der Gene, die für stickstoffassimilierende Funktionen kodieren, unterliegt dem sogenannten "global nitrogen control". Ein Schlüsselement dieses Prozesses ist der Transkriptionsfaktor NtcA. Alle bisherigen untersuchten stickstoff-regulierten Gene weisen in ihrer Promoterregion eine NtcA-Bindestelle auf. Die Bindung von NtcA an die DNA ist nötig für die Transkriptionsinitiation an den entsprechenden Promotern. Neben NtcA wurde in Cyanobakterien auch das Signalprotein P_{II} nachgewiesen, das in Proteobakterien eine zentrale Rolle der Stickstoff-Regulation spielt. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Signalperzeption des P_{II} Proteins detailliert analysiert, jedoch war die Beziehung zwischen P_{II} und NtcA ungeklärt.

Durch die *in vivo* Analyse der Expression der NtcA-regulierten Gene (*glnB* und *glnN*) mit Hilfe von Reporter genen (*luxAB*) konnte die Beziehung zwischen P_{II} und NtcA identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass es unter Stickstoffmangel zu einer raschen Aktivierung der NtcA-abhängigen Transkription sowohl beim *glnB*- als auch beim *glnN*-Promoter kam. Diese rasche Aktivierung ist abwesend in P_{II}- und NtcA-defizienten Mutanten. Daraus muss gefolgert werden, dass P_{II} für die Aktivierung der NtcA unter Stickstoffmangelbedingungen erforderlich ist.

Durch die *in vitro* Analyse der direkten Interaktion zwischen P_{II} und NtcA mit Hilfe der *Biacore*- und *Gelshift*-Experimente konnte die direkte Interaktion zwischen P_{II} und NtcA identifiziert werden. Diese direkte Interaktion ist nur durch ihre Effekte zu beobachten:

- Ein positiver Effekt von P_{II}-D, das der phosphorylierten Form des P_{II} ähnelt, auf die NtcA-DNA-Bindung.
- Ein negativer Effekt von P_{II}⁰ auf die NtcA-DNA-Bindung.

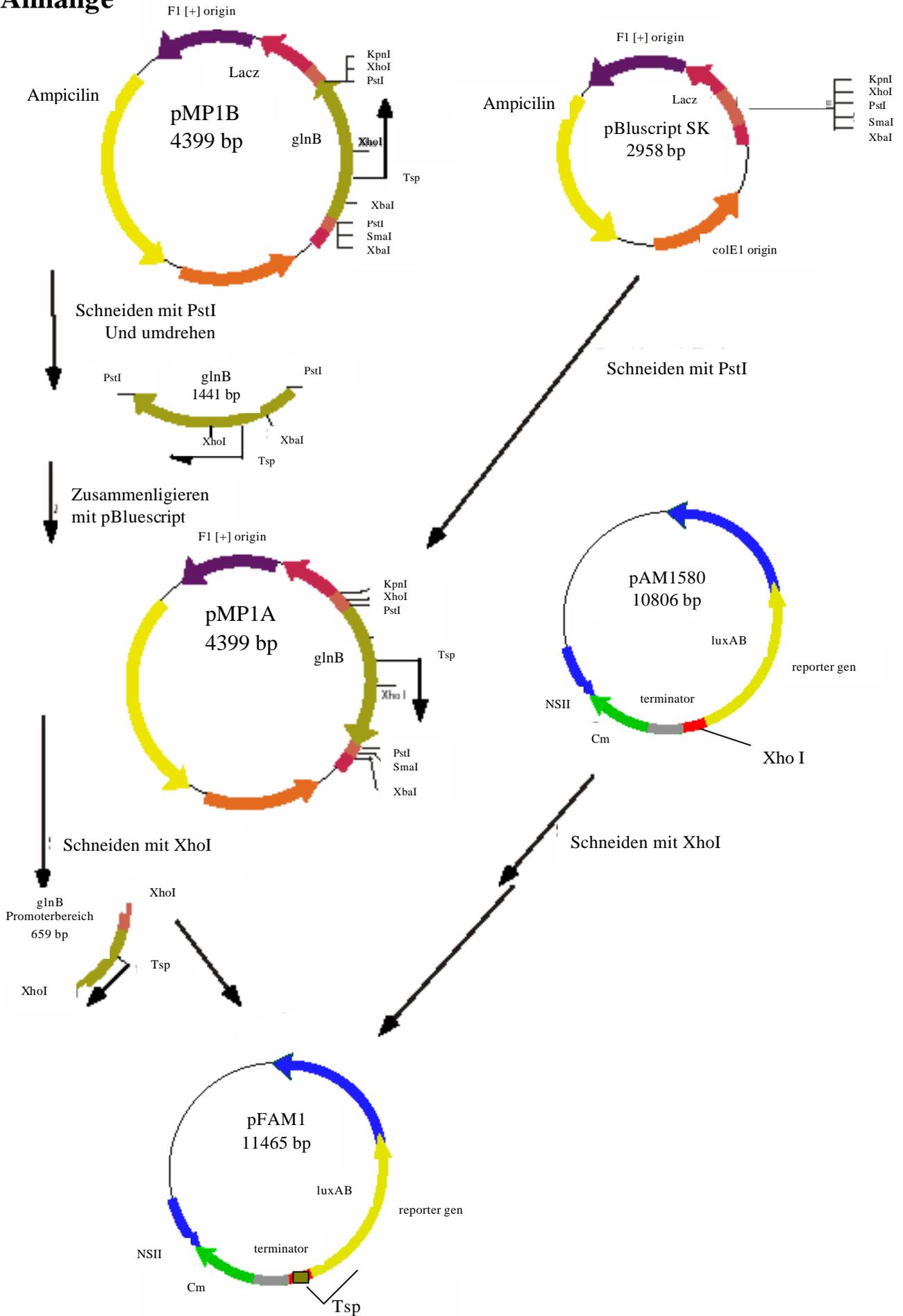
Starke Bindung zwischen NtcA und P_{II}, wie z.B. zwischen P_{II} und NAGK (N-Acetyl-L-Glutamat Kinase) ist nicht zu sehen.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- Es wurde ein Repressorelement in der *glnN*-Promoterregion entdeckt, das die Promoteraktivität reprimiert. Durch die schrittweise Verkürzung der *glnN*-Promoter konnte die Bindestelle des Repressors identifiziert werden. Sie lag zwischen -226 und -314 bp stromaufwärts des Start-Kodons der *glnN*-Gene.
- Es wurde eine neue ATPase-Reaktion von NtcA entdeckt, die zu einem neuen unbekanntem Produkt führt. Diese Reaktion wird durch P_{II} signifikant beeinflusst. Während P_{II} -D auf dieser Reaktion positiv wirkt, wirkt P_{II}^0 negativ.

