

**Identifizierung und molekularbiologische
und physiologische Charakterisierung
der P_{II}-homologen Signaltransduktionsproteine aus
Acetobacter diazotrophicus Pal5**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Olena Perlova
aus
Dnipropetrowsk, Ukraine

Bielefeld, 2001

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	VI
A. ZUSAMMENFASSUNG	1
B. EINLEITUNG	3
B.1 Biologische Stickstofffixierung und Stickstoff-Assimilation	3
B.2 Eigenschaften der Gene und deren Genprodukte, die an der Stickstofffixierung, Stickstoff-Assimilation und Stickstoff-abhängigen Regulation beteiligt sind.....	4
B.2.1 Der Nitrogenase-Enzymkomplex	6
B.2.1.1 Aktivierung der Transkription der <i>nif</i> -Gene.....	6
a) Der Transkriptionsaktivator NifA	7
b) Der alternative Sigma-Faktor σ^{54}	8
B.2.1.2 Posttranslationale Regulation der Nitrogenase-Aktivität	9
B.2.2 Stickstoff-Assimilation in diazotrophen Bakterien.....	9
B.2.2.1 Regulation der Glutamin-Synthetase.....	10
B.3 Regulatorische Rolle der P_{II}-Proteine in der Ntr-Kontrolle.....	12
B.3.1 Das globale Ntr-System und die Funktionen des P _{II} -Proteins	12
B.3.2 Eigenschaften des P _{II} -Proteins	14
B.3.3 Eigenschaften der Uridylyltransferase GlnD, die das P _{II} -Protein posttranslational modifiziert	17
B.3.4 Die Rolle der P _{II} -Proteine in der Ammonium-abhängigen Regulation der N ₂ -Fixierung in Proteobakterien.....	17
B.4 Ammonium-Aufnahme und Ammonium-Transport	21
B.5 Das endophytische stickstofffixierende Bakterium <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (syn. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>).....	22
B.6 Gene der Stickstofffixierung in <i>Acetobacter diazotrophicus</i>	23
B.7 Ziele der Arbeit	25
C. MATERIAL UND METHODEN.....	26
I. MATERIAL	26
C.1 Bakterienstämme	26
C.2 Plasmide.....	27
C.3 Phagen.....	30
C.4 Oligonukleotide	30
C.4.1 PCR-Primer	30
C.4.2 Sequenzierprimer	31
C.5 Enzyme.....	32

INHALTSVERZEICHNIS

C.5.1 Restriktionsendonukleasen	32
C.6 Antikörper	33
C.7 Kits	33
C.8 Chemikalien.....	33
C.9 Geräte.....	34
C.10 Puffer und Lösungen	35
C.10.1 Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung	35
C.10.2 Puffer und Lösungen für Southern-Hybridisierung	37
C.10.3 Phagen-Puffer, Plaques-Hybridisierung	38
C.10.4 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	39
C.10.5 RNA-Puffer und Lösungen.....	40
C.10.6 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Techniken.....	40
C.10.7 Puffer und Lösungen für GUS-Aktivität-Messung.....	42
C.11 Nährmedien und Zusätze	43
C.11.1 Nährmedien	43
C.11.2 Zusätze zu den Nährmedien.....	44
C.11.3 Antibiotika	45
II. METHODEN	46
C.12 DNA-Techniken	46
C.12.1 DNA-Isolierung	46
C.12.1.1 Gesamt-DNA-Isolierung	46
C.12.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung.....	46
C.12.1.3 Klonanalysen.....	48
a) Schnellverfahren zum Nachweis von Plasmid-DNA	48
b) Eckhardt-Lyse	48
c) Kochmethode	48
C.12.1.4 Phagen-DNA-Isolierung.....	49
C.12.2 Alkoholfällung von DNA	51
C.12.3 Phenolextraktion.....	51
C.12.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
C.12.5 Agarosegelelektrophorese	52
C.12.6 DNA-Restriktion.....	52
C.12.7 <i>In vitro</i> Neukombination von DNA-Fragmenten - Ligation.....	53
C.12.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase	53
C.12.9 Auffüllen rezessiver 3'-Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	53
C.12.10 Einführung unidirektionaler Deletionen in Plasmid-DNA mittels Exonuklease III	54
C.12.11 PCR-Amplifikation.....	56
C.12.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	57
C.12.13 DNA-Sequenzierung	57
C.12.14 DNA-DNA-Hybridisierung	60
C.12.14.1 DNA-Transfer über Vakuumblotting	60
C.12.14.2 Passiver DNA-Transfer - Kapillarblot.....	61

C.12.14.3 Markierung der DNA	61
a) Random Primed DNA Labelling	61
b) Markierung der DNA mittels "Nick Translation"	62
C.12.14.4 Überprüfung der Markierungsreaktion.....	62
C.12.14.5 Hybridisierungsreaktion	62
C.12.14.6 Nachweisreaktion mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern.....	63
C.12.14.7 Plaque-Hybridisierung.....	63
C.13 Transformation	63
C.13.1 Transformation von <i>E. coli</i>	63
C.13.2 Elektroporation von <i>A. diazotrophicus</i>	64
C.14 Herstellung der Phagen-Genbank	65
C.15 RNA-Analytik.....	66
C.15.1 RNA-Isolierung aus <i>A. diazotrophicus</i>	66
C.15.1.1 Bakterienanzucht und Zellaufschluß	66
C.15.1.2 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	66
C.15.2 RNA-Reinigung.....	66
C.15.3 Northern Blot	67
C.15.3.1 Auftrennung der RNA im Formaldehyd-Agarosegel	67
C.15.3.2 Markierung der RNA-Sonden	67
C.15.3.3 Hybridisierung unter stringenten Bedingungen.....	68
C.16 Proteinbiochemische Techniken	69
C.16.1 Zellschnellaufschluss für SDS-PAGE	69
C.16.2 Zellaufschluss über Ultraschall.....	69
C.16.3 Zellaufschluss mit RIBI Cell Fractionator	69
C.16.4 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)	70
C.16.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit „BioRad Protein Assay“	70
C.16.6 SDS-PAGE	71
C.16.7 Protein Blot mit dem SemiDry Elektrobloetter	72
C.16.8 Western Blot	72
C.16.8.1 Nachweisreaktion mit ECL™	72
C.16.8.2 Nachweisreaktion mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugat	73
C.16.9 Radioaktiver Nachweis der Uridylylierung von Proteinen.....	73
C.16.9.1 Behandlung mit SVPD („snake venom phosphodiesterase“).....	73
C.17 Analyse der Genexpression über GUS-Aktivitäts-Messungen	73
C.18 Untersuchung der physiologischen Rolle der <i>glnB</i>, <i>glnK</i>₁ und <i>amtB</i>₁-Mutanten in <i>A. diazotrophicus</i>	74
C.18.1 Wachstum auf dem Stickstoff-freiem LGI-Weichagar.....	74
C.18.2 Aminosäureplatten-Test.....	75
C.18.3 Messung der Nitrogenase-Aktivität mittels ARA („acetylene reduction assay“).....	75
C.18.4 Bestimmung der γ - Glutamyltransferase-Aktivität der Glutamin-Synthetase	76
C.18.5 Messung der [¹⁴ C]-Glutamin-Aufnahme	77
C.18.6 [¹⁴ C]-Methylammonium-Aufnahme	77

D. ERGEBNISSE	79
D.1 Identifizierung <i>glnB</i>-homologer Bereiche im <i>Acetobacter diazotrophicus</i> -Genom über PCR	79
D.2 Herstellung einer <i>Acetobacter diazotrophicus</i> Phagen-Genbank und Isolierung der zwei <i>glnB</i>-tragenden Fragmente	81
D.3 Klonierung, Sequenzierung und Mutagenese der zwei zu <i>glnB</i>-Gen homologen Regione.....	84
D.3.1 Der Phage EMBL-P10 trägt das <i>glnB</i> -Gen.....	84
D.3.1.1 <i>glnB</i> und <i>glnA</i> -Gene liegen in <i>Acetobacter diazotrophicus</i> geclustert vor	84
D.3.1.2 Sequenzanalyse der <i>glnBA</i> -Region	86
D.3.1.3 Charakterisierung der abgeleiteten Genprodukte der <i>glnB</i> und <i>glnA</i> -Gene	88
D.3.2 Inaktivierung des <i>Acetobacter diazotrophicus glnB</i> -Gens über die Insertion einer Antibiotika-Resistenz.....	92
D.3.3 Identifizierung und Charakterisierung des <i>glnB</i> -homologen Gens <i>glnK₁</i>	94
D.3.3.1 Klonierung der <i>glnK₁</i> -Kodierregion.....	94
D.3.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung der chromosomalen <i>glnK₁amtB₁</i> Genregion in <i>A. diazotrophicus</i>	95
D.3.3.3 Eigenschaften des abgeleiteten Proteins GlnK1	97
D.3.3.4 Das <i>amtB₁</i> -Gen liegt auf dem Chromosom stromabwärts des <i>glnK₁</i> -Gens und kodiert für ein Protein der Familie der Ammoniumtransporter	99
D.3.4 Interposonmutagenese des <i>glnK₁</i> -Gens	100
D.3.5 Mutagenese des <i>amtB₁</i> -Gens	102
D.3.6 Analyse der <i>glnK₁</i> - und <i>amtB₁</i> -Genexpression über die Messung der β -Glukuronidase-Aktivität.....	103
D.3.7 Konstruktion von <i>glnBglnK₁</i> -Doppelmutanten.....	105
D.4 Untersuchungen zur Expression der P_{II}-homologen Proteine im <i>A. diazotrophicus</i> Wildtypstamm PAL5 sowie in <i>glnB</i>- und <i>glnK₁</i>-Mutanten-Stämmen	105
D.5 Untersuchung der Modifikation des P_{II}-Proteins in <i>Acetobacter diazotrophicus</i>	106
D.6 <i>A. diazotrophicus</i> trägt ein drittes <i>glnB</i>-homologes Gen - <i>glnK₂</i>.....	108
D.6.1 Identifizierung des <i>glnK₂amtB₂</i> -Genlocus	108
D.6.2 Sequenzanalyse der <i>glnK₂amtB₂</i> -Genregion und Charakterisierung der abgeleiteten Genprodukte	109
D.6.3 Homologievergleich der drei P _{II} -homologen Proteine aus <i>Acetobacter diazotrophicus</i>	114
D.7 Analyse des Einflusses der Mutationen in <i>glnB</i> und <i>glnK₁</i>-Genen auf die physiologischen Eigenschaften von <i>A. diazotrophicus</i>	115
D.8 Untersuchung der Funktion P_{II}-homologer Proteine in der Regulation der Stickstofffixierung.....	118
D.8.1 Analyse der Nitrogenaseaktivität in dem <i>glnB</i> Mutantenstamm	118
D.8.2 Analyse der Expression der Nitrogenase über Western Blot-Analyse	120
D.8.3 Expression der Nitrogenase in einer <i>glnD</i> -Mutante	122
D.9 Versuche zur Inaktivierung des <i>glnA</i>-Gens, um die physiologische Rolle des Genproduktes zu bestimmen.....	123
D.9.1 Untersuchung der Glutamin-Aufnahme in <i>Acetobacter diazotrophicus</i> Pal5	123
D.9.2 Analyse der Expression der Glutamin-Synthetase	124

D.10 Untersuchungen zur Bedeutung des <i>amtB</i>₁-Genproduktes für die Methylammonium-Aufnahme	125
E. DISKUSSION	130
E.1 Organisation und Sequenzvergleich der für <i>glnB</i>-homologe Gene kodierenden Regionen .	130
E.1.1 Die <i>glnBA</i> -Region in <i>A. diazotrophicus</i>	132
E.1.2 <i>glnK</i> ₁ <i>amtB</i> ₁ und <i>glnK</i> ₂ <i>amtB</i> ₂ -Kodierregionen.....	135
E.2 Expression der P_{II}-homologen Proteine	137
E.3 Struktur und Funktion der P_{II}-Proteine	137
E.4 Rolle der P_{II}-Proteine in N₂-Fixierung	140
E.5 Phänotypen der <i>glnB</i>-, <i>glnK</i>₁- und <i>glnBglnK</i>₁-Mutanten.....	145
E.6 Ist das <i>glnA</i>-Gen essentiell in <i>A. diazotrophicus</i>?.....	146
E.7 Einfluss der <i>glnD</i>-Mutation auf die Expression der Nitrogenase	147
E.8 Das Ammoniumaufnahme-System in <i>A. diazotrophicus</i>	148
E.9 Ausblick	149
F. LITERATURVERZEICHNIS	151
ANHANG	170
Anhang I. Nukleotidsequenz des <i>glnBA</i>-Fragments	170
Anhang II. DNA-Sequenz des <i>glnK</i>₁<i>amtB</i>₁-Fragments	174
Anhang III. DNA-Sequenz des <i>glnK</i>₂<i>amtB</i>₂-Fragments	177
Anhang IV. Multiples Alignment der AmtB-Proteinen von <i>A. diazotrophicus</i> und Proteinen der AmtB/Mep-Familie	181
Anhang V. Vergleich der Nukleotidsequenz der beiden <i>glnKamtB</i>-Regionen von <i>Acetobacter diazotrophicus</i> – <i>glnK</i>₁<i>amtB</i>₁ und <i>glnK</i>₂<i>amtB</i>₂	184

Abkürzungen

A	Adenosin
<i>A. diazotrophicus</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>
A. L. F.	„Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer“
Abb.	Abbildung
add.	additiv bzw. addiere
Ap	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
ccc	covalently closed circle
Cm	Chloramphenicol
CNPAB	Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologica, Rio de Janeiro, Brazil
const.	konstant
d	Desoxy
dd	Didesoxy
Dig	Digoxigenin
Dig-11-dUTP	Digoxigenin-11-Desoxyuridintriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endkonz.	Endkonzentration
<i>et al.</i>	et altera; und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	Guanosin
Gm	Gentamicin
h	hour; Stunde
inkub.	inkubieren
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Km	Kanamycin
log.	logarithmisch
M	Molar

ABKÜRZUNGEN

mA	Milliampere
mcs	multiple cloning site
min	Minute
mod.	modifiziert
mV	Millivolt
NBT	Nitrobluetetrazolium
nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphate
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame; offenes Leseraster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
pfu	plaque forming units
R	Resistenz
RBS	ribosome binding site
resusp.	resuspendieren
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	second; Sekunde
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Trisborat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
u	unit
u. a.	und andere
ü.N.	über Nacht
UAS	upstream activator sequence
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen zu Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht zu Volumen

A. Zusammenfassung

Das *glnB*-Gen, das ein Signaltransduktionsprotein P_{II} kodiert, wurde in dem in einer endophytischen Assoziation in Zuckerrohr lebenden diazotrophen Bakterium *Acetobacter diazotrophicus* über PCR mit degenerierten *glnB*-Primern, die von bekannten *glnB*-Nukleotidsequenzen abgeleitet wurden, identifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden kloniert und über Sequenzierung charakterisiert. Interessanterweise zeigte die Sequenzierung, dass zwei verschiedene gleich große zu dem *glnB*-Gen homologe Amplifikate unterschiedlicher Sequenz auftreten, die auf DNA- bzw. Proteinebene zu 70% bzw. 64% identisch sind. Eine Phagen-Genbank von *A. diazotrophicus* Gesamt-DNA wurde konstruiert und mit den klonierten PCR-Amplifikaten als Sonden gescreent. Die Sequenzanalyse zeigte, dass das *glnB*-Gen mit dem *glnA* und das *glnB*-Homolog *glnK*₁ mit dem *amtB*₁-Gen geclustert vorliegt. Diese Genanordnung ist charakteristisch für die Proteobakterien α -Gruppe, zu der auch *A. diazotrophicus* gehört. Durch Southern Hybridisierung der Gesamt-DNA von *A. diazotrophicus* gegen ein *glnK*₁*amtB*₁-Fragment als Sonde wurde ein drittes *glnB*-homologes Gen, *glnK*₂, das wie das *glnK*₁-Gen benachbart zu einem *amtB*-homologen Gen liegt, isoliert. Damit ist *A. diazotrophicus* das erste Mitglied der α -Gruppe der Proteobakterien, in dem drei Kopien des *glnB*-homologen Gens beschrieben sind.

Restriktionsfragmente, die die vollständigen Regionen der *glnB*-Homologen und diesen Genen benachbarten ORFs tragen, wurden aus der Phagen-Genbank isoliert und sequenziert. Insgesamt wurden drei Fragmente - *glnBglnA* (4 kb, auf dem Plasmid pOP26), *glnK*₁*amtB*₁ (2,5 kb, auf dem Plasmid pOP7) und *glnK*₂*amtB*₂ (3,2 kb, auf dem Plasmid pOP80) - sequenziert. Alle drei *glnB*-homologen Gene kodieren 112 AS lange Regulatorproteine, die in unterschiedliche Regulationskaskaden des Energie- und Stickstoff-Metabolismus und auch der Stickstofffixierung involviert sein können. Das abgeleitete Genprodukt des *glnA*-Gens zeigt hohe Übereinstimmungen mit den Glutamin-Synthetasen anderer Organismen. Die Gene *amtB*₁ und *amtB*₂ kodieren für Transportproteine der Amt/Mep-Familie (Ammoniumtransporter).

Durch eine Interposonmutagenese konnten *glnB*-, *glnK*₁-, *amtB*₁-Mutanten und *glnBglnK*₁-Doppelmutanten erzeugt werden, welche die physiologische Rolle der entsprechenden Genprodukte in *A. diazotrophicus* klären sollten. Inaktivierung des *glnA*-Gens scheint letal zu sein und das Gen könnte essentiell in diesem Organismus sein.

Alle Mutanten sind weiterhin in der Lage, Luftstickstoff zu fixieren. Die Acetylen-Reduktions-Messung zeigte aber die Nitrogenase-Aktivität in Gegenwart von 20 mM NH₄⁺ in *glnB*- und *glnBglnK*₁-Mutanten. Das P_{II}-Protein (*glnB*-Genprodukt) könnte also in die Regulation der Expression der *nif*-Gene wahrscheinlich über die Kontrolle der Expression oder Aktivität des Transkriptionsaktivators der *nif*-Gene (das NifA-Protein) involviert sein. Die *glnK*₁-Mutante zeigt keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp Pal5 in Bezug auf die N₂-Fixierung.

Eine *in vitro* Uridylylierung der P_{II}-Proteine mit radioaktiv-markierten [α ³²P]-UTP zeigte ein Signal in *glnBglN*K₁-Doppelmutanten und bestätigte damit, dass mindestens GlnK2-Protein, das in diesen Mutanten vorhanden ist, in *A. diazotrophicus* durch Uridylylierung an einem Tyrosinrest-51 modifiziert wird.

Die Messung der Aufnahme des radioaktiv-markierten Ammonium-Analogons [¹⁴C]-Methylammoniums zeigte, dass die Aufnahme der radioaktiven Substanz in der *amtB*₁-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zwar reduziert ist, dass das AmtB1 aber nicht das einzige Protein ist, das Methylammonium transportiert. Das daraufhin isolierte *amtB*₂-Gen, dessen abgeleitetes Genprodukt den Ammoniumtransportern ähnlich ist, könnte also ebenfalls einen Methylammoniumtransporter kodieren, der mit *amtB*₁ zusammen wirkt.

B. Einleitung

B. 1 Biologische Stickstofffixierung und Stickstoff-Assimilation

Anorganischer Stickstoff als Bestandteil von Nukleotiden, Aminosäuren, Proteinen und anderen zellulären Verbindungen ist ein essentielles Element für alle lebende Organismen. Seine Verfügbarkeit ist einer der kritischen Faktoren, die den Ertrag der Nutzpflanzen beeinflussen. Pflanzen können anorganischen Stickstoff in der Form von Nitrat- und Ammonium-Ionen assimilieren, alle anderen höheren Organismen sind auf die Zufuhr organischer Stickstoffverbindungen angewiesen. Stickstoffgas aus der Atmosphäre, die zu 78% aus N_2 besteht und das größte Reservoir an Stickstoff bildet, ist nur für einige Prokaryonten - **diazotrophe Mikroorganismen** - nutzbar. Diese Reduzierung des atmosphärischen Stickstoffs zu Ammonium, NH_4^+ , die von Mikroorganismen durchgeführt wird, wird als **BNF** - biologische Stickstofffixierung (*engl.* : biological nitrogen fixation) - bezeichnet.

Die Stickstofffixierung und die Prozesse der Nitrifikation und Denitrifikation, die ebenfalls von Bakterien durchgeführt werden, bilden einen Teil des biogeochemischen Stickstoffkreislaufs der Erde, in dessen Aufrechterhaltung den diazotrophen Mikroorganismen eine wichtige Rolle zukommt. Die Phylogenie der bekannten Stickstofffixierenden Mikroorganismen, die Beschreibung neuer Isolate und neuere Methoden zur Untersuchung der taxonomischen Identität und Ökologie der Bakterien (Gillis *et al.*, 1989; Hurek & Reinhold-Hurek, 1995; Kirchof *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 1994; Sievers *et al.*, 1994 u. a.) zeigen eine große Biodiversität und die Fähigkeit diazotropher Organismen, sich extremen Bedingungen anzupassen und verschiedenste ökologische Nischen zu besiedeln.

Die stickstofffixierenden Mikroorganismen sind als freilebende (z. B., *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus*, u. a.), assoziative bzw. endophytische (z. B. *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Azoarcus* sp., *Acetobacter diazotrophicus*) und symbiotische (z. B. *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*) Organismen bekannt und sind in allen taxonomischen Hauptgruppen der Eubakterien anzutreffen.

Pflanzen und Tiere können von dem Prozess der Stickstofffixierung entweder indirekt (nach dem Tod und der Mineralisierung diazotropher Organismen) oder direkt (assoziativ mit diesen Organismen) profitieren. Ein wichtiger Aspekt von agrar-ökonomischer Bedeutung ist die Assoziation (bzw. Symbiose) einiger diazotropher Mikroorganismen mit wirtschaftlich wichtigen Pflanzen. In diesen Pflanzen-Bakterien-Interaktionen wird Stickstoff zum größten Teil aus der atmosphärischen Umgebung der biologischen Systeme für die Lebenserhaltung verwendet. Ein Gegenstand intensiver Untersuchungen ist insbesondere die Rhizobien-Leguminosen-Symbiose. Hier erfolgt nach Besiedlung der Pflanzen durch Bakterien der Familie der *Rhizobiaceae* im Wurzelbereich eine Bildung von Knöllchen, in denen die Bakterien N_2 als Endosymbionten in nährstoffreichem Milieu unter mikroaeroben

Bedingungen fixieren. Diese Bakterien-Pflanzen-Interaktion ist hochspezifisch und die Übertragbarkeit dieses Systems auf ökonomisch relevante Pflanzen, außerhalb der Leguminosen, ist problematisch.

Alternativ zur Rhizobien-Leguminosen-Symbiose sind Assoziationen von Mikroorganismen mit der Rhizosphäre der Pflanzen durch Bakterien der Gattung *Azospirillum* von großem wissenschaftlichen Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass diese assoziativen Bakterien nicht nur zur Stickstofffixierung fähig sind, sondern die Pflanzen auch mit Phytohormonen versorgen, die an der Stimulation des Wurzelwachstums beteiligt sind, was zur Ertragserhöhung führt (Costacurta & Vanderleyden, 1995; Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993; Leinhos & Vacek, 1994).

Die Gräser (Poaceae) bilden im Gegensatz zu Leguminosen keine Knöllchen oder ähnliche Strukturen. Es wurden jedoch diazotrophe Bakterien aus dem Pflanzengewebe isoliert. Am Beispiel des Zuckerrohrs (*Saccharum officinarum*) wurde gezeigt, dass diese Pflanzen lange Zeit (über viele Jahre und Generationen) mit relativ niedrigen Zugaben an Stickstoff überleben und bis zu 70% des Stickstoffs aus der Atmosphäre beziehen, was auf eine assoziative BNF zurückgeführt wird (Boddey *et al.*, 1991; Döbereiner, 1961; Lima *et al.*, 1987; Urquiaga *et al.*, 1992). Neben Bakterien der Gattungen *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Erwinia*, die am häufigsten aus der Rhizosphäre der Zuckerrohrpflanzen isoliert wurden, wurde eine neue Bakterienspezies, *Acetobacter diazotrophicus*, isoliert und charakterisiert, die zum größten Teil für die assoziative BNF verantwortlich zu sein scheint (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989). Aufgrund einiger physiologischer Eigenschaften, die im weiteren beschrieben werden, ist dieser Organismus von großem Interesse als neues Modellsystem der Bakterien-Pflanzen-Interaktion.

B. 2 Eigenschaften der Gene und deren Genprodukte, die an der Stickstofffixierung, Stickstoff-Assimilation und Stickstoff-abhängigen Regulation beteiligt sind

Bakterien können eine Vielzahl der Stickstoffverbindungen (von anorganischen Komponenten wie N_2 oder Nitraten bis komplexen organischen Verbindungen wie Aminosäuren) als einzige Stickstoffquelle verwenden. Die $N\equiv N$ -Bindung, die zur Dissoziation 930 kJ/mol benötigt, ist sehr widerstandsfähig gegen chemische Angriffe. Daher erfordert die biologische Stickstofffixierung ein komplexes Enzymsystem - den Nitrogenasekomplex. Er ist hoch konserviert bei allen bisher untersuchten diazotrophen Mikroorganismen unabhängig von deren systematischer Stellung. Für eine aktive Nitrogenase wird die Expression von mehr als 20 Genen benötigt (Fischer, 1994; Gussin *et al.*, 1986). Diese Gene werden *nif*-Gene genannt und sind genetisch in sogenannten „*nif*-Cluster“ organisiert.

B. EINLEITUNG

Endprodukt der Nitrogenasereaktion ist NH_3 , welches in seiner protonierten Form mit Hilfe der Enzyme Glutamin-Synthetase, L-Glutamatdehydrogenase und L-Alanindehydrogenase in biosynthetische Prozesse eingebracht wird.

Aufgrund des sehr hohen energetischen Potentials, das diazotrophe Bakterien zur Stickstofffixierung aufbringen müssen, wird ein sehr feiner und effektiver Sensor-Mechanismus benötigt, um die *nif*-Gene zu regulieren.

Welche Gene sind an diesem Prozess beteiligt, wie wird das Signal über den Ammonium-Status der Zelle wahrgenommen und weitergeleitet und welche Mechanismen der Ammonium-Assimilation werden angeschaltet?

Die bekannten an diesen Prozessen beteiligten Gene und deren Funktionen sind in der Tabelle 1 aufgeführt und die Mechanismen der Regulation der BNF und des Stickstoff-Metabolismus werden in weiterem besprochen. Die grundlegenden Kenntnisse über die Stickstoff-abhängige Regulation von Expression und metabolischer Aktivität dieser Enzyme stammen aus Arbeiten mit den Enterobakterien *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* und *Salmonella typhimurium* (Merrick & Edwards, 1995).

Tab. 1. Gene aus verschiedenen Mikroorganismen, die an den Prozessen der Stickstofffixierung, Stickstoff-Metabolismus und Stickstoff-Regulation beteiligt sind.

Gen	Genprodukt/ Funktion
<i>nifHDK</i>	Nitrogenasekomplex, Strukturgene
<i>nifA</i>	NifA, Transkriptionsaktivator der <i>nif</i> -Gene
<i>rpoN, ntrA</i>	σ^{54} , Sigmafaktor für die Transkription von N-abhängigen Promotoren
<i>glnA</i>	Glutamin-Synthetase, Strukturgen
<i>glnB</i>	P_{II} , Signlatransduktionprotein
<i>glnK</i>	GlnK, P_{II} -Paralog, Signaltransduktionprotein
<i>glnZ</i>	P_Z , GlnK-Homolog
<i>ntrC</i>	NtrC, Transkriptionsregulator
<i>ntrB</i>	NtrB, Phosphokinase des Zweikomponenten-Regulationssystems
<i>nifL</i>	NifL, Regulator der NifA-Aktivität; O_2 und NH_4^+ -abhängig; nur in γ -Gruppe der Proteobakterien
<i>glnD</i>	UTase/UR, N-Status-abhängige Modifizierung des P_{II} -Proteins
<i>glnE</i>	ATase, Regulierung der GS-Aktivität
<i>gltDB</i>	Glutamat-Synthase, Strukturgene
<i>amtB</i>	Ammoniumtransporter
<i>draT</i>	Dinitrogenase-Reduktase Ribosyltransferase, Repression der Nitrogenase-Aktivität
<i>draG</i>	Dinitrogenase-Reduktase aktivierende Glykohydrolase

B.2.1 Der Nitrogenase-Enzymkomplex

Der Nitrogenasekomplex katalysiert die Reduktion des molekularen Stickstoffs. Diese Reaktion ist energetisch höchst aufwendig: für jedes reduzierte N_2 werden mindestens 16 ATP hydrolysiert (Peters *et al.*, 1995).



Das konventionelle Nitrogenasesystem besteht aus zwei Proteinkomponenten, die zu den Eisen-Schwefel Proteinen gehören: einem Eisen-Protein (Fe-Protein) und einem Molybdän-Eisen-Protein (MoFe-Protein) (Abb. 1). Das Fe-Protein, das von *nifH* kodiert wird, ist ein

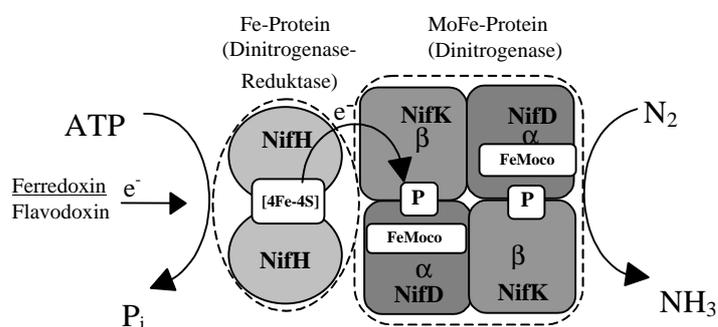


Abb. 1. Nitrogenase-Enzymkomplex. P – P-Cluster; FeMoco – FeMo-Kofaktor.

Homodimer ($M_r \sim 60$ kDa) mit zwei Bindestellen für MgATP und einem [4Fe-4S]-Cluster. Das MoFe-Protein ist ein Heterotetramer $\alpha_2\beta_2$ ($M_r \sim 240$ kDa), deren α -Untereinheiten und β -Untereinheiten von *nifD* bzw. von *nifK* kodiert werden. Diese Proteinkomponente des Nitrogenasekomplexes enthält je

zwei Metallcluster: die P-Cluster [8Fe-7S] und FeMo-Kofaktoren (FeMoco) (Georgiadis, 1992; Kim & Rees, 1992). Alle Reaktionen der Substratreduktion, die durch die Nitrogenase katalysiert werden, benötigen die Assoziation der beiden Proteine in einen Komplex, wobei die Elektronen vom Fe-Protein auf das MoFe-Protein unter MgATP-Hydrolyse und weiter auf den FeMoco, an den die Substrate binden und reduziert werden, übertragen werden (Rees *et al.*, 1998). Die Bindung des MgATP am Eisen-Protein ruft eine Änderung der Konformation hervor, so dass es für dieses Protein möglich wird, an das Molybdän-Eisen-Protein andocken. Diese Konformationsänderung geht mit dem bislang nicht eindeutig aufgeklärten Mechanismus des Elektrontransfers ($1e^-$ pro 2 ATP) vom [4Fe-4S]-Cluster des Fe-Proteins zum P-Cluster des MoFe-Proteins einher und ist vermutlich für die Dissoziation des Proteinkomplexes nach dem Elektrontransfer verantwortlich (Seefeldt *et al.*, 1998).

B.2.1.1 Aktivierung der Transkription der *nif*-Gene

Die BNF ist ein energie-aufwendiger Prozess und daher haben diazotrophe Organismen im Laufe der Evolution eine Vielfalt an Mechanismen entwickelt, die Nitrogenase transkriptional und posttranslational präzise zu kontrollieren. Die Aktivierung der Transkription dieser Gene ist allen bislang untersuchten diazotrophen Organismen gemeinsam und wird von der RNA-Polymerase, die den alternativen Sigma-Faktor σ^{54} (σ^N) enthält, initiiert (Merrick & Edwards,

1995). Weiterhin ist ein spezifischer Aktivator der Transkription für die Gene der Stickstofffixierung, das NifA-Protein, erforderlich.

a) Der Transkriptionsaktivator NifA

Der Transkriptionsaktivator NifA bindet an die DNA an spezifische UAS (engl.: upstream activator sequences) mit der Konsensussequenz TGT-N₁₀-ACA etwa 80 - 100 bp oberhalb der Startstelle der Transkription (Buck *et al.*, 1987; Buck *et al.*, 2000; Buck *et al.*, 1986) und

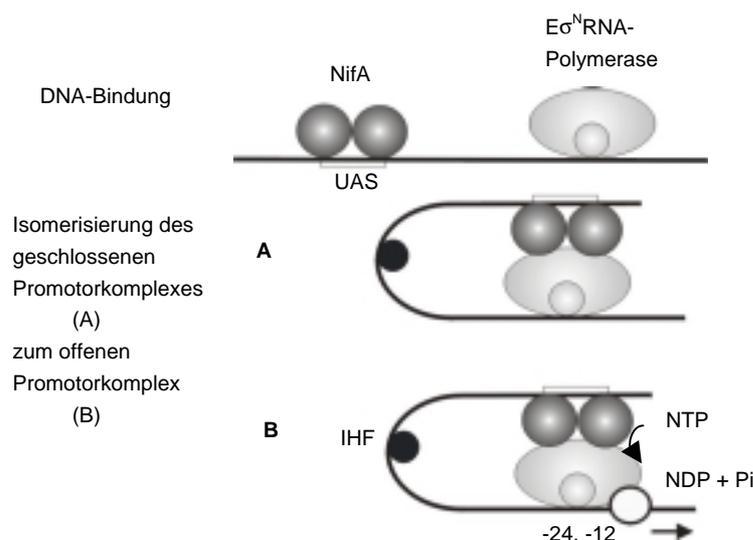


Abb. 2. Modell für die Aktivierung der Transkription durch das NifA-Protein von σ^{54} -abhängigen Promotoren (mod. nach Dixon, 1998).

kommt durch eine Loop-Bildung der DNA in Kontakt mit der RNA-Polymerase. Diese Formation wird durch den IHF (engl.: integration host factor) stimuliert. Dabei katalysiert das NifA-Protein den Übergang des geschlossenen Promotor-Komplexes in einen offenen Promotor-Komplex (Abb. 2). Unter Hydrolyse von an die konservierte Zentral-domäne des NifA gebundenem ATP erfolgt die Initiation der Transkription der *nif*-Gene (Berger *et al.*, 1994; Dixon, 1998; Wang *et al.*, 1997).

