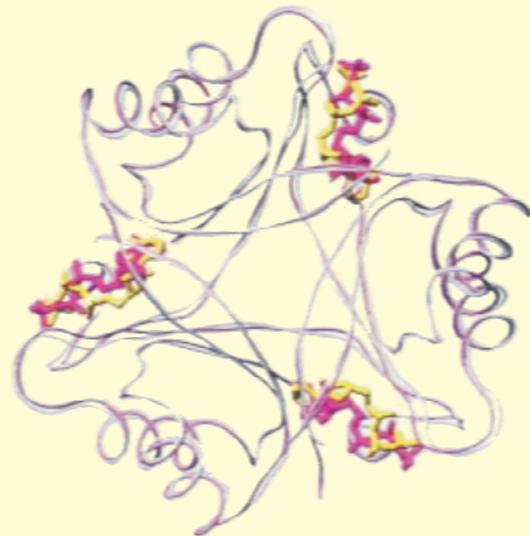


ANNETTE HEINRICH

**Interaktionen von P_{II}-Signaltransduktionsproteinen
im Stickstoffmetabolismus der Organismen
Bacillus subtilis und *Synechococcus elongatus***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
beim Fachbereich Biologie u. Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



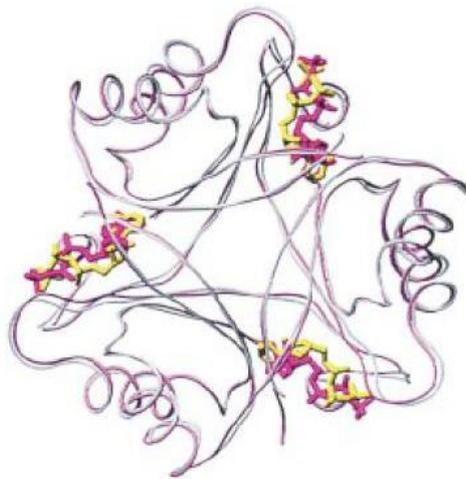
VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Interaktionen von P_{II}-Signaltransduktionsproteinen
im Stickstoffmetabolismus der Organismen
Bacillus subtilis und *Synechococcus elongatus***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorsgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie
am Institut für Mikro- und Molekularbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von

Annette Heinrich

aus Düsseldorf

Gießen, August 2005

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl Forchhammer

2. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud

Tag der Disputation: 11. Oktober 2005

Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.

Albert Einstein (1879-1955)

A. Einleitung	1
1. Bedeutung des Stickstoffs	1
2. Das P_{II}-System	2
2.1. Biochemie der P _{II} -Proteine	3
2.2. Ligandenbindung	4
2.3. Modifikation	6
2.4. Funktionsvielfalt der P _{II} -Proteine	7
3. <i>Bacillus subtilis</i>	9
3.1. Systematik und Physiologie	9
3.2. Stickstoffregulierung in <i>B. subtilis</i>	11
4. Cyanobakterien	15
4.1. Verbreitung und ökologische Bedeutung	15
4.2. Stickstoff-Stoffwechsel	15
4.2.1. Stickstoff-Assimilation in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	16
4.2.2. P _{II} -Signaltransduktion in Cyanobakterien	17
4.2.3. Cyanophycin	18
4.3. Arginin-Biosynthese	19
5. Allgemeine Fragestellung	21
5.1. <i>Bacillus subtilis</i> GlnK	21
5.2. <i>Synechococcus elongatus</i> GlnB	21
B. Material und Methoden	22
1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	22
1.1. Bakterienstämme	22
1.2. Vektoren	22
1.3. Verwendete Oligonukleotide	25
2. Kultivierung von Bakterien	26
2.1. <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.1. Nährmedium und Anzuchtbedingungen	26
2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	26
2.2.1. Nährmedium	26
2.2.2. Anzuchtbedingungen	27
2.2.3. Ernten der Zellen	27

3. Puffer und Reagenzien	28
3.1. Laufpuffer	28
3.2. Auftragspuffer	28
3.3. Blotting-Puffer für <i>semi-dry-blot</i>	29
3.4. Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterienstämme	29
3.5. Zellaufbruchpuffer	30
3.6. Puffer für säulenchromatographische Auftrennungen	31
3.7. Puffer für Enzymaktivitätstests	33
3.8. Puffer für Immunopräzipitation	33
3.9. Puffer für In-Gel Trypsinverdau	34
3.10. Puffer für Ligandenbindungstests/ <i>UV-Crosslinking</i>	34
3.11. Lagerpuffer	34
3.12. Färbelösungen für SDS-Polyacrylamidgele	35
3.13. Sonstige Puffer	35
3.14. Standards	36
4. Enzyme und Chemikalien	36
5. Molekularbiologische Methoden	36
5.1. DNA-Isolierung	36
5.2. Bestimmung der DNA-Konzentration	37
5.3. Amplifikation von DNA durch Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)	37
5.4. DNA-Aufreinigung nach PCR und anderen enzymatischen Reaktionen (<i>QIAquick PCR Purification Kit</i> , Qiagen)	38
5.5. DNA-Präparation aus Agarosegelen (Qiagen, <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>)	38
5.6. Restriktionen	39
5.7. Ligationen	39
5.8. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	39
5.9. Sequenzierung	39
5.10. Transformationsverfahren	39
5.11. Herstellung von Glycerin-Kulturen	40
5.12. Herstellung von radioaktiv-markierter DNA (<i>5'-Endlabelling</i>)	41
6. Analytische Methoden	41
6.1. Bestimmung der Zelldichte	41
6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)	41
6.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	42

7. Färbemethoden für SDS-PAGEs	43
7.1. Silberfärbung nach Blum <i>et al.</i> , 1987	43
7.2. Coomassie-Färbung	44
7.3. Färbung mit Sypro [®] -Orange (Bio-Rad)	44
8. Zellaufbruchsmethoden	44
8.1. Zellaufbruch im RiboLyser	44
8.2. Zellaufbruch mittels <i>French-Press</i>	45
9. Proteinfractionierungsmethoden	45
9.1. Zentrifugation	45
9.2. Ammoniumsulfat-Fällung	45
9.3. β -Mercaptoethanol-Fällung	45
9.4. Präparation von Membranfraktionen	46
10. Entsalzung und Umpufferung	46
11. Chromatographische Methoden	46
11.1. Affinitätschromatographie	47
11.2. Gelfiltrationschromatographie	47
11.3. Ionenaustauschchromatographie	47
11.4. Hydrophobe Interaktionschromatographie	47
11.5. <i>Strep-tag Pulldown Assay</i>	47
12. Proteinaufreinigung	47
12.1. Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i> TnrA	47
12.2. Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i> GlnK- <i>Strep-tag</i> (GlnK-ST)	48
12.3. Reinigung von <i>Synechococcus elongatus</i> ArgB (NAG-Kinase)	49
13. Bestimmung des Molekulargewichtes	49
13.1. Eichung der Gelfiltrationssäule	49
13.2. Gelfiltration von Proteinen	50
14. Immunologische Methoden	50
14.1. Immunoblotanalyse (<i>Western Blot</i>)	51
14.2. Dot Blot-Methode	52
14.3. Immunopräzipitation	52
15. Tryptischer In-Gel Verdau	53
16. Massenspektroskopie (MALDI-TOF)	54
17. Elektrospray-Ionisierungsmassenspektrometrie (ESI-MS)	55

18. Ligandenbindung – UV-Crosslink mit ATP/ADP an GlnK	55
19. Gelshift-Experimente	56
20. Enzymaktivitätstests	56
20.1. Glutamin-Synthetase (Biosynthetischer Test)	56
20.2. N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase (NAG-Kinase)	57
21. BIAcore Surface Plasmon Resonance Detection	58
C. Ergebnisse	59
I. <i>Bacillus subtilis</i> GlnK	59
1. Biochemische und physiologische Eigenschaften des <i>B. subtilis</i> GlnK-Proteins	59
1.1. Bindung von [γ - 32 P]ATP und [8 - 14 C]ADP an GlnK	59
1.2. Zelluläre Lokalisation von <i>B. subtilis</i> GlnK	61
1.3. Modifizierung von <i>B. subtilis</i> GlnK	63
1.3.1. Aufreinigung von nativem GlnK aus <i>B. subtilis</i>	64
1.3.2. Aufreinigung von überproduziertem GlnK-ST in <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	68
1.3.2.1. Aufreinigung von GlnK-ST aus <i>B. subtilis</i>	68
1.3.2.2. Aufreinigung von GlnK-ST aus <i>E. coli</i>	70
1.3.3. Elektrospray-Ionisierungsmassenspektrometrie (ESI-MS)	73
1.3.4. Immunopräzipitation von <i>B. subtilis</i> GlnK und Massenspektroskopie	74
2. Interaktion zwischen TnrA und GlnK in <i>B. subtilis</i>	76
2.1. Konstruktion des Plasmids pT7-TNRA	76
2.2. Überexpression und Aufreinigung von TnrA	77
2.2. <i>Gel electrophoretic mobility shift assay</i> (GEMSA)	81
2.3. Co-Immunopräzipitation von TnrA und GlnK	84
2.4. Co-Lokalisation von TnrA und GlnK	86
2.5. ATP/ α -Ketoglutarat-Effekt auf den GlnK-TnrA-Komplex	88
2.6. TnrA-Lokalisation in Abwesenheit von Stickstoff	89
2.7. Klonierung einer <i>glnH</i> -defizienten Mutante	90
3. Interaktion zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase	92
3.1. Konstruktion des Vektors pET-TnrA	92
3.2. TnrA beeinflusst die Glutamin-Synthetase-Aktivität durch Protein-Interaktion	93
II. <i>Synechococcus elongatus</i> N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase	100
1. Aufreinigung	100
2. Komplexbildung zwischen P_{II} und NAG-Kinase	105

3. P_{II} beeinflusst die NAG-Kinase Aktivität	106
4. Eigenschaften des NAG-Kinase-P_{II}-Komplexes	108
4.1. Bestimmung des Molekulargewichtes	108
4.2. Effekt der P _{II} -Liganden α -Ketoglutarat und ATP auf die Komplexbildung	111
4.3. Die Rolle des P _{II} Serin 49 in der NAG-Kinase-P _{II} -Interaktion	113
4.4. Feedback-Hemmung der NAG-Kinase-Aktivität durch Arginin und deren partielle Aufhebung durch Komplexbildung mit P _{II}	115
D. Diskussion	117
1. <i>Bacillus subtilis</i>	117
2. <i>Synechococcus elongatus</i>	127
E. Zusammenfassung	134
1. <i>Bacillus subtilis</i>	134
2. <i>Synechococcus elongatus</i>	134
F. Literaturangabe	135
G. Abkürzungsverzeichnis	150
Danksagung	154

A. Einleitung

1. Bedeutung des Stickstoffs

Stickstoff ist eines der wichtigsten Nährstoffe für alle bekannten Lebensformen. Er wird benötigt, um eine Vielzahl an lebensnotwendigen Bausteinen aufzubauen, wie z. B. Aminosäuren, Nukleotide oder Aminozucker. Der Reichtum an Stickstoffquellen reicht von Ammonium (NH₄) bis zu atmosphärischem Stickstoff (N₂). Ammonium stellt immer die bevorzugte Stickstoffquelle dar, da es direkt in Glutamat und weiter in Glutamin, den entscheidenden Donoren für biosynthetische Reaktionen, überführt werden kann. Aminosäuren hingegen müssen, wenn sie als Stickstoffquelle dienen, erst zu Ammonium degradiert und anorganische Quellen, wie z.B. Nitrat (NO₃), Nitrit (NO₂) und N₂ zu Ammoniak (NH₃) reduziert werden (Reitzer, 1996). Prototrophe Organismen sind in der Lage, Stickstoff aus anorganischen Verbindungen zu assimilieren.

Für die Umwandlung des Stickstoffs, genauer gesagt von Ammonium, in Glutamin und Glutamat gibt es zwei Hauptassimilationswege. Der wichtigste Assimilationsweg ist der **Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Amido-Transferase-Weg** (GS/GOGAT). Die Glutamin-Synthetase katalysiert dabei die Umwandlung von Glutamat und Ammonium zu Glutamin. Dabei wird unter ATP-Verbrauch durch die Glutamin-Synthetase Ammonium auf die Carboxylgruppe von Glutamat transferiert.

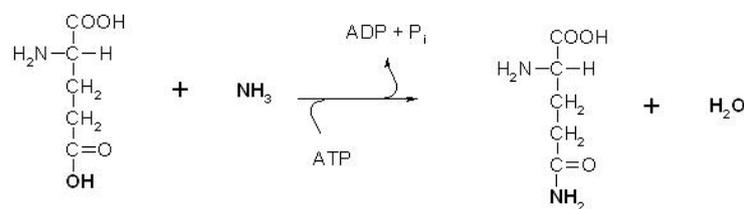


Abbildung A.1.: Katalysierte Reaktion der Glutamin-Synthetase (GS).

Durch die Glutamat-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) wird die Amidogruppe des soeben entstandenen Glutamins auf α -Ketoglutarat übertragen. Bei dieser Reaktion entstehen zwei Moleküle Glutamat. Die für diese Reaktion notwendigen Elektronen werden ebenfalls durch reduziertem Ferredoxin aus der Photosynthese bereitgestellt.

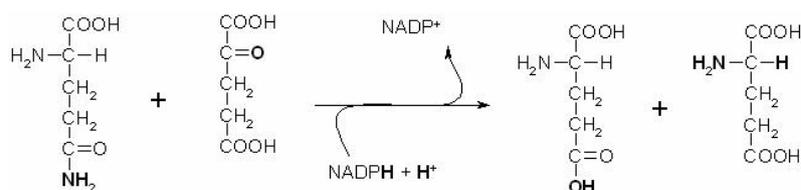


Abbildung A.2.: Katalysierte Reaktion der Glutamat-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT).

Anschließend wird eines der beiden entstandenen Moleküle Glutamat wieder innerhalb des GS/GOGAT-Zyklus aminiert, wodurch netto aus je einem Molekül Ammonium und α -Ketoglutarat ein Molekül Glutamat entsteht.

In vielen Bakterien, z.B. bei den Enterobakterien, gibt es außerdem einen alternativen Assimilationsweg, den Glutamat-Dehydrogenase-Weg. Bei dieser NADPH-abhängigen Reaktion wird die Umwandlung von α -Ketoglutarat und Ammonium zu Glutamat durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert. Während die Glutamat-Dehydrogenase energetisch effizienter als die GS/GOGAT arbeitet, besitzt es eine geringere Affinität für Ammonium (K_M von ca. 1 mM) und ist daher in Zellen, die stickstofflimitierenden Bedingungen ausgesetzt sind, nicht aktiv.

In natürlichen Ökosystemen ist allerdings die biologische Verfügbarkeit von verwertbaren Stickstoffverbindungen sehr oft ein limitierender Wachstumsfaktor. Daher haben Organismen hoch effektive Systeme entwickelt, um Stickstoff assimilieren zu können. Des Weiteren wird diese effektive Aufnahme der seltenen und kostbaren Ressource durch ein System selektiver Nutzung verschiedener Stickstoffquellen gesichert. Dieses System erlaubt es, dass Stickstoffquellen, die mit wenig Energieverlust aufgenommen werden können, den Quellen, die mit hohen Kosten verbunden sind, vorgezogen werden. Diese Kontrolle erlaubt so optimales Wachstum der Organismen und sichert ihnen eine gefestigte Position in dem natürlichen Konkurrenzkampf um limitierende Ressourcen.

2. Das P_{II}-System

Ein zentrales Regulationssystem der Stickstoffassimilation basiert auf der Familie der P_{II}-Proteine. Die Familie der P_{II}-Proteine, bestehend aus den Protein-Unterfamilien GlnB, GlnK und Nifl, agiert durch Aufnahme und Weiterleitung von Signalen, die den zellulären Stickstoffstatus betreffen (Arcondeguy *et al.*, 2001). Sie gehören zu den am höchst konserviertesten und am weit verbreitetsten Signaltransduktionsproteinen. P_{II}-Proteine sind sowohl in Bakterien (Arcondeguy *et al.*, 2001), Archaeen (Kessler *et al.*, 2001, Ehlers *et al.*, 2005) als auch in den Chloroplasten von eukaryotischen Algen und Pflanzen (Moorhead und Smith, 2003) zu finden, was die weitreichende biologische Rolle dieser Proteine um so mehr verdeutlicht.

Auffällig ist außerdem, dass P_{II}-Proteine in vielen Pathogenen fehlen (z.B. *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, Mycoplasmen, Chlamydien und Rickettsien). Durch die Fähigkeit dieser Organismen, die Stickstoffreserven ihrer Wirte für sich zu nutzen, ist es für sie nicht notwendig, ihren intrazellulären Stickstoffstatus zu kontrollieren.

Das P_{II}-Protein wurde das erste Mal 1969 bei der Analyse der Glutamin-Synthetase-Regulation in *E. coli* entdeckt. Da es als zweiter Peak eines Gelfiltrationslaufes von der Gelfiltrationssäule eluierte, erhielt es die Bezeichnung P_{II} (Shapiro, 1969). Dieses P_{II}-Protein wurde mit GlnB bezeichnet. 1995 wurde in *E. coli* ein zweites P_{II}-Paralog entdeckt, welches die Bezeichnung GlnK erhielt (van Heeswijk *et al.*, 1995 und 1996).

2.1. Biochemie der P_{II}-Proteine

Die Proteine der P_{II}-Familie bestehen aus ca. 110 bis 120 Aminosäuren und sind über ihre gesamte Sequenz hoch konserviert. Die molekulare Masse der P_{II}-Proteine liegt bei ca. 12,5 kDa. Durch Kristallisationsstudien, Sedimentationsgleichgewichts- und Gelfiltrationsexperimente konnte gezeigt werden, dass P_{II}-Proteine als Trimere vorliegen (Abb. A.3.) (de Mel *et al.*, 1994; Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994; Cheah *et al.*, 1994, eigene Diplomarbeit, 2002).

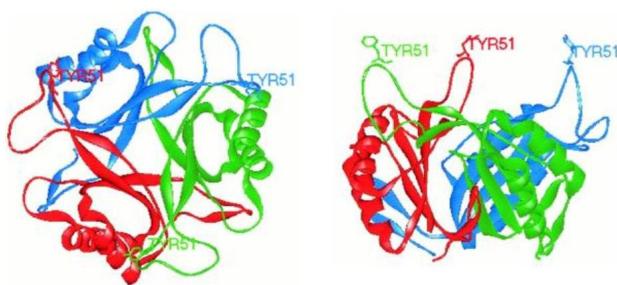
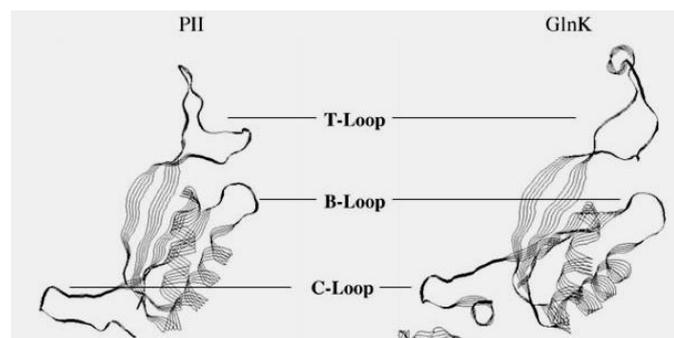


Abbildung A.3.: Struktur des *E. coli* GlnB-Trimers. Die linke Darstellung zeigt die Ansicht von oben, die rechte die Ansicht von der Seite. Die einzelnen Monomere sind durch die Farben Rot, Grün und Blau hervorgehoben (entnommen aus Xu *et al.*, 1998).

Ein *E. coli* GlnB-Monomer besteht aus zwei α -Helices und sechs β -Faltblättern. Diese sind so angeordnet, dass die beiden α -Helices und die β -Faltblätter 1 bis 4 ein doppeltes $\beta\alpha\beta$ -Motiv bilden, das durch eine große Schleife (Gly-37 bis Phe-55) verbunden ist. Diese Schleife wird als *T-loop* bezeichnet, da an der Spitze dieser Schleife ein Tyrosin-Rest kovalent modifiziert werden kann (vgl. A.4. und A.6.). Die Aminosäurereste Gln-82 bis Asp-88 bilden eine weitere, kleinere Schleife, den sogenannten *B-loop*, die die zweite α -Helix von dem vierten β -Faltblatt trennt. Die β -Faltblätter 5 und 6 sind in einer dritten Schleife (*C-loop*) am C-Terminus angeordnet. Die Faltblätter 2 und 3, sowie der *C-loop* werden durch Wasserstoffbrücken stabilisiert.

Abbildung A.4.: Strukturvergleich eines *E. coli* GlnB- und GlnK-Monomers. Die Schleifenstrukturen (*T*-, *B*- und *C-loop*) sind gekennzeichnet (entnommen aus Ninfa und Atkinson, 2000).



In der trimeren Struktur sind die Monomere so angeordnet, dass die β -Faltblätter 1 bis 4 auf der einen Seite von dem *T-loop* des zweiten Monomers und auf der anderen Seite vom *C-loop* des dritten Monomers flankiert werden. Aus der Anordnung der Monomere resultiert eine Furche zwischen dem *T-loop* und dem *B-loop* eines Monomers und dem *C-loop* des angrenzenden Monomers. Die sechssträngigen antiparallelen Faltblätter bilden außerdem eine konkave Fläche in der Mitte des Trimers (Cheah *et al.*, 1994; de Mel *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 1996) (vgl. Abb. A.3.).

Die trimere Form des GlnK-Proteins ist der von GlnB sehr ähnlich (Abb. A.4. und A.5.). Allerdings besitzt GlnK zwei verschiedene Konformationen in der Kristallstruktur und die Strukturen der *T-loops* unterscheiden sich im Vergleich zum GlnB durch eine 3_{10} -Helix (Reste 47 bis 49) (MacPherson *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). Der *B-* und *C-loop* unterscheiden sich geringfügig von denen des GlnB-Proteins. Diese Schleifen bilden einen Teil der Furche, die eine wichtige Rolle in der Bindung von Effektormolekülen und Proteinen spielen.

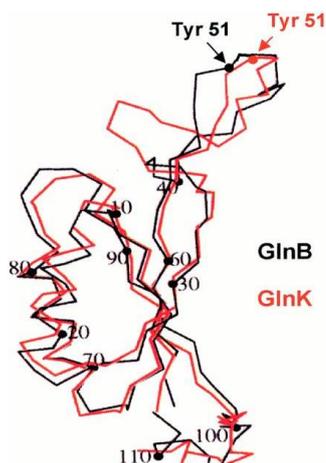
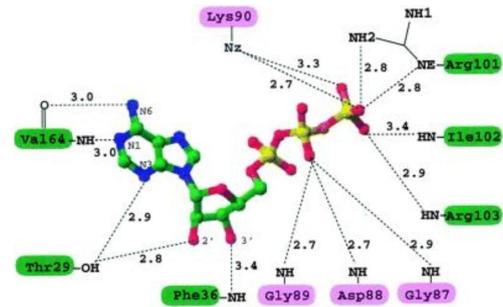


Abbildung A.5. Vergleich der Monomerstrukturen von GlnB und GlnK von *E. coli*. GlnB (schwarz) und GlnK (rot) wurden übereinander gelagert. Die Positionen der Tyrosinreste 51 sind in jedem Molekül hervorgehoben (entnommen aus Xu *et al.*, 1998).

2.2. Ligandenbindung

Die Signalwahrnehmung durch P_{II} findet durch die Bindung von kleinen Effektormolekülen statt, hauptsächlich ATP und α -Ketoglutarat (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Jiang *et al.*, 1998a; Moorhead und Smith, 2003). Co-Kristalle von *E. coli* GlnB und GlnK mit ATP offenbarten drei ATP-Bindestellen in den lateralen Furchen zwischen den Untereinheiten (Xu *et al.*, 1998 und 2001). Das Effektormolekül ATP kommt über die gesamte Länge der Furche mit GlnK in Kontakt und bindet an die Reste beider Untereinheiten (vgl. Abb. A.3.). Die Bindung von ATP und α -Ketoglutarat an die P_{II} -Proteine hängt stark voneinander ab (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Smith *et al.*, 2004). Es stellte sich weiterhin heraus, dass das γ -Phosphat von ATP essentiell für die Interaktion der Effektormoleküle ist (Benelli *et al.*, 2002; Ruppert *et al.*, 2002) (Abb. A.6.).

Abbildung A.6.: Schematische Darstellung der ATP-Interaktionen mit dem *E. coli* P_{II}-Protein. Die Aminosäurereste der unterschiedlichen Monomere sind in grün bzw. violett hervorgehoben (entnommen Xu et al., 2001).



Obwohl die α -Ketoglutarat-Bindestelle bis heute nicht durch Kristallstudien gezeigt worden ist, konnte ein Modell durch Strukturvergleiche mit anderen α -Ketosäure-bindenden Proteine entwickelt werden. Dieses Modell schlägt vor, dass das α -Ketoglutarat in der Furche zwischen *B*- und *C-loop* nahe des γ -Phosphates des ATP binden könnte (Benelli et al., 2002).

Die Konsensussequenz des *B-loops* (Thr-Gly-X-X-Gly-Asp-Gly-Lys-Ile-Phe) ist eine hoch konservierte Region in allen P_{II}-Proteinen, angefangen von Eubakterien, über Archaeen bis hin zu Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass es eine allgemeine Fähigkeit der Proteine der P_{II}-Familie ist, ATP zu binden (vgl. Abb. A.7.).

					<u>T-loop</u>	
Ath	FYKVEAIVRP	WRIQQVSSAL	LKIGIRGVTY	SDVRGFGAQQ	GSTERHGGSE	50
Ppu	MKKIEAII RP	FKLNEVKLAL	VKGGIGGMTV	VKVSQFGRQK	GQTERYKQSE	50
Syn	MKKIEAII RP	FKLDEVKIAL	VNAGIVGMTV	SEVRGFGRQK	GQTERYRGSE	50
Bsu	MFKVEIVTRP	ANFEKLLQEL	GKIGVTSLTF	SNVHCCGLQK	AHTELYRGVK	55
Eco	MKLVTVI IKP	FKLEDVREAL	SSIGIQGITV	TEVKGFGRQK	GHAELYRGAE	50
Mt1	MKEVIAI IRP	NTVSKTVKAL	DVVGFPVATM	AECFGRGKQK	GE-EGEKEGR	49
Ath	FSEDKFVAKV	KMEIVVKKDQ	VESVINTIIE	GARTGEIGDG	KIFVLPVSDV	100
Ppu	YSID-IIDKI	KLEIIVSDDK	VNSITEIIIK	TAKTGEIGDG	KIFISDVEQV	99
Syn	YTVE-FLQKL	KLEIIVVEDAQ	VDTVIDKIVA	AARTGEIGDG	KIFVSPVDQT	99
Bsu	IESN-VYERL	KLEIIVSVKVP	VDQVTETAKR	VLKTGSEFGD	KIFVYEISNT	104
Eco	YSVN-FLPKV	KIDVAIADDQ	LDEVIDIVSK	AAATGKI GDG	KIFVAELQRV	99
Mt1	FIK--YIPKR	LISIVYDDAD	VPLVVGII SK	VNRTGSEFGD	RIFVLPVEEA	97
				<u>B-loop</u>		
Ath	IRVRTGE---	---				107
Ppu	IRIRTNDLNS	AAL				112
Syn	IRIRTGEKNA	DAI				112
Bsu	INIRTGEEGP	EAL				116
Eco	IRIRTGEADE	AAL				112
Mt1	IRVRTGETGE	IAI				110
				<u>C-loop</u>		

Abbildung A.7.: Sequenzvergleich von P_{II}-Proteinen von Bakterien, Archaeen und Eukaryoten. Abkürzungen: Ath: *Arabidopsis thaliana*, Bsu: *Bacillus subtilis*, Eco: *Escherichia coli* GlnK, Mtl: *Methanococcus thermolithotrophicus*, Ppu: *Porphyra purpurea*, Syn: *Synechococcus* PCC6301. Die für die ATP-Bindung relevanten Aminosäuren, die durch Kristallisationsstudien (Xu et al., 2001) ermittelt worden sind, sind mit Kästchen umrandet. Die unterschiedlichen Arten der Linien (durchgezogen und gestrichelt) stehen für jeweils ein Monomer. Des Weiteren sind die Sequenzen der Schleifenstrukturen gekennzeichnet.

2.3. Modifikation

Zusätzlich zu der Fähigkeit der P_{II}-Proteine, Liganden zu binden, können P_{II}-Proteine als Antwort auf einen Wechsel in der Stickstoffverfügbarkeit kovalent modifiziert werden. In allen bisher untersuchten Fällen findet diese Modifikation an einem Aminosäurerest statt, der in der Nähe der Spitze des langen und flexiblen *T-loops* lokalisiert ist (Xu *et al.*, 2003). Unterschiedliche Arten der Modifikation sind bis heute in den verschiedensten Organismen identifiziert worden: In Proteobakterien werden P_{II}-Proteine an dem Tyrosinrest 51 uridyliert (Funktionsweise siehe Abb. A.8.) (Jiang *et al.*, 1998a; Atkinson und Ninfa, 1999).

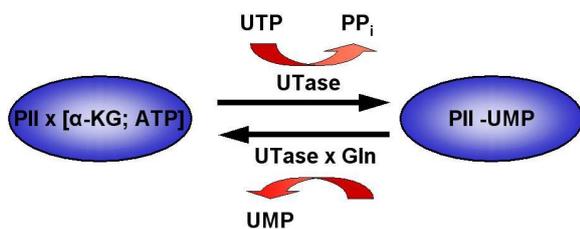


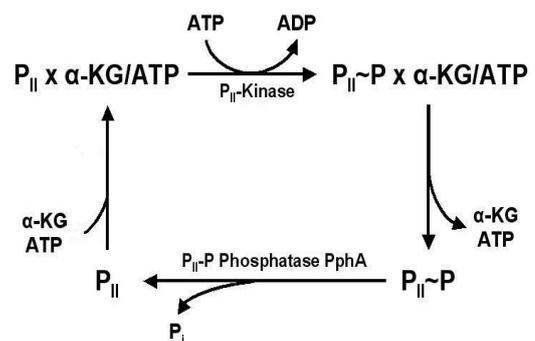
Abbildung A.8.: Funktionsweise der Uridylierung der P_{II}-Proteine in *E. coli*. Bei Stickstoffmangel wird das P_{II}-Monomer durch die Uridyltransferase (UTase) uridyliert. Ist genug Stickstoff vorhanden, bindet Glutamin an die UTase und verändert deren Funktionsweise. Sie agiert nun als Uridylremovase (UR) (nach Arcondeguy *et al.*, 2001).

Das GlnY-Protein von *Azoarcus* sp. BH72 liegt ausschließlich in einem Modifikationszustand, in seinem uridylierten Zustand, vor, unabhängig von der aktuellen Stickstoffverfügbarkeit (Martin *et al.*, 2000).

Dieser hoch konservierte Rest ist auch in Aktinobakterien zu finden. Allerdings wird in *Streptomyces coelicolor* und *Corynebacterium glutamicum* dieser Tyrosin-Rest adenyliert (Hesketh *et al.*, 2002; Strösser *et al.*, 2004).

Obwohl der Prozess der Tyrosin-Modifikation weit verbreitet ist, ist er nicht universell. Das P_{II}-Protein in Cyanobakterien wird im Gegensatz zu den Enterobakterien bei Stickstoffmangel oder Kohlenstoffüberschuss an dem Serinrest 49 phosphoryliert (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994 und 1995) (vgl. Abb. A.9.).

Abbildung A.9.: Schema der Phosphorylierungs-Dephosphorylierung in Cyanobakterien. In Gegenwart von Stickstoffmangel bindet α -KG und ATP an das P_{II}-Monomer. Der gebildete P_{II}-Komplex kann in dieser Form durch die noch unbekannte P_{II}-Kinase phosphoryliert werden. Im Zustand eines Stickstoffüberschusses löst sich α -KG und ATP ab. Das phosphorylierte P_{II} wird so für die P_{II}-Phosphatase PphA angreifbar und kann durch diese dephosphoryliert werden (nach Forchhammer, 1998).



In einigen Organismen scheinen die Proteine der P_{II}-Familie nicht modifiziert zu werden, wie z.B. in Firmibakterien (Wray *et al.*, 1994; Detsch und Stülke, 2003), in dem Cyanobakterium der Gattung *Prochlorococcus* (Palinska *et al.*, 2002) oder in Pflanzen (Moorhead und Smith, 2003; Smith *et al.*, 2004).

2.4. Funktionsvielfalt der P_{II}-Proteine

Abhängig von ihrem Status der Ligandenbindung und Modifikation spielen P_{II}-Proteine eine Schlüsselrolle in der Stickstoff-Assimilierung. P_{II}-Proteine regulieren die Aktivität verschiedenster Rezeptorproteine, die in den Prozess der Stickstoffaufnahme und -verarbeitung involviert sind. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Aufgaben der P_{II}-Proteine gegeben werden. Allerdings sind auf Grund der Komplexität der Regulation des mikrobiellen Stickstoffmetabolismus noch nicht alle Funktionen der P_{II}-Proteine bekannt.

In *E. coli* kontrolliert GlnB die Aktivität des Transkriptionsfaktors NtrC durch Interaktion mit dessen Histidin-Kinase NtrB (Jiang *et al.*, 1998b). Des Weiteren reguliert GlnB die Aktivität der Glutamin-Synthetase (GS) durch Interaktion mit dem Glutamin-Synthetase-modifizierendem Enzym Adenyltransferase (ATase) (Jiang *et al.*, 1998c; Reitzer, 2003) (vgl. Abb. A.10. und A.11.).

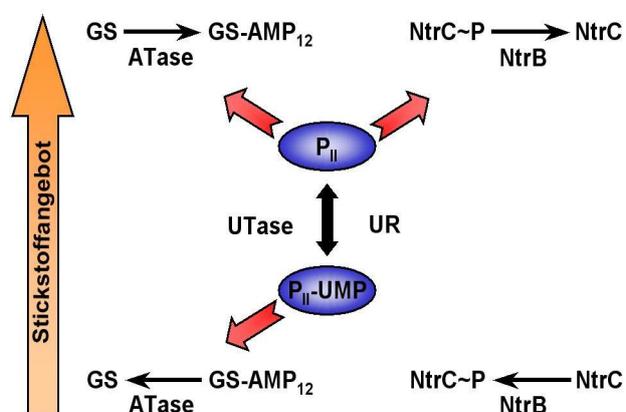


Abbildung A.10.: Stickstoffregulierung durch GlnB in *E. coli*. Die Aktivitäten der Glutamin-Synthetase (GS) und von NtrC werden in Abhängigkeit des intrazellulären Stickstoffangebotes durch GlnB reguliert. Die UTase/UR (GlnD) katalysiert die (De-)Uridylierung von GlnB. Die ATase katalysiert die (De-)Adenylierung der GS. NtrB reguliert die (De-)Phosphorylierung von NtrC (nach Arcondeguy *et al.*, 2001).

Die enterobakterielle Glutamin-Synthetase (GS) des Typs GS_I wird durch *glnA* kodiert und setzt sich aus 12 identischen Untereinheiten zusammen. Diese sind ca. 55 kDa groß und bilden zwei übereinander liegende hexagonale Ringe, die durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen den Untereinheiten zusammen gehalten werden (Yamashita *et al.*, 1989). In einer Vielzahl von Bakterien wird die GS sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene reguliert. In Enterobakterien wird die Glutamin-Synthetase reversibel durch die zweifunktionale Adenyltransferase (GlnE) als Antwort auf das Stickstoffangebot modifiziert (Abb. A.11.) (Shapiro *et al.*, 1968; Foor *et al.*, 1975; Caban und Ginsburg, 1976; Berlett *et al.*, 1998, Forchhammer *et al.*, 1999).

Die Modifizierung ist eine Adenylierung des Tyrosinrestes 397 jeder Untereinheit. Diese erlaubt die progressive Inaktivierung der Glutamin-Synthetase bei steigendem intrazellulärem Stickstoffspiegel. Auf diese Weise beugt die Glutamin-Synthetase einem anhaltenden Abfall der ATP-Konzentrationen vor und schützt den intrazellulären Glutamat-Pool, der für die Physiologie der Zelle enorm wichtig ist (Kustu *et al.*, 1979; Schutt *et al.*, 1972).

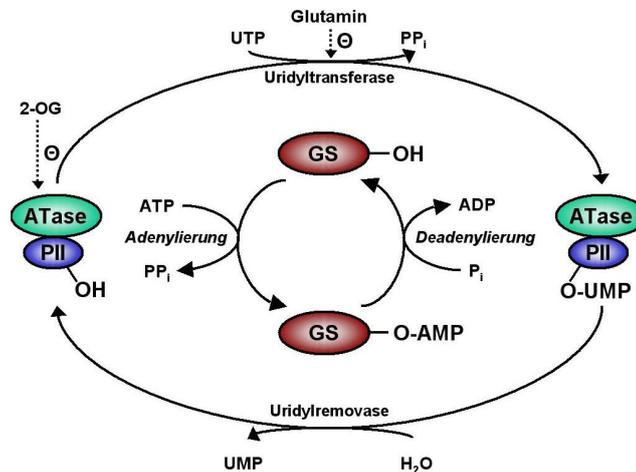


Abbildung A.11.: Regulierung der Glutamin-Synthetase (GS) in *E. coli* in Zusammenhang mit P_{II}. In Gegenwart von ausreichend Stickstoff in der Zelle liegt das P_{II}-Protein unmodifiziert vor und stimuliert in dieser Form die Adenylierung der GS durch die ATase. Es können bis zu zwölf AMP auf die GS übertragen werden. Ist die GS vollständig adenyliert, ist sie nicht mehr aktiv. Fällt der Stickstoffspiegel in der Zelle, wird P_{II} stufenweise uridyliert. P_{II}-UMP aktiviert die deadenylierende Form der ATase, wodurch die GS wieder aktiv wird (nach http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG17_05.jpg).

Des Weiteren ist die Glutamin-Synthetase des Typs GS_I Subjekt einer kumulativen Feedback-Hemmung durch Endprodukte des Glutamin-Metabolismus und durch ADP, AMP und anderer Nukleotide (vgl. Abb. A.12.).

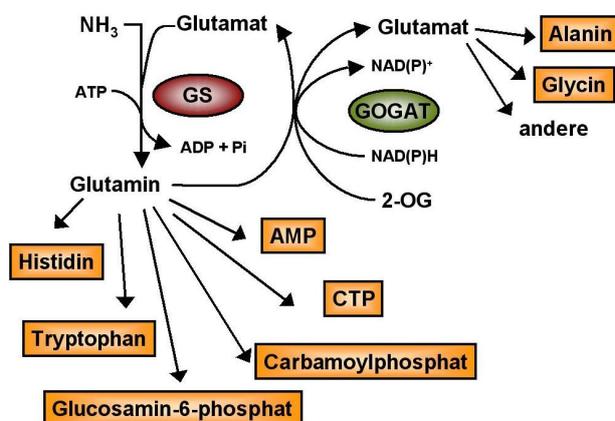


Abbildung A.12.: Kumulative Feedback-Hemmung der Glutamin-Synthetase in *E. coli*. Die Endprodukte, die in der Lage sind, die GS zu hemmen, sind orange hervorgehoben (nach <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/>).

In dem methanogenen Archaeobakterium *Methanosarcina mazei* Stamm Gö1 bildet GlnK₁ einen stabilen Komplex mit der Glutamin-Synthetase (GlnA₁). Die Komplexbildung mit GlnK₁ hemmt in der Abwesenheit von Metaboliten die Aktivität der Glutamin-Synthetase (Ehlers *et al.*, 2005).

Das *E. coli* P_{II}-Paralog GlnK kontrolliert den Ammoniumtransport durch direkte Interaktion mit dem hoch affinen Transporter AmtB, dessen Gen *amtB* mit dem Gen *glnK* co-transkribiert wird. Unter Ammonium-reichen Bedingungen interagiert GlnK mit dem Transporter, um dessen Aktivität zu hemmen (Coutts *et al.*, 2002; Javelle *et al.*, 2004).

Ein weiteres Beispiel zur Übermittlung des Stickstoffstatus ist die direkte Interaktion von P_{II}-Proteinen mit den regulatorischen Proteinen NifA oder NifL in Stickstoff-fixierenden Bakterien (Liang *et al.*, 1992; Arsene *et al.*, 1996 und 1999; Little *et al.*, 2000; Rudnick *et al.*, 2002; Drepper *et al.*, 2003; Stips *et al.*, 2004).

3. *Bacillus subtilis*

3.1. Systematik und Physiologie

Bacillus subtilis zählt taxonomisch zu den Eubakterien. Dieser Organismus besitzt eine gram-positive Zellwand und ist phylogenetisch der Klasse der gram-positiven Bakterien (Firmicutes) mit geringem GC-Gehalt zu zuordnen (GC-Gehalt von *B. subtilis* liegt bei 43 Molprozent). Diese Klasse beinhaltet die Familie der *Bacillaceae* mit der Gattung *Bacillus*, die ca. 150 Arten umfasst (Claus und Berkeley, 1986), sowie den Gattungen *Clostridia*, *Sporosarcina* und *Heliobacterium*. Seine Erstbeschreibung erfolgte im Jahr 1835 durch Ehrenberg als *Vibrio subtilis*. 1872 wurde *V. subtilis* durch Cohn in *Bacillus subtilis* umbenannt und von Fisher 1895 in die gleichnamige Gattung eingeordnet (Gordon, 1981).

B. subtilis ist ein weit verbreitetes Bodenbakterium. Es besiedelt sowohl die Rhizosphäre als auch die oberen Schichten des Bodens. Da sich *B. subtilis* sehr gut im Heuaufguss anreichern lässt, erhielt er die deutsche Bezeichnung Heubazillus. Die Zellen sind stäbchenförmig, ca. zwei Mikrometer lang und peritrich begeißelt. Eine weitere Fähigkeit von *B. subtilis* ist es, unter ungünstigen Lebensbedingungen hitzebeständige Endosporen zu bilden. Diese sind zentral in der Zelle ausgerichtet und resistent gegenüber Strahlung, Säure und Austrocknung (Abb. A.13.).

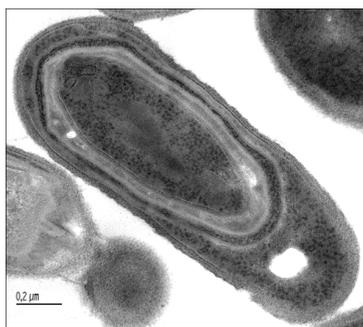


Abbildung A.13.: EM-Bild von *B. subtilis* mit eingebauter Endospore (entnommen http://www.biol.lu.se/cellorgbiol/membprot/pop_sv.html).

B. subtilis ist fakultativ aerob, lebt mesophil und ernährt sich chemoorganotroph. Auf Grund seiner saprophytischen Lebensweise hat *B. subtilis* großen Anteil an der Mobilisierung und Mineralisierung organischer Stoffe und deren Rückführung in die Nahrungskreisläufe. *B. subtilis* besitzt dazu ein großes Arsenal an Glukan- und Protein-abbauenden Enzymen, die bei Bedarf aus der Zelle exportiert werden können.

Wenn ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff zur Verfügung stehen, werden Verdopplungszeiten von ca. 45 Minuten erreicht (Bernhard, 2000). Als bevorzugte Kohlenstoff- und Energiequelle wird Glucose genutzt. Bei der Energiegewinnung dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor. Unter anaeroben Bedingungen können die Zellen durch die Verarbeitung von Glucose und Nitrat mittels Nitratatmung noch langsam wachsen. Stehen keine Elektronenakzeptoren mehr zur Verfügung, wird durch Glykolyse verwertbarer Zucker Substratkettenphosphorylierung betrieben. Bei diesem Gärungsprozess werden Milchsäure, Ethanol, Acetoin und 2,3-Butandiol produziert (Nakano *et al.*, 1997).

B. subtilis ist neben *Escherichia coli* eines der am besten studierten Organismen. Die Verwendung von *B. subtilis* als experimentelles System zur Untersuchung von Genregulationsmechanismen und Differenzierung geht auf mehrere Entwicklungen zurück. 1947 setzten Burkholder und Giles einen Marburger *B. subtilis*-Stamm Röntgenstrahlen und UV-Licht aus und isolierten eine große Anzahl an auxotrophen Mutanten. Diese stellten die Basis für biochemische und genetische Analysen der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren und anderer Stoffwechselwege dar. John Spizizen benutzte für seine Untersuchungen den Tryptophan-auxotrophen Stamm 168. Anagnostopoulos und Spizizen optimierten in diesem die Effizienz von Transformationen. Spizizen entwickelte auch das nach ihm benannte Spizizen Minimal Medium (1961). Der *B. subtilis* Stamm 168 und das Spizizen Minimal Medium (SMM) sind Grundlage dieser Doktorarbeit.

Die Sequenzierung des Genoms begann 1989 und ist 1997 fertig gestellt worden. Von den vermuteten 4.107 Genen besitzen ca. 1.500 genau definierte bzw. abgeleitete Funktionen und 1.000 weitere können allgemein klassifiziert werden, ohne dass jedoch genauere Aussagen über ihre speziellen Funktionen gemacht werden können (Kunst *et al.*, 1997). Voraussichtlich ein Viertel des Genoms scheint Proteine zu kodieren, die Biosynthesewegen dienen. Eine weitere große Fraktion des Genoms widmet sich der Adaption an Stress, dem *B. subtilis* auf Grund seiner Umwelt ausgesetzt ist. Die totale Anzahl an Regulationsproteinen (ca. 200) scheint sehr gering im Gegensatz zu den zu regulierenden Genen zu sein (ca. 1.500 Operons). Es wird außerdem vermutet, dass ca. 50% der Gene „stumm“ sind, was bedeutet, dass sie nur bei entsprechenden Umweltbedingungen zur Expression kommen.

3.2. Stickstoffregulierung in *B. subtilis*

Über die Regulation der Stickstoffassimilation in Firmibakterien ist bis heute nur wenig bekannt. Verglichen mit gut untersuchten bakteriellen Systemen, wie z.B. Proteobakterien, Corynebakterien oder Cyanobakterien, unterliegt die Regulierung der Stickstoffassimilation in *B. subtilis* auf der Ebene der Transkription anderen Faktoren. In Firmibakterien gibt es keine Hinweise auf ein NtrBC-System.

Es wurden in *B. subtilis* zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an der transkriptionellen Stickstoffkontrolle teilhaben und auf den zellulären Stickstoffstatus der Zelle reagieren (Fisher, 1999). Die beiden Transkriptionsfaktoren, GlnR und TnrA, gehören zu der MerR-Familie der DNA-bindenden Regulationsproteine (Schreier *et al.*, 1989; Wray *et al.*, 1996). Die Aminosäuresequenzen ähneln N-terminalen DNA-Bindedomänen. Beide Proteine binden an eine ähnliche DNA-Sequenz (vgl. Abb. A.14.). GlnR und TnrA besitzen jedoch geringe Ähnlichkeiten in der Sequenz ihrer C-terminalen Signaltransduktionsdomäne und sind unter verschiedenen Nährstoffbedingungen aktiv.

Abbildung A.14.: Konsensussequenz der TnrA-Box (entnommen aus [html://prodoric.tu-bs.de](http://prodoric.tu-bs.de)).



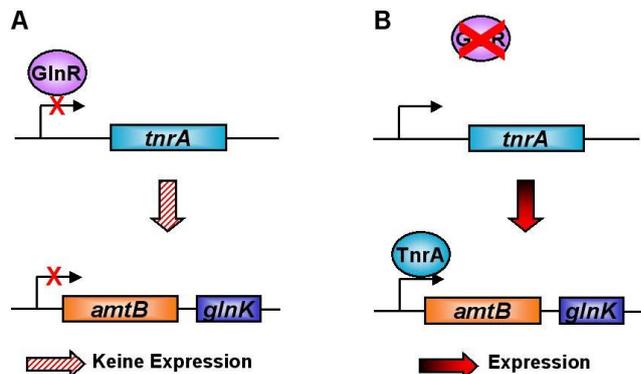
GlnR unterdrückt die Genexpression unter Bedingungen des Stickstoffüberschusses. Es gibt bislang nur drei bekannte Targets für GlnR im *B. subtilis* Genom: das *glnRA*-Operon, das aus seinem eigenen Gen und dem Gen der Glutamin-Synthetase zusammen gesetzt ist (Brown und Sonenshein, 1996; Wray *et al.*, 1996), dem *tnrA*-Gen (Fisher und Wray, 2002) und dem *ureABC*-Operon, das das Enzym Urease kodiert (Wray *et al.*, 1997).

Die GlnR-abhängige Regulation des *glnRA*-Operons wurde für *Bacillus cereus* und *Staphylococcus aureus* beschrieben (Kimura *et al.*, 1991). Es ist nicht bekannt, ob GlnR als ein Operon-spezifischer oder globaler Regulator in diesen zwei Bakterien dient, da die Regulation anderer in den Stickstoffmetabolismus beteiligten Gene nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz zu GlnR ist TnrA unter Bedingungen der Stickstofflimitierung aktiv und aktiviert die Expression einer Vielzahl an Genen, die eine Rolle in der Stickstoffassimilierung spielen. So aktiviert TnrA z.B. Gene für die Ammoniumaufnahme (*amtBglmK*, ursprünglich mit *nrgAB* bezeichnet, Wray *et al.*, 1994 und 1996), für die Nitrat- (*nasA* und *nasB*, Nakano *et al.*, 1995) und Nitritassimilation (*nasDEF*, Nakano *et al.*, 1998), für die Urease (*ureABC*, Wray *et al.*, 1997), für den Purin-Katabolismus (*puc*-Gene, Schultz *et al.*, 2001), für den γ -Aminobutylat-Transport (*gabP*, Ferson *et al.*, 1996) sein eigenes Gen (*tnrA*, Fisher, 1999; Robichon *et al.*, 2000) und andere Gene der Stickstoffassimilation (Yoshida *et al.*, 2003).

Des Weiteren kann TnrA auch als Repressor agieren, und zwar für die Gene der Glutamat-Synthase (*gltAB*, Belitsky *et al.*, 2000) und der Glutamin-Synthetase (*glnRA*, Wray *et al.*, 1996) als auch einigen weiteren Genen mit bisher unbekanntenen Funktionen (Yoshida *et al.*, 2003). Die oben genannten Fakten implizieren, dass TnrA Gene für die Verwertung von schlecht verwertbaren Stickstoffquellen aktiviert und Gene für die Synthese von Stickstoff-haltigen Hauptbestandteile in der Zelle, wie Glutamin und Glutamat, unterdrückt.

Abbildung A.15.: Übersicht über das Zusammenspiel von GlnR und TnrA bei (A) Stickstoffüberschuss und (B) Stickstoffmangel. Bei Stickstoffüberschuss ist der Transkriptionsfaktor GlnR aktiv und unterdrückt die Expression von *tnrA*. Herrscht Stickstoffmangel wird die Repression von *tnrA* aufgehoben und sein Genprodukt TnrA kann die Expression von Genen der Stickstoffassimilation (z.B. das *amtB*/*glnK*-Operon) aktivieren.



Das Stickstoffsignal, das die Aktivität von GlnR reguliert, ist noch nicht bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass unter Stickstoffüberschuss die Konzentrationen des intrazellulären Glutamins und anderer Metaboliten so stark ansteigen, dass diese die Glutamin-Synthetase *feedback* hemmen können. Die Feedback-gehemmte Glutamin-Synthetase ist in der Lage, direkt mit TnrA zu interagieren. Auf diese Weise wird die Fähigkeit von TnrA, DNA zu binden, blockiert (Wray *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu verlässt TnrA den Glutamin-Synthetase-TnrA-Komplex unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen und bindet an die speziellen DNA-Bindestellen (TnrA-Box, vgl. Abb. A.14.) zur Transkriptionsregulierung.

Ein weiterer Transkriptionsrepressor in *B. subtilis*, CodY, kontrolliert die Transkription in Antwort auf die Wachstumsrate. Reguliert werden Gene, die sowohl an der Stickstoffverwertung als auch am Kohlenstoffmetabolismus, der Bewegung, der Differenzierung und der Sporulation involviert sind. Auffallend ist, dass CodY keine Ähnlichkeit mit bekannten Transkriptionsregulatoren besitzt. Des Weiteren ist bisher keine Konsensussequenz einer DNA-Bindungsstelle identifiziert worden (Serror und Sonenshein, 1996). Allerdings scheint CodY an DNA-Strukturen zu binden, die sich durch AT-reiche DNA-Sequenzen auszeichnen. Die Hemmung von CodY tritt in Zellen auf, die schnell in Aminosäuren-reichen Medien wachsen. Im Gegensatz dazu lässt Kohlenstoff- und Stickstoffmangel die Aktivität von CodY nahezu versiegen (Ferson *et al.*, 1996). Als ein Indikator des aktuellen Nährstoffangebotes wurde intrazelluläres GTP identifiziert (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001).

Verglichen mit anderen bakteriellen Systemen gibt es nur einen konservierten Stickstoff-regulierenden Faktor in *B. subtilis*. Dieser Faktor ist ein Homolog der P_{II}-Familie, das der Unterfamilie der GlnK-Proteine angehört. Das Gen *glnK* (ursprünglich mit *nrgB* bezeichnet) liegt stromabwärts eines *amtB*-Homologs (*nrgA*) (Abb. A.16.) (Wray *et al.*, 1994). Es ist 348 Basenpaare lang und wird unter Stickstofflimitierung durch TnrA induziert (Wray *et al.*, 1994). Sein Produkt umfasst 116 Aminosäuren und die molekulare Masse beträgt 12,68 kDa. Der isoelektrische Punkt (IP) liegt bei 8,83 (SubtiList, 2002). Gelfiltrationsexperimente zeigten außerdem, dass das GlnK-Protein nativ als Trimer vorliegt (eigene Diplomarbeit).

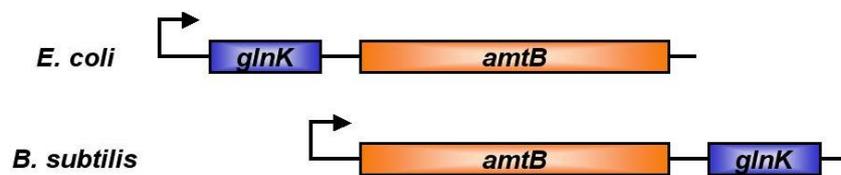


Abbildung A.16.: Anordnung des *amtB-glnK*-Operons in *E. coli* und *B. subtilis*. Das Gen des P_{II}-Homologs liegt immer mit *amtB* in einem Operon. Allerdings kann die Anordnung der Gene unterschiedlich sein, wie z.B. im oben dargestellten Fall von *E. coli* und *B. subtilis*.

Das Gen *amtB* wurde das erste Mal in *E. coli* beschrieben und kodiert einen Ammoniumtransporter. Die *amtB*-Homologe sind stets an das *glnK*-Gen gekoppelt. Die stromaufwärts liegende Region des *amtB-glnK*-Operons besitzt einen σ^A -abhängigen Promotor. σ^A ist der primäre Sigmafaktor von *B. subtilis*, reguliert ca. 4.000 Gene und ähnelt strukturell und funktionell stark dem σ^{70} -Faktor von *E. coli*. Unter Bedingungen von Ammoniummangel bindet GlnK an die cytoplasmatische Membran in einer AmtB-abhängigen Weise (Detsch und Stülke, 2003). Dies impliziert, dass das GlnK-Protein aus *B. subtilis* den Ammoniumtransport reguliert, wie es bereits für andere GlnK-Proteine gezeigt worden ist (Javelle *et al.*, 2004; Strösser *et al.*, 2004).

Das GlnK-Protein in *B. subtilis* unterscheidet sich von anderen P_{II}-Proteinen durch ein Fehlen der konservierten Modifikationsstellen im *T-loop*, wie z.B. den Tyrosinrest 51 in *E. coli* oder dem Serinrest 49 in Cyanobakterien. Tatsächlich wird davon ausgegangen, dass *B. subtilis* GlnK nicht kovalent modifiziert wird (Wray *et al.*, 1994; Detsch und Stülke, 2003). Abbildung A.17. versucht eine Übersicht über den Stickstoffmetabolismus zu geben.

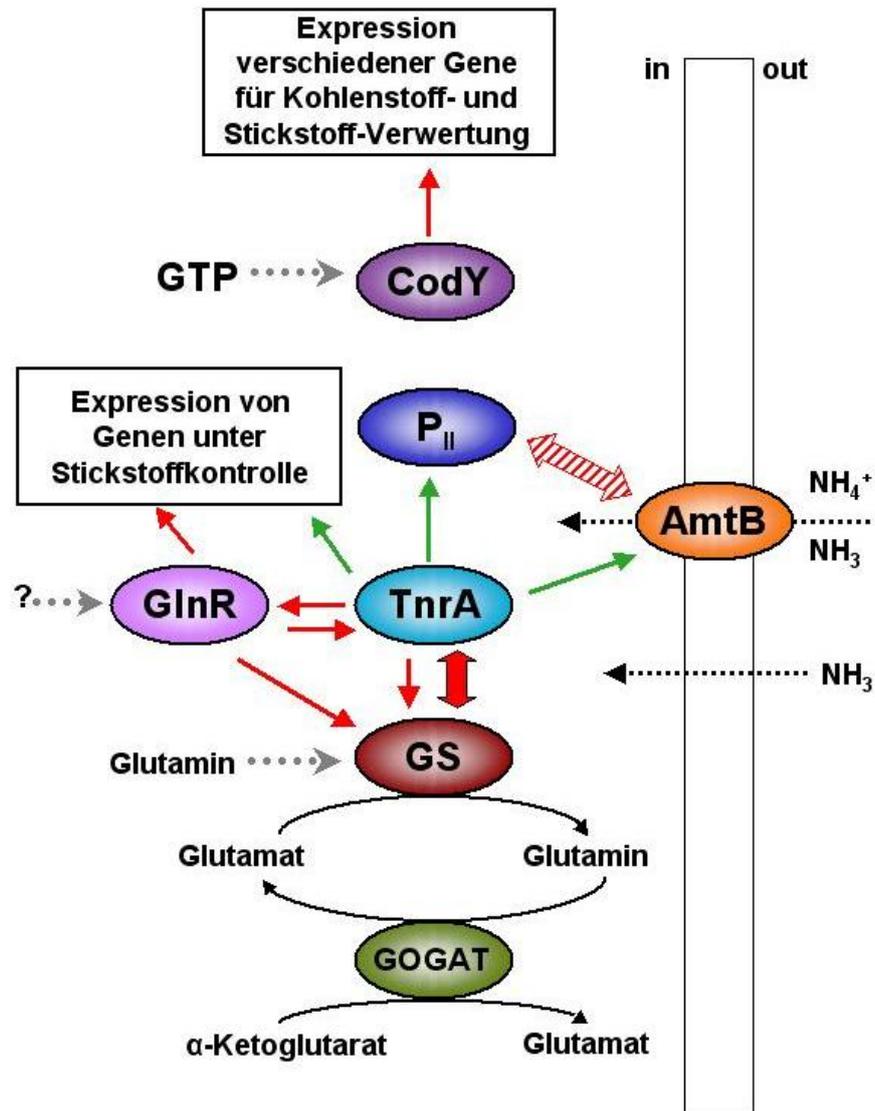


Abbildung A.17.: Ammoniumaufnahme und Stickstoffregulierung in *B. subtilis*. Wenn Ammonium in die Zelle tritt, wird es durch den GS/GOGAT-Weg assimiliert. In *B. subtilis* wird die Expression von Genen des Stickstoffmetabolismus durch die Transkriptionsregulatoren GlnR, TnrA und CodY reguliert. Rote Pfeile weisen auf eine hemmende und grüne Pfeile auf eine aktivierende Genregulation hin. Proteininteraktionen sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet (gestrichelte Pfeile potentielle und rot gefärbte bekannte Interaktionen). Graue gepunktete Pfeile stellen Stickstoffsignale dar (modifiziert nach Burkovski, 2003).