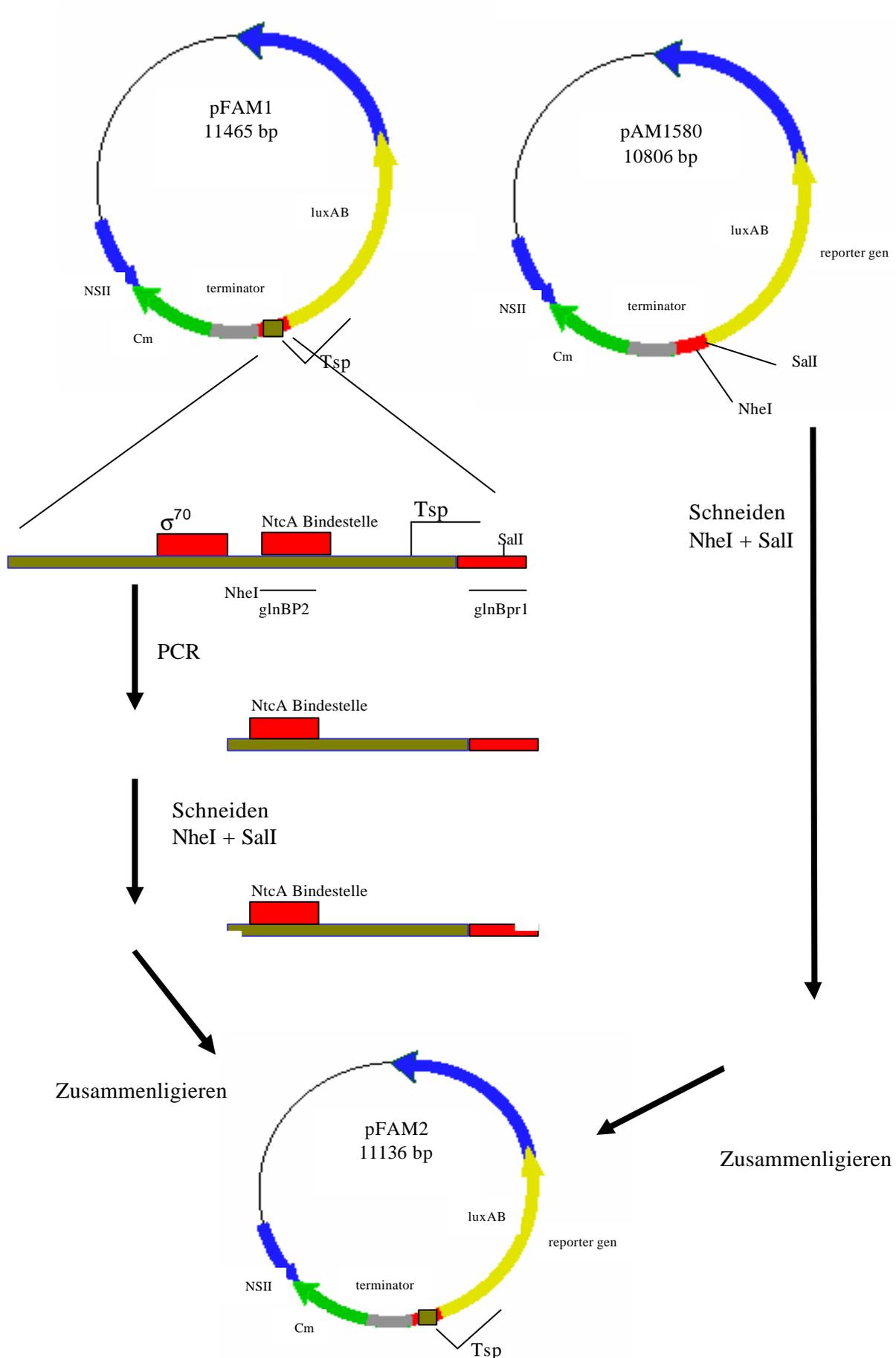
Anhang 1

Anhänge



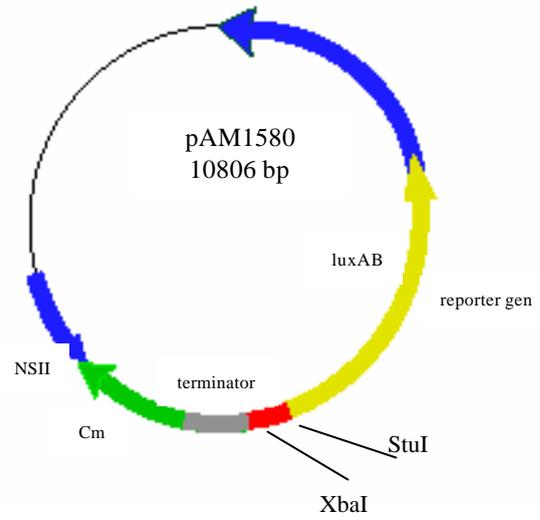
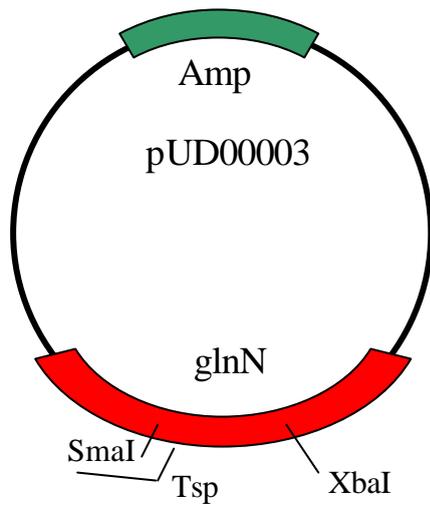
Anhang 2

Konstruktion der pFAM2



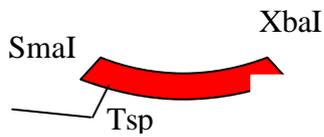
Konstruktion der pFAM-431

Anhang 3



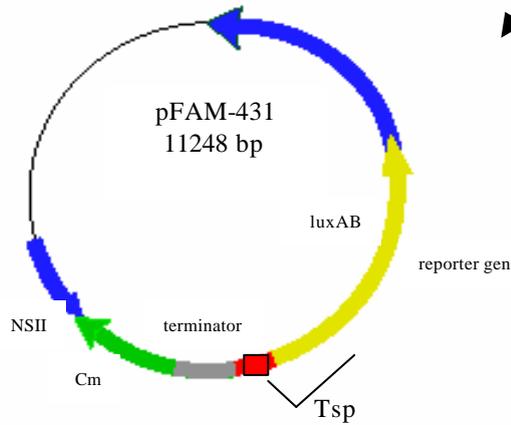
Schneiden
XbaI + SmaI

Schneiden
XbaI + StuI



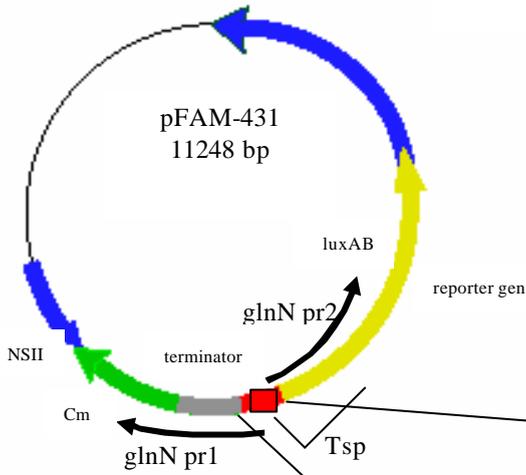
Zusammenligieren

Zusammenligieren



Anhang 4

Konstruktion der pFAM-84

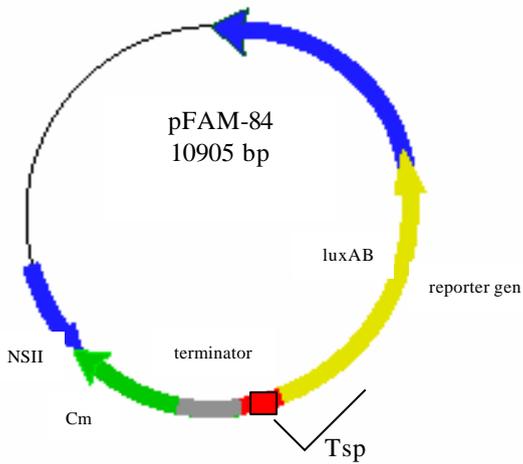


XbaI
GAGCCCGGGTCTAGACAATGACAGTTCAGAGCAGAGTCTCCCAGTTACA
glnN pr1

GCCATTGCTGGTTGGGGGAAGGACTGAATCTGCCCTTTGACCAGCT TGG
 CTGATTACAATTGCGATCGCAGACTCTGCATCCTTCATAGGGTCTGGCA
 TTTCCAGTCTTTTGAGAACTGAAAATAAGTAATTA AAAACCC TATAAATCAAGG
 CTGATGATAACCTCTAATTTTCTCTTCAAAGGAATTTAAATTCTTGC GACTGAT
 GCAACCCATCCTTGTCACTGTCGGCTTCAAATCTAGGGTTCAAAGGA
 TTCTTGGTGCGATCGCAAGGAGGCGATAACTTAGGCTTTTCATCAA AATC
TGCCCTTGGTTCTGTATCTTTCTAGCGATCGAGCTGGTCACCATTGAG
XbaI-glnN-Pr2