Die N-terminale Domäne des NifA-Proteins übernimmt wahrscheinlich regulatorische Funktionen und der C-Terminus des NifA-Proteins besitzt ein hoch konserviertes Helix-turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung. Der N-Terminus ist über einen Glutamin-reichen Q-Linker mit der Zentraldomäne verbunden (Abb. 3).

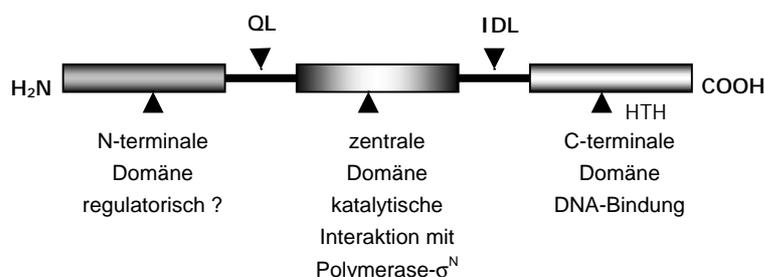


Abb.3. Aufbau des NifA-Proteins (mod. nach Fischer (1994) und Dixon (1998). QL - Q-Linker, IDL - Interdomänenlinker, HTH - Helix-Turn-Helix Motiv.

Die DNA-bindende C-terminale Domäne ist bei den Vertretern der γ -Subgruppe der Proteobakterien *Azotobacter vinelandii* und *Klebsiella pneumoniae* entweder direkt mit der

Zentraldomäne oder aber, typisch für alle O₂-sensitiven NifA-Proteine (z. B. in der α -Subgruppe der Proteobakterien), über einen Cystein-reichen Interdomänenlinker verbunden (Fischer, 1994; Merrick, 1992; Morett *et al.*, 1988).

Das NifA-Protein aktiviert außer den *nif*-Genen das *glnII*-Gen der Glutaminsynthetase II (Martin & Chelm, 1988) und die *groESL*-Gene für Chaperone (Fischer *et al.*, 1993) in *Bradyrhizobium japonicum*, in *Rhizobium meliloti* - *mos*-Gene (Gene für die Synthese der Opine-ähnlichen Komponente) und *nfe*-Gene (auf den Plasmiden kodierte Gene für die erhöhte Effizienz der Nodulation) (Fischer, 1994). In *Bradyrhizobium japonicum* führte ein Screening des sogenannten symbiotischen Chromosombereichs auf Gene, die von NifA kontrolliert werden, zur Identifizierung von drei neuen Genen *nrgA*, *nrgB* und *nrgC* (*nrg* – engl.: NifA-regulated gene), deren physiologische Rolle gegenwärtig untersucht wird (Nienaber *et al.*, 2000).

Das NifA-Protein selbst wird auf transkriptionaler und posttranslationaler Ebene reguliert. Die NifA-Regulation unterliegt in verschiedenen Bakterienspezies unterschiedlichen Mechanismen. Die Regulation in freilebenden Bakterien wird vom NH₄⁺- und O₂-Gehalt beeinflusst, während in symbiotisch lebenden Bakterien in der Pflanze die Regulation überwiegend durch den Sauerstoffgehalt kontrolliert wird (Ditta *et al.*, 1987). Die Regulation der *nifA*-Expression kann Sauerstoff-reguliert über das FixLJ-FixK-System (Agron *et al.*, 1993) und Ammonium-reguliert über das NtrBC-System (Merrick & Edwards, 1995) oder NtrXY-System (Pawlowski *et al.*, 1991) erfolgen. In *Bradyrhizobium japonicum* unterliegt die *nifA*-Expression zudem der Regulation über ein weiteres Zweikomponenten-System RegSR (Bauer *et al.*, 1998). Das Umweltsignal, das von der Sensor kinase RegS gemessen wird, ist jedoch noch unbekannt.

Die Aktivität des NifA-Proteins wird posttranslational Ammonium-abhängig über Protein-Protein-Interaktionen mit dem NifL-Protein (in *Klebsiella pneumoniae*) (Austin *et al.*, 1990; Austin *et al.*, 1994), mit dem P_{II} (in *Azospirillum brasilense*) (Arsene *et al.*, 1996) oder vermutlich mit dem GlnK (in *Klebsiella pneumoniae*) (Jack *et al.*, 1999) reguliert.

b) Der alternative Sigma-Faktor σ^{54}

Die meisten untersuchten *nif*-Promotoren haben eine charakteristische Konsensussequenz TGGCAC-N₅-TTGC^A/T, in der die konservierten GG und GC 24 bzw. 12 bp entfernt oberhalb des Transkriptionsstarts lokalisiert sind (Morett & Buck, 1989). Derartige Promotoren benötigen einen σ^{54} -Faktor. Der Sigma-Faktor σ^{54} (σ^N) mit M_r ~54 kDa wird vom *rpoN* (*ntrA*)-Gen kodiert und wurde in mehr als 20 Organismen beschrieben. σ^{54} wird nicht nur für die Expression der Gene des Stickstoff-Metabolismus wie *glnA* und die *nif*-Gene sondern auch anderer Gene mit unterschiedlichen Funktionen, z. B. *hyc*, *hup* - Biosynthese der Hydrogenase, *psp* - Phagen-Schockprotein, *xylCAB*, *xylS* - Xylenkatabolismus, *hrp* - Pflanzen-Pathogenität u. a., benötigt (Merrick, 1993). RpoN selbst unterliegt in der Regel keiner Stickstoff-Regulation mit der Ausnahme von *Rhodobacter capsulatus*, wo die

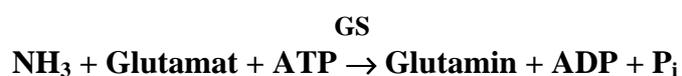
Expression dieses Gens auf Transkriptionsebene Stickstoff-abhängig reguliert wird (Cullen *et al.*, 1994). Da das σ^N -Holoenzym nicht in der Lage ist, ohne ein Aktivatorprotein einen geschlossenen Promotorkomplex in einen offenen Promotorkomplex umzuwandeln, sind σ^N -abhängige Promotoren immer Gegenstand einer positiven Transkriptionsregulation (Cannon *et al.*, 1995; Merrick, 1993).

B.2.1.2 Posttranslationale Regulation der Nitrogenase-Aktivität

Ammonium-Zugabe (auch die Zugabe einiger Aminosäuren und von Nitrat) reprimiert die Stickstofffixierung in Bakterienkulturen. Die Repression der Nitrogenase-Aktivität wird in einigen Bakterien über die Inaktivierung des Enzyms durch posttranslationale Modifikation erreicht. Die Inaktivierung des Nitrogenasekomplexes in *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* und *Azospirillum* spp. wird über die ADP-Ribosylierung des Arg101-Restes an einer der zwei Untereinheiten des Fe-Proteins reguliert, katalysiert von Produkt des *draT*-Gens (DraT - engl.: dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase). Demgegenüber wird die ADP-Ribose vom Fe-Protein (durch DraG - von *draG*-Gen kodiert, engl.: dinitrogenase reductase activating glycohydrolase) entfernt, wenn Ammonium wieder limitierender Faktor des Wachstums wird (Burriss *et al.*, 1991; Pierrard *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995a; Zhang *et al.*, 1996).

B.2.2 Stickstoff-Assimilation in diazotrophen Bakterien

In diazotrophen Mikroorganismen wird während der Stickstofffixierung produziertes Ammonium in den durch die Glutamin-Synthetase (GS) und Glutamat-Synthase (GOGAT - (Glutamin:2-Oxoglutarat Aminotransferase) katalysierten Reaktionen assimiliert (Merrick & Edwards, 1995). Die Glutamin-Synthetase katalysiert die Synthese von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak, das unter diazotrophen Bedingungen produziert wird:



Die Glutamat-Synthase katalysiert den Transfer der Aminogruppe von L-Glutamin auf das C(2)-Atom des 2-Ketoglutarats, wobei zwei L-Glutamat-Moleküle entstehen:



Der GS/GOGAT-Weg der Ammonium-Assimilation ist besonders wichtig für Stickstofffixierende Organismen, da sie auf die Produktion der Aminosäuren durch Aminotransferasen, wo Glutamat und Glutamin als wichtigste Donoren dienen, angewiesen sind.

Während außer der fundamentalen Rolle der Glutamat-Synthase in stickstofffixierenden Organismen wenig über die Mechanismen der Regulation der Genexpression und der

Aktivität (soweit diese Regulation überhaupt vorhanden ist) dieses Enzyms bekannt ist (Vanoni & Curti, 1999), wurde die GS in allen untersuchten Mikroorganismen gefunden und die Regulation der Glutamin-Synthetase in diazotrophen Bakterien wird gegenwärtig untersucht (Merrick & Edwards, 1995; Vanoni & Curti, 1999; Eisenberg *et al.*, 2000).

B.2.2.1 Regulation der Glutamin-Synthetase

Das *glnA*-Gen, das für die GS kodiert, wurde aus vielen Prokaryonten kloniert und zeigte hohe Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz (Merrick & Edwards, 1995). Diese am weitesten verbreitete Form der Glutamin-Synthetase ist ein Dodecamer identischer Untereinheiten mit einem jeweiligen Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Die 12 Untereinheiten sind in zwei hexagonalen, parallelen Ringen angeordnet, die zum größten Teil durch hydrophobe Wechselwirkungen, aber auch durch Wasserstoffbrücken, zusammengehalten werden (Yamashita *et al.*, 1989). Die aktiven Zentren liegen auf den Oberflächen zwischen Untereinheiten im gleichen Ring (Almassy *et al.*, 1986). In Enterobacteriaceae kommt nur diese Form der Glutamin-Synthetase vor. Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass viele Organismen mehrere Formen dieses Enzyms besitzen. Eine zweite Glutamin-Synthetase (GSII, *glnII*-Genprodukt) wurde in *Rhizobium leguminosarum* (Patriarca *et al.*, 1992), *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Streptomyces* spp. und *Frankia* spp. identifiziert (Merrick & Edwards, 1995). Zusätzliche GS (*glnT*-Genprodukt) wurde in *Rhizobium leguminosarum* (Chiurazzi *et al.*, 1992) und *Sinorhizobium meliloti* (de Bruijn *et al.*, 1989) beschrieben. Aufgrund der Bedeutung des von der Glutamin-Synthetase produzierten Glutamins unterliegt die Glutamin-Synthetase einer strengen zellulären Kontrolle. Das Regulationssystem dieses Enzyms stellt eine klassische zyklische Kaskade der Signal-Transduktion dar und ist am besten in *Escherichia coli* untersucht. Die Aktivität dieses Enzyms ist auf verschiedenen Ebenen reguliert: durch Feedback-Hemmung durch Stickstoff-Metabolite, über reversible kovalente Modifikation und schließlich wird das Strukturgen für Glutamin-Synthetase - *glnA* - auf Transkriptionsebene reguliert. Alle diese regulatorischen Mechanismen führen zusammen dazu, dass die Glutamin-Synthetase-Aktivität präzise kontrolliert wird und ihre Aktivität und Menge schnell an die wechselnden Umweltsignale angepasst werden kann.

Unterschiedliche Metabolite - Alanin, Glycin, Histidin, Tryptophan, Serin, CTP, AMP, Carbomoylphosphat und Glucosamin-6-Phosphat - inhibieren die Aktivität der Glutamin-Synthetase über kumulative Feedback-Hemmung (Purich, 1998).

Die Glutamin-Synthetase kann posttranslational modifiziert werden entweder durch Adenylylierung (Enterobacteriaceae, *Vibrio alginolyticus*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces coelicolor* (Merrick & Edwards, 1995) oder ADP-Ribosylierung (*Rhodospirillum rubrum*, *Streptomyces griseus*, *Synechocystis* sp. (Merrick & Edwards, 1995). Am besten ist die Regulation der Glutamin-Synthetase in *Escherichia coli*

untersucht und das Modell dieser Regulation wird im weiteren beschrieben.

Die Bakterienzellen koordinieren die Assimilation von Kohlenstoff und Stickstoff unter anderem durch posttranslationale Modifikation von GS durch Adenylylierung. In *Escherichia coli* sind Kohlenstoff- und Stickstoff-Status der Zellen antagonistisch wirkende Signale, die die Aktivität der GS kontrollieren. Wenn eine gute Kohlenstoffquelle vorhanden ist, resultiert Stickstoffmangel in einer hohen intrazellulären Konzentration der aktiven, deadenylylierten GS, während unter Bedingungen, wenn Stickstoff im Überschuss angeboten wird, die intrazelluläre Konzentration der Glutamin-Synthetase niedrig ist, und das Enzym adenylyliert vorliegt. Sobald die C-Quelle ein limitierender Faktor ist, wird die GS nicht aktiviert, wenn

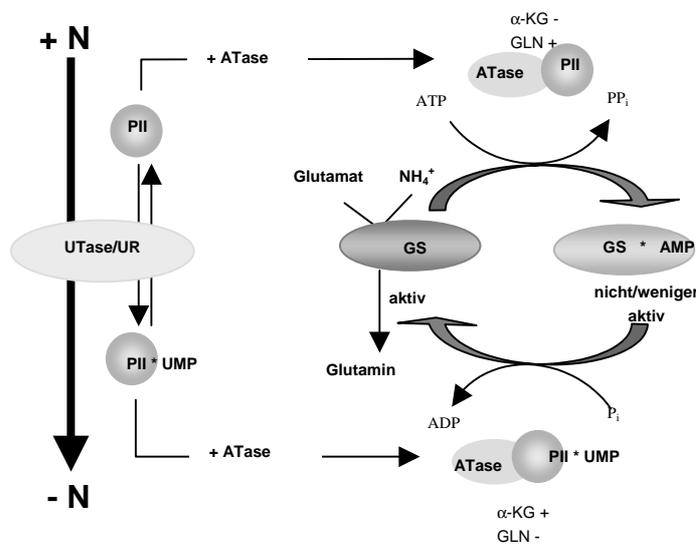


Abb. 4. Die Regulation der Glutamin-Synthetase am Beispiel *E. coli*. UTase - Uridylyltransferase/Uridylylremoving-Enzym; ATase - Adenylyltransferase. +N - Überschuss des gebundenen Stickstoffs, -N - Ammonium-Mangel. α -KG - α -Ketoglutarat, GLN - Glutamin. "+" und "-" zeigen stimulierende bzw. inhibierende Wirkung für die entsprechende Reaktion.

man aber diese Zellen in Bedingungen mit C-Überschuss transferiert, wird die Glutamin-Synthetase sogar ohne Änderungen im N-Status der Zelle aktiviert (Jiang *et al.*, 1998c). Die posttranslationale Modifikation der GS schließt zwei bifunktionelle Enzyme - eine ATase (Adenylyltransferase, *glnE*-Genprodukt) und eine UTase (Uridylyltransferase/Uridylylremoving-Enzym, *glnD*-Genprodukt) - sowie das P_{II}-Signaltransduktionsprotein (*glnB*-Genprodukt) ein. Die bzyklische Kaskade der GS-Modifikation besteht aus Adenylylierung/Deadenylylierung der GS, katalysiert durch die ATase, und Uridylylierung/Deuridylylierung des P_{II}-Proteins, katalysiert von der UTase (Abb. 4).

Unter hohen Konzentrationen gebundenen Stickstoffs katalysiert die ATase die kovalente Bindung von AMP über eine Phosphodiesterbindung an die Hydroxylgruppe eines spezifischen Tyrosinrestes (in *E. coli* Tyr³⁹⁸) (Rhee *et al.*, 1985a, b; Rhee *et al.*, 1989) jeder Untereinheit der Glutamin-Synthetase, wobei der Adenylylierungsgrad des Enzyms 0-12 AMP betragen kann und die Glutamin-Synthetase in unterschiedlich adenylylierten Formen in der Zelle vorkommen kann, wobei die voll adenylylierte Form der Glutamin-Synthetase weniger aktiv ist und einer stärkeren Endproduktthemmung unterliegt als die nicht adenylylierte (Shapiro & Stadtman, 1970). Die ATase katalysiert auch die Reaktion, in der die AMP-Gruppe wieder vom adenylylierten Enzym durch Phosphorolyse abgespalten wird. Die Aktivität der bifunktionellen ATase wird durch das Regulatorprotein P_{II} moduliert, das selbst ebenfalls posttranslational modifiziert wird.

Unter Stickstoff-Mangel Bedingungen katalysiert die UTase die Anlagerung von Uridinmonophosphat an einen spezifischen Tyrosinrest des P_{II}-Proteins und seine uridylylierte Form katalysiert zusammen mit der ATase die Deadenylylierung der Glutamin-Synthetase. Die hydrolytische Aktivität der UTase führt zur Abspaltung der UMP-Einheiten vom P_{II}-UMP, wenn hohe Stickstoff-Konzentrationen vorhanden sind. Somit reguliert P_{II} zusammen mit der ATase die Adenylylierung der GS.

Die wichtigsten Stimuli, die mit der Modifikation der Glutamin-Synthetase korrelieren, sind die Mengenverhältnisse von Glutamin und 2-Ketoglutarat, deren zelluläres Verhältnis von der Ammonium-Konzentration abhängig ist und den Adenylylierungsgrad bzw. die Aktivität der Glutamin-Synthetase bestimmt (Engleman & Francis, 1978; Rhee *et al.*, 1985a, b).

Die Adenylylierungsreaktion benötigt also das P_{II}-Protein, wird von Glutamin stimuliert und durch α -Ketoglutarat gehemmt. Die Aktivierung der Glutamin-Synthetase wird durch α -Ketoglutarat, ATP und P_{II}-UMP stimuliert und durch Glutamin inhibiert (Engleman & Francis, 1978).

In *Rhodospirillum rubrum* (sowie in einigen anderen Bakterien, s. oben) kann die Glutamin-Synthetase sowohl adenylyliert als auch ADP-ribosyliert werden. Der ADP-Ribosylierung konnte bisher keine signifikante physiologische Rolle zugeschrieben werden (Woehle *et al.*, 1990; Merrick & Edwards, 1995).

Die Expression des Strukturgens der Glutamin-Synthetase (*glnA*) ist ein Gegenstand der Stickstoff-abhängigen Regulation und unterliegt der Kontrolle des globalen Ntr-Systems (s. unten).

B. 3 Regulatorische Rolle der P_{II}-Proteine in der Ntr-Kontrolle

B.3.1 Das globale Ntr-System und die Funktionen des P_{II}-Proteins

Das globale Ntr-System umfaßt das P_{II}-Protein, die UTase (Genprodukte der Gene *glnB* und *glnD*) und das Zweikomponenten-System NtrBC, kodiert durch die Gene *ntrB* und *ntrC* (Merrick & Edwards, 1995). Das Ntr-System reguliert die Synthese und Aktivität der am Stickstoff-Metabolismus beteiligten Proteine im Hinblick auf die zur Verfügung stehenden Substrate.

Besonderes Interesse verdient die Untersuchung der Rolle von P_{II}-Proteinen, welche wichtige Funktionen bei der Regulation des Stickstoff-Metabolismus in den Proteobakterien übernehmen (Abb. 5). Das bifunktionelle Enzym Uridylyltransferase (UTase/UR, s. B.3.3, S. 17) ist ein Sensor des intrazellulären N-Status (Glutamins), welches das P_{II}-Protein bei limitierenden Glutamin-Konzentrationen modifiziert (uridylyliert). UTase/UR-Enzym deuridylyliert P_{II} bei hohen Konzentrationen gebundenen Stickstoffs. Über eine Interaktion mit der Adenylyltransferase (ATase) reguliert das P_{II}-Protein die GS-Aktivität (s. B.2.2.1).

besitzen, aber in ihrer Beweglichkeit beeinträchtigt sind, was auf einen Defekt in der Kontrolle des globalen Energie-Metabolismus zurückzuführen scheint (de Zamaroczy *et al.*, 1996).

Im Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 wird das P_{II}-Protein (*glnB*-Genprodukt) im Unterschied zu Proteobakterien nicht uridyliert, sondern an einem Serinrest phosphoryliert und koordiniert damit den C- und N-Metabolismus in diesem Organismus, da die CO₂-Fixierungsrate die Phosphorylierung des P_{II} beeinflusst. *glnB*-Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp in Bezug auf die Kontrolle des Stickstoffmetabolismus. Sie sind beeinträchtigt in der Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen (z. B. zur Licht-Intensität) und sind in der Methylammonium-Aufnahme gestört (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995a; b).

Untersuchungen der Expression des *glnB* und *glnB*-homologen Gens *glnK* in Ribulose 1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO)-Mutanten in *Rhodobacter sphaeroides* haben gezeigt, dass keine Expression der *glnB::lacZ*-Fusion in RubisCO-Mutanten nachgewiesen werden konnte. RubisCO-Mutanten sind in der Funktionalität des CBB (Calvin-Benson-Bassham)-Stoffwechselwegs (CO₂-Fixierung) gestört. Dabei erfolgte eine Dereprimierung der Nitrogenase-Aktivität. Die konstitutive Expression des *glnB*-Gens von einem σ^{70} -abhängigen Promotor sowie eine Ammonium-abhängige Regulation der Nitrogenase-Aktivität konnten wiederhergestellt werden, wenn die Gene für den funktionalen CBB-Stoffwechselweg (Plasmid-kodiert) eingeführt wurden. Die Abwesenheit des P_{II}-Proteins zusammen mit der Deregulierung der Nitrogenase spricht für eine Rolle des P_{II}-Proteins als negativer Regulator der *nif*-Expression in *Rhodobacter sphaeroides* und für die Verbindung zwischen Kohlenstoff-Metabolismus und Stickstoff-Metabolismus durch Regulation der P_{II}-Expression. Die Expression des *glnK*-Gens in RubisCO-Mutanten war ebenfalls nicht mehr Ammonium-abhängig (Qian & Tabita, 1998).

Im Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 ist eine Mutation in *glnB* letal. Eine letale Mutation konnte auch in *glnK*-Gen des γ -Proteobakterium *Azotobacter vinelandii* (kein *glnB*-Gen wurde in diesem Organismus nachgewiesen) gezeigt werden, was bedeutet, dass die Genprodukte der *glnB*-homologen Gene essentiell für das Wachstum in diesem Organismen sind (Hanson *et al.*, 1998; Meletzus *et al.*, 1998).

B.3.2 Eigenschaften des P_{II}-Proteins

Das P_{II}-Protein ist ein Signaltransduktionsprotein, das die Transkription und die Aktivität der Glutamin-Synthetase reguliert. Ursprünglich wurden 2 Regulatorproteine für die Glutamin-Synthetase beschrieben - P_I und P_{II} (Brown *et al.*, 1971). Das P_I-Protein (*glnE*-Genprodukt) wurde Adenylyltransferase (ATase) genannt. Röntgenstrukturanalysen des P_{II}-Proteins von *Escherichia coli* haben gezeigt, daß es sich um ein Trimer mit M_r ~ 12,4 kD (Molekulargewicht des Monomers) handelt (de Mel *et al.*, 1994). P_{II} wird an dem Tyrosinrest-51 posttranslational modifiziert (uridyliert) (Rhee *et al.*, 1985b; Son & Rhee, 1987). Das aus 112 Aminosäuren bestehende Monomer enthält 6 β -Faltblatt-Strukturen und 2 α -Helices.

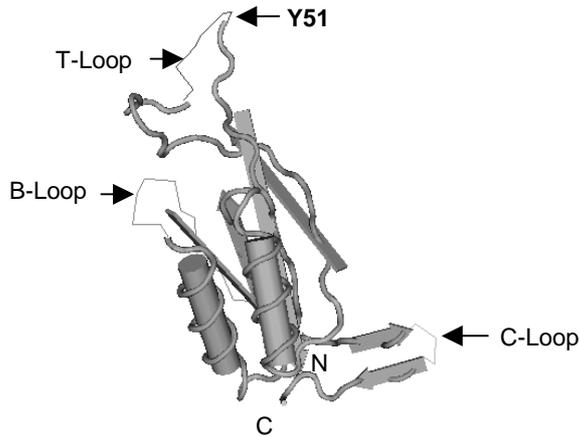


Abb. 6. P_{II}-Protein aus *E. coli*. Die Proteinstruktur wurde bei NCBI-Server erhalten und mit dem Programm Cn3D v.3.0 angezeigt (nach (Cheah *et al.*, 1994). Y51 - die Uridylierungsstelle des PII-Proteins. T-, B- und C-Loops sind gezeigt.

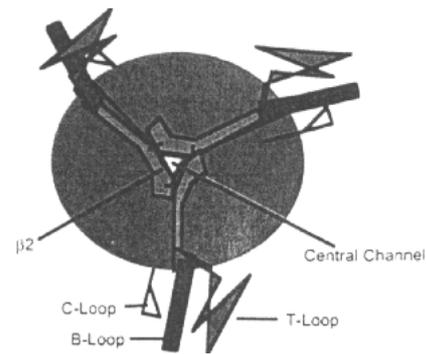


Abb. 7. P_{II}-Trimer. $\beta 2$ stabilisiert die Struktur. B-, C-, T-Loop und Zentralkanal sind abgebildet (Jiang *et al.*, 1997).

Jedes Monomer enthält 3 Loops: die B-, T- und C-Loops (Abb.6, 7). Der T-Loop wird von den Aminosäuren 37-55 gebildet und enthält die konservierten Tyrosinreste - Y46 und Y51. Die Modifikationsstelle ist Y51 (Abb. 6), während Y46 eine Rolle bei der Bindung des Uridyltransferase spielt (Jaggi *et al.*, 1996). P_{II} bindet die Effektormoleküle α -Ketoglutarat, Glutamat und ATP (Kamberov *et al.*, 1995) und interagiert mit mindestens 3 bifunktionellen Proteinen - der Uridyltransferase/Uridylremoving Enzym (UTase), der Adenylyltransferase (ATase) und der Kinase/Phosphatase NtrB (de Mel *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1997), sowie dem Transkriptionsaktivator NifA (Arsene *et al.*, 1996).

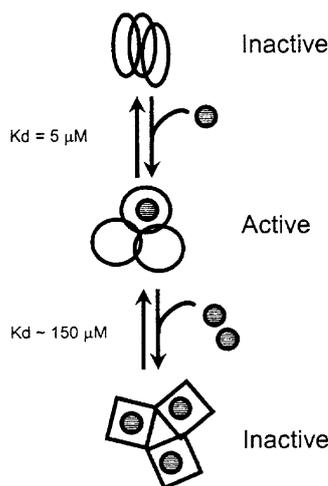


Abb. 8. Regulation der P_{II}-Aktivität durch α -Ketoglutarat (Jiang & Ninfa, 1999)

Die Fähigkeit des P_{II}-Proteins, die Kinase/Phosphatase-Aktivitäten des NtrB zu regulieren, befindet sich unter der allosterischen Kontrolle des Effektormoleküls α -Ketoglutarat, das an P_{II}-Protein bindet. Das P_{II}-Protein kann wahrscheinlich in drei verschiedenen Konformationen vorliegen, die von der Zahl der gebundenen α -Ketoglutarat-Moleküle abhängig sind (Abb. 8). Das erste an P_{II}-Protein gebundene α -Ketoglutarat-Molekül bringt das P_{II} in eine sehr aktive Form, die an NtrB-Protein binden kann und damit die Phosphatase-Aktivität des NtrB aktiviert und die Kinase-Aktivität inhibiert (Jiang & Ninfa, 1999; Kamberov *et al.*, 1995). Die anderen zwei α -Ketoglutarat-Bindestellen an P_{II} können nur bei hohen Effektor-Konzentrationen (>100 μ M) besetzt werden. In dieser Form erfolgt nur eine schwache Bindung des P_{II}-Proteins an NtrB oder die Adenylyltransferase (Jiang *et al.*, 1998b; c). Aus diesem Mechanismus folgt, dass in Abwesenheit von Ammonium die Konzentration

des α -Ketoglutarats in der Zelle hoch genug ist, um P_{II} zu inaktivieren (keine Bindung an NtrB) und NtrB-Phosphatase-Aktivität zu inhibieren. Das ermöglicht dem Responseregulator NtrC in seiner aktiven phosphorylierten Form, die Transkription zu aktivieren. Die oben beschriebenen Modelle und Hypothesen der Regulation durch das P_{II} -Protein basieren auf *in vitro* rekonstituierten Systemen aus *E. coli*. (Jiang & Ninfa, 1999; Jiang *et al.*, 1998b; Kamberov *et al.*, 1995).

Gegenwärtig sind die Sequenzen von 44 P_{II} -homologen Proteinen bekannt. Zwei konservierte Bereiche sind für P_{II} -Proteine charakteristisch. Der erste Bereich umfasst den B-Loop und die flankierende Region (AXTGXIGDGKIF, die am stärksten konservierte Region an Position ~81-92 ist unterstrichen). Die zweite konservierte Region befindet sich im T-Loop und schließt die Uridylierungsstelle des P_{II} -Proteins in *E. coli* ein (YRGAEY, an Position ~46-51) (Ninfa & Atkinson, 2000).

Vielen Organismen scheint das Vorkommen von GlnB-Paralogen GlnK/GlnZ gemeinsam zu sein. Die Tertiärstruktur der GlnB und GlnK-Proteine aus *E. coli* sind sehr ähnlich, die Unterschiede liegen in der Konformation von T-Loop und im C-Terminus (Xu *et al.*, 1998). Die Unterschiede in Aminosäuren des T-Loops könnten die Struktur oder die Funktion des T-Loops, der für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist und die Stelle der Modifikation beinhaltet, beeinflussen. Die beiden Proteine sind in der Zelle gleichzeitig vorhanden, was zu der Frage über die physiologische Bedeutung der einzelnen Proteine führt. Wie das P_{II} -Protein, kann auch GlnK/ P_Z posttranslational modifiziert (uridyliert) werden und in die Regulation der Glutamin-Synthetase oder Stickstofffixierung involviert sein (de Zamaroczy, 1998; Jack *et al.*, 1999; Michel-Reydellet & Kaminski, 1999; Arcondeguy *et al.*, 1999).

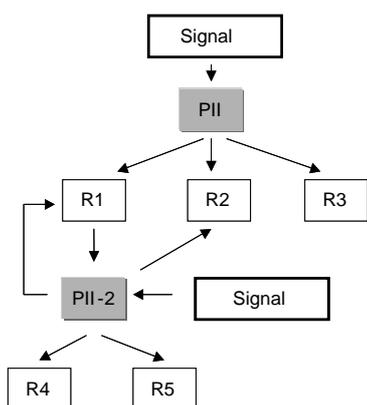


Abb. 9. Rolle der P_{II} -Proteine in der Signaltransduktion der verschiedenen Stoffwechselwege (nach Ninfa & Atkinson (2000)). R1-R5 – P_{II} - bzw. P_{II} -2-regulierte Enzyme. Signal – kleine Effektormoleküle, die die P_{II} -Aktivität kontrollieren. P_{II} -Protein kontrolliert R1, R2 und R3; P_{II} -2 kontrolliert R1, R2, R4 und R5. R1 reguliert den Transkriptionsaktivator des P_{II} -2 Strukturgens.

Zusammenfassend sind P_{II} -Proteine an der Signaltransduktion in verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt. In der Abbildung 9 ist die Rolle zweier paraloger P_{II} -Proteine aus verschiedenen untersuchten Organismen schematisch dargestellt. P_{II} -Proteine stehen unter Kontrolle unterschiedlicher intrazellulären Stimuli, welche über Effektormoleküle die Aktivität der P_{II} -Proteine kontrollieren und Konformationsänderungen hervorrufen. Die P_{II} -regulierten Enzyme aktivieren bzw. inhibieren dann die Transkription oder die Aktivität der metabolischen Enzyme.

B.3.3 Eigenschaften der Uridylyltransferase GlnD, die das P_{II}-Protein posttranslational modifiziert

Die Uridylyltransferase (UTase/UR) ist das Genprodukt des *glnD*-Gens. In *E. coli* wird *glnD* als einzelnes Transkript gebildet und seine konstitutive, vom σ^{54} -Faktor unabhängige Expression wird nicht über den Stickstoffstatus der Zelle reguliert (van Heeswijk *et al.*, 1992; van Heeswijk *et al.*, 1993,), obwohl die Regulation der Expression bislang ungeklärt ist. Das GlnD ist ein Protein mit M_r ca. 100 kD (Garcia & Rhee, 1983) und seine Funktion besteht in der Modifizierung des P_{II}-Proteins in Abhängigkeit des N-Status der Zelle.

In *Azotobacter vinelandii* kodiert das *nfrX* (*glnD*)-Gen ein 105 kD großes Protein (Contreras *et al.*, 1991). Das Gen *nfrX* wurde über Tn5-Transposonmutagenese als Nif-Mutante isoliert (Santero *et al.*, 1988). Der Wildtyp-Phänotyp wird wiederhergestellt in *nfrXnifL*-Doppelmutanten, was zu der Frage führt, ob das GlnD-Protein die NifL-abhängige Regulation von NifA, vermittelt durch das P_{II}-Protein, beeinflusst (Contreras *et al.*, 1991).

GlnD-Nullmutanten haben in *Klebsiella pneumoniae* einen Ntr⁻, Nif⁻ Phänotyp. Die UTase ist hier für die Expression der unter der Ntr-Kontrolle stehenden Promotoren (*glnAp2*, *pnifL*) notwendig, aber nicht an der NifL-spezifischen Antwort auf der N-Status der Zelle beteiligt. Wird *nifL* konstitutiv exprimiert (in *glnB*, *ntrB*-Mutanten) (Holtel & Merrick, 1989), erfolgt wie im Wildtyp eine Reprimierung der Stickstofffixierung, damit kann NifL immer noch auf den N-Status der Zelle reagieren. Die Expression von allen getesteten *nif*-Promotoren und die Ammonium-abhängige Reprimierung der Stickstofffixierung wurde auch in *glnD*, *glnB*, *ntrB*-Mutanten beobachtet und bestätigt, dass die NifL-Aktivität nicht von der UTase abhängig ist. Es wurde postuliert, dass der Uridylylierungsgrad des P_{II}-Proteins durch das von Uridylyltransferase gemessene Mengen-Verhältnis Glutamin:2-Ketoglutarat reguliert wird. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass wahrscheinlich nur Glutamin als allosterischer Regulator für die UTase, sowie für Adenylyltransferase GlnE, dient und beide Reaktionen - Modifikation und Demodifikation des P_{II}-Proteins - am gleichen aktiven Zentrum des Enzyms stattfinden (Jiang *et al.*, 1998a).