4. Cyanobakterien

4.1. Verbreitung und ökologische Bedeutung

Cyanobakterien sind photoautotrophe Mikroorganismen, die zu den Prokaryoten, genauer gesagt, zu den gram-negativen Bakterien gehören. Sie sind in der Lage, oxygene Photosynthese zu betreiben, einem Prozess, bei dem ATP und Reduktions-äquivalente aus der Oxidation von Wasser erzeugt werden. Mit diesen Primärprodukten der Lichtreaktion werden einfache anorganische Nährstoffe assimiliert. In der Dunkelreaktion wird CO₂ über den Calvin-Zyklus fixiert. Ein auffälliges Merkmal der Cyanobakterien ist das Fehlen der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym des TCA-Zyklus. Als daraus folgende Konsequenz dient die Synthese von α -Ketoglutarat ausschließlich der Synthese von Glutamat (Stanier und Cohen-Bazire, 1977).

Auf Grund ihrer weiten Verbreitung und ihres Metabolismus spielen Cyanobakterien eine dominante Rolle in dem globalen Stickstoff- und Kohlenstoffzyklus. Durch ihre Fähigkeit, photoautotroph zu wachsen, sind sie in nahezu jedem Habitat zu finden. Sie können neben gemäßigten Böden, Frischwasserseen und Ozeanen auch extreme Habitate wie heiße Quellen, Salzseen und Wüstenböden besiedeln. Cyanobakterien gelten als Pionierorganismen und somit als Wegbereiter für andere Organismen. Außerdem sind viele Cyanobakterien in der Lage, Symbiosen einzugehen, z.B. Symbiosen mit Pilzen (Flechten). Die bekannteste Symbiose ist die des Wasserfarnes *Azolla* mit *Anabaena azollae*.

4.2. Stickstoff-Stoffwechsel

Alle Cyanobakterien sind in der Lage, Ammonium, Nitrat und/oder Nitrit als Stickstoffquelle zu verwerten (Flores und Herrero, 1994). Stehen den Bakterien mehrere Stickstoffquellen zur Verfügung, erfolgt zuerst die Assimilation der energetisch günstigsten Verbindung. Die verschiedenen Stickstoffquellen werden nach folgender Priorität genutzt: Ammonium > Nitrat / Nitrit > molekularer Stickstoff. Nitrat kommt allerdings in der Natur am häufigsten vor (Guerrero *et al.*, 1981). Steht die bevorzugte Verbindung Ammonium zur Verfügung, wird die Verwertung anderer Stickstoffquellen unterdrückt. Man spricht dann von Ammoniumrepression (Flores und Herrero, 1994; Herrero *et al.*, 2001).

Des Weiteren besitzen einige Cyanobakterien die Fähigkeit, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren. Filamentöse Cyanobakterien besitzen dazu speziell differenzierte Zellen, die Heterozysten, die zu Beginn des Stickstoffmangels ausgebildet werden (Adams und Duggan, 1999; Wolk, 2000; Meeks und Elhai, 2002). Andere diazotrophe Stämme fixieren atmosphärischen Stickstoff ohne speziell ausgebildete Zellen mit verschiedenen Strategien, um die Sauerstoffempfindliche Nitrogenase vor Sauerstoff zu schützen (Sherman *et al.*, 1998; Berman-Frank *et al.*, 2001; Gallon, 2001).

Im Gegensatz zu diazotrophen Stämmen reagieren nicht diazotrophe Cyanobakterien auf die Abwesenheit von nutzbaren Stickstoffquellen mit einem Prozess, der als Chlorose bekannt ist. Chlorose zeichnet sich durch einen Verlust der Pigmentation aus (Allen und Smith, 1969; Collier und Grossman, 1992). Für den Modellorganismus *Synechococcus elongatus* PCC 7942 konnte gezeigt werden, dass chlorotische Zellen bis zu zwei Jahre in diesem Ruhezustand überleben können (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001, Forchhammer, 2002).

4.2.1. Stickstoff-Assimilation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942

In dem einzelligen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 kann die Nitrat- oder auch Nitritaufnahme aktiv und passiv erfolgen. Eine passive Aufnahme von Nitrat bzw. Nitrit kann ab einer Konzentration von > 10 mM durch Diffusion erfolgen (Omata *et al.*, 1993). Die Assimilation von Nitrat beginnt durch die Aufnahme in die Zelle durch aktiven Transport und eine daran anschließende Zwei-Schritt-Reduktion zu Ammonium. Diese Reaktionen werden durch die Ferredoxin-Nitratreduktase (Omata *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 1996) und die Ferredoxin-Nitritreduktase katalysiert (reduziertes Ferredoxin stammt aus Photosystem I). Ein ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*), der aus den Produkten von *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* und *nrtD* zusammengesetzt ist, ist für die Nitrat/Nitrit-Aufnahme zuständig (Omata *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994; Maeda und Omata, 1997). In *Synechococcus* sp. PCC 7942 sind die Gene für den Transporter mit den Genen für die Nitritreduktase (*nirA*) und die Nitratreduktase (*narB*) in dem sogenannten *nir*-Operon (*nirA-nrtABCD-narB*) angeordnet (Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993, Suzuki *et al.*, 1993). Dieses Operon wird bei Ammoniummangel exprimiert.

Ammonium wird, wenn nicht passiv durch Diffusion, aktiv durch eine Ammonium- bzw. Methylammoniumpermease aufgenommen (Konzentration im extrazellulären Medium < 1 μ M) und anschließend durch die GS/GOGAT-Reaktionen assimiliert (Flores und Herrero, 1994). Eine Hemmung der Glutamin-Synthetase kann durch die inaktivierenden Faktoren IF7 und IF17 (*gifA* und *gifB*) durch Protein-Protein-Interaktion geschehen (García-Domínguez *et al.*, 1999).

Das α -Ketoglutarat, das genutzt wird, um Ammonium durch den GS/GOGAT-Zyklus einzubauen, wird durch die NADP⁺-Isocitrat-Dehydrogenase bereitgestellt (Muro-Pastor und Florencio, 1992 und 1994). Da, wie bereits erwähnt, Cyanobakterien die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt, wird α -Ketoglutarat hauptsächlich für die Biosynthese von Glutamat und dessen Derivaten genutzt (Ihlenfeldt und Gibson, 1977). Seine entscheidende Rolle als Kohlenstoff-Skelett in der Stickstoffassimilation macht α -Ketoglutarat zu einem wichtigen Sensoren der Kohlenstoff-Stickstoff-Balance in der cyanobakteriellen Zelle (Forchhammer, 1999).

4.2.2. P_{II}-Signaltransduktion in Cyanobakterien

Das erste cyanobakterielle P_{II}-Protein wurde in dem nicht diazotrophen Stamm *Synechococcus* PCC 6301 identifiziert (Harrison *et al.*, 1990) und anschließend von dem verwandten Stamm *Synechococcus* PCC 7942 kloniert (Tsinoremas *et al.*, 1991). Weitere Studien zeigten, dass dieses P_{II}-Protein an dem Serinrest 49 im *T-loop* phosphoryliert wird (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994 und 1995a).

Wenn das *Synechococcus glnB*-Gen in *E. coli* exprimiert wird, ist es in der Lage, mit den *E. coli* eigenen P_{II}-Proteinen GlnB und GlnK Heterotrimeren zu bilden (Forchhammer *et al.*, 1999). Diese Eigenschaft unterstreicht ein weiteres Mal die sehr konservierte Struktur der P_{II}-Proteine. Mittlerweile wurden in einer Vielzahl an Cyanobakterien P_{II}-Homologe entdeckt. Bei allen bisher untersuchten Proteinen beträgt die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz 50 bis 65% mit den proteobakteriellen P_{II}-Homologen (Tsinoremas *et al.*, 1991; Palinska *et al.*, 2002).

Auf Grund seiner trimeren Struktur kann *Synechococcus* P_{II} in vier unterschiedlichen Stadien vorliegen, einer unmodifizierten Form und drei modifizierten Formen, bei denen entweder eine, zwei oder alle drei Untereinheiten phosphoryliert sind (P_{II}⁰, P_{II}¹, P_{II}² bzw. P_{II}³). Die Höhe der Modifikation des P_{II}-Proteins hängt stark von dem vorliegenden Stickstoff- und Kohlenstoffstatus ab (vgl. Abb. A.18.).

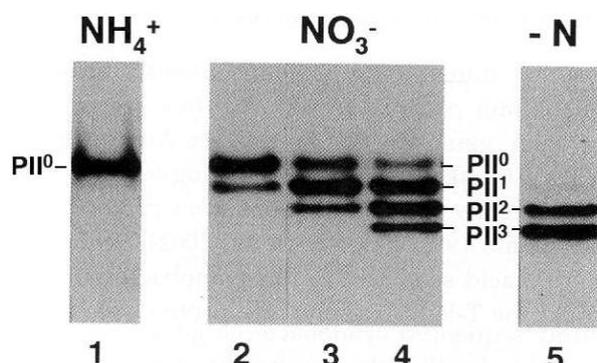


Abbildung A.18.: Darstellung des Phosphorylierungsstatus in Abhängigkeit des Stickstoff- und Kohlenstoffangebotes. Abgebildet sind Extrakte von *Synechococcus* PCC 7942, die durch nicht denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Lage der unterschiedlich modifizierten Stadien des P_{II}-Proteins durch Immunoblotanalysen sichtbar gemacht worden sind. (1) Zellen, die in Gegenwart von Ammonium, (2 bis 4) in Gegenwart von Nitrat mit ansteigenden Kohlenstoffkonzentrationen [(2) Kohlenstoffmangel, (3) Belüftung mit 0,03% und (4) mit 1% CO₂-angereicherter Luft] und (5) in Abwesenheit einer Stickstoffquelle angezogen worden sind (entnommen aus Forchhammer, 2003).

Kohlenstoffmangel und gut verwertbare Stickstoffquellen (NH₄⁺) führen zu einer Dephosphorylierung des P_{II}-Proteins, während ein steigender Mangel an Stickstoff (NO₃ bzw. N⁻) und Kohlenstoffüberschuss eine zunehmende Phosphorylierung zur Folge hat (Forchhammer, 2003).

Rezeptoren der P_{II} -Regulation in *S. elongatus* wurden bisher nur unvollständig charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass zur Regulation des Nitrat/Nitrit-Transportes in Abhängigkeit der Ammonium- und CO_2 -Verfügbarkeit das P_{II} -Signaltransduktionsprotein benötigt wird (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995b; Lee *et al.*, 1998 und 2000). Des Weiteren wird P_{II} benötigt, um die Aktivität des DNA-Bindeproteins NtcA unter Bedingungen von Stickstoffmangel zu regulieren (vgl. Abb. A.19.) (Aldehni *et al.*, 2003; Paz-Yepes *et al.*, 2003). NtcA ist der Haupttranskriptionsfaktor in Cyanobakterien, der die globale Stickstoffkontrolle der Genexpression ausübt (Herrero *et al.*, 2001). Allerdings sind weder die molekularen Regulationsmechanismen für den Nitrat/Nitrit-Transport noch für NtcA durch P_{II} bekannt.

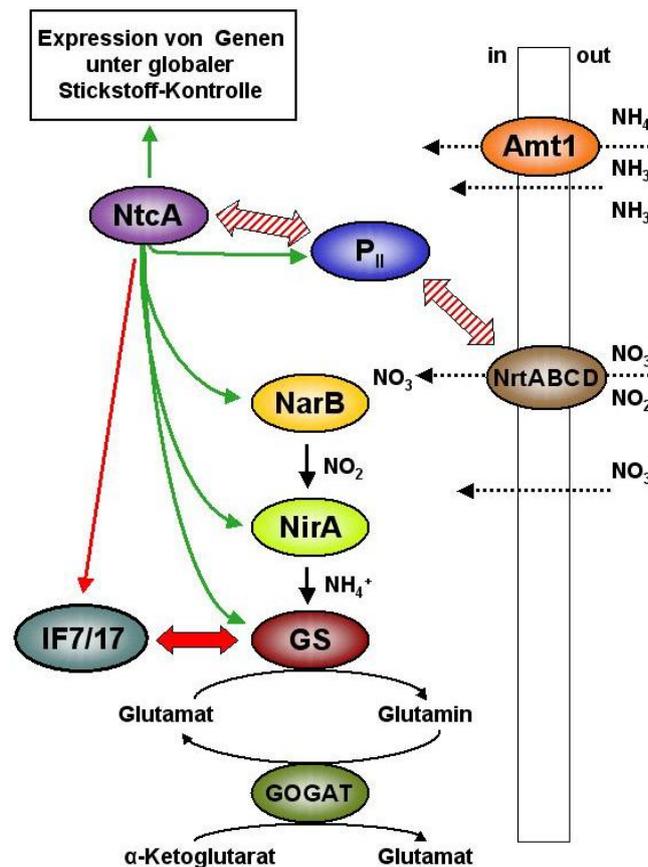
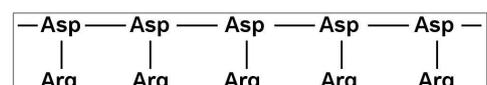


Abbildung A.19.: Stickstoffaufnahme und deren Regulation in *Synechococcus elongatus*. Wenn Nitrat in die Zelle tritt (NrtABCD oder Diffusion), wird es als erstes durch die Ferredoxin-Nitratreduktase (NarB) zu Nitrit, anschließend durch die Ferredoxin-Nitritreduktase (NirA) zu Ammonium reduziert und dieses durch den GS/GOGAT-Weg assimiliert. In *S. elongatus* wird die Expression von Genen des Stickstoffmetabolismus durch den Transkriptionsregulator NtcA reguliert. Die Richtung der Stickstoffassimilation ist durch schwarze Pfeile und mögliche Rezeptoren von P_{II} durch graue Pfeile gekennzeichnet.

4.2.3. Cyanophycin

Cyanophycin ist eine Art von Speicherstoff, der nur bei Cyanobakterien vorkommt. Es besteht aus einem



Polypeptid von Asparaginsäure, in dem alle Carboxygruppen mit Arginin verknüpft sind (Verhältnis 1:1) (Allen, 1988). Cyanophycin kann bis zu 10% der Zellmasse ausmachen und stellt bei vielen Cyanobakterien ein wichtiges Stickstoffspeicherprodukt dar.

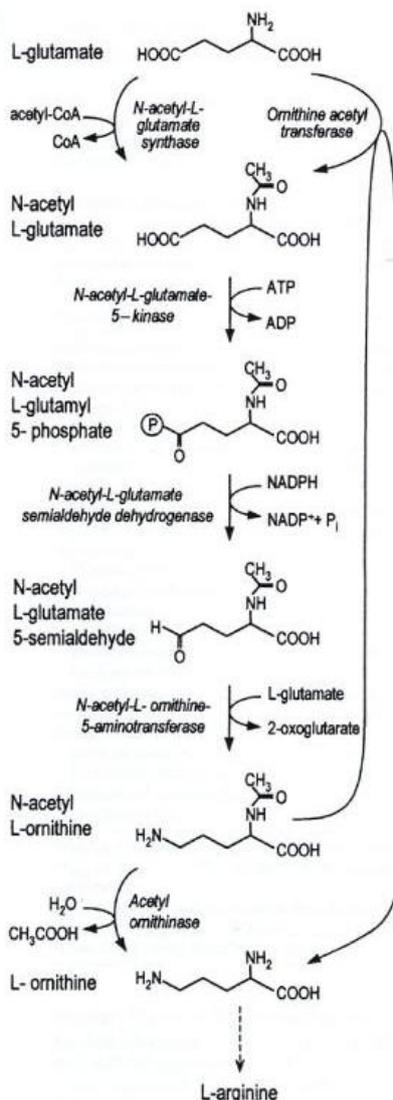
Sobald Stickstoff in der Umwelt knapp wird, kann dieses Polymer abgebaut und verwendet werden. Außerdem ist Cyanophycin eine Energiereserve. Arginin, das aus dem Cyanophycin stammt, kann hydrolysiert werden und zu Ornithin umgewandelt werden, wobei ATP durch die Aktivität des Enzyms Arginin-Dihydrolase mit Carbamoylphosphat als Zwischenprodukt erzeugt wird:



Da das Enzym Arginin-Dihydrolase bei vielen Cyanobakterien zu finden ist, kann Arginin als ATP-Quelle dienen, um während Dunkelperioden die Zellfunktionen aufrechtzuerhalten.

4.3. Arginin-Biosynthese

Arginin ist ein wichtiger Bestandteil vieler Zellbausteine, wie z.B. von Proteinen, und zusammen mit seinem Vorläufer Ornithin Bestandteil von Polyaminen und Harnstoff. Des Weiteren ist Arginin ein Vorläufer für die wichtigen Energiespeicher Kreatinphosphat, Argininphosphat und Cyanophycin (s.o.).



In einigen Bakterien, u.a. Pseudomonaden, *Micrococcus glutamicum*, *Thermus aquaticus*, photosynthetisch-aktiven Bakterien und Cyanobakterien, setzt sich die Biosynthese von Arginin aus Glutamat aus acht enzymatischen Schritten zusammen (vgl. Abb. A.20.). Fünf Schritte führen mit N-acetylierten Zwischenprodukten zu Ornithin. Die Umwandlung von Ornithin zu Arginin benötigt drei weitere Schritte (Cunin *et al.*, 1986).

Als erstes wird aus Acetyl-CoA und L-Glutamat N-Acetyl-L-Glutamat gebildet. Diese Reaktion wird durch das Enzym N-Acetylglutamat-Synthetase katalysiert.

Abbildung A.20.: Acetylierter (zyklischer) Biosyntheseweg von Ornithin (entnommen aus Ramón-Maiques *et al.*, 2002).

Der nächste Schritt, die Phosphorylierung von N-Acetylglutamat (NAG) durch ATP in Gegenwart der N-Acetylglutamat-5-Phosphotransferase (ArgB, später mit N-Acetylglutamat-Kinase bezeichnet), ist Ziel einer Feedback-Hemmung durch Arginin und stellt daher den entscheidenden Schritt in der zyklischen Arginin-Biosynthese dar (Caldovic und Tuchman, 2003). Daher ist diese Aktivität und seine Sensitivität gegenüber Arginin in vielen Organismen untersucht worden (u.a. Degryse *et al.*, 1976; Hoare und Hoare, 1966; Isaac und Holloway, 1972; Leisinger *et al.*, 1972). Die am besten studierte NAG-Kinase ist die aus *Pseudomonas aeruginosa*, die bis zu 90% Reinheit durch Haas und Leisinger (1975) aufgereinigt worden ist. Das Enzym setzt sich aus 29 kDa großen Untereinheiten zusammen und kommt je nach Anwesenheit von Liganden in unterschiedlichen Aggregaten vor. Das Molekulargewicht in Gegenwart von N-Acetylglutamat beträgt 230 kDa, während kleinere Formen (minimal 65 kDa) in der Gegenwart der Feedback-Inhibitoren L-Arginin und $MgCl_2/ATP$ auftreten (Haas und Leisinger, 1975).

Der dritte Schritt wird durch die N-Acetylglutamat-5-Semialdehyd-Reduktase katalysiert. Bei diesem Schritt wird N-Acetylglutamat-5-Phosphat in das entsprechende Semialdehyd umgewandelt. Anschließend wird die Umwandlung von N-Acetylglutamat-5-Semialdehyd und Glutamat in N^2 -Acetylorithin und α -Ketoglutarat durch die N-Acetylorithin-Aminotransferase katalysiert. Im fünften Schritt überträgt die Ornithin-Acetyltransferase eine Acetyl-Gruppe des N^2 -Acetylorithin auf Glutamat. Dabei entsteht Ornithin und N-Acetylglutamat.

Die drei letzten Schritte werden von der Ornithin-Carbamoyltransferase (Carbamoylphosphat + L-Ornithin \rightarrow Orthophosphat + L-Citrullin), der Argininosuccinat-Synthetase (ATP + L-Citrullin + L-Aspartat \rightarrow AMP + Pyrophosphat + L-Argininosuccinat) und der Argininosuccinase (L-Argininosuccinat \rightarrow Fumarat + L-Arginin) katalysiert.

5. Allgemeine Fragestellung

Auf Grund der unterschiedlichen komplexen Stickstoffmetabolismen in Bakterien und Pflanzen und auf Grund der hoch konservierten Eigenschaften der P_{II}-Proteine ist es sehr wahrscheinlich, dass die Proteine der P_{II}-Familie weitere Funktionen als die bisher bekannten besitzen. Ziel dieser Arbeit ist es nun, einen weiteren Einblick in die Funktionsvielfalt der P_{II}-Proteine zu gewährleisten und diese Funktionen biochemisch zu charakterisieren.

5.1. *Bacillus subtilis* GlnK

Wenn man die einzigartigen Eigenschaften der Kontrollmechanismen des Stickstoffmetabolismus in *B. subtilis* (Fisher, 1999) in Betracht zieht, bleibt die Rolle des P_{II}-Signaltransduktionsproteins weitgehend im Dunkeln. Diese Arbeit soll einen tieferen Einblick in die Signaltransduktionseigenschaften des P_{II}-Proteins GlnK in *B. subtilis* geben. Dazu wurden biochemische Eigenschaften charakterisiert und versucht, potentielle Interaktionspartner zu identifizieren. Während dieser Arbeit konnte der Transkriptionsregulator TnrA als ein neues Rezeptorprotein von GlnK identifiziert und deren Komplexbildung in Bezug auf die GlnK-Eigenschaften charakterisiert werden. Außerdem wurden biochemische Bindestudien mit TnrA und der Glutamin-Synthetase mit BIAcore Oberflächenplasmonresonanz-Detektionsstudien durchgeführt, um den Einfluss von Feedback-Inhibitoren der Glutamin-Synthetase auf dem TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplex zu untersuchen.

5.2. *Synechococcus elongatus* GlnB

In dem Cyanobakterium *S. elongatus* sind bis heute zwar Rezeptoren aber bislang keine molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung durch das P_{II}-Protein GlnB bekannt. In einem Versuch, Rezeptoren zu identifizieren, die an das *S. elongatus* P_{II} binden können, wurden Hefe-2-Hybrid-Studien mit P_{II} durchgeführt. Im Verlauf dieser Experimente konnte das Protein ArgB (N-Acetylglutamat-Kinase) als ein potentieller Rezeptor identifiziert werden. In dieser Arbeit sollen die biochemischen Eigenschaften dieses Komplexes und dessen Einfluss auf die zelluläre Physiologie beschrieben werden.

B. Material und Methoden

1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

1.1. Bakterienstämme

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die in Tabelle B.1. aufgeführten *Bacillus subtilis* Stämme verwendet:

Tabelle B.1.: Verwendete *Bacillus subtilis* – Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
168	<i>trpC2</i>	Anagnostopoulos und Spizizen, 1961
GP250	<i>trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3)</i>	Detsch und Stülke, 2003
GP253	<i>trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3) ΔnrgB::cat</i>	Detsch und Stülke, 2003
GP254	<i>trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3) ΔnrgA::cat</i>	Detsch und Stülke, 2003

Des Weiteren wurden die *Escherichia coli* Stämme XL1 (Bullock *et al.*, 1987) und BL21(DE3) (Grodberg und Dunn, 1988) für Klonierungsarbeiten genutzt.

1.2. Vektoren

Tabelle B.2.: Verwendete Vektoren in der Übersicht.

Vektor	Referenz
pGEM-T	Promega
pDG148	Stragier <i>et al.</i> , 1988
pT7-7	Studier und Moffat, 1986
pET-15b	Novagen

1.2.1. pGEM-T (Promega)

Das pGEM-T Vektorsystem (Promega) wurde benutzt, um PCR-Produkte zu klonieren. Der Vektor ist mit Thymidin-Überhängen am 3'-Ende ausgestattet. Diese 3'-Thymidin-Überhänge in der Insertionsstelle erlauben eine effiziente Ligation der PCR-Produkte, da viele hitzestabile Polymerasen ein einzelnes Deoxyadenosin an das 5'-Ende der amplifizierten Produkte hängen.

Der Vektor pGEM-T besitzt einen T7- und einen SP6-Promotor, die die multiple Klonierungsstelle flankieren. Außerdem besitzt der Vektor die α -Peptid codierende Region des Enzyms β -Galaktosidase. Durch diese Fähigkeit können rekombinante Klone direkt durch Blau-Weiß-Screening auf Indikatorplatten (mit IPTG/X-Gal-Zugabe) identifiziert werden. Die Gegenwart des *ampR*-Gens, das die β -Lactamase kodiert, gestattet es, eine Selektion auf Ampicillin durchzuführen.

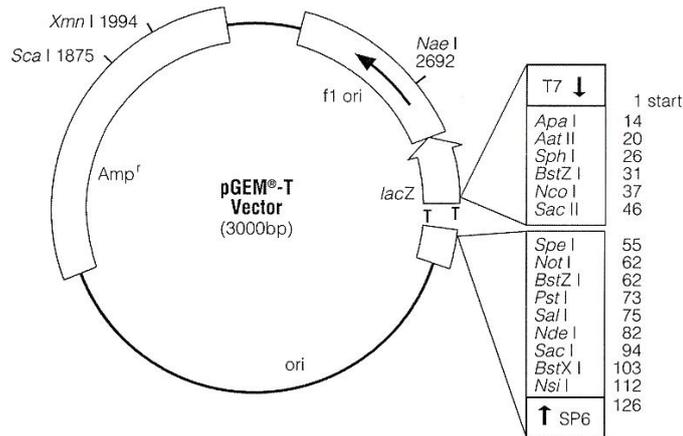


Abbildung B.1.: Karte des Vektors pGEM-T für die Klonierung von PCR-Produkten.

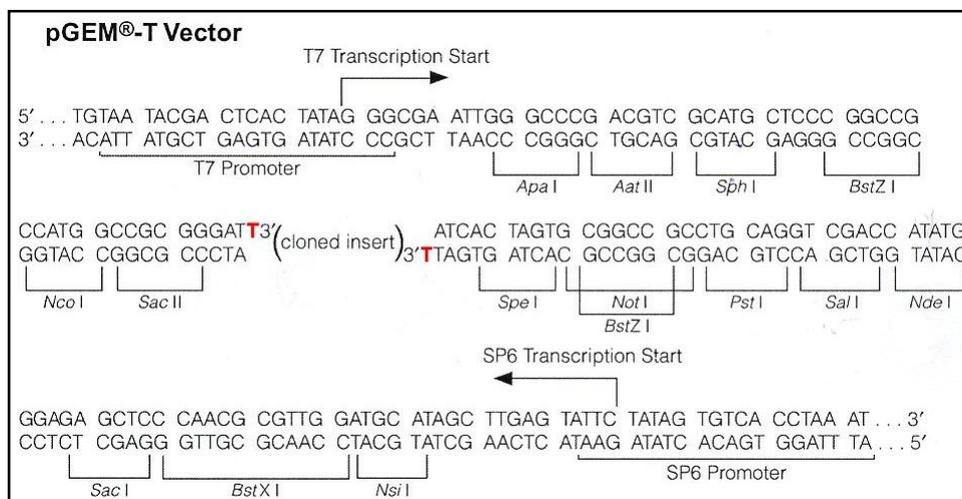


Abbildung B.2.: Bereich der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pGEM-T. Die überhängenden 3'-Thymidine sind rot hervorgehoben.

1.2.1. pDG148

Der Vektor pDG148 besitzt das Replikon des Vektors pBR322 und das β -Lactamase-Gen *ampR* für die Replikation und Ampicillin-Selektion in *E. coli* (Stragier *et al.*, 1988). Des Weiteren besitzt der Shuttle-Vektor pDG148 das Replikon des Vektors pUB110 für die Vermehrung in *B. subtilis* (McKenzie *et al.*, 1987). Außerdem dienen die Gene *phIR* und *kanR* des Vektors pUB110 der Selektion der Transformanten durch Phleomycin und/oder Kanamycin. Die Anwesenheit des *Pspac*-Promotors, der mit dem Lac-Operator assoziiert ist, und des *lacI*-Gens, das den Lac-Repressor von *E. coli* unter der Kontrolle des Penicillinase-Promotors *Ppen* von *B. licheniformis* kodiert, erlauben eine IPTG-induzierende Expression von Promoter-losen Genen. Die multiple Klonierungsstelle *HindIII-SalI-SphI* ermöglicht es, Gene von Interesse in den Vektor unter die Kontrolle des *Pspac*-Promotors zu klonieren (Abb. B.3.).

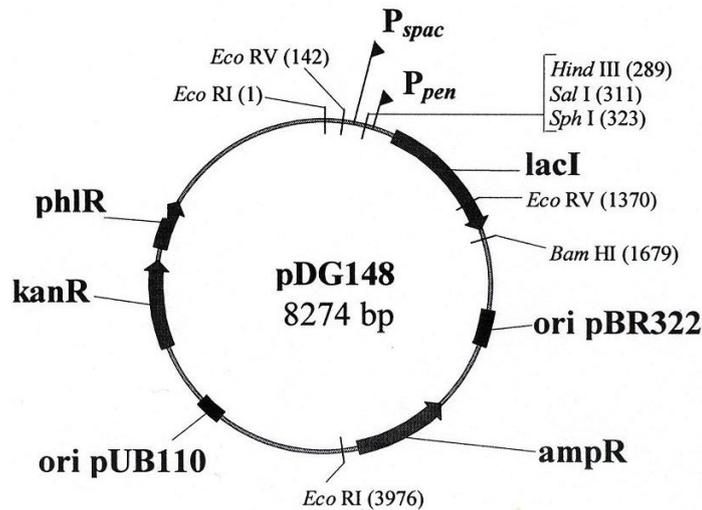


Abbildung B.3.: Karte des Shuttle-Vektors pDG148.

1.2.3. pT7-7

Der Vektor pT7-7 enthält einen T7-Promotor und wird zur Expression von Genen mit Hilfe von T7-RNA-Polymerasen verwendet. Der Vektor besitzt außerdem einen T7-RNA-Polymerase-Promotor, ein Resistenzgen gegen Ampicillin und das ColE1-Origin zur Replikation. pT7-7 besitzt eine starke ribosomale Bindestelle (rbs) und das Startcodon (ATG) stromaufwärts der *Polylinker*-Sequenz. Diese Sequenz ist in Abbildung B.4. dargestellt. pT7-7 wurde von S. Tabor aus dem Vektor pT7-1 hergestellt (Tabor und Richardson, 1985).

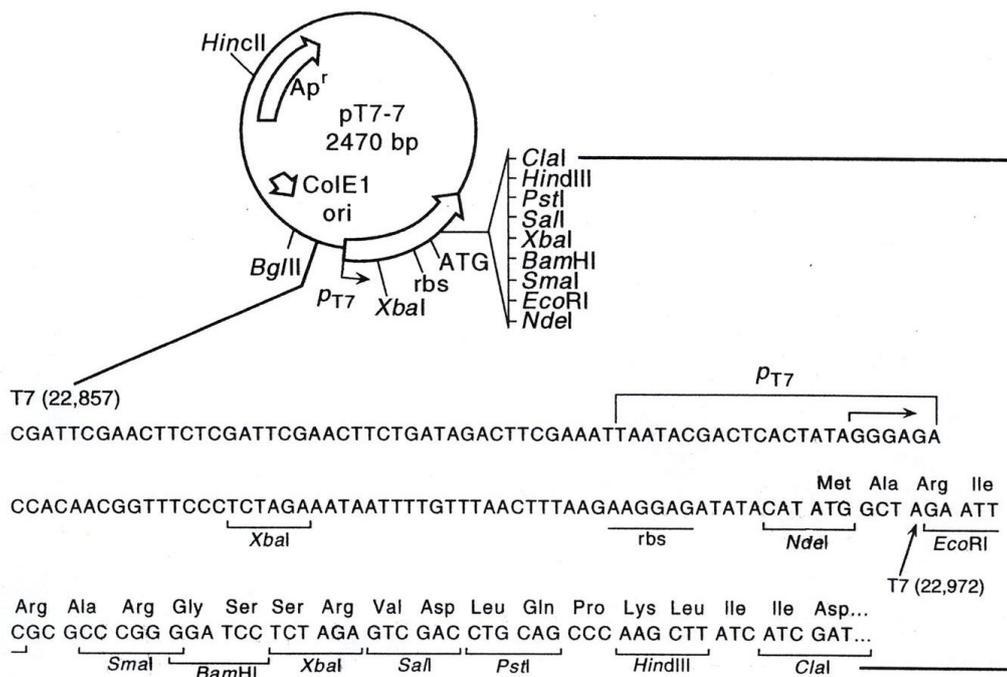


Abbildung B.4.: Karte des Vektors pT7-7 und seine multiple Klonierungsstelle.

1.2.4. pET-15b (Novagen)

Der Vektor pET-15b kodiert eine N-terminale His₆-Tag-Sequenz, gefolgt von einer Thrombinschnittstelle und drei Klonierungsstellen zur *in-frame* Klonierung des gewünschten Gens. Des Weiteren besitzt der Vektor pET-15b einen T7-Promotor. Dieser erlaubt eine IPTG-induzierte Expression. Durch den N-terminalen His₆-Tag kann überproduziertes Protein spezifisch über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt werden.

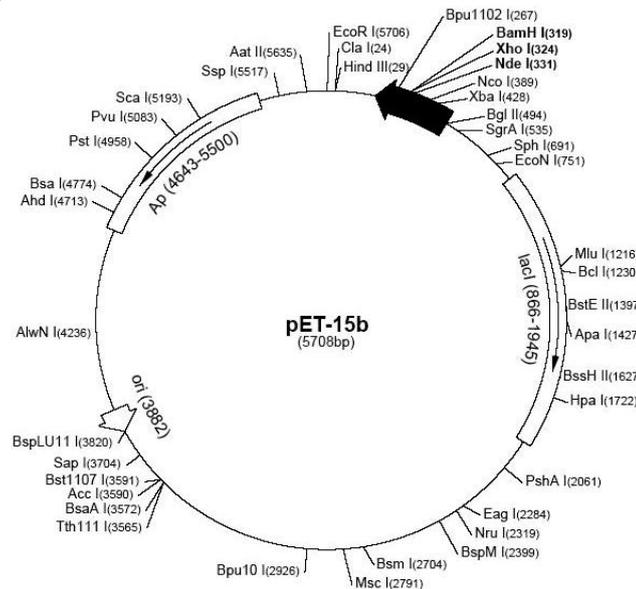


Abbildung B.5.: Karte des Vektors pET-15b für die Klonierung von PCR-Produkten.

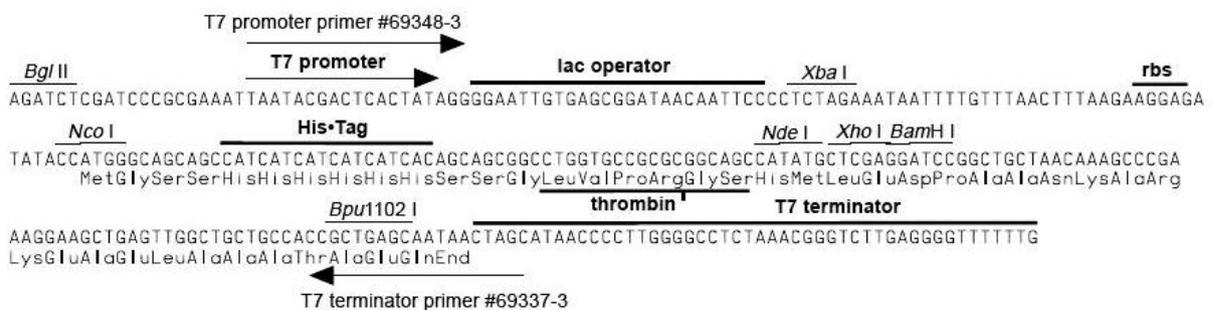


Abbildung B.6.: Bereich der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pET-15b.

1.3. Verwendete Oligonukleotide

Tabelle B.3.: Verwendete Oligonukleotide (MWG Biotech)

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5' → 3')
TnrA-for	GGA ATT CCA TAT GAC CAC AGA AGA TCA TTC TT
TnrA-rev	CCC AAG CTT CTG GAC CGC TGA TTA C
TnrA XhoI-rev	CCG CTC GAG CCG GAC TTT TAT TAT TTA AC
5'-TnrABinds	CAT TCT CCT TCC TTT CCA TCC C
3'-TnrABindSunm	CTG TAT CGC CCA TTT GCA TGT C
5'-glnH-knockout	GAA GGC ATG ACA ATG GTT GTC G
3'-glnH-knockout	CTC ATA ACC GCT ACA GCA ACG

2. Kultivierung von Bakterien

2.1. *Escherichia coli*

Die *E. coli* Stämme XL1 (Bullock *et al.*, 1987) und BL21(DE3) (Grodberg und Dunn, 1988) wurden für Klonierungsarbeiten und Proteinexpression genutzt.

2.1.1. Nährmedium und Anzuchtbedingungen

Die *E. coli* Stämme wurden in Luria-Bertani (LB) Medium (Miller, 1972) angezogen.

LB-Medium:	Pepton/Trypton	1%
	Hefeextrakt	0,5%
	NaCl	0,5%

Die Anzucht erfolgte bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln. Transformanten wurden auf LB-Platten selektiert, die 100 µg ml⁻¹ Ampicillin enthielten. Die LB-Platten wurden durch Addition von 15 g Agar-Agar (Carl Roth) auf einen Liter Medium hergestellt.

2.2. *Bacillus subtilis*

2.2.1. Nährmedium

B. subtilis wurde in Spizizens Minimalmedium (SMM) (Anagnostopoulos und Spizizen, 1961) mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Tryptophan wurde als auxotropher Bedarfstoff hinzugefügt. Die Anzucht erfolgte bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln, wobei Spurenelemente in den üblichen Endkonzentrationen verwendet wurden (s. unten).

Das Spizizens Minimal Medium setzte sich folgendermaßen zusammen:

K ₂ HPO ₄	80 mM
KH ₂ PO ₄	44 mM
Tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O	3,5 mM
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,8 mM
L-Tryptophan	0,25 mM
D-Glucose	0,5%
Spurenelementlösung	1%

Die 100x Stamm-Spurenelementlösung enthielt folgende Bestandteile:

CaCl ₂	4 mM
FeCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,6 mM
ZnCl ₂	1,2 mM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,25 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 mM

Die Stickstoffquellen wurden je nach Experiment nach Sterilfiltration separat den Medien zugesetzt und sind den entsprechenden Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Folgende Stickstoffquellen wurden verwendet:

NH ₄ Cl	40	mM
NaNO ₃	20	mM
NaNO ₃	5	mM

2.2.2. Anzuchtbedingungen

Die Anzucht von *B. subtilis* erfolgte bei einer Temperatur von 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm). Um aerobe Milieubedingungen zu gewährleisten, wurden die verwendeten Erlenmeyerkolben nur zu einem Fünftel ihres Gesamtvolumens mit Medium befüllt (100 ml Kolben enthielten 20 ml; 500 ml Kolben 100 ml Medium). Die Erlenmeyerkolben wurden mit Silikon-Kulturkappen (Bellco Glass, Inc.) oder Papierstopfen bedeckt.

Die Bakterien wurden von einer Über-Nacht-Kultur, die durch direktes Beimpfen einer auf einer SMM-Platte angezogenen Kultur hergestellt wurde, angeimpft und dann kultiviert.

Mittels des Spektralphotometers *Ultrospec 3000 pro* (Biochrom Ltd., Pharmacia Biotec Ltd.) wurde durch Messung der optischen Dichte gegen das verwendete Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) das Wachstumsverhalten der Kultur kontrolliert.

2.2.3. Ernten der Zellen

Zellen wurden in der jeweils benötigten Menge der Kultur entnommen (siehe jeweiliges Experiment). Diese Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation (Hermle, Z 233 MK) bei a) kleinen Volumina bis 2 ml bei 14.000 rpm und bei b) größeren Volumina bis 500 ml bei 8.000 rpm (Beckman, J2-21 *centrifuge*) und 4°C geerntet.

3. Puffer und Reagenzien

3.1. Laufpuffer

10x Agarosepuffer	Tris	400	mM
(modifizierter TAE)	Natriumacetat	30	mM
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	EDTA II	10	mM
	EDTA III	10	mM
	pH 7,8 (Essigsäure)		

Laufpuffer für nicht denaturierende Polyacrylamidgele	Tris	25	mM
	Glycin	192	mM

Laufpuffer für denaturierende Polyacrylamidgele	Tris	25	mM
(Laemmli, 1970)	Glycin	192	mM
	SDS	0,1	%

10x TBE-Puffer	Tris-Cl pH 8,0	890	mM
(Gelshift-Experimente)	Borsäure	890	mM
	EDTA	20	mM

3.2. Auftragspuffer

DNA-Auftragspuffer	Glycerin	50	%
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Bromphenolblau	0,25	%

1x Auftragspuffer für native Gele

Puffer 1	Tris-Cl pH 6,8	0,05	mM
	Glycerin	20	%
	Bromphenol blau	0,1	%

Puffer 2	Kalium~Phosphat, pH 7,4	50	mM
	MgCl ₂	5	mM
	DTT	5	mM
	EDTA	0,5	mM
	KCl	50	mM
	Benzamidin	2	mM

Puffer 3	BSA in Puffer 1	80	mg ml ⁻¹
-----------------	-----------------	----	---------------------

MIX	Puffer 1	45,45	%
	Puffer 2	45,45	%
	Puffer 3	9,1	%
1x SDS-Auftragspuffer (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Tris-Cl pH 6,8	50	mM
	DTT	100	mM
	SDS	2	%
	Glycerin	10	%
	Bromphenol blau	0,1	%

3.3. Blotting-Puffer für *semi-dry-blot*

Anodenpuffer I	Tris	300	mM
	Methanol	20	%
Anodenpuffer II	Tris	25	mM
	Methanol	20	%
Kathodenpuffer	Tris	25	mM
	Methanol	20	%
	6-Amino-n-capronsäure	40	mM
TBS	Tris-Cl pH 7,4	20	mM
	NaCl	6,5	mM
Absättigungslösung	Milchpulver in TBS	10	%

3.4. Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterienstämme

3.4.1. RbCl-kompetente *E. coli*-Stämme (nach Hanahan *et al.*, 1983)

RF1 pH 5,8	RbCl	100	mM
	MnCl ₂	50	mM
	Kaliumacetat	30	mM
	CaCl ₂	10	mM
	Glycerin	15	%

RF2 pH 6,8	MOPS	10	mM
	RbCl	10	mM
	CaCl ₂	75	mM
	Glycerin	15	%

3.4.2. Kompetente *B. subtilis*-Zellen (nach Cutting und VanderHorn, 1990)

2x SS-Lösung	KH ₂ PO ₄	1,2	%
	K ₂ HPO ₄	2,8	%
	NH ₄ SO ₄	0,4	%
	Natriumcitrat	0,2	%
	MgSO ₄	0,04	%

SPI-I-Medium	2x SS-Lösung	50	%
	Glucose	0,5	%
	Casaminosäure	0,02	%
	Hefeextrakt	0,1	%

SPI-II-Medium	MgCl ₂ (0,1 M)	2,5	%
	CaCl ₂ (0,05 M)	1	%
	in SPI-I-Medium		

SPI-III-Medium	EGTA (0,1 M)	2	%
	in SPI-II-Medium		

3.5. Zellaufbruchspuffer

Zellaufbruchspuffer X (<i>E. coli</i>)	Tris-Cl pH 7,4	50	mM
	KCl	50	mM
	MgCl ₂	5	mM
	EDTA	2	mM
	Benzamidin	2	mM
	PMSF	0,2	mM

Zellaufbruchspuffer Z (<i>B. subtilis</i> GlnK)	Tris-Cl pH 7,4	50	mM
	NaCl	50	mM
	EDTA	2	mM
	MgCl ₂	5	mM
	Benzamidin	2	mM

Zellaufbruchspuffer A (NAG-Kinase)	Na~Phosphat pH 7,0	10	mM
	MgCl ₂	5	mM
	EDTA	0,5	mM
	DTT	0,2	mM
Zellaufbruchspuffer T1 (TnrA)	Tricine pH 8,3	50	mM
	NaCl	600	mM
	EDTA	1	mM
	DTT	1	mM
	Glycerin	10	%
Zellaufbruchspuffer S1 (GlnK-ST)	Tris-Cl pH 7,4	50	mM
	KCl	50	mM
	MgCl ₂	5	mM
	EDTA	2	mM
	Benzamidin	2	mM
	PMSF	0,2	mM

3.6. Puffer für säulenchromatographische Auftrennungen

Puffer H (Heparin-Säule)	Hepes-NaOH pH 7,0	10	mM
	NaCl	50	mM
	EDTA	0,4	mM
	MgCl ₂	1	mM
	DTT	1	mM
Puffer S2 (Waschpuffer der <i>Strep-Tactin</i> -Säule)	Tris-Cl pH 8,0	100	mM
	NaCl	150	mM
	EDTA	1	mM
Puffer S3 (Elutionspuffer der <i>Strep-Tactin</i> -Säule)	Tris-Cl pH 8,0	100	mM
	NaCl	150	mM
	EDTA	1	mM
	Desthiobiotin	2,5	mM

B. Material und Methoden

Puffer T2	Tricine pH 8,3	50	mM
(TnrA-Aufreinigung)	NaCl	200	mM
	EDTA	1	mM
	DTT	1	mM
	Glycerin	10	%
Puffer T3	Tricine pH 8,3	50	mM
(TnrA-Aufreinigung)	NaCl	400	mM
	EDTA	1	mM
	DTT	1	mM
	Glycerin	10	%
Gelfiltrationspuffer G	Na~Phosphat pH 7,0	10	mM
	NaCl	400	mM
	MgCl ₂	5	mM
	EDTA	0,5	mM
	DTT	0,2	mM
Puffer A2	Na~Phosphat pH 7,0	10	mM
(Pelletbehandlung)	DTT	0,2	mM
Puffer A3	Na~Phosphat pH 7,0	10	mM
Methyl-HIC-Säule	NaCl	400	mM
(NAG-Kinase)	MgCl ₂	5	mM
	DTT	0,2	mM
	EDTA	0,5	mM
Puffer A4	Na~Phosphat pH 7,0	10	mM
Gelfiltration	NaCl	150	mM
(NAG-Kinase)	MgCl ₂	5	mM
	DTT	0,2	mM
	EDTA	0,5	mM
Puffer A5	Na~Phosphat pH 7,0	10	mM
UnoQ	NaCl	75	mM
(NAG-Kinase)	MgCl ₂	5	mM
	DTT	0,2	mM
	EDTA	0,5	mM

3.7. Puffer für Enzymaktivitätstests

3.7.1. Glutaminsynthetase (GS)

Reaktionspuffer GS	Imidazol pH 7,0	100	mM
	Hydroxylamin pH 7,0 ^{*)}	125	mM
	MgCl ₂	20	mM
	ATP	10	mM

^{*)} Da Hydroxylamin bei einem pH = 7 instabil ist, wird es unmittelbar vor Gebrauch aus gleichen Teilen 1,6 M Hydroxylammoniumchlorid und 1,6 M NaOH hergestellt. Der pH des Gemisches beträgt sieben.

3.7.2. N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase

Reaktionspuffer N	NH ₂ OH-HCl	400	mM
	Tris	400	mM
	MgCl ₂	20	mM
	ATP	10	mM

3.7.3. Stopplösung für Enzymaktivitätstests

FeCl ₃ x 6 H ₂ O	5	%
Trichloressigsäure	8	%
HCl	300	mM

3.8. Puffer für Immunopräzipitation

NET-Puffer I (modifiziert) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Tris-Cl pH 7,4	50	mM
	NaCl	150	mM
	NP40	0,1	%
	EDTA pH 8,0	1	mM

NET-Puffer II (modifiziert)	Tris-Cl pH 7,4	50	mM
	NaCl	500	mM
	NP40	0,1	%
	EDTA pH 8,0	1	mM

Puffer IP	Tris-Cl pH 7,5	10	mM
	NP40	0,1	%

3.9. Puffer für In-Gel Trypsinverdau

Trypsin-Digest 1	Tris-Cl pH 8,5	100	mM
	Acetonitril	50	%
Trypsin-Digest 2	Tris-Cl pH 8,1	100	mM
	Acetonitril	10	%
Trypsin-Digest 3	Tris-Cl pH 8,1	100	mM
	CaCl ₂	1	mM
	Acetonitril	1	mM
Stopp- und Elutionslösung	Acetonitril	75	%
	TFA	2	%

3.10. Puffer für Ligandenbindungstests/UV-Crosslinking

5x Puffer B (Gelshift-Experimente)	Hepes pH 7,5	250	mM
	Natriumacetat	250	mM
	DTT	5	mM
	EDTA	5	mM
	MgCl ₂	50	mM
	Triton X-100	0,25	%
	Glycerin	25	%
	BSA	500	µg ml ⁻¹
	<i>Salmon sperm</i> DNA	250	µg ml ⁻¹
Puffer U (UV-Crosslinking)	Hepes pH 7,5	10	mM
	NaCl	150	mM
	NP40	0,005	%

3.11. Lagerpuffer

Lagerpuffer L (<i>B. subtilis</i> GlnK/GlnK-ST) (<i>B. subtilis</i> TnrA) (<i>B. subtilis</i> GlnA)	Tris-Cl pH 7,4	10	mM
	NaCl	50	mM
	DTT	1	mM
	MgCl ₂	1	mM
	Glycerin	50	%

3.12. Färbelösungen für SDS-Polyacrylamidgele

3.12.1. Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987)

Fixierlösung	Ethanol	50	%
	Essigsäure	12	%
	Formaldehyd	0,02	%
Waschlösung 1 und 5	Ethanol	50	%
Vorbehandlung	Na-Thiosulfat	0,02	%
Imprägnierlösung	Silbernitrat	0,2	%
	Formaldehyd	0,03	%
Entwickler	NaCO ₃	6	%
	Formaldehyd	0,02	%
	Na-Thiosulfat	4	µg/ml
Stopplösung	Ethanol	50	%
	Essigsäure	8	%

3.12.2. Coomassie-Färbung

Färbelösung	<i>Coomassie brilliant blue</i>	0,25	mM
	Methanol	50	%
	Essigsäure	10	%
Entfärbelösung	Methanol	20	%
	Essigsäure	7,5	%

3.13. Sonstige Puffer

HBS-Puffer (BIAcore-Experimente)	Hepes pH 7,5	10	mM
	NaCl	150	mM
	NP40	0,005	%
	MgCl ₂	5	mM
Kalium-Phosphat-Puffer	K ₂ HPO ₄	802	mM
	KH ₂ PO ₄	198	mM

10x PNK-Puffer	Tris-Cl pH 7,6	700	mM
	MgCl ₂	100	mM
	DTT	50	mM

3.14. Standards

3.14.1. Proteinstandard

- *Broad range protein molecular weight marker V849A* Promega

3.14.2. DNA-Standards

- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Fermentas
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix Fermentas

4. Enzyme und Chemikalien

Die verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Biorad (München) bezogen. Die eingesetzten Enzyme wurden von Promega (Mannheim), New England BioLabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Boehringer Mannheim (Mannheim) bezogen und nach den Herstellerempfehlungen verwendet. [8-¹⁴C] Adenosin-5'-Diphosphat wurde von Moravek Biochemicals, Inc. und [γ -³²P]-Adenosin-5'-Triphosphat von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. DNA-Isolierung

5.1.1. Plasmidisolierung („Minilysat“) (modifiziert nach Qiagen)

Um Plasmide aus Bakterien zu isolieren, wurden 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach einer vierminütigen Zentrifugation bei 6.000 rpm und Raumtemperatur wurde das Zellpellet in 100 μ l P1-Puffer (nach Qiagen) resuspendiert und das Reaktionsgemisch mit Hilfe eines Vortexgerätes geschüttelt. Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 200 μ l Lysis-Puffer (P2-Puffer nach Qiagen) hinzugefügt, der Ansatz leicht geschüttelt und fünf Minuten auf Eis gestellt. Es wurden 150 μ l P3-Puffer (nach Qiagen) dem Reaktionsansatz beigefügt, die Probe geschüttelt und zehn Minuten auf Eis gestellt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 0,7 Volumenteile Isopropanol wurden dem Mix hinzugegeben. Nach erneutem Schütteln wurde wieder 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit kaltem (-20°C) 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde zum Schluss in 40 μ l H₂O gelöst.

5.1.2. Plasmidisolierung („Midi-Präp“) (modifiziert nach Qiagen)

Zwei Milliliter Über-Nacht-Kultur (LB-Medium mit selektierendem Antibiotika, Anzucht bei 37°C) wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt (25 ml Endvolumen) und weitere 12 bis 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 6.000xg, 4°C) geerntet und das Pellet in 4 ml Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Anschließend wurden zu den Zellen 4 ml Puffer P2 (Qiagen) hinzugegeben, die Lösungen vorsichtig gemischt und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P3 (Qiagen) wurde der Mix für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 4°C und 20.000xg zentrifugiert. Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde abgenommen und auf eine *Qiagen-tip 100* Säule gegeben. Die Säule leerte sich durch Gravitationsfluss. Die Säule, an der die Plasmid-DNA gebunden ist, wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC (Qiagen) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde dann mit 5 ml Puffer QF (Qiagen) eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol (Raumtemperatur) gefällt. Es wurde nun 30 Minuten mit 15.000xg bei 4°C zentrifugiert und vorsichtig der Überstand abgenommen.

Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 2 ml 70%igem Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen und bei 15.000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und zum Schluss in *Aqua dest.* aufgenommen.

5.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde photometrisch mit dem Spektralphotometer *Ultrospec 3000 pro* (Biochrom Ltd., Pharmacia Biotec Ltd.) bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ DNA. Aufschluss über die Reinheit der DNA gibt das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} . Bei einer reinen DNA-Präparation liegt der Quotient zwischen 0,7 und 0,9.

5.3. Amplifikation von DNA durch Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden mit *Taq*-Polymerase (Biolabs) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsmix (50µl):	30 ng	genomische DNA
	10 mM	dNTPs
	10 pmol	5'-Primer
	10 pmol	3'-Primer
	0,5 units	Taq-Polymerase
	in 1x	Reaktionspuffer

Die Amplifikation erfolgte in einem PCR-Sprint (Hybaid) nach folgendem Grundprogramm:

Anzahl der Zyklen	Funktion	Zeit [min]	Temperatur
1	Denaturierung	5	94°C
30	Denaturierung	1	94°C
	Annealing	1	vgl. Tabelle B.4.
	Elongation	1	72°C
1	Elongation	5	72°C
	Kühlen	∞	4°C

Für eine PCR aus ganzen Zellen wurden die Bakterienkolonien direkt vom festen Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen in der Mikrowelle bei 600 Watt für 90 Sekunden aufgeschlossen. Nach Zugabe des Reaktionsmixes erfolgte die PCR gemäß der üblichen Vorgehensweise.

Tabelle B.4.: Annealing-Temperaturen der durchgeführten PCRs.

Primerpaar	Annealingtemperatur
TnrA-for / TnrA-rev	56°C
TnrA-for / TnrA-XhoI-rev	56°C
5'TnrABindS / 3'TnrABindSunm	56°C
5'-glnH-knockout / 3'-glnH-knockout	56°C

5.4. DNA-Aufreinigung nach PCR und anderen enzymatischen Reaktionen (*QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen)

Um DNA-Fragmente nach der PCR oder anderen enzymatischen Reaktionen von Primern, Nukleotiden, Polymerasen oder Salz zu reinigen, wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* Protokoll für Tischzentrifugen (Qiagen) angewendet. Dazu wurden fünf Volumenteile des Puffers PB (Qiagen) zu einem Volumenteil des PCR-Ansatzes gegeben und die Probe gut durchmischt. Danach wurde die Probe in eine *QIAquick*-Säule (Qiagen) gegeben und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Probe mit 750 µl PE-Puffer (Qiagen) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl H₂O und erneutem Zentrifugieren von der Säule eluiert.

5.5. DNA-Präparation aus Agarosegelen (*Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit*)

Das *QIAquick Gel Extraction Kit* - Protokoll wurde angewendet, um DNA aus Agarosegelen zu extrahieren und zu säubern. Dazu wurde das entsprechende DNA-Fragment mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Zu dem ausgeschnittenen Gelstück wurden drei Volumen QG-Puffer (Qiagen) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde dann 10 Minuten lang bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte, wurde ein Volumen Isopropanol zu dem Ansatz gegeben. Dieser Mix wurde auf eine *QIAquick*-Säule gegeben und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die DNA-Probe mit 750 µl PE-Puffer (Qiagen) gewaschen (Zentrifugation 13.000 rpm, eine Minute). Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA mit 50 µl H₂O eluiert.

5.6. Restriktionen

Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller (New England Biolabs, Boehringer Mannheim, MBI Fermentas).

5.7. Ligationen

Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl bei 16°C über Nacht nach Beschreibung des Herstellers durchgeführt.

5.8. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,7 bis 1%igen Agarosegelen bei einer Stromspannung von 50 bis 80 V. Als Gel- und Laufpuffer diente ein modifizierter TAE-Puffer (B.3.1.). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Fünftel Volumen Auftragspuffer versetzt. Als Längenstandards dienten der *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* oder der *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder* (MBI Fermentas). Nach erfolgtem Lauf wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht detektiert.

5.9. Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen erfolgten durch den *ABI Prism 310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer) nach Angaben des Herstellers.

5.10. Transformationsverfahren

5.10.1. Transformation von RbCl-kompetenten *E. coli*-Stämmen („Hitzeschock“)

Die Herstellung RbCl-kompetenter Zellen erfolgte nach Hanahan *et al.* (1983). Verwendet wurden die *E. coli*-Stämme XL1 und BL21(DE3). Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 in 25 ml LB-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezogen und anschließend durch Zentrifugation bei 5.000xg (Beckman *J2-21*, Rotor *JA-14*) geerntet. Nach Waschen mit kaltem RF1-Puffer (B.3.4.) wurden die Zellen in 2 ml kaltem RF2-Puffer (B.3.4.) resuspendiert, zu je 100 µl aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Für die Transformation wurden zu 100 µl Zellen 2 bis 10 µl DNA zugegeben. Der Transformationsansatz wurde zunächst 45 Minuten auf Eis und anschließend 45 Sekunden bei 42°C inkubiert. Die Expression erfolgte in 800 µl LB-Medium für eine Stunde bei 37°C. Danach wurden Aliquots unterschiedlichen Volumens auf Selektionsmedien ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutraum inkubiert.

5.10.2. Transformation von *B. subtilis*

Kompetente Zellen von *B. subtilis* wurden nach der Methode von Cutting und Vander Horn (1990) hergestellt. Als erstes wurde eine 2 ml Kultur (in SPI-I-Medium, B.3.4.) von einer Kolonie angeimpft und dann über Nacht bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur mit 18 ml frischem SPI-I-Medium verdünnt und weiter bei 37°C geschüttelt (180 rpm). Als das Zellwachstum die stationäre Phase erreicht hatte, also sich keine signifikante Änderung in der Zelldichte über einen Zeitrahmen von 20 bis 30 Minuten zeigte, wurde die Kultur mit 180 ml vorgewärmten SPI-II-Medium (B.3.4.) gemischt und weitere 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde dann 10 Minuten lang auf Eis gestellt und anschließend für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (8.000xg). 18 ml des Überstandes wurden beiseite gestellt und der restliche Überstand vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wurde in dem restlichen 18 ml Überstand unter Zugabe von 2 ml sterilem Glycerin resuspendiert. Aliquots der kompetenten Zellen (0,2 ml) wurden in sterile Eppendorf-Gefäße transferiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen durch Eintauchen in ein 37°C warmes Wasserbad aufgetaut. 200 µl des SPI-III-Mediums (B.3.4.) wurden zu den aufgetauten Zellen gegeben und vorsichtig mit 10 µl DNA (0,5 bis 5 µg) gemischt. Die Mischung wurde dann bei 30°C für 90 Minuten oder bei 37°C für eine Stunde unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Die Transformationsmischung wurde verdünnt und auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

5.11. Herstellung von Glycerin-Kulturen

Zur Herstellung von Glycerin-Stammkulturen wurden 4 ml Über-Nacht-Kultur bei 13.000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 4 ml frischem LB-Medium gewaschen und erneut für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Zellen werden in 800 µl LB-Medium und 200 µl sterilem 100%igem Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

5.12. Herstellung von radioaktiv-markierter DNA (5'-Endlabelling)

Zur 5'-Markierung von kleinen PCR-Produkten (DNA für Gelshift-Experimente) wurde folgender Mix hergestellt: 10 pmol DNA-Fragment wurde mit 2 µl γ -³²P-ATP (20 µCi) und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (PNK, New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 10 µl PNK-Puffer (B.3.13.) gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNA mittels einer *ProbeQuantTMG-50 Micro Column* (Amersham Pharmacia Biotech) durch Zentrifugation (735xg, 2 Minuten) von der überschüssigen Radioaktivität getrennt.