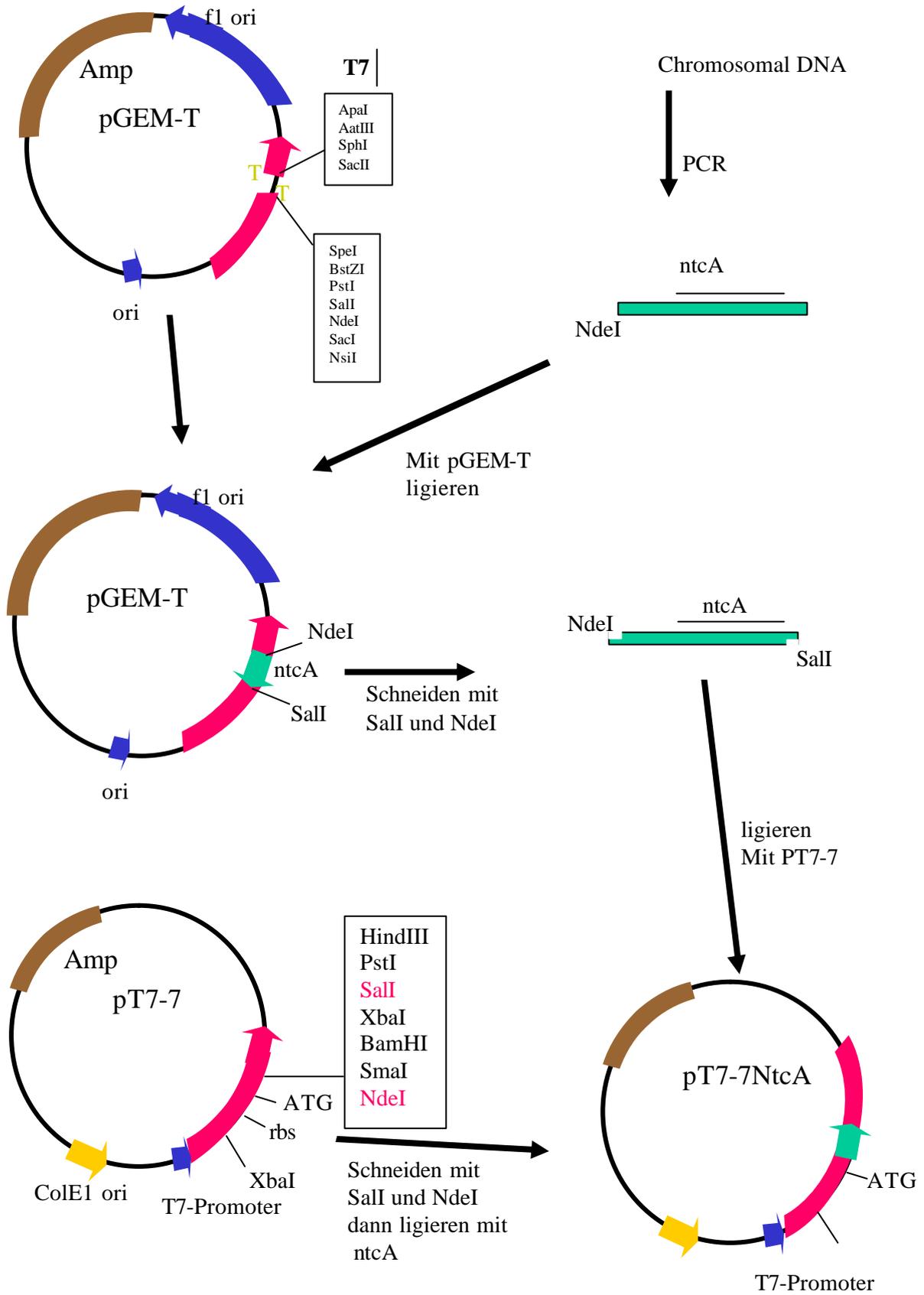
TACGATCAAT TGACTAGCTT TTTTGGGAAAGTCCATGAGCGGCAACGCAG
CCCGGG
SmaI

- Mit PCR das ganze Plasmid amplifizieren
- Schneiden mit XbaI
- Ligieren



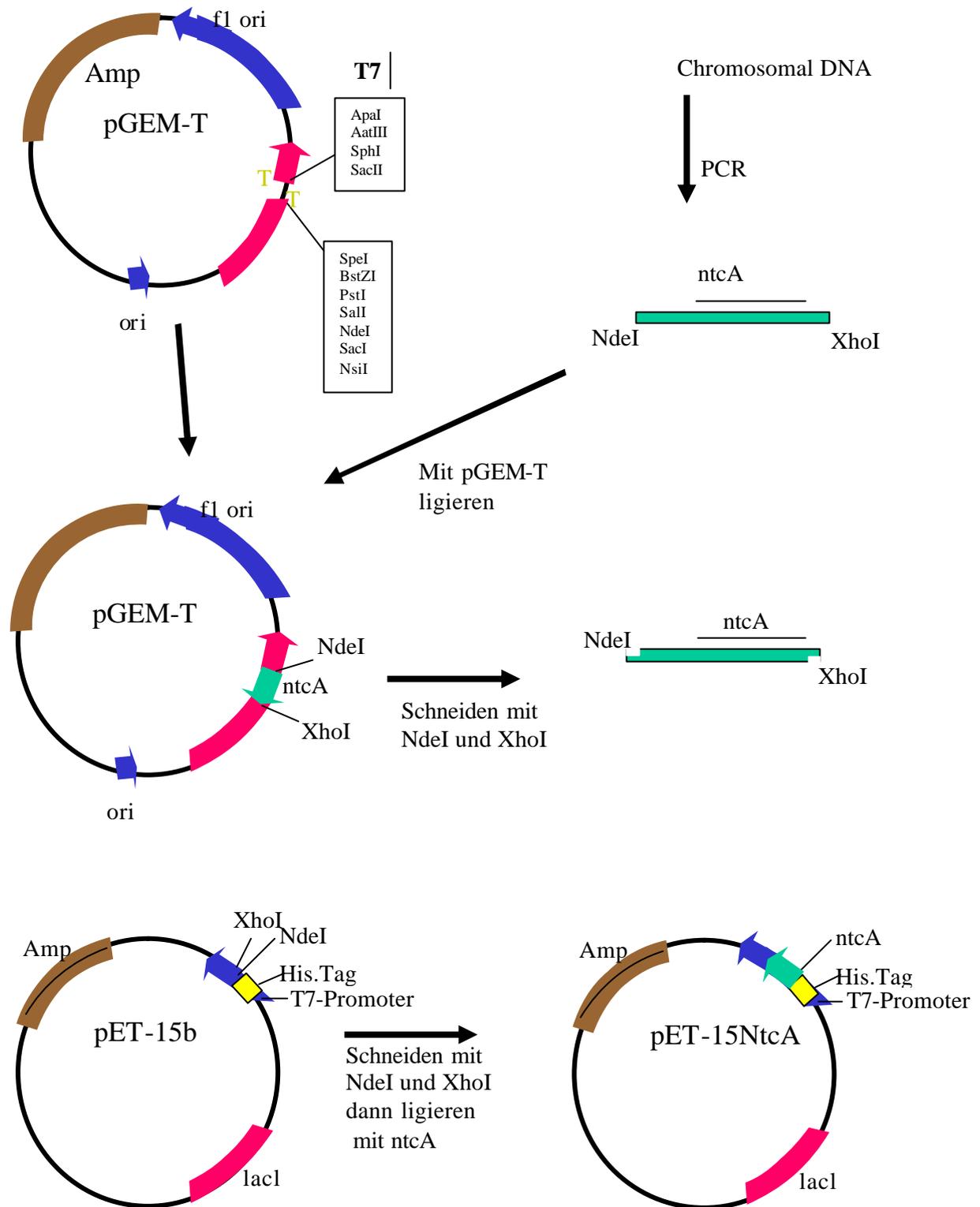
Anhang 5

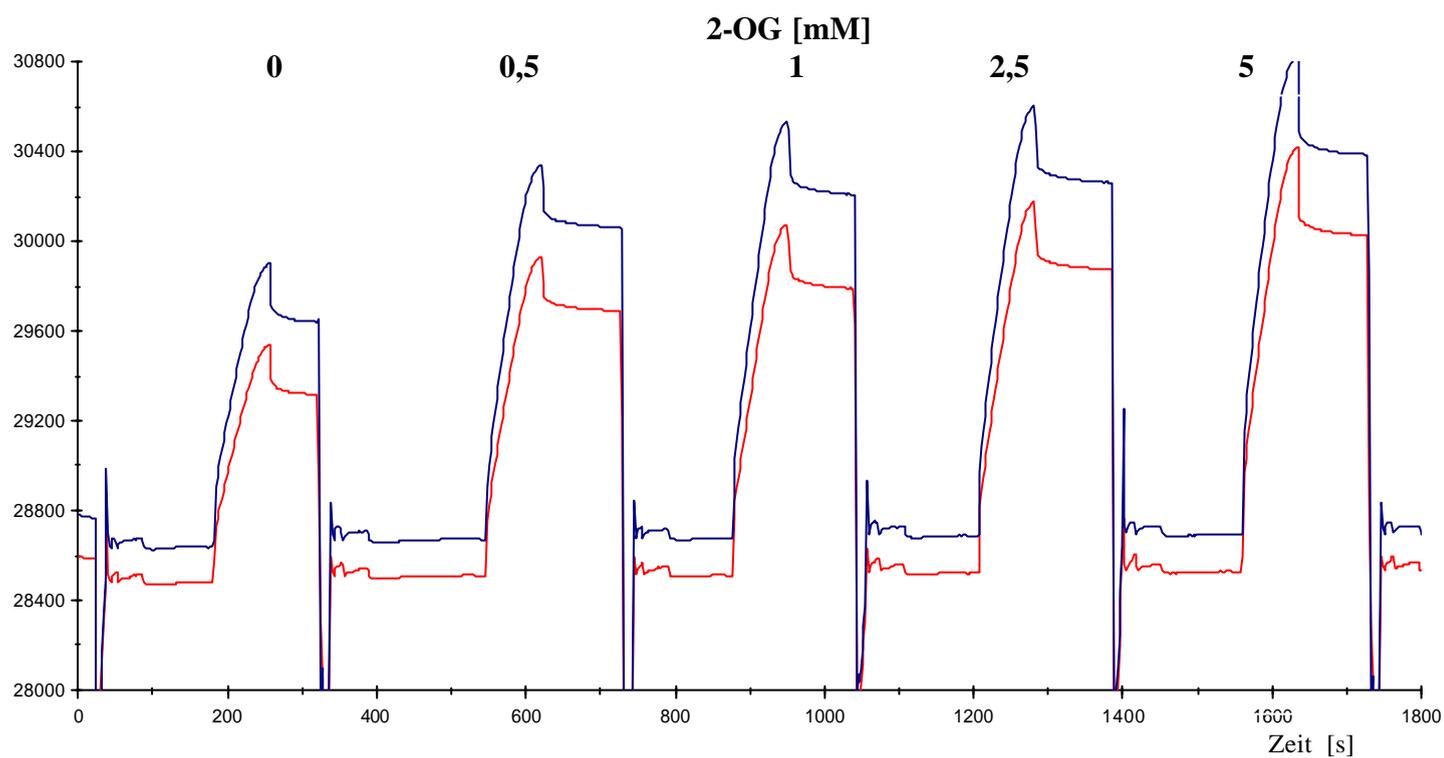
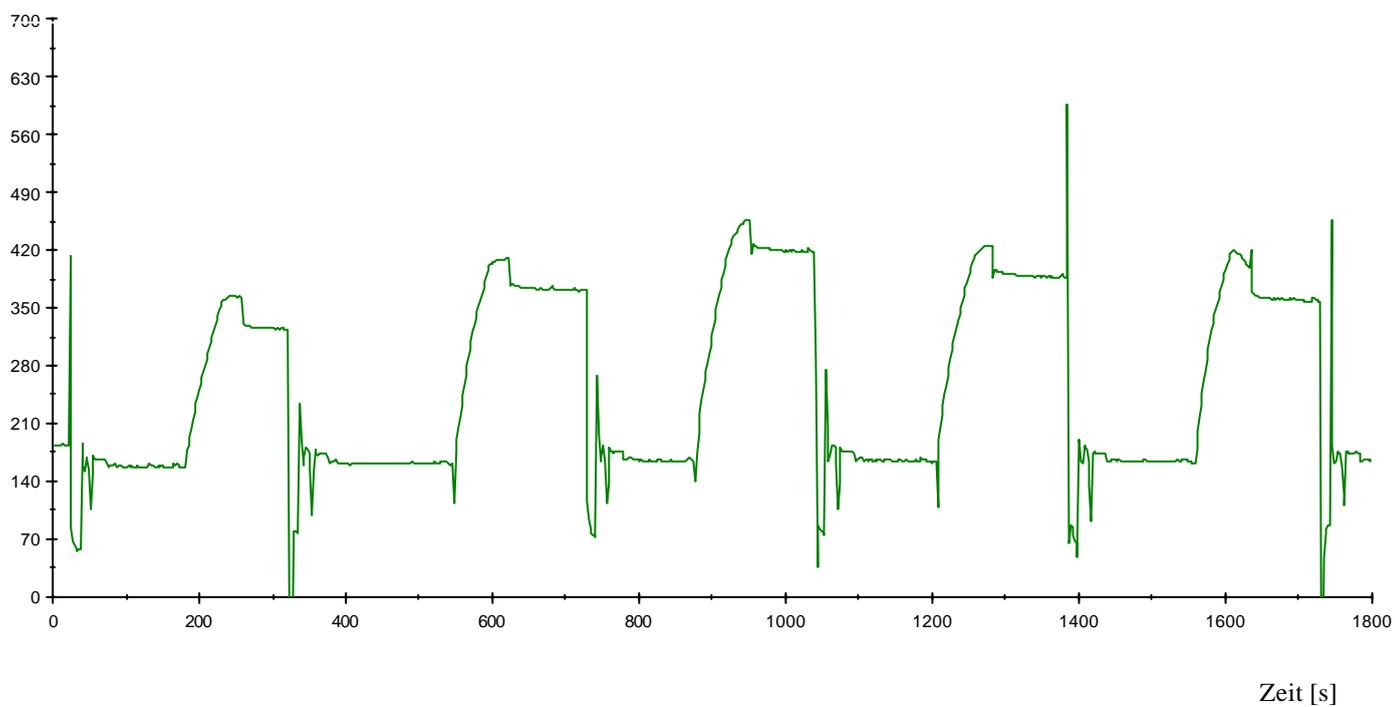
Konstruktion der pT7-7NtcA