B.3.4 Die Rolle der P_{II}-Proteine in der Ammonium-abhängigen Regulation der N₂-Fixierung in Proteobakterien

Die Genprodukte der Gene *glnB* und *glnD* als Bestandteil der Ammoniumsensing-Kaskade in Enterobakterien spielen eine zentrale Rolle für den Stickstoff-Metabolismus. Diese Proteine können auch eine signifikante Funktion bei der Regulation der NifA-Synthese oder -Aktivität übernehmen bzw. andere Prozesse in diazotrophen Organismen, die in Abhängigkeit von Stickstoff reguliert werden, direkt oder indirekt beeinflussen.

Ammonium-Zugabe zu diazotroph-wachsenden Bakterienkulturen führt zur Inhibierung der Stickstofffixierung. Ammonium kann entweder die Nitrogenase-Aktivität und -Synthese oder nur die Synthese des Nitrogenase-Enzymkomplexes reprimieren. (Rudnick *et al.*, 1997). Der

Mechanismus der Repression und Regulation durch Ammonium ist am besten in den Proteobakterien, die in vier Subgruppen (α , β , γ , δ/ϵ) unterteilt sind, untersucht. Die Rolle der P_{II}-Proteine in der Stickstofffixierung oder -Metabolismus ist in der Tabelle 2 (S. 20) zusammengefasst.

Vertreter der **α -Gruppe** der Proteobakterien sind z. B. die photosynthetischen Genera *Rhodospirillum* und *Rhodobacter*, die Leguminosen-Symbionten der *Rhizobiaceae*, die Rhizosphäre-assoziierten *Azospirillum* spp. und endophytisch in zuckerhaltigen Pflanzen vorkommenden *Acetobacter diazotrophicus*.

In Rhizobiaceen beeinflusst die Ammoniumkonzentration nicht nur die Stickstofffixierung in den Bakterien, sondern auch z. B. die Fähigkeit zur Nodulation der Wirtspflanze (Dusha *et al.*, 1989; Dusha & Kondorosi, 1993). Symbiontische Defekte, die von *nod*- oder EPS-Mutanten in *Sinorhizobium meliloti* verursacht werden (intensive Wurzelhaar-Deformierungen, Stärke-Ausscheidung) sind vergleichbar mit Defekten von *glnB*-Nullmutanten oder Mutanten, in denen P_{II}-Protein nicht uridylyliert werden kann (Arcondeguy *et al.*, 1997; Debelle *et al.*, 1986; Niehaus *et al.*, 1993). Das P_{II}-UMP (die modifizierte Form des *glnB*-Genproduktes) ist daher möglicherweise für die Ausbildung und den normalen Verlauf der symbiontischen Wechselwirkungen, einschließlich der Infektion der Pflanze, notwendig. Damit verknüpft das P_{II}-Protein die Pflanzen-Infektion mit der Regulation des Stickstoff-Metabolismus (z. B. Ntr-System-abhängige Expression der Gene *glnA* und *glnII*). Zusätzlich wird postuliert, dass das P_{II}-Protein in *Sinorhizobium meliloti* an der Regulation der Expression von Ammoniumtransport-Proteinen (B.4, S. 21) in den Bakteroiden beteiligt ist, welche für die funktionelle symbiontische Stickstofffixierung notwendig sind (Patriarca *et al.*, 1998). Für alle untersuchten Organismen der α -Subgruppe ist charakteristisch, dass das *glnB*-Gen direkt benachbart dem *glnA*-Gen liegt und meistens von einem σ^{54} -abhängigen Promotor transkribiert wird. Die relevanten Phänotypen der Mutanten und die speziesspezifischen Mechanismen der Ammonium-abhängigen Regulation variieren jedoch in den Gattungen dieser taxonomischen Gruppe (Tab. 2, S. 20).

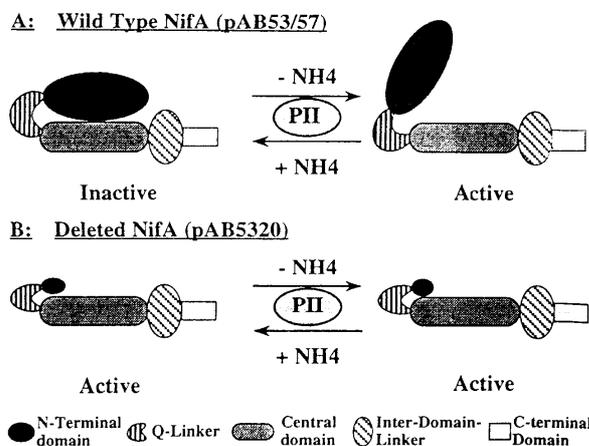


Abb.10. Modell der Ammonium-abhängigen Regulation der NifA-Aktivität in *A. brasilense* (Arsene *et al.*, 1996).

In *Azospirillum brasilense* wird das *nifA*-Gen in *glnB*-Mutanten sogar in ammoniumhaltigen Medium exprimiert, aber eine Expression der vom NifA-Transkriptionsaktivator-abhängigen *nif*-Gene findet nicht statt. Daher liegt nahe, dass die Aktivität des NifA-Proteins Ammonium-abhängig reguliert wird (Abb.10).

Da in *Azospirillum brasilense* wie in anderen Organismen der proteobakteriellen α -Gruppe keine NifL-ähnlichen

Proteine (s. unten) identifiziert werden konnten, es ist zu vermuten, daß ein anderer Signal-Transduktor den Ammonium-Status der Zelle mißt und NifA-Aktivität reguliert. In diesem Organismus wurde schließlich gezeigt, dass der Nif-Phänotyp der *glnB*-Mutante in den Deletionsmutanten von NifA, denen die N-terminale Domäne fehlt, aufgehoben wird. Somit ist das P_{II}-Protein für eine Überführung des NifA-Proteins in eine aktive Form unter Ammoniummangel-Bedingungen notwendig (über eine Interaktion mit der N-terminalen Domäne des NifA-Proteins (Abb. 10) (Arsene *et al.*, 1996).

In *glnB**glnK*-Doppelmutanten von *Azorhizobium caulinodans* ist die Nitrogenase sogar in Gegenwart von bis zu 10 mM Ammonium aktiv. Die Proteine P_{II} und GlnK könnten in diesem Organismus eine wichtige Rolle bei der Ammonium-abhängigen Regulation der Nitrogenase-Aktivität spielen (Michel-Reydellet & Kaminski, 1999).

β-Gruppe. Einer der diazotrophen Vertreter dieser Gruppe ist *Herbaspirillum seropedicae*, das aus tropischen und subtropischen monocotylen Pflanzen isoliert wurde (Ureta *et al.*, 1995). Das NifA-Protein in *H. seropedicae* wird in Gegenwart von hohen Konzentrationen von Ammonium inaktiviert, wobei die nicht konservierte N-terminale Domäne des Proteins für diese Funktion verantwortlich zu sein scheint. Zudem wird die NifA-Expression Ammonium-abhängig reguliert. Ob das P_{II}-Protein hier eine Rolle spielt (wie z. B. in *Azospirillum brasilense*) ist bislang unbekannt (Benelli *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 1995).

Interessanterweise besitzt ein Vertreter dieser Gruppe *Azoarcus* sp. BH72 3 Kopien des P_{II}-Proteins. Die Funktion dieser Proteine wird gegenwärtig untersucht (Martin & Reinhold-Hurek, 1998).

γ-Gruppe. Für diese Gruppe ist das Vorkommen des *nifL*-Gens charakteristisch, dessen Genprodukt ein Inhibitor der Aktivität des Transkriptionsaktivators NifA ist. Durch die Wechselwirkung des Repressorproteins NifL mit dem NifA wird die Konformation des NifA-Proteins verändert, so dass es nicht mehr an die UAS der suszeptiblen Promotoren binden kann (Austin *et al.*, 1994).

In *Klebsiella pneumoniae* scheint das GlnK-Protein direkt oder indirekt an der NifL-abhängigen Regulation des NifA-Proteins beteiligt zu sein. Die Ammonium-abhängige Inhibierung der NifA-Aktivität durch das NifL-Protein könnte über eine Interaktion zwischen GlnK und der N-terminalen Domäne des NifA-Proteins reguliert werden. Unter Ammonium-Mangel würde eine Interaktion des GlnK-Proteins mit dem NifA den Inhibitor-Effekt des NifL-Proteins verhindern, unter der Voraussetzung, dass das GlnK-Protein Ammonium-abhängig reguliert und/oder transkribiert wird (Jack *et al.*, 1999).

In *Azotobacter vinelandii* wurde nur ein P_{II}-Protein charakterisiert und bisher ist unbekannt, ob das Protein an der Ammonium-abhängigen Regulation des NifA-Proteins durch das NifL beteiligt ist (Meletzus *et al.*, 1998; Rudnick *et al.*, 1997).

Tab. 2. *glnB(glnK/glnZ)*-Gene und phänotypische Charakterisierung derer Genprodukte in diazotrophen Proteobakterien.

Organismus/Subgruppe	P _{II} -homologe Proteine	Relevante Phänotypen der Mutanten bzw. Funktion der P _{II} oder P _Z /GlnK-Proteine	Regulation der <i>nifA</i> -Expression oder <i>NifA</i> -Aktivität	Referenz
<i>Azospirillum brasilense</i> α	2	<i>glnB</i> : Nif ⁻ ; gestört in Beweglichkeit; <i>glnB glnZ</i> : schwaches Wachstum P _{II} and P _Z sind nicht notwendig für GS-Modifikation	P _{II}	Arsene <i>et al.</i> , 1996; de Zamaroczy, 1998
<i>Rhodospirillum rubrum</i> α	2	Δ <i>glnB</i> : Nif ⁻	P _{II} ?	Zhang <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhodobacter capsulatus</i> α	2	<i>glnB</i> : <i>nifA/nifAIF</i> <i>glnB glnK</i> : Nitrogenase-Aktivität bei hohen NH ₄ ⁺ -Konzentrationen	?	Paschen, 1997; Drepper, pers. Mitt.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> α	1	<i>glnB</i> : Nif ⁻ ; notwendig für die NirC-abhängige Expression von <i>glnII</i> (freilebend); unfähig zur normalen Pflanzeninfektion; beteiligt an der Regulation des Ammoniumtransportes	?	Arcondeguy <i>et al.</i> , 1997
<i>Azorhizobium caulinodans</i> α	2	<i>glnB glnK</i> : Ammonium-Ausscheidung; Nitrogenase-Aktivität bei 10 mM NH ₄ ⁺ ; <i>nifA</i> -Expression bei 15 mM NH ₄ ⁺ <i>glnB</i> : Fix ⁻ <i>glnK</i> : Fix ⁺ P _{II} and GlnK notwendig für vollständige GS-Deadenylylierung	?	Michel-Reydellet & Kaminski, 1999
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> β	2	<i>glnB</i> : Nif ⁻	P _{II} ?	Benelli <i>et al.</i> , 1997; Souza <i>et al.</i> , 1999
<i>Azoarcus</i> sp. BH72 β	3	<i>glnB</i> und <i>glnK</i> sind an der Regulation der NH ₄ ⁺ - und Nitrat-Assimilation beteiligt; wahrscheinlich an der posttranslationalen Modifikation der Nitrogenase über Ammonium-, switch-off*	?	Karg & Reinhold-Hurek, 1996; Martin <i>et al.</i> , 2000; Martin, pers. Mitt.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> γ	2	<i>glnB</i> : Nif ⁻ P _{II} ist an der Expression von <i>nifLA</i> -Promotor beteiligt GlnK ist an der Regulation der <i>NifA</i> -Aktivität beteiligt	GlnK	Holtel & Merrick, 1988; Jack <i>et al.</i> , 1999
<i>Azotobacter vinelandii</i> γ	1	<i>glnK</i> : letal	?	Meletzus <i>et al.</i> , 1998

B. 4 Ammonium-Aufnahme und Ammonium-Transport

In Bakterien wurde das Genprodukt des *amtB*-Gens aufgrund Homologien zu entsprechenden Transportern in Hefe (z. B. MEP - Methylammonium/Ammonium Permease - in *Saccharomyces cerevisiae*) (Marini *et al.*, 1994) und Pflanzen (Ninnemann *et al.*, 1994) als Ammoniumtransporter identifiziert. Das *amtB*-Gen kodiert in Bakterien für ein Membranprotein mit $M_r \sim 54$ kD mit 11 - 12 Transmembrandomänen und wird für die Aufnahme von $\text{NH}_4^+/\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ (Ammonium/Methylammonium) benötigt (Siewe *et al.*, 1996; Tate *et al.*, 1998; van Heeswijk *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass kleine ungeladene Ammoniak-Moleküle durch die Membran diffundieren können, während für geladene NH_4^+ -Moleküle ein aktives Transportsystem benötigt wird (Ninnemann *et al.*, 1994). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* das AmtB-Protein seine Funktion im Reimport ungeladener NH_3 -Moleküle hat und für das bakterielle Wachstum unter niedrigen NH_3 -Konzentrationen benötigt wird (Soupene *et al.*, 1998). Die Rolle und die Regulation der bakteriellen AmtB-Proteine wird gegenwärtig untersucht. Zudem besitzen einige Bakterien mehrere Kopien von *amt*-Genen (Thomas *et al.*, 2000a).

In *Azospirillum brasilense* wird das *amtB*-Gen im Unterschied zu den meisten Bakterien nicht zusammen mit *glnB* oder *glnK* transkribiert und liegt nicht mit diesen Genen benachbart. Es ist das bislang einzige charakterisierte Gen dieses Organismus, dessen Transkription NtrC-abhängig ist (Van Dommelen *et al.*, 1998).

AmtB-Mutanten in *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998), *Corynebacterium glutamicum* (Siewe *et al.*, 1996) und *Azospirillum brasilense* (Van Dommelen *et al.*, 1998) können kein [^{14}C]-Methylammonium aufnehmen.

Während freilebende Rhizobien Stickstoff entweder durch direkte Ammoniumaufnahme oder über die Nitratreduktion durch GS/GOGAT assimilieren, wird in den Bakteroiden N_2 zwar reduziert, gebildetes NH_4^+ aber wenig assimiliert, sodass die Wirtspflanzen davon profitieren können. Hierzu ist für die Symbiose notwendig, dass beide Prozesse - N_2 -Fixierung und -Assimilation - entkoppelt werden (Patriarca *et al.*, 1998). Die dabei angeschalteten regulatorischen Mechanismen für den Ammonium Transport werden gegenwärtig untersucht. Im Rahmen der symbiotischen Interaktion ist es notwendig, dass die durch die bakterielle Stickstofffixierung gebildeten Ammoniumkomponenten für die Wirtspflanzen zugänglich werden. Das Modell des Ammoniumtransportes von Bakteroiden zum Zytoplasma der Pflanzenzellen wurde von Udvardi & Day (1997) vorgeschlagen. Von der Nitrogenase in den Bakteroiden produziertes NH_3 diffundiert in PBS (Peribakteroidraum), wo NH_3 zu NH_4^+ protoniert wird. Diese NH_4^+ -Ionen würden dann in das Zytoplasma der Pflanzenzelle durch ein Kanal der PBM (Peribakteroidmembran) gelangen und schnell für die Aminosäuresynthese verwendet werden (Udvardi & Day, 1997; Howitt & Udvardi, 2000). Der Ammonium-Export ist von folgenden Bedingungen abhängig:

- niedrige Ammonium-Assimilations-Aktivität in Bakteroiden (z. B. GS-Aktivität);
- Anwesenheit von NH_3 und NH_4^+ im PBS;

- kein Ammoniumaufnahme-System in Bakteroiden;
- Ammonium Transport (AMT) in PBM;
- hohe Ammonium-Assimilationsrate im Zytoplasma der benachbarten Pflanzenzellen (Abb.11)

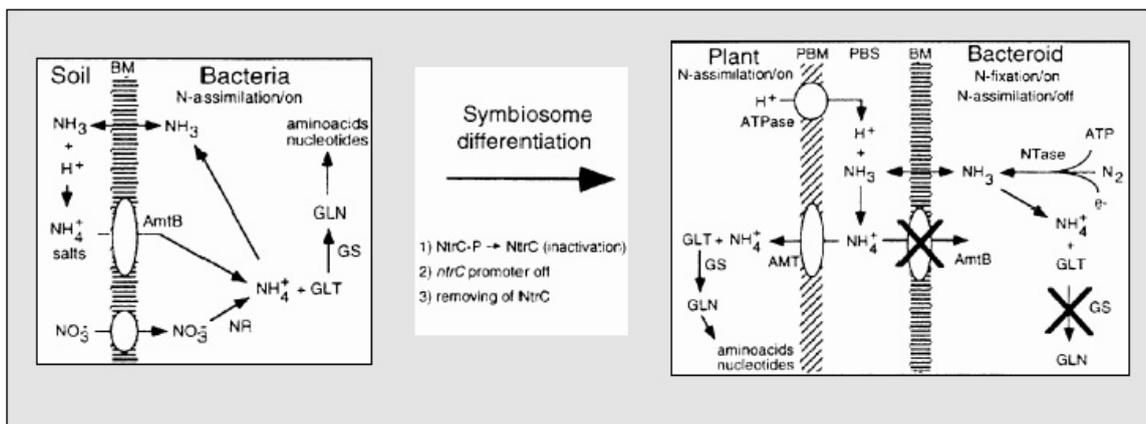


Abb.11. Das Modell des NH_4^+ -Transportes von N_2 -fixierenden Symbiosomen zum Zytoplasma der Pflanzenzelle. (Tate *et al.*, 1999). NTase - Nitrogenase, GLN - Glutamin, GLT - Glutamat, PBM – Peribakteroidmembran; PBS – Peribakteroidraum; GS - Glutamin-Synthetase.

In *Rhizobium etli* befindet sich das *glnKamtB*-Operon unter der NtrC-Kontrolle. Das Ntr-System jedoch ist in Knöllchen nicht aktiv (Tate *et al.*, 1998). Dieses bewirkt einen "switch-off" der NtrC-abhängigen Gene in Bakteroiden und damit keine Expression des Ammoniumtransporters und somit keinen Transport der NH_4^+ -Ionen aus dem PBS in die Bakterioide (Tate *et al.*, 1999).

Interessanterweise zeigen Pflanzen, die mit *Rhizobium meliloti glnB*-Mutanten infiziert wurden, starke N-Mangelsymptome trotz hoher Nitrogenase-Aktivität in den Knöllchen. Aufgrund dieses Nif^+Fix^- -Effekts könnte das P_{II} -Protein möglicherweise an der Regulation des Ammoniumtransporters, welcher für die funktionale Symbiose essentiell ist, beteiligt sein (Arcondeguy *et al.*, 1997).

B. 5 Das endophytische stickstofffixierende Bakterium *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*)

Aufgrund seiner Fähigkeit, Ethanol zu Essigsäure zu oxidieren, und diese dann zu Kohlendioxid und Wasser überzuoxidieren, seiner extremen Säuretoleranz bis zu pH 2,5 und seiner Anpassung an Lebensverhältnisse mit hohen Zuckerkonzentrationen wird *Acetobacter diazotrophicus* in die Familie der *Acetobacteraceae* eingeordnet (Swings, 1992).

A. diazotrophicus ist die einzige bekannte Art innerhalb dieser Familie, die zur Fixierung molekularen Stickstoffs befähigt ist (Gillis *et al.*, 1989). Die Familie der *Acetobacteraceae* wurde mittels 16S-rDNA-Analysen in die α -Subgruppe der Proteobakterien eingeordnet (Sievers *et al.*, 1994), zu der auch einige andere stickstofffixierende Bakteriengattungen

(*Rhizobiaceae*, *Rhodobacter* spp. und *Azospirillum* spp.) gehören. Dieser Mikroorganismus ist Gram⁻, stäbchenförmig, trägt 1-3 laterale Flagellen und besitzt einen respiratorischen Stoffwechsel (Gillis *et al.*, 1989). Ein optimales Wachstum des Bakteriums erfolgt bei ca. 28-30°C, einer Sucrosekonzentration von 10% und einem pH-Wert von 5,5. *A. diazotrophicus* toleriert Sucrosekonzentrationen bis 30% und pH-Werte von 2,5 - 7, und fixiert N₂ bei niedrigen pH-Werten (bis 2,5) (Stephan *et al.*, 1991), während bei den meisten Stickstofffixierern dieser Prozess bei niedrigen pH-Werten stark reduziert ist. *A. diazotrophicus* besitzt keine Nitratreduktase (Cavalcante & Döbereiner, 1988), was bedingt, dass die Stickstofffixierung dieses Bakteriums nicht vom Nitratgehalt des umgebenden Milieus beeinflusst wird. Sowohl von 20 mM (NH₄)₂SO₄ als auch einiger Aminosäuren (z. B. Glutamin, Glutamat, Methionin) wird die Nitrogenaseaktivität in *A. diazotrophicus* nur partiell inhibiert (Stephan *et al.*, 1991). Die extrazelluläre Glucoseoxidation stellt einen Schutzmechanismus für die sauerstoffempfindliche Nitrogenase dar und bedingt zudem, im Vergleich zu anderen diazotrophen Organismen, eine sehr hohe Osmotoleranz des Bakteriums (Stephan *et al.*, 1991; Flores-Encarnacion *et al.*, 1999).

Soweit bekannt, besiedelt *Acetobacter diazotrophicus* nicht das Zytoplasma der Pflanzenzelle, sondern den Apoplast der Pflanze (Dong *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1997) und es werden keine symbiosespezifischen Organellen (Symbiosomen), im Gegensatz zu Rhizobien in Knöllchen, ausgebildet. Aus diesem Grund wird *Acetobacter diazotrophicus* nicht als Endosymbiont bezeichnet (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998), obwohl alle Merkmale einer wirksamen Symbiose bei der Interaktion dieses Organismus mit der Wirtspflanze, wie die Zufuhr der Kohlenstoffquelle durch die Pflanzen, der Transfer von Aminokomponenten zurück zur Pflanze, eine kontrollierte O₂-Versorgung, damit die Stickstofffixierung von den Bakterien durchgeführt werden kann, vorhanden zu sein scheinen.

Acetobacter diazotrophicus wurde aus Blatt-, Stengel- und Wurzelgewebe des Zuckerrohrs (*Saccharum* spp.) isoliert (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993; Li & Macrae, 1991). Das Vorkommen des Bakteriums *Acetobacter diazotrophicus* ist nicht nur auf Zuckerrohr als Wirtspflanze beschränkt, sondern es wurden auch *Pennisetum purpureum* cv. cameroon (Döbereiner, 1992) und Kaffee (Jimenez Salgado *et al.*, 1997) als Wirtspflanzen für diesen Organismus beschrieben. Es ist möglich, dass weitere Pflanzenarten, wie z. B. Süßkartoffel (*Ipomoea batatas* L. Lam), Mohrenhirse (*Sorghum vulgare*) über Sporen des VAM (engl.: vesicular-arbuscular mycorrhizal)-Pilz *Glomus clarum* als Vektor infiziert werden (Paula *et al.*, 1991). Damit besitzt *Acetobacter diazotrophicus* das Potential, für weitere wirtschaftlich wichtige Pflanzen nutzbar gemacht zu werden.

B. 6 Gene der Stickstofffixierung in *Acetobacter diazotrophicus*

In *Acetobacter diazotrophicus* sind einige der an der Stickstofffixierung beteiligten Gene isoliert und molekularbiologisch charakterisiert worden. Die *nif*-Gene liegen in einem grossen *nif*-Cluster vor, der gute Übereinstimmungen zu dem *Azospirillum brasilense nif*-Cluster

aufweist (Lee *et al.*, 2000). Dieses Cluster wurde aus einer pLAFR3-Cosmidgenbank bzw. λ EMBL3-Phagengenbank durch Komplementation entsprechender *nif* und *ntr*-Mutanten von *Azotobacter vinelandii* oder über Hybridisierung mit *nif*-Proben aus anderen diazotrophen Bakterien isoliert. Die Sequenzanalyse hat gezeigt, dass das *nifA*-Gen stromaufwärts des *nifB*-Gens liegt und die beiden Gene in die gleiche Richtung aber von verschiedenen Promotoren transkribiert werden. Diese Gene sind ca. 2,5 kb stromaufwärts der Strukturgene der Nitrogenase *nifHDK* lokalisiert (Sevilla *et al.*, 1997). Die NifA-Expression in *A. diazotrophicus* wird durch Ammonium reguliert, während die Sauerstoff-Konzentration keinen Einfluss auf die Expression hat. *nifA::gusA*-Mutanten zeigen in Bakterien, die mit 20 mM Ammonium angezogen wurden, nur 5% der Expression im Vergleich zu der NifA-Expression mit 1 mM Ammonium im Anzuchtmedium (Teixeira *et al.*, 1999). Der Mechanismus der Ammonium-abhängigen Regulation der *nifA*-Expression ist noch unbekannt, keine für die Ammonium-abhängige Regulation typischen σ^{54} - oder NtrC-Bindungsstellen konnten stromaufwärts von *nifA*-Sequenz gefunden werden (Wülling, 1998). Ob Ammonium die Aktivität des NifA-Proteins in *A. diazotrophicus* beeinflusst, ist bisher auch unbekannt. Die NifA-Aktivität ist O₂-sensitiv. Die Sauerstoff-abhängige Regulation erfolgt wahrscheinlich durch ein Cystein-Motiv in der Interdomänen-Linker-Region des Proteins (Teixeira *et al.*, 1999). Die Cysteine dienen wahrscheinlich zur Messung des Redoxzustandes der Zellen, entweder durch Bindung eines Fe²⁺-Ions, dessen Oxidation zur Konformationsänderung und Inaktivierung führt, oder direkt über die Oxidation der Schwefelwasserstoffbrücken, die eine Änderung des Oligomerisationszustandes bewirken (Fischer, 1994). Diese Struktur ist charakteristisch für die α -Gruppe der Proteobakterien, wo keine NifL-ähnlichen Regulatorproteine gefunden wurden.

Die Gene *ntrBC* mit den hohen Übereinstimmungen zu anderen bakteriellen NtrBC-Zweikomponenten-Systemen sind in *A. diazotrophicus* in einem *nifR3-ntrBC*-Gencluster organisiert. Stromabwärts von *ntrC* liegen ORFs, die Homologie zu dem *ntrXY*-Operon zeigen, das für ein homologes Zweikomponenten-Regulationssystem in *Azorhizobium caulinodans* NtrXY kodiert (Baumgarth, 1999).

Ein ORF, der homolog zu dem an der Regulation der N₂-Fixierung in *Azorhizobium caulinodans* beteiligten Gen *nrfA* ist, wurde beschrieben (Baumgarth, 1999). Das NrfA-Protein hat einen Effekt auf die Stabilität oder Translation der *nifA*-mRNA (Kaminski *et al.*, 1994; Kaminski & Elmerich, 1998). Ein Einfluß des Genproduktes dieses Gens auf die N₂-Fixierung in *A. diazotrophicus* konnte aber nicht gezeigt werden (Baumgarth, 1999).

Über Komplementation einer *nfrX* (*glnD*⁻) Mutante von *Azotobacter vinelandii* mit einer Cosmid-Genbank aus *Acetobacter diazotrophicus* konnte das *glnD*-Gen isoliert und sequenziert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt hohe Homologien zu GlnD aus *Rhizobium tropici*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii* und *Klebsiella pneumoniae* (Nawroth, 1998). Das GlnD-Genprodukt ist ein Zentralprotein in der Ammoniumsensing-Kaskade (B.3, B.3.3, S. 12, 17). Eine Mutation in diesem Gen führt zu einem pleiotrophen

Phänotyp. Die Mutanten sind in vielen physiologischen Funktionen beeinträchtigt, sie sind z. B. nicht in der Lage, auf dem Minimalmedium mit Ammonium als Stickstoffquelle zu wachsen und die meisten Aminosäuren zu verwerten. Auf Vollmedium zeigt die *glnD*-Mutante eine Verlängerung der Generationszeit bis zu 19 Std. im Unterschied zum Wildtyp (ca. 3 Std.) (Meletzus, pers. Mitt.). Untersuchungen zu weiteren Regulatorproteinen in der Ammonium-Sensing und -Transduktions-Kaskade – den P_{II}-Proteinen – sind Gegenstand dieser Arbeit.

B. 7 Ziele der Arbeit

In dem stickstofffixierenden *Acetobacter diazotrophicus* ist wenig bekannt über die Mechanismen der Regulation des Stickstoff-Metabolismus und der N₂-Reduktion. Um zu klären, wie die *nif*-Gene, die für die Synthese und Aktivität der Nitrogenase notwendig sind, exprimiert und reguliert werden, sollte zunächst die Ammonium-Sensing-Kaskade charakterisiert werden, da in allen bislang untersuchten Organismen die intrazelluläre Stickstoffkonzentration ein entscheidender Faktor ist. Bekannte Proteine, die an Ammonium-Sensing und der nachfolgenden Signaltransduktion beteiligt sind, sind die Uridyltransferase/Uridylremoving-Enzym (*glnD*-Genprodukt) und das Regulatorprotein P_{II}, das von *glnB* kodiert wird.

- Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Fragen beantwortet werden, ob *Acetobacter diazotrophicus* ein oder mehrere P_{II}-Proteine besitzt und ob diese Proteine an der Regulation der Stickstofffixierung in diesem Organismus beteiligt sind.
- Es sollte zunächst das Schlüsselgen der Ammonium-Sensing Kaskade, das *glnB*-Gen, isoliert und sequenziert werden.
- Nach der molekularbiologischen Charakterisierung der *glnB*-Regionen sollten durch Insertion von Resistenzkassetten in diese Kodierbereiche auf Plasmiden in *E. coli* chromosomale Mutanten in *Acetobacter diazotrophicus* konstruiert und charakterisiert werden.
- Es ist möglich, dass das P_{II} Protein oder auch Genprodukte *glnB*-homologer Gene an der posttranslationalen Regulation der Nitrogenase-Aktivität beteiligt sind. Über Acetylen-Reduktions-Messungen in den Mutanten sollte die physiologische Rolle der *glnB*-Genprodukte in *A. diazotrophicus* im Bezug auf die mögliche Beteiligung an der Regulation der Nitrogenase mit dem Wildtypstamm Pal5 verglichen werden.
- In der P_{II}-Regulationskaskade in *E. coli* ist bekannt, daß dieses Protein an einem spezifischen Tyrosinrest, vom intrazellulären N-Status der Zelle abhängig, uridyliert wird. Ob das P_{II}-Protein in *A. diazotrophicus* in ähnlicher Weise modifiziert wird, sollte durch Experimente mit radioaktiv markierten Isotopen beantwortet werden.