6. Analytische Methoden

6.1. Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Bestimmung der optischen Dichte verfolgt. Dazu wurden bei geringer optischer Dichte (< 0,7) 1 ml einer Kultur in eine 1 ml Küvette (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Bei einer optischen Dichte über 0,7 wurden 600 µl einer Kultur mit dem jeweiligen Medium im Verhältnis 1:5 verdünnt und in eine 3 ml Küvette (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) in dem Spektralphotometer *Ultrospec 3000 pro* (Biochrom Ltd, Pharmacia Biotech Ltd.).

6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)

Die Gesamtproteinkonzentrationen, der wie unter B.8. gewonnenen Zellextrakte, wurden nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt. Hierbei dienten mehrere definierte Konzentrationen von BSA als Standard.

Es wurden 800 µl *Aqua dest.* in eine 1 ml Küvette gegeben und ein definiertes Volumen an Zellextrakt ($V_{\text{Zellextrakt}}$) zugegeben. Zu diesem Mix wurden 200 µl *Roti-Quant* (Roth) hinzugefügt und gut vermischt. Durch die Bindung von Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes in der *Roti-Quant*-Lösung von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm (OD₅₉₅) gemessen.

$$c \text{ [}\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}\text{]} = \frac{\text{OD}_{595} * 17,3}{V_{\text{Zellextrakt}}}$$

Der Faktor, der für die *Roti-Quant*-Lösung durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve bestimmt wurde, betrug während der laufenden Doktorarbeit 17,3. Die Gesamtproteinkonzentration

eines Zellextraktes berechnete sich nach der links abgebildeten Gleichung. Außerdem wurde die Proteinkonzentration der Proteine eines Zellextraktes anhand einer SDS-PAGE nach Bearbeitung durch Immunoblotanalysen mit gereinigtem Protein definierter Menge abgeschätzt.

6.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**6.3.1. Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen****6.3.1.1. Zusammensetzung eines 15%igen Polyacrylamidgeles**

Trenngel	Tris-Cl pH 8,9	375	mM
	Acrylamid	15	%
	SDS	0,1	%
	APS	0,05	%
	TEMED	0,1	%
Sammelgel	Tris-Cl pH 6,8	125	mM
	Acrylamid	6	%
	SDS	0,1	%
	APS	0,05	%
	TEMED	0,1	%

6.3.1.2. Durchführung

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde in 15%igen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt (SDS-PAGE). Die Proben wurden in entsprechenden Teilen in 4x SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und vor dem Auftragen aufs Gel 5 min im Wasserbad bei 95°C denaturiert. Es folgte eine vertikale Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 160 V.

Nach vollendeter Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden durch Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) (B.7.1.), durch *Coomassie*-Färbung (B.7.2) oder Immunoblotanalyse (B.14.1.) detektiert.

6.3.2. Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen**6.3.2.1. Zusammensetzung eines 7,5%igen Polyacrylamidgeles**

Trenngel	Tris-Cl pH 8,9	750	mM
	Acrylamid	7,5	%
	NP40	0,05	%
	APS	0,05	%
	TEMED	0,1	%

Sammelgel	Tris-Cl pH 6,8	125	mM
	Acrylamid	6	%
	NP40	0,05	%
	APS	0,1	%
	TEMED	0,1	%

6.3.2.2. Durchführung

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde in 7,5%igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proben wurden zu gleichen Teilen in Nativgel-Probenauftragspuffer aufgenommen. Es folgte dann eine vertikale Elektrophorese bei einer Spannung von 100 bis 160 V.

Nach vollendeter Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden durch Immunoblotanalysen detektiert.

6.3.3. Gelshift-Versuche mit TnrA und GlnK

6.3.3.1. Zusammensetzung eines 6%igen Polyacrylamidgeles

Gel	TBE	0,25	x
	Polyacrylamid	6	%
	APS	10	%
	TEMED	0,1	%

6.3.3.2. Durchführung

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und Proteinen in den Gelshift-Experimenten wurde in 6%igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proben wurden in 6x DNA-Auftragspuffer aufgenommen. Es folgte eine vertikale Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V über 105 Minuten. Nach vollendeter Gelelektrophorese wurden die radioaktiv markierten DNA-Banden durch Autoradiographie detektiert.

7. Färbemethoden für SDS-PAGEs

7.1. Silberfärbung nach Blum *et al.*, 1987

Bei der Silberfärbung von Proteingelen handelt es sich um eine sehr sensitive Färbemethode. Es können Banden mit einem Proteingehalt von 1 bis 10 ng sichtbar gemacht werden. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind unter Punkt B.3.12. nachzulesen.

Als Erstes wurde das Gel nach vollendeter Gelelektrophorese für eine Stunde bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert. Danach wurde das Gel dreimal für 20 Minuten in 50%igem Ethanol gewaschen. Dann erfolgte eine Vorbehandlung des gewaschenen Geles für eine Minute in 0,02% Na-Thiosulfat. Es folgten drei Waschschriffe in *Aqua dest.* für jeweils 20 Sekunden. Das Gel wurde anschließend für 20 Minuten imprägniert und erneut für zweimal 20 Sekunden in *Aqua dest.* gewaschen. Danach wurde das Gel in der Entwicklerlösung inkubiert und nach erfolgreichem Erscheinen der Proteinbanden zweimal für jeweils eine Minute in *Aqua dest.* gewaschen. Die Entwicklungsreaktion wurde durch 10-minütige Inkubation in der Stopplösung beendet. Das gefärbte Gel wurde dann in 50%igem Ethanol aufbewahrt.

7.2. Coomassie-Färbung

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Gel in *Coomassie blue*-Färbelösung (B.3.12.) für mehrere Stunden inkubiert. Die Inkubation erfolgte so lange, bis das Gel blau gefärbt ist. Danach wurde das unspezifisch gebundene *Coomassie blue* mittels Entfärbelösung (B.3.12.) über Nacht aus dem Gel entfernt. Das entfärbte Gel wird in *Aqua dest.* bei 4°C gelagert.

7.3. Färbung mit Sypro[®]-Orange (Bio-Rad)

Bei Minigelen wurden 5 µl der Sypro-Orange-Färbelösung mit 25 ml 7,5%iger Essigsäure gemischt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel in die Lösung gegeben. Während der Inkubation wurde das Gefäß, in dem die Inkubation stattfindet, mit Aluminium-Folie abgedeckt, um die Färbung vor Licht und Verschmutzung zu schützen. Die Inkubation erfolgte über 30 Minuten mit leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Nach 30 Minuten wurde das Gel in frischer 7,5%iger Essigsäure für 30 bis 60 Sekunden gewaschen, um überschüssige Färbelösung von der Geloberfläche zu entfernen. Das Gel wurde dann unter UV-Licht-Bestrahlung analysiert.

8. Zellaufbruchmethoden

8.1. Zellaufbruch im RiboLyser

Der Zellaufbruch geringer Zellmengen von *B. subtilis* erfolgte durch Anwendung des RiboLyser (Hybaid). Zu dem vorliegenden Zellpellet (Gewinnung siehe B.2.2.3.) wurde eine äquivalente Menge an Glaskügelchen ($\varnothing = 0,10 - 0,11$ mm, B. Braun Melsungen AG) gegeben. Es wurden dann 50 µl Zellaufbruchpuffer hinzugefügt. Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Zellaufbruchpuffer sind unter Punkt B.3.5. nachzulesen.

So präpariert wurden die Zellen im RiboLyser bei einer Geschwindigkeit von 6,5 für zehn Sekunden aufgebrochen. Dieser Vorgang wurde sechsmal wiederholt. Nach drei Durchgängen wurden die Reaktionsgefäße dem RiboLyser entnommen und zur Kühlung für kurze Zeit auf Eis gestellt. Die nicht vollständig aufgebrochenen Zellen, Zelltrümmer und die Glaskugeln wurden durch zweifache Zentrifugation (Hermle, Z 233 MK) bei 14.000 rpm und 4°C entfernt. Der gewonnene Überstand enthielt die löslichen Proteine.

8.2. Zellaufbruch mittels *French-Press*

Große Zellmengen wurden mittels der *French-Press*-Zelle aufgebrochen. Hierfür wurde das Zellpellet in Zellaufbruchspuffer (Zusammensetzungen der unterschiedlichen Puffer siehe B.3.5.) aufgenommen (2 ml Puffer auf 1 g Zellpellet) und durch dreimalige Passage durch die *French-Press*-Zelle bei 16.000 psi lysiert. PMSF wurde erst unmittelbar vor dem Zellaufbruch zugegeben. PMSF und EDTA dienen im Zellaufbruchspuffer der Hemmung von Serinproteasen bzw. Proteasen und Phosphatasen, die von zweiwertigen Kationen abhängig sind.

9. Proteinfractionierungsmethoden

9.1. Zentrifugation

Lysate, die durch die *French-Press*-Methode (siehe B.8.2.) gewonnen worden sind, wurden für 10 Minuten bei 5.000 rpm und für 30 Minuten bei 12.500 rpm bei jeweils 4°C zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-14), um nicht aufgeschlossene Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde weiter verwendet.

9.2. Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Fällung der Proteine wird zu dem Überstand (B.9.1.) eine entsprechende Menge an fein gemörsertem Ammoniumsulfat (27,5 bzw. 60% Endkonzentration) gegeben. Dieser Vorgang geschah unter langsamen und vorsichtigem Rühren bei 4°C. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlraum ohne Rühren. Das Ammoniumsulfat-Präzipitat wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C sedimentiert (Beckman J2-21, Rotor JA-20) und das Pellet weiter verwendet.

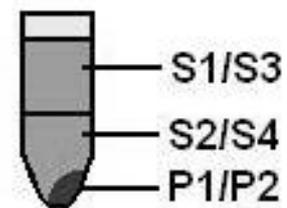
9.3. β -Mercaptoethanol-Fällung

Zur weiteren Aufreinigung wurde zu dem unter Punkt B.9.1. oder B.9.2. gewonnenen Überstand eine β -Mercaptoethanol-Lösung (20% des Gesamtvolumens) unter vorsichtigem Rühren zugesetzt. Die Lösung wurde anschließend für 15 Minuten bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Präzipitat wurde durch zweimalige 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm entfernt. Der Überstand wurde weiter verwendet.

9.4. Präparation von Membranfraktionen

Über-Nacht-Kulturen von *B. subtilis* Zellen wurden zum Zeitpunkt der spät exponentiellen Phase bei einer OD_{600} von 0,8 durch Zentrifugation geerntet (B.2.2.3.). Anschließend wurden sie in 500 μ l Zellaufbruchspuffer Z (B.3.5.) resuspendiert und im RiboLyser aufgebrochen (B.8.1.). Zelltrümmer und nicht vollständig aufgebrochene Zellen wurden durch Zentrifugation (3.500 g, 2 min, 4°C) entfernt. Die Fraktionen des zellfreien Extraktes wurden durch Ultrazentrifugation (*Optima™ TLX Ultracentrifuge*, Beckman Coulter, Rotor *TLA 100-1*) (100.000 g, 1h, 4°C) getrennt.

Der Überstand wurde zu gleichen Teilen in eine obere (S1) und eine untere Fraktion (S2) geteilt. Das Sediment (P1) wurde im Ausgangsvolumen von Zellaufbruchspuffer Z (B.3.5.) resuspendiert und ein Teil davon wiederholt ultrazentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde ein weiteres Mal zu gleichen Teilen fraktioniert



und das Pellet in Puffer A im Ausgangsvolumen der zweiten Ultrazentrifugation aufgenommen. Die Fraktionen wurden durch Immunoblotanalysen unter Zuhilfenahme der Antikörper gegen GlnK oder TnrA untersucht. GlnA-spezifische Antikörper wurden benutzt, um die Qualität der Fraktionierungen zu testen, da GlnA ein ausschließlich cytosolisches Protein ist.

10. Entsalzung und Umpufferung

Entsalzung und Umpufferung der Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse in einem *ZelluTrans*-Dialyseschlauch (Roth, Porengröße: 25 μ m) gegen einen Liter des gewünschten Puffers über Nacht im Kühlraum (4°C) unter leichtem Rühren der Dialyselösung.

11. Chromatographische Methoden

Die folgenden Säulenchromatographien wurden an der *BioLogic Workstation* (Bio-Rad) bei 4°C durchgeführt. Fraktionen wurden durch den Fraktionskollektor *Model 2/28* (Bio-Rad) gesammelt. Gemessene Daten, wie z.B. auftretender Druck in der Säule, Absorption des Durchlaufes bei einer Wellenlänge von 280 nm oder Elutionsprofile, wurden im *BioLogic Controller* (Bio-Rad) gesammelt und über das Computerprogramm *BioLogic HR Chromatography System* (Bio-Rad) verwaltet.

Alle unter Punkt B.3.6. aufgeführten Puffer, die bei den Säulenchromatographien verwendet wurden, wurden per Filtration durch einen *MicronSep-Filter* (Osmonics Inc.) mit einer Porengröße von 0,45 Micron von Unreinheiten gesäubert und anschließend vollständig entgast, um Verstopfungen in dem *FPLC*-System zu vermeiden.

Die verwendeten Arten der Chromatographie mit den jeweiligen Säulen sind nach folgendem Schema aufgelistet: Name der Säule – Säulenbettvolumen – Firma.

11.1. Affinitätschromatographie

<i>Strep</i> -Tactin-Säule	5 ml	IBA
<i>Strep</i> -Tactin <i>Superflow</i> Mini-Säule	0,2 ml	IBA
Heparin-Sepharose	5 ml	Bio-Rad Laboratories
Ni-NTA-Säule	6 ml	Material von Qiagen

11.2. Gelfiltrationschromatographie

<i>High-load</i> 16/60 Superdex 200	24 ml	Amersham Pharmacia Biotech
<i>Bio-Silect</i> ® SEC 250-5	1,4 ml	Bio-Rad Laboratories

11.3. Ionenaustauschchromatographie

UnoQ-1	1,3 ml	Bio-Rad Laboratories
HighS- <i>Cartridge</i>	5 ml	Bio-Rad Laboratories
CM-Sepharose- <i>Cartridge</i>	5 ml	Bio-Rad Laboratories

11.4. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Methyl-HIC-Säule	5 ml	Bio-Rad Laboratories
------------------	------	----------------------

11.5. *Strep-tag* Pulldown Assay

Gereinigtes *Strep-tag* P_{II}-Protein (P_{II}-ST) (30 µg) wurde mit 500 µg Zellextrakt in 100 µl Puffer P (B.3.6.) gemischt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurde die Mischung auf eine *Strep*-Tactin *Superflow* Mini-Säule (B.11.1.) gegeben. Der Durchfluss wurde gesammelt und nicht spezifisch gebundene Proteine durch fünf konsekutive Waschschriffe mit Puffer S2 (B.3.6.) entfernt. Die Elution des *Strep*-Tactin-gebundenen Materials wurde durch die Zugabe von 6 x 0,1 ml Elutionspuffer S3 (B.3.6.) erreicht.

12. Proteinaufreinigung

12.1. Reinigung von *Bacillus subtilis* TnrA

TnrA wurde in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) von dem Plasmid pT7-TNRA exprimiert. Die Zellen wurden in LB-Medium mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin bei 37°C bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen. Dann wurde die Expression von TnrA durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 2,5 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (B.2.2.3) geerntet, mit Puffer T1 gewaschen und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Die nächsten Reinigungsschritte wurden bei 4°C nach dem leicht abgeänderten Protokoll von Wray *et al* (2000) durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in Puffer T1 mit 1 mM PMSF resuspendiert und durch drei konsekutive Passagen durch die *French-Press*-Zelle aufgebrochen (B.8.2.). Zelltrümmer und unaufgebrochene Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt (B.9.1.). Anschließend wurde der zellfreie Extrakt erneut zentrifugiert (30 Minuten, 12.000 rpm). Nach einer fraktionierenden Ammoniumsulfat-Fällung (27,5 und 60% (w/v), B.9.2.) wurde das Proteinpräzipitat durch Zentrifugation geerntet, in Puffer T2 (Puffer T1 mit 200 mM NaCl) aufgenommen und über Nacht gegen Puffer T2 dialysiert. Das Dialysat wurde zentrifugiert, um ausgefallene Proteine zu entfernen und anschließend auf eine CM-Sepharose-Säule (B.11.3.) geladen, die mit einem linearen Gradienten von 200-600 mM NaCl durchgeführt wurde. Die TnrA-haltigen Fraktionen wurden durch 15%ige SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie*-Färbung identifiziert, anschließend vereinigt und dann mit 60% Ammoniumsulfat gefällt. Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation gesammelt, in Puffer T3 (Puffer T1 mit 400 mM NaCl) gelöst und durch Gelfiltration (Superdex 200, B.11.2.) weiter gereinigt. Die vereinten TnrA-haltigen Fraktionen (s. o.) wurden außerdem durch Ionenaustauscher-Chromatographie (High S, linearer Gradient von 200 bis 1000 mM NaCl, B.11.3.) gesäubert. Das gereinigte Protein wurde bei -20°C mit Lagerpuffer L (B.3.11.) dialysiert und in diesem gelagert.

12.2. Reinigung von *Bacillus subtilis* GlnK-Strep-tag (GlnK-ST)

B. subtilis GP253-Zellen, die das Plasmid pDG148-glnK-ST trugen, wurden bei 37°C in 500 ml SMM (mit 0,5 µg ml⁻¹ Phleomycin und 5 µg ml⁻¹ Chloramphenicol) mit 20 mM NaNO₃ als einziger Stickstoffquelle angezogen. *E. coli* BL21(DE3) Zellen, die ebenfalls das Plasmid pDG148-glnK-ST trugen, wurden bei 37°C in 500 ml LB-Medium (mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin) angezogen.

Nach Wachstum bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,8 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Drei Stunden nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (B.2.2.3.) und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden zur Weiterverarbeitung auf Eis langsam aufgetaut, in Zellaufbruchspuffer S1 (B.3.5.) aufgenommen und per *French-Press*-Zelle (B.8.2.) aufgebrochen. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch zwei Zentrifugationsschritte (10 min, 5.000xg und 30 min, 12.000xg) wurde der Überstand durch eine *Strep-Tactin*-Säule (B.11.1.) geleitet, die vorher mit Waschpuffer S2 (B.3.6.) äquilibriert worden war. Nach der Entfernung von ungebundenem Protein durch wiederholtes Waschen wurde das affin gebundene Protein durch Zugabe des Elutionspuffer S3 (B.3.6.) von der Säule eluiert. Das gereinigte Protein wurde bei -20°C in Lagerpuffer L (B.3.11.) gelagert.

12.3. Reinigung von *Synechococcus elongatus* ArgB (NAG-Kinase)

Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen und durch $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin selektiert. Die Überexpression von *argB* wurde durch Zugabe von $0,5 \text{ mM}$ IPTG bei einer OD_{600} von $0,8$ initiiert. Nach 2 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert.

Alle nun folgenden Schritte wurden bei 4°C nach dem Aufreinigungsprotokoll von Gil *et al.* (1999) modifiziert durchgeführt. Die Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und in Zellaufbruchpuffer A (Puffer A, B.3.5.) resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufbruch durch drei aufeinander folgende Passagen durch eine *French-Press-Zelle* (B.8.2.). Unaufgebrochene Zellen und Zellrümpfer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation (6.000rpm , 4°C) entfernt. Der zellfreie Extrakt wurde einer einstündigen Ultrazentrifugation (100.000g) unterzogen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in gleichem Volumen gelöst. Da im Pellet der größte Anteil der NAG Kinase-Aktivität beobachtet werden konnte (NAG-Kinase-Aktivitätstest siehe B.20.2), wurde das Pellet einmalig durch eine erneute Ultrazentrifugation mit Puffer A gewaschen. Danach wurde das Pellet in Puffer A mit 400 mM NaCl (Puffer A3) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, in der die Probe regelmäßig durchmischt wurde, und einer weiteren Ultrazentrifugation konnte die NAG-Kinase-Aktivität überwiegend im Überstand gemessen werden.

Zur weiteren Aufreinigung wurde der Überstand einer Gelfiltration (B.11.2) in Puffer A mit 150 mM NaCl (Puffer A4) unterzogen. Die Fraktionen, in denen NAG-Kinase-Aktivität beobachtet werden konnte, wurden vereinigt und durch Zugabe von Ammoniumsulfat (60% Sättigung) gefällt (B.9.2.). Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation gesammelt, gelöst und gegen Puffer A5 dialysiert (B.3.6.). Es folgte eine weitere Reinigung durch eine Ionenaustauscher-Chromatographie mit einer Uno-Q1 Säule (B.11.3.), bei der ein linearer Gradient von $75 - 400 \text{ mM}$ NaCl in Puffer A angelegt wurde.

Die NAG-Kinase wurde bis zur scheinbaren elektrophoretischen Homogenität aufgereinigt, die durch kolloidale *Coomassie Brilliant Blue* G250 Färbung (Roti-Blue, Carl Roth) (B.7.2.) gezeigt wurde. Das aufgereinigte Protein wurde auf Eis bis zur Benutzung gelagert.

13. Bestimmung des Molekulargewichtes

13.1. Eichung der Gelfiltrationssäule

Als Erstes musste die *Superdex 200 HR 10/30* Säule (Amersham Pharmacia Biotech) geeicht werden. Dazu wurden die folgenden Standardansätze in je $250 \mu\text{l}$ Puffer G (B.3.6.) gelöst:

Standard	Eingesetzte Konzentration	Molekulargewicht
Blue Dextran	2 mg/ml	2.000.000
β-Amylase	5 mg/ml	200.000
Alkoholdehydrogenase	3 mg/ml	150.000
BSA	10 mg/ml	66.000
Carbonanhydrase	2 mg/ml	29.000
Cytochrom C	10 mg/ml	12.400

Tabelle B.5.: Standardansätze zur Eichung der *Superdex 200*. In dieser Tabelle sind die verwendeten Standards mit ihren Molekulargewichten und den eingesetzten Konzentrationen aufgelistet.

Die Säule wurde in Puffer G (B.3.6.) äquilibriert und eine Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ angelegt. Als Erstes wurde *Blue Dextran* auf die Säule aufgetragen, um das Ausschlussvolumen zu ermitteln. Im zweiten Lauf wurden die Alkoholdehydrogenase und die Carbonanhydrase und im dritten Lauf das Cytochrom C auf die Säule aufgetragen. Im vierten Lauf diente Ovalbumin als Standard.

Die Elutionsprofile wurden durch den *BioLogic Controller* (Bio-Rad) aufgenommen und über das Computerprogramm *BioLogic HR Chromatography System* (Bio-Rad) verwaltet. Aus den Werten der angezeigten Peaks (Angabe des Elutionsvolumen) wurde eine Eichkurve erstellt. Die Volumenangabe wurde in Abhängigkeit zum jeweiligen Molekulargewicht in einem Graphen aufgetragen.

13.2. Gelfiltration von Proteinen

Nach Eichung der Gelfiltrationssäule wurde jeweils ein Aliquot der aufgereinigten und nativen Proteine auf die *Superdex 200* Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ eluiert. Des Weiteren wurden Fraktionen von 250 µl gesammelt, um entweder NAG-Kinase-Aktivitätstests oder Immunoblotanalysen durchführen zu können. Den Angaben zum Elutionsprofil wurde das Elutionsvolumen entnommen und in der vorher erstellten Eichgerade eingetragen. Es konnte so das Molekulargewicht der untersuchten Proteine abgelesen werden.

14. Immunologische Methoden

Es wurden in den immunologischen Methoden Kaninchen-AntiGlnK-Antiserum (GlnK-Antikörper) des 90. Immunisierungstages, Kaninchen-AntiTnrA-Antiserum (TnrA-Antikörper) des 140. Immunisierungstages oder Kaninchen-AntiGlnA-Antiserum (GS-Antikörper) des 90. Immunisierungstages verwendet. Die Herstellung der jeweiligen Antiseren erfolgte durch den Antikörper-Service Dr. J. Pineda (Berlin) unter der zu Hilfenahme der aufgereinigten Proteine GlnK (550 µg, eigene Diplomarbeit, 2002), TnrA (250 µg, diese Doktorarbeit) und GlnA-ST (630 µg, K. Woyda, 2004).

14.1. Immunoblotanalyse (*Western Blot*)

Die Proteine wurden mittels einer denaturierenden (SDS-PAGE) oder einer nicht denaturierenden (Nativ-Gel) Gelelektrophorese aufgetrennt und mit der Methode des *semi-dry-blottings* elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (BioTrace NT, Porengröße: 140 μm , Proteinbindekapazität: 209 $\mu\text{g cm}^{-3}$, PALL Gelman Laboratory) übertragen. Dieser Vorgang wurde bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA über 30 Minuten durchgeführt. Die Puffer für den *semi-dry-blot* sind in Punkt B.3.3. aufgeführt.

Beim Aufbau des *semi-dry-blots* war zu berücksichtigen, dass keine Lufteinschlüsse zwischen den unterschiedlichen Schichten sind, da sonst der korrekte Elektrotransfer nicht gewährleistet ist.

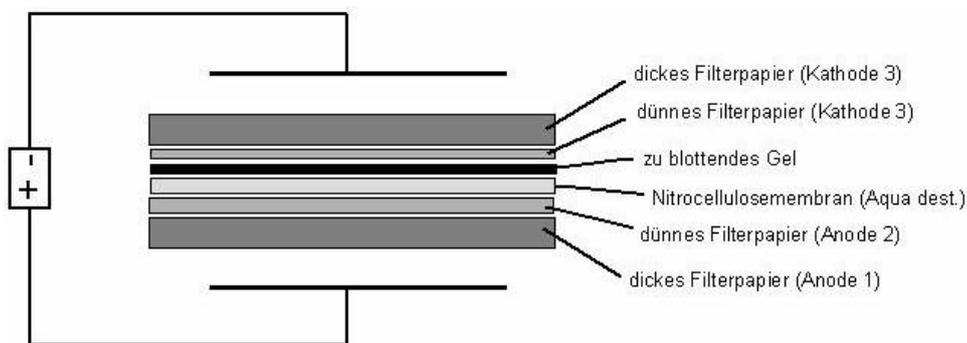


Abbildung B.7.: Aufbau des *semi-dry-blots*. Der Abbildung ist die Schichtung der mit Puffer getränkten Filterpapiere zu entnehmen. Es kommt durch diese Anordnung zu einem pH-Gradienten innerhalb des Aufbaus.

Nach 30 Minuten wurde die Nitrocellulosemembran dem Aufbau entnommen und in 5%igem Milchpulver (Roth) in TBS eingelegt. Die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken oder über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran in 1%iges Milchpulver in TBS transferiert. Dem 1%igen Milchpulver wurde eine 1 : 10.000fache Verdünnung des primären Antikörpers zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Schwenken über 2 Stunden oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen (je 30 Sekunden) in TBS wurde die Nitrocellulosemembran wieder in 1%iges Milchpulver in TBS überführt und eine 1:10.000fache Verdünnung des sekundären Antikörpers (*POD- α -Anti-Rabbit*, Sigma) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken für mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS (je 30 Sekunden) und zweimaligem Waschen in *Aqua dest.* wurde die Membran 1 Minute lang in Chemilumineszenz-Reagenz (*LumiLight – Western Blotting Substrate*, Roche) inkubiert und das Protein durch ein Chemiluminogramm (Filme: CEA RP NEW; Röntgen Bender, Karlsruhe; Röntgenentwickler und Fixierkonzentrat: Adefo-Chemie, Nürnberg) detektiert.

14.2. Dot Blot-Methode

Bei der Dot Blot-Methode werden 5 bis 10 µl der zu untersuchenden Proben direkt auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Nach vollständigem Trocknen der Nitrocellulosemembran wurde sie zur Absättigung in 5%igem Milchpulver (Roth) in TBS eingelegt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und mäßigem Schütteln wurde die Nitrocellulosemembran in 1%iges Milchpulver in TBS überführt. Der primäre Antikörper wurde in einer 1 : 10.000fachen Verdünnung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen (je 30 Sekunden) mit TBS wurde die Nitrocellulosemembran erneut in frische 1%ige Milch überführt. Des Weiteren wurde eine 1:10.000fache Verdünnung des sekundären Antikörpers (*POD-α-Anti-Rabbit*, Sigma) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit TBS und zweimaligem Waschen mit *Aqua dest.* wurde die Membran 1 Minute lang in Chemilumineszenz-Reagenz (*LumiLight – Western Blotting Substrate*, Roche) inkubiert und das Protein durch ein Chemiluminogramm (Filme: CEA RP NEW; Röntgen Bender, Karlsruhe; Röntgenentwickler und Fixierkonzentrat: Adefo-Chemie, Nürnberg) detektiert.

14.3. Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitationen wurden Zellextrakte verwendet, die wie in Punkt B.8.1. beschrieben, hergestellt worden sind. Diese Zellextrakte wurden mit modifiziertem NET-Puffer I (B.3.8.) auf ein Gesamtvolumen von einem Milliliter aufgefüllt. Es wurden dann 20 µl spezifischer Antikörper (GlnK-Antikörper oder TnrA-Antikörper) hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Die weiteren Schritte fanden bei 4°C statt.

Zur Vorbereitung der Protein-G-Sepharose wurden 100 µl Protein-G-Sepharose bei 14.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Protein-G-Sepharose-Pellet wurden 50 µl modifizierter NET-Puffer I gegeben und die Protein-G-Sepharose mit Hilfe eines Vortexgerätes im Puffer aufgenommen.

Zu dem gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex wurden anschließend 50 µl vorbereitete Protein-G-Sepharose gegeben, um den Antigen-Antikörper-Komplex aus dem Zellextrakt entfernen zu können. Es wurde nun eine Stunde unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Probe 30 Sekunden lang bei 14.000 rpm zentrifugiert (Hermle, Z 233 MK). Der Überstand wurde abgenommen und für spätere Prüfung der Aufreinigung bei -20°C gelagert. So wurde auch mit den folgenden Waschüberständen verfahren.

Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in einem Milliliter modifiziertem NET-Puffer I aufgenommen und für fünf Minuten inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C über 30 Sekunden. Der Überstand wurde abgenommen und, wie oben beschrieben, gelagert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Im dritten Waschschrift wurde zu dem Pellet ein Milliliter modifizierter NET-Puffer II (B.3.8.) gegeben und wiederum für 5 Minuten inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt.

Das erhaltene Pellet wurde in einem Milliliter Puffer IP (B.3.8.) suspendiert, fünf Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

Das Pellet, das den Antigen-Antikörper-Protein-G-Sepharose-Komplex darstellt, wurde in 100 µl 1xSDS-Auftragspuffer aufgenommen und drei Minuten lang bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Durch diesen Schritt wurde der Antigen-Antikörper-Komplex von der Protein-G-Sepharose gelöst. Es wurde dann für 30 Sekunden bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die wieder gelösten Antigene und Antikörper.

Im Anschluss an die Immunopräzipitation wurden SDS-Polyacrylamidgele und anschließende Immunoblotanalysen (B.14.1.) mit Aliquots der unterschiedlichen Waschschriffe durchgeführt, um die Aufreinigung auf eventuellen Proteinverlust zu prüfen.

Des Weiteren wurde eine 15%ige SDS-PAGE mit dem gesamten Immunopräzipitat durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Protein-Standard (B.3.12.1.) und aufgereinigtes Protein aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Färbung mittels *Coomassie blue* (B.7.2.).

15. Tryptischer In-Gel Verdau

Zum tryptischen In-Gel Verdau wurde das, in Punkt B.14.3. nach erfolgter Immunopräzipitation hergestellte *Coomassie* gefärbte SDS-Gel verwendet.

15.1. Vorbereitung der Trypsinlösung

20 µg Trypsin (Promega) wurden in 200 µl 50 mM Essigsäure aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das gelöste Trypsin wurde dann in 1,4 ml Trypsin-Digest 3 (B.3.9.) gegeben (Endkonzentration: 12,5 ng µl⁻¹).

15.2. Vorbereitung der Gelspots

Die *Coomassie blue* gefärbten Spots wurden mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und in mehrere kleine Stücke zerschnitten. Diese zerkleinerten Gelstücke wurden in ein 1,5 ml Plastik-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 µl Trypsin-Digest 1 (B.3.9.) zu den Gelstücken gegeben und 20 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Bei stark gefärbten Spots wurde dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Durch den hohen Anteil von Acetonitril schrumpften die Gelstücke und drückten so das *Coomassie* aus dem Gel heraus.

Um die Gelstücke wieder auf Originalgröße zu bringen und den pH einzustellen, wurde die überstehende Lösung abgenommen, verworfen und durch 500 µl Trypsin-Digest 2 (B.3.9.) ersetzt. Es folgte eine Inkubation über 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln. Der Überstand wurde anschließend verworfen.

Die Gelstücke wurden anschließend in einem Vakuum-Konzentrator (*Speed Vac Concentrator*, Savant) auf 20 bis 40 % des Ausgangsvolumens getrocknet. Dieser Vorgang dauerte ca. 30 min.

15.3. Enzymatischer Verdau

Auf das getrocknete Gelmaterial wurden 30 µl der vorbereiteten Trypsinlösung (B.15.1.) gegeben. Dies entspricht 375 ng Trypsin. Dieser Vorgang wurde in sechs Schritten à 5 µl durchgeführt, damit die Gelstücke die Lösung und somit das Trypsin besser aufnehmen konnten. Die Gelstücke wurden dann bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert.

15.4. Extraktion der Peptide

Zu den Gelstücken wurden 100 µl Stop- und Elutionslösung (B.3.9.) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im *Vakuum-Konzentrator* auf 1 bis 2 µl Rest-volumen eingengt. So vorbereitet, wurde die Peptidlösung mittels Massen-spektroskopie analysiert.

16. Massenspektroskopie (MALDI-TOF)

Die MALDI-TOF-MS Experimente wurden in Kooperation mit dem Institut für Analytische Chemie (D. Kirsch, AG Prof. B. Spengler, Justus-Liebig-Universität Giessen) durchgeführt. Die in Punkt B.15.4. aufbereitete und hochkonzentrierte Peptidlösung wurde per Massenspektroskopie untersucht. Dazu wurden 0,5 µl der Peptidlösung in 5 µl 2,5-Dihydroxybenzoesäure aufgenommen und auf einen mit Gold beschichteten Proben-teller aufgetragen. Der Mix wurde mit einem Fön bei schwacher Hitze auf dem Teller getrocknet.

Durch diesen Schritt kam es zu einer Kristallisation der Peptide. Der Probeneller wurde dann in das Massenspektrometer (ALADIM II, konstruiert von dem Institut für Analytische Chemie) eingespannt. Unter Vakuum-Bedingungen wurden die Peptidkristalle mit einem Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm für 3 ns mit einer beschleunigenden Energie von 18,5 keV beschossen. Dabei wurden die Kristalle ionisiert und vom Probeneller gelöst. Durch das Auftreffen der Ionen auf einem Detektorschirm konnte die Flugrate bestimmt und direkt zur Masse der Peptide umgerechnet werden. Die ermittelten Daten wurden dann durch ein Spektrum dargestellt.

Der Vorgang des Laserbeschusses wurde 100 bis 300 Mal wiederholt und die Spektren summiert. Das endgültig summierte Spektrum wurde in einem speziell entwickelten Computerprogramm weiterverarbeitet. Die einzelnen Peaks des Spektrums entsprachen direkt den molekularen Massen der Peptide. Diese Peaks wurden markiert und die erhaltenen Massenangaben in das Computersuchprogramm *Mascot* (Matrixscience, Perkins *et al.*, 1999) transferiert. Das Programm suchte dann nach den am wahrscheinlichsten zugehörigen Proteinen.

Die Suchkriterien für die erhaltenen Molekularmassen wurden auf eine Abweichung von $\pm 0,15$ Da gesetzt. Des Weiteren wurden maximal kein bzw. ein falsch geschnittenes Peptid pro Protein zugelassen. Proteine galten als identifiziert, wenn vier oder mehr Peptide mit den Suchkriterien übereinstimmten.

17. Elektrospray-Ionisierungsmassenspektrometrie (ESI-MS)

ESI-MS-Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Universität Marburg (U. Linne, AG Prof. M. Marahiel) durchgeführt. Die Chromatographie für ganze Proteinmassenbestimmung wurde an einem Agilent 1100 HPLC System (Agilent) durchgeführt. Es wurde eine Agilent *Zorbax 300 Stable Bond C8* mit einem Durchmesser von 2,1 mm und einer Länge von 50 mm verwendet. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 5% bis 95% Acetonitril in 0,05% Ameisensäure mit einer Flussrate von $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ über eine Dauer von 10 Minuten durchgeführt. Die Temperatur der Säule betrug 40°C .

18. Ligandenbindung – UV-Crosslink mit ATP/ADP an GlnK

UV-Crosslinking von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{ADP}$ an GlnK wurde nach der Methode von Najafi *et al.* (1997) und Lee *et al.* (2000) durchgeführt. Dazu wurden 7,5 μg GlnK mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($0,1 \mu\text{Ci } 100\mu\text{M}^{-1}$) oder $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{ADP}$ ($0,05 \mu\text{Ci } 50 \mu\text{M}^{-1}$) in der Gegenwart oder Abwesenheit von

divalenten Kationen (5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) und unterschiedlichen Mengen an α -Ketoglutarat in 25 μ l Puffer U inkubiert. Als Kompetitorprotein wurden 50 μ g BSA pro Ansatz dem Reaktionsmix hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben in ein Mikrotitergefäß überführt und auf Eis 20 Minuten lang UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm und 4 W (Hereaus) mit einem Abstand von einem Zentimeter ausgesetzt. Die Proben wurden anschließend mit 9 μ l 4x SDS-Auftragspuffer gemischt, vier Minuten bei 95°C inkubiert und mittels einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurden die Gele mit *Coomassie blue* G250 gefärbt, getrocknet und im Fall von [γ -³²P]ATP für 72 Stunden und im Fall von [8-¹⁴C]ADP eine Woche lang auf Phosphorscreens (Bio-Rad) exponiert. Die Phosphorscreens wurden mit dem Phospho-Imager-System (Personal Imager FX, Bio-Rad) mit einer Auflösung von 200 μ m ausgewertet.

19. Gelshift-Experimente

Ein möglicher Effekt von GlnK auf die DNA-Bindefähigkeit wurde mit *Gel Electrophoretic Mobility Shift Assays* (GEMSA) analysiert. Dazu wurde ein 166 bp großes Fragment des *nrgAB*-Promotors per PCR amplifiziert und mit [γ -³²P]ATP am 5'-Ende mit Hilfe der Polynukleotidkinase markiert (B.5.12.). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20 μ l in Bindepuffer (B.3.10.) durchgeführt. TnrA und GlnK wurden je nach Experiment zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 20 Minuten bei 30°C inkubiert, anschließend mit 4 μ l 6xDNA-Auftragspuffer (ohne Bromphenolblau) gemischt und auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Es folgte eine Gelelektrophorese mit 100 V für 105 Minuten. Danach wurde das Gel getrocknet und auf Phosphor-Screens (Bio-Rad) exponiert. Die Screens wurden nach 24 Stunden mit dem Phospho-Imager-System (Personal Imager FX, Bio-Rad) mit einer Auflösung von 200 μ m ausgewertet.

20. Enzymaktivitätstests

20.1. Glutamin-Synthetase (Biosynthetischer Test)

Die Glutamin-Synthetase katalysiert bei der Synthese von Glutamin eine Zweischnittreaktion, bei der ein Zwischenprodukt entsteht. Die Gesamtreaktion, welche aus einem Biosynthese- und einem Transferaseschritt zusammengesetzt ist, ist folgendermaßen aufgebaut:

- | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1. Schritt | Glutamat + ATP \rightarrow Glutamyolphosphat + ADP + H ₂ O |
| 2. Schritt | Glutamyolphosphat + Ammoniak \rightarrow Glutamin + P _i |

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der biosynthetische Test durchgeführt. In diesem Test katalysiert die Glutamin-Synthetase zwei Reaktionen, wobei Glutamat zunächst durch die Hydrolyse von ATP am C₅-Atom phosphoryliert wird und so Glutamyolphosphat und ADP entstehen. Im nächsten Schritt wird die Phosphatgruppe durch Hydroxamat ersetzt, wobei γ -Glutamyhydroxamat und Orthophosphat (P_i) gebildet werden. In diesem Test wurde Mg²⁺ als divalentes Kation für die Aktivität der Glutamin-Synthetase eingesetzt.



Die Glutamin-Synthetase wurde in definierten Konzentrationen (siehe C.3.) in 450 μ l des Reaktionsmixes (B.3.7.1) gemischt und für fünf Minuten bei 37°C im Heizblock (West 6100) vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 0,5 M Glutamat gestartet. Nach 20 Minuten (soweit nicht anders beschrieben) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stopplösung beendet. Durch die Zugabe der Stopplösung (B.3.7.3.) bildet sich Glutamyhydroxamat, das einen braunen Komplex bildet und gelegentlich ausfällt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wird die optische Dichte bei 540 nm (OD₅₄₀) bestimmt. Als Leerkontrolle diente ein Reaktionsansatz, dem keine Glutamin-Synthetase zugesetzt wurde.

Eine Einheit (U) Glutamin-Synthetase katalysiert die Umsetzung von 1 μ mol Glutamat pro Minute und wurde mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von 533 M⁻¹ cm⁻¹ (A₅₄₀) des γ -Glutamyhydroxamate-Fe³⁺-Komplexes berechnet (Bender *et al.*, 1977).

20.2. N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase (NAG-Kinase)

Der NAG-Kinase-Aktivitätstest wurde mit zellfreien Extrakten oder aufgereinigtem Protein wesentlich nach der Methode von Haas und Leisinger (1975) durchgeführt. Der pH des Reaktionspuffers N (B.3.7.2.) wurde auf 7,0 eingestellt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 40 nM N-Acetyl-L-glutamat (NAG) gestartet und dann bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 0,5 ml wurden nach 30 bis 60 Minuten durch Zugabe von 0,5 ml Stopplösung (B.3.7.3.) beendet. Als Leerkontrolle diente ein Reaktionsansatz, dem keine NAG-Kinase zugesetzt wurde.

Eine Einheit (U) NAG-Kinase katalysiert die Umsetzung von 1 μ mol NAG pro Minute und wurde mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von 456 M⁻¹ cm⁻¹ (A₄₅₀) des N-Acetyl-glutamyhydroxamate-Fe³⁺-Komplexes berechnet.

21. BIAcore Surface Plasmon Resonance Detection

Surface plasmon resonance-Experimente wurde mit Hilfe des BIAcore X Biosensor System (Biacore AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Um His₆-TnrA auf der Oberfläche des NTA-Biosensors zu immobilisieren, wurde als erstes Ni²⁺ auf die NTA-Oberflächen beider Messzellen geladen, indem 10 µl einer 0,5 mM NiSO₄-Lösung in beide Messzellen injiziert wurden. Danach wurden 1,4 µg His₆-TnrA in einem Volumen von 30 µl HBS-Puffer (B.3.13.) in die Messzelle 2 injiziert. Dies resultierte in einem Anstieg der Resonanzeinheiten von ca. 2.500. Die Experimente wurden bei 25°C in HBS-Puffer mit einer Flussrate von 20 µl min⁻¹ durchgeführt.

Um einen Effekt von kleinen Molekülen auf die Bindung der Glutaminsynthetase an His₆-TnrA zu analysieren, wurde die Glutaminsynthetase für fünf Minuten mit den jeweiligen Effektormolekülen (Konzentrationen sind dem Ergebnisteil C.3. zu entnehmen) auf Eis inkubiert und dann auf den Sensorchip injiziert. Zur neuen Beladung des Sensorchips mit His₆-TnrA wurden 50 µl einer 0,4 M EDTA-Lösung injiziert, um das bereits gebundene Ni²⁺ und His₆-TnrA vollständig zu entfernen. Danach konnte der Chip, wie bereits beschrieben, erneut mit Ni²⁺ und His₆-TnrA beladen werden.

C. Ergebnisse

I. *Bacillus subtilis* GlnK

1. Biochemische und physiologische Eigenschaften des *B. subtilis* GlnK-Proteins

1.1. Bindung von [γ - 32 P]ATP und [8- 14 C]ADP an GlnK

Auf Grund der hochkonservierten Aminosäuresequenz der P_{II} -Proteine, wurde die Bindung von ATP und α -Ketoglutarat als eine allgemeine Eigenschaft von Proteinen der P_{II} -Familie postuliert (Kamberov *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1998a; Forchhammer und Hedler, 1997). Anfängliche Versuche, ATP-Bindung an GlnK von *B. subtilis* durch die Ultrafiltrationsmethode, die bereits benutzt wurde, um ATP-Bindung an *E. coli* und *S. elongatus* P_{II} -Proteine (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997) zu zeigen, wies keine erkennbare Bindung auf (eigene Diplomarbeit). Allerdings ist diese Methode in Bezug auf den messbaren Bereich sehr limitiert, denn es kann damit nur eine hoch affine Bindung im Bereich der eingesetzten Proteinkonzentration detektiert werden (Voelker *et al.*, 1995; Ludwig *et al.*, 2002), während Bindung im millimolaren Bereich damit nicht gemessen werden kann.

Bei genauerer Betrachtung der GlnK-Sequenz von *B. subtilis* (vgl. Abb. C.1.) kann allerdings eine Abweichung in einem Aminosäurerest festgestellt werden, der als wichtig für die ATP-Bindung von *E. coli* GlnK gilt.

Bs GlnK 5	-	MFKVEIVTRP	ANFEKLRKQEL	GKIGVTSLTF	SNVHG	GLQK	AHTELYRGVK	55
Ec GlnK 1		MKLVTVIIKP	FKLEDVREAL	SSIGIQGLTV	TEVKGF	GRQK	GHAELYRGAE	50
consensus		M..V.**.*P	.**E.**.*L	**IG*.*LT	**V*G	.G.QK	*H*ELYRG**	
Bs GlnK 56		IESNVYERLK	IEIVVSKVPV	DQVTETAKRV	LKTGSP	GDGK	IFVYEISNTI	105
Ec GlnK 51		YSVNFLPKVK	IDVALADDQL	DEVIDIVSKA	AYTGKI	GDGK	IFVAELQRVI	100
consensus		...N...**K	I*****.*	D*V.*.****	..TG*.	GDGK	IFV.E**.*I	
Bs GlnK 106		NIR	TGEEGPE	AL				116
Ec GlnK 101		RIR	TGAEDEA	AL				112
consensus		.IRTGE	AL				

Abbildung C.1.: Sequenzvergleich von *B. subtilis* und *E. coli* GlnK. Dieses Alignment zeigt die Verwandtschaft zwischen GlnK von *B. subtilis* und *E. coli*. (-) in der Konsensussequenz steht für ähnliche Aminosäuren. Des Weiteren sind die für die ATP-Bindung relevanten Aminosäuren, die durch Kristallisationsstudien (Xu *et al.*, 2001) ermittelt worden sind, mit Kästchen umrandet. Die unterschiedlichen Arten der Linien (durchgezogen und gestrichelt) stehen für jeweils eine Untereinheit. Die entscheidenden Unterschiede der ATP-Bindungsstellen sind hellrot unterlegt.

Der Aminosäurerest 106 im *B. subtilis* GlnK, der dem Arginin 101 im *E. coli* GlnK entspricht, ist in *B. subtilis* durch ein Asparagin ausgetauscht. Um ATP- bzw. ADP-Bindung mit höheren Konzentrationen der Liganden detektieren zu können, wurden *UV-Crosslink*-Experimente mit [γ - 32 P]ATP bzw. [8- 14 C]ADP unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt. Die Methode des *Photolabeling* wurde bereits erfolgreich genutzt, um ATP- und ADP-Bindung an *S. elongatus* P_{II} (Maheswaran *et al.*, 2005) zu zeigen.

Bei den *UV-Photolabeling*-Experimenten wurden jeweils 7,5 µg GlnK in 25 µl Puffer UV in der Gegenwart von [γ - 32 P]ATP (0,1 µCi/100 µl) bzw. [8 - 14 C]ADP (0,05 µCi/50 µM) und in der An- oder Abwesenheit von verschiedenen divalenten Kationen und α -Ketoglutarat im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte überführt, um bessere Kühlung durch das Eis und bessere Exponierung zum UV-Licht zu gewährleisten. Nach einer 20minütigen Bestrahlung mit UV-Licht (B.18.) mit einem Abstand von einem Zentimeter wurde den Proben jeweils 9 µl 4xSDS-Auftragspuffer (B.3.2.) hinzugegeben, bei 95°C über vier Minuten aufgekocht und auf einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit *Coomassie blue* gefärbt (B.7.2.), getrocknet und auf *Phosphor-Screens* (Bio-Rad) für 72 Stunden (im Fall von ATP) bzw. eine Woche (im Fall von ADP) exponiert. Die *Screens* wurden anschließend im Phospho-Imager-System (Personal Imager FX, Bio-Rad) mit einer Auflösung von 200 µm gescannt.

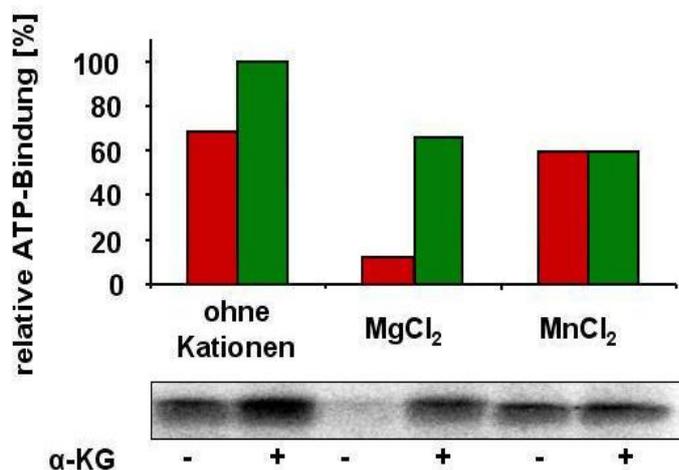


Abbildung C.2.: UV-Photolabeling von [γ - 32 P] ATP an GlnK. Die Experimente wurden in Abwesenheit von divalenten Kationen oder in der Gegenwart von MgCl₂ und MnCl₂ (jeweils mit einer Endkonzentration von 2 mM) und in Abwesenheit (rote Balken) oder Gegenwart (grüne Balken) von 1 mM α -Ketoglutarat durchgeführt. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Durchläufen abgebildet.

Wie in Abbildung C.2. zu sehen ist, konnte eine starke Bindung von ATP an GlnK in Abwesenheit von divalenten Kationen beobachtet werden. Diese Bindung konnte wesentlich durch die Gegenwart von α -Ketoglutarat gesteigert werden (um ca. 35%). In der Gegenwart von 2 mM MgCl₂ war die Bindung von ATP an GlnK deutlich reduziert. Allerdings konnte die Bindung von ATP an GlnK durch α -Ketoglutarat in der Gegenwart von MgCl₂ wiederhergestellt werden. Es konnte eine fünffache Steigerung der ATP-Bindung an GlnK festgestellt werden.

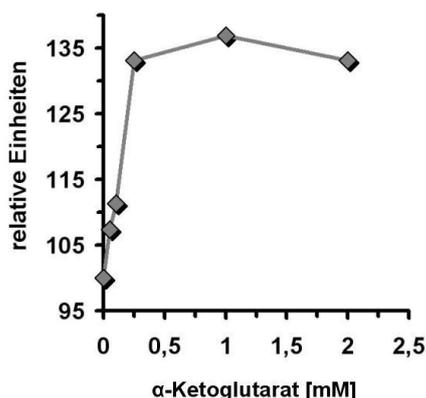
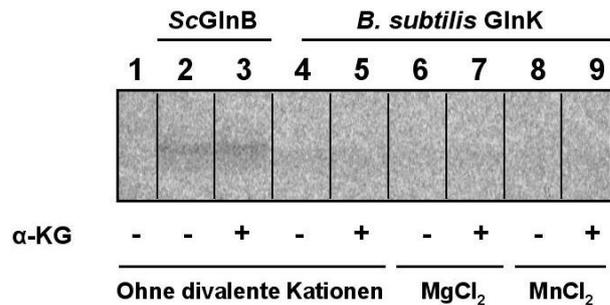


Abbildung C.3.: Effekt von α -Ketoglutarat auf die ATP-Bindung in den UV-Photolabeling-Experimenten in Gegenwart von 2 mM MgCl₂. GlnK wurde, wie bereits beschrieben, mit steigenden Konzentrationen von α -Ketoglutarat (0, 0,05, 0,1, 0,25, 1 bzw. 2 µM) inkubiert.

Titrationsexperimente zeigten, dass der Effekt von α -Ketoglutarat auf die Bindung von ATP an GlnK bereits ab einer Konzentration von 250 μ M gesättigt war (Abb. C.3.). In der Gegenwart von 2 mM $MnCl_2$ zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zu der Bindung von ATP in der Abwesenheit von divalenten Kationen. Allerdings konnte die Bindung von ATP nicht durch α -Ketoglutarat beeinflusst werden.

Abbildung C.4.: *UV-Photolabeling* von $[8-^{14}C]$ ADP an GlnK. Die Experimente wurden in Abwesenheit von divalenten Kationen oder in der Gegenwart von $MgCl_2$ oder $MnCl_2$ (jeweils mit einer Endkonzentration von 2 mM) und in Abwesenheit oder Gegenwart von 1 mM α -Ketoglutarat durchgeführt. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Durchläufen abgebildet. (1) Negativkontrolle ohne P_{II} , (2) und (3) Positivkontrolle mit *S. elongatus* P_{II} (ScGlnB), (4) bis (9) *B. subtilis* GlnK.



Bindung mit $[8-^{14}C]$ ADP an *B. subtilis* GlnK konnte durch *UV-Photolabeling*-Experimente im Gegensatz zu der Bindung von ADP an *S. elongatus* P_{II} , wie es durch die gleiche Methode (Maheswaran *et al.*, 2005) bereits gezeigt worden ist, nicht detektiert werden (Abb. C.4.).

1.2. Zelluläre Lokalisation von *B. subtilis* GlnK

Frühere Studien zur Lokalisation von GlnK zeigten, dass dieses Protein mit dem Ammoniumtransporter AmtB einen Membran-lokalisiereten Komplex bildet (Coutts und Merrick, 2002). Ebenso konnte dies für das *B. subtilis* GlnK unter Bedingungen von Stickstofflimitierung (Anzucht mit 0,2% (w/v) Glutamat) und nach Ammoniumchock gezeigt werden (Detsch und Stülke, 2003).

In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in der vorausgegangenen Diplomarbeit (Heinrich, 2001) die Membranassoziation von *B. subtilis* GlnK in Extrakten von in Nitrat gezogenen Zellen gezeigt werden. Um nun zu untersuchen, ob die Liganden ATP und α -Ketoglutarat die Bindung von GlnK an die Membran beeinflussen, wurden in Nitrat (20 mM) gewachsene Zellen ($OD_{600} = 0,8$) in der Abwesenheit oder Gegenwart von divalenten Kationen, mit oder ohne α -Ketoglutarat mit ansteigenden Mengen an ATP fraktioniert (B.9.4.). Die Verteilung von GlnK auf die cytosolische und membranhaltige Fraktion wurde durch Immunoblotanalysen und densitometrische Quantifizierung der resultierenden Banden ermittelt.

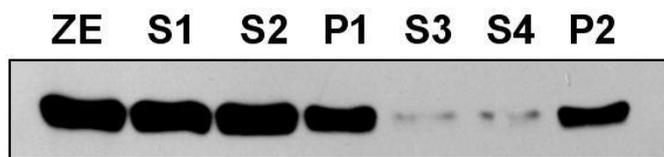


Abbildung C.5.: Beispiel für eine Fraktionierung von GlnK. Die Abbildung zeigt einen Immunoblot, nach erfolgter Fraktionierung eines Zellextraktes von

B. subtilis. Die Zellen wurden in diesem Fall in Gegenwart von 2 mM $MgCl_2$ mit dem RiboLyser (B.8.1.) aufgebrochen und anschließend fraktioniert (B.9.4.). (ZE) Zellextrakt, (S1) oberer und (S2) untere Überstand, (P1) Pellet nach 1. Zentrifugation, (S3) oberer und (S4) unterer Überstand, (P2) Pellet nach 2. Zentrifugation.

In der Abwesenheit von sowohl ATP als auch divalenten Kationen (C.6.A.) waren nur 15% des gesamten GlnK an die Membran gebunden. In der Gegenwart von 2 mM $MnCl_2$ waren hingegen 40% (C.6.B.) und in der Gegenwart von 2 mM $MgCl_2$ sogar 50% (C.6.C.) des gesamten GlnK an die Membran assoziiert.

In allen drei Fällen führte eine Erhöhung der ATP-Konzentration zu einem Ablösen des GlnK-Proteins von der Membran. Eine Konzentration von 4 mM ATP hatte eine vollständige Auflösung der Bindung an die Membran zur Folge. Der Effekt von ATP auf die Membranbindung von GlnK wurde durch die Zugabe von 1 mM α -Ketoglutarat im Zellaufbruchspuffer verstärkt (C.6., Dreieckssymbole), speziell im Zusammenspiel mit $MgCl_2$.

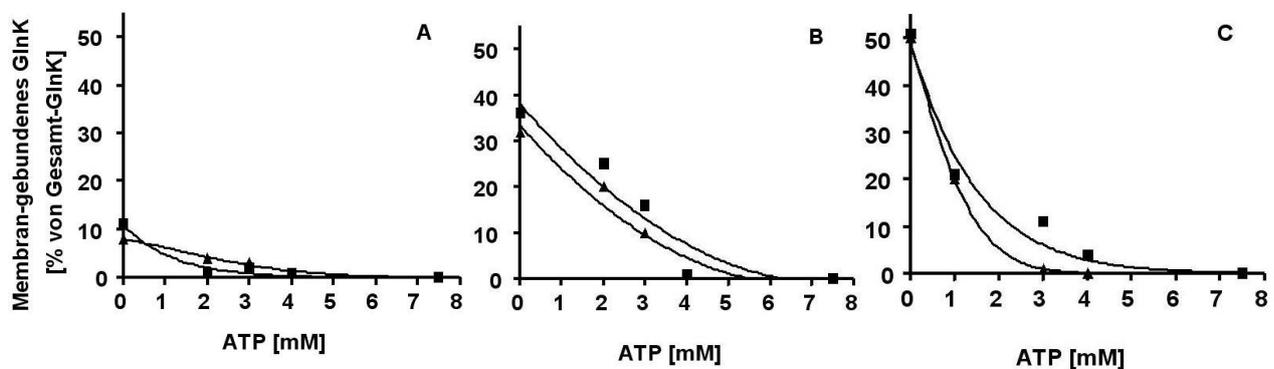


Abbildung C.6.: Effekt von ansteigenden Konzentrationen von ATP auf die Lokalisation von GlnK in Zellen, die mit 20 mM Nitrat angezogen worden sind. Die Zellextrakte wurden in der Abwesenheit von divalenten Kationen (A), oder in der Gegenwart von 2 mM $MnCl_2$ (B) oder 2 mM $MgCl_2$ (C) mit (■) oder ohne (▲) 1 mM α -Ketoglutarat fraktioniert und durch Immunoblots und anschließender densitometrischen Quantifizierung analysiert.

Um den spezifischen Effekt von ATP auf die Membranbindung von GlnK zu zeigen, wurden andere Nukleotide (ADP, GTP, CTP und UTP) mit einer Endkonzentration von 10 mM unter den oben genannten Bedingungen getestet.