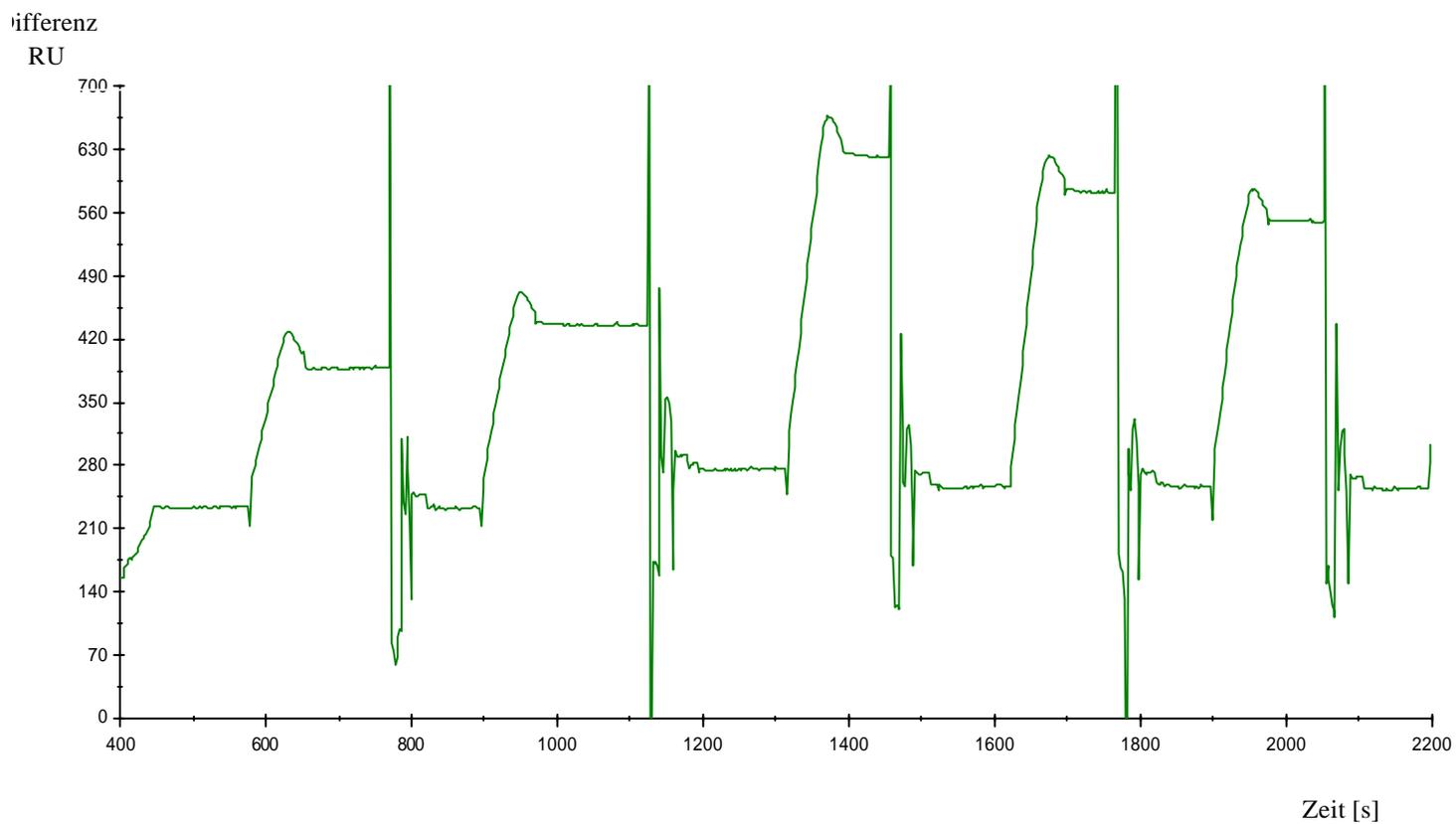
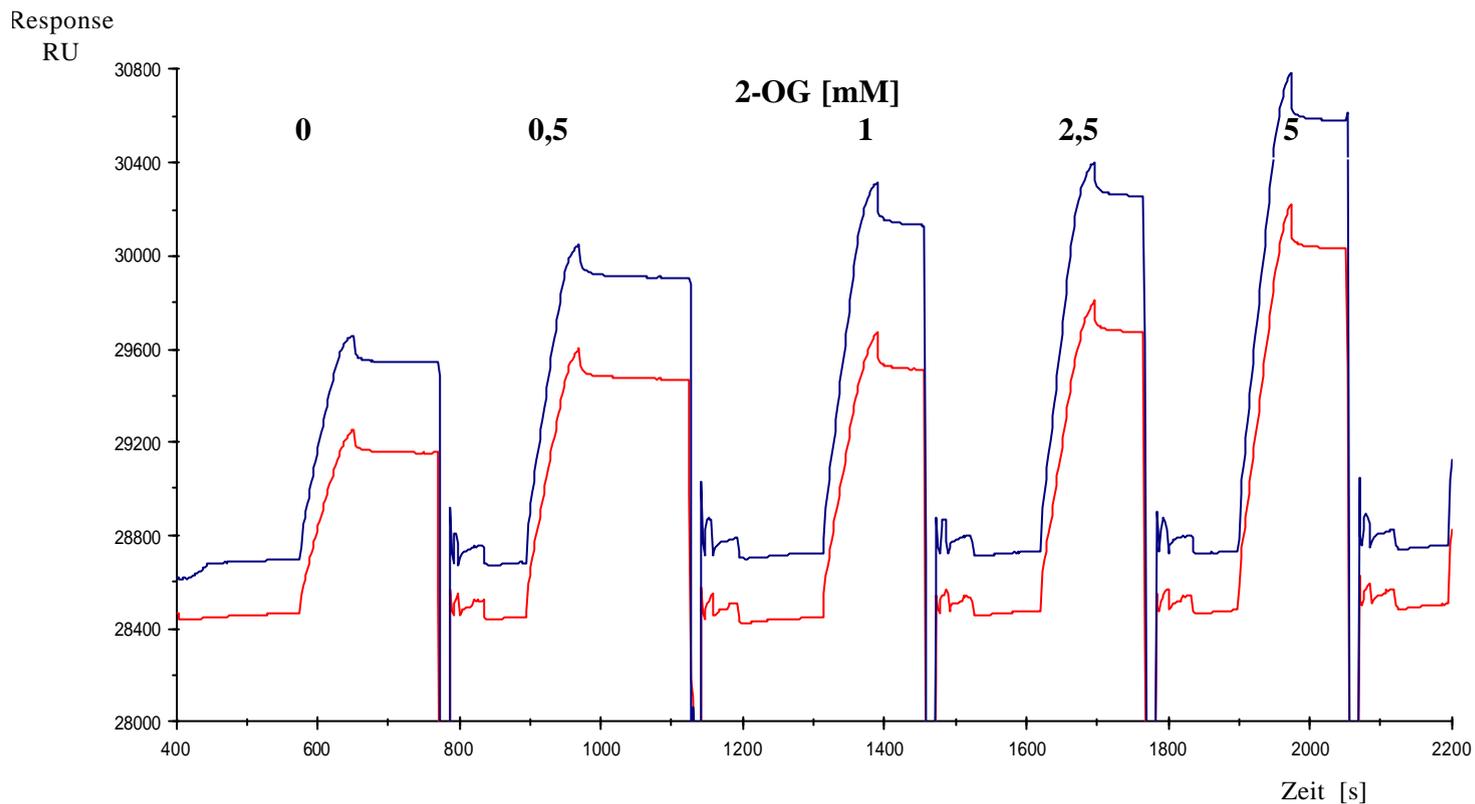
Anhang 6