C. Material und Methoden

I. Material

C. 1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp/relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lacF', [proAB⁺, laqI^l, lacZ ΔM15 Tn10 (Tc^R)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRA	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA, lac$	Lambda EMBL3/ <i>Bam</i> HI Vector Kit (Stratagene)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRA (P2)	XL1-Blue MRA (P2-Lysogen)	Lambda EMBL3/ <i>Bam</i> HI Vector Kit (Stratagene)
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA, endA, thi, hsdR17, supE44, relA, Δ(lac-proAB), gyrA, (F' traD, proAB, lacI^qΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> DH5α	$F' endA1 hsdR17 (r_k^- m_k^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 \Delta(lacIZYA-argF) U169 deoR (\phi 80dlac\Delta (lacZ)M15)$	Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA
<i>Escherichia coli</i> WM1090	<i>dam⁻, supE, hsd51, lacY</i>	Stammsammlung W. Messer, MPI, Berlin
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> Pal5	Wildtyp, Isolat aus Zuckerrohrwurzeln	CNPAB-Sammlung, ATCC 49037 (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis <i>et al.</i> , 1989)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI120	<i>glnB::Neomycin/Kanamycinresistenzgen aus pDM6, Km^R</i>	diese Arbeit
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI113	<i>amtB::gusAaphII, Km^R (α-Orientierung)</i>	diese Arbeit
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI116	<i>amtB::gusAaphII, Km^R (β-Orientierung)</i>	diese Arbeit
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI125	<i>glnK₁::gusAcat, Cm^R (α-Orientierung)</i>	diese Arbeit
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI126	<i>glnK₁::gusAcat, Cm^R (β-Orientierung)</i>	diese Arbeit
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI130	<i>glnB::Km, glnK₁::gusAcat, Km^R, Cm^R</i>	diese Arbeit
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI60	<i>glnD::aphII, Km^R</i>	Meletzus, nicht veröffentlicht
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> UBI17	<i>ntrC::gusAaphII, Km^R</i>	Meletzus, nicht veröffentlicht

C. 2 Plasmide

Plasmid	Genotyp/relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pSVB30	Ap ^R , <i>lacZ'</i>	Arnold & Pühler, 1988
pUC18	Ap ^R , <i>lacZ'</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19	Ap ^R , <i>lacZ'</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pWM4	<i>gusA</i> -Kassette (polar), Cm ^R Ap ^R	Metcalf & Wanner, 1993
pWM6	<i>gusAaph</i> -Kassette (apolar), Km ^R Ap ^R	Metcalf & Wanner, 1993
pAB2002	<i>lacZaacC1</i> -Kassette, Promotortest-Vektor, Gm ^R Ap ^R	Becker <i>et al.</i> , 1995
pDM6	Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen <i>aphII</i> des Transposons Tn5, Tc ^R Km ^R	Meletzus, 1988
pGEM3Z	Ap ^R	Promega
pSUP205	Cm ^R , Tc ^R , Mob, pBR325-Derivat	Simon <i>et al.</i> , 1986
pSUP401	Cm ^R , Km ^R , Mob, pACYC177-Derivat	Simon <i>et al.</i> , 1983
pOP42	pUC18::258 bp <i>glnB</i> -PCR-Fragment	diese Arbeit
pOP75	pUC18::258 bp <i>glnK₁</i> -PCR-Fragment	diese Arbeit
pOP30	pSVB30::2,3 kb <i>KpnI-glnBA</i> -Fragment (α -Orientierung)	diese Arbeit
pOP30-1	pOP30::Exonuklease III-Deletionsderivat <i>HindIII/XbaI</i> , Δ <i>glnA</i>	diese Arbeit
pOP29	pSVB30::2,3 kb <i>KpnI-glnBA</i> -Fragment (β -Orientierung)	diese Arbeit
pOP37	pSVB30::10 kb <i>EcoRI-glnB</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP26	pUC18::8kb- <i>BamHI-glnBA</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP12	pOP30::Neomycin/Kanamycinresistenzgen aus pDM6 in <i>BglII</i> -des <i>glnB</i> (α -Orientierung)	diese Arbeit
pOP16	pOP30::Neomycin/Kanamycinresistenzgen aus pDM6 in <i>BglII</i> des <i>glnB</i> (β -Orientierung)	diese Arbeit
pOP27	pOP30-1::3,7 kb <i>BamHI gusAcat</i> aus pWM4 in <i>BglII</i> des <i>glnB</i> -Gens, α -Orientierung, Cm ^R	diese Arbeit

C. MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Genotyp/relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pOP58	pOP30-1::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAcat</i> aus pWM4 in <i>Bgl</i> III des <i>glnB</i> -Gens, β -Orientierung, Cm ^R	diese Arbeit
pOP109	pOP30-1::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in <i>Bgl</i> III des <i>glnB</i> -Gens, β -Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP110	pOP30-1::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in <i>Bgl</i> III des <i>glnB</i> -Gens, α -Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP131	pOP30-1::4 kb <i>Bam</i> HI <i>lacZaacC1</i> aus pAB2002 in <i>Bgl</i> III des <i>glnB</i> -Gens, α -Orientierung, Gm ^R	diese Arbeit
pOP137	pOP30-1::4 kb <i>Bam</i> HI <i>lacZaacC1</i> aus pAB2002 in <i>Bgl</i> III des <i>glnB</i> -Gens, α -Orientierung, Gm ^R	diese Arbeit
pOP103	pSUP205::1 kb <i>Bgl</i> III <i>glnBA</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP200	pGEM3Z::387 bp <i>Sal</i> I <i>glnA</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP100	pGEM3Z::418 bp <i>Sma</i> I/ <i>Sph</i> I <i>glnB</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP201	PGEM3Z-A::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in <i>Bgl</i> III des <i>glnA</i> , β -Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP210	PGEM3Z-A::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in <i>Bgl</i> III des <i>glnA</i> , α -Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP7	pUC18::3,5 kb <i>Eco</i> RI- <i>glnK₁amtB₁</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP8	pUC18::2,1 kb <i>Sal</i> I- <i>glnK₁amtB</i> -Fragment	diese Arbeit
pOP8-305-473	pOP8-305::Exonuklease III-Deletionsderivat <i>Sph</i> I/ <i>Sal</i> I (trägt ca. 260 bp <i>amtB₁</i> -Fragment, AS-Position 360-435)	diese Arbeit
pOP8-338	pOP8::Exonuklease III-Deletionsderivat <i>Kpn</i> I/ <i>Xba</i> I (ca. 760 bp-Insert), <i>glnK₁</i>	diese Arbeit
pOP8-305	pOP8::Exonuklease III-Deletionsderivat <i>Kpn</i> I/ <i>Xba</i> I (ca. 100 bp Deletion, Δ <i>Sal</i> I)	diese Arbeit

C. MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Genotyp/relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pOP4	pOP8::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAcat</i> aus pWM4 in <i>Bgl</i> II des <i>glnK</i> ₁ -Gens, β-Orientierung, Cm ^R	diese Arbeit
pOP5	pOP8::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAcat</i> aus pWM4 in <i>Bgl</i> II des <i>glnK</i> ₁ -Gens, α-Orientierung, Cm ^R	diese Arbeit
pOP2	pOP8::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in <i>Bgl</i> II des <i>glnK</i> ₁ -Gens, β-Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP115	pOP8::4 kb <i>Bam</i> HI <i>lacZaacC1</i> aus pAB2002 in <i>Bgl</i> II des <i>glnK</i> ₁ -Gens, α-Orientierung, Gm ^R	diese Arbeit
pOP119	pOP8::4 kb <i>Bam</i> HI <i>lacZaacC1</i> aus pAB2002 in <i>Bgl</i> II des <i>glnK</i> ₁ -Gens, β-Orientierung, Gm ^R	diese Arbeit
pOP33	pOP8(Δ0,5kb <i>Bcl</i> I)::4 kb <i>Bam</i> HI <i>lacZaacC1</i> aus pAB2002 in Δ <i>Bcl</i> I des <i>amtB</i> ₁ , β-Orientierung, Gm ^R	diese Arbeit
pOP50	pOP8(Δ0,5kb <i>Bcl</i> I)::4 kb <i>Bam</i> HI <i>lacZaacC1</i> aus pAB2002 in Δ <i>Bcl</i> I des <i>amtB</i> ₁ , α-Orientierung, Gm ^R	diese Arbeit
pOP88	pSUP401::1,9 kb <i>Sma</i> I <i>glnK</i> ₁ <i>amtB</i> ₁	diese Arbeit
pOP113	pOP88(Δ0,5kb <i>Bcl</i> I)::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in Δ <i>Bcl</i> I des <i>amtB</i> ₁ , α-Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP116	pOP88(Δ0,5kb <i>Bcl</i> I)::3,7 kb <i>Bam</i> HI <i>gusAaph</i> aus pWM6 in Δ <i>Bcl</i> I des <i>amtB</i> ₁ , β-Orientierung, Km ^R	diese Arbeit
pOP150	pGEM3Z::266 bp <i>Hind</i> III <i>Bgl</i> II <i>glnK</i> ₁ -Fragment	diese Arbeit
pOP80	PUC19::3,2 kb <i>Sal</i> I <i>glnK</i> ₂ <i>amtB</i> ₂ -Fragment	diese Arbeit

C. 3 Phagen

Phage	Genotyp /Phänotyp/ relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
λEMBL3-Vektor	<i>red⁺/gam⁺</i>	Lambda EMBL3/ <i>Bam</i> HI Vector Kit (Stratagene); Frischauf <i>et al.</i> , 1983
λ EMBL3-Genbank von <i>Acetobacter diazotrophicus</i> Pal5	Phagen-Genbank von <i>A. diazotrophicus</i> -Gesamt-DNA	diese Arbeit
EMBL-P1	Phage aus der λEMBL3-Genbank; <i>glnK₁amtB₁</i> -Region aus <i>A. diazotrophicus</i>	diese Arbeit
EMBL-P3	Phage aus der Genbank; <i>glnK₂amtB₂</i> -Region aus <i>A. diazotrophicus</i>	diese Arbeit
EMBL-P10	<i>glnBA</i> -tragender Phage aus der Genbank	diese Arbeit

C. 4 Oligonukleotide

C.4.1 PCR-Primer

GlnB-I Primer (23-mer): 5'-ATCATYAAGCCSTTCAARCTCGA (Tib Molbiol)

GlnB-II Primer (21-mer): 5'-GAARATCTTSCCGTCRCCRAT

Abkürzungen für degenerierte Basen (IUB Code):

Y = C/T S = G/C R = A/G

Primer für die Amplifikation der Gene *glnA* und *glnB*: (Roth)

*glnA*1 (20-mer): 5'-GACGTCATCCGCATCCGCAC

*glnA*2 (19-mer): 5'-TGGTGCTGGGACTGCTGAC

*glnB*1 (18-mer): 5'-CCCTGGCCCAGATTGATG

*glnB*2 (21-mer): 5'-TCGATAGGACATACGGACCCC

Primer zum Nachweis der Insertion in *glnB* (Tib Molbiol)

B upper (19-mer): 5'- GATCCGATTGCCCGAAAGC

B lower(18-mer): 5'- CCGGGAAGGGGATGGTGG

Primer zum Nachweis der Insertion in *glnK₁*

Z upper (18-mer): 5'- TGCCAGCCCATAAATCAG

Z lower (18-mer): 5'- GAATAGTGCGGGGGAGAC

Spezifische 23S-rDNA-Primer für *Acetobacter diazotrophicus* (Kirchhof *et al.*, 1998)

5'- GTTGGCTTAGAAGCAGCC

5'- TGCGGCAAAAGCCGGAT

Annealing-Temperaturen und Größen der PCR-Amplifikate s. C.12.11 (S.57)

C.4.2 Sequenzierprimer

Primer für den A.L.F. Express (5'-Cy5 markiert)

M13 pUC forward Primer (17-mer): 5'- GTTTTCCCAGTCACGAC

M13 pUC forward Primer (24-mer): 5'- CGCCAGGGTTTTCAGCCTGGTTAAG

M13.pUC reverse Primer (17-mer): 5'- CAGGAAACAGCTATGAC

M13.pUC reverse Primer (22-mer): 5'- TCACACAGGAAACAGCTATGAC

Unmarkierte Sequenzierprimer zum "Primer walking"

glnBA-Fragment

B1 (19-mer): 5'- ATGATTGCCTTGGTCCTGG

B2 (21-mer): 5'- AACCAGTATCCGCCCTGACC

B3 (18-mer): 5'- AACGGTGTACAGGTACGGG

B4 (20-mer): 5'- CGATGTAATACAGCGCCTGG

B5 (18-mer): 5'- CGACGAGCTGAAGCAGAT

B6 (18-mer): 5'- ATCTGCTTCAGCTCGTCG

B7 (20-mer): 5'- CCTCGACCGGGCAGTTCTAC

B8 (19-mer): 5'- GTTCGGCACGCCCTCAGAC

glnK₁amtB₁-Fragment

Z1 (20-mer): 5'- AGGGCTTGATGATGGCTGTG

Z2 (20-mer): 5'- TGCAGCAGATGGCGAAGGAC

Z3 (20-mer): 5'- AGTCCTTCGCCATCTGCTGC

Z4 (20-mer): 5'- CGGCTGGTTCGGCTTCAATG

Z5 (20-mer): 5'- GCCTTGGCCTGGGTGACGAG

Z6 (20-mer): 5'- CGAAATCGAGGGGCTGGACA

amtB1-1up (21-mer): 5'- TCGGCTGGTTCGGCTTCAATG

amtB1-2 (19-mer): 5'- GCTGGTTCGGCTTCAATGC

glnK₂amtB₂-Fragment

glnK2-1 (20-mer): 5'- GGACGCTTCCGCAATCTGTG

amtB2-1up (20-mer): 5'- CCTGTGGTCGCTGCTGGTCT

amtB2-low (21-mer): 5'- ATAGACCAGCAGCGACCACAG

amtB2-3up (22-mer): 5'- CGCTACTATGGGTCGGCTGGTT

amtB2-4low (20-mer): 5'- CCGAACCAGCCGACCCATAG

C. 5 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase (Calf intestine)	Boehringer Mannheim
DNA-Polymerase I (<i>E. coli</i>)	Biolabs
DNase I	Serva
Exonuklease III	LKB Pharmacia (Nested Deletions Kit)
Klenow-Fragment der DNA Polymerase I	Biolabs LKB Pharmacia (Nested Deletions Kit)
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Serva
RNase A	Serva
RNase T1	Boehringer Mannheim
S1-Nuklease	LKB Pharmacia (Nested Deletions Kit)
SAP (Shrimps Alkalische Phosphatase)	USB
SVPD (Snake Venom Phosphodiesterase)	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	Epicentre LKB Pharmacia (Nested Deletions Kit)
Taq-DNA Polymerase	Qiagen

C.5.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Hersteller
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	2	Biolabs
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	3	Biolabs
<i>Bcl</i> I	T/GATCA	3	Biolabs
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	3, <i>Eco</i> RI	Biolabs
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	2	Biolabs
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	NEB 1 4	Biolabs BRL
<i>Pst</i> I	CTGCA/G	3	Biolabs
<i>Pvu</i> II	CAG/CTG	2	Biolabs
<i>Sac</i> I	GAGCT/C	1	Biolabs
<i>Sal</i> I	G/TCGAC	NEB <i>Sal</i> I 10	Biolabs BRL
<i>Sau</i> 3A	/GATC	1	Biolabs
<i>Sma</i> I	CCC/GGG	4	Biolabs
<i>Sst</i> I	GAGCT/C	2	BRL
<i>Sph</i> I	GCATG/C	2	Biolabs

C. MATERIAL & METHODEN

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Hersteller
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	2	Biolabs
<i>Xmn</i> I	GAAnn/nnTTC	2	Biolabs

C. 6 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-Dig-AP FAB Fragment	1:10000	Boehringer Mannheim
Anti-Rabbit-IgG-AP Conjugat	1:10000	Sigma
Anti-Rabbit-IgG-HRP	1:10000	Promega
Anti-P _{II} (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)	1:750	Prof. S. Nordlund, Universität Stockholm
Anti-Fe-Protein der Nitrogenase (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)	1:20000	Prof. S. Nordlund, Universität Stockholm
Anti-GS (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)	1:20000	Prof. S. Nordlund, Universität Stockholm

C. 7 Kits

Kit	Hersteller/Bezugsquelle
AutoRead-Sequencing Kit	Pharmacia
BCA-Protein-Assay Reagent	Pierce
ECL™-System für Western Blot	Amersham Life Science
JetSorb Gel Extraction Kit	Genomed
Lambda EMBL3/ <i>Bam</i> HI Vector Kit	Stratagene
Nested Deletion Kit	Pharmacia Biotech
Qiagen Lambda Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer Mannheim
Riboprobe® <i>in vitro</i> Transcription Systems	Promega
Sure Clone Ligation Kit	Pharmacia Biotech
Taq PCR Core Kit	Qiagen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech

C. 8 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller / Bezugsquelle
[¹⁴ C]Methylammonium (50 mCi/mmol)	ICN
[α- ³² P]UTP (400 Ci/mmol), [¹⁴ C]Glutamin (267 mCi/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech

C. MATERIAL & METHODEN

Chemikalien	Hersteller / Bezugsquelle
Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bindsilan, Bisacrylamid, TEMED	LKB Pharmacia
Agar, BactoPepton, BactoTrypton, Casamino Acids, Yeast Extract	Difco
Agar, BCIP, NBT, Trypton	Gibco BRL
Ammoniumacetat, Harnstoff	Fluka
Antibiotika, EDTA, Mannitol, 5-Methyl-Tryptophan, SDS, Sucrose, Tris-Base, Tris-HCl, Tris7-9, Hydroxylamin, KArsenat	Sigma
Blocking-Reagenz	Boehringer Mannheim
Bromphenolblau, N-Lauroylsarkosin, MOPS, Polyethylenglykol (PEG 1000/6000)	Serva
Cäsiumchlorid	ICN Biomedicals
Chloroform, NaCitrat, NaOH	Baker
D-Glucose	Fisher
Ethidiumbromid, Glycerin, NaCl, Phenol	Roth
ExpressHyb-Hybridization Solution	Clontech
IPTG, X-Gal	Appligene
NBT, BCIP; DIG-UTP markierter Lambda-Marker;	Boehringer Mannheim
Seakem LE Agarose	FMC Bioproducts

Andere Chemikalien wurden von der Firma Merck AG bezogen.

C. 9 Geräte

Geräte	Firma
A.L.F. (automated laser fluorescence)	LKB Pharmacia
Direct-Blotter VacuGene Pump	LKB Pharmacia
Elektroblotter für Proteine	BioRad
Elektroporationsapparatur „Gene Pulser & Pulse Controller“	BioRad
Gaschromatograph GC-17A	Shimadzu
Millipore-Anlage „Milli-Q _{PLUS} “	Elga
PCR-Gerät „Mini-Cycler TM “	MJ Research über Biozym
PCR-Gerät „Robocycler Gradient 96“	Stratagene
RIBI Cell Fractionator RF-1	AB LAMBDA Stockholm
Rotoren VTi65.2, A8.24, Tst55.5	Kontron
Eppendor fzentrifuge	Heraeus
Ultrazentrifuge Centrikon T2055	Kontron
Zentrifuge Centrikon H401	Kontron

C. 10 Puffer und Lösungen

C.10.1 Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung

AKI	6,7 % (w/v) Sucrose 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
CIA (Chloroform-Isoamylalkohol)	Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)
CsCl-gesättigtes Isopropanol	37 g CsCl in 41 ml H ₂ O lösen add. 100 ml Isopropanol
E1 (Eckhardt-Lyse)	50 mM Tris 25 mM EDTA 8% (w/v) Saccharose 2% (w/v) Ficoll400 pH 8,0 autoklavieren frisch vor Gebrauch: add. RNase A (10 mg/ml) add. Lysozym (5 mg/ml)
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Kirby-Mix	88 ml Phenol 12 ml Kresol 0,1 g Hydroxyquinolin add. 1 Vol. 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Mix I	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 frisch: vor Gebrauch: add. Lysozym (2 mg/ml) add. 50 µl RNase A (10 mg/ml) pro 5 ml Mix I
Mix II	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
P1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A

C. MATERIAL & METHODEN

P2	200 mM NaOH 1 % SDS
P3	3M KAcetat, pH 5,5
QBT (Äquilibrierungspuffer)	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (v/v) Triton X-100 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, auf pH 7,0 einstellen
QC (Waschpuffer)	1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, auf pH 7,0 einstellen
QF (Eluierungspuffer)	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % (v/v) Isopropanol mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, auf pH 8,0 einstellen
RNase A (Stammlösung)	10 mg/ml RNase A in: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 15 mM NaCl 15 min bei 100°C inkubieren langsam auf RT abkühlen bei -20°C lagern
STE	50 mM Tris-HCl 50 mM EDTA 8% (w/v) Sucrose pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,5
TES-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 5 mM EDTA
TES-Sucrose-Puffer	TES-Puffer 25% w/v Sucrose

C.10.2 Puffer und Lösungen für Southern/Northern-Hybridisierung

0,1 x Waschpuffer	0,1 x SSC 0,1% SDS
0,5 x Waschpuffer	0,5 x SSC 0,1% SDS
2 x Waschpuffer	2 x SSC 0,1% SDS
20 x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g NaCitrat mit H ₂ O auf 1l auffüllen auf pH 7,0 einstellen
Antikörperkonjugat	Anti-Dig-AP FAB Fragment 1:10000 verdünnt in Dig-Puffer 2
Blocking Reagenz (10% Stammlösung)	10% w/v Blocking Reagenz in Dig-Puffer 1
Blotting Puffer 1 (Depurinierungspuffer)	0,25 N HCl
Blotting Puffer 2 (Denaturierungspuffer)	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Blotting Puffer 3 (Neutralisierungspuffer)	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 3 M NaCl
Dig-11-dUTP-Nukleotidmix	1 mM dATP 1 mM dCTP 1 mM dGTP 0,65 mM dTTP 0,35 mM Dig-11-dUTP
Dig-Färbelösung	50 ml Dig-Puffer 3 mit 45 µl NBT und 35 µl BCIP (Boehringer)
Dig-Puffer 1	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

C. MATERIAL & METHODEN

Dig-Puffer 2	Dig-Puffer 1 mit 2% Blocking Reagenz
Dig-Puffer 3 (Nachweis-Puffer)	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂
Dig-Waschpuffer	Dig-Puffer 1 mit 0,3% (v/v) Tween20
DNase I (für die Nick-Translation, 10 ⁻⁴ -verdünnt)	Stammlösung: 1 mg/ml in 0,15M NaCl 50% Glycerin Verdünnung 10 ⁻² : 100 µl 10 x NT-Puffer 500 µl Glycerin 400 µl H ₂ O 10 µl DNase I-Stammlösung (1 mg/ml) verdünnen bis 10 ⁻⁴
10 x Nick-Translation-Puffer (10 x NT-Puffer)	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 0,1 M MgSO ₄ 1 mM DTT
Prä-/Hybridisierungspuffer für Southern Hybridisierung	5 x SSC 2% (w/v) Blocking Reagenz 0,1% Na-Lauroylsarkosin 0,02% SDS
Prä-/Hybridisierungspuffer für Northern Hybridisierung	5 x SSC 50% Formamid (deionisiertes) 2% (w/v) Blocking Reagenz 0,1% Na-Lauroylsarkosin 0,02% SDS

C.10.3 Phagen-Puffer, Plaques-Hybridisierung

CsCl-Gradient-Lösungen	<p>$\rho = 1,45$ g/ml: 6 g CsCl in 8,5 ml SM-Puffer</p> <p>$\rho = 1,50$ g/ml: 6,7 g CsCl in 8,2 ml SM-Puffer</p> <p>$\rho = 1,70$ g/ml: 9,5 g CsCl in 7,5 ml SM-Puffer oder</p> <p>$\rho = 1,4$: 3,883 g CsCl auf 10 g mit H₂O auffüllen</p> <p>$\rho = 1,5$: 4,541 g CsCl auf 10 g mit H₂O auffüllen</p> <p>$\rho = 1,6$: 5,116 g CsCl auf 10 g mit H₂O auffüllen</p> <p>$\rho = 1,7$: 5,683 g CsCl auf 10 g mit H₂O auffüllen</p>
-------------------------------	---

C. MATERIAL & METHODEN

Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Dialysepuffer für Phagen	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 5 mM MgSO ₄
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 8,0
Puffer L1	20 mg/ml RNase A 6 mg/ml DNase I 0,2 mg/ml BSA 10 mM EDTA 100 mM Tris-HCl 300 mM NaCl, pH 7,5
Puffer L2	30% PEG6000 3 M NaCl
Puffer L3	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 25 mM EDTA, pH 7,5
Puffer L4	4% SDS
Puffer L5	2,55 M K-Acetat, pH 4,8
SM-Puffer	5,8 g/l NaCl 2,6 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O 50 ml/l 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 5 ml/l 2 % (w/v) Gelatine
Waschpuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 2 x SSC

C.10.4 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

10 x TA	400 mM Tris-Acetat, pH 7,8 100 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
10 x TBE	108 g/l Tris 55 g/l Borsäure 9,3 g/l EDTA

Bromphenolblau (Gelladepuffer)	7 g Sucrose 0,024 g BPB 4 ml 250 mM EDTA auf 10 ml mit H ₂ O auffüllen
Ethidiumbromid- Färbelösung	1 µg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Laufpuffer	1 x TBE oder 1 x TA

C.10.5 RNA-Puffer und Lösungen

Cäsiumchlorid-EDTA-Lösung	5,7 M CsCl 100 mM EDTA 0,1% DEPC
Guanidiniumthiocyanatpuffer	4,0 M Guanidiniumthiocyanat 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 1% β-Mercaptoethanol, frisch zugeben
MOPS-Puffer	0,2 M Morpholinpropansäure (MOPS) 50 mM Natrium-Acetat 10 mM EDTA pH 7,0 mit 0,1% DEPC behandeln und autoklavieren
RNA-Gelladepuffer	50% Glycerin 1 mM EDTA, pH 8,0 0,25% BPB 0,25% Xylencyanol 0,1% DEPC
RNA-Probenpuffer	10 µl deionisiertes Formamid 3,5 µl 18 % Formaldehyd 2 µl 10x MOPS-Puffer

C.10.6 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Techniken

4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl 0,4% SDS (6,05 g Tris-Base in 40 ml H ₂ O lösen, pH 6,8 mit 1N HCl einstellen, add. H ₂ O zu 100 ml, sterilfiltrieren mit 0,45 µm-Filter, add. 0,4 g SDS, bei 4°C aufbewahren)
---------------------------------	---

C. MATERIAL & METHODEN

4 x Tris-HCl/SDS, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS (91 g Tris-Base in 300 ml H ₂ O lösen, pH 8,8 mit 1N HCl einstellen, add. H ₂ O zu 500 ml, sterilfiltrieren mit 0,45 µm-Filter, add. 2 g SDS, bei 4°C aufbewahren)
Blocking Puffer	100 ml TBS-Puffer 4% BSA oder Magermilchpulver 0,05% Tween80
Coomassie Blue Färbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure 1% Coomassie Brilliant Blue G250
Detection-Puffer (für den Nachweis mit NBT-BCIP)	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂
Entfärber	40% Ethanol 10% Eisessig
Probenpuffer (für Proteine)	0,187M Tris, pH 6,8 30% Glycerin 6% SDS 2 ml 0,3% BPB aufbewahren bei RT vor Gebrauch add. β-Mercaptoethanol: 900 µl Puffer + 100 µl β-Mercaptoethanol
RB-Stammlösung	144 g Glycin 30 g Tris-Base mit H ₂ O auf 1l auffüllen
RB-Gebrauchslösung	100 ml RB Stammlösung 10 ml 10% SDS mit H ₂ O auf 1l auffüllen
Stop-Mix (Transferase-Aktivität)	auf 1 l: 60 g FeCl ₃ 80 g Trichloressigsäure (TCA)
TBS-Puffer	20 mM Tris-Base 2,42 g 137 mM NaCl 8 g 1 M HCl 3,8 ml H ₂ O auf 1 l (pH 7,6)

TBS-T	0,05% Tween80 in TBS
Transferase Puffer (für die GS-Transferase-Aktivität)	80 mM Imidazol 80 mM Hepes 40 mM Hydroxylamin (NH ₂ OH) 40 mM KH ₂ AsO ₄ pH 7,6 oder: 7,62 g HEPES 2,18 g Imidazol 2,88 g KH ₂ AsO ₄ 1,11 g NH ₂ OH mit H ₂ O auf 400 ml auffüllen, pH 7,6
Transferpuffer (für Semi-Dry Elektrolot von Proteinen)	192 mM Glycin 90,08 g (auf 5 l) 25 mM Tris-Base 18,92 g (auf 5 l) pH 8,3 vor Gebrauch add. 20% Metanol
Tris-Puffer, pH 7,1 (für Proteinextrakte)	100 mM Tris, pH 7,1 50 mM NaCl 2 mM MnCl ₂
Tris-Puffer, pH 7,1 (anaerob)	100 mM Tris, pH 7,1 50 mM NaCl 2 mM MnCl ₂ 2 mM DT (Dithionit)

C.10.7 Puffer und Lösungen für GUS-Aktivitätsmessung

1M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0	1M Na ₂ HPO ₄ 1M NaH ₂ PO ₄ mischen bis pH 7,0
GUS-Assay-Puffer	2 mM 4-Methylumbelliferyl- β-D-Glucuronid in GUS-Extraktionspuffer
GUS-Carbonat-Stop-Puffer	0,2 M Na ₂ CO ₃
GUS-Extraktionspuffer	50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0 10 mM β-Mercaptoethanol 10 mM Na ₂ EDTA 0,1% SDS 0,1% Triton X-100
MU-Kalibrationsstandard	50 nM 4-Methylumbelliferon (MU) in GUS-Carbonat-Stop-Puffer

C. 11 Nährmedien und Zusätze

C.11.1 Nährmedien

C2-Medium (Vollmedium für <i>A. diazotrophicus</i>)	10 g Pepton 15 g Glucose 5 g Yeast-Extrakt 5 g NaCl add 1 l H ₂ O pH 6,0
LBMM (für <i>E. coli</i> XL1-Blue MRA(P2), Lambda EMBL3/ <i>Bam</i> HI Vector Kit)	10 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Yeast nach dem Autoklavieren zugeben: 10 ml 20% Maltose 10 ml 1 M MgSO ₄ (beides sterilfiltriert)
LBMM-Weichagar	LBMM add. 0,7% Agarose
LGI (Cavalcante & Döbereiner, 1988) (Minimalmedium für <i>A. diazotrophicus</i>)	0,2 g K ₂ HPO ₄ 0,6 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g MgSO ₄ 0,02 g CaCl ₂ 0,002 g NaMoO ₄ 0,01 g FeCl ₃ 25 g Sucrose add. 1 l H ₂ O Millipore add. 5 ml Bromthymolblau (s. Zusätze zu Nährmedien) pH 6,0
LGY (Vollmedium für <i>A. diazotrophicus</i>)	LGI + 7 g/l Yeast-Extrakt
M9 (Maniatis <i>et al.</i> , 1982) (Minimalmedium)	6 g NaH ₂ PO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g NaCl 1 g NH ₄ Cl auf 1 l mit H ₂ O auffüllen pH 7,2 - 7,4 nach dem Autoklavieren Zugabe von: 2 ml 1M MgSO ₄

	10 ml 20% Glucose 0,1 ml 1M CaCl ₂
NZY (Lambda EMBL3/ <i>Bam</i> HI Vector Kit)	5 g NaCl 2 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 5 g Yeast-Extrakt 10 g NZ Amine (Kasein Hydrolysat) mit NaOH pH 7,5 einstellen
NZY-Weichagar	NZY add. 0,7% Agarose
TBY (Vollmedium für <i>E.coli</i>)	15 g/l Trypton 5,0 g/l NaCl 5,0 g/l Yeast Extract pH 7,5

C.11.2 Zusätze zu den Nährmedien

NH₄Cl Stickstoffquelle im Minimalmedium	Zu den Medien wird 1M NH ₄ Cl bis zu einer Endkonzentration von 1 mM (Stickstoffmangel) oder 20 mM (Stickstoffüberschuss) zugegeben
Agar	1,5% für Festmedien (Oxid: Vollmedien; Bactoagar: Minimalmedien) 0,18 - 0,20% für Weichagar
Aminosäuren	zu den entsprechenden Minimalmedien wurden 0,5 g/l der jeweiligen Aminosäure zugegeben; Glutamin wird bis zu einer Endkonzentration von 10 mM dem Medium zugegeben
Bromthymolblau pH-Indikator für LGI und LGY	0,5% Bromthymolblau in 0,2 N KOH
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	100 mM in H ₂ O bidest. pro Agarplatte - 10 µl Lösung
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-Galaktosid)	2% (w/v) X-Gal in N,N-Dimethylformamid pro Agarplatte - 50 µl Lösung
X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyglucoronid)	2% (w/v) X-Gluc in N,N- Dimethylformamid pro Agarplatte - 50 µl Lösung

C.11.3 Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	<i>E. coli</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>
Ampicillin	Ap	150	200
Chloramphenicol	Cm	30	280
Gentamicin	Gm	10	150
Kanamycin	Km	50	200
Tetracyclin	Tc	15	40

Die Konzentration der Antibiotika ist in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Ampicillin, Gentamicin und Kanamycin wurden in sterilem H_2O gelöst, Chloramphenicol - in 100% EtOH, Tetracyclin - in 50% EtOH .

II. Methoden

C. 12 DNA-Techniken

C.12.1 DNA-Isolierung

C.12.1.1 Gesamt-DNA-Isolierung

(Hopwood *et al.*, 1985, modifiziert)

- Bakterien werden über Nacht unter Selektionsdruck angezogen
- 10 ml einer Übernachtskultur werden 5 min bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert
- Bakterienpellet in 500 µl AK 1 resuspendieren und ins Eppendorfgefäß überführen
- 50 µl RNase A (10 mg/ml) zugeben
- 60 min bei 37°C inkubieren
- 250 µl 2 % SDS zugeben
- 1 min vortexen
- 275 µl Kirby-Mix zugeben
- 30 sec vortexen, 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- die obere Phase in ein neues Gefäß überführen
- 250 µl CIA zugeben
- 30 sec vortexen, 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren, die obere Phase in ein neues Gefäß überführen
- CIA-Behandlung noch 2 x wiederholen
- 60 µl 3 M NaAcetat (pH 4,8) zugeben
- auf Eis stellen
- 1 Vol. Isopropanol (-70°C) oder 2 Vol. 100 % Ethanol zugeben
- invertieren
- DNA auf Pasteurpipette aufwickeln
- gewickelte DNA in 70 % Ethanol (RT) waschen
- DNA lufttrocknen
- DNA in 100-200 µl TE oder H₂O Millipore lösen

C.12.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung

Alkalische Lyse (nach Birnboim & Doly, 1979)

- zur Isolierung von "high copy" pUC-Derivaten -

- 40 ml Übernachtskultur 10 min bei 4°C und 6500 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 8 ml Mix I resuspendieren
- 30 - 60 min bei 0°C inkubieren
- 16 ml Mix II zugeben
- 10 min bei RT inkubieren
- 12 ml gekühltes 3 M NaAcetat (pH 4,8) zugeben
- 15 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugieren
- Überstand mit 1 Vol. Isopropanol (-70°C) versetzen

- 20 min bei -70°C inkubieren
- 20 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 4,5 ml TE-Puffer lösen
- anschließend CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

- DNA-Pellet in 4,5 ml TE lösen
- in ein Corexgläschen (15 ml) 4,7 g CsCl einwiegen
- gelöstes Pellet zum CsCl geben
- 0,3 ml EtBr (5 mg/ml) zugeben
- 30-60 min bei 15 000 rpm, 15°C, A8.24 zentrifugieren ("clearing spin")
- klare Lösung in Quick-Seal-Röhrchen (Beckman) pipettieren
- Röhrchen luftblasenfrei verschließen
- ü. N. in Ultrazentrifuge bei 50 000 rpm, 15°C, VTI 65.2 zentrifugieren
- untere ccc-DNA-Bande unter UV-Licht (365 nm) mit einer 1 ml Spritze abziehen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- Extraktion: add. 1 Vol. CsCl-gesättigtes Isopropanol (3-4 x wiederholen)
- Dialyse: 2 x mindestens 2 Stunden gegen je 2 l TE dialysieren

Plasmid-DNA-Isolierung nach Qiagen (modifizierte Lyse nach Birnboim & Doly, 1979)

- zur Isolierung von ccc-DNA für die Sequenzierung -

- 10 ml Übernachtskultur
- zentrifugieren 5 min, 6000 rpm, A8.24
- waschen mit 1 ml TE
- Pellet in 500 µl P1 mit 50 µl RNase A (10 mg/ml) und 2 µl RNaseT1 (1:300 mit bidest. H₂O verdünnt)
- resuspendieren
- add. 500 µl P2
- 5 min RT
- add. 500 µl P3 (kalt)
- 10 min 0°C
- zentrifugieren 15 min 18000 rpm, 4°C, A8.24 mit Eppendorfgefäßeinsätzen
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- zentrifugieren 10 min 18000 rpm, 4°C, A8.24 mit Eppendorfgefäßeinsätzen
- Qiagen-20 Säule mit 1 ml QB-Puffer äquilibrieren
- Überstand der Zentrifugation auf die Qiagensäule geben
- durchlaufen lassen
- Säule 2 x mit 1 ml QC-Puffer waschen (für die DNA-Präparation aus XL1-Blue; oder 4 x 1 ml QC - für JM109)
- mit 0,8 ml QF-Puffer die Plasmid-DNA eluieren
- add. 700 µl Isopropanol
- zentrifugieren 30 min, 13000 rpm, 4°C, Eppendorfszentrifuge
- Pellet waschen mit 200 µl 70 % EtOH (p.A. in Millipore-Wasser)
- Pellet trocknen
- in 20 µl TE resuspendieren

C.12.1.3 Klonanalysen

a) Schnellverfahren zum Nachweis von Plasmid-DNA

(nach Birnboim & Doly, 1979, modifiziert)

- 1,5 ml Übernachtkultur
- zentrifugieren 5 min, 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Pellet in 200 µl Mix I + RNase A (10 mg/ml) resuspendieren
- inkubieren 30 min 0°C
- add. 400 µl Mix II
- inkubieren 10 min bei RT
- add. 300 µl 3M NaAcetat, pH 4,8
- inkubieren 15 - 30 min 0°C
- zentrifugieren 20 min, 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 0,7 Vol. Isopropanol
- zentrifugieren 30 min, 13000 rpm, RT, Eppendorfzentrifuge
- DNA-Pellet mit 70% EtOH waschen
- 5 min zentrifugieren
- Pellet trocknen
- in 30 µl H₂O Millipore oder TE-Puffer lösen
- 4 µl DNA mit Restriktionsendonukleasen spalten
- auf einem Agarosegel auftrennen

b) Eckhardt-Lyse

(Eckhardt, 1978, modifiziert)

- plasmidhaltige Zellen lysieren durch zugegebenes Lysozym und im Gel enthaltenes SDS direkt in den Taschen des Agarosegels -

SDS-Agarosegel:

- 0,8% (w/v) Agarose in TBE-Puffer aufkochen
- auf ca. 60°C abkühlen
- add. 10 % SDS zu einer Endkonzentration 0,2%
- Gel gießen
- Bakterienkolonie direkt von der frischen Agarplatte nehmen
- in 40 µl E1 + 10 mg/ml Lysozym aufnehmen
- sofort aufs vorbereitete SDS-Agarosegel geben
- Elektrophorese-Vorlauf: 10 V bis die Taschen klar sind (Lyse komplett)
- Hauptlauf: 4 - 5 h bei 50-75 V bzw. 18-20 V ü. N.
- Gel 10 min mit EtBr färben
- 30 min in TBE-Puffer entfärben

c) Kochmethode

(nach Holmes & Quigley, 1981, mod.)