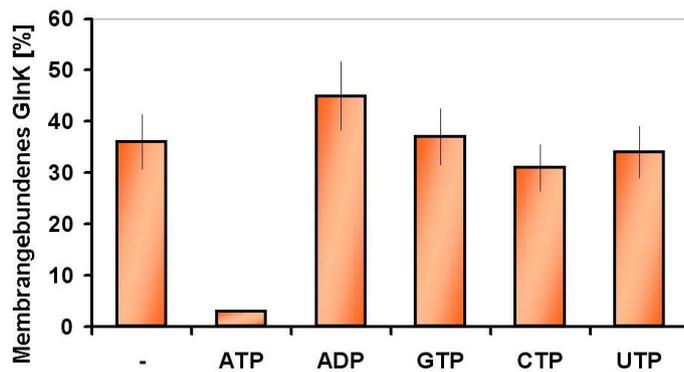


Abbildung C.7.: Effekt von unterschiedlichen Metaboliten (10 mM) auf die Lokalisation von GlnK in Zellen, die mit 20 mM Nitrat angezogen worden sind. Die Zellextrakte wurden in der Gegenwart von 2 mM MnCl_2 fraktioniert und durch Immunoblots und anschließender densitometrischen Quantifizierung analysiert.

Wie in Abbildung C.7. zu sehen ist, zeigten diese Metaboliten keinen gravierenden Effekt auf die Membranbindung von GlnK, was die Spezifität des ATP-Effektes bestätigt.

1.3. Modifizierung von *B. subtilis* GlnK

Um zu analysieren, ob *B. subtilis* GlnK kovalent modifiziert ist, wurden in früheren Studien nicht-denaturierende PAGE-Analysen benutzt (eigene Diplomarbeit). Diese Methode wurde bereits erfolgreich verwendet, um kovalente Modifikationen des P_{II} -Proteins anderer Bakterienstämme aufzuzeigen. Dafür wurden *B. subtilis* Zellen unter Stickstoffüberschuss (NH_4Cl) angezogen und während der exponentiellen Phase auf Nitrat-haltiges Medium *geschiftet*. In den ersten zwei Stunden nach Initiierung des Stickstoffmangels stieg die Menge an GlnK stark an. Des Weiteren konnten zusätzliche schneller wandernde Banden in der nicht-denaturierenden PAGE beobachtet werden (eigene Diplomarbeit). Diese Banden sind ein Anzeichen für eine posttranslationale Modifikation des GlnK-Proteins. In allen bisher untersuchten Fällen stellten sie kovalente Modifikationen mit negativer Ladung dar. Die Modifikation erfolgt als schnelle und reversible Antwort des P_{II} -Proteins auf den Stickstoffgehalt in der Zelle.

Um herauszufinden, ob diese schnelleren wandernden Banden von *B. subtilis* GlnK durch eine reversible Modifikation verursacht werden, wurden die Zellen wieder in Stickstoff-reiches Medium (NH_4Cl) überführt. In der Folge der Ammoniumzugabe nahm die Menge an GlnK im Lauf der Zeit zwar graduell ab, aber eine Demodifikation konnte durch die nicht-denaturierende PAGE nicht beobachtet werden (eigene Diplomarbeit).

Auch konnte bisher die chemische Natur dieser beobachteten Modifikation nicht aufgedeckt werden. Durchgeführte Experimente, in denen Proteinextrakte, die die modifizierten Formen des GlnK enthielten, mit Phosphodiesterase (SVD) oder alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt wurden, konnten keine Veränderungen im Laufverhalten dieser Banden herbeiführen (eigene Diplomarbeit). Dies spricht entschieden dafür, dass die beobachtete Modifikation weder auf einer Uridylierung, Adenylierung noch auf einer Phosphorylierung basiert.

In *B. subtilis* sind potentielle Modifikationsstellen, wie z.B. der Tyrosinrest 51, der in Proteobakterien uridyliert wird, oder der Serinrest 49, der in Cyanobakterien phosphoryliert wird, nicht konserviert. Um einen weiteren Hinweis auf die beobachtete Modifikation zu bekommen, wurde GlnK aus *B. subtilis*-Zellen, die unter Stickstofflimitierung angezogen worden waren, nativ aufgereinigt, um dies anschließend einer massenspektrometrischen Untersuchung zu unterziehen.

1.3.1. Aufreinigung von nativem GlnK aus *B. subtilis*

Dazu wurden *B. subtilis* Zellen in SMM mit 5 mM NaNO₃ in einem Gesamtvolumen von 1,5 l bis zu einer OD₆₀₀ von 1,7 angezogen und dann durch Zentrifugation (B.2.2.3.) geerntet. Die nun folgenden Schritte fanden bei 4°C statt. Das Zellpellet (20 g) wurde in 40 ml Zellaufbruchpuffer Z (B.3.5.) gelöst. Es folgte eine dreimalige Passage durch die *French-Press*-Zelle zum Aufbruch der Zellen. Nach Entfernen von nicht vollständig aufgebrochenen Zellen und Zelltrümmern (B.9.1.) wurde der Überstand erneut 20 Minuten lang zentrifugiert (12.500 rpm). Anschließend wurde eine 20%ige β -Mercaptoethanol-Fällung durchgeführt (Zugabe von 6,8 ml auf 34 ml zellfreien Extraktes). Die Fällung erfolgte auf Eis. Nach einer 10minütigen Zentrifugation (10.000 rpm) wurde der Überstand über Nacht gegen einen Liter Puffer H (B.3.6.) dialysiert.

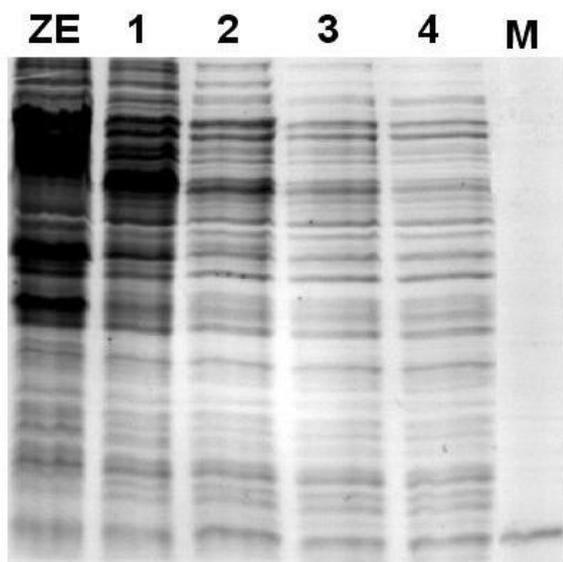


Abbildung C.8.: Vortest zur β -Mercaptoethanol-Fällung. Um die optimale Konzentration des β -Mercaptoethanols herauszufinden, wurden unterschiedliche Konzentrationen angewendet. Es folgte eine 15%ige SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie*-Färbung zur Identifizierung der idealen β -Mercaptoethanol-Konzentration. (ZE) bezeichnet den frisch aufgebrochenen Zellextrakt. (1) zellfreier Proteinextrakt, (2) Überstand nach 16%iger, (3) nach 19%iger und (4) nach 22%iger β -Mercaptoethanol-Fällung. (M) bezeichnet aufgereinigtes GlnK als Kontrolle.

Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 10.000 rpm) wurde der Überstand auf eine Heparin-Säule gegeben. Es wurden 10 ml Fraktionen mit einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹ gesammelt. Der an die Säule angelegte Gradient verlief von 50 bis 400 mM NaCl in Puffer H.

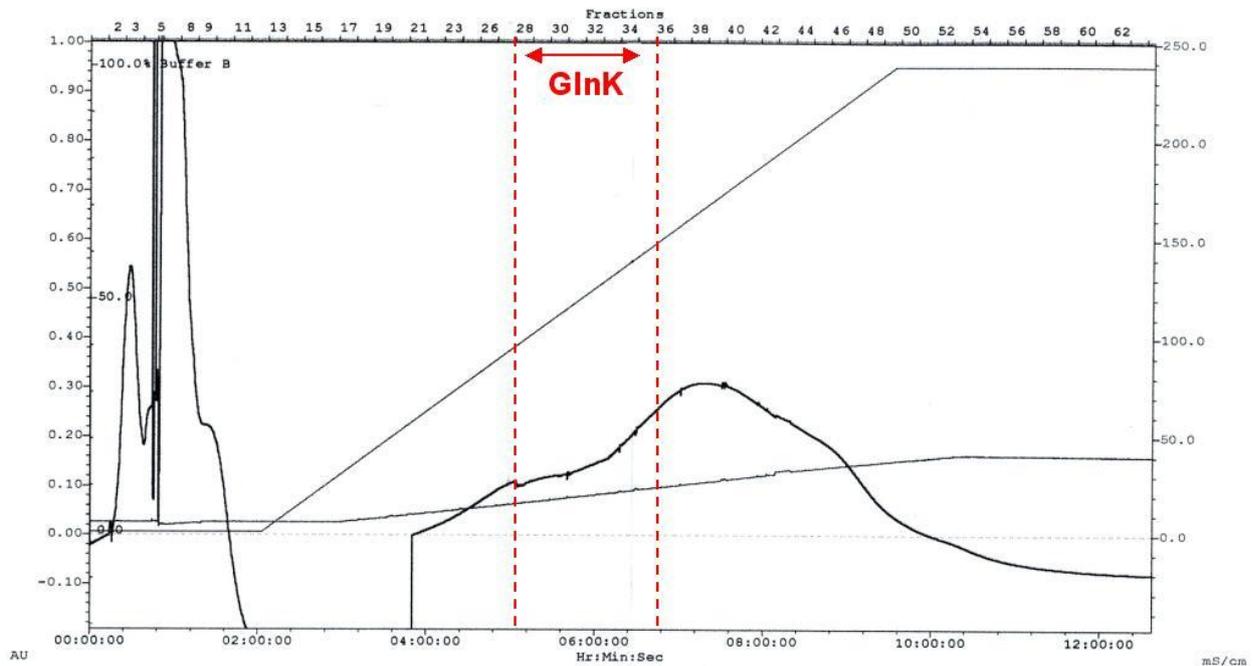
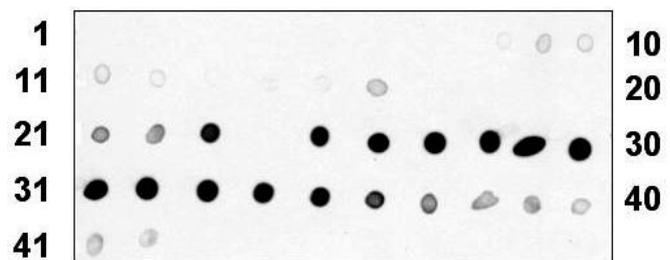


Abbildung C.9.: Elutionsprofil der Heparin-Säule. Die schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-haltigen Fraktionen an, die durch Dot-Blot detektiert worden sind (vgl. Abb. C.10.).

Im Anschluss an die Säule wurden die GlnK-haltigen Fraktionen durch Dot-Blot (B.14.2.) identifiziert. Das native GlnK eluierte bei einem Salzgehalt zwischen 150 und 225 mM.

Abbildung C.10.: Analyse der Fraktionen der Heparin-Säule auf ihren Gehalt an GlnK per Dot Blot.



Das Protein in den GlnK-haltigen Fraktionen wurde durch Ammoniumsulfat gefällt (60% Endkonzentration; 29,6 g auf 81 ml Proteinlösung) und über Nacht im Kühlraum gelagert. Das Proteinpellet wurde am darauffolgenden Tag durch Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 10 min) und in 10 ml 50%iger Ammoniumsulfatlösung aufgenommen. Es folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt über eine *Superdex 200* Gelfiltrationssäule (B.11.2.). Während der Gelfiltration wurden 3 ml Fraktionen mit einer Flussrate von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ gesammelt.

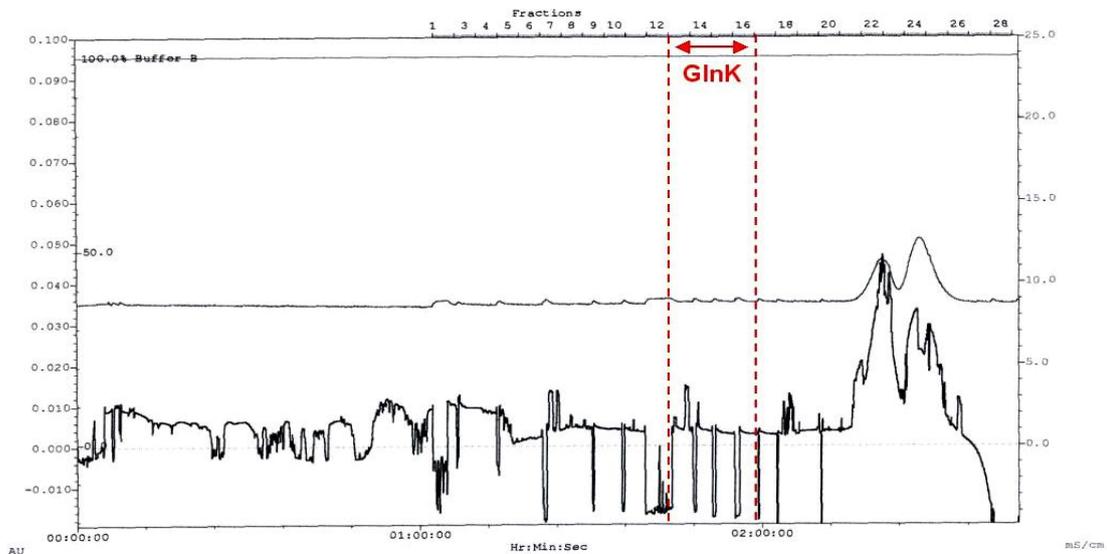
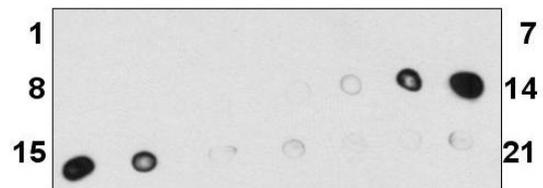


Abbildung C.11.: Elutionsprofil der Gelfiltration (oben). Die schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-haltigen Fraktionen an, die durch Dot-Blot detektiert worden sind (rechts).



Die GlnK-haltigen Fraktionen wurden per Dot-Blot detektiert (Fraktionen 13 bis 16, Abb. C.11.) und auf eine UnoQ-Säule (B.11.3.) aufgetragen, die mit Puffer U (B.3.6.) äquilibriert worden ist. Der Salz-Gradient (50 bis 400 mM NaCl) wurde mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} angelegt. Es wurden 1 ml große Fraktionen während des ganzen Laufes gesammelt.

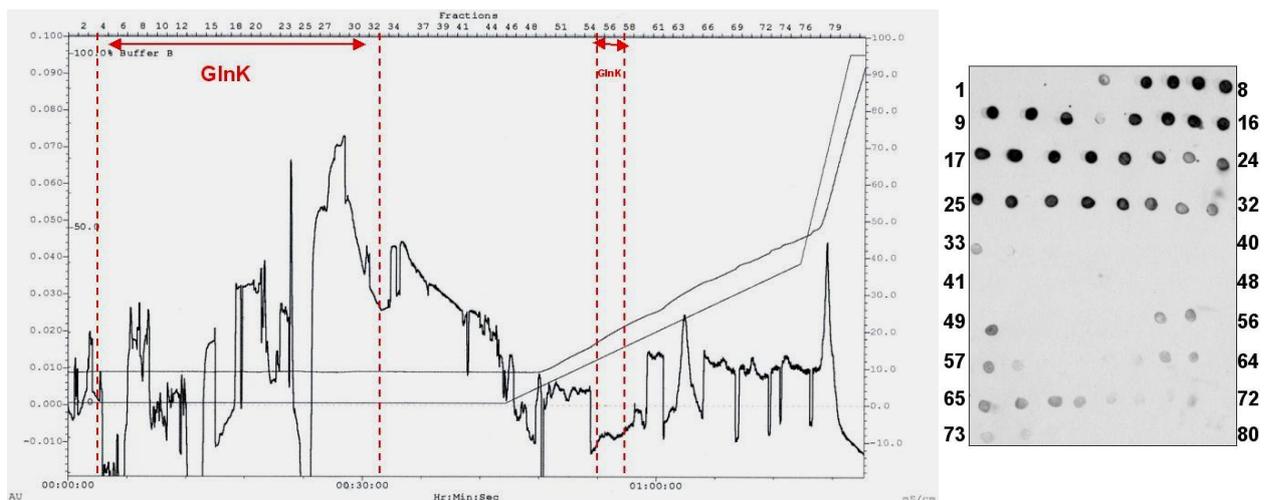


Abbildung C.12.: Elutionsprofil der UnoQ-Säule (links). Die schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-haltigen Fraktionen an, die durch Dot-Blot detektiert worden sind (rechts).

Da sich das meiste GlnK im Durchlauf befand, wurde außerdem eine HighS-Säule (B.11.3.) mit Puffer H (B.3.6.) zur Aufreinigung genutzt. Die Fraktionen 4 bis 33 wurden vereint und auf die HighS-Säule aufgetragen. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ gesammelt.

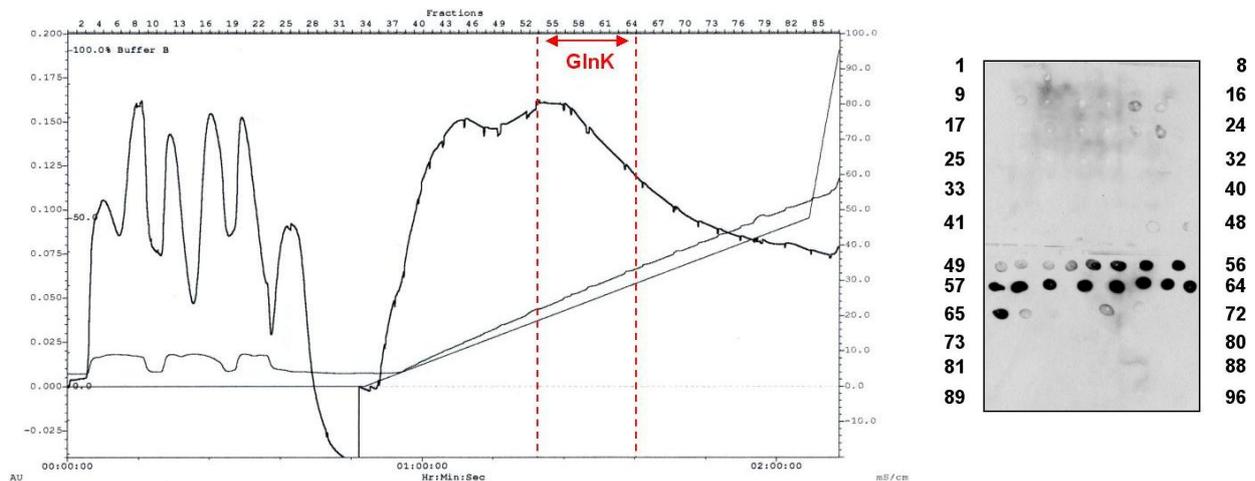


Abbildung C.13.: Elutionsprofil der HighS-Säule (links). Die schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-haltigen Fraktionen an, die durch Dot-Blot detektiert worden sind (rechts).

Des Weiteren wurden die GlnK-haltigen Fraktionen in einer 15%igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung auf elektrophoretische Homogenität untersucht (Abb. C.14.). Dazu wurden pro Fraktion 30 µl in das Gel eingesetzt.

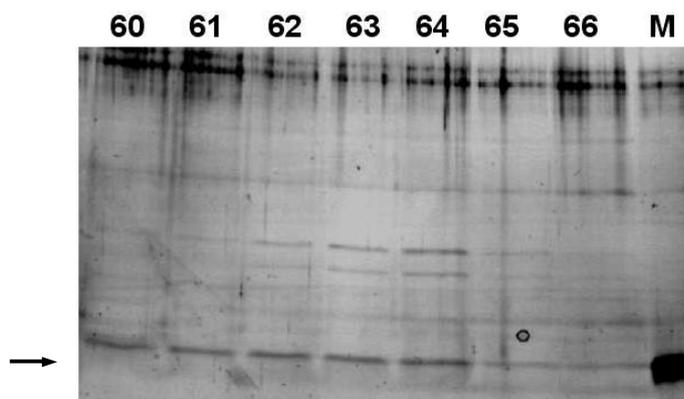


Abbildung C.14.: 15%ige SDS-PAGE der untersuchten Fraktionen. Die Proteine wurden mit *Coomassie blue* (B.7.2.) angefärbt. Die Zahlen 60 bis 66 stehen für die untersuchten Fraktionen. (M) steht für aufgereinigtes GlnK, das als Marker ein-gesetzt worden ist. Die Lage von GlnK ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Fraktionen 60 bis 66 wurden vereint und in einem Vakuum-Konzentrator (*Speed Vac Concentrator*, Savant) aufkonzentriert. Anschließend wurde die aufkonzentrierte Proteinlösung auf ein 15%iges Gel aufgetragen. Des Weiteren wurden 600 ng aufgereinigtes *B. subtilis* GlnK, das in *E. coli* überproduziert worden war (eigene Diplomarbeit) auf das Gel aufgetragen, um eine Kontrolle ohne Modifikation zu haben. Die Banden wurden mit Sypro®-Orange angefärbt, die entsprechenden GlnK-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und bis zum Trypsin-Verdau bei -20°C gelagert.

Das *Sypro®-Orange*-gefärbte Gelstück wurde zur Vergrößerung der Oberfläche in mehrere kleinere Stücke zerschnitten und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu dem Gelstück wurden 500 µl Trypsin-Digest 1 (B.3.9.) gegeben und in diesen bei 30°C unter Schütteln für 20 min inkubiert. Die überstehende Lösung wurde abgenommen, verworfen, durch 500 µl Trypsin-Digest 2 (B.3.9.) ersetzt und in diesem 30 Minuten lang bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Auch dieser Überstand wurde anschließend verworfen. Die Gelstückchen wurden dann in der *Speedvac* auf ca. 30% des Ausgangsvolumens getrocknet. Auf das getrocknete Gelmaterial wurden 30 µl der Trypsinlösung (B.3.9.) gegeben. Dieser Vorgang wurde in sechs Schritten à 5 µl durchgeführt, damit die Gelstücke die Lösung und somit das Trypsin besser aufnehmen konnten. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln. Zu den Gelstücken wurden 100 µl Stopp- und Elutionslösung (B.3.9.) gegeben und eine weitere Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der *Speedvac* auf 1 bis 2 µl Restvolumen eingengt. So vorbereitet, wurde die Peptidlösung zur Massenspektroskopie gegeben.

Die massenspektroskopische Untersuchung wurde in Kooperation mit dem Institut für Analytische Chemie (Dr. Dieter Kirsch, AG Prof. Bernhard Spengler, Universität Gießen) durchgeführt. Allerdings sind die Messungen des Proteins fehlgeschlagen und führten somit zu keinem Ergebnis.

1.3.2. Aufreinigung von überproduziertem GlnK-ST in *B. subtilis* und *E. coli*

Nachdem sich die Aufreinigung von nativen *B. subtilis* GlnK als äußerst aufwendig erwies und die Ausbeute sehr niedrig ausfiel (s.o.), wurde ein *Strep-tag* GlnK Fusionsprotein (GlnK-ST) konstruiert (Diplomarbeit, K. Woyda), um die Aufreinigung von GlnK zu erleichtern. Dazu wurde das Plasmid pDG148-GlnK-ST sowohl in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3), als auch in der *glnK*-defizienten Mutante GP253 von *B. subtilis* überproduziert und aufgereinigt. Das Plasmid pDG148-GlnK-ST führte in beiden Fällen zu einer Überproduktion eines 13,5 kDa großen Proteins, das als *B. subtilis* GlnK durch Immunoblot-Analysen identifiziert werden konnte (siehe unten).

1.3.2.1. Aufreinigung von GlnK-ST aus *B. subtilis*

Nach erfolgter Transformation von *B. subtilis* GP253 (*glnK*-defiziente Mutante) mit dem Plasmid pDG148-GlnK-ST nach der Methode von Cutting und Vander Horn (1990), wurden die Transformanten auf Phleomycin- ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) und Chloramphenicol-haltigen ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) LB-Platten selektiert.

B. subtilis GP253-Zellen, die das Plasmid pDG148-GlnK-ST tragen, wurden in einem Liter SMM mit 20 mM NaNO₃ als einzige Stickstoffquelle auf eine OD₆₀₀ von 0,074 angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,9 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 1,4 geerntet (B.2.2.3.). Das Zellpellet (5,3 g) wurde mit Zellaufbruchpuffer Z (B.3.5.) gewaschen und bei -20°C gelagert.

Alle nun folgenden Schritte fanden bei 4°C statt. Am darauf folgenden Tag wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 20 ml Zellaufbruchpuffer Z resuspendiert. Die Zugabe von 0,2 mM PMSF erfolgte kurz vor Zellaufbruch. Nach dem Aufbrechen der Zellen durch dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (B.8.2.) wurden nicht aufgebrochene Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 6.000xg und 30 min, 12.000xg) entfernt. Der Überstand (18 ml) wurde über eine 5 ml *Strep-Tactin*-Säule (B.11.1.) mit einer Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ geleitet, die vorher mit Waschpuffer S1 (B.3.6.) äquilibriert worden ist. Unspezifisch-gebundenes Protein wurde auf diese Weise ausgewaschen. Von dem Durchlauf wurden 1 ml große Fraktionen und von dem Elutionsbereich 0,5 ml große Fraktionen gesammelt. Das affin gebundene Protein wurde mit Elutionspuffer S2 (B.3.6.) von der Säule gelöst.

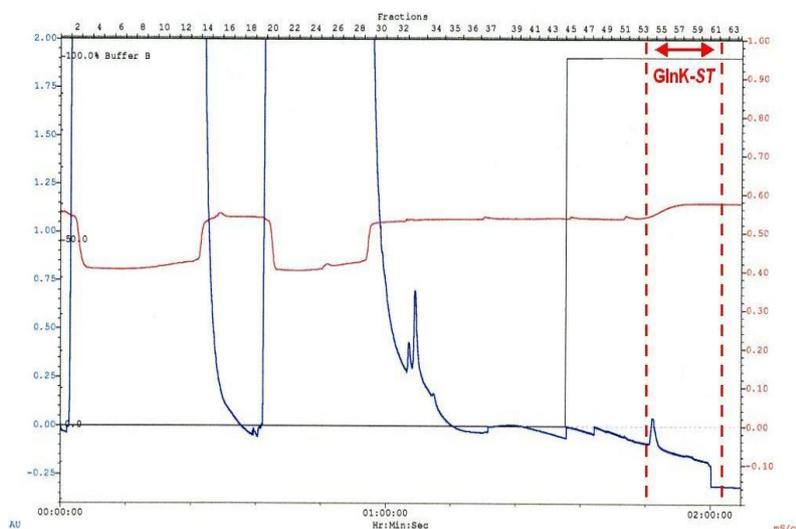


Abbildung C.15.: Elutionsprofil der *Strep-Tactin*-Säule. Die blaue Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-ST-haltigen Fraktionen an, die durch 15%ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung als auch Immunoblot detektiert worden sind (vgl. Abb. C.16.).

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden zwei Arten von Proteindetektion vorgenommen. Zum einen wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie*-Färbung und zum anderen per Immunoblot mit GlnK-spezifischen Antikörpern analysiert. Dazu wurden 5 µl der Fraktionen für den Immunoblot bzw. 10 µl für die *Coomassie*-Färbung in die 15%igen SDS-Gele eingesetzt.

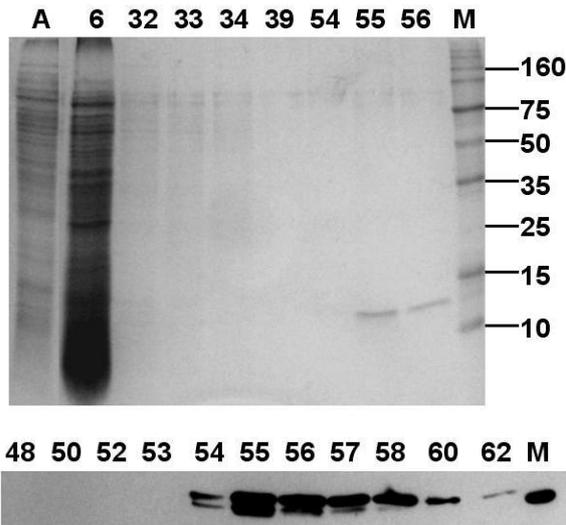


Abbildung C.16.: 15%ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (oben) bzw. Immunoblot-Analyse (unten). (A) bezeichnet das Ausgangsmaterial, das auf die *Strep-Tactin*-Säule aufgetragen worden ist. Die Zahlen 6 bis 62 stehen für die gesammelten Fraktionen. (M) bezeichnet zum einen den Proteinmarker *Broad range* (Coomassie-gefärbtes Gel) in kDa bzw. bereits aufgereinigtes GlnK (Immunoblot) als Kontrolle.

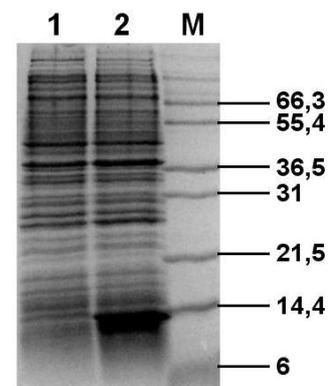
Die Fraktionen 54 bis 61 wurden vereint und über Nacht gegen Lagerpuffer (B.3.11.) dialysiert. Das Protein wurde bis zur Untersuchung durch Elektrospray-Ionisierungsmassenspektrometrie (B.17.) bei -20°C gelagert.

1.3.2.2. Aufreinigung von GlnK-ST aus *E. coli*

Nach erfolgter Transformation (B.5.10.) von *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pDG148-GlnK-ST nach der Methode von Hanahan *et al.* (1985), wurden die Transformanten auf Ampicillin-haltigen ($100\ \mu\text{g ml}^{-1}$) LB-Platten selektiert.

E. coli BL21(DE3)-Zellen, die das Plasmid pDG148-GlnK-ST tragen, wurden in einem halben Liter LB-Medium auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,7 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 1,6 geerntet (B.2.2.3.). Das Zellpellet (4,2 g) wurde mit Zellaufbruchpuffer X (B.3.5.) gewaschen und bei -20°C gelagert.

Abbildung C.17.: Überproduktion von *B. subtilis* GlnK-ST in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Das mit Coomassie gefärbte 15%ige SDS-Gel zeigt den Zellextrakt vor (1) und nach (2) erfolgter Induktion. (M) Marker in kDa.



Alle nun folgenden Schritte fanden bei 4°C statt. Am darauf folgenden Tag wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 15 ml Zellaufbruchspuffer X (B.3.5.) resuspendiert. Die Zugabe von 0,2 mM PMSF erfolgte kurz vor Zellaufbruch. Nach dem Aufbrechen der Zellen durch dreimalige Passage durch eine *French-Press-Zelle* (B.8.2.) wurden nicht aufgebrochene Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 6.000xg und 30 min, 12.000xg) entfernt. Der Überstand (12 ml) wurde über eine *Strep-Tactin-Säule* (B.11.1.) mit einer Flussrate von 2,5 ml min⁻¹ geleitet, die vorher mit Waschpuffer S1 (B.3.6.) äquilibriert worden ist. Unspezifisch-gebundenes Protein wurde auf diese Weise ausgewaschen. Es wurden 3 ml große Fraktionen gesammelt. Das affin gebundene Protein wurde mit Elutionspuffer S2 (B.3.6.) von der Säule geholt.

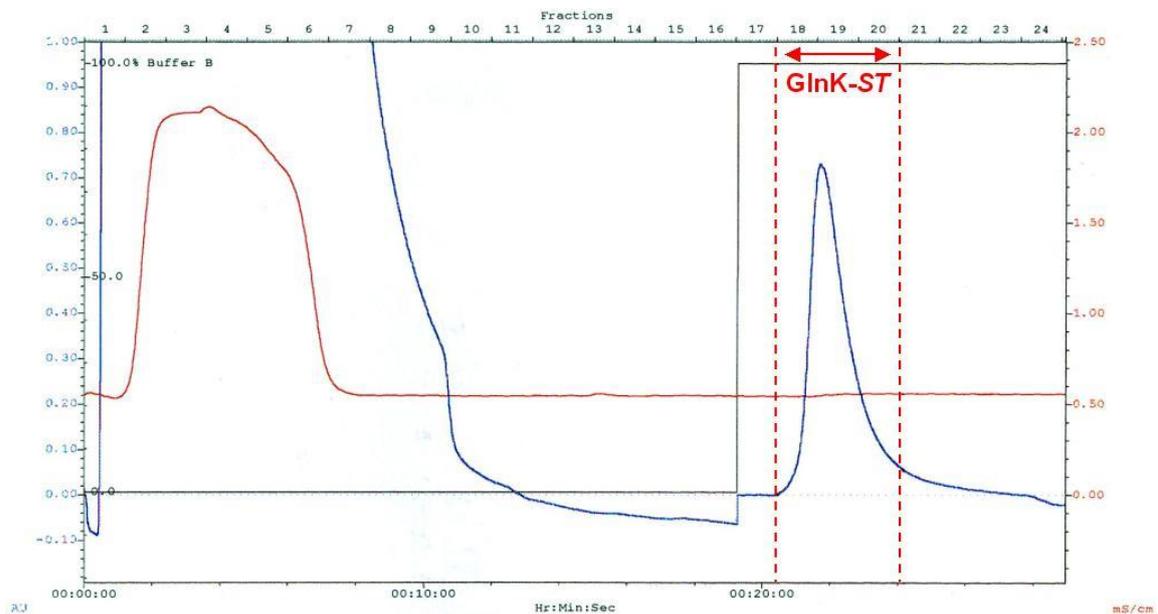


Abbildung C.18.: Elutionsprofil der *Strep-Tactin*-Säule. Die blaue Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-ST-haltigen Fraktionen an, die durch ein 15%iges SDS-Gel, das mit Coomassie angefärbt worden ist, detektiert worden sind (vgl. Abb. C.19.).

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Fraktionen durch 15%ige SDS-PAGE und anschließender *Coomassie*-Färbung analysiert. Dazu wurden 10 µl der Fraktionen für die *Coomassie*-Färbung in das 15%ige SDS-Gel eingesetzt.

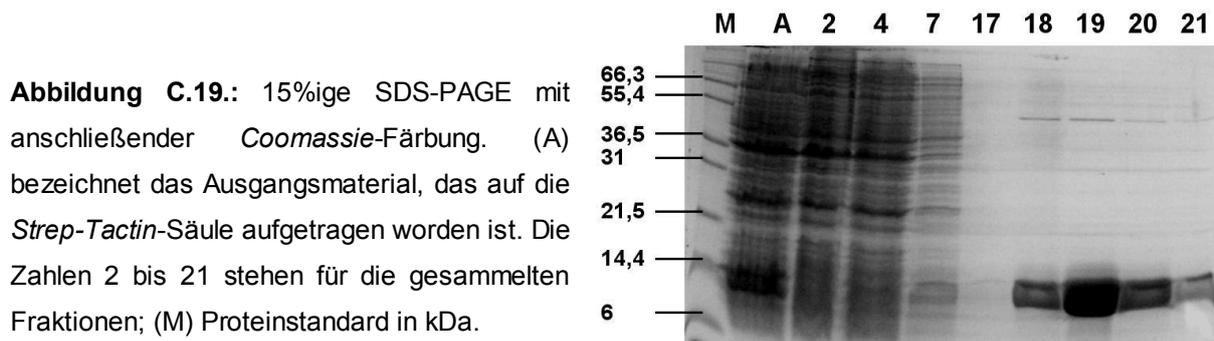


Abbildung C.19.: 15%ige SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie*-Färbung. (A) bezeichnet das Ausgangsmaterial, das auf die *Strep-Tactin*-Säule aufgetragen worden ist. Die Zahlen 2 bis 21 stehen für die gesammelten Fraktionen; (M) Proteinstandard in kDa.

Da die GlnK-ST-haltigen Fraktionen (18 bis 20) noch nicht vollständig elektrophoretisch homogen waren, wurden die Fraktionen vereinigt (9 ml) und zum Einengen des Volumens die Proteine mit 4,71 g Ammoniumsulfat (Endkonzentration 80%) unter langsamen Rühren gefällt. Die Fällung erfolgte über Nacht im Kühlraum. Nach Ernten der Ammoniumsulfat-gefällten Proteine (Zentrifugation: 15 min, 15.000 rpm) wurde das Proteinpellet in 1 ml Gelfiltrationspuffer G (B.3.6.) gelöst und in zwei Durchgängen à 500 µl per Gelfiltration (*Superdex 200 HR 10/30*) gereinigt. Es wurden 2 ml Fraktionen mit einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹ gesammelt.

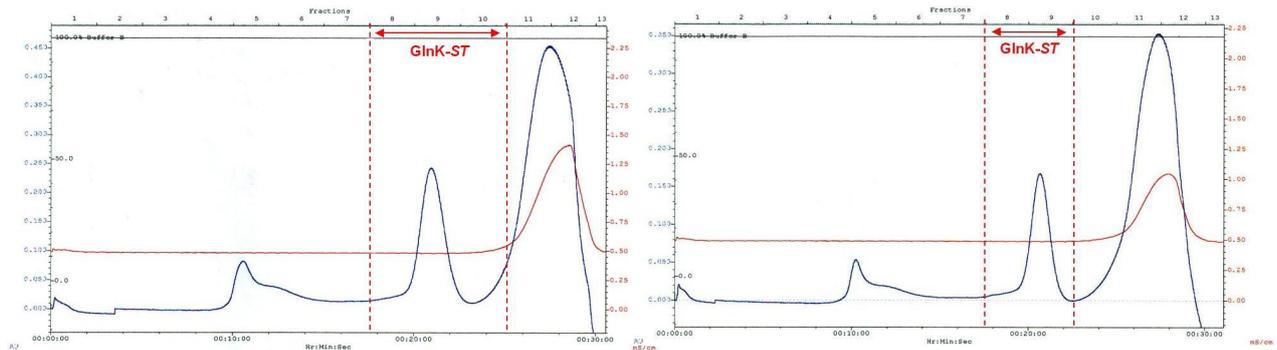


Abbildung C.20.: Elutionsprofile der Gelfiltrationssäulen. Die blauen Kurven stellen das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die GlnK-ST-haltigen Fraktionen an, die durch 15%ige SDS-PAGE detektiert worden sind, die mit Coomassie angefärbt worden sind (vgl. Abb. C.21.).

Anschließend wurden die Fraktionen durch 15%ige SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf den Inhalt von GlnK-ST untersucht. Es wurden 10 µl der Fraktionen auf das Gel aufgetragen.

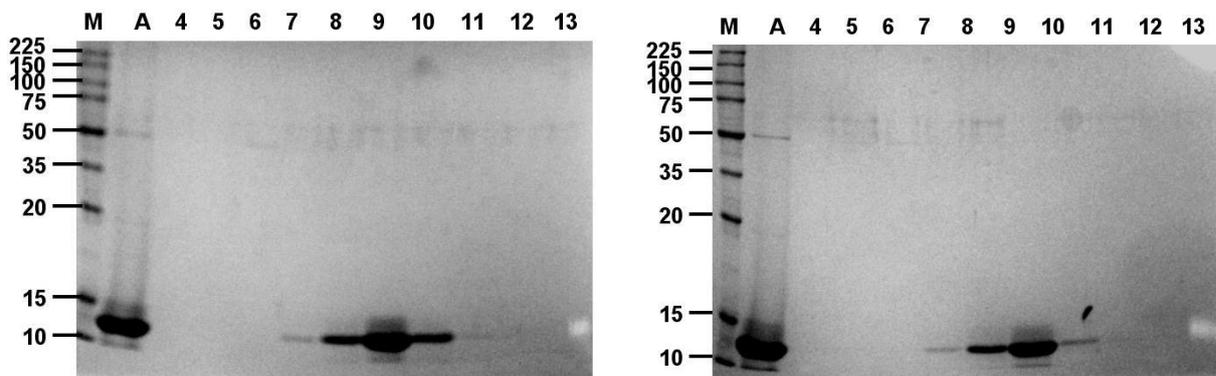


Abbildung C.21.: 15%ige SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie*-Färbung. (A) bezeichnet das Ausgangsmaterial, das auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen worden ist. Die Zahlen 4 bis 13 stehen für die gesammelten Fraktionen; (M) Proteinstandard in kDa.

Die Fraktionen 8 bis 10 des ersten Laufes und die Fraktionen 8 und 9 des zweiten Laufes wurden vereinigt und gegen den Lagerpuffer (B.3.11.) über Nacht dialysiert. Des Weiteren wurde die Proteinkonzentration auf 1,69 mg ml⁻¹ bestimmt.

1.3.3. Elektrospray-Ionisierungsmassenspektrometrie (ESI-MS)

Um die potentielle unbekannte Modifikation von *B. subtilis* GlnK zu untersuchen, wurde GlnK-ST sowohl in *E. coli* und dem *glnK*-defizienten *B. subtilis* Stamm GP253 unter stickstoff-limitierenden Bedingungen überproduziert (siehe oben). Nach der Aufreinigung wurden die Proteine einer ESI-MS in Kooperation mit dem Institut für Biochemie (Dr. U. Linne, AG Prof. M. Marahiel, Universität Marburg) unterzogen (B.17.). Das *B. subtilis* GlnK-ST besitzt auf Grund seiner Aminosäuren-Zusammensetzung eine errechnete molekulare Masse von 14,02 kDa.

Das GlnK-ST-Protein, das in *E. coli* überproduziert wurde, zeigte in der ESI einen Peak, der einer molekularen Masse von 13,89 kDa entspricht (Abb. C.22.). Es konnten keine molekularen Massen über 14 kDa in der ESI beobachtet werden. Das andere GlnK-ST-Protein hingegen, das in *B. subtilis* überproduziert worden war, zeigte zwei deutliche Peaks (Abb. C.23.). Diese entsprachen einer molekularen Masse von 14,019 und 13,888 kDa. Die Differenz der molekularen Massen beträgt genau 131 Da, was einer molekularen Masse eines Methionins entspricht.

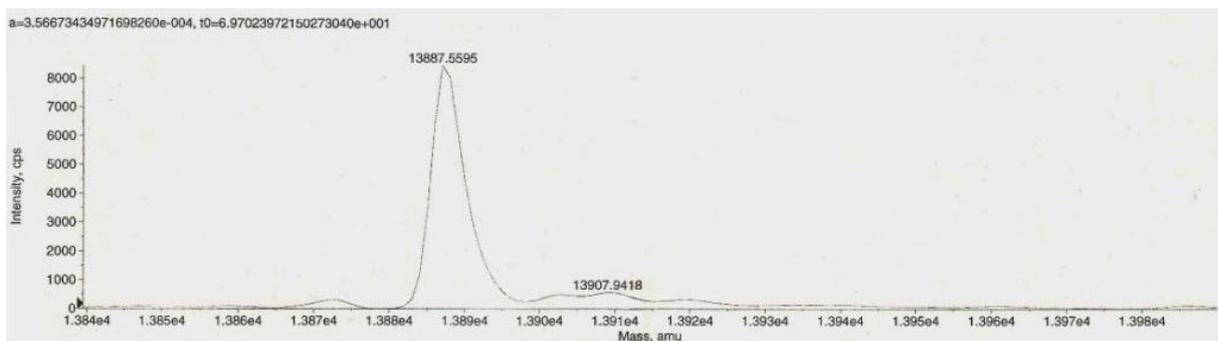


Abbildung C.22.: ESI-Spektrum des GlnK-ST, überproduziert in *E. coli*.

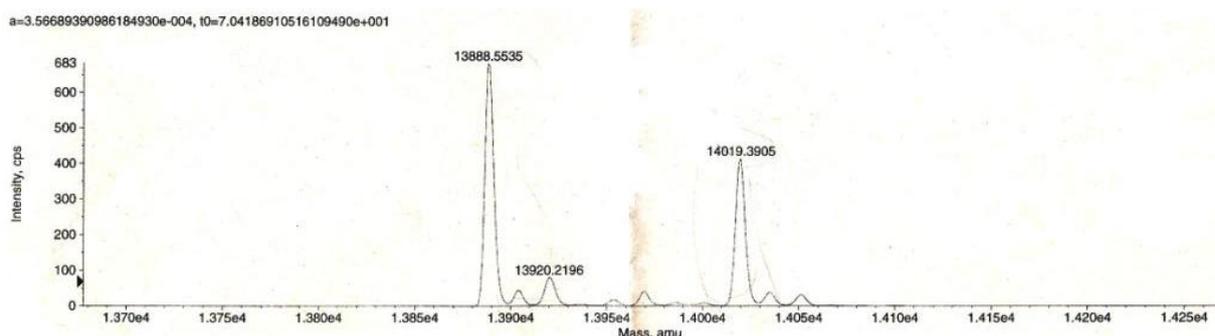


Abbildung C.23.: ESI-Spektrum des GlnK-ST, überproduziert in *B. subtilis*.

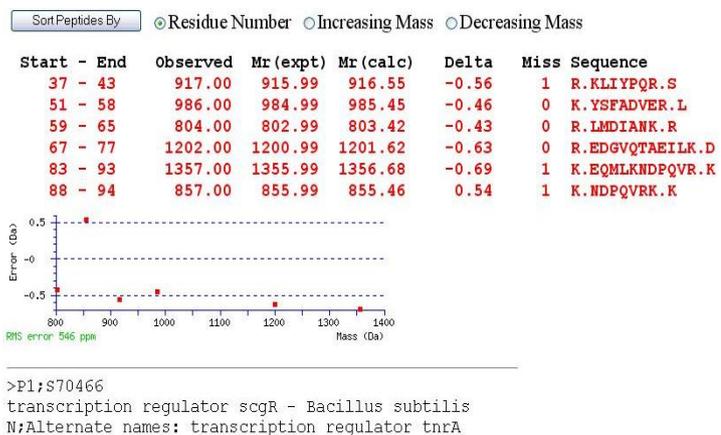
Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Startmethionin von *B. subtilis* GlnK einer partiellen N-terminalen Prozessierung in *B. subtilis* und einer totalen N-terminalen Prozessierung in *E. coli* unterliegt. Es konnten keine weiteren Massenunterschiede beobachtet werden. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine kovalente Modifikation des *B. subtilis* GlnK.

1.3.4. Immunopräzipitation von *B. subtilis* GlnK und Massenspektroskopie

Neben der Analyse von biochemischen Eigenschaften des *B. subtilis* GlnK, bestand die Aufgabe dieser Arbeit darin, potentielle Interaktionspartner von *B. subtilis* GlnK zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden Immunopräzipitationen von sowohl cytoplasmatischen als auch Membran-gebundenem GlnK durchgeführt.

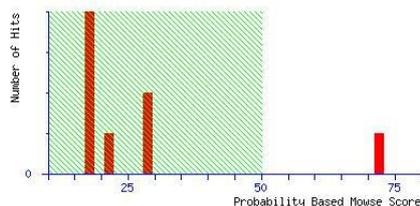
Zu diesem Zweck wurden Zellextrakte aus Zellen hergestellt (B.8.1.), die unter stickstofflimitierenden Bedingungen angezogen worden waren. Diese Zellextrakte wurden in eine cytosolische und eine Membran-haltige Fraktion unterteilt (B.9.4.) und anschließend mit GlnK-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit Protein-G-Sepharose gesammelt. Nach rigorosem Waschen und der Elution dieser Antikörper-gebundenen Proteine, wurden die Proben durch 15%ige SDS-PAGE getrennt und die Proteine durch *Coomassie* gefärbt. Die entstandenen Proteinbanden wurden aus dem Gel extrahiert und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Peptidfragmente, die durch diese Vorgehensweise gewonnen worden sind, wurden durch MALDI-TOF-Analyse untersucht. Diese Immunopräzipitationen sind zum Ende meiner Diplomarbeit durchgeführt worden und konnten erst während dieser Doktorarbeit ausgewertet werden.

Abbildung C.24.: Auflistung der übereinstimmenden Peptide und deren Verteilung (rechts).



Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 50 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits

1. [S70466](#) **Mass:** 13118 **Score:** 72 **Expect:** 0.00038 **Queries matched:** 6
transcription regulator scgR - Bacillus subtilis

Abbildung C.25.: Wahrscheinlichkeitsverteilung der ermittelten Proteine. Der Transkriptionsregulator TnrA (Synonym: ScgR) wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von 72 angegeben. Ab einem Faktor von 50 gilt das Ergebnis als wahrscheinlich.

Neben den tryptischen Fragmenten von *B. subtilis* GlnK zeigten die MALDI-TOF-Analysen des Immunopräzipitats von Membran-gebundenem GlnK weitere Peptide. Diese Massen konnten den tryptischen Fragmenten des Transkriptionsfaktors TnrA zugeordnet werden. Die Sequenzabdeckung betrug 46% (Abb. C.26.). Im Gegensatz dazu konnten keine TnrA-Fragmente in dem Immunopräzipitat des löslichen *B. subtilis* GlnK gefunden werden.

1 MTTEDHSYKD KKVISIGIVS ELTGLSVRQI RYYEER**KLIY** PQRSSRGTRK
 51 YSFADVERIM DIANKREDGV **QTAEILKDMR** KKE**QMLKN**DP QVR**KM**LEGGQ
 101 LNAHF**RY**KNR

Abbildung C.26.: Sequenzabdeckung von TnrA durch die tryptischen Fragmente, die durch MALDI-TOF-Analysen identifiziert worden sind. Die tryptischen Fragmente sind rot hervorgehoben.

Weitere tryptische Fragmente konnten dem Glutamin-Bindeprotein GlnH zugeordnet werden, das Bestandteil des Glutamin-(ABC)-Transporters ist. Die Sequenzabdeckung betrug 53% (vgl. Abb. C.28.).

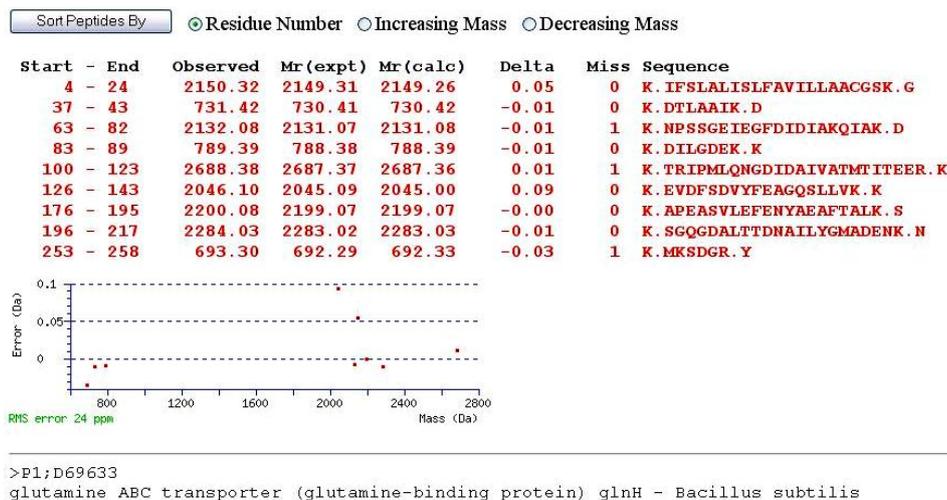


Abbildung C.27.: Auflistung der übereinstimmenden Peptide und deren Verteilung (rechts).

Abbildung C.28.: Sequenzabdeckung von GlnH durch die tryptischen Fragmente, die durch MALDI-

1 MK**KIFSLALI** SLFAVILLAA CGSKG**NGEA** SKESK**KDTLA** AIKDNDK**IVF**
 51 G**VKTD**TRLFG LKNPSSG**EIE** GFDIDIA**KQI** AKDILG**DEK** AQFKE**VTSKT**
 101 R**IPMLQ**NGDI DAIVAT**MTIT** EER**KKE**VDFS DVYFEAG**QSL** LVKKG**SKIKS**
 151 VENL**GKGS**KV LAVKG**STSSQ** NIREKA**PEAS** VLEFENY**AEA** FTALK**SGQGD**
 201 A**LTTDN**AILY G**MADENK**NYQ LTG**KPFT**DEP YG**IAV**KKG**QS** ALAKE**INASL**
 251 K**KMSD**GRYD EIY**KKWIK**ED PAE

TOF-Analysen identifiziert worden sind. Die tryptischen Fragmente sind rot hervorgehoben.

2. Interaktion zwischen TnrA und GlnK in *B. subtilis*

Um herauszufinden, ob TnrA tatsächlich spezifisch mit *B. subtilis* GlnK co-immunopräzipitieren kann, wurde TnrA in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert und TnrA-spezifische Antikörper für weitere Studien hergestellt.

2.1. Konstruktion des Plasmids pT7-TNRA

Als erstes wurde das 463 bp große *tnrA*-Gen von *B. subtilis* durch PCR amplifiziert, wobei chromosomale DNA von *B. subtilis* und das Primerpaar *tnrA*-for und *tnrA*-rev benutzt wurden, die die Schnittstellen *Nde*I bzw. *Hind*III besaßen. Das Amplifikationsprodukt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in den Vektor pGEM-T kloniert.

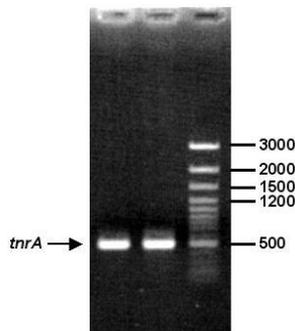


Abbildung C.29.: PCR-Produkt, das durch Amplifizierung mit chromosomaler *B. subtilis* DNA und dem Primerpaar *tnrA*-for und *tnrA*-rev hergestellt worden ist. DNA-Standard in Da.

Das Plasmid wurde anschließend zur Vermehrung in den *E. coli* Stamm XL1 transformiert (B.5.10.) und die Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin selektiert. Das Plasmid wurde aus *E. coli* extrahiert und mit *Nde*I und *Hind*III geschnitten (B.5.6.). Das kleinere Fragment wurde aufgereinigt (B.5.5.) und mit dem T7-Expressionsvektor pT7-7 ligiert (B.5.7.), der bereits mit den selben Enzymen geschnitten worden ist.

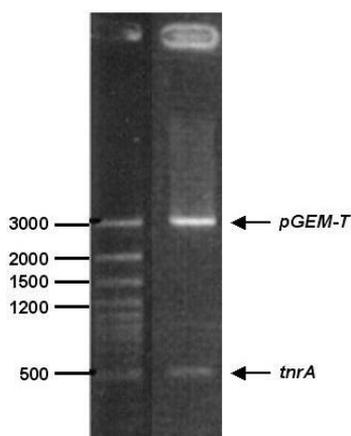


Abbildung C.30. (links): Plasmid pGEM-TNRA nach Restriktion mit *Nde*I und *Hind*III. Zu sehen sind der 3000 bp große Vektor pGEM-T und das 463 bp große DNA-Fragment *tnrA*. DNA-Standard in Da.

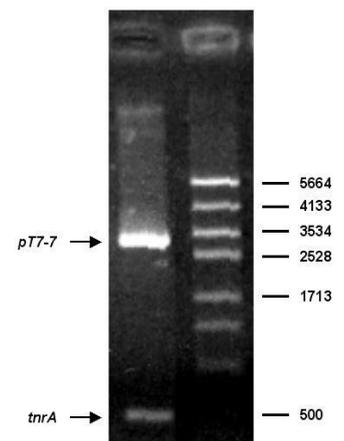


Abbildung C.31. (rechts): Plasmid pT7-TNRA nach Restriktion mit *Nde*I und *Hind*III. Zu sehen sind der 2470 bp große Vektor pT7-7 und das 463 bp große DNA-Fragment *tnrA*. DNA-Standard in Da.

Das resultierende Plasmid pT7-TNRA wurde in den *E. coli* Stamm XL1 transformiert (B.5.10), die Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin selektiert und das Plasmid pT7-TNRA aus den Bakterienzellen extrahiert (B.5.1.). Das gereinigte Plasmid wurde sequenziert und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert.

2.2. Überexpression und Aufreinigung von TnrA

Weitere Angaben zu den nun folgenden Methoden sind dem Material- und Methodenteil, speziell dem Punkt B.12.1., zu entnehmen und fanden bei 4°C statt.

Die Überproduktion von TnrA fand in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) statt, das mit dem Plasmid pT7-TNRA transformiert worden war. Zur Überproduktion wurden zweimal 700 ml Kultur in LB-Medium in je einem zwei Liter-Kolben mit je 9 ml Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der *tnrA*-Expression mit 1 mM IPTG. Nach 2,5 Stunden bei 32°C wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 1,43 geerntet, in Zellaufbruchpuffer T1 (B.3.5.) gewaschen und bei -20°C gelagert.

Das Zellpellet (11,65 g) wurde auf Eis aufgetaut, in 100 ml T1-Puffer (B.3.5.) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (B.8.2.) aufgebrochen. Danach wurden Zelltrümmer und nicht aufgebrochene Zellen durch fraktionierte Zentrifugation (10 min bei 5.000 rpm und 25 min bei 12.000 rpm) entfernt (B.9.1).

Der zellfreie Extrakt wurde gegen 27,5% Ammoniumsulfat in 50 mM Tricine pH 8,3 über Nacht im Kühlraum dialysiert (B.10.). Das Dialysat wurde zentrifugiert (10 min bei 10.000 rpm), um ausgefallene Proteine zu entfernen. Zum Überstand (72 ml) wurde langsam 15,41 g fein gemörserter Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation unter Rühren wurde das Protein vier Stunden lang auf Eis im Kühlraum gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min bei 10.000 rpm) geerntet und in 30 ml Puffer T2 (B.3.6.) resuspendiert. Es folgte eine Dialyse gegen Puffer T2 über Nacht im Kühlraum, um die Ammoniumsulfat-Konzentration im Dialysat zu verringern.

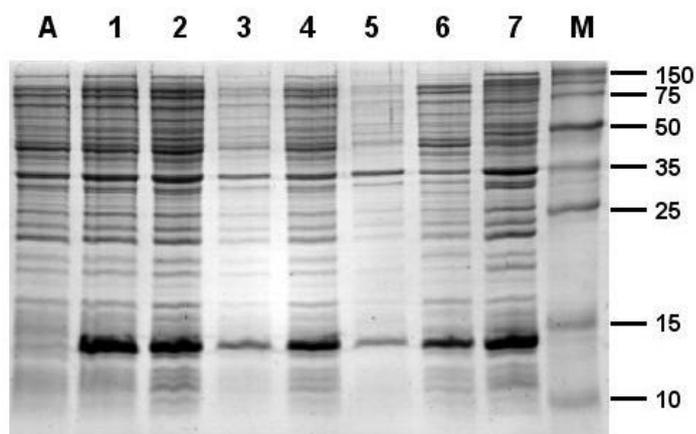


Abbildung C.32.: Verlauf der Reinigung anhand einer 15%igen SDS-PAGE. Die Proteine sind mit *Coomassie blue* gefärbt worden (B.7.2.). (A) Proteinextrakt vor und (1) nach Induktion, (2) Überstand und (3) Pellet der ersten Zentrifugation, (4) Überstand und (5) Pellet der zweiten Zentrifugation, (6) Überstand und (7) Pellet nach 27,5%iger Ammoniumsulfat-Fällung. M) Marker *Broad Range* (Promega) in kDa.

Da sich das meiste TnrA in dem Präzipitat der 27,5%igen Ammoniumsulfatfällung befunden hat, wurde das Präzipitat mit 600 mM NaCl (in 10% Glycerin, 1 mM EDTA und 1 mM DTT) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation der Überstand gegen Puffer T2 dialysiert.

Die entsalzten Protein-haltigen Lösungen wurden nacheinander in zwei Läufen auf zwei hintereinander geschaltete CM-Sepharose-Säulen (B.11.3.) aufgetragen. Die angelegte Flussrate betrug 2 ml min^{-1} . Bei einer Ausgangskonzentration von 200 mM NaCl in Puffer T2 konnte das TnrA-Protein an die Säule binden. Danach wurde ein linearer Gradient von 200 bis 600 mM NaCl über eine Dauer von 150 ml an die Säule angelegt. Fraktionen wurden in einem Volumen von 3 ml gesammelt.