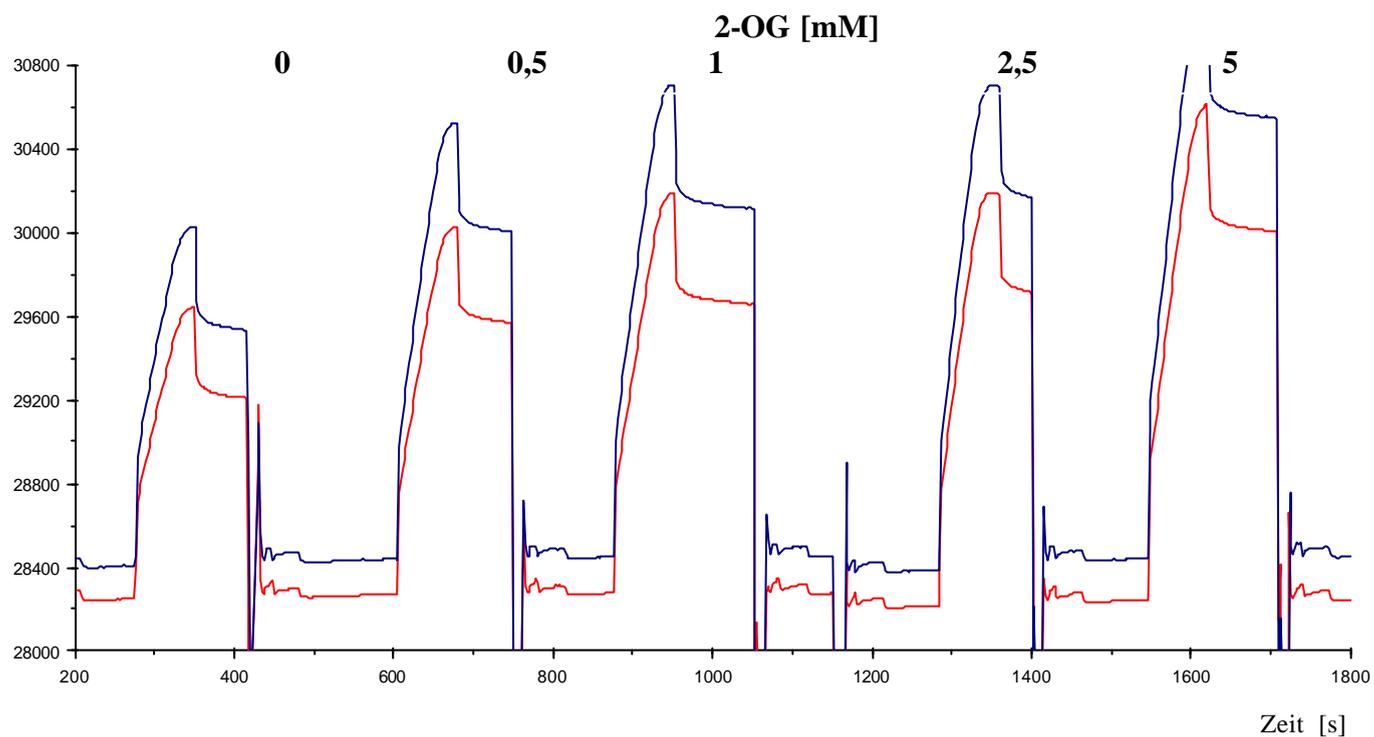
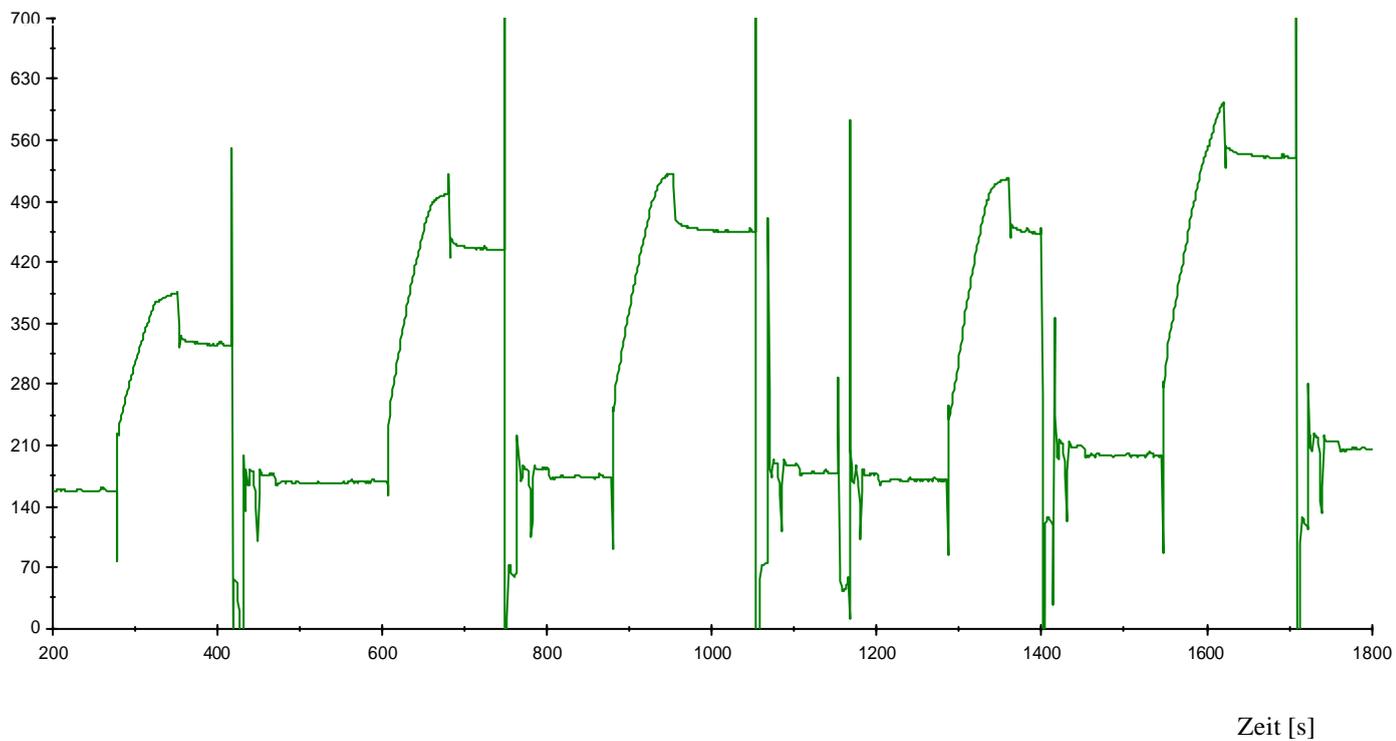
Konstruktion der pET-15bNtcA



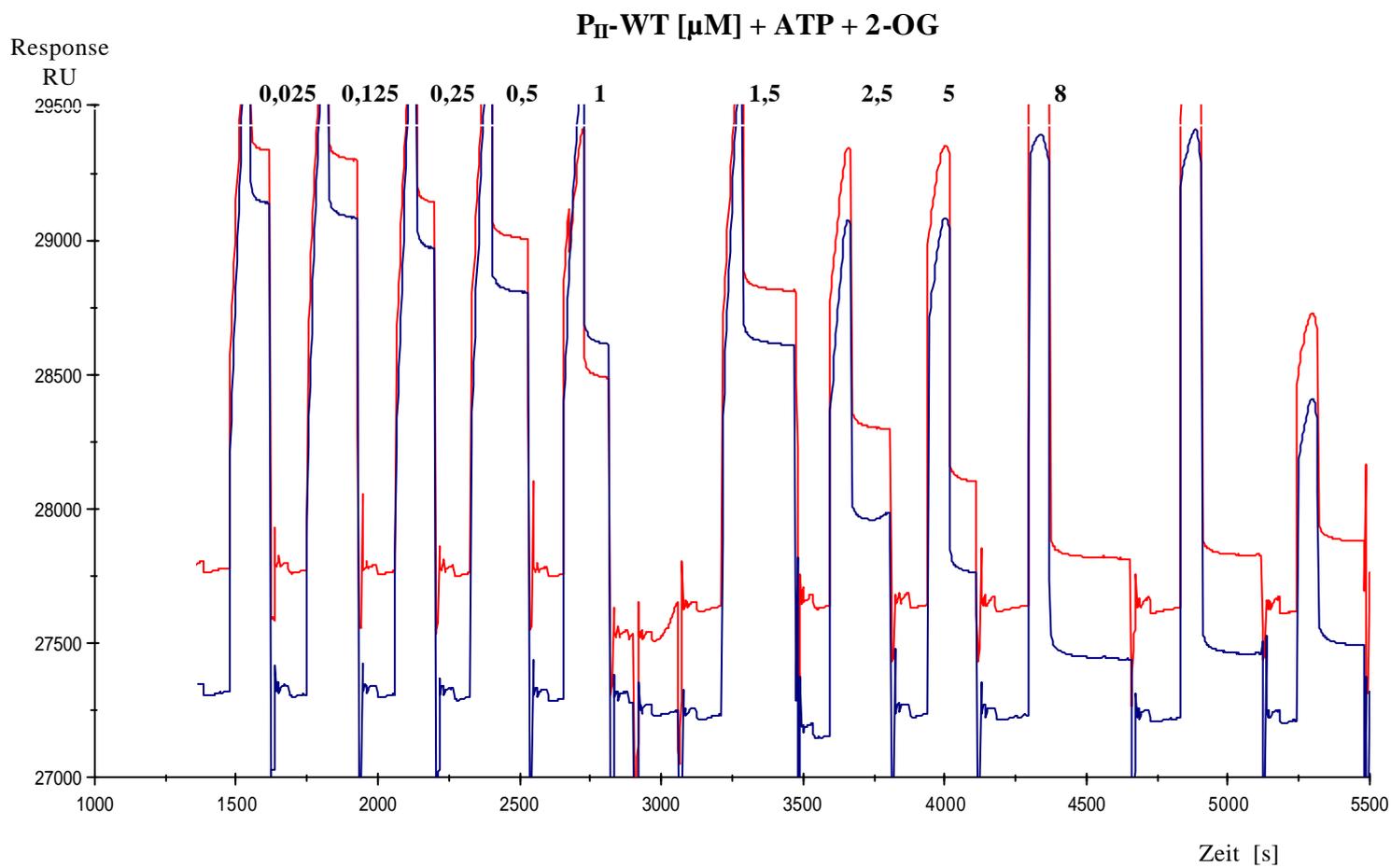
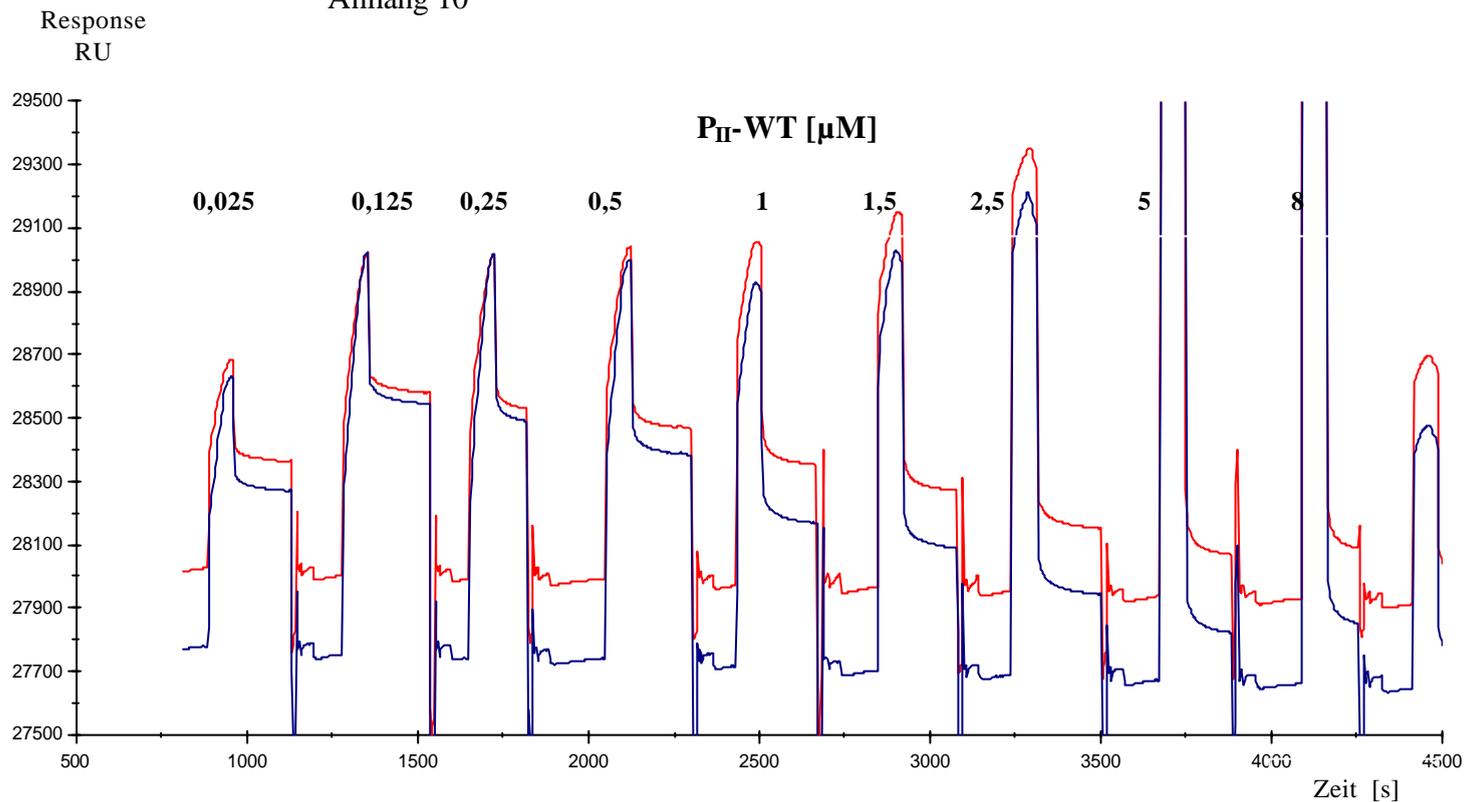
Response
RUAnhang 7. In Abwesenheit von Mg^{2+} und ATPDifferenz
RU