- für RSF1010-Derivate-

- 20 ml Übernachtskultur
- zentrifugieren 10 min, 6000 rpm, Rotor A8.24
- Pellet mit 2 ml TE waschen
- Pellet resuspendieren in 100 µl STE
- add. 10 µl Lysozym (10 mg/ml)
- 1 min 98°C
- 5 min 0°C
- zentrifugieren 10 min, 13000, Eppendorfszentrifuge
- Überstand mit 250 µl EtOH fällen
- Pellet in TE resuspendieren

C.12.1.4 Phagen-DNA-Isolierung

Qiagen-Methode

Vorbereitung von Indikator-Bakterienzellen

- Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRA (P2) in LBMM-Flüssigmedium bei 37°C bis zur log-Phase anziehen
- 10 min bei 4°C 4000 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in ½ Volumen 10 mM MgSO₄ lösen
- Zellen in sterilem 10 mM MgSO₄ bis zu OD₆₀₀ = 0,5 verdünnen

Vorbereitung des Lysats:

- 10⁵ -10⁶ pfu in SM-Puffer
- add. 100 µl Bakterienkultur XL1-Blue MRA (P2) (Vorbereitung s. oben)
- inkubieren 20 min 37°C
- add. 3 ml LBMM-WA, mischen
- auf LBMM Platten gießen
- die Platten ü. N. bei 37°C inkubieren
- wenn konfluente Lyse erreicht ist, add. 5 ml SM-Puffer
- unter Schütteln bei 4°C 2-4 h weiter inkubieren
- SM-Puffer mit Phagen mit Pasteurpipette in Greiner-Röhrchen überführen
- add. 1 ml frischen SM-Puffer auf die Platten und 15 min weiter inkubieren
- SM-Puffer sammeln und in Greiner-Röhrchen mit dem früher gesammelten SM zugeben
- add. 100 µl Chloroform
- zentrifugieren 10 min bei 6500 rpm, 4°C, A8.24
- Überstand in ein neues Gefäß überführen, add. 1 Tropfen Chloroform
- im Kühlschrank bei 4°C lagern

DNA-Präparation:

- 10 ml Plattenlysat (s. oben, bei kleineren Volumen des Lysats werden die Puffervolumen L1-L5 entsprechend reduziert, Volumen QBT, QF und QC bleiben unverändert)
- add. 30 µl Puffer L1 mit RNase A und DNase I
- inkubieren 30 min bei 37°C
- add. 2 ml Puffer L2 (0°C)
- inkubieren 1 h auf Eis
- zentrifugieren 10 min bei 10000 x g, 4°C

- Überstand verwerfen
- das Pellet in 1 ml L3 resuspendieren
- add. 1 ml Puffer L4, mischen
- inkubieren 10 min bei 70°C, dann auf Eis abkühlen
- add. 1 ml L5, mischen
- zentrifugieren 30 min bei 15 000 x g, 4°C
- den Überstand noch mal 10 min zentrifugieren

Reinigung von DNA mit Qiagensäulen

- Säule Qiagen-tip 20 mit 1 ml Puffer QBT äquilibrieren
- Überstand der Zentrifugation auf die Säule kippen
- waschen mit 2 x 1 ml QC
- DNA mit 1,5 ml QF eluieren
- DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol fällen
- zentrifugieren 30 min bei 15000 x g, 4°C
- DNA-Pellet mit 70% EtOH waschen, lufttrocknen
- DNA resuspendieren in TE-Puffer (pH 8,0)

Phagen-DNA-Isolierung mit CsCl-Gradienten

Vorbereitung des Lysats

- 10^5 - 10^6 pfu in SM-Puffer
- add. 100 µl Bakterienkultur XL1-Blue MRA (P2) (Vorbereitung s. 49)
- inkubieren 20 min 37°C
- add. 3 ml LBMM-WA, mischen
- auf LBMM Platten gießen
- die Platten ü. N. bei 37°C inkubieren
- wenn konfluente Lyse erreicht ist, add. 5 ml SM-Puffer
- unter Schütteln bei 4°C 2 - 4 h weiter inkubieren
- Weichagar mit Phagen in SM-Puffer in Zentrifugenröhrchen überführen
- inkubieren 30 min bei 37°C
- zentrifugieren 10 min bei 4°C, 8000 rpm, Rotor A8.24
- add. 100 µl CHCl_3 zum Überstand
- bei 4°C lagern
- für weitere Behandlung auf 37°C erwärmen
- add. 60 µl L1-Puffer
- 5µl DNase I (6 mg/ml)
- 3 µl RNase A (10 mg/ml)
- inkubieren 30-60 min bei 37°C
- add. NaCl (29,2 g/500 ml)
- inkubieren 1 h bei 0°C
- zentrifugieren 10 min bei 4°C, 11000 x g
- Überstand in neues Gefäß überführen
- Phagen 2 h 13000 rpm zentrifugieren, Rotor A6.14
- Pellet in 2,5 ml Puffer resuspendieren: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
5 mM MgCl_2
2 mM CaCl_2

- in UZ-Röhrchen 0,7 ml CsCl-Lösung $\rho = 1,4$
 unterschichten mit 0,7 ml $\rho = 1,5$
 unterschichten mit 0,7 ml $\rho = 1,7$
- mit Phagensuspension auffüllen
- zentrifugieren 90 min bei 10°C, 30000 rpm in ZU, Rotor Tst55.5
- Phagenbande abziehen (zwischen $\rho = 1,4$ g/ml und $\rho = 1,5$ g/ml)
- Dialyse 2 h, RT
 Dialysepuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 50 mM NaCl
 5 mM Mg²⁺
- DNA-Isolierung ab Qiagen L3-Puffer

C.12.2 Alkoholfällung von DNA

- zur Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren in Lösungen, wobei es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen zur Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle und zur nachfolgenden Präzipitation kommt; niedermolekulare Nukleotide und Oligonukleotide bleiben in Lösung -

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 7,5
- add. 2 Vol. EtOH, bzw. 1 Vol. Isopropanol
- 15 min -70°C
- zentrifugieren 20 min 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- Pellet 2 x mit 300 µl 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen
- Pellet in TE resuspendieren

C.12.3 Phenolextraktion

- zur Denaturierung und Extraktion von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen; restliches Phenol wird durch eine Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung entfernt -

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1 Vol. Kirby-Mix oder neutrales Phenol
- gründlich mischen (Vortex)
- zentrifugieren 5 min 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- add. 1 Vol. CHCl₃/Isoamylalkohol (24:1), mischen
- zentrifugieren 10 min 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- Alkoholfällung der Oberphase

C.12.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Proteine absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm, wodurch Verunreinigungen der DNA anhand der Absorption erkannt werden können.

Standardwerte :	doppelsträngige Plasmid-DNA:	O.D. ₂₆₀ 1= 50 µg/ml
(Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	Oligonukleotide:	O.D. ₂₆₀ 1= 33 µg/ml
	einzelsträngige DNA oder RNA:	O.D. ₂₆₀ 1= 40 µg/ml

C.12.5 Agarosegelelektrophorese

Da Nukleinsäuren aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht. Diese Eigenschaft wird bei der Elektrophorese zu deren Trennung ausgenutzt. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wird eine elektrisch neutrale, feste Gelmatrix aus Agarose verwendet. Durch Färbung mit EtBr-Lösung und anschließende Fluoreszenz bei UV-Bestrahlung werden Banden, die die Konformations- und Größenunterschiede zeigen, sichtbar. Für Agarose-Gele werden meist TBE oder TA-Puffer benutzt.

Je nach Agarosekonzentration kann man Fragmente von Länge weniger als 100 bp bis zu mehreren Kilobasen unterscheiden, z. B. wird 0,5 - 1,2% (w/v)-Agarose zur Auftrennung linearer Fragmente nach Hydrolyse und 1,2 - 2% Agarose für die Auftrennung kleinerer Fragmente eingesetzt.

Die DNA-Proben (je nach Gel 10-30 µl) wurden mit 1/10 Vol. Bromphenolblaulösung vermischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Gele wurden nach dem Lauf unter UV-Licht von 302 nm Wellenlänge (Bachofer Transilluminator) fotografiert (Polaroid-Film Typ 667).

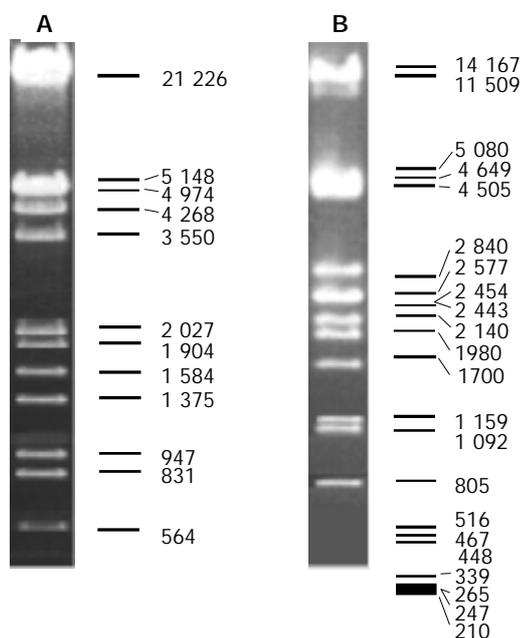


Abb. 12. Längenmarker für Agarosegelelektrophorese.

Hydrolysierte Lambda-DNA (Standard für lineare DNA, Angaben in (bp)): A - λ EcoRIHindIII, B - λ PstI.

Die Mobilität von DNA-Restriktionsfragmenten ist bei der Gelelektrophorese umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Im Vergleich mit der Mobilität eines Standards bekannter Fragmentgrößen lässt sich die Größe unbekannter Fragmente bestimmen (Abb. 12)

C.12.6 DNA-Restriktion

DNA wird in den Restriktionspuffern nach Empfehlung des Enzym-Herstellers hydrolysiert. Bei Mehrfachrestriktionspaltungen wird die DNA zunächst mit dem Enzym hydrolysiert, das die niedrigere Salzkonzentration benötigt. Für zweite Spaltung wird die Ionenkonzentration entweder

sofort auf die entsprechenden Bedingungen eingestellt, oder der Restriktionsansatz zunächst mit EtOH gefällt. Inaktivierung von hitzelabilen Enzymen erfolgt bei 70°C, von hitzestabilen Enzymen über Phenolextraktion.

Standard-Spaltungsansatz (20 µl):

- 0,2 - 1 µg DNA
- 2 µl des jeweiligen 10 x Restriktionspuffers
- 1-5 U Restriktionsendonuklease
- mit H₂O auf 20 µl auffüllen
- 1 h im Temperaturoptimum inkubieren
- 10 min 70°C
- add. 1/5 Vol. BPB-Lösung

C.12.7 *In vitro* Neukombination von DNA-Fragmenten - Ligation

- Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer 5'-Phosphat-Gruppe und einer freien 3'-Hydroxyl-Gruppe, die von DNA-Ligasen katalysiert wird -

50 µl-Ansatz:

- 10 µl linearisierter Vektor
- 20 µl lineare Insert-DNA
- 5 µl 10x Puffer für T4-Ligase
- 2,5 µl ATP
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- mit H₂O auf 50 µl auffüllen
- 2h RT oder ü. N. 16°C
- 10 min 70°C
- Transformation (C.13.1, S. 64)

C.12.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase

- verhindert die durch DNA-Ligase katalysierte Zirkularisierung linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle, da dieses Enzym die endständigen 5'-Phosphat-Gruppen von DNA abspaltet; dadurch wird der Einbau von Fremd-DNA in einen Klonierungsvektor begünstigt -

- 47,5 µl linearisierte Plasmid-DNA in Restriktionspuffer
- 2,5 µl alkalische Phosphatase zugeben (SAP)
- 1 h bei 37°C inkubieren
- alkalische Phosphatase 10 min bei 70°C deaktivieren

C.12.9 Auffüllen rezessiver 3'-Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

- um nicht kompatible DNA-Fragmente mit einzelsträngigen, überhängenden Enden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und dNTPs als Substrat in "blunt end"-Fragmente umzuwandeln, die anschließend verknüpft (ligiert) werden können -

100 µl-Ansatz:

- 84 µl linearisierte DNA in Restriktionspuffer
- 5 µl 10x Puffer für Klenow-Fragment zugeben
- 10 µl 10 mM dNTP-Mix zugeben
- 1 µl Klenow-Fragment zugeben
- 30 min bei 37°C inkubieren
- 8 µl 250 mM EDTA (pH 8,0) zugeben
- 8 µl 3 M NaAcetat (pH 7,5) zugeben
- 300 µl absolutes EtOH zugeben
- 30 min -20°C inkubieren
- 20 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Pellet mit 100 µl 70% (v/v) EtOH waschen
- 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- EtOH-Überstand vollständig abziehen
- Pellet bei 37°C trocknen lassen
- DNA in 50 µl H₂O lösen

C.12.10 Einführung unidirektionaler Deletionen in Plasmid-DNA mittels Exonuklease III (Nested Deletion Kit)

Die Exonuklease III ist eine doppelstrangspezifische 3'-Exonuklease, die bevorzugt sukzessive Nukleotide an 3'-Enden von ds-DNA entfernt; 3'-überstehende Enden oder „blunt“-Enden sind geschützt. Die erzeugten Einzelstrangbereiche können dann mit der einzelstrangspezifischen S1-Nuklease abgespalten werden (Henikoff, 1984), dadurch werden DNA-Moleküle verkürzt. Um unidirektionale Deletionen im Plasmid zu erzeugen, muss die DNA zuerst mit einem Enzym gespalten werden, das im Plasmid möglichst nur einmal in der mcs des Vektors vorkommt. Wenn diese Spaltung zu einem 5'-Überhang führt (und nicht zu geschützten 3'- oder „blunt“-Enden), muss die DNA in einer "Fill-in"-Reaktion durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit Thionukleotiden aufgefüllt und damit vor der kompletten Exonuklease III-Verdauung geschützt werden. Die zweite Hydrolyse der linealisierten DNA (mit "blunt"-Enden) mit einem Enzym, das 5'-überstehende Enden erzeugt, führt zum Ergebnis, dass nur ein Ende ein Substrat für die Exonuklease III darstellt und somit Deletionen nur in eine Richtung eingeführt werden. Nach der Abspaltung der einzelsträngigen DNA mit S1-Nuklease werden die "blunt"-Enden durch T4-DNA-Ligase verknüpft. Dabei entsteht eine Population von Plasmiden, die Deletionen unterschiedlicher Größe aufweisen. Die erhaltenen Plasmide werden in *E. coli* transformiert. Diese Methode erlaubt die Sequenzierung aller Deletionsderivate mit dem gleichen Primer, da die Primerbindestelle erhalten und vor der Exonuklease III geschützt bleibt.

1. Hydrolyse der DNA (in mcs des Vektors)

- 2,5 µg DNA werden in 25 µl Gesamtvolumen hydrolysiert
- 2 h Inkubation im Temperaturoptimum
- 10 min 70 °C
- 5 µl zur Agarosegelelektrophorese

Auffüllung der 5'-überstehenden DNA-Enden nach der 1. Hydrolyse mit Thionukleotiden

- 20 µl DNA-Lösung

- add. 300 µl EtOH
- 10 min -70°C
- zentrifugieren 10 min, 13000 rpm, Eppendorffzentrifuge
- Pellet in 14 µl H₂O resuspendieren
- add. 2 µl 10 x Klenow-Puffer
- add. 2 µl dNTP-Thio-Nukleotid Mix
- add. 2 µl verdünntes Klenow-Fragment (0,05 U/µl)
 - Verdünnung:
 - 1 µl Klenow-Fragment
 - add. 19 µl einer Lösung aus 2 µl 10x Klenow-Puffer
mit 18 µl H₂O verdünnt
- vorsichtig mischen
- 15 min 37°C
- add. 40 µl NaCl/Glycogen
- add. 150 µl Ethanol
- 15 min -70°C
- zentrifugieren 10 min, 12000 rpm, Eppendorffzentrifuge
- Pellet mit 200 µl 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen
- in 18,8 µl H₂O resuspendieren

2. Hydrolyse der DNA (mit einer Restriktionsendonuklease, die 5'-überstehende Enden erzeugt; auf der dem Insert zugewandten Seite der mcs oder im Insert selbst)

- 2,2 µl 10x Restriktionspuffer
- 18,8 µl DNA
- 1 µl Restriktionsendonuklease
- 2 h Inkubation im Temperaturoptimum
- 10 min 70°C
- 2 µl zur Analyse im Agarosegel

Deletionseinführung

- S1-Nuklease-Puffer vorbereiten: 33 µl S1-Puffer,
66 µl H₂O und
1 µl S1-Nuklease vermischen
- Puffer in 6 µl-Aliquots auf Eppendorffgefäße verteilen
- 20 µl DNA mit 20 µl 2x ExoIII-Puffer vermischen
- 3 min bei 37°C inkubieren
- 4 µl entnehmen und zu 6 µl S1-Nuklease-Puffer geben (Kontrolle)
- auf Eis stellen bis zum Ende der Deletionsreaktion
- add. 2 µl Exonuklease III
- Inkubation bei 37°C
- alle 3 min werden weitere 4 µl entnommen und
mit 6 µl S1-Nuklease-Puffer vermischt
- auf Eis aufbewahren
- nach Entnahme aller Proben gleichzeitige Inkubation bei RT für 30 min
- add. je 2 µl S1-Stop-Lösung
- 10 min 65°C

Analyse der Deletionen im Agarosegel

- 5 µl DNA aus den Deletionsansätzen mit 2 µl BPB-Lösung vermischen
- auf ein 1% Agarosegel auftragen

C.12.11 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz. Man lässt die Nukleinsäure mit einem Überschuss von zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer), die aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz stammen und strangspezifisch sind, reagieren. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Anhybridisierung der Primer und Auffüllreaktion mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase kommt es unter geeigneten Bedingungen zur exponentiellen, selektiven Amplifizierung der DNA-Fragmente.

„Taq PCR Core Kit“ (Qiagen)

Reaktionsansatz 100 µl

- PCR-Puffer, 10 x 10 µl
- MgCl₂, 25 mM 6 µl
- dNTP, je 10 mM 2 µl
- Primer A, 50 µmol 1 µl
- Primer B, 50 µmol 1 µl
- Taq-Polymerase 0,5 µl
- Template-DNA 2 µl
- DMSO 5 µl
- H₂O 73 µl
- Überschichten mit Mineralöl

Reaktionsbedingungen für die in dieser Arbeit verwendeten Primer-Paare:

- 5 min 95°C
- anschließend 30 Zyklen:
 - 1 min 95°C
 - 1 min T_{annealing}
 - 1 min 72°C
- 6 min 72°C
- 10 µl des PCR-Ansatzes werden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft

T_{annealing} - Temperatur der Primer-Anhybridisierung mit der Template-DNA ("Annealing")

T_{annealing} kann für jedes Primer-Paar:

- im Robocycler (Stratagene) mit Temperaturgradienten ermittelt werden
- als Anhaltspunkt kann die Temperatur, die 5°C unter der Schmelztemperatur (ermittelt nach "2+4"-Regel: 4 x (C+G) + 2 x (A+T), wobei A, G, T und C für die Anzahl der entsprechenden Basen in der Primersequenz stehen) liegt, dienen

Primer-Paar
GlnBI/GlnBII

T_{annealing}
55-60°C

Amplifikat
258 bp

C. MATERIAL & METHODEN

glnA1/glnA2	55°C	1,9 kb
glnB1/glnB2	55°C	0,5 kb
B upper/B lower	58°C	ca. 5 kb (funktioniert mit Taq-DNA-Polymerase nur mit den linearisierten Interposon-tragenden Plasmiden als Template)
Z upper/Z lower	52°C	ca. 5 kb (wie oben)
<i>A. diazotrophicus</i> 23S-rDNA I/II	60°C	411 bp (Kirchhof <i>et al.</i> , 1998)

C.12.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

- Fragment aus dem Gel ausschneiden und wiegen
auf je 100 mg Gel
- add. 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETSORB Suspension
- kurz vortexen
- 15 min 50°C, dabei alle 3 min mischen
- zentrifugieren 30 sec 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Überstand abziehen, Pellet in 300 µl JETSORB A1 resuspendieren
- zentrifugieren 30 sec, 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Überstand komplett abziehen, Pellet in 300 µl JETSORB A2 resuspendieren
- zentrifugieren 30 sec, 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Schritt wiederholen
- Pellet an der Luft trocknen lassen (RT, 37°C oder 50°C)
- add. 20 µl TE, resuspendieren
- 5 min 50°C, einmal mischen
- zentrifugieren 30 sec, 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen

Isolierung von Gesamt-DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel zur Verpackung in Phagen-Genbank

- *Sau3A*-hydrolysierte DNA auf einem 0,8% Agarosegel auftrennen
- Gel im UV-Licht unterhalb und oberhalb des 9-23 kb Bereichs ausschneiden (ca. 0,5 cm)
- Dialyseschlauch in den Schnitt oberhalb der 23 kb Bande einsetzen
- Richtung des Gellaufs ändern
- Gel weitere 30 sec-1 min laufen lassen
- DNA-Fragmente der gewünschter Größe werden im Puffer gesammelt
- DNA in ein Eppendorfgefäß pipettieren
- Fällung der DNA
- DNA-Pellet in TE-Puffer resuspendieren
- auf einem Agarosegel kontrollieren

C.12.13 DNA-Sequenzierung

(nach Sanger *et al.*, 1977)

Die DNA-Sequenzierung am Automated Laser Fluorescent (A.L.F.) DNA Sequencer der Firma Pharmacia beruht auf der nichtradioaktiven Didesoxy-Sequenziermethode (Kettenabbruch-Verfahren) nach Sanger (1977). Diese Technik basiert auf der enzymatischen Neusynthese der zu

sequenzierenden einzelsträngigen Matrizen-DNA mit T7-DNA-Polymerase. Es werden Fluorescein-markierte Primer mit einem freien 3'-Hydroxyl-Ende eingesetzt, die an komplementäre Bereiche der Template-DNA hybridisieren und von denen ausgehend die Neusynthese des komplementären Stranges erfolgt. Als Substrat für die DNA-Polymerase werden zusätzlich zu den normalen Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten (dNTP's) 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate (ddNTP's) verwendet. Der Einbau der ddNTP's in einen neusynthetisierten DNA-Strang bewirkt den Abbruch der Synthese. Die enzymatische Reaktion wird in vier Ansätzen, von denen jeder in geringen Mengen eines der vier Dideoxynucleotide enthält, durchgeführt. So entsteht eine Population von DNA-Molekülen (aus der zu sequenzierenden DNA abgeleiteten), die das gleiche Fluorescein-markierte 5'-Ende besitzen, sich jedoch in der Länge bis zum jeweiligen 3'-Ende hin unterscheiden. Während einer elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsansätze in einem sehr dünnen, hochauflösenden, hochprozentigen, denaturierenden Polyacrylamidgel werden die getrennten DNA-Moleküle mit Hilfe eines Argon-Lasers angeregt. Die von den markierten 5'-Enden (Primer) emittierte Fluoreszenz wird mittels Photodioden detektiert und mit Hilfe der A.L.F.-Manager-Software in eine Sequenz umgewandelt.

Sequenzierungsreaktion mit dem "AutoRead-Sequencing Kit" (Pharmacia)

Annealing des fluoresceinmarkierten Sequenzierprimers:

- ca. 5 µg der zu sequenzierenden Plasmid-DNA in ein Eppendorfgefäß überführen
- auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit sterilem Millipore auffüllen
- 2 µl (2 pmol/µl) fluoresceinmarkierten Sequenzierprimer (M13 „universal“ oder M13 „reverse“) hinzugeben
- DNA-Denaturierung durch Zugabe von 1 µl 1 M NaOH
- kurz vortexen und abzentrifugieren
- 5 min bei 70°C inkubieren
- 2 min bei RT abkühlen und bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Neutralisation durch Zugabe von 1 µl 1 M HCl
- 2 µl Annealing-Puffer zugeben
- 3 µl DMSO zugeben, mischen und abzentrifugieren
- Annealing-Ansatz 30-45 min im Wasserbad von 37°C auf RT abkühlen lassen

Durchführung der Sequenzierreaktion:

- für jeden Sequenzieransatz je 3 µl A-, C-, G- und T-Nukleotidmix in eine Mikrotiterplatte pipettieren
- 19 µl des Annealing-Ansatzes mit 1 µl Extensionspuffer versetzen
- 8 µl T7-DNA-Polymerase (7-9 U/µl) mit 14 µl T7-Verdünnungspuffer auf eine Endkonzentration von ca. 3 U/µl verdünnen
- 2 µl verdünnte T7-DNA-Polymerase pro Sequenzieransatz hinzugeben
- kurz vortexen und abzentrifugieren
- während dieser Zeit: Mikrotiterplatte 1 min im Heizblock auf 37°C vorwärmen
- je 5 µl Sequenzieransatz zu jedem der vier Nukleotidmixe hinzupipettieren
- nach exakt 5 min die Reaktion mit 5 µl Stopmix beenden
- (der Sequenzieransatz ist bei 4°C über Nacht stabil)
- vor dem Auftragen auf das Gel werden die Sequenzierproben 5 min auf der Oberfläche eines Wasserbades bei 85°C denaturiert
- Proben während des Auftragens auf Eis stellen
- 7-8 µl pro Ansatz auf das Sequenziergel auftragen

Cycle-Sequencing

- mit "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" (Amarsham Pharmacia Biotech) -

Reaktionsansatz:

- Pro Klon (24 µl DNA-Primer-Mix):
 - 1 – 2 µl Qiagen-DNA
 - 19 - 20 µl H₂O
 - 1 µl DMSO
 - 2 µl Primer (2,5 pmol/µl)
- je 6 µl Mastermix auf je vier Reaktionsgefäße verteilen
- je 1 µl der entsprechenden Nukleotidlösung (beinhaltet Thermo Sequenase) in der Reihenfolge A-C-G-T auf die Reaktionsgefäße verteilen
- mit je 10 µl Mineralöl überschichten

Reaktionsbedingungen:

- 4 min 95°C
- dann 30 Zyklen:

Denaturierung	30 sec 95°C
Annealing	30 sec 60°C
Extension	30 sec 72°C
- 3 min 72°C
- Aufreinigung der PCR-Reaktion von Ölresten über Parafilm-Methode
- add. 4 µl Formamid-Ladepuffer (Kit)
- keine Hitzedenaturierung der Proben vor dem Auftragen

Vorbereitung des Sequenziergels

- alle benötigten Geräte und Behälter nacheinander mit bidestilliertem Wasser, Millipore und 70% Ethanol waschen und mit Druckluft säubern
- Gelträger-Glasplatten, Probenkamm und Spacer mit Millipore und 70% Ethanol gründlich reinigen
- 400 µl Bindsilan mit 100 µl 10% (v/v) Essigsäure verdünnen und beide Gelträger-Glasplatten in Höhe der Geltaschen mit je 250 µl dieser Lösung silanisieren
- Platten erneut mit Millipore und 70% Ethanol reinigen (Bindsilan dabei nicht über die Glasplatten verteilen) und mit Druckluft säubern
- Gelträger-Glasplatten und Spacer mittels Klemmen zusammenbauen
- Gellösung ansetzen
 - 21,7 g Harnstoff
 - 6,6 ml LongRanger™ Gel Solution
 - 9 ml 10 x TBE (121,14 g/l Tris, 51,32 g/l Borsäure, 3,72 g/l EDTA)
 - auf 60 ml mit H₂O Millipore auffüllen
 - Lösung abfiltrieren und 10 min entgasen
- 300 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) hinzugeben und kurz umschwenken
- add. 30 µl TEMED, vorsichtig mischen
- Gel luftblasenfrei in die Gelkammer gießen und sofort Probenkamm einsetzen
- mindestens 1 h bei RT auspolymerisieren lassen

Sequenzierlauf

- Gelträger und Puffertanks in den A.L.F.-Express einsetzen und Elektroden anschließen
- Laufpuffer - 0,5 x TBE:
 - 12,11 g/2 l Tris
 - 5,13 g/2 l Borsäure
 - 0,37 g/2 l EDTA
- Elektrophoresepuffer einfüllen und Probenkamm ziehen
- Gerät einschalten und warten, bis Laufbedingungen erreicht sind
- Probenaschen mit Elektrophoresepuffer 3-4 x spülen
- Sequenzieransätze in der Reihenfolge A-C-G-T auftragen
- Lauf starten

Laufbedingungen:

Spannung	800 V
Stromstärke	60 mA
Leistung	25 W
Laserleistung	2 mW
Temperatur	55°C
Meßintervall	2 sec
Laufdauer	720 min

Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen wurden mit dem A.L.F. Manager der Firma Pharmacia ausgewertet. Danach wurden die DNA- und die abgeleiteten Proteinsequenzen mit den BLAST-Programmen (Altschul *et al.*, 1997) bei den ISREC (Swiss Institute for Experimental Cancer Research) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information) Servern mit den GenBank- oder EMBL-Datenbanken verglichen.

Anmerkung: Ein Teil die Sequenzierungen für diese Arbeit wurde vom „IIT-Biotech/Bioservice“-Sequenzierdienst in der Universität Bielefeld durchgeführt.