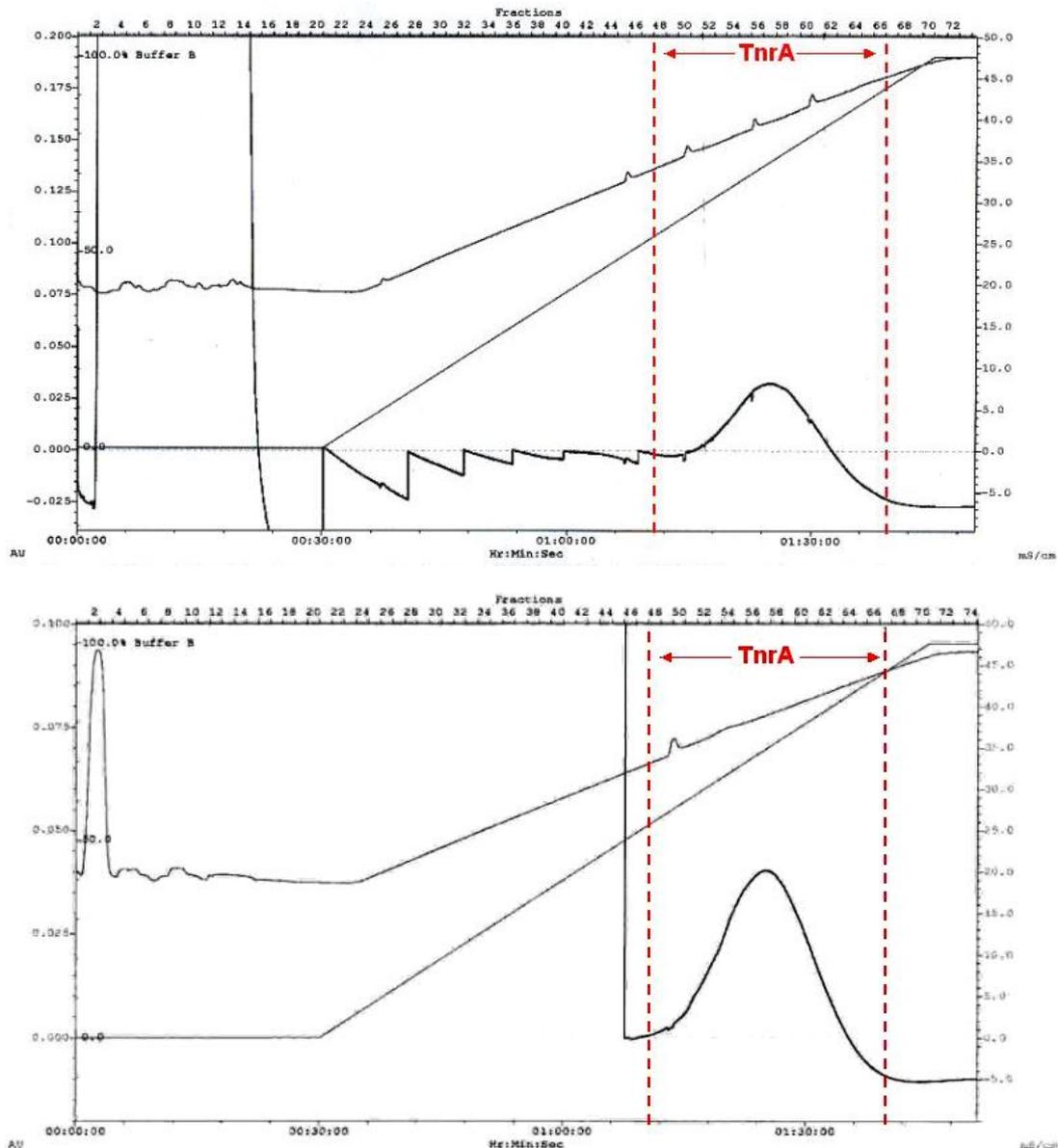


Abbildung C.33.: Elutionsprofile der Ionenaustausch-Chromatographien – Lauf 1 und 2. Die dickere schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die TnrA-haltigen Fraktionen an, die durch 15%ige SDS-PAGE detektiert worden sind.

$12,5 \mu\text{l}$ der gesammelten Fraktionen wurden durch eine 15%ige SDS-PAGE auf den Gehalt von TnrA untersucht.

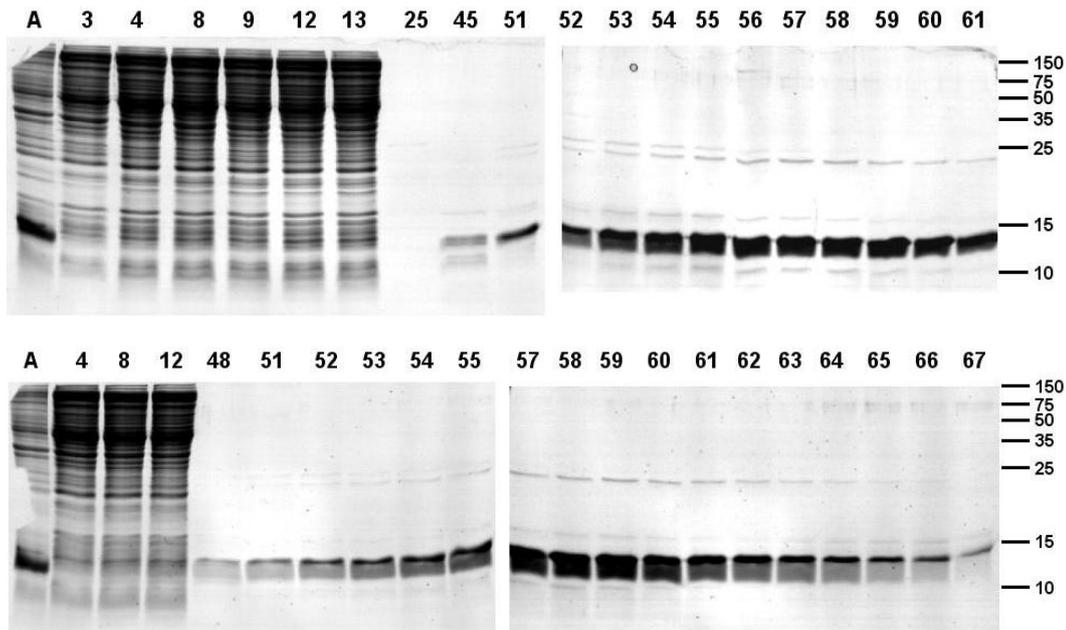


Abbildung C.34.: 15%ige SDS-PAGE der untersuchten Fraktionen – 1. und 2. Lauf der CM-Sepharose-Chromatographien. Die Proteine wurden mit *Coomassie blue* angefärbt. Mit (A) ist das Ausgangsmaterial bezeichnet, das auf die CM-Sepharose-Säule aufgetragen worden ist. Die Zahlen 3 bis 67 stehen für die untersuchten Fraktionen. Proteinstandard in kDa.

Das TnrA-Protein eluierte in den Fraktionen 48 bis 66 in einem Bereich von 430 bis 570 mM NaCl. Die TnrA-haltigen Fraktionen beider Läufe wurden vereinigt und in 60%igem Ammoniumsulfat über Nacht im Kühlraum aufbewahrt.

Das in Puffer T3 (B.3.6.) resuspendierte Sediment der 60%igen Ammoniumsulfat-Fällung wurde auf eine *Superdex 200* Gelfiltrationssäule (B.11.2.) aufgetragen. Es wurde eine Flussrate von 1 ml min^{-1} angelegt und Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml gesammelt.

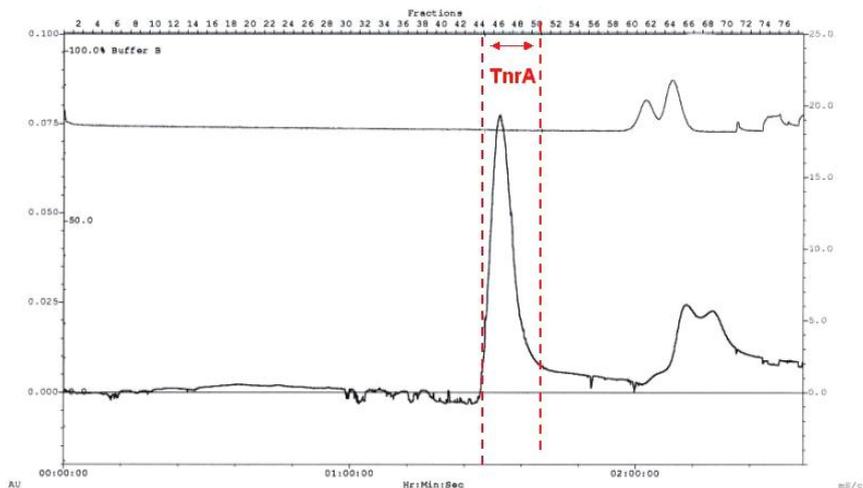
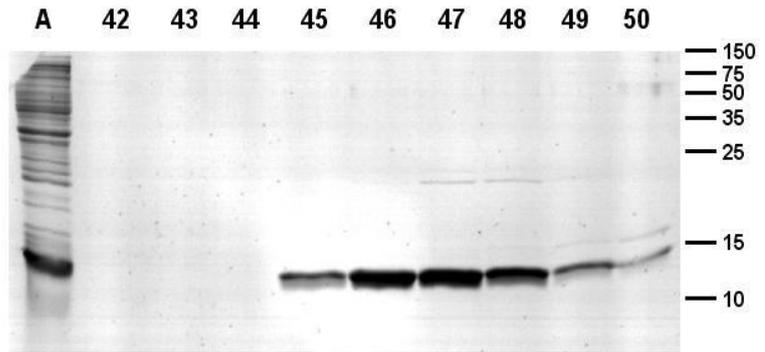


Abbildung C.35.: Elutionsprofil der Gelfiltration. Die schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die TnrA-haltigen Fraktionen an, die durch 15%ige SDS-PAGE detektiert worden sind.

12,5 μl der gesammelten Fraktionen wurden durch eine 15%ige SDS-PAGE auf den Gehalt von TnrA untersucht.

Abbildung C.36.: 15%ige SDS-PAGE der untersuchten Fraktionen. Die Proteine wurden mit *Coomassie blue* angefärbt. Mit (A) ist das Ausgangsmaterial bezeichnet, das auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen worden ist. Die Zahlen 42 bis 50 stehen für die untersuchten Fraktionen. Proteinstandard in kDa.



TnrA eluierte in den Fraktionen 45 bis 50. Die Fraktionen 45 und 46 wurden auf Grund ihrer hohen Reinheit getrennt durch Dialyse in Lagerpuffer (B.3.11.) überführt. Fraktion 45 wurde zur Antikörper-Herstellung verwendet.

Die Fraktionen 47 bis 50 wurden vereinigt und auf eine HighS-Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml min^{-1} . Es wurden Fraktionen mit einer Größe von 3 ml gesammelt. Des Weiteren wurde ein Gradient von 200 bis 1000 mM NaCl über eine Dauer von 200 ml angelegt.

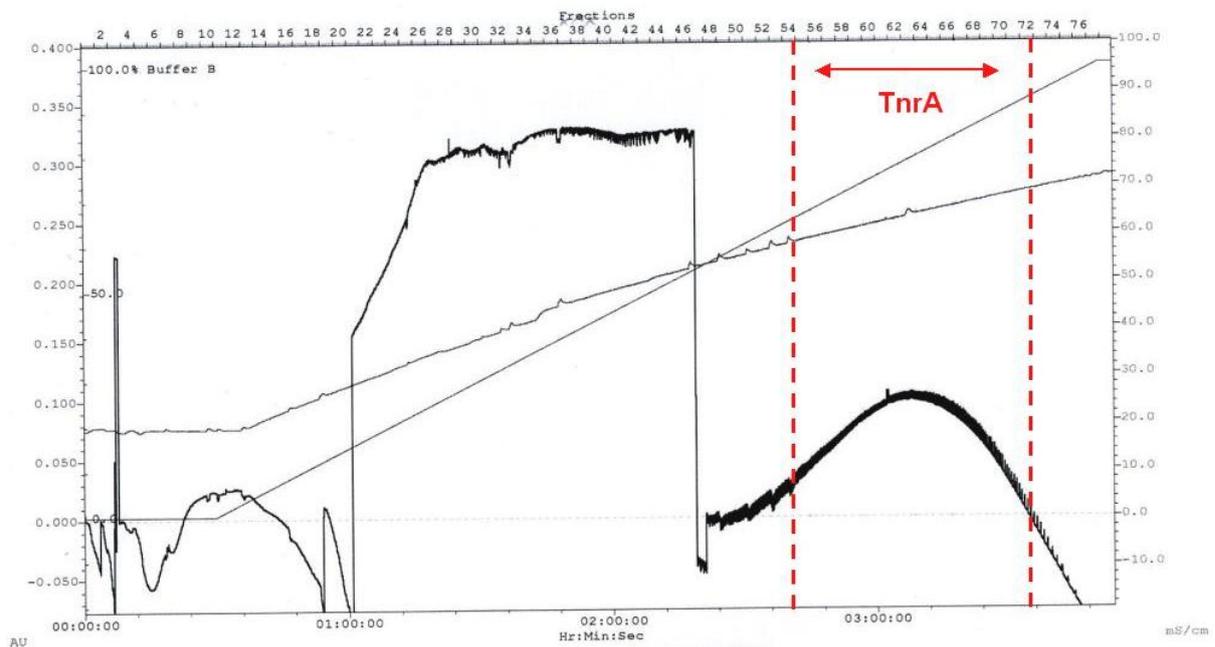


Abbildung C.37.: Elutionsprofil der Ionenaustauscher-Chromatographie. Die dickere schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die TnrA-haltigen Fraktionen an, die durch 15%ige SDS-PAGE detektiert worden sind.

12,5 μl der gesammelten Fraktionen wurden durch eine 15%ige SDS-PAGE auf den Gehalt von TnrA untersucht.

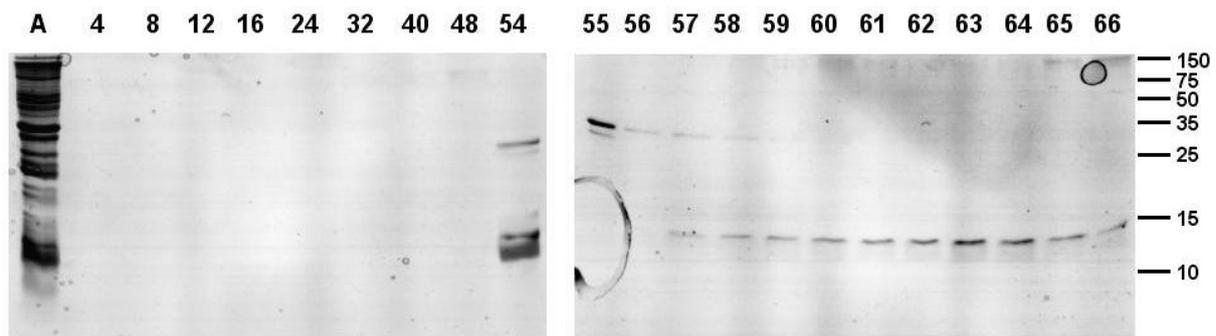
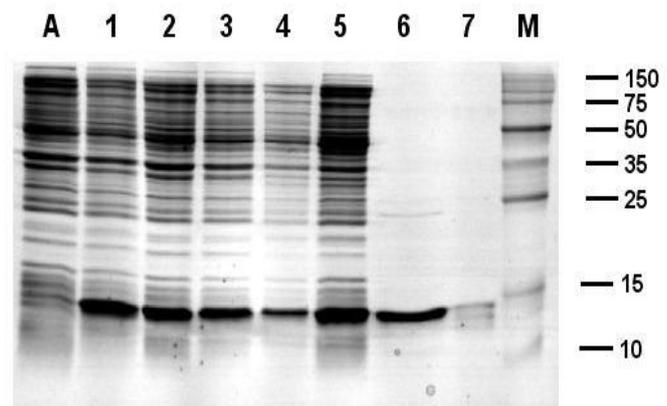


Abbildung C.38.: 15%ige SDS-PAGE der untersuchten Fraktionen. Die Proteine wurden mit *Coomassie blue* angefärbt. Mit (A) ist das Ausgangsmaterial bezeichnet, das auf die HighS-Säule aufgetragen worden ist. Die Zahlen 4 bis 66 stehen für die untersuchten Fraktionen. Proteinstandard in kDa.

TnrA eluierte in den Fraktionen 56 bis 66. Dies entspricht einem Elutionsbereich von 540 bis 665 mM NaCl. Die Fraktionen wurden anschließend vereinigt und durch Dialyse über Nacht in Lagerpuffer aufkonzentriert und bei -20°C aufbewahrt.

Abbildung C.39.: Verlauf der TnrA-Reinigung anhand einer 15%igen SDS-PAGE. Die Proteine sind mit *Coomassie blue* gefärbt worden. (A) Proteinextrakt vor und (1) nach Induktion, (2) Überstand der ersten Zentrifugation, (3) Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes, (4) Überstand nach Fällung mit 27,5%igem Ammoniumsulfat, (5) Pellet der 27,5%igen Ammoniumsulfatfällung, (6) Fraktionspool der CM-Sepharose-Läufe und (7) Fraktion 45 nach der Gelfiltration. (M) Marker *Broad Range* (Promega) in kDa.



Die Ausbeute an TnrA-Protein betrug insgesamt 750 μg . 250 μg TnrA-Protein wurden zur Herstellung von Antikörpern verwendet.

2.2. Gel electrophoretic mobility shift assay (GEMSA)

Da die TnrA-spezifischen Antikörper zunächst noch nicht zur Verfügung standen, wurde als erstes ein Effekt der Komplexbildung von TnrA und GlnK in DNA-Gelretardationsexperimente analysiert. Falls die Komplexbildung von TnrA und GlnK einen Einfluss auf die Bindung von TnrA an die DNA hat, müsste sich eine Veränderung im Laufverhalten des DNA-Fragmentes zeigen - entweder dadurch, dass TnrA nicht mehr an die DNA bindet und dadurch die DNA-Bande wieder unkomplexiert vorliegt, oder durch einen *Supershift*, der einen Komplex aus TnrA mit gebundener DNA und dem GlnK-Protein darstellt.

Die Fähigkeit von TnrA DNA zu binden und die TnrA-Bindestellen wurden von Wray *et al.* (2000) bereits charakterisiert. Die DNA-Fragmente, die in den Gelretardationsexperimenten benutzt wurden, waren 166 bp große Fragmente aus dem *nrgAB*-Promotorbereich, die durch PCR amplifiziert worden sind (Abb. C.40.).

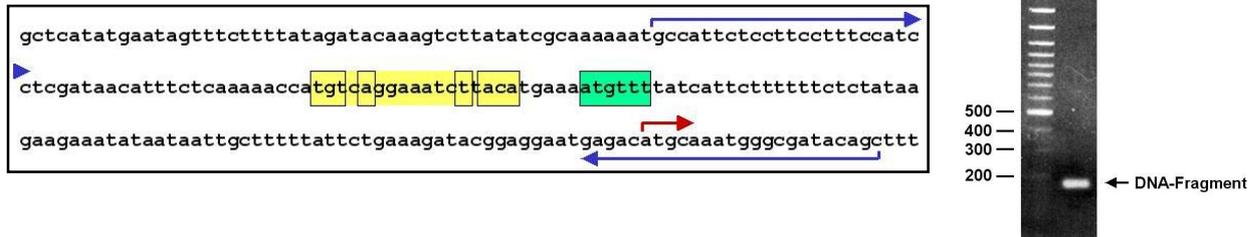


Abbildung C.40.: Promotorbereich des *nrgAB*-Gens (links) und dem entsprechenden DNA-Fragment, das für die Gelretardationsexperimente genutzt wurde (rechts). Die Primer sind durch blaue Pfeile, das Startmethionin von *nrgAB* durch einen roten Pfeil gekennzeichnet, der Promotorbereich ist grün und die TnrA-Bindestelle gelb hervorgehoben. Die konservierte Konsensussequenz aller TnrA-Bindestellen ist durch Kästchen gekennzeichnet. Das DNA-Fragment wurde durch PCR aus chromosomaler *B. subtilis* DNA amplifiziert.

Die über ein Agarosegel aufgereinigten DNA-Fragmente wurden durch Reaktion mit der Polynukleotidkinase [γ - 32 P]ATP am 5'-Ende markiert. Nicht eingebautes [γ - 32 P]ATP wurde durch Größenausschluss-Chromatographie mit einer *ProbeQuantTM G-50 MicroColumn* (B.5.12.) entfernt. Anschließend wurde die Radioaktivität der markierten DNA-Fragmente gemessen. 0,1 pmol DNA-Fragment (entspricht 5 ng) hatten eine Strahlung von ca. 25.000 cpm.

Die Bindereaktionen hatten ein Gesamtvolumen von 15 μ l und enthielten 0,1 pmol DNA-Fragment in Bindepuffer B (B.3.10.). Die Proben wurden bei 30°C für 20 Minuten inkubiert und dann auf ein 6%iges Polyacrylamidgel (B.6.3.) geladen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese getrocknet und die radioaktiven Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Als erstes wurde getestet, wie viel TnrA notwendig ist, um die DNA-Fragmente in den Gelshift-Experimenten um ca. 90% zu *shiften*. Dazu wurden aufsteigende Mengen an TnrA mit konstanten Mengen an DNA-Fragmenten inkubiert.

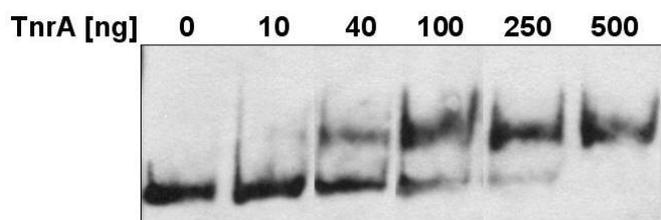


Abbildung C.41.: Gelretardationsexperiment der Interaktion zwischen dem *nrgAB*-Promotors und TnrA. Das radioaktiv markierte DNA-Fragment wurde mit ansteigenden Konzentrationen an gereinigtem TnrA inkubiert.

Wie aus Abbildung C.41. zu erkennen ist, liegt die Menge an TnrA, die durch 0,1 pM DNA-Fragment um ca. 90% geshiftet wird, bei 100 ng.

Um nun zu testen, ob GlnK einen Effekt auf die DNA-Bindung von TnrA besitzt, wurden 500 ng TnrA mit aufsteigenden Mengen an GlnK inkubiert.

TnrA [ng] 0 10 100 500 500 500 500



GlnK [ng] - - - - 10 250 500

Abbildung C.42.: Einfluss von GlnK auf das Laufverhalten von TnrA im Gelretardationsexperiment der Interaktion zwischen dem *nrgAB*-Promotor und TnrA. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen von gereinigtem GlnK mit TnrA inkubiert.

Wie in Abbildung C.42. zu sehen ist, zeigt die Zugabe von GlnK in dem Retardationsexperiment keine Veränderung im Laufverhalten der TnrA-gebundenen DNA.

Als nächstes wurde getestet, ob die P_{II}-Liganden ATP und α -Ketoglutarat einen möglichen Effekt auf die Bindung von GlnK an TnrA haben. Dazu wurden jeweils 10 mM ATP und 10 mM α -Ketoglutarat in den Retardationsexperimenten eingesetzt.

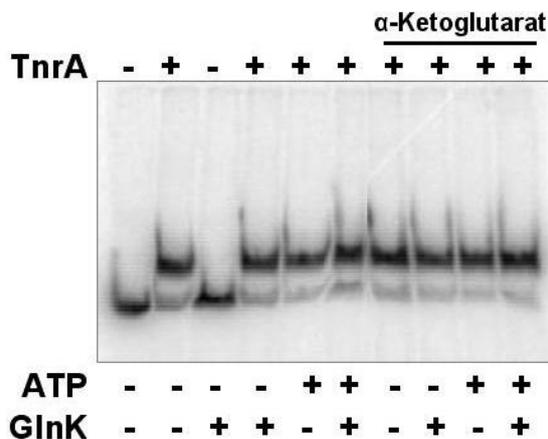


Abbildung C.43.: Einfluss von GlnK auf das Laufverhalten von TnrA im Gelretardationsexperiment in der Gegenwart von 10 mM ATP und α -Ketoglutarat.

In den Gelretardationsexperimenten, in denen ATP und α -Ketoglutarat eingesetzt worden sind, konnte keine Veränderung im Laufverhalten der TnrA-gebundenen DNA beobachtet werden (Abb. C.43.).

Um ausschließen zu können, dass keine Effektorsubstanz dem GlnK fehlt, um an TnrA zu binden, wurden die folgenden Substanzen mit einer Konzentration von 10 mM im Gelretardationsexperiment in Gegenwart von 10 mM ATP getestet: Malat, Glutamat, Glutamin, Isocitrat, Oxalacetat, Citrat, Succinat, Pyruvat, Phosphoenolpyruvat, GTP, CTP und UTP.

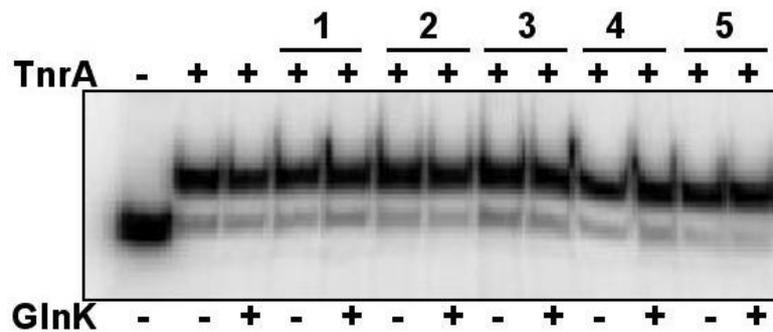


Abbildung C.44.: Beispiel für ein Gelretardationsexperiment. Die Substanzen (1) α -Ketoglutarat, (2) Phosphoenolpyruvat, (3) Oxalacetat, (4) Isocitrat und (5) CTP wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 200 ng GlnK mit TnrA-gebundener radioaktiv-markierter DNA inkubiert.

Abbildung C.44. zeigt ein Beispiel für alle durchgeführten Experimente. In den Gelretardationsexperimenten konnte in keinem untersuchten Fall ein Effekt von GlnK auf die DNA-Binddefähigkeit von TnrA beobachtet werden.

2.3. Co-Immunopräzipitation von TnrA und GlnK

Um die Interaktion zwischen TnrA und GlnK zu verifizieren, wurde die Immunopräzipitation von *B. subtilis* GlnK wiederholt und anschließend die Immunopräzipitate auf GlnK und TnrA mit Immunoblotanalysen untersucht.

Dazu wurden *B. subtilis* Zellen in SMM mit 20 mM NaNO₃ bis zu einer OD₆₀₀ von 2,8 angezogen. Die Zellen befinden sich nun in der stationären Phase. Wie bereits gezeigt wurde (eigene Diplomarbeit), ist die Menge an GlnK in stationären Zellen am größten. Die Zellextrakte wurden im RiboLyser (B.8.1.) mit Zellaufbruchspuffer X (B.3.5.) aufgebrochen. Zelltrümmer und nicht vollständig aufgebrochene Zellen wurden durch Zentrifugation (B.9.1.) entfernt. Anschließend erfolgte eine Fraktionierung des zellfreien Extraktes durch Ultrazentrifugation (1h, 40.000 rpm, 4°C, B.9.4.). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (B.6.2.) der Fraktionen S₁₀₀ und P₁₀₀ wurden 2,5 mg Gesamtprotein in die Immunopräzipitation eingesetzt. Die jeweiligen Proben wurden mit modifiziertem NET-Puffer I (B.3.8.) auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Dann wurden 100 μ l spezifischer GlnK-Antikörper zu den Proben gegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde in jede Probe 20 μ l Protein-G-Sepharose zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von einer Stunde bei 4°C unter Schütteln wurden die Proben zentrifugiert (30 sec, 14.000 rpm, 4°C), um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Dazu wurde der Überstand (S) abgenommen und bei -20°C gelagert, um zu sehen, wie effektiv die Antikörper das jeweilige spezifische Protein gebunden haben. Anschließend wurde die Protein-G-Sepharose zweimal mit modifiziertem NET-Puffer I und je einmal mit NET-Puffer II (B.3.8.) und Puffer IP (B.3.8.) gewaschen.

Nach anschließender Zentrifugation (30 sec, 14.000 rpm, 4°C) wurden die jeweiligen Pellets mit 100 µl 1x SDS-Auftragspuffer (B.3.2.) versetzt und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation enthält der Überstand das Immunopräzipitat. Es wurden nun das Ausgangsmaterial (S₁₀₀ und P₁₀₀), der Überstand nach Zugabe der Protein-G-Sepharose (S) und das Immunopräzipitat (IP) auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde anschließend *geblottet* (B.14.1.) und die Proben auf GlnK bzw. TnrA getestet.

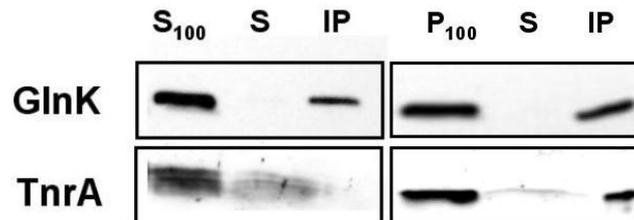
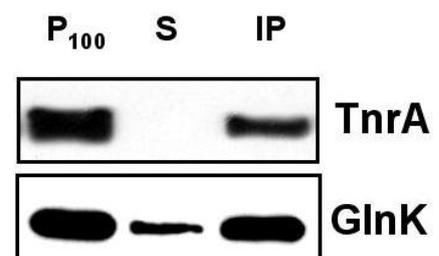


Abbildung C.45.: Co-Immunopräzipitationen, durchgeführt mit GlnK-spezifischen Antikörpern. *B. subtilis* Zellen wurden unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen angezogen. Der Zellextrakt wurde wie beschrieben fraktioniert und die Fraktionen (S₁₀₀ und P₁₀₀) zur Immunopräzipitation herangenommen. Der erste Waschschrift (S) und das Immunopräzipitat (IP) wurden durch Immunoblot mit Hilfe von GlnK- und TnrA-spezifischen Antikörpern analysiert.

Wie in Abbildung C.45. zu sehen ist, wird TnrA nahezu komplett mit dem Membran-gebundenen GlnK (P₁₀₀) co-immunopräzipitiert. Im Gegensatz dazu ist lösliches GlnK nicht in der Lage, TnrA im Cytosol zu binden. Dies bestätigt die vorangegangenen MALDI-TOF-Analysen und Immunopräzipitationen (eigene Diplomarbeit).

Da nun mehrfach gezeigt wurde, dass lösliches GlnK nicht mit cytosolischem TnrA interagiert, wurde eine Immunopräzipitation von Membran-gebundenen TnrA durchgeführt, um zu sehen, ob auch TnrA in der Lage ist, GlnK zu co-immunopräzipitieren. Dazu wurden Zellen, wie bereits beschrieben, fraktioniert und anschließend TnrA mit TnrA-spezifischen Antikörpern immunopräzipitiert. Es wurden dann das Ausgangsmaterial (P₁₀₀), der Überstand nach Zugabe der Protein-G-Sepharose (S) und das Immunopräzipitat (IP) auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde anschließend geblottet (B.14.1.) und die Proben auf TnrA bzw. GlnK getestet.

Abbildung C.46.: Co-Immunopräzipitation, durchgeführt mit TnrA-spezifischen Antikörpern. *B. subtilis* Zellen wurden unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen angezogen. Der Zellextrakt wurde wie beschrieben fraktioniert und die Fraktion P₁₀₀ zur Immunopräzipitation herangenommen. Der erste Waschschrift (S) und das Immunopräzipitat (IP) wurden durch Immunoblot mit Hilfe von TnrA- und GlnK-spezifischen Antikörpern analysiert.



TnrA war ebenfalls in der Lage, ca. 90% des Membran-gebundenen GlnK zu co-immunopräzipitieren. Dies bestätigt die Ergebnisse aus früheren MALDI-TOF-Analysen und Immunopräzipitationen. Die reziproke Co-Immunopräzipitation unterstreicht die Vermutung, dass Membran-gebundenes GlnK und TnrA einen stabilen Komplex bilden.

2.4. Co-Lokalisation von TnrA und GlnK

Um einen Einblick zur zellulären Lokalisation von TnrA zu bekommen, wurden *B. subtilis* Wildtyp-Zellen in SMM mit 20 mM NaNO₃ als einziger Stickstoffquelle bis zum exponentiellen Wachstum von einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Die Zellen wurden in der Gegenwart von MgCl₂ mit dem RiboLyser aufgebrochen (B.8.1.) und durch Ultrazentrifugation fraktioniert (B.9.4.). Aliquots dieser Fraktionen wurden per 15%igem SDS-Gel und anschließender Immunoblotanalyse (B.14.1.) mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen TnrA und GlnK auf die Anwesenheit dieser Proteine untersucht. Des Weiteren wurde die Qualität der Fraktionierung durch Immunoblotanalysen untersucht, in denen polyklonale Antikörper gegen das lösliche Enzym Glutamin-Synthetase eingesetzt worden sind.

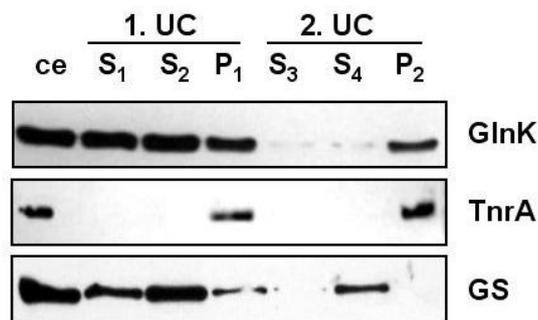


Abbildung C.47.: Lokalisation von TnrA im Wildtyp *B. subtilis* 168. Zellen wurden unter Stickstofflimitierung in SMM mit 20 mM NaNO₃ als einzige Stickstoffquelle angezogen. Die Zellextrakte (ce) wurden in eine obere (S₁) und untere (S₂) cytoplasmatische und eine Membranfraktion (P₁) aufgetrennt. P₁ wurde gewaschen und wieder in dem gleichen Muster (S₃, S₄ und P₂) fraktioniert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotanalysen untersucht. Der Immunoblot gegen die cytoplasmatische Glutamin-Synthetase fungiert als ein Indikator für die Qualität der Fraktionierung.

Als erstes ist aus der Immunoblot-Analyse gegen die Glutamin-Synthetase zu erkennen, dass die Glutamin-Synthetase ausschließlich in der cytoplasmatischen und nicht in der Membranfraktion vorkommt. Dies zeigt deutlich, dass die Membranfraktionen frei von cytoplasmatischen Proteinen sind. Die Immunoblot-Analysen zeigen weiterhin, dass GlnK nach einer Ultrazentrifugation zu gleichen Teilen zwischen der löslichen und der Membranfraktion verteilt ist, wie es bereits durch frühere Experimente gezeigt werden konnte (vgl. Abb. C.5. und C.6.). Im Gegensatz dazu konnte TnrA nur in der Membranfraktion detektiert werden.

Um nun zu untersuchen, ob die Lokalisation von TnrA von GlnK abhängt, wurde das gleiche Experiment mit Zellen der *glnK*-defizienten Mutante GP253 von *B. subtilis* durchgeführt. Die Glutamin-Synthetase diente erneut als Kontrolle, ob die Fraktionierung sauber durchgeführt worden ist.

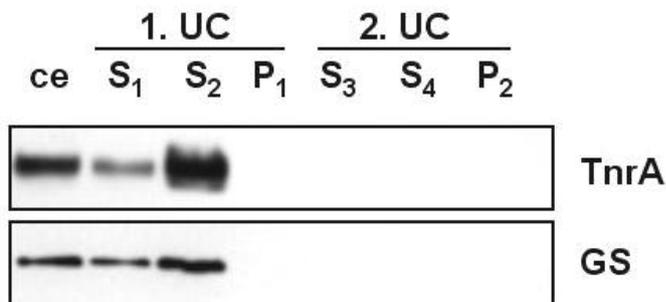


Abbildung C.48.: Lokalisation von TnrA in der *glnK*-defizienten Mutante GP253 von *B. subtilis*. Zellen wurden unter Stickstofflimitierung in SMM mit 20 mM NaNO₃ als einzige Stickstoffquelle angezogen. Die Zell-extrakte (ce) wurden in eine obere (S₁) und untere (S₂) cytoplasmatische und eine Membranfraktion (P₁) aufgetrennt. P₁ wurde

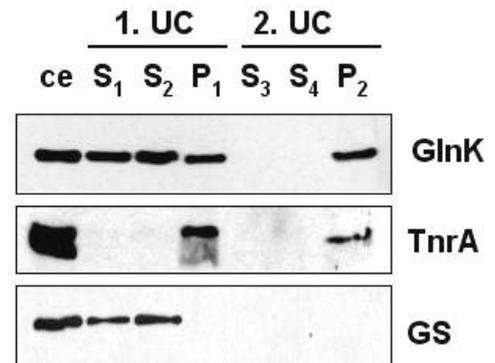
gewaschen und wieder in dem gleichen Muster (S₃, S₄ und P₂) fraktioniert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotanalysen untersucht. Der Immunoblot gegen die cytoplasmatische Glutamin-Synthetase fungiert als ein Indikator für die Qualität der Fraktionierung.

Der Immunoblot gegen GlnK zeigte, wie erwartet, keine Signale. Des Weiteren konnte TnrA ausschließlich in der cytosolischen Fraktion detektiert werden. Dies bedeutet, dass GlnK für die Membran-Assoziation von TnrA notwendig ist.

Da auch die *amtB*-defiziente Mutante GP254 von *B. subtilis* zur Verfügung stand, wurde das gleiche Experiment auch mit Zellen dieses Stammes durchgeführt. Detsch und Stülke (2003) zeigten bereits, dass bei Anzucht der Zellen auf Glutamat, GlnK im Wildtyp nahezu komplett an die Membran gebunden ist. In der *amtB*-defizienten Mutante allerdings ist GlnK komplett von der Membran gelöst. Weitere Lokalisationsexperimente zeigten, dass der Ammoniumtransporter AmtB das Bindeglied zwischen GlnK und der Membran unter Anzucht auf Ammonium darstellt (vgl. Einleitung). Das heißt nun für das folgende Experiment, dass GlnK komplett von der Membran gelöst sein sollte, da der Ammoniumtransporter AmtB fehlt. Wenn TnrA durch GlnK an die Membran fixiert wird, sollte auch in diesem Fall TnrA in der löslichen Fraktion vorkommen.

Für den Versuch wurde nun die *amtB*-defiziente Mutante GP254 mit 20 mM NaNO₃ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 herangezogen, die Zellen aufgebrochen und der zellfreie Extrakt nach oben beschriebenen Schema fraktioniert. Die Fraktionen wurden anschließend durch Immunoblot-Analyse unter Anwendung von TnrA- und GlnK-spezifischen Antikörpern auf deren Lokalisation untersucht. Ein weiterer Immunoblot mit GS-spezifischen Antikörpern wurde zur Überprüfung der Qualität der Membranfraktionen genutzt.

Abbildung C.49.: Lokalisation von TnrA in der *amtB*-defizienten Mutante GP254 von *B. subtilis*. Zellen wurden unter Stickstofflimitierung in SMM mit 20 mM NaNO₃ als einzige Stickstoffquelle angezogen. Die Zellextrakte (ce) wurden in eine obere (S₁) und untere (S₂) cytoplasmatische und eine Membranfraktion (P₁) aufgetrennt. P₁ wurde gewaschen und wieder in dem gleichen Muster (S₃, S₄ und P₂) fraktioniert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotanalysen untersucht. Der Immunoblot gegen die cytoplasmatische Glutamin-Synthetase fungiert als ein Indikator für die Qualität der Fraktionierung.



Entgegen den Erwartungen, TnrA und GlnK ausschließlich in der cytosolischen Fraktion zu finden, ist GlnK wie im Wildtyp zu gleichen Teilen zwischen der löslichen und der Membranfraktion verteilt. TnrA ist außerdem komplett im Pellet zu finden. Die lösliche Glutamin-Synthetase ist nur in der löslichen Fraktion zu finden, was bedeutet, dass die Membranfraktionen frei von löslichen Proteinen ist.

2.5. ATP/ α -Ketoglutarat-Effekt auf den GlnK-TnrA-Komplex

Das Ergebnis, dass die Lokalisation von TnrA GlnK-abhängig ist, wirft die Frage auf, ob die Effektormoleküle ATP und α -Ketoglutarat diese GlnK-abhängige TnrA-Lokalisation beeinflussen kann. Um diesen Punkt zu klären, wurden Zellextrakte in der Gegenwart von MgCl₂ fraktioniert (B.9.4.). Des Weiteren wurde diese Fraktionierung in Abwesenheit oder Gegenwart von 4 mM ATP und 1 mM α -Ketoglutarat durchgeführt. Die Fraktionen wurden, wie bereits beschrieben, einer Immunoblot-Analyse unterzogen, in der GlnK- und TnrA-spezifische Antikörper verwendet wurden. Außerdem wurden GS-spezifische Antikörper benutzt, um die Qualität der Fraktionierung zu bestimmen.

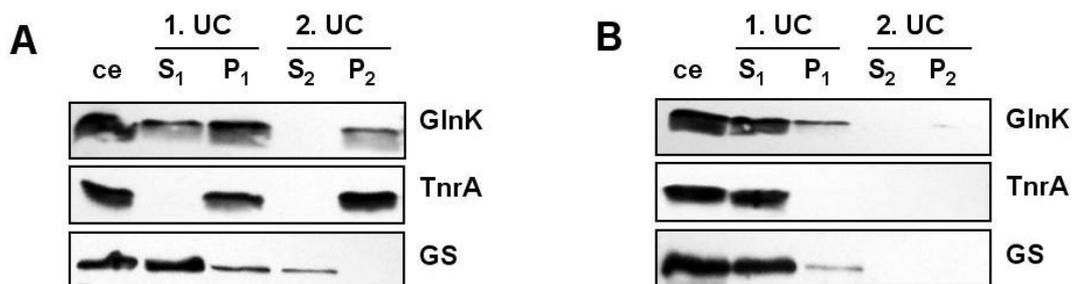


Abbildung C.50.: ATP und α -Ketoglutarat beeinflussen die GlnK-abhängige TnrA-Lokalisation. Wildtyp Zellen von *B. subtilis* wurden unter Stickstofflimitierung in SMM mit 20 mM NaNO₃ als einzige Stickstoffquelle angezogen. Der Zellextrakt (ce) wurde durch Ultrazentrifugation in der Abwesenheit (A) und in der Gegenwart (B) von 4 mM ATP und 1 mM α -Ketoglutarat in eine cytoplasmatische (S₁) und eine Membranfraktion (P₁) unterteilt. P₁ wurde gewaschen und erneut nach dem oben beschriebenen Muster fraktioniert (S₂ und P₂). Die Fraktionen wurden einer SDS-PAGE unterzogen, gefolgt von einer Immunoblot-Analyse, in der GlnK- und TnrA-spezifische Antikörper verwendet wurden. Der Immunoblot gegen die cytoplasmatische Glutamin-Synthetase diente als Indikator für die Qualität der Membranfraktion.

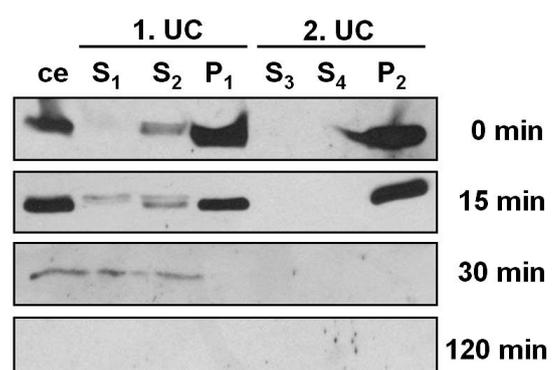
Wie bereits in früheren Experimenten gezeigt worden ist, ist GlnK in der Abwesenheit von ATP und α -Ketoglutarat zwischen der Membran-haltigen und cytosolischen Fraktion zu gleichen Teilen verteilt, wohingegen TnrA nur in der Membran-haltigen Fraktion zu finden ist (Abb. C.50.A.). In der Gegenwart von ATP und α -Ketoglutarat hingegen (Abb. C.50.B.) ist GlnK, wie erwartet, fast vollständig in das Cytosol über-getreten. Des Weiteren ist die Lokalisation von TnrA stark durch die Anwesenheit von ATP und α -Ketoglutarat beeinflusst. Unter diesen Bedingungen ist TnrA komplett von der Membran gelöst. Es konnte keine Assoziation mit der Membran mehr beobachtet werden. Dies stimmt mit der ATP/ α -Ketoglutarat-abhängigen Lokalisation von GlnK überein.

2.6. TnrA-Lokalisation in Abwesenheit von Stickstoff

In den Lokalisationsversuchen und Immunopräzipitationen zeigten sich Differenzen in der Lokalisation von TnrA. In Zellen, die unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen angezogen worden waren und in der stationären Phase vorlagen (vgl. Abb. C.45.), befanden sich geringe Teile an TnrA in der cytosolischen Fraktion, wohingegen in exponentiell angezogenen Zellen TnrA ausschließlich Membran-assoziiert ist.

Diese Diskrepanz warf die Frage auf, ob die Abwesenheit von Stickstoff die Lokalisation von TnrA beeinflusst. Um diese Frage zu lösen, wurden *B. subtilis* Zellen mit 20 mM NaNO₃ als einziger Stickstoffquelle in 150 ml SM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen. Die Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation (5.000 rpm, RT) pelletiert und mit SM-Medium ohne jegliche Stickstoffquelle gewaschen. Anschließend wurde das gewaschene Pellet wieder in 150 ml SM-Medium ohne Stickstoffquelle gelöst. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, während der zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30 und 120 Minuten) Zellproben genommen wurden. Die entnommenen Zellen wurden mit Hilfe des RiboLysers aufgebrochen (B.8.1.) und die zellfreien Extrakte anschließend durch Ultrazentrifugation fraktioniert (B.9.4.). Die Fraktionen wurden durch Immunoblot-Analyse unter Anwendung von TnrA-spezifischen Antikörpern auf dessen Lokalisation untersucht (B.14.1).

Abbildung C.51.: Lokalisation von TnrA nach Stickstoffentzug. Zellen wurden unter Stickstofflimitierung in SMM mit 20 mM NaNO₃ als einzige Stickstoffquelle angezogen. Nach einem *Shift* auf SM-Medium ohne Stickstoff wurden nach 0, 15, 30 und 120 Minuten die Zellextrakte auf die Lokalisation von TnrA untersucht. Dazu wurden die Zellextrakte (ce) in eine obere (S₁) und untere (S₂) cytoplasmatische und eine Membranfraktion (P₁) aufgetrennt. P₁ wurde gewaschen und wieder in dem gleichen Muster (S₃, S₄ und P₂) fraktioniert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotanalysen untersucht.



Wie in der Abbildung C.51. zu sehen ist, liegt zum Zeitpunkt des *Shifts* TnrA in der Pelletfraktion vor. Nach 15 Minuten nimmt die Gesamtmenge an TnrA leicht ab und ist nun auch in der cytosolischen Fraktion zu finden. Außerdem erscheint in der Fraktion S₂ eine zweite Bande, die auf ein Spaltprodukt oder eine Art von Modifikation hinweisen könnte, durch die sich das Laufverhalten der TnrA-spezifischen Bande verändert haben könnte. Nach weiteren 15 Minuten ist die Menge an TnrA deutlich reduziert und vollständig ins Cytosol übergegangen. Nach zwei Stunden kann im Zellextrakt kein TnrA mehr detektiert werden.

Des Weiteren wurde der Zellextrakt auf den Gehalt von GlnK untersucht, um festzustellen, ob der Abbau von TnrA mit einem Abbau von GlnK einhergeht.

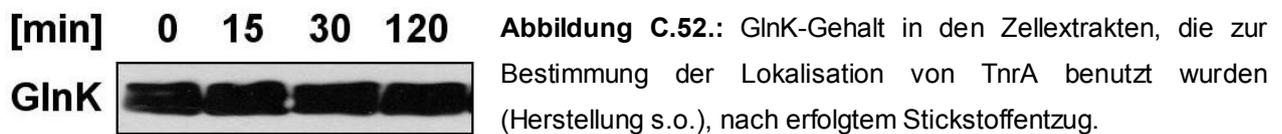


Abbildung C.52. zeigt deutlich, dass GlnK über einen Zeitraum von zwei Stunden nicht abgebaut wird. Dies bedeutet wiederum, dass der Abbau von TnrA spezifisch ist. Die Identifizierung der TnrA-abbauenden Protease wird in Kooperation mit der Universität von Kasan, Russland (Airat Kayumov) durchgeführt.

2.7. Klonierung einer *glnH*-defizienten Mutante

Da in Punkt C.2.4. (Co-Lokalisation von TnrA und GlnK) festgestellt wurde, dass in der *amtB*-defizienten Mutante trotz Fehlens des Ammoniumtransporters GlnK an der Membran lokalisiert ist (vgl. Abb. C.49.), wurde nach möglichen Interaktionspartnern an der Membran gesucht. In den MALDI-TOF-Analysen (C.1.3.4.) wurden tryptische Fragmente des Glutamin-Bindeproteins GlnH, einem Bestandteil des potentiellen Glutamin-ABC-Transporters, detektiert (vgl. C.27 und C.28.). Zur Analyse einer GlnH-abhängigen Lokalisation von GlnK sollte eine *glnH*-defiziente Mutante von *B. subtilis* hergestellt werden. Für den Fall, dass GlnK über GlnH an der Membran bindet, müsste GlnK in der Mutante in der cytosolischen Fraktion vorliegen.

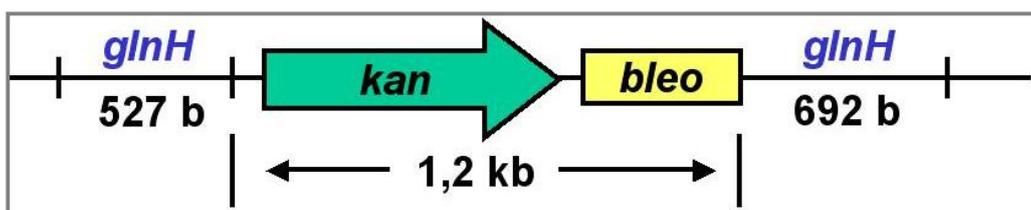


Abbildung C.53.: Deletionskonstrukt von *glnH* mit Hilfe der Kanamycin-Kassette KIXX aus dem Vektor pUC4KIXX.

Als erstes wurde das 819 bp große *glnH*-Gen mit Überhängen von jeweils 200 bp von *B. subtilis* durch PCR amplifiziert, wobei chromosomale DNA von *B. subtilis* und das Primerpaar 5'-*glnH*-knockout und 3'-*glnH*-knockout benutzt wurden (Abb. C.54.).

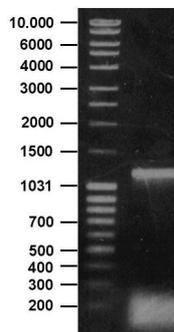


Abbildung C.54.: PCR-Produkt, das durch Amplifizierung mit chromosomaler *B. subtilis* DNA und dem Primerpaar 5'-*glnH*-knockout und 3'-*glnH*-knockout hergestellt worden ist. DNA-Standard in Da.

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem Vektor pGEM-T ligiert. Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht. Das Plasmid wurde anschließend zur Vermehrung in den *E. coli* Stamm XL1 transformiert und die Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin selektiert. Das Plasmid wurde aus *E. coli* extrahiert und mit *EcoRV* geschnitten.

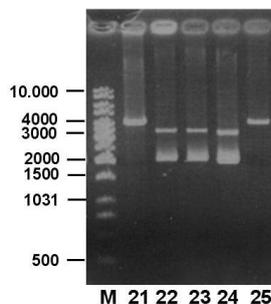


Abbildung C.55.: Plasmid pGEM-*glnH*-ko nach Restriktion mit *EcoRV*. Zu sehen sind in den Spuren 21 und 25 das linearisierte Plasmid mit einer Größe von 4219 bp.

Das linearisierte Plasmid wurde mit Hilfe von alkaliner Phosphatase (CIP, Fermentas) an den 5'-Enden dephosphoryliert (Inkubation: 30 Minuten bei 37°C, Stopp der Reaktion: 15 Minuten bei 85°C). Es folgte eine Aufreinigung des Plasmids über ein 1%iges Agarosegel.

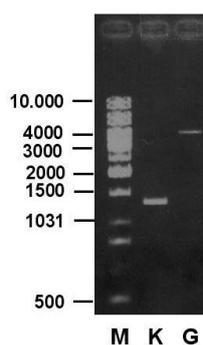


Abbildung C.56.: Aufgereinigtes und linearisiertes Plasmid pGEM-*glnH*-ko nach Restriktion mit *EcoRV* (G) und Kanamycin-Kassette KIXX (K) mit *SmaI* geschnitten.

Das linearisierte Plasmid pGEM-*glnH*-ko wurde mit der Kanamycin-Kassette über Nacht bei 4°C ligiert. Das entstandene Plasmid wurde anschließend zur Vermehrung in den *E. coli* Stamm XL1 transformiert und die Transformanten auf LB-Platten mit Kanamycin (50µg ml⁻¹) selektiert. Es sind nach diesem Schritt auch nach mehrmaliger Wiederholung keine Transformanten gewachsen. Die Ligation mit der KIXX-Kassette führte auch bei anderen Ligationen im Labor zu Problemen. Daher konnte keine weitere Untersuchung einer potentiellen GlnK-GlnH-Interaktion bis zum Ende der vorliegenden Doktorarbeit unternommen werden.

3. Interaktion zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase

Wie bereits von Wray *et al.* (2001) beschrieben, interagiert der Transkriptionsfaktor TnrA mit der Glutamin-Synthetase in ihrer *feedback*-gehemmten Form. Durch diese Komplexbildung wird die Fähigkeit von TnrA, DNA zu binden, unterdrückt. Durch Glutamin-Synthetase-Tests (K. Woyda, Diplomarbeit) konnte gezeigt werden, dass TnrA sowohl mit der *feedback*-gehemmten als auch mit der aktiven Form der Glutamin-Synthetase Wechsel wirken kann und die Aktivität der Glutamin-Synthetase dabei deutlich reduziert wird.

3.1. Konstruktion des Vektors pET-TnrA

Als erstes wurde das 359 bp große *tnrA*-Gen von *B. subtilis* durch PCR amplifiziert, wobei chromosomale DNA von *B. subtilis* und das Primerpaar *tnrA*-for und *tnrA*-*Xho*I-rev benutzt wurden, die die Schnittstellen *Nde*I bzw. *Xho*I besaßen.

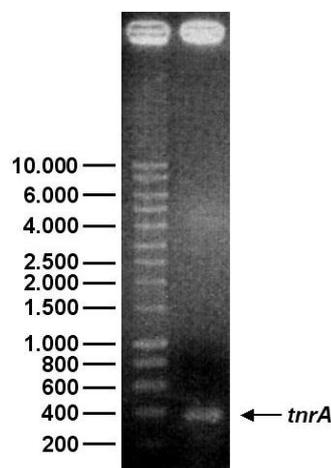


Abbildung C.57.: PCR-Produkt, das durch Amplifizierung mit chromosomaler *B. subtilis* DNA und dem Primerpaar *tnrA*-for und *tnrA*-*Xho*I-rev hergestellt worden ist. DNA-Standard in Da.

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem Vektor pGEM-T ligiert. Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht. Das Plasmid wurde anschließend zur Vermehrung in den *E. coli* Stamm XL1 transformiert und die Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin selektiert. Das Plasmid wurde aus *E. coli* extrahiert und mit *Nde*I und *Xho*I geschnitten. Das kleinere Fragment wurde aufgereinigt und mit dem Expressionsvektor pET-15b ligiert, der bereits mit den selben Enzymen geschnitten worden ist.

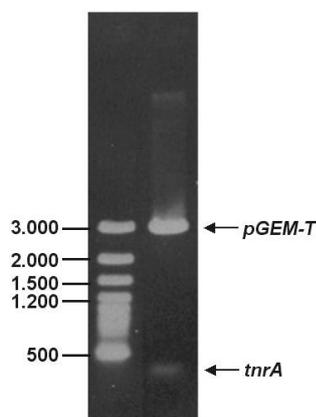
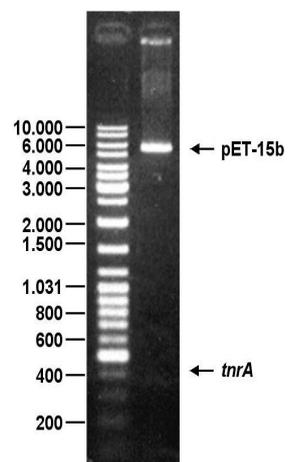


Abbildung C.58. (links): Plasmid pGEM-TnrA nach Restriktion mit *Nde*I und *Xho*I. Zu sehen sind der 3000 bp große Vektor pGEM-T und das 359 bp große DNA-Fragment *tnrA*.

Abbildung C.59. (rechts): Plasmid pET-tnrA nach Restriktion mit *Nde*I und *Xho*I. Zu sehen sind der 5708 bp große Vektor pET-15b und das 359 bp große DNA-Fragment *tnrA*.



Das resultierende Plasmid pET-tnrA wurde in den *E. coli* Stamm XL1 transformiert, die Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin selektiert und das Plasmid pET-tnrA aus den Bakterienzellen extrahiert. Das gereinigte Plasmid wurde sequenziert und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert.

Die Aufreinigung des His₆-TnrA wurde von K. Woyda im Rahmen ihrer Diplomarbeit in unserem Labor durchgeführt.

3.2. TnrA beeinflusst die Glutamin-Synthetase-Aktivität durch Protein-Interaktion

Um eine gut messbare Aktivität der Glutamin-Synthetase in den folgenden Experimenten verwenden zu können, wurde als erstes die Aktivität der Glutamin-Synthetase bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt (Abb. C.60.).

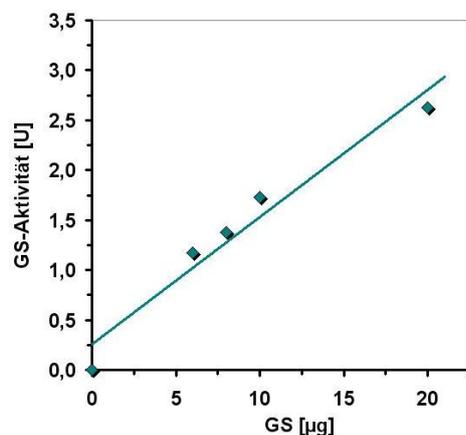


Abbildung C.60.: Aktivität der Glutamin-Synthetase (GS-Aktivität) von aufsteigenden Konzentrationen an Glutamin-Synthetase (0, 6, 8, 10 und 20 µg).

In den folgenden Experimenten wurden jeweils 8 µg Glutamin-Synthetase in die Aktivitätstests eingesetzt.

Als nächstes wurde der Effekt von TnrA auf die Glutamin-Synthetase in Abwesenheit von Effektormolekülen gemessen. Dazu wurden aufsteigende Mengen an TnrA (0, 5, 10 und 15 µg) in den Aktivitätstest eingesetzt (Abb. C.61.).

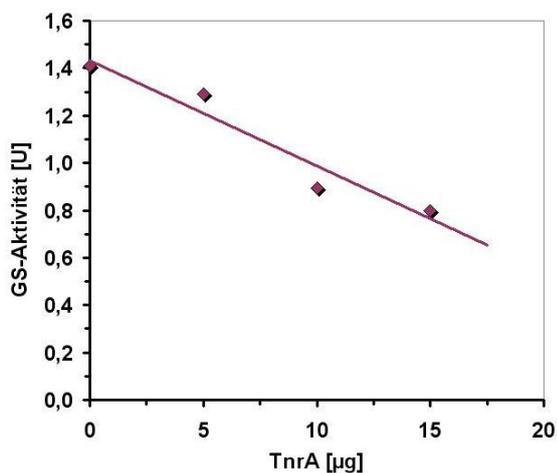


Abbildung C.61.: Effekt von TnrA auf die Glutamin-Synthetase (GS) Aktivität. In die Aktivitätstest wurden aufsteigende Mengen an TnrA eingesetzt (0, 5, 10 und 15 µg) und die Aktivität der Glutamin-Synthetase bestimmt.