Anhang 8. In Anwesenheit von Mg²⁺

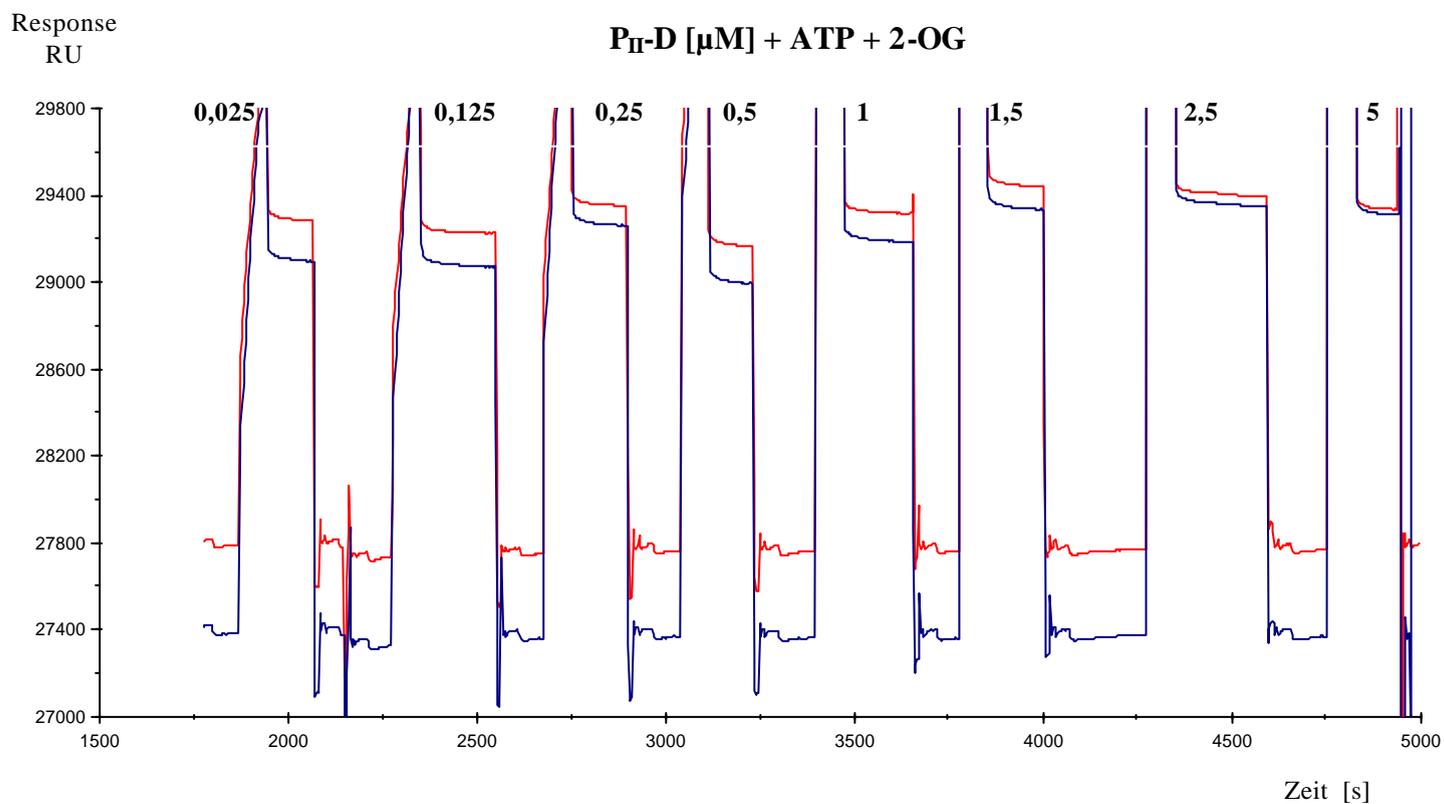
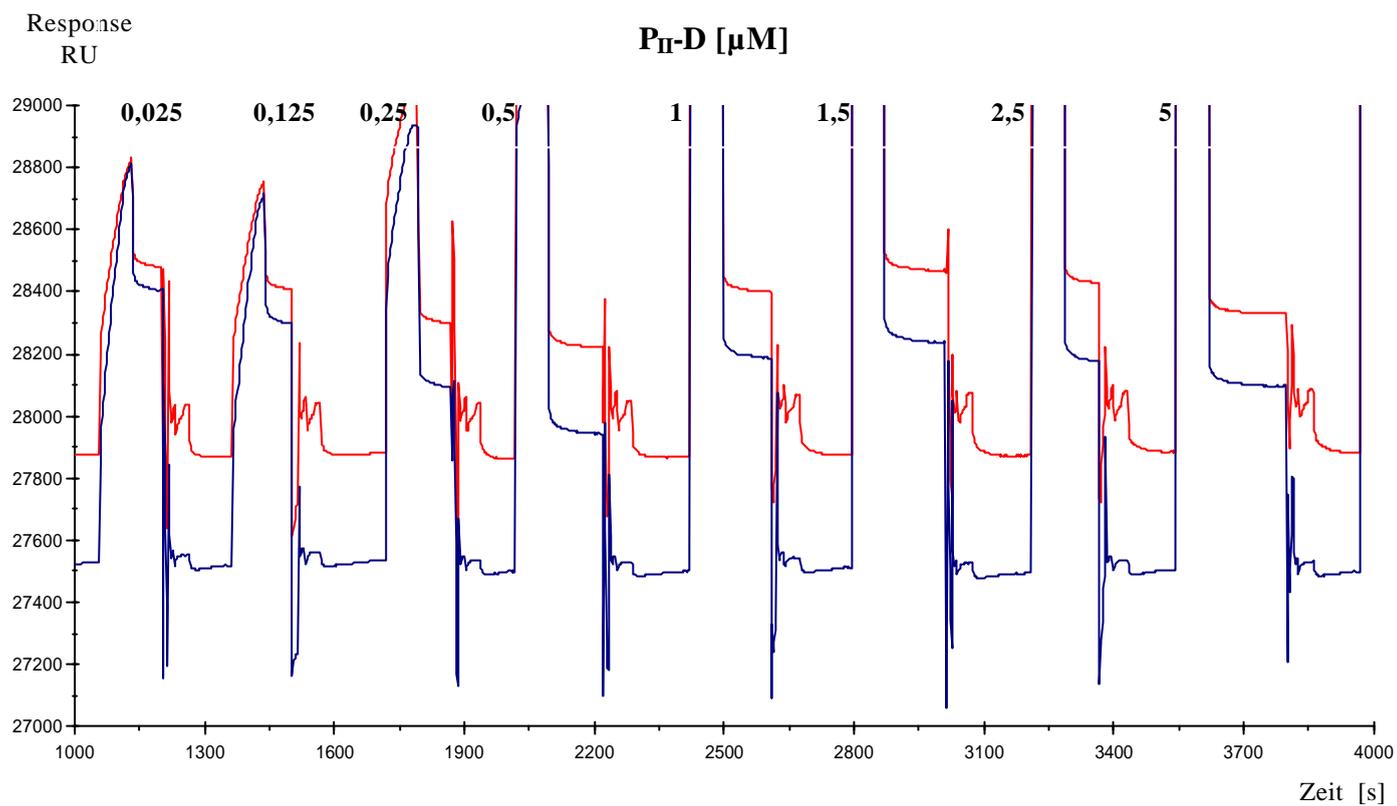