C.12.14 DNA-DNA-Hybridisierung

C.12.14.1 DNA-Transfer über Vakuumblotting

- für den schnellen Transfer der DNA -

- Vakuumblotapparat aufbauen
- Nylonmembran auflegen
- Agarosegel luftblasenfrei auf die Membran legen
- Unterdruck anlegen
- Gel mit Blotting Puffer 1 überschichten, 3 min (Depurinierung)
- Blotting Puffer 1 abziehen, mit Blotting Puffer 2 überschichten, 3 min (Denaturierung)
- Blotting Puffer 2 abziehen, mit Blotting Puffer 3 überschichten, 3 min (Neutralisierung)
- Blotting Puffer 3 abziehen, mit 20 x SSC überschichten
- ca. 45 min blotten
- DNA auf der Membran 5 min mit UV quervernetzen

C.12.14.2 Passiver DNA-Transfer - Kapillarblot

Vorbereitung des Gels:

- Gel mit der zu hybridisierenden DNA wird im EtBr-Bad angefärbt, im UV-Licht fotografiert und in 1 x TBE für mind. 1 h entfärbt.
- Depurinierung: Blotting-Puffer 1 aufs Gel pipettieren, 5 min inkubieren
- Puffer 1 entfernen
- Denaturierung: 2 x 15 min mit Blotting-Puffer 2 inkubieren
- Puffer 2 entfernen
- Neutralisierung: 2 x 15 min mit Blotting-Puffer 3 inkubieren
- der Transfer erfolgt über Nacht mit 20 x SSC

Blotaufbau:

- in ein Glasgefäß 6-8 Schichten Schwammtücher legen und diese mit 20 x SSC tränken
- darauf 2-3 Schichten Whatman 3MM-Papier schichten
- das Gel mit der Oberseite nach unten darauf legen
- Membran auflegen, die DNA-Seite markieren
- Dichtring aus Parafilm auf die Kanten der Membran legen
- einige Schichten Whatman 3MM-Papier darauf schichten
- eine Schicht Papiertücher (ca. 10 cm) auflegen
- ein Gewicht möglichst gleichmäßig auf den Stapel legen
- Gefäß mit Transferpuffer (20 x SSC) auffüllen, so dass das Gel nicht erreicht wird
- Transfer erfolgt über Nacht
- Membran im UV-Licht quervernetzen
- Filter bei RT zwischen zwei Whatman-3MM-Papieren trocknen
- bei 4°C aufbewahren oder sofort weiterbearbeiten

C.12.14.3 Markierung der DNA

a) Random Primed DNA Labelling

- zur Markierung kurzer linearer DNA-Fragmente (unter 1kb) -

- 0,5- 3 µg DNA auf 15 µl verdünnen
- denaturieren 10 min 98°C
- sofort auf Eis stellen
- add. 2 µl Hexanukleotid-Mix
- add. 2 µl Dig-11-dUTP-Nukleotidmix
- add. 1 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase
- 60 min 37°C
- add. 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0
- 10 min 65°C
- add. 2 µl 3 M NaAcetat, pH 7,5
- add. 75 µl EtOH (absolut)
- 20 min -20°C
- zentrifugieren 30 min, 13000 rpm, Eppendorfzentrifuge
- Pellet mit 50 µl 70% EtOH waschen

- Pellet trocknen
- resuspendieren in 50 µl TE
- bei -20°C lagern (in 5 ml Prähybridisierungspuffer)

b) Markierung der DNA mittels “Nick Translation“

(Sambrook *et al.*, 1989)

- zur Markierung von ccc-DNA und von langen linearen Fragmenten (über 1 kb) -

- 1 µg DNA in 20 µl TE
- add. 22 µl H₂O
- add. 5 µl Klenow-Puffer (10x)
- add. 2 µl Dig-11-dUTP-Nukleotidmix
- add. 0,5 µl DNase I (10⁻⁴ verdünnt)
- add. 0,5 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (10 u/µl)
- 90 min 15°C
- add. 4 µl 250 mM EDTA, pH 8,0
- 5 min 90°C
- Alkoholfällung
- Pellet in 50 µl TE resuspendieren
- add. 5 ml Prähybridisierungslösung, bei -20°C lagern
- vor der Hybridisierung Probe 10 min bei 98°C denaturieren

C.12.14.4 Überprüfung der Markierungsreaktion

- 1 - 2 µl markierte Sonden-DNA und verschiedene Verdünnungen von Kontroll-DNA (DIG-DNA Labeling Kit) auf eine Nylonmembran auftragen
- bei RT trocknen
- 5 min UV quervernetzen
- 1 min mit Dig-Puffer 1 waschen
- 30 min in Dig-Puffer 2 inkubieren (schütteln)
- 30 min in Dig-Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (1:10000) schütteln
- 2 x 15 min mit Dig-Waschpuffer waschen
- 2 min mit Dig-Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in Dig-Färbelösung im Dunklen färben und mit Kontroll-DNA vergleichen

C.12.14.5 Hybridisierungsreaktion

- Membran in Glaszylinder überführen
- 10 min in 2 x SSC waschen, RT
- 2 x SSC durch 20 ml Prähybridisierungslösung (68°C) ersetzen
- 1 - 2 h bei 68°C rollern
- Prähybridisierungslösung durch 5 ml denaturierte Probe ersetzen
- ü. N. bei 68°C rollern

C.12.14.6 Nachweisreaktion mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern

- Hybridisierungslösung abgießen
- 2 x 5 min mit je 100 ml 2 x Waschpuffer bei RT waschen
- 2 x 15 min mit je 100 ml 0,1 x Waschpuffer bei 68°C waschen
- 1 min 50 ml Dig-Puffer 1
- 30 min 50 ml Dig-Puffer 2
- Antikörperkonjugat (1:10000) vorbereiten: 2 µl in 20 ml Dig-Puffer 2
- 30 min RT
- 2 x 15 min waschen mit je 50 ml Dig-Puffer 1 + Tween80
- 2 min 50 ml Dig-Puffer 3
- Membran in Plastischale überführen
- add. Färbelösung (50 ml Dig-Puffer 3 mit 45 µl NBT + 35 µl BCIP)
- im Dunklen lagern, bis Banden sichtbar werden
- die Reaktion mit TE-Puffer oder mit H₂O abstoppen
- Membran trocknen

C.12.14.7 Plaque-Hybridisierung

- Verdünnungsreihe der Phagensuspension in SM-Puffer herstellen
- In Weichagar Röhrchen 20 µl je einer Verdünnungsstufe der Phagensuspension mit 200 µl der vorbereiteten Bakterienzellen (Vorbereitung s. S. 49) mischen
- Phagen für ca. 15 min bei 37°C an die Bakterienzellen adsorbieren lassen
- 3 ml flüssigen LBMM-Weichagar zu jedem Röhrchen gießen
- Bakterien/Phagensuspension in Weichagar auf LBMM-Platten gießen
- Weichagar erstarren lassen
- Platten ü. N. bei 37°C bebrüten
- Plaques auszählen und pfu (plaque forming units)/ml errechnen
- geeignete Verdünnungsstufe der Phagen auswählen
- Nylonfilter für 2 min auf die Platte legen, Orientierung genau markieren
- Filter für 2 min in Denaturierungspuffer inkubieren
- Filter für 5 min in Neutralisierungspuffer inkubieren
- Filter maximal 30 sec in Waschpuffer spülen
- Membranen für 5 min mit UV-Licht bestrahlen
- Phagen-Membranen mindestens 2 h prähybridisieren in Hybridisierungspuffer
- Hybridisierung und Nachweisreaktion erfolgen wie beim Southern-Blot

C. 13 Transformation

C.13.1 Transformation von *E. coli*

Herstellung kompetenter Zellen

- 20 ml TBY mit 0,2 ml Übernachtskultur animpfen
- Bakterien bei 37°C bis zu einem Titer von 2×10^8 Zellen (log-Phase) inkubieren
- zentrifugieren 5 min, 6500 rpm, 4°C, Rotor A 8.24
- Pellet in 10 ml 100 mM CaCl₂ (kalt) resuspendieren

- 1 h 0°C
- zentrifugieren 5 min, 6500 rpm, 4°C, Rotor A 8.24
- Pellet in 2 ml 100 mM CaCl₂ resuspendieren
- 200 µl für die Transformation verwenden oder
- Zellen in Aliquots mit 20 % (v/v) Glycerin bei -70°C lagern

Transformation

- Ligationsansatz (5 –20 µl)
- add. 200 µl kompetente Zellen
- 20 min 0°C
- 3 min Hitzeschock bei 42°C
- 5 min 0°C
- add. 1 ml TBY
- 30 - 45 min bei 37°C inkubieren bei Ampicillinresistenz, bei den anderen Antibiotika 90 min
- ausplattieren auf antibiotikahaltigem Selektivmedium

C.13.2 Elektroporation von *A. diazotrophicus*

(nach Meletzus & Eichenlaub, 1991)

Herstellung kompetenter *A. diazotrophicus*-Zellen

- eine Übernachtskultur von *A. diazotrophicus* in C2-Medium ca. 1:100 verdünnen und bis zur log-Phase wachsen lassen
- 10 min bei 4°C 6000 rpm abzentrifugieren
- Pellet resuspendieren in 20 ml 10% Glycerin (0°C)
- 2 x wiederholen
- 10 min bei 4°C 6000 rpm abzentrifugieren
- Pellet resuspendieren in 5 ml 10 % Glycerin

Elektroporation/Transformation:

- Elektroporationsküvetten mindestens 30 min in 70% EtOH einlegen, trocknen lassen
- Küvetten auf Eis vorkühlen
- 1 µg DNA in Elektroporationsküvette pipettieren
- 200 µl vorbereitete Zellen zugeben und vorsichtig mischen
- Küvette in Pulschammer stellen

Elektroporationsbedingungen:

Spannung	2,5 kV
Kapazität	25 µF
Widerstand	600-800 Ω
Feldstärke	12,5 kV/cm
Pulslänge	12-15 msec

- nach Elektroporation 1 ml C2-Medium zugeben
- 2 h bei 28°C inkubieren
- in Eppendorf-Reaktionsgefäße umfüllen
- 5 min bei 6000 rpm abzentrifugieren

- Überstand verwerfen
- Pellet in ca. 100 µl Rücklauf resuspendieren
- auf C2-Selektionsmedium ausplattieren
- 3-4 Tage bei 28°C inkubieren

C. 14 Herstellung der Phagen-Genbank

Ligation der 9-23 kb DNA-Fragmente mit dem λEMBL3/BamHI (0,4 µg Insert pro 1 µg Vektor)

- 1 µl λEMBL3/BamHI
- 2,5 µl Gesamt-DNA/Sau3A
- 0,5 µl 10 x Ligationspuffer
- 0,5 µl 10 mM ATP
- 2 Weiss U T4 DNA-Ligase (Stratagene)
- add. H₂O bis 5 µl
- ü. N. inkubieren

Verpackung

- „Sonic extract“ auftauen bei 0°C
- „Freeze-Thaw extract“ schnell zwischen den Fingern auftauen
- add. 1 µl vom Ligationsansatz zu dem „Freeze-Thaw extract“, 0°C
- add. 15 µl „Sonic extract“
- schnell mischen
- kurz zentrifugieren (3-5 sec)
- inkubieren 2 h, RT (höchste Effizienz wird nach Inkubation von 90-120 min erreicht)
- dann:
- add. 500 µl SM-Puffer
- add. 20 µl Chloroform
- kurz zentrifugieren
- bei 4°C aufbewahren

Vorbereitung von Indikator-Bakterienzellen

- Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRA (P2) in LBMM-Flüssigmedium bei 37°C bis zur log-Phase anziehen
- 10 min bei 4°C 4000 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet lösen in ½ Volumen 10 mM MgSO₄
- Zellen in sterilem 10 mM MgSO₄ bis zu OD₆₀₀ = 0,5 verdünnen

Titerbestimmung

- 5 µl verpackte DNA bzw. 5 µl 1:10 Verdünnung
- add. 200 µl Bakterienzellen
- inkubieren 15 min, 37°C
- add. 3 ml LBMM-Weichagar
- auf die LBMM-Platten ausplattieren
- pfu (plaque-forming-units) / ml errechnen

Amplifikation der Genbank

- Bakterienzellen vorbereiten
 - zu 600 µl Zellen add. 50000 pfu aus der Verpackungsreaktion
 - inkubieren 15 min, 37°C
 - add. 10 ml LBMM-Weichagar
 - ausplattieren auf 150-mm LBMM-Platten
 - inkubieren ü. N., 37°C
 - Platten mit Plaques mit 10 ml SM-Puffer bedecken
 - ü. N. bei 4°C inkubieren
 - SM-Puffer von allen Platten in 40 ml-Zentrifugenröhrchen sammeln
 - Platten mit 2 ml SM-Puffer spülen, Puffer sammeln
 - add. Chloroform (5% Endkonz.)
 - mischen
 - inkubieren 15 min, RT
 - zentrifugieren 10 min, 2000 x g
 - Überstand bei 4°C aufbewahren oder
 - Aliquots in 7% DMSO bei -80°C
-
- Screening der Genbank über Plaque-Hybridisierung (C.12.14.7, S. 63)

C. 15 RNA-Analytik

C.15.1 RNA-Isolierung aus *A. diazotrophicus*

C.15.1.1 Bakterienanzucht und Zellaufschluß

- 80 ml logarithmisch wachsende Zellen in LGI-Medium mit 100 mM NH₄Cl
- OD₅₆₀ der Kulturen ca. 0.7-0.8
- 10 min zentrifugieren, 4°C, 8000 rpm, Rotor A8.24
- Bakterienpellet auf Eis
- in 3,5 ml Guanidiniumthiocyanatpuffer resuspendieren
- add. 75 µl 30% Na-Laurylsarkosinat
- 10 sec in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- auftauen bei 4°C
- Ultraschallbehandlung, 15 min, Intervall 0,5 sec

C.15.1.2 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

- 3 ml RNA-Homogenat auf 1,5 ml CsCl/EDTA-Kissen pipettieren
- zentrifugieren 18 h, 20°C, 35000 rpm, Ausschwingrotor Tst55.5

C.15.2 RNA-Reinigung

- Überstand mit Pasteurpipette abziehen
- Röhrchenboden mit heißer Skalpellklinge abschneiden
- RNA-Pellet in 2 x 100 µl H₂O DEPC resuspendieren

- Fällung mit 400 µl EtOH, 20 µl 1M LiCl
- 20 min, -20°C
- 30 min zentrifugieren, 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- 1x mit 80% EtOH-DEPC waschen
- 5 min zentrifugieren, 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- RNA-Pellet im Vakuum trocknen
- resuspendieren in 50 µl H₂O DEPC
- 5 min, 70°C lösen

C.15.3 Northern Blot

C.15.3.1 Auftrennung der RNA im Formaldehyd-Agarosegel

(Maniatis *et al.*, 1982, modifiziert.)

Formaldehyd-Agarosegel gießen:

- 1,5 g Agarose
- add. 10 ml MOPS-Puffer
- add. 72 ml H₂O DEPC
- add. 17,8 ml 37% Formaldehyd
- aufkochen
- 0,5 cm dickes Agarosegel gießen, erstarren lassen
- Gelträger in Elektrophoresekammer einsetzen und mit 1x MOPS-Puffer überschichten

- 4,5 µl RNA-Probe
- add. 18 µl RNA-Probenpuffer
- add. 2 µl Formaldehydgelladepuffer
- add. 1 µl EtBr (0,5 mg/ml) in H₂O DEPC
- 10 min, 65 °C
- Proben sofort auf das Formaldehyd-Agarosegel auftragen
- Gel ca. 2 h bei 80 V laufen lassen
- Banden im UV-Licht ($\lambda = 345 \text{ nm}$) fotografieren

Transferbedingungen

- RNA durch zweimaliges Spülen des Gels in 10 x SSC-Lösung (DEPC behandelt) für 20 min unter leichtem Schütteln denaturieren
- Transfer der RNA auf Nylonmembran mittels Vakuumtransfer mit 10 x SSC-Lösung als Transferpuffer, ca. 3 h
- Markierung der geblotteten, EtBr-gefärbten Marker-Banden (RNA-Leiter, 23S, 16S, 5S rRNA) auf dem Filter mit Bleistift
- Fixierung der RNA auf dem Filter mittels UV-Bestrahlung
- Filter direkt weiter verwenden oder bei RT in Whatman-3MM-Papier lagern

C.15.3.2 Markierung der RNA-Sonden (*In vitro* Transcription Kit, Promega)

Die *in vitro*-Transkription ist ein Verfahren, bei dem RNA zellfrei *in vitro* synthetisiert wird. Für die Herstellung der Transkripte werden spezielle Klonierungsvektoren (Transkriptionsvektoren)

eingesetzt, die den Promotor des Gens für eine phagenkodierte RNA-Polymerase in der Nähe einer Klonierungsstelle tragen. Hinter diesen Promotor in den Vektor klonierte Fremd-DNA wird spezifisch unter der Kontrolle dieses Promotors abgelesen und liefert bei der Transkription genspezifische mRNA im Mikrogrammbereich, wenn die vier Ribonukleotid-Triphosphate der RNA-Polymerase als Substrat angeboten werden. Oft verwendet man bidirektionale Vektoren, in denen eingebaute Fremdgene von beiden Seiten von zwei verschiedenen, in entgegengesetzter Richtung abgelesenen Promotoren flankiert sind. Auf diese Weise kann die mRNA, je nach verwendetem Promotor, von dem einen oder von dem anderen Strang des klonierten Fremdgens gebildet werden.

- DNA-Template (in pGEM3Z mit SP6- und T7-Promotoren) linearisieren, um „run-off“-Transkripte zu erhalten
- Markierungsreaktion ansetzen:
 - 16 µl Template-DNA
 - 3 µl DTT
 - 6 µl 5 x Transkriptionspuffer
 - 3 µl Dig-RNA-Labeling-Mix
 - 0,5 µl RNasin
- inkubieren 2 h bei 37°C
- add. 2 µl DNaseI
- 15 min, 37°C
- add. 2 µl EDTA
- add. 5 ml Prähybridisierungslösung

C.15.3.3 Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

- der Filter wird mit der Seite, an die die RNA gebunden ist, nach innen in einen Hybridisierungszyylinder überführt
- Zugabe von 15 ml Prähybridisierungslösung
- 2 h bei 42°C inkubieren
- Prähybridisierungslösung gegen 5 ml Hybridisierungslösung, in der sich frisch denaturierte DNA- (oder RNA)-Proben befinden, auswechseln
- ü.N. bei 68°C weiter inkubieren,
- Filter anschließend zweimal in 2 x SSC, 0,1% SDS bei RT waschen
- Filter mindestens zweimal mit vorgewärmten 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 68°C waschen
- 1 min 50 ml Dig-Puffer 1
- 30 min 100 ml Dig-Puffer 2
- Antikörperkonjugat (1:10000 in 20 ml Puffer 2, 2 µl)
- 30 min RT
- 2 x 15 min waschen mit je 50 ml Puffer 1 + Tween80
- 2 min 50 ml Puffer 3
- 1 ml CSPD-Chemilumineszenz-Reagenz auf der Membran verteilen und in Plastikfolie einschweißen
- 15 min bei 37°C inkubieren
- Röntgenfilm in einer Expositionskassette auf die Membran legen
- im Dunkeln 30 min inkubieren
- Film entwickeln, fixieren, trocknen und auswerten

C. 16 Proteinbiochemische Techniken

C.16.1 Zellschnellaufschluss für SDS-PAGE

- Kultur anwachsen lassen und OD₄₅₀ bestimmen
- 1,5 ml Kultur in Eppendorfgefäß überführen
- zentrifugieren 5 min bei 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet in Probenpuffer resuspendieren - 30 µl/OD
- inkubieren 10 min bei 100°C
- zentrifugieren 5 min bei 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- 3 - 15 µl auf SDS-PAGE auftragen
- den Rest bei -20°C lagern

oder

- Bakterien anziehen bis log-Phase
- OD₆₀₀ messen
- 500 µl dieser Bakterienkultur + 200 µl Probenpuffer
- 3 - 5 min 90°C
- die aufzutragende gleiche Proteinmenge anhand der OD₆₀₀-Werte ausrechnen
- 3 - 15 µl auf SDS-PAGE auftragen
- Rest bei -80°C lagern

C.16.2 Zellaufschluss über Ultraschall

- Der Ultraschallaufschluss erfolgte mit dem Gerät Labsonic U, B. Braun Diessel Biotech, Nadelschwingsonde 40 Ti (Länge 127 mm, Durchmesser 4 mm) -

- 200 ml Zellen spät-logarithmische Kultur
- zentrifugieren 10 min, 6000 rpm, 4°C, A6.14
- resusp. in 1 ml Tris-Puffer, pH 7,1
- auf Eis stellen
- Ultraschallsonde in Suspension einführen
- Ultraschallparameter: 80 - 90 Watt, Pulsdauer 0,5 s, 5 min, Eis
- Ultrazentrifugation 60 min, 35000 rpm, 4°C, Tst55.5
- Protein-Rohextrakt lagern bei - 80°C

C.16.3 Zellaufschluss mit RIBI Cell Fractionator

- diese Methode wurde verwendet, um *A. diazotrophicus*-Zellen unter anaeroben Bedingungen aufzuschließen -

- Bakterien anziehen ü. N. in Vollmedium
- 2 l Minimalmedium mit 10 ml Übernachtskultur animpfen
- bis OD₆₀₀ = 0,7-0,8 bei 30°C mit Schütteln anziehen
- zentrifugieren 25 min, 7000 rpm.
- Pellet im flüssigen Stickstoff aufbewahren

- Puffer ansetzen: erst DT (2 mM) abwiegen und dann in einem kleinem mit Gummideckel geschlossenem Gefäß mit Puffer (100 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,1; add. 2 mM MnCl₂) anaerob unter Vakuum mischen und lösen
- Puffer unter N₂-Atmosphäre halten
- Bakterienpellet im 7 ml Puffer resuspendieren
- mit RIBI Cell Fractionator aufschliessen (anaerob)
- 20 min zentrifugieren bei 10000 rpm in Kühlzentrifuge
- Überstand aliquotieren in 2 ml-Eppendorfgefäße
- in flüssigem Stickstoff aufbewahren

C.16.4 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)

Das "Pierce Protein Assay Reagent" ist ein hochempfindliches System für die spektrophotometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen, das auf der Reaktion von Proteinen mit Cu²⁺ in alkalischem Milieu basiert. Cu²⁺ wird dabei zu Cu⁺ reduziert. Für den Nachweis dieser Reaktion wird Bicinchoninsäure (spezifische Nachweisreagenz für Cu⁺) verwendet werden. Das System ist kompatibel mit ionischen und nichtionischen Detergenzien.

- 50 µl Proteinprobe mit 950 µl Arbeitsreagenz (100 Teile Reagenz A, 2 Teile Reagenz B) mischen
- inkubieren 30 min, 37°C
- Reaktionsgefäße auf RT abkühlen
- Messung der Extinktion bei 562 nm (Blindwert: 50 µl H₂O bidest., add. 950 µl Arbeitsreagenz)
- Proteinkonzentration der Probe mit unbekanntem Proteingehalt aus der Eichkurve ausrechnen

Erstellung einer Eichkurve:

- Aus einer BSA-Stammlösung (10 mg/ml) werden Verdünnungsstufen mit folgenden Proteinendkonzentrationen erstellt: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml BSA.
- Proteinbestimmung wie angegeben; Auftragen der Konzentration gegen die Extinktion.

C.16.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit „BioRad Protein Assay“

- 2 µl Proteinlösung
- 798 µl H₂O
- 200 µl Reagenz
- inkub. 10 min
- OD₅₉₅ messen

Parallel werden die Ansätze für die Erstellung einer Eichkurve gemessen: 1 µl, 2 µl und 5 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml). Für die Eichkurve wird die Extinktion bei 595 nm gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Um Proteinkonzentration genauer zu bestimmen, werden Ansätze 2 oder 3 mal angesetzt und Mittelwert der OD₅₉₅ wird verwendet.

C.16.6 SDS-PAGE

(Laemmli, 1970, modifiziert)

SDS-Page 18% (mit Protogel-30%Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, Biozym), für 5 kleine Gele (Pharmacia)

Sammelgel

- 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 18 ml
- 4 x Tris-HCl/SDS, pH 8,8 7,5 ml
- H₂O 4,5 ml
- 10% APS 100 µl
- TEMED 20 µl

Trenngel

- 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 1,95 ml
- 4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 3,75 ml
- H₂O 9,15 ml
- 10% APS 75 µl
- TEMED 15 µl

SDS-PAGE 17,5%

Sammelgel

- 30% Acrylamid 0,65 ml
- 1% Bisacrylamid 0,5 ml
- 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,47 ml
- H₂O Millipore 2,15 ml
- 10% SDS 45 µl
- 10% APS 25,5 µl
- TEMED 6 µl

Trenngel

- 30% Acrylamid 4,38 ml
- 1% Bisacrylamid 0,55 ml
- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,7 1,68 ml
- H₂O Millipore 0,8 ml
- 10% SDS 100 µl
- 10% APS 50 µl
- TEMED 10 µl

- Glasplatten und Spacer reinigen und mit EtOH entfetten
- Elektrophoreseeinheit zusammenbauen und mit Agarose (1,5% in H₂O) abdichten
- Trenngel luftblasenfrei gießen und mit Wasser überschichten
- 30 min - 1 h auspolymerisieren lassen
- Wasser entfernen, Sammelgel gießen und Kamm einsetzen
- mindestens 1 h polymerisieren lassen
- Kamm und unteren Spacer ziehen, Gel in Elektrophoresekammer einbringen und Geltaschen mit Elektrophoresepuffer spülen (Laufpuffer RB)
- in Probenpuffer aufgenommene Proben 5 min bei 100°C inkubieren

- auf RT abkühlen lassen
- Gel beladen
- Proben mit ca. 10 mA in das Gel einlaufen lassen, dann 20 mA
- Gel entnehmen und mit Comassie Blue 30 min färben, dann entfärben

C.16.7 Protein Blot mit dem SemiDry Elektrobloetter

- SDS-PAGE laufen lassen
- Gel entnehmen und ca. 30 min in Transferpuffer äquilibrieren
- Whatman 3MM Papier und Hybond-P-Membran auf Gelgröße schneiden, in Transferpuffer anfeuchten
- Elektrobloetter beschicken:
- 3 Lagen Whatman 3MM Papier
- Membran
- Acrylamidgel
- 2 Lagen Whatman 3 mm Papier
- Gerät schließen
- Spannung anlegen: 10-12 V const.
- 30 - 70 min blotten

C.16.8 Western Blot

- 18% SDS-PAGE
- 1 h Semy-Dry-Transfer mit Transferpuffer
- Membran 45 min in TBS-T-Puffer+ 5% Milchpulver inkubieren (Blocking)
- 3x schnell in TBS-T-Puffer waschen
- add. 1. Antikörper mit der entsprechender Verdünnung in TBS-T-Puffer + 5% Milchpulver
- 30 - 45 min bei RT inkubieren
- ü. N. in Kühlraum
- 1h RT
- 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer waschen
- add. 2. Antikörper (1: 10000 verdünnt) in TBS-T-Puffer + 5% Milchpulver
- 2. Antikörper für den Nachweis mit ECL™ Anti-Rabbit-IgG-HRP
- 2. Antikörper für den Nachweis mit NBT-BCIP Anti-Rabbit-IgG-AP
- 1 h RT
- waschen in TBS-T-Puffer
- entwickeln mit ECL™-System

C.16.8.1 Nachweisreaktion mit ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech)

- Detection Reagenz 1 und 2 (1:1) mischen
- Membran mit der Lösung bedecken (0,125 ml/cm²)
- 1 min inkubieren
- Membran in eine Cellophanfolie ohne Luftblasen einwickeln
- Mit Röntgenfilm in eine Expositionskassette legen und 1 min, 5 min und 10 min exponieren (im Dunklen)

- Film entwickeln

C.16.8.2 Nachweisreaktion mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugat

- Membranen nach dem Waschen mit TBS 3 x 10 min mit Detection-Puffer waschen
- Membranen in Färbelösung (33 μ l NBT und 24 μ l BCIP in Detection-Puffer) inkubieren bis Banden sichtbar werden
- Reaktion abstoppen: 2 x 5 min H₂O Millipore

C.16.9 Radioaktiver Nachweis der Uridylylierung von Proteinen

Reaktion (1)

- 60 mM MgCl₂ 5 μ l
- Proteinextrakt 0,1 mg
- [α -³²P]UTP 3 μ l (1:500 in Tris-Puffer verdünnt, 9,25 MBq, ~400 Ci/mmol)
- Tris-Puffer, pH 7,1 zu 50 μ l auffüllen
- 45 - 60 min 30°C

dann

- 3 μ l dieses Ansatzes
- add. 12 μ l Tris-Puffer
- add. 8 μ l Probenpuffer
- 1,5 - 3 min 90°C
- 15 μ l davon aufs SDS-PAGE 18% auftragen

C.16.9.1 Behandlung mit SVPD („snake venom phosphodiesterase“)

Reaktion (2):

- 20 μ l Reaktionsansatz (1)
- add. 2,5 μ l SVPD
- add. 50 μ l SVP-Puffer 2 x
- add. 27,5 μ l H₂O
- 30 min 30°C
- 15 μ l dieses Ansatzes
- add. 8 μ l Probenpuffer
- 1,5 - 3 min 90°C
- 15 μ l davon aufs SDS-PAGE 18% auftragen

C. 17 Analyse der Genexpression über GUS-Aktivitäts-Messungen

Das Enzym β -Glucuronidase spaltet die glycosidische Bindung des Substrates 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG). Dabei entsteht D-Glucuronsäure und das Fluorochrom 4-Methylumbelliferon (MU). Im alkalischen Milieu wird das Fluorochrom durch Licht der Wellenlänge von 363 nm angeregt und emittiert eine Fluoreszenzwellenlänge von 447 nm, die im Fluorometer gemessen werden kann.

Zuerst wird eine Eichkurve erstellt, in der Fluoreszenz gegen die MU-Konzentrationen (0, 200, 400, 600 und 800 nM) gemessen wird und eine Steigung der Regressionsgeraden berechnet wird (nM/ Δ Intensität).

Anhand der Lichtemission des Produktes der Enzymreaktion kann der Substratumsatz pro Zeiteinheit berechnet werden, der eine Aussage über die Enzymkonzentration ermöglicht.

Die GUS-Aktivität wird in nM MU/OD₅₈₀/min berechnet:

$$\frac{\text{nM MU (in Fluorometer gemessene Fluoreszenz x aus der Eichkurve berechnete Steigung der Regressionsgeraden)}}{\text{OD}_{580} \times \Delta t \text{ (5 min)}} \quad \times 25$$

Der Verdünnungsfaktor 25 ergibt sich aus den zu der Messung eingesetzten Volumina.

- Bakterienkulturen ü. N. bei 28°C in C2-Medium inkubieren
- In LGI-Medium mit 1 mM bzw. 20 mM NH₄Cl überimpfen
- bis spät-logarithmischen Phase inkubieren
- OD₅₈₀ bestimmen
- 1 ml der Kulturen 10 min zentrifugieren, 4°C, 13000 rpm, Eppendorfszentrifuge
- Pellet in 250 μ l GUS-Extraktionspuffer resuspendieren
- zu 50 μ l resuspendierter Zellen add. 200 μ l GUS-Extraktionspuffer
- add. 250 μ l GUS-Assaypuffer
- mischen
- bei 37°C inkubieren für 5, 10, 15 und 20 min
- jeweils 100 μ l des Reaktionsansatzes mit 1,4 ml Stoppuffer mischen
- GUS-Aktivität im Fluorometer messen

C.18 Untersuchung der physiologischen Rolle der *glnB*, *glnK*₁ und *amtB*₁-Mutanten in *A. diazotrophicus*

C.18.1 Wachstum auf dem Stickstoff-freiem LGI-Weichagar

Wachstum auf diesem stickstofffreien Medium ist nur möglich, wenn die Fähigkeit zur N₂-Fixierung vorhanden ist. Spezifisch für *A. diazotrophicus* in LGI-Medium ist, dass dieses Bakterium während des diazotrophen Wachstums etwas unterhalb der Oberfläche in der mikroaeroben Zone wächst.

- Bakterienzellen von einer frischen Platte oder aus der Vorkultur mit LGI-Flüssigmedium oder mit H₂O waschen (2 x)
- Pellet in LGI resuspendieren
- 2-3 ml Weichagar mit 20 - 50 μ l Bakteriensuspension animpfen
- bei 30°C inkubieren

Testmedien:

LGI Stickstoff-frei
LGI + 20 mM NH₄Cl
LGI + 1 mM NH₄Cl

Kontrolle:

C2 (Vollmedium)

C.18.2 Aminosäureplatten-Test

In diesem Test wird geprüft, ob und welche Aminosäuren vom Organismus als einzige Stickstoffquelle verwendet werden können bzw. es werden die Phänotypen der Mutanten bezüglich der Aminosäureverwertung bestimmt und mit dem Wildtyp verglichen.

Zum Vergleich der verschiedenen Mutanten werden Bakterien von Platte oder aus Flüssigkulturen mit stickstofffreiem Minimalmedium gewaschen, und die gleiche Bakterienanzahl wird auf LGI mit 0,5 g/l der jeweiligen Aminosäure als alleiniger N-Quelle ausplattiert. Wenn sich Unterschiede im Wachstum zwischen Mutanten und dem Wildtyp zeigten, wurde der Test mit entsprechendem Flüssigmedium wiederholt und der Bakterientiter (OD_{600}) alle 2 Stunden bestimmt.

C.18.3 Messung der Nitrogenase-Aktivität mittels ARA („acetylene reduction assay“)

Diese Methode erlaubt den Nachweis und die Quantifizierung des Ethylens, das in einer von der aktiven Nitrogenase katalysierten Reaktion gebildet wird. Die Messung erfolgt in einem Gaschromatograph (GC); die Identifizierung von Ethylen ist über seine Retentionszeit im Chromatogramm möglich (Abb. 13, A). Für die Bestimmung der Menge des gebildeten Ethylens wurde zuerst eine Eichkurve mit Ethylen erstellt: Ethylen wird in einem mit einem Gummiseptum verschlossenem Reagenzglas bis zu einer Endkonzentration von 0,1% (1:1000) verdünnt (z. B. 16,5 μ l in 16,5 ml Volumen) und 2 – 10 μ l der Verdünnung werden mit einer 10 μ l-Hamilton-Spritze in den GC eingespritzt. Anschließend wird das Volumen des eingespritzten Ethylens gegen die gemessenen GCE (GC-Einheiten) aufgetragen. Die absolute Konzentration wird aus den Angaben des Herstellers von Ethylen ausgerechnet (z. B. 1 ml aus Druckflasche \sim 42 μ mol; 1 ml 0,1%igen Verdünnung \sim 42 nmol. Man kann dann Umrechnungswert angeben (z. B.: 1 Mio GCE \sim 0,3 nmol C_2H_4 , Abb. 13, B)

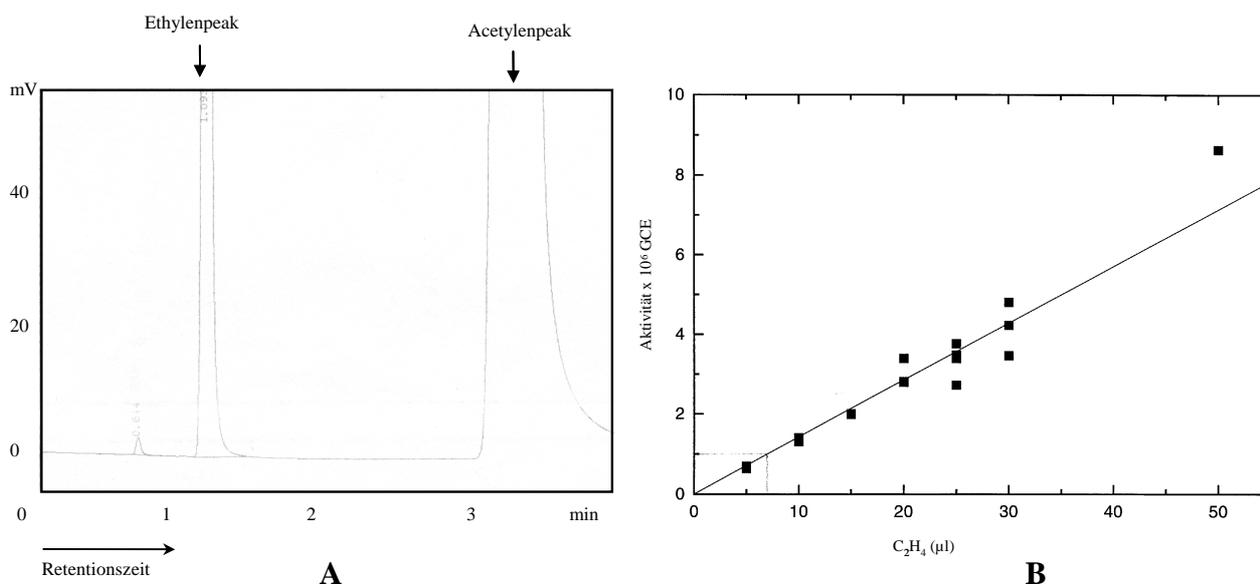


Abb. 13. Messung der Nitrogenase-Aktivität mit dem GC. A. Chromatogramm des Acetylen-Reduktionstestes zum Nachweis des aus Acetylen in einer von Nitrogenase katalysierten Reaktion gebildeten Ethylens. **B.** Eichkurve zur Quantifizierung der Acetylen-Reduktion.