Abbildung C.61. zeigt eine deutlich hemmende Wirkung des Transkriptionsfaktors TnrA auf die Aktivität der Glutamin-Synthetase in Abwesenheit jeglicher Effektormoleküle.

Die folgenden Glutamin-Synthetase-Tests (B.20.1.) zeigen den Effekt von TnrA in der Gegenwart von unterschiedlichen Feedback-Inhibitoren auf die Glutamin-Synthetase-Aktivität (Abb. C.62.). Dazu wurden aufsteigende Mengen von TnrA in Gegenwart von konstanten Konzentrationen der Metaboliten in den Glutamin-Synthetase-Test eingesetzt und die Aktivität bestimmt. Die Konzentrationen der Metaboliten wurden so gewählt, dass sie bereits eine ca. 50%ige Hemmung der Glutamin-Synthetase-Aktivität bewirken (vgl. Diplomarbeit K. Woyda).

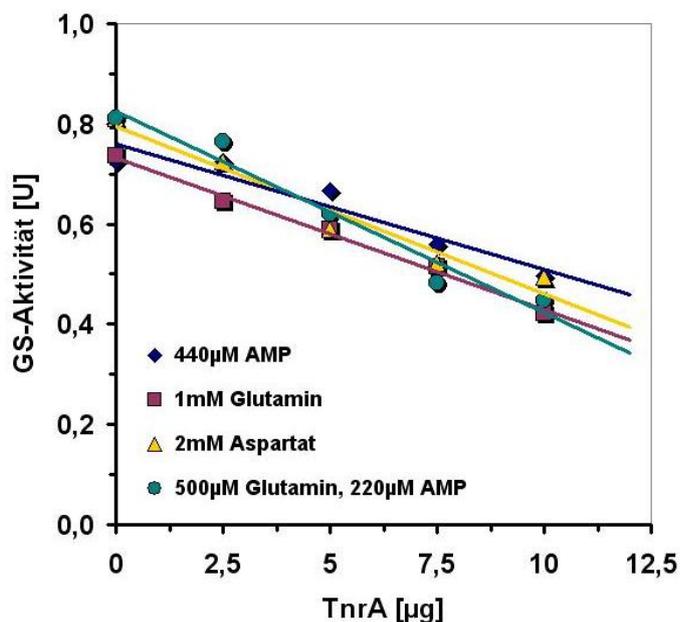


Abbildung C.62.: Effekt von TnrA in Gegenwart von unterschiedlichen Metaboliten auf die Glutamin-Synthetase-Aktivität. Es wurden aufsteigende Mengen an TnrA (0, 2,5, 5, 7,5 und 10 µg) und konstante Mengen an AMP (440 µM), Glutamin (1 mM) Aspartat (2 mM) bzw. die Kombination aus AMP und Glutamin (220 µM bzw. 500 µM) eingesetzt.

Aus den Glutamin-Synthetase-Tests (Abb. C.62.) mit den unterschiedlichen Metaboliten wird deutlich, dass, unabhängig der zugeführten Metaboliten, TnrA die Aktivität der Glutamin-Synthetase hemmt. Sowohl ohne Effektoren als auch in der Gegenwart von Aspartat, das sich in früheren Studien als unwirksam identifiziert wurde, zeigt sich der gleiche Effekt von TnrA, wie auch in der Gegenwart von AMP und Glutamin, die starke Inhibitoren der Glutamin-Synthetase-Aktivität darstellen.

Die folgenden BIAcore-Experimente sollen einen weiteren Einblick in die Interaktion zwischen Glutamin-Synthetase und dem Transkriptionsfaktor TnrA ermöglichen.

Für die BIAcore-Experimente wurde His₆-TnrA (C.2.6.) auf einem NTA-Sensorchip immobilisiert und *Strep*-tag Glutamin-Synthetase als Analyt genutzt. In der Referenzzelle (FC1) wurde His₆-N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase von *Synechococcus elongatus* gebunden, um unspezifische Bindungen ausschließen zu können.

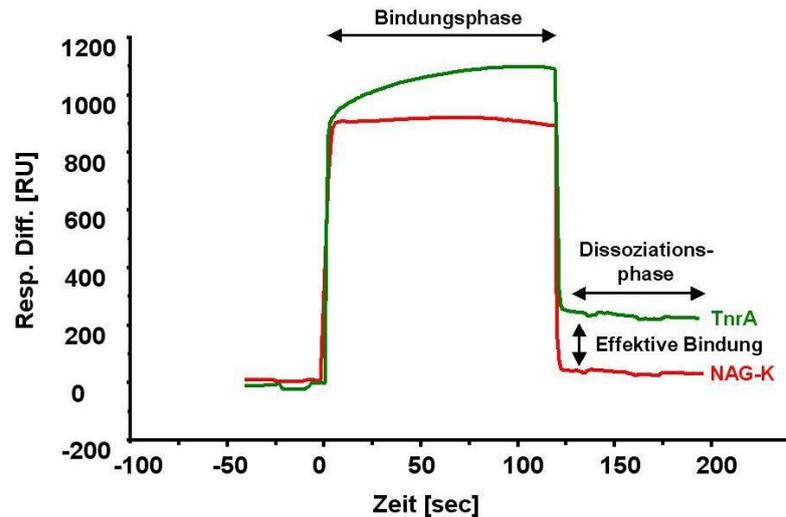


Abbildung C.63.: Beispiel einer Biacore-Analyse. Die beiden Messzellen sind hier separat dargestellt. In der Referenzzelle (FC1) ist His₆-NAG-Kinase (rot) und in der Messzelle (FC2) His₆-TnrA (grün) immobilisiert. Nach Zugabe von Glutamin-Synthetase beginnt die Bindungsphase. Die grüne Kurve zeigt eine deutliche Bindung, während die rote Kurve nur einen Massentransport anzeigt. Die effektive Bindung ist im Unterschied der beiden Messzellen im Vergleich zum Ausgangswert (Zeitpunkt Null) zu ermitteln.

Es konnte keine Bindung von Glutamin-Synthetase an die NAG-Kinase beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Bindung von TnrA und Glutamin-Synthetase spezifisch ist.

Nun wurde die Bindung von aufsteigenden Konzentrationen an Glutamin-Synthetase und gleichbleibenden Mengen an gebundenem TnrA untersucht.

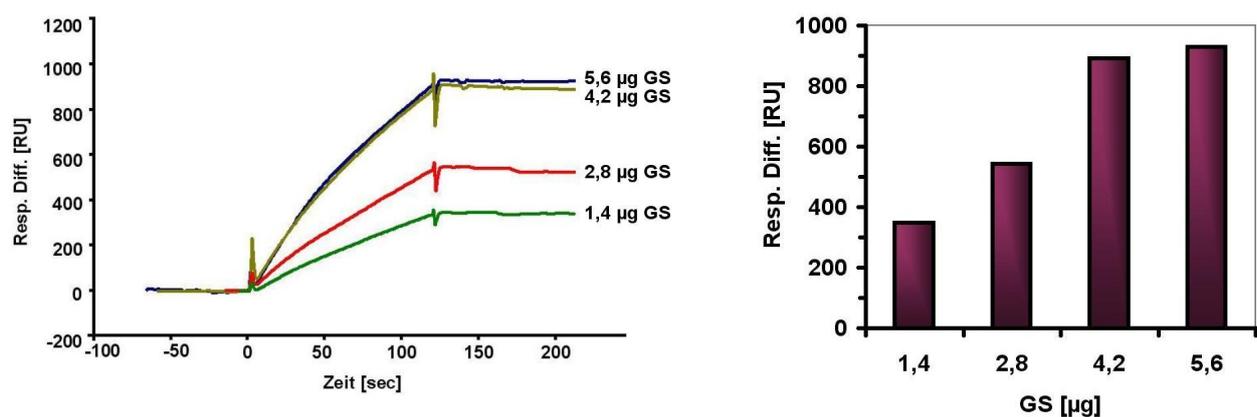


Abbildung C.64.: Titration von an die Ni²⁺-NTA-Oberfläche gebundenem His₆-TnrA mit ansteigenden Mengen an Glutamin-Synthetase (von 1,4 bis 5,6 µg). Die Glutamin-Synthetase wurde mit einem Volumen von 40 µl mit einer Flussrate von 20 µl min⁻¹ injiziert. Der Graph links zeigt die Differenz zwischen der Flusszelle 2 und der Referenzzelle 1. In dem Graphen rechts sind die Zunahmen der Bindung absolut in einem Balkendiagramm dargestellt.

Die Abbildung C.64. zeigt die Interaktion zwischen gebundenem TnrA und ansteigenden Konzentrationen an Glutamin-Synthetase. Die Bindung war bereits ab 4,2 µg Glutamin-Synthetase nahezu gesättigt. Diese Konzentration wurde daher für weitere Bindungsstudien genutzt. Der TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplex war sehr stabil, wie an der Dissoziationsphase, die auf die Injektionsphase folgt, zu sehen ist. Behandlung dieses Komplexes mit hohen Salzkonzentrationen oder pH-Unterschieden zum Sauern hin, führten zu keiner vollständigen Dissoziation. Daher musste der Sensorchip nach jeder Messung mit Imidazol regeneriert und anschließend neu mit His₆-TnrA beladen werden.

Um den Effekt von verschiedenen Effektormolekülen auf die Interaktion zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase zu testen, wurden 4,2 µg Glutamin-Synthetase mit den jeweiligen Effektormolekülen inkubiert und der Effekt auf die Bindung an TnrA anschließend mit Hilfe des BIAcore-Systems analysiert. In Abbildung C.65. ist der Effekt von ATP abgebildet.

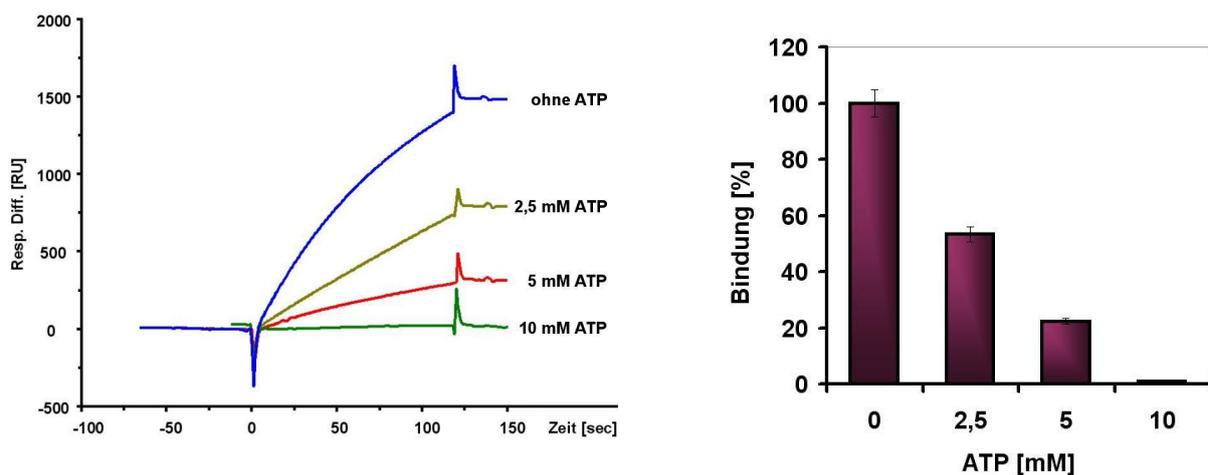


Abbildung C.65.: Effekt von ATP auf den TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplex. Von oben nach unten zeigen die Kurven die Interaktion von 4,2 µg Glutamin-Synthetase an TnrA in der Gegenwart von ansteigenden Mengen an ATP (0, 2,5, 5 bzw. 10 mM) (links). Die Hemmung der Bindung ist außerdem als Balkendiagramm dargestellt (rechts).

Wie in der Zusammenstellung zu sehen ist, verhindert ATP die Komplexbildung zwischen Glutamin-Synthetase und TnrA. Bei einer Konzentration von 10mM ATP ist TnrA nicht mehr in der Lage, Glutamin-Synthetase zu binden.

In einem abgewandelten Experiment wurden 10 mM ATP erst nach Bildung des TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplexes injiziert. Dieser Effekt von ATP auf den TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplex ist in Abbildung C.66. gezeigt.

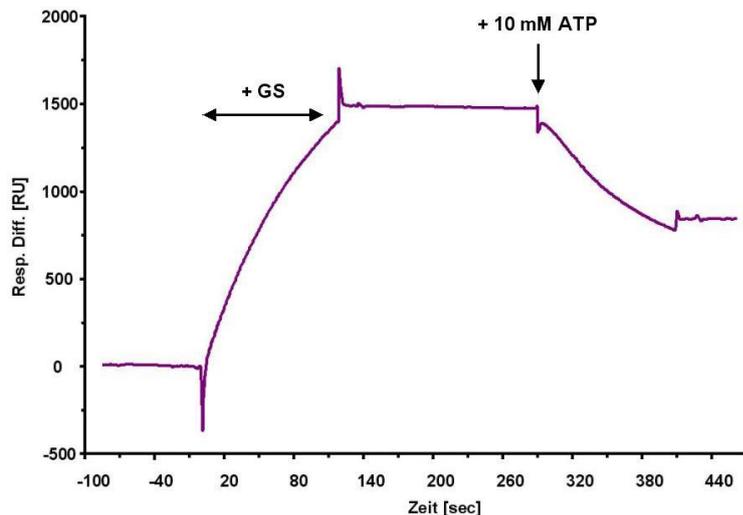


Abbildung C.66.: Effekt von ATP auf die Dissoziation des TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplexes. Als erstes wurde Glutamin-Synthetase (4,2 µg) injiziert, das an TnrA wie gewohnt gebunden hat. Nach 180 Sekunden Waschen mit HBS-Puffer wurden 40 µl 10 mM ATP injiziert (durch Pfeil gekennzeichnet). Dies führt zu einer partiellen Dissoziation.

Direkt nach Injektion von 10 mM ATP dissoziiert der TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplex zu ca. 50%. Eine weitere Dissoziation durch erneute Zugabe von ATP oder höheren Konzentrationen konnte allerdings nicht erreicht werden.

Als nächstes wurde der Effekt von Feedback-Inhibitoren der Glutamin-Synthetase auf die Komplexbildung untersucht. Dazu wurde die Glutamin-Synthetase (4,2 µg) mit aufsteigenden Mengen an AMP (5, 7,5 bzw. 10 mM AMP) vorinkubiert und anschließend mit einer Flussrate von 20 µl min⁻¹ injiziert. Der Effekt von AMP auf die Komplexbildung ist in Abbildung C.67. dargestellt.

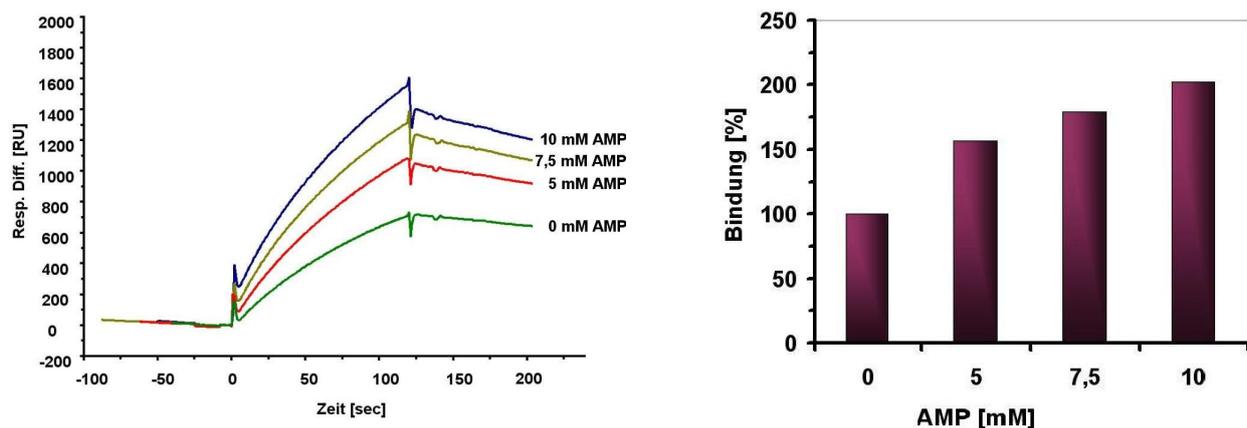


Abbildung C.67.: Einfluss von AMP auf die Komplexbildung zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase. Auf der linken Seite sieht man eine Zusammenstellung der Komplexbildungen, bei denen eine gleichbleibende Menge an Glutamin-Synthetase (4,2 µg) mit aufsteigenden Mengen an AMP (0, 5, 7,5 bzw. 10 mM) mit einer Flussrate von 20 µl min⁻¹ injiziert worden war. Rechts ist der prozentuale Anteil an gebundener Glutamin-Synthetase in einem Balkendiagramm abgebildet. Die gebundene Menge an Glutamin-Synthetase in der Abwesenheit von AMP wurde als Ausgangswert genutzt.

Wie aus Abbildung C.67. zu erkennen ist, steigert AMP die Komplexbildung zwischen TnrA und der Glutamin-Synthetase. 10 mM AMP verdoppeln sogar die Bindekapazität der Proteine, die eigentlich schon in der Abwesenheit von AMP gesättigt war (vgl. C.64.).

Als nächstes wurde ein weiterer *Feedback*-Inhibitor untersucht. Dazu wurde die Glutamin-Synthetase (4,2 µg) nun mit 20 mM Glutamin vorinkubiert und anschließend mit einer Flussrate von 20 µl min⁻¹ injiziert. Es wurden 20 mM Glutamin in den Test eingesetzt, da Fisher und Sonenshein (1984) zeigten, dass in *B. subtilis* Zellen, die in Minimalmedium mit einem Überschuss an Stickstoff angezogen worden waren, der Glutaminspiegel bei 19,8 mM liegt. Der Effekt von Glutamin auf die Komplexbildung ist im Vergleich zu 10 mM AMP in Abbildung C.68. dargestellt.

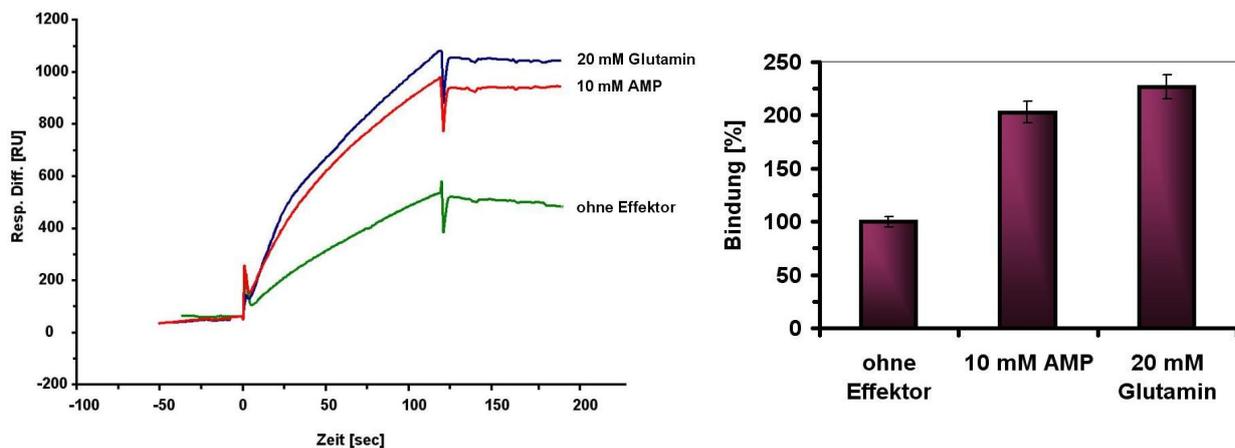


Abbildung C.68.: Einfluss von Glutamin auf die Komplexbildung zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase. Auf der linken Seite sieht man eine Zusammenstellung der Komplexbildungen, bei denen eine gleichbleibende Menge an Glutamin-Synthetase (4,2 µg) in der Gegenwart von 20 mM Glutamin bzw. 10 mM AMP oder deren Abwesenheit mit einer Flussrate von 20 µl min⁻¹ injiziert worden war. Rechts ist der prozentuale Anteil an gebundener Glutamin-Synthetase in einem Balkendiagramm abgebildet. Die gebundene Menge an Glutamin-Synthetase in der Abwesenheit von AMP wurde als Ausgangswert genutzt.

20 mM Glutamin steigern die Glutamin-Synthetase-Bindung um mehr als 125% (Abb. C.68.), 10 mM AMP, wie bereits gezeigt, um 100% (vgl. Abb. C.67.).

Ein weiterer Feedback-Inhibitor, Glycin, wirkte sich in Gelshift-Experimenten ebenfalls sehr verstärkend auf die Hemmung der Bindung von DNA an TnrA aus (Wray *et al.*, 2001). Deshalb wurde auch Glycin mit einer Konzentration von 10 mM in den Test eingesetzt.

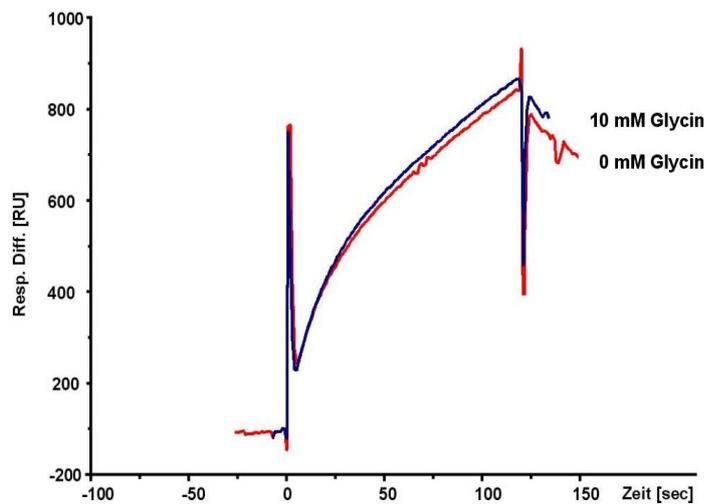


Abbildung C.69.: Einfluss von Glycin auf die Komplexbildung zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase. Auf der linken Seite sieht man eine Zusammenstellung der Komplexbildungen, bei denen eine gleich bleibende Menge an Glutamin-Synthetase (4,2 μg) in der Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 mM mit einer Flussrate von $20 \mu\text{l min}^{-1}$ injiziert worden war.

Wie aus Abbildung C.69. zu entnehmen ist, hat Glycin auch bei einer Konzentration von 10 mM keinen wesentlichen Einfluss auf die Komplexbildung zwischen TnrA und der Glutamin-Synthetase.

II. *Synechococcus elongatus* N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase

Um Proteine identifizieren zu können, die mit dem P_{II}-Protein von *Synechococcus elongatus* PCC 7942 interagieren, wurden in unserem Labor Hefe-2-Hybrid-Screenings durchgeführt (U. Ruppert). Das *S. elongatus glnB*-Gen wurde dazu in die DNA-Bindedomäne von GAL4 gesetzt und als Sonde in einem Interaktionsscreening gegen eine genomische Bank von *S. elongatus* genutzt. Von den positiven Klonen, die in diesem Screening entdeckt worden sind, wurden die klonierten Sequenzen von sechs Klonen bestimmt. Zwei der untersuchten Fragmente entsprachen dem *glnB*-Gen und eins dem *argB*-Gen. Da die GlnB-Untereinheiten miteinander interagieren, um die trimere P_{II}-Struktur zu bilden, bestätigt eine Interaktion von GlnB-GAL4AD mit der GlnB-GAL4BD-Fusion die physiologische Relevanz dieser Screening-Prozedur.

Die positive Interaktion der GlnB-GAL4BD-Fusion mit dem *argB*-Produkt war unerwartet und warf die Frage auf, ob diese Interaktion spezifisch, oder ob das Ergebnis ein Artefakt der Interaktion zwischen den Fusionsproteinen ist. Das *argB*-Gen, dessen Sequenz bereits in der NCBI-Datenbank eingetragen war (Zugangsnummer AY354518), kodiert das Enzym N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase (NAG-Kinase), ein Schlüsselenzym in der Argininbiosynthese in Prokaryoten, niederen Eukaryoten und Pflanzen (Caldovic und Tuchman, 2003) und ist ein Prototyp der Enzymfamilie von Aminosäurekinasen (Ramón-Maiques *et al.*, 2002).

Um nun die Interaktion zwischen GlnB und ArgB von *S. elongatus* zu verifizieren und eine tatsächliche Interaktion biochemisch charakterisieren zu können, wurde als erstes die NAG-Kinase in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt.

1. Aufreinigung

Für die Aufreinigung wurde das für die N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase codierende Gen *argB* in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) überproduziert. 500 ml LB-Kultur (mit 100 µg ml⁻¹) wurden in einem zwei Liter-Kolben bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wachsen gelassen. Nach erfolgter Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Zellen nach 2 Stunden geerntet, in Zellaufbruchpuffer A (B.3.5.) gewaschen und bei -20°C gelagert. In diesem Zustand wurden die Zellen bereit gestellt.

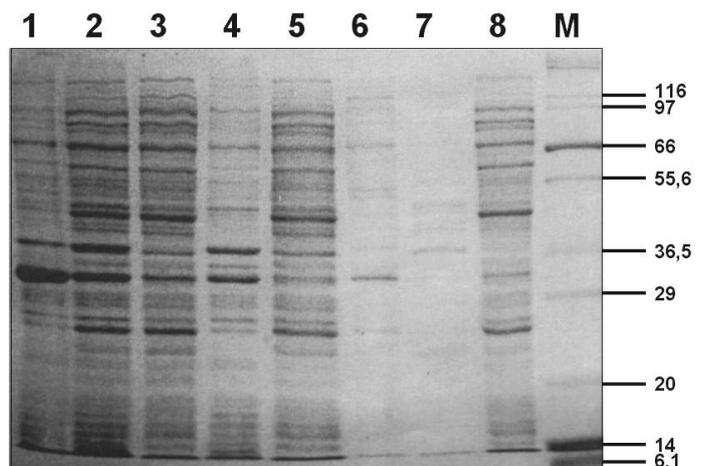
Das Zellpellet (18 g) wurde auf Eis aufgetaut, in 18 ml Zellaufbruchpuffer A (B.3.5.) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (B.8.2.) aufgebrochen. Danach wurden Zelltrümmer und nicht aufgebrochene Zellen durch Zentrifugation (10 min bei 6.000 rpm) entfernt.

Der zellfreie Extrakt wurde einer Ultrazentrifugation (40.000 rpm, 1h) unterzogen. Mit dem Überstand der Ultrazentrifugation wurde anschließend eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (B.9.2.) durchgeführt. Dazu wurden 2,99 g Ammoniumsulfat zu den 18 ml zellfreien Extraktes gegeben (→ 30% Endkonzentration). Nach erfolgter Zentrifugation (10.000 rpm, 10 min) wurde der Überstand weiter verwendet, indem 2,9 g Ammoniumsulfat auf den so gewonnenen Überstand (16 ml) gegeben wurden (→ 60% Endkonzentration). Die spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde durch NAG-Kinase-Aktivitätstests bestimmt, um zu sehen, in welcher Fraktion sich aktive NAG-Kinase befindet. Des Weiteren wurde eine 15%ige SDS-PAGE angefertigt, um die Proteinzusammensetzung der Fraktionen zu analysieren.

Tabelle C.1.: Spezifische Aktivität der NAG-Kinase-haltigen Fraktionen.

Fraktion	Aktivitätstest [OD ₅₄₀]	Proteingehalt [mg ml ⁻¹] (nach Bradford)	Spezifische Aktivität [A mg ⁻¹]
Rohextrakt	0,766	16,41	4,67
S100	0,438	14,99	2,92
P100	0,254	5,36	4,74
S30%AS	0,254	11,53	2,20
P30%AS	0,125	1,41	8,87
S60%AS	0,012	0,89	1,35
P60%AS	0,218	8,12	2,68

Abbildung C.70.: Verlauf der Reinigung anhand einer 15%igen SDS-PAGE. Die Proteine sind mit *Coomassie blue* gefärbt worden. (1) Proteinextrakt nach Induktion, (2) zellfreier Proteinextrakt, (3) Überstand und (4) Pellet der Ultrazentrifugation, (5) Überstand und (6) Pellet nach 30%iger Ammoniumsulfat-Fällung, (7) Überstand und (8) Pellet nach 60%iger Ammoniumsulfat-Fällung. (M) Marker [kDa].



Da sich die meiste spezifische Aktivität der NAG-Kinase in dem Pellet nach der 60%igen Ammoniumsulfat-Fällung befand, wurde das nach Zentrifugation (s.o.) erhaltene Pellet in 18 ml Puffer A2 mit 400 mM NaCl gelöst. Es folgte eine Inkubation auf Eis über eine Dauer von 30 Minuten unter regelmäßigem Schütteln. Nach erneuter Ultrazentrifugation (100.000xg, 1h) wurde dem S100 20% Ammoniumsulfat zugesetzt. Dieses Material wurde auf eine Methyl-HIC-Säule (B.11.4.) aufgetragen. Es wurde ein linearer Gradient von 20 bis 0% Ammoniumsulfat in Puffer A3 angelegt. Die Flussrate betrug 1,5 ml min⁻¹. Außerdem wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt (Abb. C.71.).

Nach erfolgtem Lauf wurden 3 μl der gesammelten Fraktionen in einem NAG-Kinase-Aktivitätstest (B.20.2.) untersucht, um die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen zu ermitteln (Abb. C.72.).

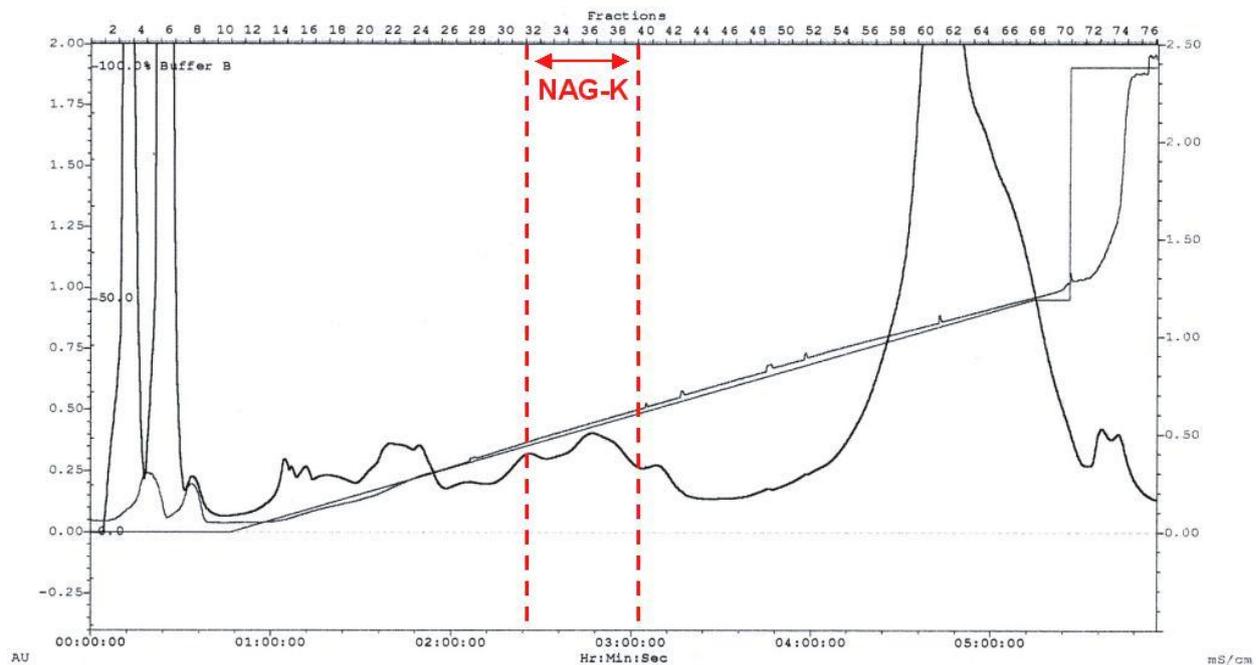


Abbildung C.71.: Elutionsprofil der Methyl-HIC-Chromatographie. Die dickere schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen an, die durch Aktivitätstests detektiert worden sind (vgl. Abb. C.72.).

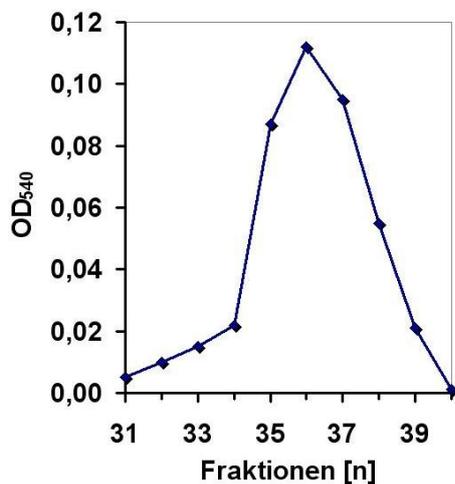


Abbildung C.72.: Ausschnitt des NAG-Kinase-Aktivitätsprofils. 3 μl der jeweiligen Fraktionen wurden auf NAG-Kinase-Aktivität getestet (B.20.2.). In der Abbildung ist der Bereich der aktiven NAG-Kinase gezeigt.

Die aktive NAG-Kinase befand sich hauptsächlich in den Fraktionen 32 bis 39 der hydrophoben Interaktionschromatographie. Diese Fraktionen wurden vereinigt und gegen den Puffer A4 dialysiert. Anschließend wurde eine Gelfiltration (*Superdex 200*) durchgeführt, bei der 2 ml Fraktionen mit einer Fließgeschwindigkeit von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ gesammelt wurden (Abb. C.73.). Nach erfolgtem Lauf wurden 3 μl der gesammelten Fraktionen in einem NAG-Kinase-Aktivitätstest (B.20.2.) untersucht, um die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen zu ermitteln (Abb. C.74.).

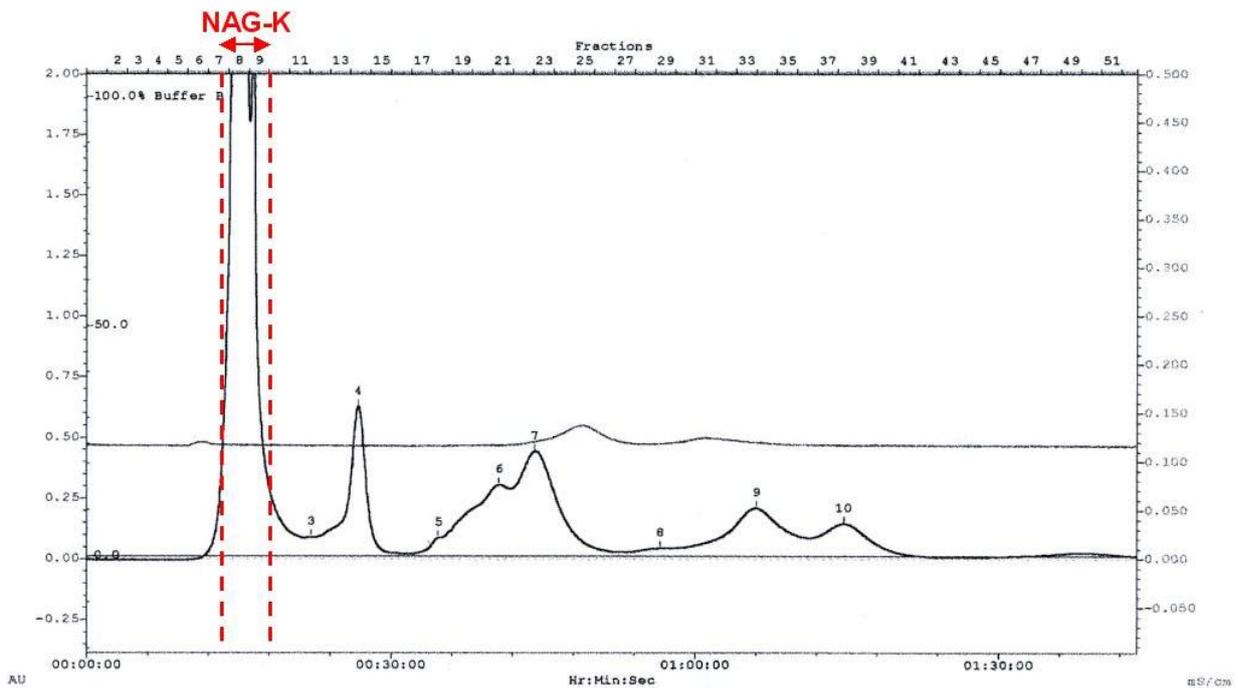


Abbildung C.73.: Elutionsprofil der Gelfiltration. Die dickere schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen an, die durch Aktivitätstests detektiert worden sind (vgl. Abb. rechts).

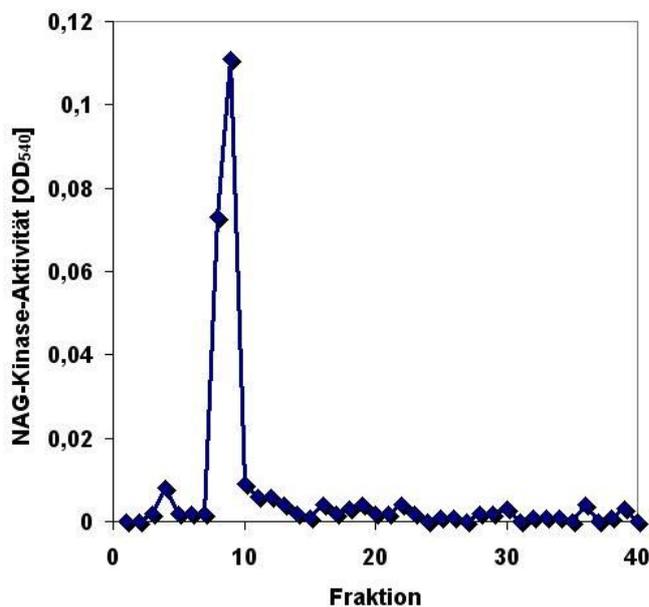


Abbildung C.74.: NAG-Kinase-Aktivitätsprofil der Gelfiltration. 3 µl der jeweiligen Fraktionen wurden auf NAG-Kinase-Aktivität getestet (B.20.2.). Die Fraktionen, die aktive NAG-Kinase enthielten, sind vereinigt worden.

Die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen (8-10) wurden vereinigt, in Puffer A5 verdünnt und auf eine UnoQ-Säule (B.11.1.) aufgetragen. An die Säule wurde ein Gradient von 75 bis 1000 mM NaCl angelegt. Fraktionen von einem Volumen von 1 ml wurden mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ gesammelt.

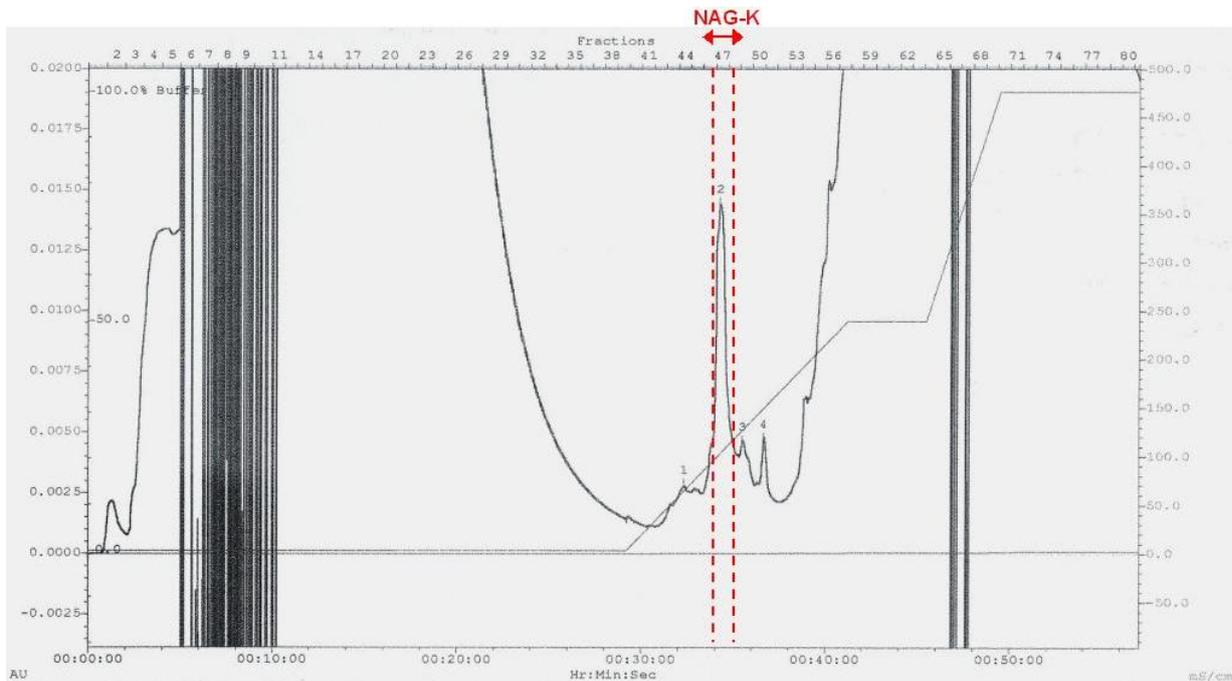


Abbildung C.75.: Elutionsprofil der UnoQ-Säule. Die dickere schwarze Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der rot markierte Bereich zeigt die NAG-Kinase-haltige Fraktion an, die durch Aktivitätstests detektiert worden ist.

Die NAG-Kinase wurde auf diese Weise bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt und ein Aliquot zur Immunisierung gegeben (vgl. Abb. C.76.).

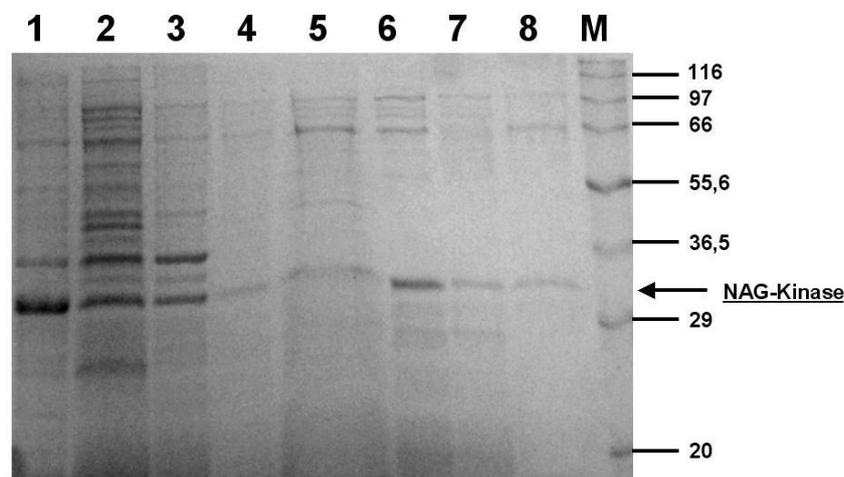


Abbildung C.76.: Verlauf der Reinigung anhand einer 15%igen SDS-PAGE. Die Proteine sind mit *Coomassie blue* gefärbt worden. (1) Proteinextrakt nach Induktion, (2) zellfreier Proteinextrakt, (3) Pellet nach 1. Ultrazentrifugation, (4) Probe aus Spur 3 nach Behandlung mit 400 mM NaCl, (5) Überstand nach 2. Ultrazentrifugation und 20%iger Ammoniumsulfatfällung, (6) vereinigten NAG-Kinase-haltigen Fraktionen nach erfolgreicher Methyl-HIC-Chromatographie, (7) vereinigten NAG-Kinase-haltigen Fraktionen nach erfolgreicher Gelfiltration, (8) Fraktion 47 des UnoQ-Laufes und (M) Marker [kDa].

2. Komplexbildung zwischen P_{II} und NAG-Kinase

Die Interaktion zwischen *S. elongatus* P_{II} und NAG-Kinase wurde als erstes mit Hilfe des Fusionsprotein P_{II}-*Strep*-tag (P_{II}-ST) von *S. elongatus* untersucht. Dieses Protein kann sehr schnell unter physiologischen Bedingungen über *Strep*-Tactin-Säulen (B.11.1.) gereinigt werden (Skerra und Schmidt, 2000). Diese rekombinanten *S. elongatus* P_{II}-Proteine liegen unmodifiziert, also unphosphoryliert, vor, da sie in *E. coli* Zellen überproduziert und aufgereinigt worden sind. Um nun eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen zu untersuchen, wurden 30 µg aufgereinigtes P_{II}-ST zu einem NAG-Kinase-haltigen zellfreien Extrakt (500 µg Gesamtprotein) hinzugefügt und die Mixtur über eine *Strep*-Tactin *Superflow* Säule geführt (B.22.). Nachdem unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen entfernt wurden, wurde affin gebundenes P_{II}-ST durch die Zugabe von Desthiobiotin eluiert. Das Eluat wurde dann durch SDS-PAGE analysiert.

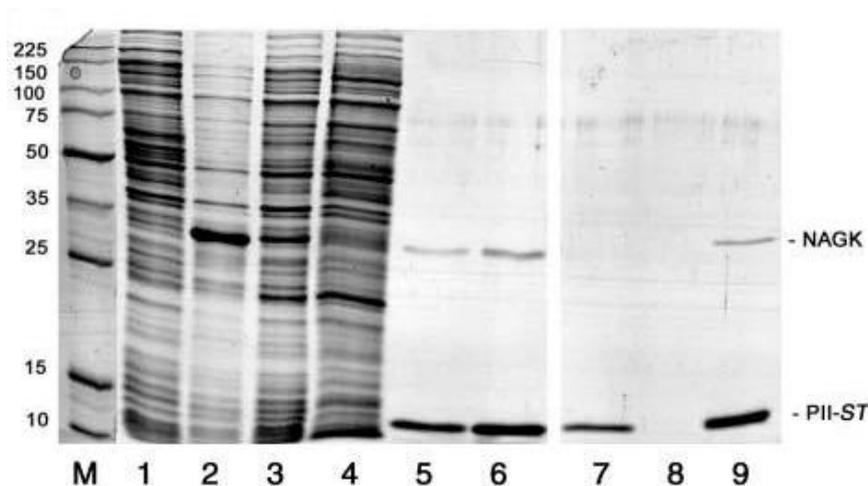


Abbildung C.77.: Überexpression von NAG-Kinase und Co-Elution mit *Strep*-tag P_{II} (P_{II}-ST) von einer *Strep*-Tactin-Säule. (1) Extrakt von BL21(DE) pASK-IBA3 Zellen (Vektorkontrolle), (2) Zellysat von BL21(DE) Zellen nach Überproduktion der NAG-Kinase, (3) zellfreier Extrakt der NAG-Kinase überproduzierenden Zellen (vgl. Spur 2). (4-8) *Strep*-tag *Pulldown Assays* der P_{II}-NAG-Kinase Komplexbildung. (4) Durchfluss der *Strep*-Tactin-Säule des zellfreien Extrakts (vgl. Spur 3), der mit P_{II}-ST gemischt wurde, (5) und (6) Elutionsfraktionen, (7) Elutionsfraktion eines Assays mit der Vektorkontrolle (vgl. Spur 1), (8) Elutionsfraktion eines zellfreien Extraktes von NAG-Kinase überproduzierenden Zellen, denen kein P_{II}-ST zugesetzt wurde, (9) wie in Spur 5, allerdings in der Gegenwart von 2 mM ATP und 0,5 mM α -Ketoglutarat. (M) *Broad Range* Proteinstandard (B.3.14.).

Wie in Abbildung C.77. in Spur 5 und 6 zu sehen ist, konnte tatsächlich eine Co-Elution von NAG-Kinase und P_{II}-ST festgestellt werden. Wenn Extrakte aus Zellen der Vektorkontrolle in den Test eingesetzt werden, konnte kein Protein mit der Größe der NAG-Kinase im Eluat beobachtet werden (Abb. C.77., Spur 7). Wurde kein P_{II}-ST dem NAG-Kinase-haltigen Extrakt zugefügt, eluierten keine Proteine von der *Strep*-Tactin-Säule (Abb. C.77., Spur 8).

Als das Experiment mit NAG-Kinase-haltigen Extrakten in der Gegenwart der Effektormoleküle ATP (2 mM) und α -Ketoglutarat (0,5 mM) durchgeführt wurde (Abb. C.77., Spur 9), eluierten ähnliche Mengen an NAG-Kinase und P_{II} -ST wie in der Abwesenheit dieser Effektormoleküle. Diese Experimente weisen deutlich darauf hin, dass die NAG-Kinase aus *S. elongatus* einen stabilen Komplex mit P_{II} bildet, sowohl in der Abwesenheit, als auch in der Gegenwart von ATP und α -Ketoglutarat.

3. P_{II} beeinflusst die NAG-Kinase Aktivität

Um einen tieferen Einblick in die molekulare Interaktion zwischen P_{II} und NAG-Kinase zu bekommen, wurde der Effekt von P_{II} auf die katalytische Aktivität der NAG-Kinase mit aufgereinigten Komponenten gemessen. Aufgereinigte NAG-Kinase wurde mit aufsteigenden Mengen an P_{II} -Protein inkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität der NAG-Kinase bestimmt.

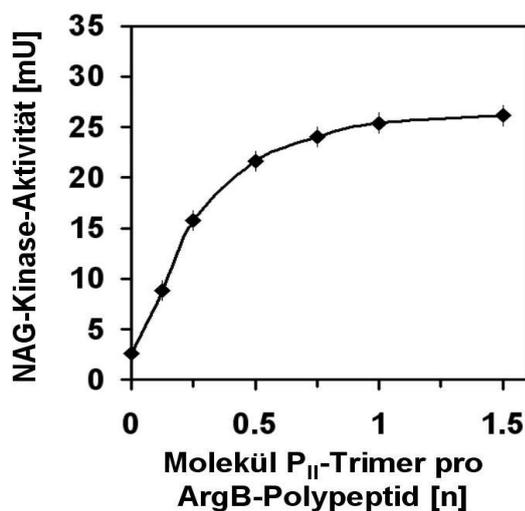
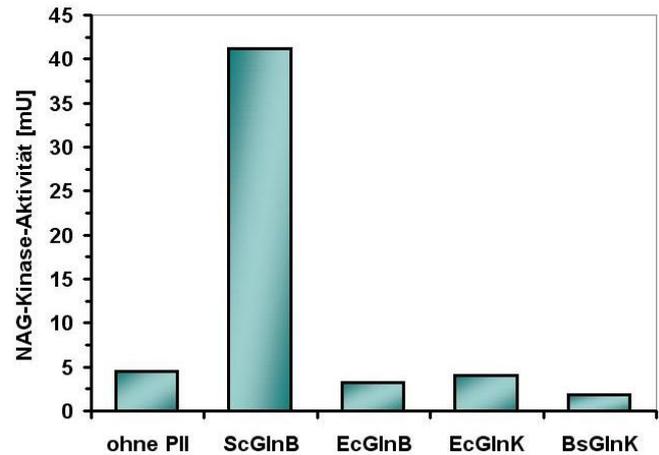


Abbildung C.78.: Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch P_{II} -Protein. Die NAG-Kinase-Aktivität (50 nM ArgB-Polypeptid) wurde in der Gegenwart von ansteigenden Mengen an unphosphoryliertem Wildtyp- P_{II} gemessen (B.20.2.).

Die Aktivität der NAG-Kinase reagierte deutlich auf die Zugabe von P_{II} . Ansteigende Mengen von P_{II} (Abb. C.78.) stimulierten die NAG-Kinase deutlich. Äquimolare Mengen an trimeren P_{II} -Protein pro ArgB-Polypeptid reichten bereits aus, um die NAG-Kinase maximal zu aktivieren. Die Aktivität der NAG-Kinase in Gegenwart von absättigenden Mengen P_{II} war ungefähr zehnmal höher als die der P_{II} -freien NAG-Kinase.

Um zu untersuchen, ob diese Interaktion spezifisch zwischen den beiden cyanobakteriellen Proteinen ist, wurden andere P_{II} -Homologe in den Enzymaktivitätstest eingesetzt. Dazu wurden sowohl die P_{II} -Analoge GlnB und GlnK aus *E. coli* als auch das P_{II} -Homolog GlnK aus *B. subtilis* verwendet.

Abbildung C.79.: NAG-Kinase-Aktivitätstests in der Gegenwart von P_{II}-Homologen. Die NAG-Kinase-Aktivität (50 nM ArgB-Polypeptid) wurde in Abwesenheit oder in Gegenwart von 50 nM P_{II}-Homolog bestimmt. Als P_{II}-Homologe dienten *E. coli* GlnB (EcGlnB) und GlnK (EcGlnK) und *B. subtilis* GlnK (BsGlnK).



Wie aus der oben abgebildeten Graphik ersichtlich wird, war nur das cyanobakterielle GlnB aus *S. elongatus* in der Lage, die NAG-Kinase aus *Synechococcus*, wie bereits beobachtet, um das zehnfache zu aktivieren. Die P_{II}-Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis* konnten die NAG-Kinase-Aktivität nicht stimulieren. Dies deutet auf eine sehr spezifische Protein-Protein-Interaktion hin, die auf der Struktur des cyanobakteriellen P_{II} beruht.

Von verschiedenen P_{II}-Rezeptor-Interaktionen in anderen bakteriellen Systemen, wie z. B. die Interaktion zwischen P_{II} und NtrB oder P_{II} und NifL, ist bekannt, dass die Bindung von ATP und α -Ketoglutarat an P_{II} eine entscheidende Rolle in der Regulierung dieser Interaktionen spielt (Little *et al.*, 2000; Ninfa und Atkinson, 2000). Wenn der NAG-Kinase-Aktivitätstest in Gegenwart von 10 mM ATP durchgeführt wird, ist P_{II} bereits nahezu komplett mit ATP abgesättigt. Daher kann ein möglicher Effekt von ATP auf die Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch P_{II} in dieser Art von Test nicht untersucht werden. Allerdings kann der Effekt von α -Ketoglutarat auf die NAG-Kinase-Aktivität in der Gegenwart oder Abwesenheit von P_{II} bestimmt werden (Abb. C.80.).

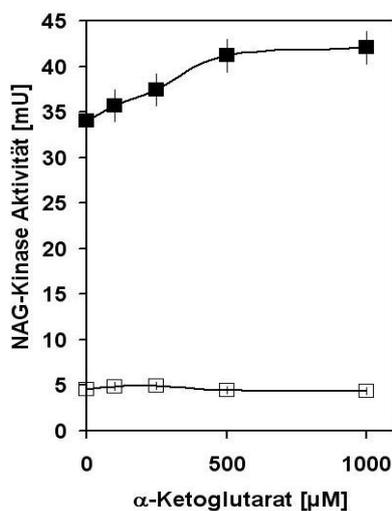


Abbildung C.80.: Effekt von α -Ketoglutarat auf die NAG-Kinase-Aktivität. NAG-Kinase (50 nM ArgB-Polypeptid) wurde in der Gegenwart von 50 nM P_{II}-Trimer (geschlossene Symbole) oder in dessen Abwesenheit (offene Symbole) mit ansteigenden Mengen an α -Ketoglutarat (0, 100, 250, 500 und 1000 μ M) gemessen. Die Datenpunkte stellen drei unabhängige Experimente dar. Die Standardabweichung ist durch senkrechte Striche dargestellt.

Mit ansteigenden Konzentrationen von α -Ketoglutarat kann in der Gegenwart von P_{II} zwar nur eine leichte, jedoch reproduzierbare Erhöhung der NAG-Kinase-Aktivität festgestellt werden. Fehlt P_{II} jedoch im Aktivitätstest, kann keine Veränderung der NAG-Kinase-Aktivität beobachtet werden. Bei ca. 0,5 mM α -Ketoglutarat ist die Stimulierung der NAG-Kinase-Aktivität gesättigt und resultiert in einer ungefähren Steigerung der Aktivität um 20%.

4. Eigenschaften des NAG-Kinase- P_{II} -Komplexes

4.1. Bestimmung des Molekulargewichtes

4.1.1. Eichung der Gelfiltrationssäule

Die Gelfiltrationen (B.11.2.) der verwendeten Standards ergaben folgende Elutionsvolumina:

Standard	Molekulargewicht [Da]	Elutionsvolumen	V_e/V_0
Blue Dextran	2.000.000	7,1 ml	1,0
β -Amylase	200.000	10,7 ml	1,5
Alkoholdehydrogenase	150.000	11,7 ml	1,6
BSA	66.000	12,9 ml	1,8
Carbonanhydrase	29.000	15,2 ml	2,1
Cytochrom C	12.400	16,5 ml	2,3

Tabelle C.2.: Elutionsvolumina der Standardansätze. In dieser Tabelle sind die Standards mit ihren jeweiligen Molekulargewichten, Elutionsvolumina (V_e), dem Ausschlussvolumen (V_0) und deren Verhältnisse (V_e/V_0) aufgelistet.

Das Ausschlussvolumen der *Superdex 200 HR 10/30* ergab sich aus dem Elutionsvolumen des *Blue Dextran*, da es auf Grund seines hohen Molekulargewichtes nicht in die Säulenmatrix eindringen kann. Aus den Werten der Elutionsvolumina konnte eine Eichkurve erstellt werden. Das Verhältnis V_e/V_0 wurde in Abhängigkeit zum jeweiligen Molekulargewicht in einem Graphen aufgetragen (siehe Abb. C.83.).

4.1.2. Bestimmung der Molekulargewichte von freier und P_{II} -gebundener N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase

Zur Bestimmung der Molekulargewichte von freier und P_{II} -gebundener NAG-Kinase wurde NAG-Kinase in Gegenwart und Abwesenheit von P_{II} -Protein in 100 μ l Gelfiltrationspuffer G (B.3.6.) inkubiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde die Mixtur auf eine *Superdex HR 10/30* Säule gegeben, die zuvor mit Puffer G äquilibriert wurde. Das BioLogic HR Chromatographie-System (Bio-Rad Laboratories) wurde genutzt, um eine konstante Flussrate von 0,5 ml min^{-1} zu gewährleisten und 0,25 ml große Fraktionen zu sammeln. Die NAG Kinase-Aktivität von 50 μ l Aliquots wurde, wie bereits beschrieben, in Gegenwart oder Abwesenheit von 1,85 μ g P_{II} -Protein pro Reaktionsansatz bestimmt. 5 μ l Aliquots wurden auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und auf die Anwesenheit von P_{II} durch Immunoblotanalysen mittels eines P_{II} -spezifischen Antiserums (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994) untersucht.

Wie in Abbildung C.81. zu sehen ist, eluiert freie NAG-Kinase-Aktivität als ein einzelner Peak von einer Superdex 200 Säule. Die NAG-Kinase eluierte nach 10,5 ml, also in einem V_e/V_0 -Verhältnis von 1,58. Für die NAG-Kinase lässt sich daher im Vergleich mit den Massenstandards ein Molekulargewicht von ca. 180 Da ablesen (vgl. Abb. C.83.). Mit einer monomeren Größe von 32 kDa des ArgB-Polypeptids, entspricht dies einer multimeren Struktur, die aus vier bis sechs Untereinheiten zusammen gesetzt sein könnte. Wie erwartet, konnte die Aktivität der eluierten NAG-Kinase durch die Zugabe von P_{II} -Protein in den Reaktionsansatz stark stimuliert werden.