Anhang 9. In Anwesenheit von Mg^{2+} und ATPResponse
RUDifferenz
RU

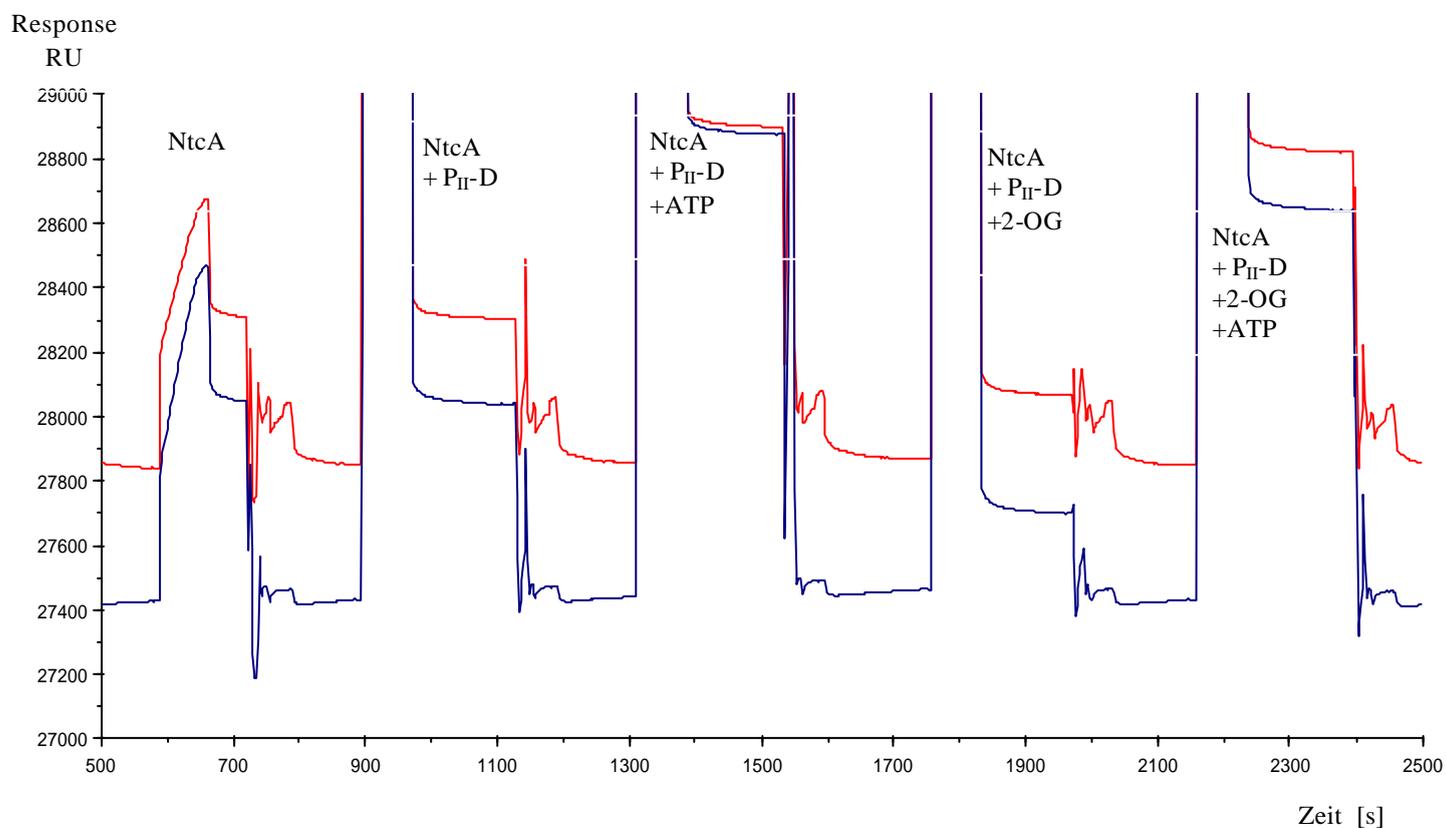
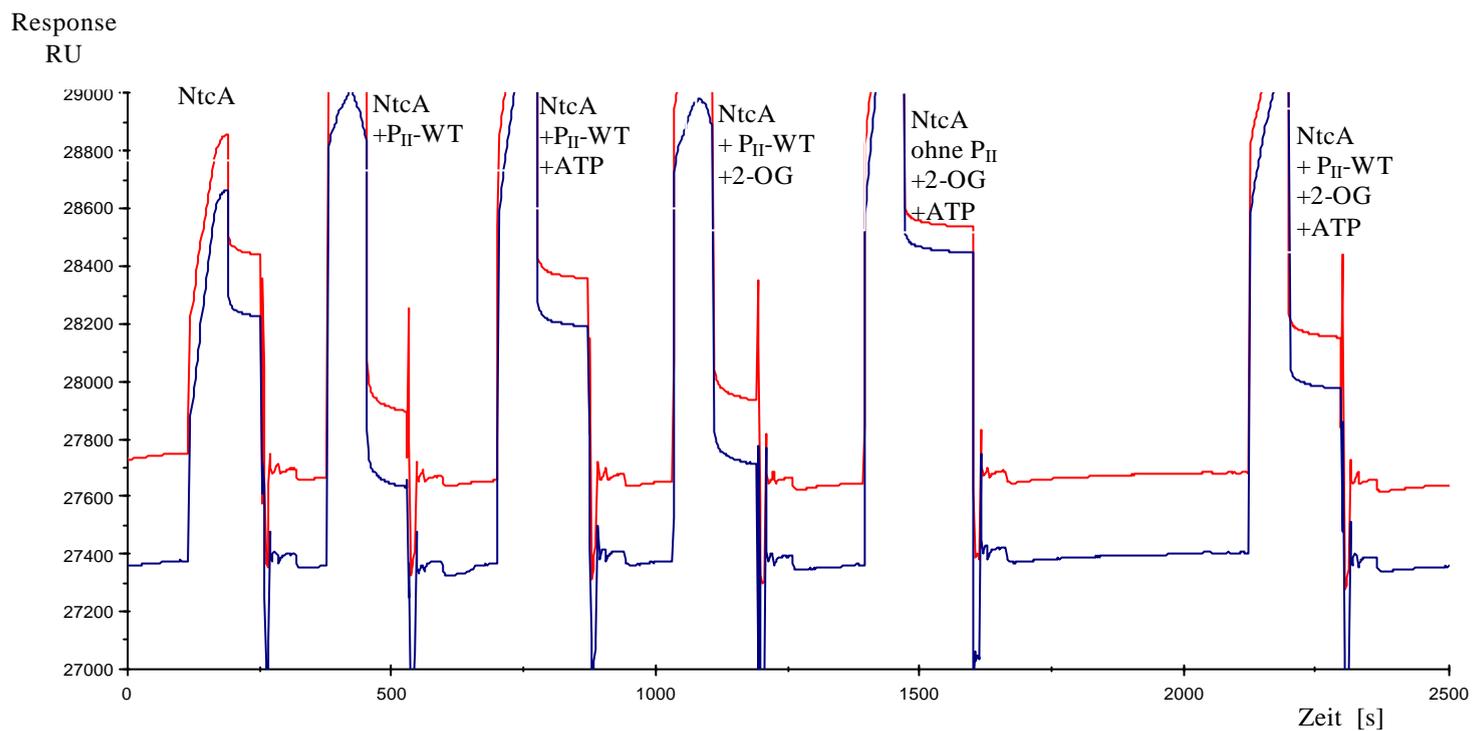
Anhang 10



Anhang 11



Anhang 12



Literaturverzeichnis

A

Aichi M, Omata T. (1997)

Journal of Bacteriology. Aug 1997;179(15):4671-5.

Agrawal GK, Asayama M, Shirai M. (1997)

FEMS Microbiol Lett. 1997 Feb 1;147(1):139-45

Aldehni M. F, J.Sauer, C. Spielhaupter, R. Schmid, and K. Forchhammer (2003)

Journal of Bacteriology, April 2003, p. 2582-2591, Vol. 185, No. 8

Andersson CR, Tsinoremas NF, Shelton J, Lebedeva NV, Yarrow J, Min H, Golden SS.

Methods Enzymol. 2000;305:527-42

Arcondeguy T, Jack R, Merrick M (2001)

Microbiology and Molecular biology Reviews, Mar. 2001, p. 80–105

Asayama M, Hayasaka Y, Kabasawa M, Shirai M, Ohyama A. (1999)

J Biochem (Tokyo). 1999 Mar;125(3):460-8

Asayama M, Kato H, Shibato J, Shirai M, Ohyama T. (2002)

Nucleic Acids Res. 2002 Nov 1;30(21):4658-66

Asayama M, Imamura S, Yoshihara S, Miyazaki A, Yoshida N, Sazuka T, Kaneko T, Ohara O, Tabata S, Osanai T, Tanaka K, Takahashi H, Shirai M. (2004)

Biosci Biotechnol Biochem. 2004 Mar;68(3):477-87

Atkinson MR, Kamberov ES, Weiss RL, Ninfa AJ. (1994)

J. Biol. Chem. 1994 Nov 11;269(45):28288-93

Atkinson MR, Ninfa AJ. (1998)

Mol. Microbiol. 1998 Jul;29(2):431-47

Atkinson MR, Ninfa AJ. (1999)

Mol. Microbiol. 1999 Apr;32(2):301-13.

B

Behrmann I, Hillemann D, Puhler A, Strauch E, Wohlleben W. (1990)

Journal of Bacteriology 1990 Sep;172(9):5326-34.

Bohannon DE, Rosenkrantz MS, Sonenshein AL. (1985)

J Bacteriol. 1985 Sep;163(3):957-64

Botsford J. L. and Thomas A. Lewis. (1990)

Applied and Environmental Microbiology 56,488–494

Boyer, H.W. and D. Roulland-Dussoix (1969).
J. Mol. Biol. 41: 459-465

Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short. (1987).
BioTechniques 5:376–379.

C

Carlson und Chlem 1986
Nature (London) 322: 268-570

D

Domínguez. M. G, José C. Reyes and Francisco J. Florencio. (2000)
Molecular Microbiology March 2000-Volume 35 Issue 5 Page 1192

Dominguez and J. Florencio (1997)
Plant Molecular Biology 35: 723–734, 1997.

Donald, R. G. K., J. LaPointe, and R. A. Ludwig. (1988)
synthase. J. Bacteriol. 170:1197–1204.

E

Elhai J, Vepritskiy A, Muro-Pastor AM, Flores E, Wolk CP (1997)
J. Bacteriol. 1997 Mar;179(6):1998-2005

F

Figurski DH, Helinski DR (1979)
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Apr;76(4):1648-52

Forchhammer, K., and Tandeau de Marsac, N. (1994)
J Bacteriol. 1994 January; 176(1): 84–91

Forchhammer, K., and Tandeau de Marsac, N. (1995)
J. Bacteriol. 177: 5812-5817

Forchhammer K, Hedler A (1997)
Eur J Biochem. 1997 Mar 15;244(3):869-75

G

Golden S. S, Brusslan J, Haselkorn R (1987)
Methods Enzymol. 1987;153:215-31

Golden S. S, M S Nalty, and D S Cho (1989)
J Bacteriol. 1989 January; 171(1): 24–29

Goodman HJ, Woods DR. (1993)
J. Gen Microbiol. 1993 Jul;139(7):1487-93.

Görl M, Sauer J, Baier T, Forchhammer K (1998)
Microbiology. 1998 Sep;144 (Pt 9):2449-58

Grodberg J, Dunn JJ. (1988)
J Bacteriol. 1988 Mar;170(3):1245-53

Gunnarsson L, Petronis S, Kasemo B, Xu H, Bjerneld J, Käll M (1999)
NanoStructured Materials 1999; 12: 783-788

H

Hanahan D. (1983)
J Mol Biol 166: 557-561

Harrison MA, Keen JN, Findlay JB, Allen JF. (1990)
FEBS Lett. 1990 May 7;264(1):25-8.

Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E (2001)
J Bacteriol. 2001 Jan;183(2):411-25

Hilgert, U., Schell, J. & de Bruijn, F. J. (1987)
Mol Gen Genet 210, 195-202

Hill RT, Parker JR, Goodman HJ, Jones DT, Woods DR. (1989)
J. Gen. Microbiol. 1989 Dec;135(12):3271-9

J

Jaggi R, van Heeswijk WC, Westerhoff HV, Ollis DL, Vasudevan SG (1997)
EMBO J. 1997 Sep 15;16(18):5562-71

Jiang F, Wisen S, Widersten M, Bergman B, Mannervik B. (2000)
J Mol Biol. 2000 Aug 25;301(4):783-93

Jiang P, P Zucker, M R Atkinson, E S Kamberov, W Tirasophon, P Chandran, B R Schefke, and A J Ninfa (1997)
J Bacteriol. 1997 July; 179(13): 4342–4353.

Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ (1998)
Biochemistry. 1998 Sep 15;37(37):12782-94.

Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ (1998a)
Biochemistry. 1998 Sep 15;37(37):12795-801

Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ (1998b)
Biochemistry. 1998 Sep 15;37(37):12802-10

Jiang P and Ninfa AJ. (1999)
J Bacteriol. 1999 March; 181(6): 1906–1911

Jose CL, Garcia-Dominguez M, Florencio FJ
Mol Microbiol. 1998 Dec;30(5):1101-12

K

Kamberov ES, Atkinson MR, Ninfa AJ (1995)
J Biol Chem. 1995 Jul 28;270(30):17797-807

Kamberov ES, Atkinson MR, Feng J, Chandran P, Ninfa AJ (1994)
Cell Mol Biol Res. 1994;40(3):175-91

Kennelly PJ, Oxenrider KA, Leng J, Cantwell JS, Zhao N (1993)
J Biol Chem. 1993 Mar 25;268(9):6505-10

Kikuchi H, Aichi M, Suzuki I, Omato T. (1996)
J Bacteriol. 1996 Oct;178(19):5822-5

Kirsch RD, Joly E. (1998)
Nucleic Acids Res. 1998 Apr 1;26(7):1848-50

Kuhlemeier CJ, Thomas AA, van der Ende A, van Leen RW, Borrias WE, van den Hondel CA, van Arkel GA. (1983)
Plasmid. 1983 Sep;10(2):156-63

L

Lea R.J, Milles R, wallsgrovr R.M, and Miflin B.J. (1982)
Elsevier North Holand, new York p. 149-178

Lee HM, Vazquez-Bermudez MF, de Marsac NT. (1999)
J Bacteriol. 1999 May;181(9):2697-702

Lee HM, Flores E, Forchhammer K, Herrero A, Tandeau De Marsac N. (2000)
Eur J Biochem. 2000 Jan;267(2):591-600

Liu J, Magasanik B. (1995)
J Bacteriol. 1995 Feb;177(4):926-31

Luque, E Flores and A Herrero. (1994)
EMBO Journal Vol 13, pp.2862-2869

M

Maeda S, Kawaguchi Y, Ohe TA, Omata T. (1998a)
J Bacteriol. 1998 Aug;180(16):4080-8

Maeda S, Okamura M, Kobayashi M, Omata T. (1998b)
J. Bacteriol. 1998 Dec;180(24):6761-3

Maheswaran M, Urbanke C, Forchhammer K. (2004)
J. Biol Chem. 2004 Dec 31;279(53):55202-10. Epub 2004 Oct 22

Manco G, Rossi M, Defez R, Lamberti A, Percuoco G, Iaccarino M. (1992)
J. Gen. Microbiol. 1992 Jul;138(7):1453-60

Mandal AK and S Ghosh. (1993)
J Bacteriol. 1993 December; 175(24): 8024–8029

Meeks JC, Elhai J. (2002)
Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Mar;66(1):94-121

Merida A, Candau P, Florencio FJ. (1991)
J. Bacteriol. 1991 Jul;173(13):4095-100

Merrick MJ. (1982)
Nature. 1982 Jun 3;297(5865):362-3

Merrick MJ, Edwards RA. (1995)
Microbiol Rev. 1995 Dec;59(4):604-22

Michel KP, Pistorius EK, Golden SS. (2001)
J Bacteriol. 2001 Sep;183(17):5015-24

Miller JH,
In Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory
Press, New York

Muhlenhoff U, Chauvat F. (1995)
Mol. Gen. Genet. 1996 Aug 27;252(1-2):93-100

Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ. (2001)
J Biol Chem. 2001 Oct 12;276(41):38320-8. Epub 2001 Jul 30

N

Ninfa AJ, Magasanik B. (1986a)
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Aug;83(16):5909-13

Ninfa AJ, Ueno-Nishio S, Hunt TP, Robustell B, Magasanik B. (1986b)
J. Bacteriol. 1986 Nov;168(2):1002-4

Ninfa AJ, Bennett RL. (1991)
J. Biol. Chem. 1991 Apr 15;266(11):6888-93

Ninfa EG, Atkinson MR, Kamberov ES, Ninfa AJ. (1993)
J. Bacteriol. 1993 Nov;175(21):7024-32

O

Omata T, Andriesse X, Hirano A. (1993)
Mol Gen Genet. 1993 Jan;236(2-3):193-202

P

- Parkinson JS, Kofoed EC.** (1992)
Annu Rev Genet. 1992;26:71-112
- Parkinson JS.** (1993)
Cell. 1993 Jun 4;73(5):857-71
- Paz-Yepes J, Flores E, Herrero A.** (2003)
FEBS Lett. 2003 May 22;543(1-3):42-6
- Porter RD.** (1986)
Crit. Rev. Microbiol. 1986;13(2):111-32

R

- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ.** (1997)
J Bacteriol. 1997 Apr;179(8):2678-89
- Romero J.M., Lara C and Guerrero M.G.** (1985)
Arch.Biochem. and Biophys. 237: 396-401

S

- Sambrook j, Fritsch EF, Maniatis T** (1989),
Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd end. Cold Spring Harbor
Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1989)
- Sanders DA, Gillece-Castro BL, Burlingame AL, Koshland DE Jr.** (1992)
J Bacteriol. 1992 Aug;174(15):5117-22
- Sauer J, Görl M, Forchhammer K.** (1999)
Arch. Microbiol. 1999 Oct;172(4):247-55
- Sauer J, Dirmeier U, Forchhammer K.** (2000)
J. Bacteriol. 2000 Oct;182(19):5615-9
- Shibata M, Ohkawa H, Kaneko T, Fukuzawa H, Tabata S, Kaplan A, Ogawa T.** (2001)
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 25;98(20):11789-94. Epub 2001
Sep 18
- Stanier RY, Cohen-Bazire G.** (1977)
Annu. Rev. Microbiol. 1977;31:225-74
- Stewart. Richard C, Ricaele VanBruggen, Dolph D. Ellefson, and Alan J. Wolfe.** (1998)
Biochemistry 1998, 37, 12269-12279
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM.** (1989)
Microbiol Rev. 1989 Dec;53(4):450-90
- Szabo A, Stolz L, Granzow R.** (1995)
Curr Opin Struct Biol. 1995 Oct;5(5):699-705

T**Tabor S, Richardson CC.** (1985)

Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Feb;82(4):1074-8

Tanigawa R, Shirokane M, Maeda Si S, Omata T, Tanaka K, Takahashi H. (2002)

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 2;99(7):4251-5.

Tsinoremas NF, Castets AM, Harrison MA, Allen JF, Tandeau de Marsac N. (1991)

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jun 1;88(11):4565-9

V**Van Heeswijk WC, Hoving S, Molenaar D, Stegeman B, Kahn D, Westerhoff HV.** (1996)

Mol Microbiol. 1996 Jul;21(1):133-46.

Vazquez-Bermudez MF, Herrero A, Flores E. (2002 a)

FEBS Lett. 2002 Feb 13;512(1-3):71-4

Vazquez-Bermudez MF, Flores E, Herrero A. (2002 b)

Biochim Biophys Acta. 2002 Oct 11;1578(1-3):95-8

Vega-Palas MA, Madueno F, Herrero A, Flores E. (1990)

J Bacteriol. 1990 Feb;172(2):643-7

Vega-Palas MA, Flores E, Herrero A. (1992)

Mol Microbiol. 1992 Jul;6(13):1853-9

W**Weiss V, Magasanik B.** (1988)

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Dec;85(23):8919-23

Wisén S, Jiang F, Bergman B, Mannervik B. (1999)

Protein Expr. Purif. 1999 Dec;17(3):351-7

Wolk CP. (1973)

Bacteriol Rev. 1973 Mar;37(1):32-101

Wray LV Jr, Ferson AE, Rohrer K, Fisher SH. (1996)

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20;93(17):8841-5

Wray LV Jr, Zalieckas JM, Ferson AE, Fisher SH. (1998)

J Bacteriol. 1998 Jun;180(11):2943-9.

Y**Yamashita MM, Almasy RJ, Janson CA, Cascio D, Eisenberg D**

J Biol Chem. 1989 Oct 25;264(30):17681-90.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Karl Forchhammer, der mir die Chance gab, bei ihm die Dissertation zu verfassen und viel über die biochemischen und molekularen Methoden zu lernen. Insbesondere bin ich ihm zu Dank verpflichtet, da er mir gegenüber immer sehr geduldig und hilfsbereit war.

Frau Prof. Dr. Gabriele Klug und ihrer Arbeitsgruppe danke ich sehr herzlich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Noelia und Ulrike, die mich bei technischen und methodischen Problemen immer wieder unterstützten.

Mir eine unersetzliche Hilfe war Annette bei der Laborarbeit und bei der Korrektur der Dissertation. Vielen Dank dafür, dass sie für mich immer da war, insbesondere in den schwierigeren Momenten meiner Arbeit.

Danke an Mani, Nicole, Kathrin, Grit, Carmen, Elvira und Miriam für die angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Nikole danke ich insbesondere für ihre moralische Unterstützung und für ihre netten Worte, die mir oft den Mut wiedergaben, weiter zu arbeiten.

Meinem Freund Hassan danke ich für seine Hilfe bei der mühevollen Arbeit mit der deutschen Sprache. Wir haben dabei oft gelacht.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Muna und Samir, die mich ermutigt haben, in Deutschland zu promovieren. Ohne ihre Hilfe und ihre unermüdliche Unterstützung wäre meine Arbeit in Deutschland unmöglich gewesen.

Meinem Zwillingbruder Shadi danke ich für die moralische und finanzielle Hilfe. Wie oft musste er sich geduldig meine Beschwerden in den schwierigen Momenten der Dissertation anhören.

Meiner Freundin Laura kann ich nicht genug dafür danken, dass sie mit mir das Leben und den einfachen Alltag im Wohnheim in Gießen teilt.