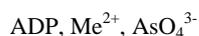
Gaschromatographische Bedingungen:

Säule:	mit Alumina (Al ₂ O ₃ ; 80-100 mesh) gepackte Metallsäule (Chrompack), in den Dimensionen: 6' x 1/8" x 2 mm ss
Detektor:	Flamenionisationsdetektor (FID)
Brenngase:	Wasserstoff (Flussrate 30 ml/min) Druckluft (Flussrate 400 ml/min)
Trägergas:	Stickstoff (Flussrate 30 ml/min)
Säulendruck:	210 kPa
Temperaturen:	Einlaß – 100°C Ofen – 140°C Detektor – 200°C

- Bakterien ü. N. in 5 ml Flüssigmedium C2 animpfen
- von dieser Übernachtskultur in frisches LGI + 1 mM NH₄⁺ oder LGI + 20 mM NH₄⁺ überimpfen und bis zur log-Phase inkubieren
- 1 ml Bakterienkultur in Weichagar-Röhrchen pipettieren
- Röhrchen mit Gummistopfen luftdicht verschließen
- Röhrchen mittels Insulin-Spritze mit 1 ml Acetylen begasen
- bei 28°C 2-6 h inkubieren
- 50 µl Gasgemisch mit Hamilton-Spritze aus dem Röhrchen entnehmen
- in den Gaschromatographen injizieren
- die Werte der Acetylen-Reduktion ablesen

C.18.4 Bestimmung der γ -Glutamyltransferase-Aktivität der Glutamin-Synthetase

Wenn in der von GS katalysierten Reaktion Ammonium durch Hydroxylamin und Orthophosphat durch Arsenat ersetzt wird, katalysiert die Glutamin-Synthetase auch eine γ -Glutamyltransferase Reaktion sogar in Abwesenheit von ATP (Purich, 1998), wobei Metall-Ion entweder Magnesium oder Mangan sein kann:



Diese Reaktion wird für die Bestimmung der Aktivität des nicht adenylierten Enzyms (stimuliert durch Mg²⁺) oder der Aktivität beider (der adenylierten und der nicht adenylierten) Formen der Glutamin-Synthetase (mit Mn²⁺) benutzt, indem die Menge des gebildeten γ -Glutamylhydroxamats in Anwesenheit von FeCl₃ kolorimetrisch bei 540 nm bestimmt wird (Arcondeguy *et al.*, 1996; Bender *et al.*, 1977; Purich, 1998; Shapiro & Stadtman, 1970; Soliman & Nordlund, 1989). Die Ergebnisse werden als µmol gebildeten γ -Glutamylhydroxamat/min/mg Protein dargestellt (für 1 µmol γ -Glutamylhydroxamats bei 540 nm $\epsilon = 0,532$).

für die Reaktion mischen:

- Transferase Puffer 20 ml
- 20 mM Glutamin 4 ml
- 16 mM ADP 1 ml

- 16 mM MnCl₂ 1 ml
- mit H₂O auf 40 ml auffüllen

<u>Reaktion:</u>	<u>Mn²⁺-Aktivität</u>	<u>Mg²⁺-Aktivität</u>
	900 µl Puffer	900 µl Puffer
	100 µl H ₂ O	100 µl 200 mM MgCl ₂
	10 µl Protein-Extrakt	10 µl Protein-Extrakt

- 10 min 30°C
- add. 1 ml Stop-Mix
- OD₅₄₀ bestimmen (Referenz - ohne Extrakt)

C.18.5 Messung der [¹⁴C]-Glutamin-Aufnahme

(nach Toukdarian *et al.*, 1990, mod.)

In diesem Experiment wurde die Fähigkeit des *A. diazotrophicus* zur Glutamin-Aufnahme untersucht. Bakterien wurden in N-freiem LGI-Medium angezogen. Als Kontrolle wurde *E. coli* verwendet und in M9-Minimalmedium angezogen.

- Bakterien in entsprechenden Medien bis zur log-Phase anziehen
- 10 ml Kultur 5 min zentrifugieren, 5000 rpm, Rotor A8.24
- waschen mit 10 ml Minimalmedium
- resuspendieren in 10 ml Testmedium
- 2 h inkubieren unter Schütteln bei 30°C bzw. bei 37°C für *E. coli*
- OD₆₀₀ messen
- 490 µl Bakterienkultur
- add. [¹⁴C]Glutamin zu Endkonz. 3,75 µM (spezifische Aktivität 267 mCi/mmol) – 10 µl
- inkubieren 1 min
- 50 µl auf einen Polycarbonatfilter (Diagonal)(auf einem mit H₂O eingefeuchteten Whatman Papier) geben
- mit Vakuum schnell filtrieren
- Filter kurz trocknen
- Filter in ein Gefäß mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit überführen
- Radioaktivität mit einem Scintillationszähler messen
- von Bakterien aufgenommene Radioaktivität als cpm/OD₆₀₀ darstellen
- Um die radioaktive Hintergrundstrahlung der Bindung von [¹⁴C]-Glutamin auf den Filter zu bestimmen, wurde die gleiche Menge und die Konzentration des [¹⁴C]-Glutamins in H₂O auf den Membranfilter gegeben und wie beschrieben weiter behandelt.

C.18.6 [¹⁴C]-Methylammonium-Aufnahme

(nach Michel-Reydellet *et al.*, 1998; Soupene *et al.*, 1998, mod.)

Vorbereitung der Bakterien:

- Bakterien in Minimalmedium LGI mit 1 mM NH₄⁺ bis zu OD₅₈₀ = 0,5 anziehen
- 5 min bei 5 000 rpm (A8.24) zentrifugieren
- Bakterienpellet mit LGI (N-frei) waschen

- 2 x wiederholen
- in LGI (N-frei) resuspendieren
- 2 h bei 30°C inkubiert
- Bakterien zentrifugieren und resuspendieren bis zu $OD_{580} = 1$
- 10 ml dieser Kultur für den Methylammonium-Aufnahme-Test verwenden

^{14}C -Methylammonium-Aufnahme:

- Bakterien 15 min bei 30°C präinkubieren
- add. 5 μl ^{14}C -Methylammonium (spezifische Aktivität 50 mCi/mmol)
- Proben (0,5 ml) zu den verschiedenen Zeitpunkten (1 – 20 min) entnehmen
- schnell filtrieren (Membranfilter Millipore HA, 0,45 μm)
- 2 x mit sterilfiltriertem (um ungelöste Partikeln in diesem Waschpuffer zu entfernen) LGI waschen
- Filter in ein Gefäß mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit überführen
- Radioaktivität mit einem Scintillationszähler messen
- Methylammonium-Aufnahme-Aktivität bestimmen (in pmol/ml/ OD_{580}):

cpm/(spezifische Aktivität x v x OD_{580}),

v = Probenvolumen

die spezifische Aktivität = 100 cpm/pmol (experimentell bestimmt)

D. Ergebnisse

D. 1 Identifizierung *glnB*-homologer Bereiche im *Acetobacter diazotrophicus* - Genom über PCR

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Informationen zu Komponenten der Ammoniumsensing-Kaskade vom endophytischen in Zuckerrohr lebenden *Acetobacter diazotrophicus* vor. Um in *A. diazotrophicus* zum *glnB*-Gen homologe Genloci, die für den Signaltransduktor P_{II} kodieren, zu identifizieren, wurden zwei Methoden angewendet: die heterologe Hybridisierung und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von degenerierten Primern.

Für die heterologe Hybridisierung wurde als Sonde das in *E. coli* klonierte *glnB*-Gen aus *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998) verwendet. Hybridisierungen erfolgten unter Verwendung von Gesamt-DNA des *A. diazotrophicus*-Wildtypstammes PAL5 nach Hydrolyse mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Es wurde versucht, unter Bedingungen unterschiedlicher Stringenz (Hybridisierungstemperaturen 45 - 65°C) ein *glnB*-homologes Gen in diesem Organismus nachzuweisen. Diese Methode war jedoch nicht erfolgreich, es traten keine spezifischen Hybridisierungssignale in Southern Hybridisierungs-Experimenten. auf.

In einem zweiten Ansatz wurden die DNA-Sequenzen der zu Beginn der Arbeit in der „Genbank“-Datenbank verfügbaren *glnB*-Gene verglichen und degenerierte *glnB*-Primer für die PCR-Reaktion abgeleitet (Abb. 14). In der anschließenden PCR mit Gesamt-DNA aus *A. diazotrophicus* konnten DNA-Amplifikate der zu erwartenden Größe (258 bp) erhalten werden. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde hierzu bei einem Temperatur-Gradienten von 44-66°C durchgeführt, wobei eine spezifische Fragment-Amplifizierung bei Annealing-Temperaturen von 55-60°C beobachtet wurde.

Zur weiteren Analyse erfolgte eine Klonierung der PCR-Produkte unter Verwendung des Vektors pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) in *E. coli* und eine Ermittlung der DNA-Sequenz der Amplifikate. Interessanterweise zeigte sich, dass zwei unterschiedliche Amplifikate gleicher Größe erhalten wurden und beide amplifizierte DNA-Fragmente sowohl auf DNA-Ebene als auch unter Verwendung der abgeleiteten Proteinsequenz signifikante Homologien zu *glnB*-Genen bzw. den korrespondierenden Genprodukten anderer Organismen aufwiesen. Ein direkter Vergleich ergab, dass diese auf DNA- bzw. Proteinebene zu 70% bzw. 64% identisch sind. Die beiden resultierenden Plasmide wurden als pOP42 und pOP75 bezeichnet und im weiteren als Sonden für die Southern Hybridisierung zum Nachweis der *glnB*-homologen Gene eingesetzt (Abb. 18, S. 83)

D. ERGEBNISSE

<i>A. brasilense</i>	ATGAAGAAGATCGAAGCCATCATTAAGCCGTTCAAACCTCGACGAAGTGAAGGAAGCCCTT
<i>E. coli</i>	ATGAAAAAGATTGATGCGATTATAAAACCCCTTCAAGCTGGACGATGTCCGGAACGACTG
<i>B. japonicum</i>	GTGAAGAAAATCGAAGCCATCATCAAGCCGTTCAAGCTCGACGAGGTGA--GGAGCCTTT
<i>K. pneumoniae</i>	ATGAAAAAGATTGATGCGATTATAAAACCTTTCAAACCTGGATGACGTGCGCGAAGCGCTG
<i>R. capsulatus</i>	ATGAAGAAGGTCGAGGCGATCATCAAGCCGTTCAAGCTCGATGAAGTGAAGGAAGCGCTT
	**** *
	 Primer <i>GlnBI</i>
<i>A. brasilense</i>	CACGAAGTCGGCATCAAGGCCATCACCGTCACCGAGGCCAAGGGCTTCGGCCGTCAGAAG
<i>E. coli</i>	GCCGAAGTCGGTATTACCGGCATGACCGTGACCGAAGTGAAGGCTTTGGTGCAGAAA
<i>B. japonicum</i>	CA--GGAGTCGGCCTTCAGGGCATCACCGTCACCGAGGCCAAGGGTTTTGGCCGGCAGAAG
<i>K. pneumoniae</i>	GCCGAAGTCGGCATCACCGGCATGACCGTAACGGAAGTGAAGGCTTTGGCCGCCAGAAG
<i>R. capsulatus</i>	CAGGAAGCGGGGATTCAAGGGCTGACCGTGATCGAGGTGAAGGCTTCGGCGGCCAAAAG
	* *
<i>A. brasilense</i>	GGGCACACCGAGCTGTACCGCGGCGCGGAGTATGTGGTCGACTTCCTGCCAAGGTGAAG
<i>E. coli</i>	GGCCATACCGAGCTGTACCGCGGCGCGGAGTATATGGTGGATTTTCTGCCAAAAGTGAAG
<i>B. japonicum</i>	GGACACACGGACCTGTACCGCGGCGCAGAATACATCGTCGACTTCCTGCCAAGGTGAAG
<i>K. pneumoniae</i>	GGGCATACCGAGCTGTACCGCGGCGGAGTATATGGTGGATTTTCTGCCAAAAGTGAAG
<i>R. capsulatus</i>	GGCCATACCGAGCTGTATCGCGGGCGCGAATATGTCGTCGACTTCCTGCCAAGGTGAAG
	** *
<i>A. brasilense</i>	ATCGAGGTGGTGATGGAGGACTCCCTGGTGGAGCGGGCGATCGAGGCGATCCAGCAGGCC
<i>E. coli</i>	ATTGAGATTTGTCGTACCGGACGACATTTGTCGATACCTGTGTCGATACCATATTTCGCACG
<i>B. japonicum</i>	ATCGAGATCGTGATCGGCGACGATCTGGTTCGAGCGGCCATCGACGCGATCCGCCGCGCT
<i>K. pneumoniae</i>	ATCGAAATCGTTGTCACCGATGATATCGTCGACACCTGCGTGGATACCATCATCCGTACG
<i>R. capsulatus</i>	ATCGAGATGGTTCTGCCCGACGAGATGGTTCGATATCGCCATCGAGGCCATCGTCGGCGCC
	** *
<i>A. brasilense</i>	GCCCACACCGGCCGCATCGGCGACGGCAAGATCTTCGTCAACCCCGTGAAGAAAGTTGTC
<i>E. coli</i>	G---AAACCGGCAAAATCGGTGACGGTAAAATCTTCGTCTTTGACGTGGCACGGGTCAAT
<i>B. japonicum</i>	GCGCAGACCGGTCGCATCGGTGACGGCAAGATTTTCGTCTCCAACATCGAAGAGGCGGATC
<i>K. pneumoniae</i>	GCGCAGACCGGCAAAATCGGCGACGGTAAAATCTTTGTCGATGTCGCGCGCGTGATT
<i>R. capsulatus</i>	GCCCGCACCGAAAAGATCGGCGACGGGAAGATCTTCGTCTCCTCCATCGAACAGGCGGATC
	* *
	 Primer <i>GlnBII</i>
<i>A. brasilense</i>	CGCATCCGACCGGCGAGAAGGGAGGCGACGCGATCTGA
<i>E. coli</i>	CGCATC-GTACCGTGA-----
<i>B. japonicum</i>	CGCATCCGAACCGGCGAATCCGGGCTGGACGCTATCTGA
<i>K. pneumoniae</i>	CGTATCCGCACCGGCGAAGAAGACGACGCGCGGATTTAA
<i>R. capsulatus</i>	CGCATCCGCACCGGCGAGACCGGCGAGGACGCGGTCTGA
	** *

Abb. 14. Sequenzalignment und Primerauswahl für die Amplifizierung *glnB*-homologer DNA-Regionen in *Acetobacter diazotrophicus*. Es wurden DNA-Sequenzen der *glnB*-Gene aus *Azospirillum brasilense* (de Zamaroczy *et al.*, 1990), *Escherichia coli* (Son & Rhee, 1987), *Bradyrhizobium japonicum* (Martin *et al.*, 1989), *Klebsiella pneumoniae* (Holtel & Merrick, 1988) und *Rhodobacter capsulatus* (Borghese & Wall, 1995) verglichen. Die Pfeile zeigen die ausgewählten Primer GlnB-I (5'-TCATYAAgCCSTTCAARCTCgA) und GlnB-II (5'-gAARATCTTSCGtTCRCCrAT). Die Länge des PCR-Amplifikats beträgt 258 bp. Das Alignment wurde mit dem CLUSTALW(1.60)-Programm erstellt.

D.2 Herstellung einer *Acetobacter diazotrophicus* Phagen-Genbank und Isolierung der zwei *glnB*-tragenden Fragmente

Um die chromosomalen DNA-Regionen mit den vollständigen *glnB*-homologen Genen zu isolieren, wurde eine λ EMBL3-Phagen-Genbank von *A. diazotrophicus* angelegt (Abb. 15).

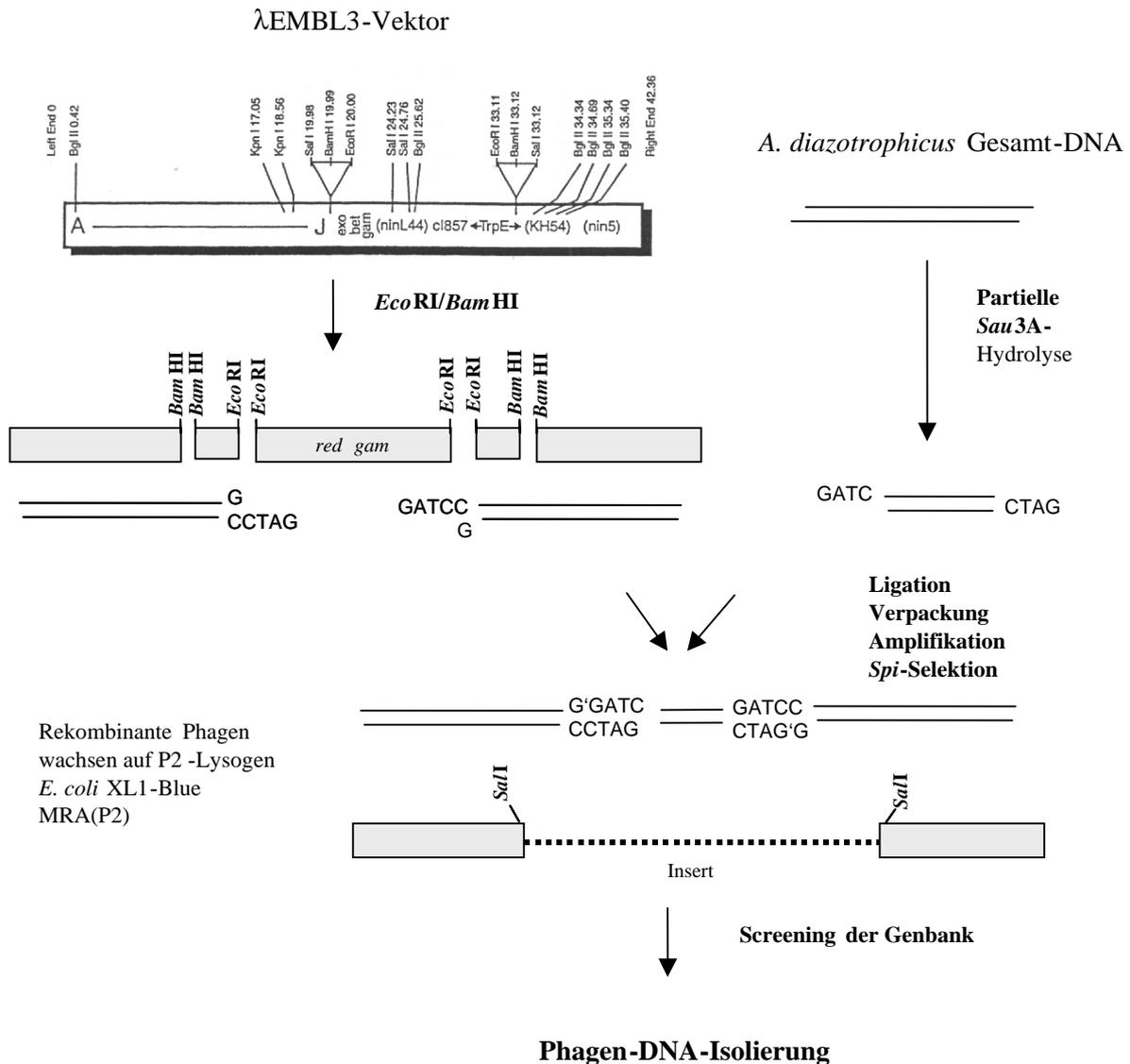


Abb. 15. Für die Phagen-Genbank verwendeter Lambda EMBL3-Vektor (Frischauf *et al.*, 1983) und die Strategie der Herstellung der Phagen-Genbank. Die Gesamt-DNA des *A. diazotrophicus* Pal5 wurde partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* hydrolysiert, in den Phagen verpackt und amplifiziert. Um Phagen mit den gesuchten DNA-Fragmenten zu identifizieren, wurde Phagen-Genbank zuerst gegen DNA-Sonden über eine Plaque-Hybridisierung gescreent und anschließend wurde DNA aus identifizierten Phagen isoliert.

λ EMBL3 ist ein Substitutionsvektor (Austauschvektor), der DNA mit *Bam*HI-kompatiblen Enden in der Größe von 9 – 23 kb aufnehmen kann (Abb. 15).

In diesem λ -Phagen Derivat kann ein zentrales "Stuffer"-Fragment entfernt werden, ohne die Lebensfähigkeit der Phagen zu beeinflussen. Die *cos*-Stellen ermöglichen Verpackung in Phagen-Köpfe *in vitro* und die Gene *red* und *gam* erlauben die sogenannte *Spi*-Selektion (engl.: sensitive to P2 inhibition). Das heißt, dass die Wildtyp-Phagen (welche auf dem „Stuffer“-Fragment liegende Gene *red* und *gam* enthalten) nicht auf Wirten wachsen können, die ein P2-Lysogen darstellen. Rekombinante Phagen dagegen haben einen *Spi*⁻-Phänotyp und können sich auf P2-lysogenen-Wirten vermehren (Frischauf *et al.*, 1983). Nach der Selektion und Vermehrung rekombinanter Phagen kann die klonierte Fremd-DNA mit dem Restriktionsenzym *Sa*II vollständig vom Phagen-Anteil abgespalten werden.

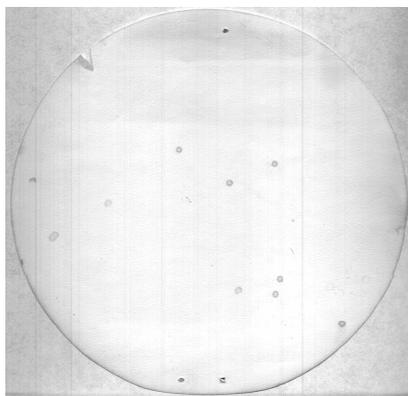


Abb. 16. Plaque-Hybridisierung der Phagen mit den chromosomalen *A. diazotrophicus*-Fragmenten, die Homologien zu den *glnB*-Genen aufweisen. Digoxigenin-markiertes Plasmid pOP42 wurde als Hybridisierungsprobe verwendet.

Die Gesamt-DNA von *A. diazotrophicus* wurde zunächst einer partiellen Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Sau*3A unterzogen, mit den λ -Armen zu Konkatemeren ligiert und nach *in vitro* Verpackung in *E.coli* transfiziert. Um die gesuchten Genbank-Phagen zu identifizieren, erfolgte im weiteren ein Screening über Plaque Hybridisierung unter Verwendung der Digoxigenin-markierten Sonden pOP75 bzw. pOP42 (D.1, S. 79) als Probe. Zwei der hybridisierenden Hybrid-Phagen (EMBL3-P1 mit pOP75 bzw. EMBL3-P10 mit pOP42 als Sonde) wurden für die weiteren Experimente ausgewählt (Abb. 16).

Diese Phagen tragen ein ca. 20 – 25 kb großes DNA-Insert und zeigen unterschiedliche Bandenmuster bei der Hydrolyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Abb. 17). Um nachzuweisen, dass die Phagen EMBL-P1 und EMBL-P10 die zum *glnB*-Gen homologen chromosomalen DNA Fragmente tragen, wurde die DNA aus diesen Phagen sowie *Acetobacter diazotrophicus* Pal5 Gesamt-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert und für die Southern Hybridisierung unter Verwendung der Plasmide pOP42 und pOP75 als Sonden eingesetzt.

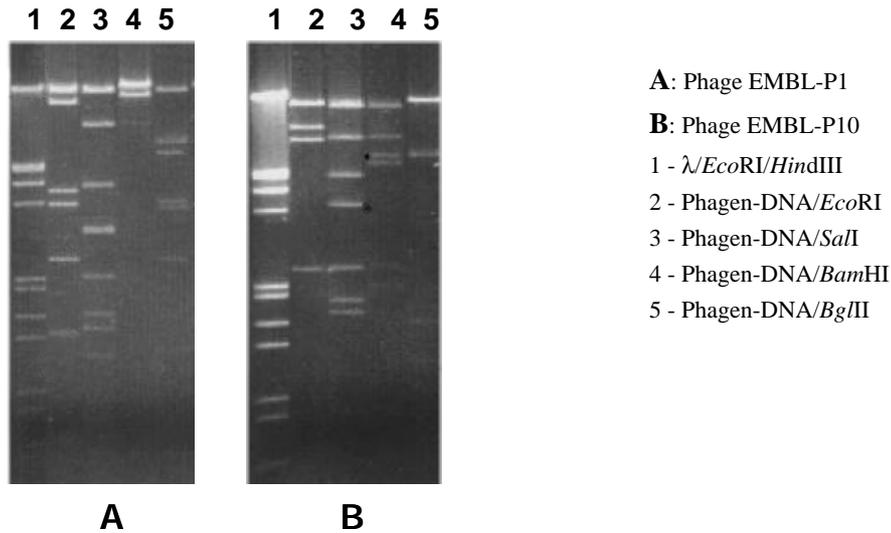


Abb. 17. Hydrolyse der DNA der Phagen EMBL-P1 und EMBL-P10. A: die DNA aus dem Phagen EMBL-P1, **B:** DNA aus dem Phagen EMBL-P10.

Die Southern Hybridisierung der *A. diazotrophicus* Gesamt-DNA zeigt, dass unter stringenten Bedingungen nach *SalI*-Spaltung eine 3,7 kb große Bande mit der pOP42-Sonde bzw. eine 2,1 kb große Bande mit pOP75-Sonde auftreten. Nach *EcoRI*-Hydrolyse treten eine 10 kb große Bande mit der pOP42-Sonde und eine 3,5 kb Bande mit pOP75-Sonde auf (Abb. 18). Damit konnte verifiziert werden, dass *A. diazotrophicus* zwei *glnB*-homologe Gene im Chromosom trägt, welche keine Kreuzhybridisierungsreaktion miteinander zeigen.

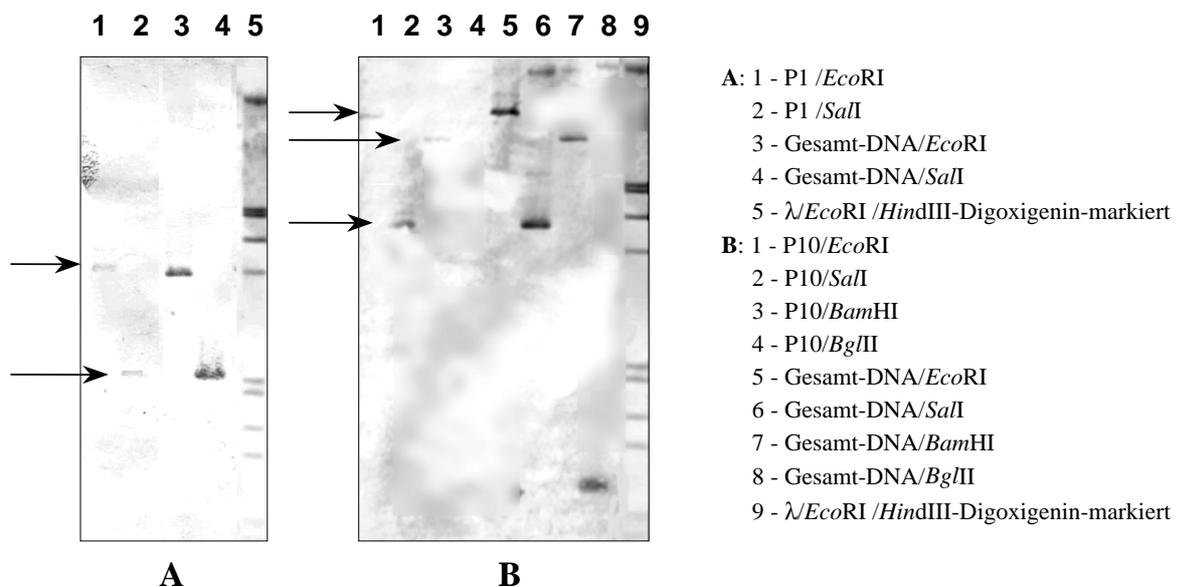


Abb. 18. Southern Hybridisierung der Phagen-DNA und *A. diazotrophicus*-Gesamt-DNA. Die Membranen nach der kolorimetrischen Nachweisreaktion mit NBT-BCIP sind gezeigt. Als Proben wurden **A** - Digoxigenin-markiertes Plasmid pOP75, **B** - pOP42 verwendet.

D.3 Klonierung, Sequenzierung und Mutagenese der zwei zu *glnB*-Gen homologen Regionen

D.3.1 Der Phage EMBL-P10 trägt das *glnB*-Gen

D.3.1.1 *glnB* und *glnA*-Gene liegen in *Acetobacter diazotrophicus* geclustert vor

Zur weiteren Charakterisierung der beiden *glnB*-homologen DNA-Regionen wurden die chromosomalen DNA-Fragmente der Phagen EMBL-P1 und EMBL-P10 in *E. coli* kloniert und über Sequenzierung charakterisiert.

Das 10 kb große *EcoRI*-Fragment des Phagen EMBL-P10 wurde in den mit *EcoRI* linearisierten Sequenziervektor pSVB30 (Arnold & Pühler, 1988) kloniert (pOP37). Die erste partielle Sequenzierung von pOP37 unter Verwendung der M13-Standard-Primer („universal“ und „reverse“) zeigte, dass an einem Ende des *EcoRI*-Fragments Homologien zum *glnA*-Gen, das für die Glutamin-Synthetase kodiert, vorliegen (Tab. 3, S. 89). Für die beschriebenen *glnB*-Gene der Vertreter der α -Subgruppe der Proteobakterien ist bekannt, dass stromaufwärts von einem *glnA*-Gen hochkonserviert ein *glnB*-Gen liegt. Um zu überprüfen, ob diese Genanordnung auch in *A. diazotrophicus* vorliegt, erfolgte zunächst die Konstruktion des Plasmids pOP30. Hierzu wurde ein 2,2 kb *KpnI*-Restriktionsfragment des Plasmids pOP37 wiederum in den *E. coli* Sequenziervektor pSVB30 inseriert, wobei eine der *KpnI*-Restriktionsschnittstellen sich aus der *mcs* von pOP37 ableitet. (Abb. 19). Das Plasmid pOP29 enthält das gleiche 2,2 kb *KpnI*-Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Abb. 19).

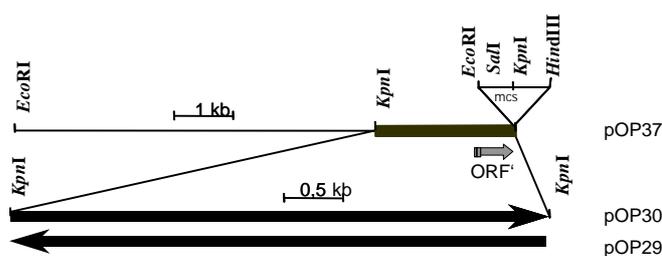


Abb. 19. Klonierung der *glnB*-Region (pOP37, pOP30 und pOP29). Die Klonierungsschnittstellen und Orientierung der Fragmente im Vektor sind gezeigt. ORF' - ein Teil des zu den *glnA*-homologen ORFs. Das 2,2 kb *KpnI*/*EcoRI*-Fragment ist die chromosomale *glnB*-Region des pOP30.

Die Nukleinsäuresequenz der DNA-Inserts beider Plasmide sollte im weiteren komplett bestimmt werden. Eine der Strategien für die Sequenzierung der großen DNA-Fragmente ist eine Verkürzung dieser Fragmente mittels Deletionen in den spezifischen Bereichen (Henikoff, 1984). Hierzu wurden zunächst unidirektionale Deletionen mittels des „Nested-Deletion“-Kits (LKB Pharmacia) in die Plasmide pOP29 und pOP30 eingeführt. Das Plasmid pOP30 wurde zunächst mit der Restriktionendonuklease *HindIII* hydrolysiert und die generierten 3'-rezessiven Enden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit Thionukleotiden modifiziert und damit geschützt. Um Exonuklease III susceptible DNA-

Enden zu erzeugen, erfolgte eine Hydrolyse der linearisierten DNA mit dem Enzym *Xba*I. Es konnten Deletionsderivate unterschiedlicher Größe so ausgewählt werden, dass die gesamte DNA-Sequenz des *Kpn*I-Fragments von pOP30 ermittelt werden konnte. Um die Sequenz des komplementären DNA-Strangs zu erhalten, wurde die gleiche Strategie für das pOP29 angewendet (*Hind*III/*Xba*I).

Um die vollständige Nukleotidsequenz des *glnA*-Gens zu erhalten (nur die 5'-Region ist auf dem Plasmid pOP29 enthalten), wurden weitere sich überlappende Restriktionsfragmente aus dem Phagen EMBL-P10 isoliert und in *E. coli* kloniert. Ein 8 kb *Bam*HI-Fragment des Phagen EMBL-P10 (Abb. 17, 18) wurde mit dem ebenfalls mit *Bam*HI-linealisierten Vektor pUC18 ligiert (pOP26) und die vollständige Nukleotidsequenz der *glnB*/*glnA*-Genregion mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden über "primer walking" bestimmt. Eine physikalische Karte der sequenzierten Region ist in Abb. 20 dargestellt. Die erhaltene DNA-Sequenz wurde für Vergleiche mit der Sequenzdatenbank (BLASTX, NCBI) verwendet. Signifikante Homologien zu den aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Genprodukten sind in der Tabelle 3 (S. 89) zusammengefasst.