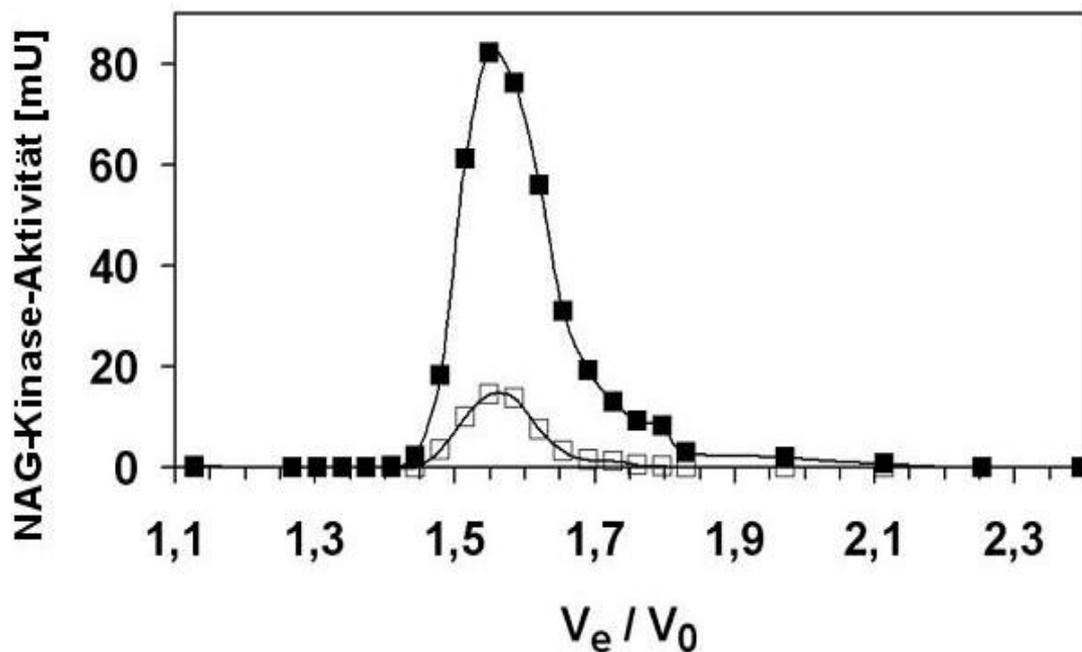


Abbildung C.81.: Gelfiltrationsanalyse der nativen NAG-Kinase. 80 μ g NAG-Kinase wurden in 100 μ l Gelfiltrationspuffer gelöst und einer Gelfiltration unterzogen (B.11.2.). Die NAG-Kinase-Aktivität wurde in 50 μ l Aliquots in der Abwesenheit (offene Symbole) und in der Gegenwart von 1,85 μ g P_{II} pro Ansatz (geschlossene Symbole) gemessen. Das Elutionsvolumen (V_e) ist im Verhältnis zum Ausschlussvolumen (V_0) angegeben.

Um den NAG-Kinase- P_{II} -Komplex zu analysieren, wurde die NAG-Kinase vor dem Gelfiltrationslauf mit absättigenden Mengen an P_{II} inkubiert und die Mischung auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

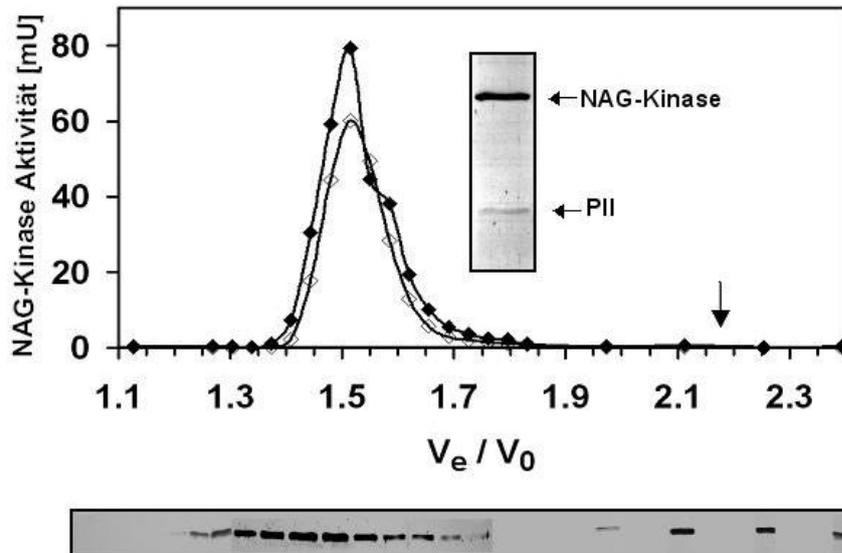


Abbildung C.82.: Gelfiltrationsanalyse des NAG-Kinase-P_{II}-Komplexes. Durchführung wie in Abb. C.81., allerdings unter Zugabe von 60 µg P_{II}-Protein vor der Gelfiltration. Der Pfeil markiert die Elutionsstelle von freiem P_{II}-Protein, die in einem gesonderten Gelfiltrationslauf ohne NAG-Kinase durch Immunoblotanalysen bestimmt wurde. Des Weiteren ist dieser Abbildung die P_{II}-spezifische Immunoblotanalyse des Komplex-Laufes zu entnehmen. Die Laufspuren sind unter den dazugehörigen untersuchten Fraktionen angeordnet. Das eingeschobene Bild zeigt die Proteine des NAG-Kinase-P_{II}-Proteinkomplexes, das durch ein *Coomassie* gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel zustande gekommen ist.

Das Elutionsvolumen des NAG-Kinase-Peaks hatte sich nun in Richtung des Ausschlussvolumens verschoben, was auf eine Vergrößerung des Molekulargewichtes hindeutet. Der Komplex aus NAG-Kinase und P_{II} hatte ein Elutionsvolumen von 9,8 ml. Dies entspricht einem V_e/V_0 -Verhältnis von 1,38. Vergleicht man dies mit der Eichgeraden, kann ein Molekulargewicht von 215 Da für den Proteinkomplex bestimmt werden.

Außerdem wurde festgestellt, dass die NAG-Kinase-Aktivität der Fraktionen dieser Gelfiltration bereits 75% im Vergleich zu dem zusätzlich hinzugegebenen P_{II} in den Aktivitätstest betrug (Abb. C.82.). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass sich bereits eine beträchtliche Menge an P_{II} in diesen Fraktionen befunden haben musste. Die Co-Elution von P_{II} in dem NAG-Kinase-Peak wurde durch Immunoblotanalysen bestätigt (Abb. C.82.).

Zusätzlich zu diesem Elutionspeak wurde ein zweiter Peak von P_{II} beobachtet. Dieser befand sich an der Stelle, wo man nicht komplexiertes P_{II}-Protein erwarten würde. Für das freie P_{II}-Protein ließ sich in einem gesonderten Lauf ohne NAG-Kinase ein Elutionsvolumen von 15,5 ml bestimmen. Dies entspricht einem V_e/V_0 -Verhältnis von 2,18. Im Vergleich mit der Eichgeraden lässt sich für das P_{II}-Protein ein Molekulargewicht von ca. 37 Da angeben, was einem freiem P_{II}-Trimer entspricht (vgl. Abb. C.83.).

Entsprechend dieser Quantifizierung betrug die Differenz von freier und komplexierter NAG-Kinase einer molekularen Masse von ungefähr 35 kDa, oder einem P_{II}-Trimer. Um die relativen Mengen an P_{II}-Protein und NAG-Kinase in dem Komplex bestimmen zu können, wurde die Peak-Fraktion der NAG-Kinase per SDS-PAGE analysiert.

Durch densitometrisches Ausmessen der mit *Coomassie* gefärbten Proteine (Siehe Einschub in Abb. C.82.) und Vergleich dieser mit definierten Mengen an NAG-Kinase und P_{II}, konnte ein Massenverhältnis von NAG-Kinase zu P_{II}-Protein von 4,1 : 1 ermittelt werden. Bezieht man die Molekulargewichte der Proteine mit in diese Überlegung ein, korrespondiert dies mit einem molaren Verhältnis von 4,7 ArgB-Polypeptid pro P_{II}-Trimer. In Anbetracht einer partiellen Komplexdissoziation während der Gelfiltration und zusammen mit den Ergebnissen der Mobilitätsstudien in der Gelfiltration, die zeigten, dass die Größe des gebildeten Komplexes um ein P_{II}-Trimer anwächst, deutet alles darauf hin, dass ein ArgB-Multimer mit einem P_{II}-Trimer Wechsel wirkt.

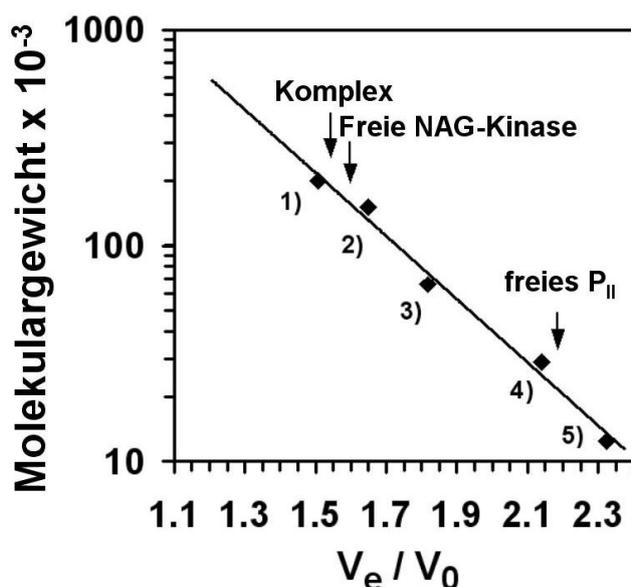


Abbildung C.83.: Eichgerade der *Superdex 200 HR 10/30*. Die Molekulargewichte der verschiedenen Standards sind halblogarithmisch gegen das Verhältnis aus Elutionsvolumen (V_e) und Ausschlussvolumen (V_0) aufgetragen. (1) β -Amylase, 200 kDa; (2) Alkoholdehydrogenase, 150 kDa; (3) BSA, 66 kDa; (4) Carbonanhydrase, 29 kDa und (5) Cytochrom C, 12,4 kDa. Die entsprechenden Elutionszeitpunkte von freier und P_{II}-gebundener NAG-Kinase, sowie von freiem P_{II}-Protein sind durch Pfeile gekennzeichnet (vgl. Tabelle C.2.).

4.2. Effekt der P_{II}-Liganden α -Ketoglutarat und ATP auf die Komplexbildung

Um die Rolle der P_{II}-Liganden ATP und α -Ketoglutarat auf die Bildung des NAG-Kinase-P_{II}-Komplexes zu erörtern, wurden Gelfiltrationsexperimente (Durchführung s.o.) in der Gegenwart dieser Metaboliten durchgeführt. Die Komplexbildung fand in der Gegenwart von entweder 1 mM ATP oder 1 mM ATP und 0,1 mM α -Ketoglutarat, oder in der Abwesenheit dieser Effektormoleküle statt. Die chromatographischen Schritte wurden in Gegenwart derselben Konzentrationen dieser Effektormoleküle durchgeführt.

Um die Menge an P_{II}-Protein, die einen stabilen Komplex mit der NAG-Kinase eingeht, bestimmen zu können, wurde der Elutionspeak der NAG-Kinase isoliert. Anschließend wurde die NAG-Kinase-Aktivität mit oder ohne überschüssigem P_{II} im Reaktionsansatz bestimmt. Für den Fall, dass die NAG-Kinase bereits mit P_{II} gesättigt ist, ist keine weitere Erhöhung der NAG-Kinase-Aktivität zu erwarten. Wenn die NAG-Kinase partiell P_{II} verloren hat, lässt sich dieser Anstieg allerdings beobachten. Des Weiteren wurde die Menge an P_{II}-Protein in diesen Fraktionen bestimmt.

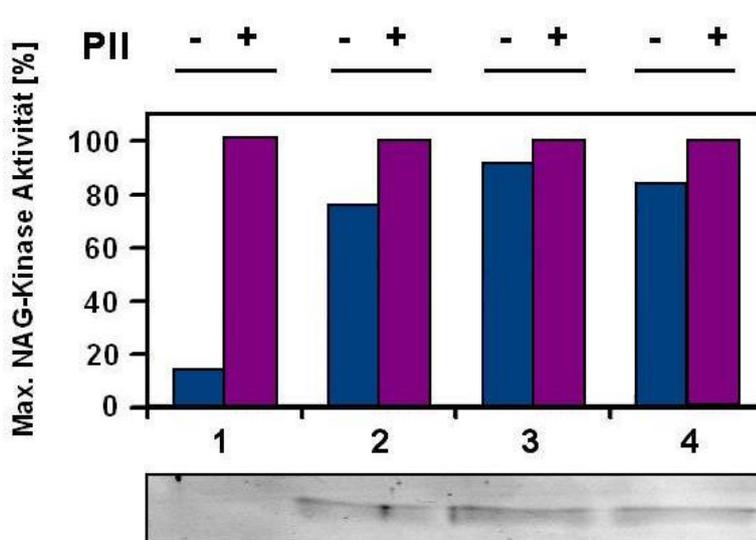


Abbildung C.84.: Effekt von ATP und α -Ketoglutarat auf die NAG-Kinase-P_{II}-Komplexbildung. In dieser Reihe von Experimenten wurde NAG-Kinase (20 μ g) in 20 μ l Gelfiltrationspuffer G (B.3.6.) in der Abwesenheit von P_{II} (1), oder in der Gegenwart von 22 μ g P_{II} (2 bis 4) für 10 Minuten vorinkubiert, um den Proteinkomplex ausbilden zu können. Es galten folgende Bedingungen: ohne Effektormoleküle (2); in Gegenwart von 1 mM ATP (3) oder in Gegenwart von 1 mM ATP und 0,1 mM α -KG (4). Die Proben wurden nach erfolgter Inkubation auf die Gelfiltrationssäule *Bio-Silect SEC 250-5* (B.11.2.) geladen, die bereits mit Gelfiltrationspuffer G und den angegebenen Konzentrationen an Effektormolekülen äquiliert worden war. Nach jedem Lauf wurden die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen isoliert und die NAG-Kinase-Aktivität von 20 μ l Aliquots in der Gegenwart (violette Balken) oder Abwesenheit von P_{II}-Protein (1,85 μ g) (blaue Balken) bestimmt. Die Werte wurden auf die maximal beobachtete NAG-Kinase-Aktivität in Gegenwart von P_{II}-Protein normalisiert. Die Anwesenheit des P_{II}-Proteins in den vier Peak-Fraktionen wurde durch SDS-PAGE analysiert. Dazu wurde je ein Aliquot von je 10 μ l der vier Peak-Fraktionen auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und die Proteine durch Silberfärbung (B.7.1.) sichtbar gemacht. Die Region, in der P_{II} im Gel verläuft, ist abgebildet. Die Banden korrespondieren mit den vier Fraktionen, in denen die oben abgebildete Aktivität gemessen worden ist.

oder in Gegenwart von 1 mM ATP und 0,1 mM α -KG (4). Die Proben wurden nach erfolgter Inkubation auf die Gelfiltrationssäule *Bio-Silect SEC 250-5* (B.11.2.) geladen, die bereits mit Gelfiltrationspuffer G und den angegebenen Konzentrationen an Effektormolekülen äquiliert worden war. Nach jedem Lauf wurden die NAG-Kinase-haltigen Fraktionen isoliert und die NAG-Kinase-Aktivität von 20 μ l Aliquots in der Gegenwart (violette Balken) oder Abwesenheit von P_{II}-Protein (1,85 μ g) (blaue Balken) bestimmt. Die Werte wurden auf die maximal beobachtete NAG-Kinase-Aktivität in Gegenwart von P_{II}-Protein normalisiert. Die Anwesenheit des P_{II}-Proteins in den vier Peak-Fraktionen wurde durch SDS-PAGE analysiert. Dazu wurde je ein Aliquot von je 10 μ l der vier Peak-Fraktionen auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und die Proteine durch Silberfärbung (B.7.1.) sichtbar gemacht. Die Region, in der P_{II} im Gel verläuft, ist abgebildet. Die Banden korrespondieren mit den vier Fraktionen, in denen die oben abgebildete Aktivität gemessen worden ist.

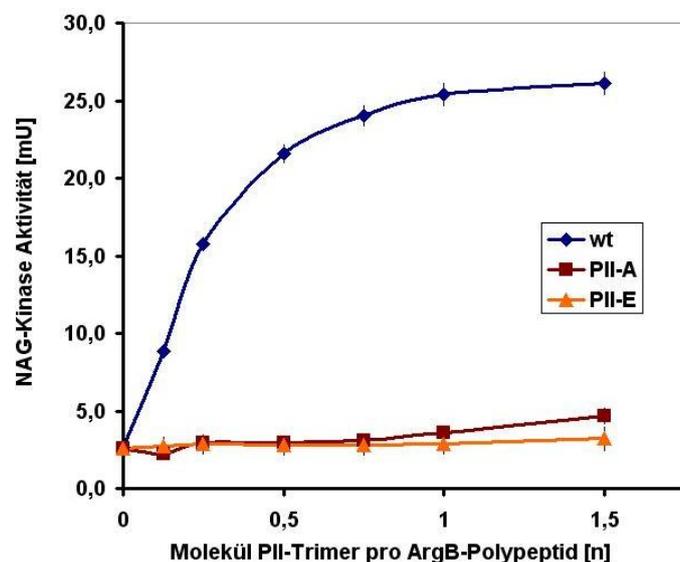
Wie sich aus den NAG-Kinase-Aktivitätsmessungen und den gelelektrophoretischen Analysen schließen lässt, ist in der Abwesenheit der Effektormoleküle die Menge an P_{II} im Komplex mit der NAG-Kinase nahezu genauso hoch, wie in der Gegenwart von ATP und α -Ketoglutarat (Abb. C.84.). Ein wenig mehr P_{II} wurde in dem Komplex beobachtet, der in Gegenwart von ATP allein gebildet wurde. Ob diese geringen Differenzen eine physiologische Signifikanz besitzen, muss in weit aus sensitiveren Analysen untersucht werden.

4.3. Die Rolle des P_{II} Serin 49 in der NAG-Kinase-P_{II}-Interaktion

Mutierte P_{II}-Proteine, in denen der Serinrest 49 durch Alanin oder Glutamat ersetzt worden ist, wurden bereits in früheren Studien genutzt, um die physiologische Rolle der unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien von P_{II} zu untersuchen.

Während P_{II}S49A scheinbar den unphosphorylierten Zustand des P_{II}-Proteins nachahmt, wurde P_{II}S49E als ein Analog des phosphorylierten P_{II}-Proteins genutzt (Lee *et al.*, 2000). Um nun die Rolle der P_{II}-Phosphorylierung auf die Interaktion mit der NAG-Kinase zu untersuchen, wurden aufgereinigte P_{II}S49A- oder P_{II}S49E-Proteine (Forchhammer und Hedler, 1997) in den NAG-Kinase-Enzymtest eingesetzt (Durchführung siehe oben).

Abbildung C.85.: Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch mutierte P_{II}-Proteine. Die NAG-Kinase-Aktivität (50 nM ArgB-Polypeptid) wurde in der Gegenwart von ansteigenden Mengen an mutierten P_{II}-Proteinen, P_{II}S49A und P_{II}S49E, gemessen. Als Vergleich ist des Weiteren die Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch nicht phosphoryliertes Wildtyp-P_{II} (vgl. Abb. C.78.) mit angegeben.



Wie in Abb. C.85. zu sehen ist, sind beide Proteine in ihrem Verhalten, die NAG-Kinase-Aktivität zu stimulieren, eingeschränkt. P_{II}S49E, das scheinbare Analog des phosphorylierten P_{II}-Proteins ist unfähig, die NAG-Kinase zu aktivieren. Im Gegensatz zu der Vermutung, dass P_{II}S49A die unphosphorylierte Form des P_{II} nachahmt und daher die NAG-Kinase genauso effizient aktivieren sollte, wie das unphosphorylierte Wildtyp P_{II}-Protein, war auch die Aktivierung durch dieses mutierte Protein stark eingeschränkt. Dies lässt vermuten, dass der Serinrest 49 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der NAG-Kinase durch P_{II} spielt.

Die niedrige Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch die mutierten P_{II}-Proteine könnte aus einer unvollständigen Komplexbildung resultieren, oder aus einer nicht aktiven Komplexbildung, in der das mutierte P_{II}-Protein zwar an die NAG-Kinase gebunden ist, diese jedoch nicht in ihrer katalytischen Aktivität stimulieren kann.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden Wettbewerbsversuche mit Wildtyp P_{II} durchgeführt. Falls eine nicht aktive Komplexbildung durch die Proteine P_{II}S49A oder P_{II}S49E vorliegt, sollten die mutierten Proteine eine Aktivierung der NAG-Kinase durch Wildtyp-P_{II} beeinträchtigen. Um dies herauszufinden, wurde die NAG-Kinase mit unterschiedlichen Mengen an P_{II}S49A oder P_{II}S49E (12,5, 25, oder 50 nM) inkubiert. Anschließend wurde 12,5 nM nicht phosphoryliertes Wildtyp P_{II} hinzugegeben und die NAG-Kinase-Aktivität bestimmt.

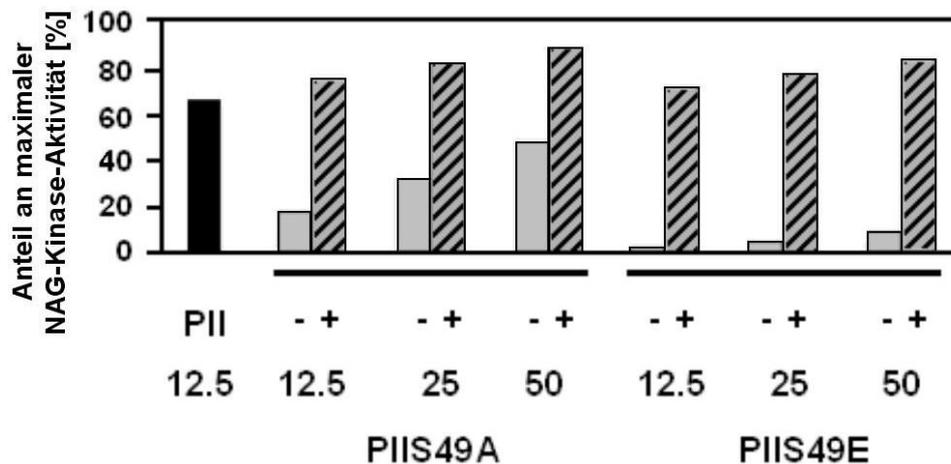


Abbildung C.86.: Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch die mutierten P_{II}-Proteine P_{II}S49A bzw. P_{II}S49E. NAG-Kinase (50 nM ArgB-Polypeptid) wurde mit 12,5 nM trimerem P_{II}, was ca. 65% der maximalen Aktivierung (linker, schwarzer Balken) entsprach, oder mit 12,5, 25 oder 50 nM P_{II}S49A oder P_{II}S49E in der Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 12,5 nM Wildtyp P_{II}-Protein inkubiert, was 10 Minuten nach Zugabe der mutierten P_{II}-Proteine zum Reaktionsmix vor Beginn des Aktivitätstestes gegeben worden war.

Die mutierten P_{II}-Proteine konnten auch bei einem vierfachen molaren Überschuss gegenüber dem Wildtyp-P_{II}-Proteins die Aktivierung der NAG-Kinase nicht reduzieren (Abb. C.86.). Dies deutet darauf hin, dass sie keinen stabilen Komplex mit der NAG-Kinase bilden können, was die Aktivierung durch nicht phosphoryliertes Wildtyp P_{II}-Protein verhindern würde.

Um diese Vermutung unmittelbar zu untermauern, wurde die P_{II}-NAG-Kinase-Komplexbildung mit den mutierten P_{II}-Proteinen in Gelfiltrationsexperimenten untersucht (Durchführung wie bereits beschrieben). Wie in Abbildung C.87. zu sehen ist, eluierte kein NAG-Kinase-P_{II}-Komplex von der Gelfiltrationssäule. Die NAG-Kinase eluierte an der Position, die dem nicht komplexiertem Protein entspricht (Abb. C.81.).

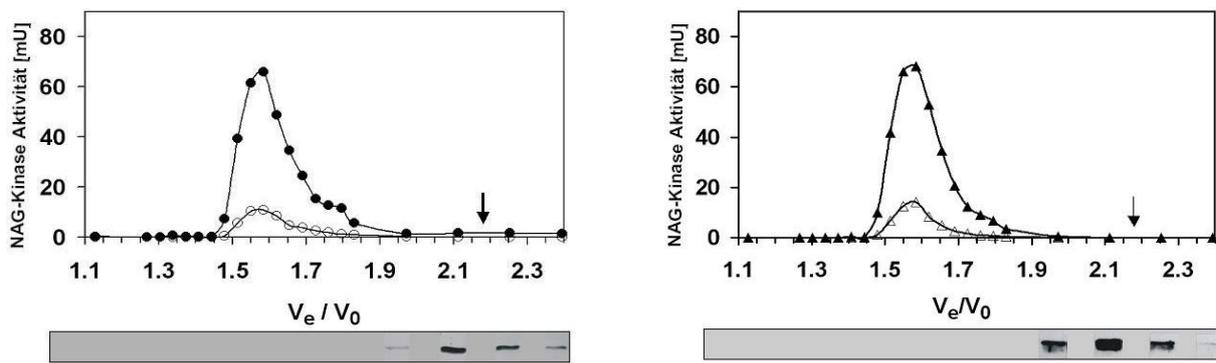


Abbildung C.87.: Gelfiltrationsanalysen der Komplexbildung zwischen NAG-Kinase und den mutierten P_{II}-Proteinen P_{II}S49A (links) und P_{II}S49E (rechts). Die Experimente wurden wie bereits beschrieben (siehe Abb. C.81.) durchgeführt, allerdings mit der Ausnahme, dass Wildtyp-P_{II} durch P_{II}S49A oder P_{II}S49E ersetzt wurde. Die NAG-Kinase-Aktivität in den Elutionsfraktionen wurde in der Abwesenheit (offene Symbole) oder in der Gegenwart von zusätzlich in den Aktivitätstest hinzugefügtem Wildtyp P_{II} (geschlossene Symbole) (vgl. Abb. C.83.) gemessen. Die Immunoblotanalysen unter den Aktivitätsprofilen zeigen die Gegenwart der mutierten P_{II}-Proteine in den Fraktionen. Die Laufspuren entsprechen den darüber liegenden Fraktionen.

Des Weiteren konnte durch Immunoblotanalysen kein mutiertes P_{II}-Protein in den NAG-Kinase-haltigen Fraktionen gefunden werden (Abb. C.87.). Da schwache Protein-komplexe während einer Gelfiltration dissoziieren können, bestätigt dieses Ergebnis, dass kein stabiler Komplex gebildet werden kann, wenn der Serinrest 49 von P_{II} mutiert ist.

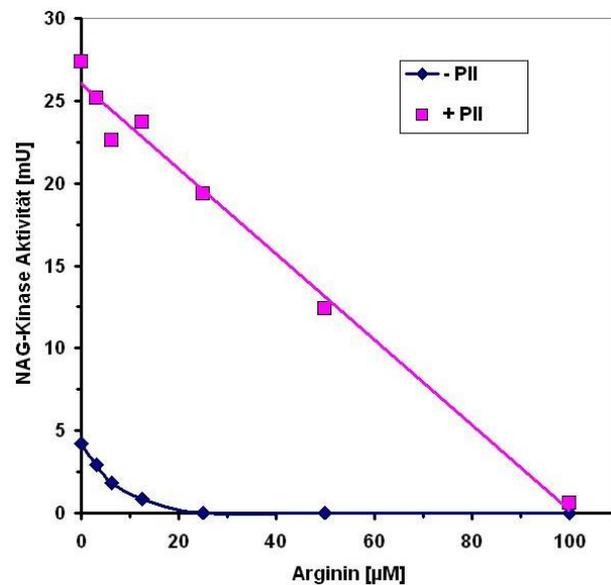
Dies deutet um so mehr darauf hin, dass der Serinrest 49 eine entscheidende Rolle in der Komplexbildung spielt. Zusammengenommen lassen diese Daten vermuten, dass die Phosphorylierung von P_{II} am Serinrest 49 die Komplexbildung mit der NAG-Kinase unter physiologischen Bedingungen beeinflusst. Weiterführende physiologische Experimente wurden von meinem Arbeitskollegen M. Maheswaran durchgeführt (vgl. Diskussion und Heinrich *et al.*, 2004).

4.4. Feedback-Hemmung der NAG-Kinase-Aktivität durch Arginin und deren partielle Aufhebung durch Komplexbildung mit P_{II}

Die Argininbiosynthese in Cyanobakterien verläuft über einen zyklischen Weg, in dem die NAG-Kinase den entscheidenden Schritt dieses Weges katalysiert, der durch die Aminosäure Arginin Feedback-reguliert wird (Abadjieva *et al.*, 2001; Caldovic und Tuchman, 2003; Cunin *et al.*, 1986).

Da nun bekannt ist, dass die NAG-Kinase-Aktivität durch P_{II} beeinflusst wird, wurde der inhibitorische Effekt von Arginin auf freie und P_{II}-komplexierte NAG-Kinase untersucht. Dazu wurden aufsteigende Mengen an Arginin (0 bis 100 µM) in den NAG-Kinase-Aktivitätstest gegeben und anschließend die NAG-Kinase-Aktivität gemessen.

Abbildung C.88.: Feedback-Hemmung der NAG-Kinase durch Arginin im freien und P_{II}-komplexierten Zustand. Die NAG-Kinase-Aktivität (50 nM ArgB-Polypeptid) wurde in Abwesenheit oder in der Gegenwart von ansteigenden Mengen an Arginin (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 µM) und in Gegenwart oder Abwesenheit von Wildtyp-P_{II} (50 nM) gemessen.



Wie in Abbildung C.88. zu sehen ist, wird freie NAG-Kinase deutlich durch Arginin gehemmt. Die Komplexbildung von NAG-Kinase und P_{II} beeinflusst wesentlich die Feedback-Hemmung durch Arginin. Die Ermittlung der weiteren katalytischen Eigenschaften der Arginin-Hemmung, wie z. B. Hill-Koeffizient und I_{0,5}-Wert wurden in weiterführenden Studien von M. Maheswaran durchgeführt (Maheswaran *et al.*, 2004).

D. Diskussion

1. *Bacillus subtilis*

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, neue regulatorische Funktionen des *B. subtilis* GlnK-Proteins aufzuzeigen und außerdem funktionelle Übereinstimmungen zwischen dem P_{II}-Signaltransduktionsprotein von *B. subtilis* und anderen gut untersuchten P_{II}-Proteinen von Proteo- und Cyanobakterien zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurde ein Rezeptorprotein des *B. subtilis* GlnK identifiziert, der Transkriptionsfaktor TnrA, und die Voraussetzungen für diese Interaktion beschrieben.

1.1. ATP/ α -Ketoglutarat-Bindung durch *B. subtilis* GlnK

B. subtilis GlnK ist in der Lage, ATP zu binden, allerdings nicht auf die gleiche Weise, wie es bereits für gut untersuchte P_{II}-Proteine beschrieben worden ist (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Little *et al.*, 2000). In Gegenwart von Mg²⁺ bindet *B. subtilis* GlnK nur sehr schwach ATP. α -Ketoglutarat verstärkt in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen die ATP-Bindung deutlich. In der Gegenwart von Mn²⁺-Ionen kann *B. subtilis* GlnK ATP wesentlich stärker in Abwesenheit von α -Ketoglutarat binden, als es für Mg²⁺-Ionen gezeigt wurde. Diese Bindung ist jedoch geringfügig schwächer, als in Gegenwart von Mg²⁺ und α -Ketoglutarat. Darüber hinaus kann α -Ketoglutarat die ATP-Bindung in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen nicht weiter verstärken. Die Tatsache, dass α -Ketoglutarat die Bindung von ATP in Gegenwart von Mg²⁺ deutlich verstärkt, deutet darauf hin, dass unter normalen physiologischen Bedingungen diese Effektormoleküle synergistisch an GlnK binden, wie es bereits für P_{II}-Proteine von Proteobakterien, Cyanobakterien und Pflanzen gezeigt wurde (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Moorhead und Smith, 2003).

Ein auffälliger Unterschied in der ATP/ α -Ketoglutarat-Bindung von *B. subtilis* GlnK im Vergleich zu anderen P_{II}-Proteinen ist allerdings, dass *B. subtilis* GlnK ATP und α -Ketoglutarat nicht mit einer vergleichbar hohen Affinität binden kann, wie das für andere P_{II}-Proteine der Fall ist. Während P_{II}-Proteine aus Proteo- und Cyanobakterien ATP bereits bei mikromolaren Konzentrationen binden können, sind diese niedrigen Konzentrationen nicht ausreichend, um eine Bindung an *B. subtilis* GlnK nachzuweisen. Erst bei einer ATP-Konzentration von 0,1 mM konnte in den *UV-Crosslink*-Experimenten eine Bindung nachgewiesen werden.

Die reduzierte Bindeaffinität von ATP an GlnK könnte auf einen Austausch in der Aminosäuresequenz des *B. subtilis* GlnK beruhen (Arginin 106, entspricht Arginin 101 von *E. coli* GlnK, wurde durch Asparagin 106 ausgetauscht) (vgl. Abb. C.1.). Diese Aminosäure ist in P_{II}-Proteinen hoch konserviert und für die Adenylatbindung von P_{II}-Proteinen von großer Bedeutung (Xu *et al.*, 2001).

Da es in der Gegenwart von Mn^{2+} zu keiner Stimulierung der ATP-Bindung durch α -Ketoglutarat kommt, bedeutet das, dass keine Synergie zwischen ATP und α -Ketoglutarat in Gegenwart von Mn^{2+} besteht. Bei vegetativem Wachstum spielen Mn^{2+} -Ionen höchstwahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle in *B. subtilis*, da das Verhältnis von Mg^{2+} zu Mn^{2+} unter physiologischen Bedingungen in einem Verhältnis von 167:1 vorliegen (Eisenstadt *et al.*, 1973). Allerdings ist Mn^{2+} für das Einsetzen des Sporulationsvorganges in *Bacillaceen* notwendig (Charney *et al.*, 1951). Herrscht ein Mangel an Mn^{2+} , tritt keine Sporulation auf (Eisenstadt, 1972). Während der Sporulation verringert sich das Verhältnis von Mg^{2+} zu Mn^{2+} , da zum Beginn der Sporulation die Zellen anfangen, Mn^{2+} zu akkumulieren. Da in Gegenwart von hohen Mn^{2+} -Konzentrationen GlnK eher cytosolisch vorliegt (30% bis 40%, vgl. C.1.2.) und α -Ketoglutarat unter diesen Bedingungen nicht mehr in der Lage ist, die ATP-Bindung an GlnK zu steigern (Abb. C.2.), scheint der Effekt der α -Ketoglutarat-stimulierten ATP-Bindung und die dadurch veränderte Funktionsweise von GlnK (siehe unten) während der Sporulation keine Rolle mehr zu spielen.

Unter physiologischen Bedingungen, bei denen die ATP-Konzentration im millimolaren Bereich liegt, sind die ATP-Bindestellen der P_{II} -Proteine von Proteobakterien und Cyanobakterien bereits gesättigt (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Jiang *et al.*, 1998a) und die Bindung von α -Ketoglutarat an *E. coli* P_{II} weist eine negative Kooperativität auf. Das erste α -Ketoglutarat-Molekül bindet bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen beliebig an eine der drei α -Ketoglutarat-Bindestellen von P_{II} .

Durch diese Bindung werden die zwei anderen α -Ketoglutarat-Bindestellen für α -Ketoglutarat schwerer zugänglich. P_{II} kann daher erst mit sehr hohen physiologischen α -Ketoglutarat-Konzentrationen gesättigt werden (Kamberov *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1998a). Durch diese Art der Bindung von α -Ketoglutarat wird die Fähigkeit von P_{II} reguliert, an die Histidin-Kinase NtrB und die Domäne der ATase zu binden, die zur Adenylierung der Glutamin-Synthetase befähigt.

Die vollständig mit α -Ketoglutarat gesättigte Form des P_{II} ist nicht mehr in der Lage, an diese Proteine zu binden (Ninfa und Atkinson, 2000). Unter Stickstoff-armen Bedingungen wird das P_{II} -Protein durch die UTase (GlnD) uridyliert (vgl. Abb. A.8.). P_{II} -UMP bindet in dieser Form an die Domäne der ATase, die wiederum die Glutamin-Synthetase deadenyliert. Auf diese Weise wird in *E. coli* das Kohlenstoffsignal (α -Ketoglutarat) und das Stickstoffsignal (Glutamin) durch P_{II} wahrgenommen und an andere Systeme weitergeleitet.

Während die Modifikation des *E. coli* P_{II}-Proteins in erster Linie von dem zellulären Glutaminspiegel abhängt und vom α -Ketoglutarat-Spiegel unabhängig ist, scheint die Modifikation des P_{II}-Proteins in Cyanobakterien in erster Linie von der zellulären α -Ketoglutarat-Konzentration abzuhängen. Da in Cyanobakterien das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt, stellt die Konzentration an α -Ketoglutarat das entscheidende Signal zur Messung des Kohlenstoff/Stickstoff-Gleichgewichtes dar (Forchhammer, 1999; Muro-Pastor *et al.*, 2001) und ist daher ein wichtiges Stickstoffsignal in Cyanobakterien (vgl. D.1.3.).

Berücksichtigt man die Ergebnisse aus den in dieser Arbeit gezeigten Lokalisationsstudien, wonach sich die Lokalisation von *B. subtilis* GlnK bei verschiedenen ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich deutlich voneinander unterscheidet, kann man davon ausgehen, dass die reduzierte ATP-Affinität von *B. subtilis* GlnK physiologisch relevant ist. Änderungen im zellulären ATP-Spiegel führen demnach zu einer verschiedenen zellulären Lokalisation von GlnK. Im Vergleich zu anderen P_{II}-Proteinen (s.o.) erlaubt die Bindung von ATP an *B. subtilis* GlnK, physiologische Veränderungen im Energiehaushalt der Zelle wahrzunehmen. Darüber hinaus könnte die Abhängigkeit der ATP-Bindung von α -Ketoglutarat unter Bedingungen von extremen Kohlenstoffmangel ein Energiemangel-Signal synergistisch verstärken.

Im Gegensatz zu den P_{II}-Proteinen von Cyanobakterien und Pflanzen (Moorhead und Smith, 2003; Maheswaran *et al.*, 2004) konnte keine Bindung von ADP an *B. subtilis* GlnK beobachtet werden. Dies könnte auf Unterschiede in der Adenylatbindestelle von *B. subtilis* GlnK zurückzuführen sein (vgl. A.7.), wodurch eine Bindung von ADP an *B. subtilis* GlnK unmöglich wird.

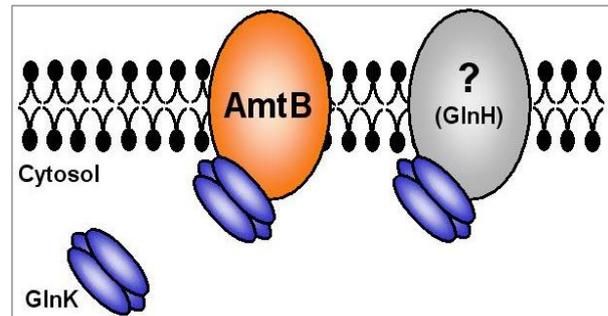
1.2. Zelluläre Lokalisation von *B. subtilis* GlnK

Unter stickstofflimitierenden Bedingungen wird die Expression des *amtB*/*glnK*-Operons in *B. subtilis* durch den Transkriptionsfaktor TnrA aktiviert. Das P_{II}-Homolog GlnK kann je nach Energie- und Kohlenstoff-Konzentrationen in der Zelle cytosolisch oder Membran-gebunden vorliegen. Da die Aminosäuresequenz von GlnK keine Ähnlichkeit mit Membranproteinen aufweist, muss GlnK indirekt durch einen Rezeptor an die Membran gebunden sein.

Für *B. subtilis* GlnK wurde der Ammoniumtransporter AmtB (ursprünglich mit NrgA bezeichnet) als potentiell Bindeglied zwischen GlnK und der Membran identifiziert (Detsch und Stülke, 2003), da in *amtB*-defizienten Mutanten GlnK bei Anzucht von *B. subtilis*-Zellen auf Glutamat ausschließlich cytosolisch vorliegt. Allerdings scheint dieser Transporter nicht der alleinige Rezeptor an der Membran zu sein, durch den GlnK an die Membran assoziieren kann.

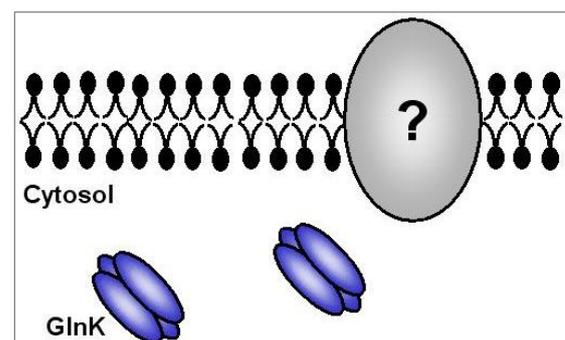
In der *amtB*-defizienten Mutante konnte in Nitrat-angezogenen Zellen im Gegensatz zu Glutamat-angezogenen Zellen eine Membranlokalisierung von GlnK beobachtet werden. (C.2.3.). Membranproteine, an die GlnK binden könnte, könnten der potentielle Glutamin-ABC-Transporter (*glnH*) (C.1.3.4.) oder der potentielle Nitrat-ABC-Transporter (*ygaL*) (eigene Diplomarbeit) sein, von denen ebenfalls tryptische Fragmente in den MALDI-TOF-Analysen gefunden worden sind.

Abbildung D.1.: Lokalisation von GlnK im *B. subtilis*. GlnK kann, abhängig von dem Energie- und Kohlenstoff-Status der Zelle cytosolisch und Membran-gebunden vorliegen. Neben dem Ammoniumtransporter AmtB müssen weitere Rezeptoren (durch „?“ gekennzeichnet) vorhanden sein. In Frage kommt z.B. ein potentieller Glutamin-ABC-Transporter (*glnH*).



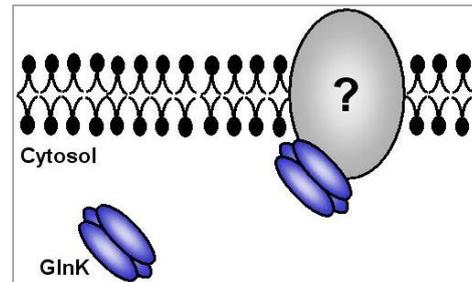
Der Status der Metabolitenbindung (ATP/ α -Ketoglutarat) des *B. subtilis* GlnK-Proteins scheint die Interaktionen mit den Membran-gebundenen Rezeptoren zu beeinflussen. Insbesondere durch die Bindung von ATP kommt es zu einer graduellen Ablösung von GlnK von der Membran, die in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen durch α -Ketoglutarat noch verstärkt wird. Ein hoher Kohlenstoff- und Energie-Spiegel in der Zelle herrscht z.B. in der Gegenwart des gut verwertbaren Zuckers Glukose, da durch die Glukoseverwertung mittels der Glykolyse und des TCA-Zyklus ausreichend Energie und Kohlenstoff zur Verfügung gestellt werden kann.

Abbildung D.2.: GlnK-Lokalisation in Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen. Bei physiologischen Konzentrationen um 4 mM ATP in der Zelle liegt GlnK ausschließlich cytosolisch vor. „?“ steht für alle potentiellen Membranproteine, an die GlnK binden könnte.



Verändert sich das äußere Milieu, in dem *B. subtilis* vorkommt, indem eine Limitierung der leicht verwertbaren Kohlenstoffquellen eintritt, sinkt der Kohlenstoff- und vor allem der Energiestatus der Zelle. Bei Konzentrationen von 0,5 bis 1 mM ATP ist GlnK nicht mehr vollständig in der Lage, ATP zu binden. Hat *B. subtilis* GlnK kein ATP mehr gebunden, scheint eine Veränderung des GlnK-Proteins vorstatten zu gehen, was zu einer partiellen Bindung von GlnK an die Membran führt (40% bis 50% des gesamten GlnK-Proteins).

Abbildung D.3.: GlnK-Lokalisation in Gegenwart geringer ATP-Konzentrationen. Bei physiologischen Konzentrationen um 0,5 mM bis 1 mM ATP in der Zelle liegt GlnK partiell Membran-gebunden vor (40% bis 50% des gesamten GlnK). „?“ steht für alle potentiellen Membranproteine, an die GlnK binden könnte.



Diese Art von Veränderungen könnte auf einer Konformationsänderung beruhen, wie sie z.B. bei dem *E. coli* P_{II}-Protein oder dem cyanobakteriellen P_{II} auftritt. In Folge dieser Konformationsänderung, die durch die Bindung von ATP und α -Ketoglutarat zu Stande kommt, kann es zu einer Hemmung der Interaktion mit den Rezeptoren ATase bzw. NtrB (*E. coli*) (Ninfa und Atkinson, 2000) oder zu einer Hemmung der Interaktion mit der N-Acetylglutamat-Kinase (Cyanobakterien) (Maheswaran *et al.*, 2004) kommen.

Ein Beispiel für eine Regulierung durch Protein-Protein-Interaktion zwischen einem P_{II}-Protein und einem Membranrezeptor ist die AmtB-GlnK-Komplexbildung in *E. coli*. Bei Ammoniummangel liegt GlnK in seiner uridylierten Form vor und ist nicht in der Lage, an den Ammoniumtransporter AmtB zu binden. In diesem Fall ist der Transporter AmtB aktiv. Steigt der Ammoniumspiegel, wird GlnK deuridyliert. GlnK kann nun an den Ammoniumtransporter binden und dessen Aktivität hemmen (Javelle *et al.*, 2004). Im Fall des *B. subtilis* GlnK-Proteins scheint die Bindung von ATP/ α -Ketoglutarat eine Interaktion mit Membranproteinen einzuschränken. Dadurch könnten z.B. Transporter in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

1.3. Modifizierung von *B. subtilis* GlnK

Studien mit nicht-denaturierenden PAGE-Analysen zeigten zusätzliche Banden von *B. subtilis* GlnK mit höherer elektrophoretischer Mobilität, d.h. im Gel schneller wandernde Banden. Um den Charakter dieser abweichenden Banden bestimmen zu können, wurde GlnK nativ aus *B. subtilis*-Zellen, die mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle angezogen worden sind, aufgereinigt.

Da die Ausbeute an *B. subtilis* GlnK bei einer aufwendigen Aufreinigungsprozedur sehr gering ausfiel, wurde ein rekombinantes GlnK mit einem C-terminalen *Strep-Tag* (Skerra und Schmidt, 2000) konstruiert, damit das überproduzierte Protein mit einer höheren Ausbeute über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte.

Die ESI-Analysen zeigten, dass die zusätzlichen schneller wandernden Banden von *B. subtilis* GlnK in den nicht-denaturierenden PAGE-Analysen nicht aus einer reversiblen kovalenten Modifikation resultieren können. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus den bereits durchgeführten chemischen und physiologischen Untersuchungen überein und verstärken frühere Überlegungen, dass das *nrgB*-Produkt (GlnK) nicht kovalent modifiziert wird (Wray *et al.*, 1994; Detsch und Stülke, 2003).

Die durch ESI-Analysen identifizierte partielle Prozessierung des N-terminalen Methionins des *B. subtilis* GlnK-ST, isoliert aus *B. subtilis*, kann ein Grund für die beobachtete heterogene elektrophoretische Mobilität sein. Außerdem könnten die zusätzlichen Banden aus einer weiteren C-terminalen Prozessierung stammen. Auf Grund des C-terminalen *Strep-Tags* können diese verkürzten Formen weder durch Affinitätschromatographie aufgereinigt, noch in den anschließend durchgeführten ESI-Analysen identifiziert werden.

Das Fehlen einer kovalenten Modifikation an der flexiblen Oberflächen-exponierten Spitze des *T-loops* könnte mit der Abwesenheit einer potentiellen Modifikationsstelle (Serin 49 oder Tyrosin 51) übereinstimmen. Als eine Konsequenz dieses Fehlens einer kovalenten Modifikation ist keine zusätzliche Signalaufnahme durch das *B. subtilis* GlnK durch Modifikation bzw. Demodifikation möglich, wie es z.B. durch *E. coli* P_{II}-Proteine der Fall ist.

Dem *E. coli* P_{II}-Protein wird die Veränderung des Stickstoffangebotes durch das Stickstoffsignal Glutamin signalisiert, da bei einer Limitierung das P_{II}-Protein durch die UTase uridyliert wird. Das uridylierte P_{II}-Protein kann mit der Domäne der ATase Wechsel wirken, die dafür verantwortlich ist, die adenylierte, und dadurch inaktive Glutamin-Synthetase zu deadenylieren, wodurch die Glutamin-Synthetase wieder aktiv wird. In Bezug auf das Fehlen einer kovalenten Modifikationsstelle ähnelt das *B. subtilis* GlnK den P_{II}-Proteinen von *Prochlorococcus sp.* (Palinska *et al.*, 2002) und denen von Pflanzen (Moorhead und Smith, 2003; Smith *et al.*, 2004), die höchstwahrscheinlich ebenfalls nicht kovalent modifiziert werden. Durch den Verlust der kovalenten Modifikation besteht keine Möglichkeit mehr, den Stickstoffstatus der Zelle wahrzunehmen und weiter zu vermitteln. Die Signalwahrnehmung durch *B. subtilis* GlnK scheint in erster Linie auf die zelluläre ATP- und α -Ketoglutarat-Konzentration zu reagieren. Im Gegensatz zu cyanobakteriellem GlnB, das den Stickstoffgehalt der Zelle durch die α -Ketoglutarat-Konzentration ablesen kann, stellt α -Ketoglutarat in *B. subtilis* vermutlich kein Stickstoffsignal dar.

α -Ketoglutarat ist in Firmibakterien ein Zwischenprodukt des vollständigen TCA-Zyklus. Sein Konzentrationsspiegel hängt daher von dessen Flussrate ab. Da Cyanobakterien, wie bereits erwähnt (s.o.), das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt, liegt bei ihnen ein unterbrochener TCA-Zyklus vor, bei dem α -Ketoglutarat das Endprodukt darstellt. Die Konzentration von α -Ketoglutarat hängt deshalb von der weiterführenden Aktivität der GS/GOGAT-Reaktionen ab, die wiederum dem zellulären Glutaminspiegel unterworfen sind und somit vom Stickstoffangebot der Zelle abhängen (Forchhammer, 1999; Muro-Pastor *et al.*, 2001).

1.4. Interaktion zwischen TnrA und GlnK in *B. subtilis*

Wie in dieser Arbeit aufgedeckt wurde, bildet das Membran-gebundene *B. subtilis* GlnK einen stabilen Komplex mit TnrA, dem wichtigsten Transkriptionsaktivator von Genen, die an der Stickstoffassimilation unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen beteiligt sind.

Es ist noch nicht geklärt, ob das GlnK-Protein mit TnrA direkt interagiert, oder ob diese Interaktion durch einen größeren Komplex mit weiteren Proteinen zustande kommt. Wenn der ATP- und α -Ketoglutarat-Spiegel in der Zelle sinkt, verstärkt sich die Membranassoziation des GlnK-Proteins. In direktem Zusammenhang mit der Bindung von GlnK an die Membran steigt auch die Menge des an die Membran assoziierten TnrA-Proteins.

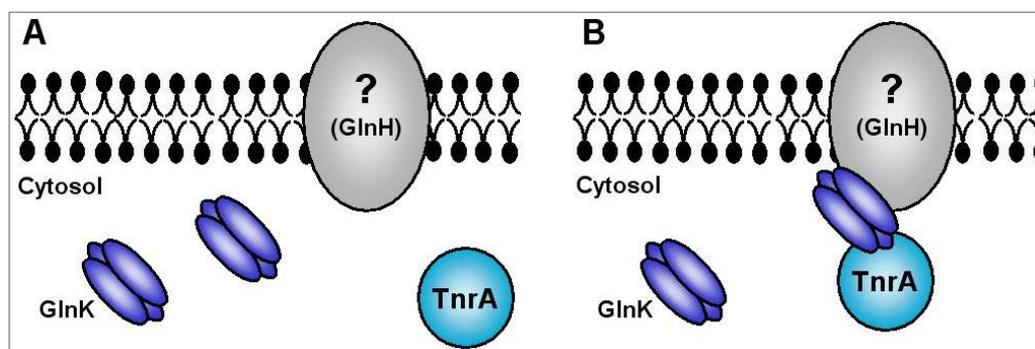


Abbildung D.4.: TnrA-Lokalisation in Abhängigkeit des Energie- und Kohlenstoff-Haushaltes (vereinfachtes Modell). Unter Energie- und Kohlenstoff-reichen Bedingungen liegt GlnK und TnrA vollständig cytosolisch vor (A). Sinkt der Energie- und Kohlenstoff-Spiegel in der Zelle, bindet GlnK partiell an einen potentiellen Membranrezeptor („?“) und zieht TnrA vollständig mit sich an die Membran (B).

Vorläufige experimentelle Daten zeigten, dass kein löslicher TnrA-GlnK-Komplex existiert. Aus diesem Grund konnte auch kein Komplex aus der cytosolischen Fraktion immunopräzipitiert werden. Dies konnte durch Immunoblotanalysen und MALDI-TOF-Experimenten gezeigt werden. Wenn der ATP- und α -Ketoglutarat-Spiegel in der Zelle sinkt, assoziiert GlnK an den Membranrezeptor und bindet TnrA. Durch diesen Vorgang lokalisiert GlnK TnrA an die Membran und verhindert dadurch möglicherweise dessen regulatorische Wirkung.

1.5. Interaktion zwischen Glutamin-Synthetase und TnrA in *B. subtilis*

Im löslichen Zustand ist TnrA in der Lage, einen Komplex mit der Glutamin-Synthetase zu bilden. In anderen Arbeiten konnte nur eine Wechselwirkung zwischen der *feedback*-gehemmten Form der Glutamin-Synthetase und TnrA gezeigt werden (Wray *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse resultieren aus *Pulldown-Assays* und Gelshift-Experimenten, in denen die Wechselwirkung der beiden Proteine getestet wurde. In Gegenwart des *Feedback*-Inhibitors Glutamin kann TnrA mit der Glutamin-Synthetase von einer Ni-NTA-Säule co-eluieren. Außerdem ist TnrA in diesem Zustand nicht mehr in der Lage, DNA zu binden. In dieser Arbeit konnte mit empfindlichen Methoden nachgewiesen werden, dass auch in Abwesenheit von Effektormolekülen eine Wechselwirkung zwischen TnrA und Glutamin-Synthetase stattfindet.

Wie in den BIAcore-Experimenten gezeigt werden konnte, ist die Bindung von TnrA an die Glutamin-Synthetase prinzipiell nicht Effektor-abhängig. Zwar wird die Affinität der Proteine TnrA und Glutamin-Synthetase zueinander durch die *Feedback*-Inhibitoren erhöht, jedoch ist TnrA in jedem Fall in der Lage, an die Glutamin-Synthetase zu binden. Durch diese Bindung verliert nicht nur TnrA seine DNA-bindende Fähigkeit (Wray *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2002). Auch die Aktivität der Glutamin-Synthetase wird stark durch TnrA reduziert, unabhängig davon, ob die Bindung in Gegenwart oder Abwesenheit von Effektormolekülen stattfindet (Diplomarbeit, K. Woyda).

In Gegenwart von ATP konnte durch die BIAcore Oberflächenplasmonresonanz-Analysen eine Hemmung der Interaktion der Proteine festgestellt werden. Physiologische Konzentrationen von 1 mM bis 5 mM ATP reichten bereits aus, um die Komplexbildung stark einzuschränken.

Diese Beobachtung deutet auf eine neue Art der Regulation der Glutamin-Synthetase durch den Transkriptionsfaktor TnrA hin und wäre der erste bekannte Regulationseffekt eines Transkriptionsregulators auf ein Enzym auf posttranslationaler Ebene. Zieht man die bereits gemachten Überlegungen mit in Betracht, lässt sich folgendes Modell aufstellen: Bei hohen ATP/ α -Ketoglutarat-Konzentrationen liegt der Transkriptionsfaktor TnrA löslich in der Zelle vor. Liegt ausreichend Glutamin in der Zelle vor, unterstützt Glutamin die Komplexbildung zwischen TnrA und der Glutamin-Synthetase und übermittelt so dem Transkriptionsfaktor TnrA eine hohe zelluläre Stickstoffkonzentration. In diesem Fall werden sowohl die Glutamin-Synthetase (durch *Feedback*-Inhibition) als auch der Transkriptionsfaktor TnrA (durch die Komplexbildung) gehemmt. Die Glutamin-Synthetase als auch TnrA werden aktiv, wenn der zelluläre Glutaminspiegel sinkt. Durch eine abgeschwächte Interaktion von TnrA an die Glutamin-Synthetase überträgt diese dem Transkriptionsfaktor den niedrigen Stickstoffgehalt der Zelle.

Fällt nun der zelluläre α -Ketoglutarat- und Energiespiegel unter eine kritische Grenze, wird TnrA durch das GlnK-Protein an die Membran gezogen und dem regulatorischen System der Glutamin-Synthetase entzogen. TnrA ist Membran-gebunden nicht weiter aktiv. Da unter Energie-armen Bedingungen jede freie Energie notwendig ist, den Organismus am Leben zu halten, ist es sinnvoll, die Neusynthese von Proteinen, die an der Stickstoffassimilation beteiligt sind, zu unterdrücken. Steigt nun der Energiegehalt in der Zelle, dissoziiert der Proteinkomplex zwischen GlnK und TnrA. Auf diese Weise wird TnrA wieder aktiv, um die Stickstoffassimilation zu regulieren.

TnrA ist unter Stickstoff-reichen Bedingungen inaktiv. Außerdem wird seine Neusynthese durch den Transkriptionsfaktor GlnR reprimiert (Fisher und Wray, 2002). Steigt nun der Energiegehalt der Zelle weiter, z. B. durch die Verwertung einer leicht zugänglichen Kohlenstoffquelle, dissoziiert der TnrA-Glutamin-Synthetase-Komplex sehr schnell. TnrA wird unter diesen Bedingungen (hoher Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt) nicht mehr benötigt und könnte abgebaut werden.

In den BIAcore Oberflächenplasmonresonanz-Analysen zeigte ATP bei einer Konzentration von 10 mM eine totale Hemmung der Komplexbildung zwischen TnrA und der Glutamin-Synthetase. Die gleiche Konzentration an ATP wird auch in den bio-synthetischen Aktivitätstests eingesetzt. Dort konnte jedoch eine Hemmung Glutamin-Synthetase-Aktivität durch TnrA beobachtet werden. Dieser Widerspruch lässt sich vielleicht mit der unterschiedlichen Art der Methoden erklären. In den BIAcore-Versuchen wird eine Interaktion zweier Proteine nur über eine Dauer von einigen Sekunden gemessen. Während der Aktivitätstests befinden sich jedoch die Proteine über 20 Minuten im Gleichgewicht. Eine langsame Wechselwirkung, die zu keiner messbaren Bindung in den BIAcore-Experimenten führte, konnte unter den Enzymtestbedingungen ausreichen, um die Aktivität des Enzyms zu senken.

1.6. Physiologische Relevanz der GlnK-TnrA-Komplexbildung

Mit dem Verlust der Fähigkeit, kovalent modifiziert zu werden, ist *B. subtilis* GlnK nicht mehr in der Lage den Stickstoffgehalt der Zelle messen zu können, wie es bereits für Cyanobakterien gezeigt wurde. Diese Funktion wurde von der Glutamin-Synthetase durch ihre Interaktion mit TnrA übernommen. Diese Proteine bilden in Gegenwart von hohen Glutaminkonzentrationen einen Komplex, wodurch TnrA seine DNA-bindende Fähigkeit verliert (Wray *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2002). Des Weiteren ist GlnK prinzipiell fähig, den Kohlenstoff- und Energiestatus der Zelle dem Transkriptionsregulator TnrA zu übermitteln. Somit besitzt das *B. subtilis* GlnK-Protein eine neue Funktion im Vergleich zu anderen P_{II}-Proteinen. Die Signalweiterleitung des Kohlenstoff- und Energiesignals ist in *B. subtilis* von großer Bedeutung, da Kohlenstoff den limitierenden Faktor in der Lebensweise dieses Bodenbakteriums darstellt.

Tritt nun der Fall einer absoluten Stickstofflimitierung auf, d.h., *B. subtilis* steht keine verwertbare Stickstoffquelle mehr zur Verfügung, löst sich der membrangebundene TnrA-GlnK-Komplex und TnrA wird für eine noch unbekannte Protease das Angriffsziel und in kürzester Zeit abgebaut. Die Ursachen für das Ablösen von TnrA aus dem mit GlnK-gebildeten Komplex sind bislang ungeklärt und müssen noch genauer untersucht werden. Ein Grund für diesen proteolytischen Abbau könnte sein, dass unter den strikten Bedingungen des Stickstoffmangels TnrA nicht mehr benötigt wird, da durch ein Fehlen von Stickstoff, keine Stickstoffassimilation mehr durchgeführt werden kann. Die Synthese von Proteinen, die an der Stickstoffassimilation beteiligt sind, würde unter diesen Bedingungen nur zu einem Verbrauch an Energie und dringend benötigtem Stickstoff führen.

2. *Synechococcus elongatus*

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Signaltransduktionsprotein GlnB mit dem Enzym N-Acetylglutamat-Kinase durch Gelfiltrationsanalysen und NAG-Kinase Aktivitätstests untersucht. Des Weiteren wurden die Rolle des Serinrestes 49 und der Modifikationsgrad des P_{II}-Proteins in Bezug auf die Komplexbildung analysiert.

2.1. Aufreinigung und Molekulargewichtsbestimmung von ArgB

Bei der Reinigung der NAG-Kinase kamen eine fraktionierende Ammoniumsulfatfällung, hydrophobe Interaktionschromatographie, Gelfiltration, und Ionenaustausch-Chromatographie als Trennprinzipien zum Einsatz. Die gereinigte *S. elongatus* NAG-Kinase eluierte in der Gelfiltration in einem aktiven Peak, der einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa entspricht. Da das ArgB-Monomer eine Größe von 32 kDa besitzt, deutet dies auf eine multimeren Struktur von vier bis sechs Untereinheiten hin.

Die Struktur der proteobakteriellen NAG-Kinase von *E. coli* wurde bereits durch kristallographische Analysen gelöst (Ramón-Maiques *et al.*, 2002) und zeigte eine homodimere Struktur. Eine mögliche tetramere Formation wurde für die NAG-Kinase von Erbsen (*Pisum sativum*) (MacKay und Shargool, 1981) beschrieben, obwohl bis heute keine Kristallstrukturen für NAG-Kinasen von photoautotrophen Eukaryoten vorliegen. Eine mögliche tetramere Formation der cyanobakteriellen NAG-Kinase wäre auf Grund der Ähnlichkeit mit dem pflanzlichen Enzym vorstellbar. Außerdem kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die NAG-Kinase eine pentamere Struktur besitzt. Jedoch scheint eine pentamere Struktur von einer strukturellen Sichtweise und der Ähnlichkeit mit anderen bereits beschriebenen bakteriellen *feedback*-sensitiven NAG-Kinasen aus *Thermotoga maritima* und *Pseudomonas aeruginosa* eher unwahrscheinlich zu sein, da diese eine hexamere Struktur besitzen (Fernández-Murga *et al.*, 2004). In neuesten Studien (Maheswaran *et al.*, 2004) konnte durch Ultrazentrifugationsanalysen gezeigt werden, dass die cyanobakterielle NAG-Kinase ebenfalls als Hexamer vorliegt.

2.2. Komplexbildung zwischen P_{II} und NAG-Kinase

Eine physische Bindung zwischen P_{II} und der NAG-Kinase konnte auf mehreren Wegen gezeigt werden. Zum einen konnte die NAG-Kinase mit P_{II}-ST von einer *Strep-Tactin*-Säule co-eluiert werden. Zum anderen konnte die Interaktion durch Gelfiltrationschromatographie gezeigt werden. Mit P_{II}-komplexierte NAG-Kinase eluierte im Gegensatz zu freier NAG-Kinase mit einem Molekulargewicht von 215 kDa. Dies entspricht einem Größenunterschied von ungefähr 35 kDa, passend zur Größe eines P_{II}-Trimers.

Das deutet auf eine Komplexierung eines NAG-Kinase-Hexamers mit einem P_{II}-Trimer hin, was mit Ergebnissen aus Ultrazentrifugationsstudien übereinstimmt (Maheswaran *et al.*, 2004).

Die Komplexbildung zwischen P_{II} und NAG-Kinase hatte in allen Fällen eine deutliche Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität zur Folge. Wurde cyanobakterielle NAG-Kinase mit P_{II}-Homologen aus anderen Organismen (*E. coli* GlnB und GlnK, *B. subtilis* GlnK) inkubiert, konnte keine Steigerung der Aktivität beobachtet werden (Abb. C.79.). Eine Ursache für die nicht auftretende Aktivierung der NAG-Kinase könnte ein Unterschied in der Aminosäuresequenz der P_{II}-Homologe liegen. Zum Beispiel könnte das Fehlen des Serinrestes 49 der Grund für die mangelnde Wechselwirkung sein (s.u.).

Wurden P_{II}-Proteine mit Mutationen in Position 49 (S49A bzw. S49E), der Stelle der Serin-Phosphorylierung, in die Aktivitätstests eingesetzt, konnte keine Steigerung der Aktivität beobachtet werden. Des Weiteren konnte in Konkurrenzexperimenten gezeigt werden, dass diese P_{II}-Proteine auch nicht in der Lage sind, mit der NAG-Kinase einen Komplex einzugehen. Da ein einfacher Austausch des –OH-Restes für einen –H-Rest ausreicht, um die Komplexbildung deutlich zu reduzieren, deutet dies auf eine entscheidende Interaktion zwischen der NAG-Kinase und dem Serinrest 49 des P_{II}-Proteins hin.

In *in vivo*-Experimenten wurde die physiologische Rolle des Serinrestes 49 untersucht (Heinrich *et al.*, 2004). In diesen wurden sowohl der Wildtyp, die P_{II}-defiziente Mutante, als auch die Mutanten mit dem veränderten P_{II} (S49A bzw. S49E) unter verschiedenen Stickstoffbedingungen auf die NAG-Kinase-Aktivität als auch den P_{II}-Status getestet. Wie sich herausstellte, trat nur eine gesteigerte NAG-Kinase-Aktivität auf, wenn Wildtyp-Zellen auf Ammonium angezogen worden waren. Unter diesen Bedingungen liegt das P_{II}-Protein unphosphoryliert vor. Wurde der Wildtyp mit Nitrat angezogen (P_{II} phosphoryliert), war die NAG-Kinase-Aktivität fünfmal niedriger als unter Stickstoff-reichen Bedingungen (NH₄⁺). Bei den untersuchten Stämmen, die entweder kein P_{II} oder P_{II} mit mutiertem Serin 49 (S49A bzw. S49E) besaßen, konnte keine Steigerung der NAG-Kinase-Aktivität festgestellt werden. In einem weiteren Experiment, bei dem *S. elongatus* Stickstoffmangel ausgesetzt wurde, trat über einen Zeitraum von zwei Stunden ein Abfall der NAG-Kinase-Aktivität auf. Nachdem den Zellen wieder Ammonium als Stickstoffquelle angeboten wurde, steigerte sich die NAG-Kinase-Aktivität wieder auf das Anfangslevel zurück (Heinrich *et al.*, 2004). Diese physiologischen Beobachtungen weisen deutlich darauf hin, dass die Regulierung der NAG-Kinase-Aktivität über den Phosphorylierungsstatus des P_{II}-Proteins geschieht. Diese Regulierung eines Rezeptors in Abhängigkeit des Status der P_{II}-Modifikation ist typisch für P_{II}-Proteine (s.o., D.1.3.).

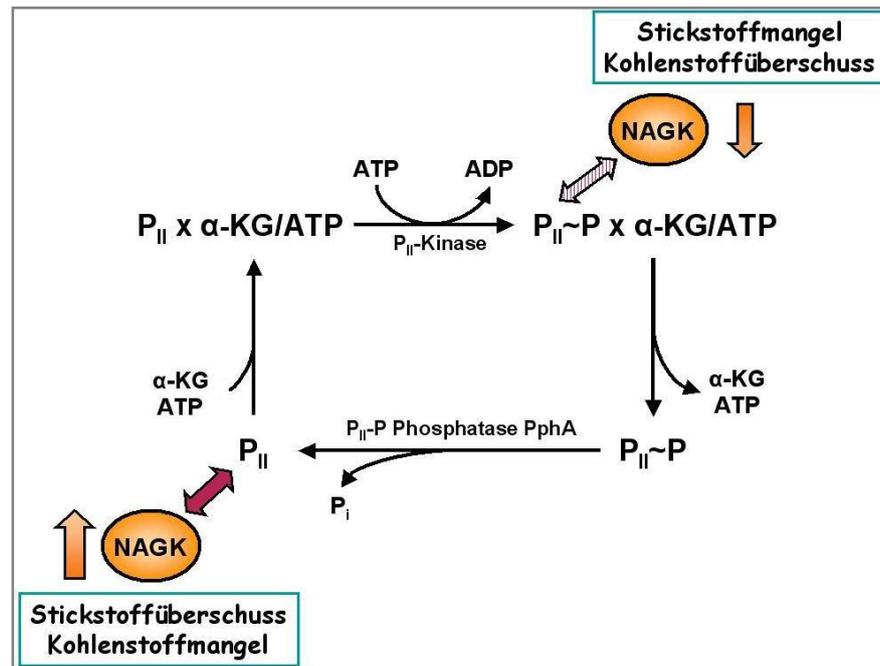


Abbildung D.5.: P_{II} -NAG-Kinase-Interaktion in Abhängigkeit von dem P_{II} -Modifikationsstatus. Bei Bedingungen von Stickstoffüberschuss und Kohlenstoffmangel liegt P_{II} unmodifiziert vor. Unter diesen Bedingungen können P_{II} und NAG-Kinase interagieren (roter Pfeil), wodurch die Aktivität der NAG-Kinase gesteigert wird (\uparrow). Verändern sich die Bedingungen (Stickstoffmangel, Kohlenstoffüberschuss), wird P_{II} phosphoryliert. Die Interaktion zwischen den beiden Proteinen wird aufgehoben (gestrichelter Pfeil). In Folge dessen verringert sich die Aktivität der NAG-Kinase (\downarrow).

Nach den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen scheinen die Effektormoleküle ATP und α -Ketoglutarat keine entscheidende Rolle in der Interaktion von NAG-Kinase und P_{II} zu spielen. Obwohl ein leichter Einfluss von α -Ketoglutarat auf die NAG-Kinase Aktivierung und eine geringe Verstärkung in der P_{II} -NAG-Kinase-Bindung in Gegenwart von ATP beobachtet werden konnte, findet eine Bindung von P_{II} an die NAG-Kinase auch in Abwesenheit jeglicher Effektormoleküle statt.

In neuesten Studien (Maheswaran *et al.*, 2004) konnte mit BIAcore Oberflächenplasmonresonanz-Analysen bestätigt werden, dass es in Gegenwart von Mg/ATP zu einer Komplexbildung kommt. α -Ketoglutarat ist zu jedoch in Gegenwart von Mg/ATP in der Lage, den Komplex zwischen NAG-Kinase und P_{II} aufzulösen, ebenso wie ADP. Der Effekt von α -Ketoglutarat auf den P_{II} -NAG-Kinase-Komplex in Gegenwart von Mg/ATP konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Allerdings wurden in den durchgeführten Gel-filtrationsanalysen nur 0,1 mM α -Ketoglutarat eingesetzt, anstatt 1 mM α -Ketoglutarat, die in den BIAcore-Experimenten nötig waren, um den Komplex aufzulösen (Maheswaran *et al.*, 2004).

0,1 mM α -Ketoglutarat führen bereits zu einer partiellen Auflösung des Komplexes. Diese unvollständige Dissoziation des Komplexes konnte jedoch nicht in den Gelfiltrations-experimenten mit den anschließenden Immunoblotanalysen des P_{II} -Proteins gezeigt werden. Diese Methode ist im Gegensatz zu den BIAcore Oberflächenplasmonresonanz-Analysen nicht sensitiv genug, um eine partielle Auflösung des Komplexes detektieren zu können.

Da die Argininherstellung nicht nur Stickstoff, sondern auch Energie benötigt, ist es sinnvoll, die Synthese von Arginin sowohl durch den Stickstoff- als auch den Energiestatus zu kontrollieren. Durch das P_{II} -Protein wird der intrazelluläre Status dieser beiden Parameter auf die NAG-Kinase übermittelt. Wie bereits erwähnt, geschieht die Aktivierung der NAG-Kinase-Aktivität durch unphosphoryliertes P_{II} -Protein. Diese Bedingung liegt bei Wachstum mit Ammonium vor, da dann der α -Ketoglutarat-Spiegel niedrig ist (vgl. Abb. D.5.). Steigt der intrazelluläre α -Ketoglutarat-Spiegel, da sich das Stickstoffangebot verschlechtert, bindet P_{II} α -Ketoglutarat und anschließend ATP. Durch diese Veränderung löst sich P_{II} aus dem mit der NAG-Kinase eingegangenen Komplex. Die P_{II} -Kinase ist nun in der Lage, P_{II} zu phosphorylieren.

2.3. Feedbackhemmung durch Arginin

Arginin-sensitive NAG-Kinasen sind in Organismen anzutreffen, die eine zyklische Argininsynthese betreiben. Das Besondere an dem zyklischen Weg ist die Wiederverwendung der Acetylgruppe des N-Acetylorithins zur Herstellung von N-Acetylglutamat durch eine Acetylgruppen-Übertragung. Da die Argininsynthese in Cyanobakterien durch den zyklischen Weg auftritt (Cunin *et al.*, 1986; Abadjieva *et al.*, 2001; Caldovic und Tuchman, 2003), wird von der NAG-Kinase von *S. elongatus* ebenfalls erwartet, einer Feedbackhemmung durch Arginin zu unterliegen.

Dies ist ein großer Unterschied zu der Arginin-unsensitiven dimeren NAG-Kinase von *E. coli* (Ramón-Maiques *et al.*, 2002), einem Organismus, der die Argininsynthese durch den linearen Weg betreibt (Caldovic und Tuchman, 2003). In dem linearen Syntheseweg, der in Enterobakterien und *Bacillaceen* vorkommt, wird Ornithin aus N-Acetyl-Ornithin durch das hydrolytisch wirkende Enzym Acetylorithinase erzeugt (Vogel und Bonner, 1956; Udaka, 1966; Prozesky, 1967). In diesen Organismen ist im Gegensatz zum zyklischen Argininsyntheseweg, die N-Acetylglutamat-Synthase, das erste Enzym des Syntheseweges, die Angriffsstelle für eine *Feedback*-Inhibition durch Arginin (Vyas und Maas, 1963).

Wie die ersten Aktivitätstests der NAG-Kinase in Gegenwart von Arginin zeigten, sind bereits 20 μ M Arginin ausreichend, um 50 nM ArgB-Polypeptid vollständig zu hemmen.

In Gegenwart von unphosphoryliertem P_{II} allerdings, einem Zustand, in dem die NAG-Kinase komplexiert vorliegt, wird die Fähigkeit von Arginin, die NAG-Kinase zu hemmen, deutlich herabgesetzt. Nach Zugabe von 50 μ M Arginin sind erst 50% der NAG-Kinase gehemmt. Dies zeigt, dass der NAG-Kinase- P_{II} -Komplex deutlich unsensitiver gegenüber der Arginin-*Feedback*-Hemmung ist als freie NAG-Kinase.

In verschiedenen Cyanobakterien wird der assimilierte Stickstoff in Form von Arginin durch die Synthese des Polypeptids Cyanophycin gespeichert (Allen, 1988). Obwohl *S. elongatus* eines der wenigen cyanobakteriellen Stämme ist, die nicht Cyanophycin (Lawry und Simon, 1982) synthetisieren, reagieren verwandte Stämme mit der Synthese dieses Polymers auf ein Ungleichgewicht des Kohlenstoff- und Stickstoffstatus. Bei Stickstoffüberschuss wird die Cyanophycinsynthese vorangetrieben, Bedingungen bei denen P_{II} in seiner unmodifizierten Art vorliegt und die NAG-Kinase aktiviert. In diesem Fall wäre eine *Feedback*-Hemmung des Komplexes eine gegenläufige Reaktion, die die Cyanophycinsynthese unterbinden würde. Daher ist es sinnvoll, wenn die Affinität des NAG-Kinase- P_{II} -Komplexes gegenüber Arginin herabgesetzt ist.

Herrschen Stickstoff-limitierende Bedingungen wird durch ein Herabsetzen der Argininsynthese der Glutamat-Spiegel in der Zelle geschützt. Neben Glutamat wird außerdem die Konzentration an Carbamoylphosphat aufrecht erhalten, das während der Argininsynthese für die Umwandlung von L-Ornithin in L-Citrullin benötigt wird. Beide Zellbausteine spielen in nicht nur in der Argininsynthese eine entscheidende Rolle, sondern in einer Vielzahl an Prozessen (z.B. Glutamat: Aminosäurensynthese, Carbamoylphosphat: Pyrimidinbiosynthese). Daher ist die Kontrolle der NAG-Kinase-Aktivität durch P_{II} eine wichtige regulatorische Maßnahme im zentralen Stoffwechsel der Cyanobakterien.

2.4. Physiologische Relevanz der P_{II} -NAG-K-Komplexbildung

Es ergibt sich folgendes Modell der *in vivo* Regulation der NAG-Kinase durch P_{II} :

Unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen liegt P_{II} in seinem phosphorylierten Zustand vor und ist nicht in der Lage, an die NAG-Kinase zu binden. Die NAG-Kinase betreibt unter diesen Bedingungen die Argininsynthese in der Menge, die benötigt wird, um die Proteinsynthese aufrechtzuerhalten. Des Weiteren ist die NAG-Kinase in diesem Zustand der *Feedback*-Hemmung durch Arginin ausgesetzt (Abb. D.6.).

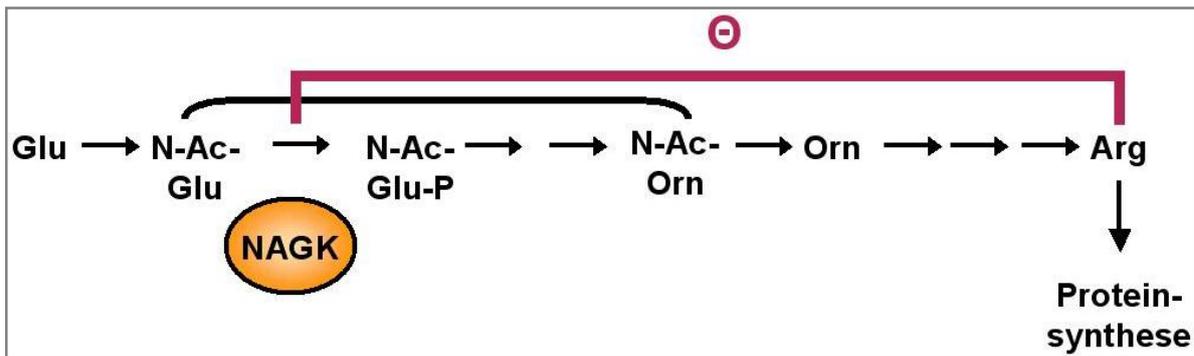


Abbildung D.6.: Zyklischer Argininsyntheseweg unter Bedingungen von Stickstoffmangel.

Das P_{II} -Protein liegt in Gegenwart von ausreichend intrazellulärem Stickstoff unphosphoryliert vor und kann nun mit der NAG-Kinase einen Komplex eingehen. Durch die Komplexbildung wird zum einen die Aktivität der NAG-Kinase geringer durch Arginin *feedback* gehemmt und zum anderen die katalytische Aktivität der NAG-Kinase um ein Vielfaches gesteigert. Überschüssiges Arginin, das nicht für die Proteinsynthese benötigt wird, könnte nun zur Herstellung des Stickstoffspeicherproduktes Cyanophycin verwendet werden (Abb. D.7.).

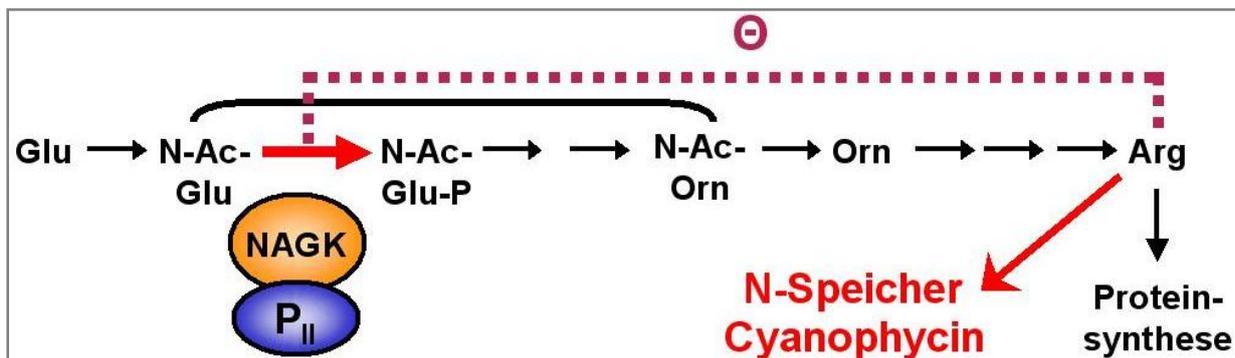


Abbildung D.7.: Zyklische Argininsynthese unter Bedingungen von Stickstoffüberschuss.

2.5. NAG-Kinase- P_{II} -Komplex in anderen Organismen

ArgB wird in niederen phototrophen Eukaryoten, wie z.B. *Porphyra* (Reith und Munholland, 1993) und in *Cyanidium caldarium* (Zugangsnummer AF022186, Z36235, Z70297) im Chloroplasten kodiert. Das ArgB-Homolog von *Arabidopsis thaliana* ist wahrscheinlich ebenfalls in Chloroplasten zu finden (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/tables/chloro.html>).

Der Vergleich der *argB*-Sequenzen von *Synechococcus elongatus* mit der von *Porphyra umbelicalis* zeigt eine hohe phylogenetische Verwandtschaft (Nishida *et al.*, 1999). Da das pflanzliche P_{II} -Homolog ebenfalls im Chloroplasten lokalisiert ist, und eine starke Ähnlichkeit zwischen pflanzlichen und cyanobakteriellen P_{II} -Proteinen (Moorhead und Smith, 2003) besteht,

ist es durchaus möglich, dass eine ähnliche Interaktion auch in Chloroplasten auftritt. Ein weiterer Hinweis darauf ist auch die gemeinsame Expression der NAG-Kinase 1 (OsNAGK1) und einem P_{II}-Homolog (OsGlnB) im Chloroplasten von Reispflanzen (Sugiyama *et al.*, 2004). Diese Interaktion der Proteine konnte durch Hefe-2-Hybrid-Studien bestätigt werden. Burillo *et al.* (2004) zeigten ebenfalls durch Hefe-2-Hybrid-Analysen eine Interaktion von NAG-Kinase und P_{II} in *Arabidopsis thaliana*.

E. Zusammenfassung

1. *Bacillus subtilis*

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das GlnK-Homolog aus *B. subtilis* zu charakterisieren und potentielle regulatorische Systeme aufzudecken.

- Das P_{II}-Homolog besitzt eine trimere Form und bindet ATP.
- Die Gegenwart von Mg²⁺ und α -Ketoglutarat wirkt sich auf die ATP-Bindung aus.
- Immunoblot-Analysen zeigen, dass GlnK partiell an die Membran gebunden ist.
- ATP führt zu einem Ablösen des GlnK von der Membran.
- GlnK interagiert mit dem eigenen Transkriptionsaktivator TnrA.
- MALDI-TOF Analysen und Co-Immunopräzipitationen bestätigen diese Interaktion.
- TnrA ist vollständig mit dem Membran-gebundenem GlnK assoziiert.
- Fehlt GlnK in der Membranfraktion, liegt TnrA löslich vor.
- Der ATP- und α -Ketoglutarat-Spiegel regulieren die Membranassoziation und die Bindung von TnrA durch das *B. subtilis* GlnK.

- TnrA interagiert mit der Glutamin-Synthetase in Gegenwart und Abwesenheit von GS-Feedback-Inhibitoren.
- Die Glutamin-Synthetase wird durch die Interaktion mit TnrA in ihrer Aktivität gehemmt.

2. *Synechococcus elongatus*

In dieser Arbeit konnte ein weiterer neuer Rezeptor für die P_{II}-Signaltransduktionsproteine beschrieben werden. Dieser Rezeptor des P_{II}-Proteins GlnB aus *S. elongatus* ist das Enzym N-Acetylglutamat-Kinase, das Schlüsselenzym der zyklischen Argininsynthese.

- ArgB wurde aufgereinigt und zur Produktion von Antikörpern verwendet.
- Durch Gelfiltrationsexperimente konnte eine multimere Struktur (Tetramer bzw. Hexamer) der NAG-Kinase bestimmt werden.
- Der NAG-Kinase-P_{II}-Komplex wird aus einem NAG-Kinase Multimer und einem P_{II}-Protein gebildet.
- P_{II} steigert die NAG-Kinase-Aktivität um ein Zehnfaches.
- Die Interaktion basiert auf dem *T-loop* des P_{II}-Proteins und kommt nur zustande, wenn P_{II} unphosphoryliert vorliegt.
- Die NAG-Kinase unterliegt der Feedback-Hemmung durch Arginin, wobei diese Hemmung durch die Komplexbildung stark gesenkt wird.

F. Literaturangabe

A

Abadjieva, A., Pauwels K., Hilven, P., und Crabeel, M. (2001) A new yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis: acetylglutamate synthase activity requires complex formation with acetylglutamate kinase. *J Biol Chem* **276**: 42869-42880.

Adams, D.G., und Duggan, P. (1999) Heterocyst and acinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* **144**: 3-33.

Aldehni, M.F., Sauer, J., Spielhaupter, C., Schmid, R., und Forchhammer, K. (2003) The signal transduction protein P_{II} is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J Bacteriol* **185**: 2582-2591.

Allen, M.M., und Smith, A.J. (1969) Nitrogen chlorosis in blue green algae. *Archives Microbiol* **69**: 114-120.

Allen, M.M. (1988) Inclusions: cyanophycin. *Methods Enzymol* **167**: 207-213.

Anagnostopoulos, C., und Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746.

Arcondéguy, T., Jack, R., und Merrick, M. (2001) P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 80–105.

Arsene, F., Kaminski, P.A., und Elmerich, C. (1996) Modulation of NifA activity by P_{II} in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J Bacteriol* **178**: 4830–4838.

Arsene, F., Kaminski, P.A., und Elmerich, C. (1999) Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P_{II}: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 339–343.

Atkinson, M.R., und Ninfa, A.J. (1999) Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**: 301–313.

B

Belitsky, B.R., Wray Jr., L.V., Fisher, S.H., Bohannon, D.E., und Sonenshein, A.L. (2000) Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. *J Bacteriol* **182**: 5939-5947.

- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, M., Foor, F., und Magasanik, B. (1977) Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **129**: 1001-1009.
- Benelli, E.M., Buck, M., Polikarpov, I., de Souza, E.M., Cruz, L.M., und Pedrosa, F.O. (2002) *Herbaspirillum seropedicae* signal transducer protein P_{II} is structurally similar to the enteric GlnK. *Eur J Biochem* **269**: 3296-3303.
- Berlett, B.S., Levine, R.L., und Stadtman, E.R. (1998) Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2784-2789.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Chen, Y.B., Kupper, H., Kolber, Z., Bergman, B., und Falkowski, P. (2001) Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science* **294**: 1534-1537.
- Bernhard, J. (2000) <http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de:8080/institute/85>
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brown, S.W., und Sonenshein, A.L. (1996) Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* Operon. *J Bacteriol* **178**: 2450-2454.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378.
- Burillo, S., Luque, I., Fuentes, I., und Contreras, A. (2004) Interactions between the nitrogen signal transduction protein P_{II} and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J Bacteriol* **186**: 3346-3354.
- Burkholder, P.R., und Giles, N.H. (1947) Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Botany* **34**: 345-348.
- Burkovski, A. (2003) Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes *FEMS Microbiol Revs* **27**: 617-628

C

Caban, C.E., und Ginsburg, A. (1976) Glutamine synthetase adenylyltransferase from *Escherichia coli*: purification and physical and chemical properties. *Biochemistry* **15**: 1569-1580.

Caldovic, L., und Tuchman, M. (2003) N-acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem J* **372**: 279-290.

Carr, P.D., Cheah, E., Suffolk, P.M., Vasudevan, S.G., Dixon, N.E., und Ollis, D.L. (1996) X-ray structure of the signal transduction protein P_{II} from *Escherichia coli* at 1,9 Å. *Acta Crystallogr Sect D* **52**: 93-104.

Carson, M. (1991) Ribbons-2.0. *J Appl Crystallog* **24**: 958-961.

Charney, J., Fisher, W.P., und Hegarty, C.P. (1951) Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* **62**: 145-148.

Cheah, E., Carr, P.D., Suffolk, P.M., Vasudevan, S.G., Dixon, N.E., und Ollis D.L. (1994) Structure of the *Escherichia coli* signal transduction protein P_{II}. *Structure* **2**: 981-990.

Claus, D., und Berkeley, R.C.W. (1986) *Genus Bacillus Cohn 1872*, pp. 1105-1139 in P.H.A. Sneath (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore.

Collier, J.L., und Grossman, A.R. (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* **174**: 4718-4726.

Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D., und Merrick, M. (2002) Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* **21**: 536-545.

Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., und Stalon, V. (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* **50**: 314-352.

Cutting, S.M., und Vander Horn, P.B. (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley & Sons. Ltd. P 27-74, Chichester, United Kingdom

D

de Mel, V.S.J., Kamberov, E.S., Martin, P.D., Zhang, J. Ninfa, A.J., und Edwards, B.F.P. (1994) Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the P_{II} protein from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **243**: 796-798.

Degryse, E., Glansdorff, N., und Pierard, A. (1976) Arginine biosynthesis and degradation in an extreme thermophile strain ZO5. *Arch Int Physiol Biochim* **84**: 599-601.

Detsch, C., und Stülke, J. (2003) Ammonium utilization in *B. subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* **149**: 3289–3297.

Drepper, T., Gross, S., Yakunin, A.F., Hallenbeck, P.C., Masepohl, B., und Klipp, W. (2003) Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **149**: 2203–2212.

E

Ehlers, C., Weidenbach, K., Veit, K., Forchhammer, K., und Schmitz, R.A. (2005) Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase activity in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 in response to nitrogen availability. *Mol Microbiol* **55**: 1841-1854.

Eisenstadt, E. (1972) Potassium content during growth and sporulation in *Bacillus subtilis* W23. *J Bacteriol* **112**: 264-267.

Eisenstadt, E., Fisher, S., Der, C.-L., und Silver, S. (1973) Manganese transport in *Bacillus subtilis* W23 during growth and sporulation. *J Bacteriol* **113**: 1363-1372.

F

Fernández-Murga, L.M., Ramón-Maiques, S., Gil-Ortiz, F., Fita, I., und Rubio, V. (2002) Towards structural understanding of feedback control of arginine biosynthesis: cloning and expression of the gene for the arginine-inhibited N-acetyl-L-glutamate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*, purification and crystallization of the recombinant enzyme and preliminary X-ray studies. *Acta Crystallogr D* **58**: 1045-1047.

Ferson, A.E., Wray, L.V., Jr und Fisher, S.H. (1996) Expression of the *Bacillus subtilis* *gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. *Mol Microbiol* **22**: 223-232.

Fisher, S.H., und Sonenshein, A.L. (1984) *Bacillus subtilis* glutamine synthetase mutants pleiotropically altered in glucose catabolite repression. *J Bacteriol* **157**: 612-621.

Fisher, S.H. (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol Microbiol* **32**: 223-232.

Fisher, S.H., Brandenburg, J.L., und Wray Jr., L.V. (2002) Mutations in *Bacillus subtilis* glutamine synthetase that block its interaction with transcription factor TnrA. *Mol Microbiol* **45**: 627-635.

Fisher, S.H., und Wray, L.V. (2002) Mutations in the *Bacillus subtilis glnRA* operon that cause nitrogen source-dependent defects in regulation of TnrA activity. *J Bacteriol* **184**: 4636-4639.

Flores, E., und Herrero, A. (1994) Assimilatory nitrogen assimilation and its regulation. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed) Kluwer Academic Publishers, Boston, MA. Pp. 487-517.

Foor, F., Janssen, K.A., und Magasanik, B. (1975) Regulation of synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 4844-4848

Forchhammer, K., und Tandeau de Marsac, N. (1994) The P_{II} protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J Bacteriol* **176**: 84-91.

Forchhammer, K., und Tandeau de Marsac, N. (1995a) Functional analysis of the phosphoprotein P_{II} (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **177**: 2033-2040.

Forchhammer, K., und Tandeau de Marsac, N. (1995b) Phosphorylation of the P_{II} protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Analysis of in vitro kinase activity. *J Bacteriol* **177**: 5812-5817.

Forchhammer, K., und Hedler, A. (1997) Phosphoprotein P_{II} from cyanobacteria: analysis of functional conservation with the P_{II} signal transduction protein from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **244**: 869-875.

Forchhammer, K. (1998) Protein-(Ser/Thr)-Phosphorylierung in Bakterien: Fragmente des "eukaryotischen" Typs der Signaltransduktion? *Biospektrum* **3**: 38-40.

Forchhammer, K. (1999) The P_{II} protein in *Synechococcus* sp. PCC 7942 senses and signals 2-oxoglutarate under ATP replete conditions. *The Phototrophic Prokaryotes*, G. Peschek, W. Löffelhardt und G. Schmetterer, p. 549-553, Kluwer Akademie/Plenum Publishers, New York.

Forchhammer, K., Hedler, A., Strobel, H., und Weiss, V. (1999) Heterotrimerization of P_{II}-like signalling proteins: implications for P_{II}-mediated signal transduction systems. *Mol Microbiol* **33**: 338-349.

Forchhammer, K. (2002) Nitrogen-starvation in non-diazotrophic cyanobacteria: survival through chlorosis. *Rec Res Devel Microbiol* **6**: 45-54.

Forchhammer, K. (2003) Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 59-73.

G

Gallon, J.R. (2001) N₂ fixation in phototrophs: adaptation to a specialized way of life. *Plant and Soil* **230**: 39-48.

García-Domínguez, M., Reyes, J.C., und Florencio, F.J. (1999) Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7161-7166.

Gil, F., Ramón-Maiques, S., Marina, A., Fita, I., und Rubio, V. (1999) N-Acetyl-L-glutamate kinase from *Escherichia coli*: cloning of the gene, purification and crystallization of the recombinant enzyme and preliminary X-ray analysis of the free and ligand-bound forms. *Acta Crystallogr D* **55**: 1350-1352.

Görl, M., Sauer, J., Baier, T., und Forchhammer, K. (1998) Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology* **144**: 2449-2458.

Grodberg, J., und Dunn, J.J. (1988) *OmpT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**: 1245-1253.

Guerrero, M.G., Vega, J.M., und Losada, M. (1981) The assimilatory-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* **32**: 169-204.

H

Haas, D., und Leisinger, T. (1975) N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and ligand-directed association-dissociation. *Eur J Biochem* **52**: 365-375.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **170**: 557-580.

Harrison, M.A., Keen, J.N., Findlay, J.B., und Allen, J.F. (1990) Modification of a *glnB*-like gene product by photosynthetic electron transport in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *FEBS Letters* **264**: 25-28.

Heinrich, A. (2002) Physiologische und biochemische Charakterisierung des P_{II}-Homologs NrgB aus *Bacillus subtilis* Stamm 168. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Heinrich, A., Maheswaran, M., Ruppert, U., und Forchhammer, K. (2004) The *Synechococcus elongatus* P_{II} signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol Microbiol* **52**: 1303-1314.

Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., und Flores, E. (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* **183**: 411-425.

Hesketh, A., Fink, D., Gust, B., Rexer, H.U., Scheel, B., Chater, K., *et al.* (2002) The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol Microbiol* **46**: 319–330.

Hoare, D.S., und Hoare, S.L. (1966) Feedback regulation of arginine biosynthesis in blue-green algae. *J Bacteriol* **92**: 375-379.

I

Ihlenfeldt, M.J.A., und Gibson, J. (1977) Acetate uptake by the unicellular cyanobacteria *Synechococcus* and *Aphanocapsa*. *Arch Microbiol* **113**: 231-241.

Isaac, J.H., und Holloway, B.W. (1972) Control of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.***73**: 427-438.

J

Javelle, A., Severi, E., Thornton, J., und Merrick, M. (2004) Ammonium sensing in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 8530-8538.

Javelle, A., und Merrick, M. (2005) Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. *Biochem Society Transactions* **33**: 170-172.

Jiang, P., Peliska, J.A., und Ninfa, A.J. (1998a) Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the P_{II} protein. *Biochemistry* **37**: 12782-12794.

Jiang, P., Peliska, J.A., und Ninfa, A.J. (1998b) Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**: 12795-12801.

Jiang, P., Peliska, J.A., und Ninfa, A.J. (1998c) The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. *Biochemistry* **37**: 12802-12810.

K

Kamberov, E.S., Atkinson, M. A. und Ninfa, A.J. (1995) The *Escherichia coli* signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J Biol Chem* **270**: 17797-17807.

Kessler, P.S., Daniel, C., und Leigh, J.A. (2001) Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: mechanistic features and requirement for the novel GlnB homologues, Nifl(1) and Nifl(2). *J Bacteriol* **183**: 882–889.

Kimura, K., Sugano, S., Funae, A., und Nakano, Y. (1991) Characterization of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase by limited proteolysis. *J Biochem* **110**: 526-531.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

Kustu, S., Hirschman, J. Burton, D., Jelesko, J., Meeks, J.C. (1984) Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. *Mol Gen Genetics* **197**: 309-317.

Kustu, S.G., McFarland, N.C., Hui, S.P., Esmon, B., und Ames, G.F. (1979) Nitrogen control of *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. *J Bacteriol* **138**: 218-234.

L

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lawry, N.H., und Simon, R.D. (1982) The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae. *J Phycol* **18**: 391-399.

Lee, H.-M., Flores, E., Herrero, A., Houmard, J., und Tandeau de Marsac, N. (1998) A role for the signal transduction protein P_{II} in the control of nitrate/nitrite uptake in a cyanobacterium. *FEBS Lett* **427**: 291-295.

Lee, H.-M., Flores, E., Forchhammer, K., Herrero, A., und Tandeau de Marsac, N. (2000) Phosphorylation of the signal transducer P_{II} protein and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur J Biochem* **267**: 591-600.

Leisinger, T., Haas, D., und Hegarty, M. P. (1972) Indospicine as an arginine antagonist in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **262**: 214-219.

Liang, Y.Y., de Zamaroczy, M., Arsene, F., Paquelin, A., und Elmerich, C. (1992) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 113–119.

Little, R., Reyes-Ramirez, F., Zhang, Y., van Heeswijk, W.C., und Dixon, R. (2000) Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the P_{II} regulatory protein. *EMBO J* **19**: 6041-6050.

Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H.M., Merzbacher, M., Stülke, J. (2002) Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol* **45**: 543-553.

Luque, I., Herrero, A., Flores, E., und Madueno, F. (1992) Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Gen Genet* **232**: 7-11.

Luque, I., Flores, E., und Herrero, A. (1994) Nitrate and nitrite transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 are mediated by the same permease. *Biochem Biophys Acta* **1184**: 296-298.

M

MacKay, G., und Shargool, P.D. (1981) Purification and characterization of 5-acetylglutamate 5-phosphotransferase from pea (*Pisum sativum*) cotyledons. *Biochem J* **195**: 71-81.

MacPherson, K.H., Xu, Y., Cheah, E., Carr, P.D., van Heeswijk, W.C., Westerhoff, H.V., Luque, E., Vasudevan, S.G., und Ollis, D.L. (1998) Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Escherichia coli* GlnK. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **54**: 996-998.

Maeda, S.-I., und Omata, T. (1997) Substrate-binding lipoprotein of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 involved in the transport of nitrate and nitrite. *J Biol Chem* **272**: 3036-3041.

Maheswaran, M., Urbanke, C., und Forchhammer, K. (2004) Complex formation and catalytic activation by the P_{II} signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J Biol Chem* **53**: 55202-55210.

Martin, D.E., Hurek, T., und Reinhold-Hurek, B. (2000) Occurrence of three P_{II}-like signal transmitter proteins in the diazotrophic proteobacterium *Azoarcus* sp. BH72. *Mol Microbiol* **38**: 276-288.

McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T., und Sueoka, N. (1986) The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **15**: 93-103.

Meeks, J.C., und Elhai, J. (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 94-121.

Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352-355. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Moorhead, G.B.G., und Smith, C.S. (2003) Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for P_{II} ? *Plant physiol* **133**: 1–7.

Muro-Pastor, M.I., und Florencio, F.J. (1992) Purification and properties of $NADP^+$ -isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **203**: 99-105.

Muro-Pastor, M.I., und Florencio, F.J. (1994) $NADP^+$ -isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J Bacteriol* **176**: 2718-2726.

Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., und Florencio, F.J. (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J Biol Chem* **276**: 38320-38328.

N

Najafi, S.M.A., Harris, D.A., und Yudkin, M.D. (1997) Properties of the phosphorylation reaction catalysed by SpoIIAB that help to regulate sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**: 5628-5631.

Nakano, M.M., Yang, F., Hardin, P., und Zuber, P. (1995) Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 573-579.

Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., und Clark, D.P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol* **179**: 6749-6755.

Nakano, M.M., Hoffmann, T., Zhu, Y., und Jahn, D. (1998) Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J. Bacteriol.* **180**: 5344-5350.

Ninfa, A.J., und Atkinson, M.R. (2000) P_{II} signal transduction proteins. *Trends Microbiol* **8**: 172-179.

Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T., und Yamane, H. (1999) A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Res* **9**: 1175-1183.

O

Omata, T., Andriesse, X., und Hirano, A. (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Gen Genet* **236**: 193-202.

P

Paz-Yepes, J., Flores, E., und Herrero, A. (2003) Transcriptional effects of the signal transduction protein P_{II} (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett* **543**: 42-46.

Palinska, K.A., Laloui, W., Bedu, S., Loiseaux-de Goer, S., Castets, A.M., Rippka, R., und Tandeau de Marsac, N. (2002) The signal transducer P_{II} and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation. *Microbiology* **148**: 2405–2412.

Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., und Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.

Prozesky, O.W. (1967) Arginine synthesis in *Proteus mirabilis*. *J Gen Microbiol* **49**: 325-334.

R

Ramón-Maiques, S., Marina, A., Gil-Ortiz, F., Fita, I., und Rubio, V. (2002) Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. *Structure* **10**: 329-342.

Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., und Sonenshein, A.L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* **15**: 1093-1103.

Reith, M., und Munholland, J. (1993) Two amino-acid biosynthetic genes are encoded on the plastid genome of the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J Curr Genet* **23**: 59-65.

Reitzer, L.J. (1996) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagines, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss, III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 391-407.

Reitzer, L.J. (2003) Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **57**: 155–176.

Robichon, D., Arnaud, M., Gardan, R., Pragai, Z., O'Reilly, M., Rapoport, G., und Débarbouillé, M. (2000) Expression of a new operon from *Bacillus subtilis*, *yzkB-ykoL*, under the control of the TnrA and PhoP-PhoR global regulators. *J Bacteriol* **182**: 1226-1231.

Rubio, L.M., Herrero, A., und Flores, E. (1996) A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. *Plant Mol Biol* **30**: 845-850.

Rudnick, P., Kunz, C., Gunatilaka, M.K., Hines, E.R., und Kennedy, C. (2002) Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **184**: 812-820.

Ruppert, U., Irmeler, A., Kloft, N., und Forchhammer, K. (2002) The novel protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC6803 controls dephosphorylation of the signalling protein P_{ii}. *Mol Microbiol* **44**: 855-864.

S

Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Völker, U., und Forchhammer, K. (2001) Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: low level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiol* **126**: 233-243.

Schreier, H.J., Brown, S.W., Hirschi, K.D., Nomellini, J.F., und Sonenshein, A.L. (1989) Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. *J Mol Biol* **210**: 51-63.

Schultz, A.C., Nygaard, P., und Saxild, H.H. (2001) Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J Bacteriol* **183**: 3293-3302.

Schutt, H., und Holzer, H. (1972) Biological function of the ammonia-induced inactivation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **26**: 68-72.

Shapiro, B.M., und Stadtman, E.R. (1968) Glutamine synthetase deadenylylating enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **30**: 32-37.

Shapiro, B.M. (1969) The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. *Biochemistry* **8**: 659-670.

- Sherman, L.A., Meunier, P., und Colon-Lopez, M.S. (1998) Diurnal rhythms in metabolism: A day in the life of a unicellular, diazotrophic cyanobacterium. *Photosynth Res* **58**: 25-42.
- Skerman V.B.D., McGowan, V., und Sneath, P.H.A. (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 225-420.
- Skerra, A., und Schmidt, T.G.M. (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for recombinant protein purification and detection. *Methods Enzymol* **326**: 271-304.
- Smith, C.S., Morrice, N.A., und Moorhead, G.B. (2004) Lack of evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* P_{II}: implications for plastid carbon and nitrogen signalling. *Biochem Biophys Acta* **1699**: 145-154.
- Serror, P., und Sonenshein, A.L. (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J Bacteriol* **178**: 5910-5915.
- Stanier, R.Y., und Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* **31**: 225-274.
- Stips, J., Thummer, R., Neumann, M., und Schmitz, R.A. (2004) GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Biochem* **271**: 3379-3388.
- Stragier, P., Bonamy, C., und Karmazyn-Campelli, C. (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell* **52**: 697-704.
- Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R., und Burkovski, A. (2004) Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **54**: 132-147.
- Studier, F.W., und Moffat, B.A. (1986) Use of bacterial T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- SubtiList, <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList>
- Sugiyama, K., Hayakawa, T., Kudo, T., Ito, T., und Yamaya, T. (2004) Interaction of N-Acetylglutamate kinase with a P_{II}-like protein in rice. *Plant Cell Physiol* **45**: 1768-1778.
- Suzuki, I., Sugiyama, T., und Omata, T. (1993) Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* **34**: 1311-1320.

T

Tabor, S., und Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1074-1078.

Tsinoremas, N.F., Castets, A.M., Harrison, M.A., Allen, J.F., und Tandeau de Marsac, N. (1991) Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of post-translational modification of the *glnB* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4565-4569.

U

Udaka, S. (1966) Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J Bacteriol* **91**: 617-621.

V

Van Heeswijk, W.C., Stegeman, B., Hoving, S., Molenaar, D., Kahn, D., und Westerhoff, H.V. (1995) An additional P_{II} in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. *FEMS Microbiol Lett* **132**: 153-157.

Van Heeswijk, W.C., Hoving, S., Molenaar, D., Stegeman, B., Kahn, D., und Westerhoff, H.V. (1996) An alternative P_{II} protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 133-146.

Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1995) Separate mechanisms activate sigma(B) of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* **177**: 3771-3780.

Vogel, H.J., und Bonner, D.M. (1956) Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**: 97-106.

Vyas, S., und Maas, W.K. (1963) Feedback inhibition of acetylglutamate synthetase by arginine in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **100**: 542-546.

W

Wallace, A.C., Laskowski, R.A. und Thornton, J.A. (1995). LIGPLOT: a computer program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* **8**: 127-134.

Wolk, C.P. (2000) Heterocyst formation in *Anabaena*. In: *Prokaryotic Development*. Brun, Y.V. und Shimkets, L.J. (eds) American Society for Microbiology, pp. 83-104.

Woyda, K. (2004) Konstruktion eines NrgB-*Streptag* exprimierenden *Bacillus subtilis* Stammes und Interaktionsstudien zwischen der Glutamin-Synthetase und dem Transkriptionsfaktor TnrA. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Wray, Jr, L.V., Atkinson, M.R., und Fisher, S.H. (1994) The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* *nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* *glnB*-encoded P_{II} protein. *J Bacteriol* **176**: 108-114.

Wray, Jr, L.V., Ferson, A.E., Rohrer, K., und Fisher, S.H. (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8841-8845.

Wray, Jr, L.V., Ferson, A.E., und Fisher, S.H. (1997) Expression of the *Bacillus subtilis* *ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA and Spo0H. *J Bacteriol* **179**: 5494-5501.

Wray Jr., L.V., Zalieckas, J.M., und Fisher, S.H. (2000) Purification and *in vitro* activities of the *Bacillus subtilis* TnrA transcription factor. *J Mol Biol* **300**: 29-40.

Wray Jr., L.V., Zalieckas, J.M., und Fisher, S.H. (2001) *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* **107**: 427-435.

X

Xu, Y., Chea, E., Carr, P.D., van Heeswijk, W.C., Westerhoff, H., Vasudevan, S.G., und Ollis, D.L. (1998) GlnK, a P_{II}-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loop may be involved in molecular recognition. *J Mol Biol* **282**: 149-165.

Xu, Y., Carr, P.D., Huber, T., Vasudevan, S.G., und Ollis, D.L. (2001) The structure of the P_{II}-ATP complex. *Eur J Biochem* **268**: 2028-2037.

Xu, Y., Carr, P.D., Clancy, P., Garcia-Dominguez, M., Forchhammer, K., Florencio, F., Tandeau de Marsac, N., Vasudevan, S.G., und Ollis, D.L. (2003) The structures of the P_{II} proteins from the cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Cryst D* **59**: 2183-2190.

Y

Yamashita, M.M., Almassy, R.J., Janson, C.A., Cascio, D., und Eisenberg, D. (1989) Refined atomic model of glutamine synthetase at 3,5 Å resolution. *J Biol Chem* **264**: 17681-17690.

Yoshida, K., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y., Nakaura, Y., und Fujita, Y. (2003) Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. *Mol Microbiol* **49**: 157-165.

G. Abkürzungsverzeichnis

A

α -KG	α -Ketoglutarat
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
*ATP	¹⁴ C-gelabeltes ATP

B

bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BsP _{II}	<i>Bacillus subtilis</i> P _{II}
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ci	Curie
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)

D

d	Tag
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotid-triphosphate
DTT	Dithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere

F

FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
------	-----------------------------------------

G

g Erdbeschleunigung

H

h Stunde

Hepes N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

I

IPTG Isopropyl-thiogalactosid

K

K~P Kaliumphosphat-Puffer

Kan Kanamycin

kDa kilo-Dalton

keV kilo-Elektrovolt

L

l Liter

M

M Molar

max. maximal

Mg Magnesium

mg Milligramm

min Minute

mind. mindestens

ml Milliliter

µl Microliter

mm Millimeter

mM millimolar

MS Massenspektrometrie

N

N Stickstoff

NADPH Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NAG N-Acetyl-L-Glutamat

Na~P Natriumphosphat-Puffer

nm Nanometer

NP40 Nonidet P-40

ns Nanosekunde

O

OD_x Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm

P

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

psi *pounds per square inch*

R

rpm *rounds per minute*

RT Raumtemperatur

S

SDS Natriumdodecylsulfat

sec Sekunde

s.o. siehe oben

sog. sogenannt

s.u. siehe unten

SVD *snake venom phosphodiesterase*

T

t Zeit

Tab. Tabelle

TCA Trichloressigsäure

TEMED Tetramethylethylendiamin

TFA Triflouressigsäure

Tricine N-tris[Hydroxymethyl]methylglycin

Tris/Cl Tris(hydroxymethyl)aminomethan mit HCl titriert

U

U *unit / Einheit*

U/min Umdrehungen pro Minute

u. a. unter anderem

UV Ultraviolett

V

V Volt

vgl. vergleiche

v/v Volumen/Volumen

W

W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen lieben Menschen bedanken, ohne deren Hilfe die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich oder zumindest deutlich schwieriger gewesen wäre.

Folgenden Personen bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

- Herrn Prof. Forchhammer, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas und für die fachlich sehr gute Betreuung.

- Frau Prof. Klug für die freundliche Aufnahme am Institut.

- Der gesamten AG Forchhammer für das stets gute Arbeitsklima. Hervorheben möchte ich unsere technischen Assistenten, Ulrike, Elvira, Carmen und Noelia, die mich mit hilfreichen Ratschlägen, kleinen und größeren Handgriffen unterstützt haben. Vielen Dank gilt im Besonderen Ulrike, die erst durch die Hefe-2-Hybrid-Analysen das NAG-Kinase-Projekt ermöglichte und Elvira, die immer eifrig für Proteinnachschub gesorgt hat.

- Meinen Mädels Grit und Miri, die mich oft zum Lachen gebracht haben und besonders Nicole, die mit mir neun Jahre lang in Freundschaft den gleichen Weg des Studiums beschritten hat.

- außerdem meinen lieben Arbeitskollegen Adrienne, Fadi und Mani, unseren Ex-Diplomanten, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Mikro- und Molekularbiologie für die konstitutive Aufrechterhaltung der guten Stimmung am Institut.

- meinem Freund, der jeder Zeit für mich da war und immer Verständnis für meine Arbeit hatte.

... und zu guter Letzt meiner Familie, für ihr Interesse und ihre permanente Unterstützung während der langen Jahre des Studiums und der Promotion.

LEBENS LAUF**Persönliche Angaben**

Name Annette Heinrich
 Geburtsdatum 28.07.1977
 Geburtsort Düsseldorf

Schulbildung

1983 - 1987 Städtische Katholische Grundschule St. Suitbertus, Ratingen
 1987 - 1996 Theodor-Heuss-Gymnasium, Ratingen

Studium

Oktober 1996 Beginn des Biologiestudiums an der JLU Gießen
 September 2001 Beginn der Diplomarbeit bei Prof. Forchhammer am Institut für Mikro- und Molekularbiologie der JLU Gießen, Thema: "Biochemical and physiological characterization of the P_{II} homologue NrgB in *Bacillus subtilis* strain 168"
 Mai 2002 Erhalt des akademischen Grades eines Diplombiologen
 Juli 2002 - August 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikro- und Molekularbiologie der JLU Gießen und Beginn der Doktorarbeit
 Oktober 2005 Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Veröffentlichung

A. Heinrich, M. Maheswaran, U. Ruppert and K. Forchhammer (2004) The *Synechococcus elongatus* P_{II} signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase, *Molecular Microbiology* 52(5), 1303-1314.

Präsentationen

April 2005 25. Symposium über Mechanismen der Genregulation, Blaubeuren; Thema: „Interaction of the P_{II} homologue GlnK and its transcription activator TnrA in *Bacillus subtilis*“.
 Sept. 2004 19th International conference on arginine and pyrimidines (ICAP), Marburg; Thema: "Arginine biosynthesis in Cyanobacteria is subjected to global nitrogen control via P_{II}".
 März 2003 Jahrestagung der VAAM (Vereinigung für Allg. und Angewandte Mikrobiologie), Berlin, Topic: "Biochemical characterization of the P_{II} homologue GlnK in *B. subtilis* strain 168".
 März 2002 Jahrestagung der VAAM, Göttingen, Thema: "Biochemical characterization of the protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC 6803".

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Annette Heinrich, geboren am 28.07.1977 in Düsseldorf, dass ich die vorliegende Dissertation, gemäß der Promotionsordnung (vom 05. Februar 1990) für die Verleihung des Dr. rer. nat. durch die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Gießen, selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen Quellen benutzt habe.

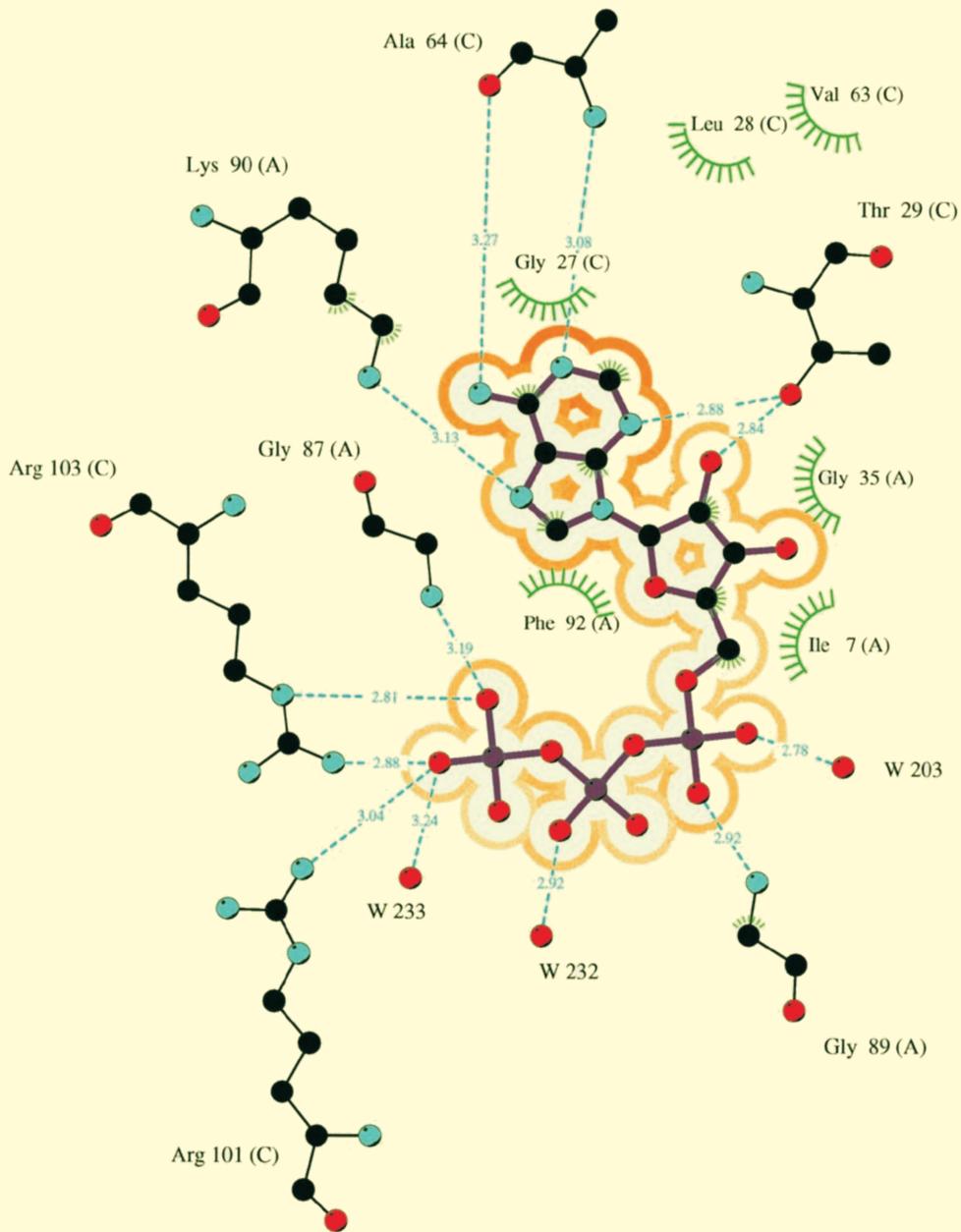
Gießen, den 15.08.2005

.....
(Annette Heinrich)

Zur Umschlagsgestaltung:

Vorderseite: Struktureller Vergleich des P_{ii}/ATP- und GlnK/ATP-Komplexes aus *Escherichia coli*. Diagramm von zwei übereinandergelagerten Trimeren mit drei ATP-Molekülen. P_{ii}/ATP und GlnK/ATP sind in rosa/magenta bzw. silber/gelb dargestellt. Das Diagramm wurde mit dem Programm RIBBONS erstellt (Carson, 1991) und ist der Veröffentlichung von Xu *et al.* (2001) entnommen.

Rückseite: Schematisches Diagramm von Wasserstoffbrücken- und unpolaren Interaktionen zwischen GlnK und ATP in *Escherichia coli*. Die Intensität der farbigen Umrandung von ATP verweist auf den Zugang zu dessen Oberfläche. Die dunklere Farbe bedeutet einen schwächeren Zugang; die Adenin-Gruppe ist weniger zugänglich als die Phosphatgruppen. Dieses Diagramm wurde mit dem LIGPLOT-Programm hergestellt (Wallace *et al.*, 1995) und ist der Veröffentlichung von Xu *et al.* (1998) entnommen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 GLEIBERGER WEG 4
 D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
 Email: vvb-ips@t-online.de
 www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-074-2



9 783896 870742