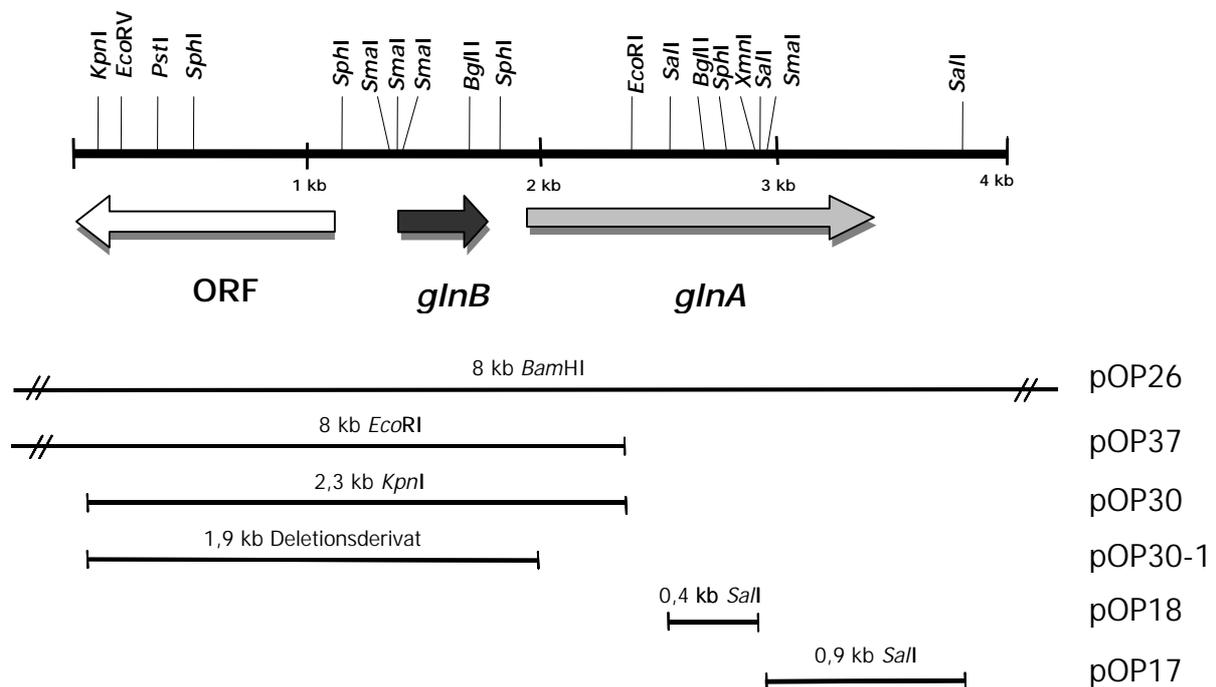


Abb. 20. Physikalische Karte der chromosomalen *glnBA*-Genregion aus *A. diazotrophicus*. Die für die Sequenzierung verwendeten Plasmide und die Größen der Inserts sind gezeigt. Die Plasmide pOP26, pOP17 und pOP18 wurden auf Basis des Vektors pUC18 konstruiert, die Plasmide pOP30 und pOP37 enthalten als Vektoranteil pSVB30. Das Plasmid pOP30-1 ist ein *Hind*III/*Xba*I-Deletionsderivat des pOP30.

D.3.1.2 Sequenzanalyse der *glnBA*-Region

Die komplett doppelsträngig sequenzierte Region umfasst 3681 bp. In dieser Region konnten drei ORFs identifiziert werden, die mittels der BLAST-Programme mit den „Genbank“-Datenbanken verglichen wurden.

- Der erste ORF - *aat* - zeigt Homologien zu Aminotransferasen verschiedener Bakterien (bis zu 40% identische Aminosäuren zu einer hypothetischen Aminotransferase aus *E. coli* und liegt auf dem Chromosom in entgegengesetzter Orientierung zu den Genen *glnB* und *glnA* (Abb. 20).
- Die Nukleotidsequenz des zweiten 336 nt langen ORFs - *glnB* - (ATG-Startcodon an Position 1317 bis TGA-Stopcodon an Position 1652) ist zu 79% identisch mit der *glnB*-DNA-Sequenz von *Azospirillum brasilense* und zeigt hohe DNA-Übereinstimmungen mit der *glnB*-Kodierregion anderer Organismen.
- Der dritte ORF - *glnA* - beginnt 180 bp stromabwärts von dem *glnB*, umspannt 1458 nt und zeigt Homologie zu den *glnA*-Genen verschiedener Prokaryonten.

Wie in anderen Proteobakterien der α -Subgruppe, liegen also die Gene *glnB* und *glnA* in *A. diazotrophicus* auf dem Chromosom geclustert vor.

Stromaufwärts des *glnB*-Gens konnten Sequenzbereiche identifiziert werden, die Ähnlichkeiten mit charakteristischen Promotor-Konsensussequenzen aufweisen. Eine potentielle Ribosomenbindestelle GGGGA befindet sich 14 bp stromaufwärts des *glnB*-Startcodons. Die Nukleotidsequenz an Position 1146 – 1160 zeigt eine gute Übereinstimmung zu der Konsensussequenz für die NtrC-Bindestelle (Dixon, 1984; Reitzer & Magasanik, 1986). Interessanterweise überlappt diese 156 nt vor dem Translationsstart liegende Sequenz mit einem putativen σ^{70} -abhängigen Konsensuspromotor. Die Nukleotidsequenz der Promotorbereiche der Gene *glnB* und *glnA* sind in Abb. 21 dargestellt.

In einem Abstand von 180 nt zum *glnB*-Stopcodon liegt an Position 1831 das potentielle Startcodon für das *glnA*-Gen. Eine mögliche σ^{54} -Promotorsequenz, die Ähnlichkeit zu der Konsensussequenz TGGCAC-N₅-TTGCA/T (Morett & Buck, 1989) aufweist, liegt vor dem *glnA*-Gen an Nukleotidposition 1705-1720. Ein zu forderndes Sequenzmotif für die Bindung eines Transkriptionsaktivators, wie NtrC oder NifA-Proteine, die für die Aktivierung σ^{54} -abhängiger Promotoren notwendig sind, konnte jedoch nicht abgeleitet werden. Es lässt sich also anhand der Sequenzanalyse nicht erklären, wie die Transkription des *glnA*-Gens stattfindet und reguliert wird und ob das *glnA*-Gen einen eigenen Promotor hat, jedoch ist eine Kotranskription mit dem *glnB*-Gen wahrscheinlich.

Stromabwärts des *glnA*-Gens konnten sogenannte “inverted repeats” – kurze gegenläufige Sequenzwiederholungen - an den Nukleotidpositionen 3317-3329 und 3335-3347 identifiziert werden. Diese Elemente bilden wahrscheinlich den Rho-unabhängigen Terminator des *glnA* Gens (Abb. 22).

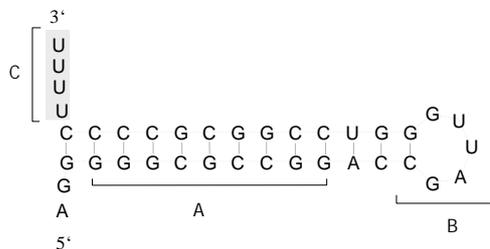


Abb. 22. Rho-unabhängiger Transkriptions-Terminator stromabwärts des *glnA*-Gens. A - durch Paarung invertierterer Sequenzwiederholungen entstandener GC-reicher Stamm, B - Schleife, C - Folge von U-Resten, die es RNA-Polymerase ermöglicht, sich von Matrize abzulösen.

Wie andere Rho-unabhängigen Terminatoren besteht der *glnA*-Terminator aus einem von palindromen Sequenzen gebildeten doppelsträngigen GC-reichen Stamm und einer 5 nt langen Schleife. Nach dieser Struktur folgt auf mRNA Ebene ein Uracil-reicher Bereich. Es wurden keine Terminatorstrukturen stromabwärts des *glnB*-Gens gefunden.

D.3.1.3 Charakterisierung der abgeleiteten Genprodukte der *glnB* und *glnA*-Gene

Das abgeleitete P_{II}-Protein (*glnB*-Genprodukt) aus *A. diazotrophicus* hat eine Größe von 112 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 12,430 kD und zeigt signifikante Übereinstimmungen mit den *glnB*-Genprodukten (P_{II}-Proteinen) anderer Bakterien. Der höchste Grad an Übereinstimmung tritt zu den P_{II}-Proteinen aus *Azospirillum brasilense* und *Rhodospirillum rubrum* auf, wo bei 79% identischer Aminosäurepositionen der Grad der Ähnlichkeit unter Berücksichtigung konservativer Austausche 90% beträgt. Die P_{II}-Proteine sind in allen phylogenetischen Gruppen der Mikroorganismen hoch konserviert, man findet gute Übereinstimmungen nicht nur zwischen Proteinen der α -Subgruppe der Proteobakterien, zu der *A. diazotrophicus* gehört, sondern auch zu P_{II}-Proteinen der Vertreter anderer Taxa, von Proteobakterien und Cyanobakterien bis hin zu Gram-positiven Bakterien und Archaeae (Tab. 3, S. 89).

Im multiplen Alignment zeigt die P_{II}-Proteinsequenz von *A. diazotrophicus* einen konservierten Tyrosinrest an der Position 51 (Abb. 23, S. 90). Dieser Tyrosin-51-Rest ist die Uridylylierungsstelle der P_{II}-Proteinen aus *E. coli* (Rhee *et al.*, 1985b; Son & Rhee, 1987), *Rhodospirillum rubrum* (Johansson & Nordlund, 1997) oder *Rhizobium leguminosarum* (Colonna-Romano *et al.*, 1993).

Im Gegensatz hierzu erfolgt in dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC7942 die posttranslationale Modifikation an dem Serinrest 49 über Phosphorylierung (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1994; Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995a, b). In *A. diazotrophicus* ist dieser Serinrest durch Alanin ersetzt, wie in allen anderen bekannten P_{II}-

D. ERGEBNISSE

Proteinen der α -Subgruppe der Proteobakterien. Der Aminosäurerest Tyrosin-51 ist daher wahrscheinlich einer posttranslationalen Modifikation über Uridylylierung durch das *glnD*-Genprodukt (UTase/UR-Enzym) unterlegen.

Tab. 3. Homologien zwischen den translatierten ORFs der *glnBA*-Kodierregion und den Proteinsequenzen anderer Organismen.

ORF	Homologes Gen	Genprodukt	Organismus	Taxonomische Anordnung	Größe des Proteins (AS)	% identische AS	% ähnliche AS
ORF1 (<i>aat</i>)		Aspartat-Aminotransferase hypothetische Aminotransferase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Gram ⁺	393	30	47
			<i>Thermus aquaticus</i>	Thermus/Deinococcus-Gruppe	385	33	49
			<i>Escherichia coli</i>	γ -Subgruppe	386	40	57
ORF2 (<i>glnB</i>)	<i>glnB</i>	P _{II}	<i>Azospirillum brasilense</i>	α -Subgruppe	112	79	90
	<i>glnB</i>		<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Proteobakterien	112	79	88
	<i>glnB</i>		<i>Azorhizobium caulinodans</i>	- „ -	112	76	90
	<i>glnB</i>		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	- „ -	112	75	88
	<i>glnB</i>		<i>Rhizobium meliloti</i>	- „ -	112	76	85
	<i>glnB</i>		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	- „ -	111	75	87
	<i>glnB</i>		<i>Escherichia coli</i>	γ -Subgruppe	112	70	85
	<i>glnB</i>		<i>Azotobacter vinelandii</i>	- „ -	112	66	82
	<i>glnB</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	- „ -	112	70	85
	<i>glnB</i>		<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	β -Subgruppe	112	69	86
	<i>glnB</i>		<i>Synechococcus sp.</i>	Cyanobakterien	112	65	78
	<i>nrgB</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	Gram ⁺	116	40	59
	<i>glnB</i>		<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Archaeae	115	59	75
	ORF3 (<i>glnA</i>)		<i>glnA</i>	Glutamin-Synthetase	<i>Azospirillum brasilense</i>	α -Subgruppe	468
<i>Rhodospirillum rubrum</i>		- „ -			469	71	83
<i>Rhizobium meliloti</i>		- „ -			469	70	81
<i>Azorhizobium caulinodans</i>		- „ -			468	68	80
<i>Escherichia coli</i>		γ -Subgruppe			469	63	76

D. ERGEBNISSE

	10	20	30	40	50
GLNB_AZOBR	M K K I E A I I K P F K L D E V K E A L H E V G I K G I T V T E A K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	50			
GLNB_BRAJA	M K K I E A I I K P F K L D E V R - S L S G V G L Q G I T V T E A K G F G R Q K G H T D L Y R G A E	49			
GLNB_ECOLI	M K K I D A I I K P F K L D D V R E A L A E V G I T G M T V T E V K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	50			
GLNB_KLEPN	M K K I D A I I K P F K L D D V R E A L A E V G I T G M T V T E V K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	50			
GLNB_RHILV	M K K I E A I I K P F K L D E V R - S P S G V G L Q G I T V T E A K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	49			
GLNB_RHOCA	M K K V E A I I K P F K L D E V K E A L Q E A G I Q G L S V I E V K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	50			
GLNB_RHORU	M K K I E A I I K P F K L D E V K E A L H E I G L Q G I T V T E A K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	50			
GLNB_RHOSH	M K K I E A I I K P F K L D E V K E A L Q A A G V Q G L S V T E V K G F G R Q K G H T E L Y R G A A	50			
GLNB_A.d	M K K I E A I I K P F K L D E V K D A L H E I G L M G I T V T E A K G F G R Q K G H T E L Y R G A E	50			

	60	70	80	90	100
GLNB_AZOBR	Y V V D F L P K V K I E I V V M E D S L V E R A I E A I Q Q A A H T G R I G D G K I F V T P V E E V V	100			
GLNB_BRAJA	Y I V D F L P K V K I E I V I G D D L V E R A I D A I R R A A Q T G R I G D G K I F V S N I E E A I	99			
GLNB_ECOLI	Y M V D F L P K V K I E I V V P D D I V D T C V D T I I R T A Q T G K I G D G K I F V F D V A R V I	100			
GLNB_KLEPN	Y M V D F L P K V K I E I V V T D D I V D T C V D T I I R T A Q T G K I G D G K I F V F D V A R V I	100			
GLNB_RHILV	Y V V D F L P K V K V E V V L A D E N A A V T E A I R K A A Q T G R I G D G K I F V S N V E E V I	99			
GLNB_RHOCA	Y V V D F L P K V K I E M V L P D E M V D I A I E A I V G A A R T E K I G D G K I F V S S I E Q A I	100			
GLNB_RHORU	Y V V D F L P K V K I E L V I E D A L V E R A I E A I Q Q A A Q T G R I G D G K I F V Y A I E E A I	100			
GLNB_RHOSH	Y V V D F L P K V K I E V V L A D D M V E A A V E A I V S A S R T D K I G D G K I F I S P V E Q A I	100			
GLNB_A.d	Y I V D F L P K V K L E I V C A D N L V D I R A V E T I M A A A R T G R I G D G K I F I L P V E D V I	100			

	110
GLNB_AZOBR	R I R T G E K G D A I 112
GLNB_BRAJA	R I R T G E S L D A I 111
GLNB_ECOLI	R I R T G E E D D A A I 112
GLNB_KLEPN	R I R T G E E D D A A I 112
GLNB_RHILV	R I R T G E T G I D A I 111
GLNB_RHOCA	R I R T G E T G E D A V 112
GLNB_RHORU	R I R T G E R G G D A I 112
GLNB_RHOSH	R I R T G E T G E D A V 112
GLNB	R I R T G E H G E E A I 112

Abb. 23. Alignment der P_{II}-Proteine (*glnB*-Genprodukte) aus *Azospirillum brasilense* (de Zamaroczy *et al.*, 1990)), *Bradyrhizobium japonicum* (Martin *et al.*, 1989), *Escherichia coli* (Son & Rhee, 1987), *Klebsiella pneumoniae* (Holtel & Merrick, 1988), *Rhizobium leguminosarum* (Colonna-Romano *et al.*, 1987), *Sinorhizobium meliloti* (Arcondeguy *et al.*, 1996), *Rhodobacter capsulatus* (Kranz *et al.*, 1992), *Rhodospirillum rubrum* (Johansson & Nordlund, 1996), *Rhodobacter sphaeroides* (Zinchenko *et al.*, 1994) und *Acetobacter diazotrophicus*. Der Pfeil zeigt der potentielle Uridylylierungsstelle des PII-Proteins Tyrosin-51.

Das direkt stromabwärts von dem *glnB* lokalisierte Gen - *glnA* - kodiert für ein Protein von 486 Aminosäuren, das hohe Übereinstimmungen (bis zu 73% Identität und 83% Ähnlichkeit mit dem GS-Protein aus *Azospirillum brasilense*) zu bakteriellen Glutamin-Synthetasen aufweist. In *E. coli* erfolgt eine posttranslationale Modifikation des Enzyms unter Wachstumsbedingungen mit Stickstoff-Überschuss durch Adenylylierung am Aminosäurerest Tyrosin-398 durch die Adenylyltransferase (*glnE*-Genprodukt) (Rhee *et al.*, 1985a, b). Dieser Aminosäurerest ist auch in der Glutamin-Synthetase aus *A. diazotrophicus* vorhanden. Das GS-Monomer aus *A. diazotrophicus* hat ein Molekulargewicht von ca. 53 kDa und unterscheidet sich von den GSI anderer Bakterien vor allem durch die Aminosäuresequenz des N-terminalen Bereichs (Abb. 24).

D.3.2 Inaktivierung des *Acetobacter diazotrophicus glnB*-Gens über die Insertion einer Antibiotika-Resistenz

Um die Funktion eines Proteins im Stoffwechsel herauszufinden, ist eine spezifische Mutagenese des korrespondierenden Gens häufig essentiell. In einigen Organismen - wie z. B. *Nostoc punctiforme* (Hanson *et al.*, 1998) und *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998) - sind Inaktivierungen des *glnB*-Gens letal. In vielen Organismen verknüpft das P_{II}-Protein den Energie- und N-Metabolismus der Zelle durch die Regulation der Aktivität der unterschiedlichen, an der Transduktion des Signals über verschiedene Stimuli beteiligten Enzyme; in einigen Organismen ist P_{II} an der Regulation der Stickstofffixierung beteiligt (Arsene *et al.*, 1996; Michel-Reydellet & Kaminski, 1999; Ninfa & Atkinson, 2000). Um zu überprüfen, welche Rolle P_{II}-Protein im Stoffwechsel von *A. diazotrophicus* spielt und wie sich der Verlust des P_{II}-Proteins in diesem diazotrophen Bakterium auswirkt, wurde eine Interposon-Mutagenese des *glnB*-Gens durchgeführt. Diese Methode bietet im Unterschied zur Transposonmutagenese die Möglichkeit, gezielt die DNA-Bereiche zu mutagenisieren, die von Interesse sind. Dazu wurde eine Reihe von Plasmiden mit Resistenzgenkassetten-Insertionen im *glnB*-Gen zunächst in *E. coli* konstruiert (C.2, S. 27). Es wurden zunächst drei Interposons - *gusA*-Km^R aus pWM6, (Metcalf & Wanner, 1993), *gusA*-Cm^R aus pWM4 (Metcalf & Wanner, 1993) und *lacZaacC1* aus pAB2002 (Becker *et al.*, 1995) ausgewählt, die jeweils ein Antibiotikaresistenzgen sowie ein promotorloses Reportergen für eine spätere Expressionsanalyse des zu untersuchenden Gens tragen. Eine weitere Resistenzkassette trägt die Neomycin/Kanamycin Resistenz (*aphII*) des Transposons Tn5 aus pDM6 (Meletzus, 1988). Zur Konstruktion der Mutanten wurde das *glnB*-tragende Plasmid pOP30 (Abb. 20, S. 85) ausgewählt.

Alle entsprechenden Kassetten wurden in die singuläre *Bgl*III-Restriktionsschnittstelle im *glnB*-Kodierbereich in beiden Orientierungen inseriert (Plasmide pOP27, pOP58, pOP109, pOP110, pOP131, pOP137, pOP12, pOP16). Die so erzeugten Hybridplasmide mit pUC als Basisvektor können in *A. diazotrophicus* nicht replizieren und wurden für die Mutagenese der chromosomalen *glnB*-Gens über homologe Rekombination eingesetzt. Dazu wurde die Plasmid-DNA in den *A. diazotrophicus* Wildtypstamm Pal5 mittels Elektroporation eingeführt und auf die Antibiotikaresistenz der Kassetten selektioniert. Als Resultat einer homologen Rekombination können zwei Integrationsformen erwartet werden: erfolgt die Integration in das chromosomale Gen über ein Doppelcrossover, so bleibt lediglich die Interposon-Antibiotikaresistenz erhalten und die Ampicillin-Resistenz des verwendeten Vektors (pUC18) ist nicht nachweisbar. Sind die Mutanten zudem Ampicillin-resistent, liegt die Ursache hierfür in der Integration des gesamten Hybridplasmids in das Chromosom als Folge eines Single-Crossover Ereignisses. Für weitere Untersuchungen sind lediglich die über Doppelcrossover erzeugten Mutanten von Bedeutung. Eine Verifikation der Mutanten erfolgte über Southern Hybridisierungen. Eine erfolgreiche Mutagenese des *glnB*-Gens konnte lediglich nach Verwendung des *aphII* Interposons (pDM6) nachgewiesen werden. Diese

Km^R -Mutante wurde als UBI120 bezeichnet (Abb. 25, 26). Diese Insertionskassette im *glnB*-Gen trägt kein Reportergen, so dass Untersuchungen der Expression des Gens über Transkriptionsfusionen in diesem Fall nicht möglich sind.

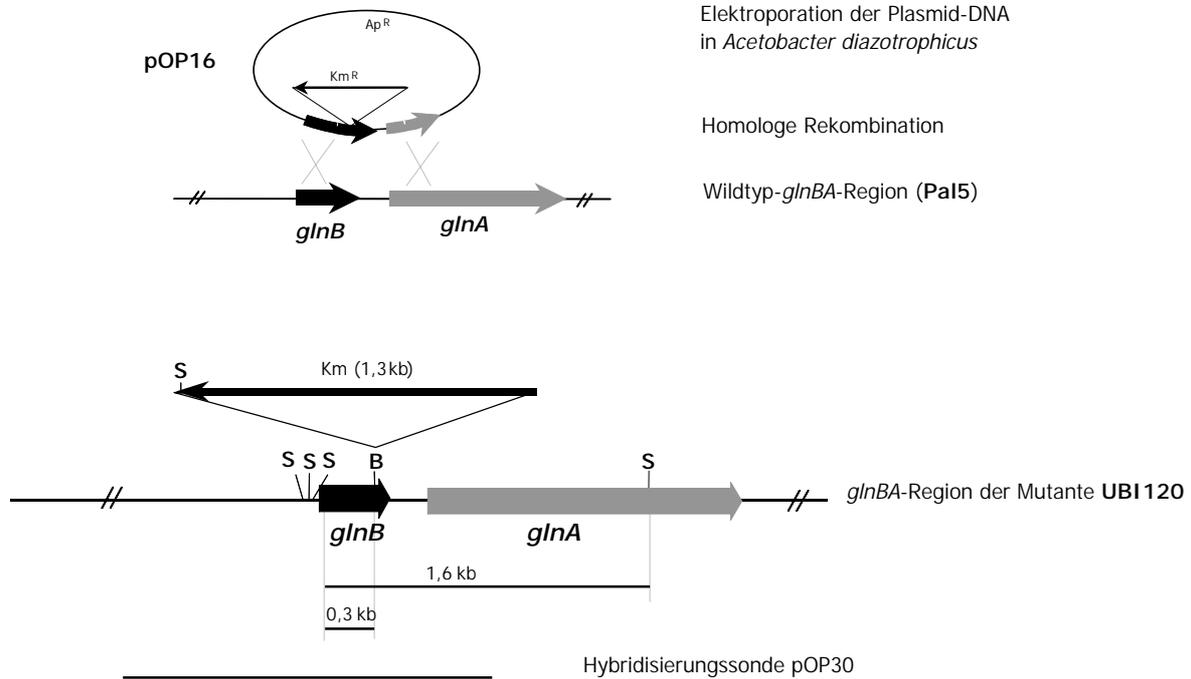


Abb. 25. Schematische Darstellung der Insertion der Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination in das *glnB*-Gen von *Acetobacter diazotrophicus* Pal5. Eine physikalische Karte der *glnBA*-Region des Mutantenstammes UBI120 ist gezeigt. Die singuläre *BglII*-Schnittstelle in *glnB* wurde als Klonierungsstelle für das Resistenzgen ausgewählt. B – *BglII*; S – *SmaI*. Die Lage der *glnB*-Hybridisierungssonde (*glnB* im Plasmid pOP30) ist gezeigt

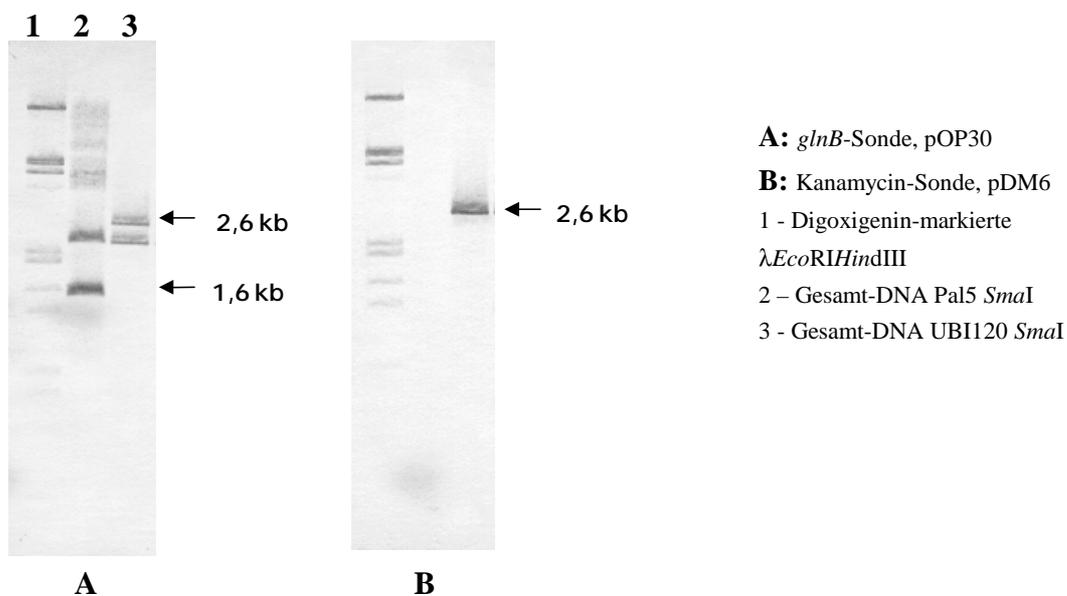


Abb. 26. Nachweis der Insertion der Km^R -Kassette in das *glnB* über Southern Hybridisierung. Als Hybridisierungssonden dienen die Digoxigenin-markierten Plasmide pOP30 (**A**) und pDM6, das die Km -Kassette trägt (**B**). Die 1,6 kb große *SmaI*-*glnB*-Bande des Wildtyps ändert durch die Insertion der Km^R -Kassette ihre Größe und gibt ein Signal bei 2,6 kb in der Mutante. Die gleiche Bande konnte in der Mutante mit der Kanamycin-Sonde nachgewiesen werden. Die Wildtyp-DNA zeigt, wie erwartet, kein Signal mit pDM6.

D.3.3 Identifizierung und Charakterisierung des *glnB*-homologen Gens *glnK*₁

D.3.3.1 Klonierung der *glnK*₁-Kodierregion

Über die Sequenzierung der PCR-Produkte, die mit den degenerierten *glnB*-Primern erhalten wurden, konnte in *A. diazotrophicus* das Vorhandensein einer weiteren Kodierregion, die zu *glnB* homolog ist, gezeigt werden. Aus dem Phagen EMBL-P1, der ein positives Signal mit dem *glnB*-homologes Fragment tragenden pOP75 als Sonde zeigte, wurden nach der Kontroll-Hybridisierung mit der *A. diazotrophicus* Gesamt-DNA (Abb. 18, S. 83) ein 2,1 kb großes *SalI*-Fragment und ein 3,5 kb großes *EcoRI*-Fragment in den ebenfalls mit *SalI* bzw. *EcoRI* linearisierten Vektor pUC18 in *E. coli* kloniert (pOP8 und pOP7). Die Sequenzierung des inserierten DNA-Fragments des Plasmids pOP8 unter Verwendung der Standard-Sequenzierprimer und ein sich anschließender Datenbankvergleich zeigte Homologien im 5'-Ende des DNA-Inserts zu dem *glnB*-Homolog *glnK* aus *Escherichia coli* und im 3'-Bereich zum *nrgA*-Gen aus *Bacillus subtilis* bzw. dem *amtB*-Gen anderer Organismen (Tab. 3, S. 89). Diese Gene (*nrgA* und *amtB*) kodieren für Proteine der Ammoniumtransporter-Familie. In *E. coli* und anderen Organismen liegen die Gene *glnK* und *amtB* benachbart. Um eine vollständige Nukleotidsequenz dieser DNA-Region zu erhalten, erfolgte zunächst wiederum die Einführung von gerichteten Deletion unter Verwendung des Exonuklease III/S1 „Nested Deletion“-Kits (Pharmacia). Geeignete Deletionsderivate wurden mit dem A.L.F.- Express-System (Pharmacia) sequenziert.

Um die unidirektionale Deletionen des Plasmids pOP8 zu erhalten, wurden die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XbaI* verwendet. Zur Sequenzierung des komplementären DNA-Strangs wurde ein Deletionsderivat pOP8-305, das eine kleine von der Exonuklease III nach der *KpnI/XbaI*-Spaltung erzeugte Deletion trägt, ausgewählt. Von diesem Plasmid wurde es möglich nach *SphI*- und *SalI*-Spaltungen Exonuklease III-Deletionen unterschiedlicher Größe (in entgegengesetzter Richtung verglichen mit Exonuklease III-Abbau in pOP8/*KpnI/XbaI*) zu erzeugen und die Sequenz dieser Deletionsderivate wurde bestimmt.

Da das *amtB*-homologe Gen auf dem Plasmid pOP8 nur unvollständig vorliegt, erfolgt eine Komplettierung der Sequenz durch Verwendung des Plasmids pOP7 (Abb. 27, S. 95) über „primer walking“ mittels synthetischer Oligonukleotide.

Datenbankvergleiche der vollständigen Sequenz des klonierten *glnB*-homologen Bereichs bestätigten die hohen Übereinstimmungen mit den Genen *glnK/glnZ* und *amtB* (Tab. 4, S. 98).

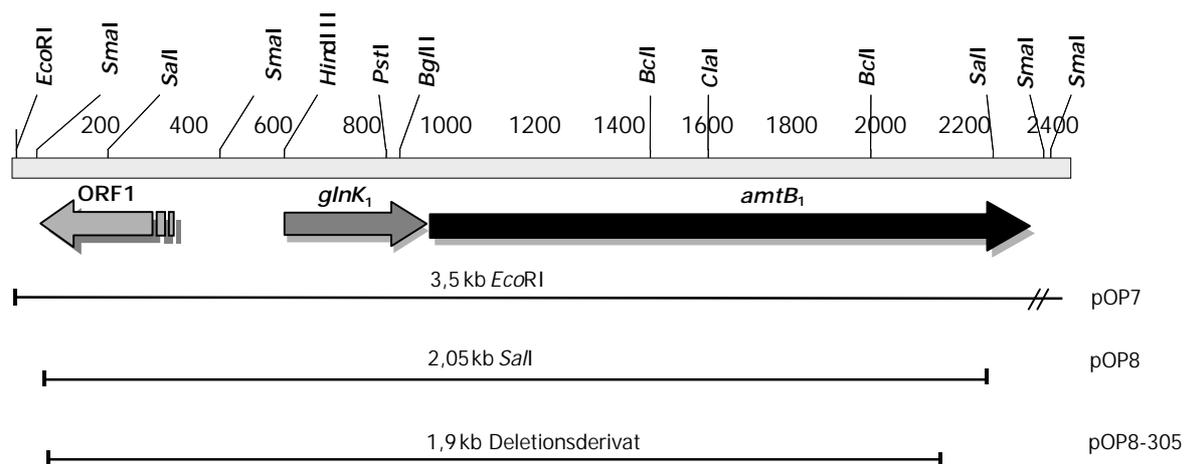


Abb. 27. Physikalische Karte der *glnK₁amtB₁*-Region. Über die Sequenzierung identifizierte Gene sind als Pfeile dargestellt. Die Plasmide pOP8 und pOP7 sind pUC18-Derivate, Plasmid pOP8-305 ist ein *SphI/SalI*-Deletionsderivat des Plasmids pOP8. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF1 zeigt Homologien zu Proteinen der UbiH-Familie (Tab. 4, S. 98).

D.3.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung der chromosomalen *glnK₁amtB₁*-Genregion in *A. diazotrophicus*

Der komplett doppelsträngig sequenzierte DNA-Bereich umfasst 2460 bp. Das Gen, das für *glnB*-Homolog kodiert, liegt auf dem sequenzierten DNA-Fragment zwischen den Positionen 636 (ATG) und 972 (TGA). Das abgeleitete Genprodukt zeigt die besten Übereinstimmungen zum P_{II}-homologen Protein P_Z aus *Azospirillum brasilense* sowie zu GlnK Protein aus *E. coli* (Tab. 4, S. 98). Eine potentielle Ribosomenbindestelle mit der Sequenz AAGGAG liegt 10 bp stromaufwärts des Startcodons. Die Gene der Stickstofffixierung und N-Assimilation werden häufig durch die Komponenten des generellen Ntr-System (RpoN; NtrC) reguliert. Daher wurde der potentielle Promotorbereich in Hinblick auf diese Konsensussequenzen analysiert, um Hinweise auf eine potentielle Regulation der Transkription zu erhalten. Der Promotorbereich der Gene *glnK₁* und *amtB₁* ist in Abb. 28 dargestellt.

An Position 469-473 wurde eine mögliche -10- und an Position 440-445 eine mögliche -35-Region eines σ^{70} -abhängigen Promotors identifiziert. Interessanterweise liegt an Position 464-478 ein Sequenzabschnitt, welcher signifikante Homologien zu einer NtrC-Bindestelle (Konsensus GC-N₁₁-GC) zeigt. Zudem weist die DNA-Region an Position 551-564 gute Homologien zur konservierten Bindestelle für den Sigmafaktor RpoN auf. Welche dieser potentiellen Promotorstrukturen *in vivo* aktiv sind, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Stromabwärts des *glnK₁*-Gens liegt ein ORF (*amtB₁*), dessen abgeleitete Proteinsequenz signifikante Homologien zu den Proteinen des Ammoniumtransport-Systems aufweist.

des vorhergehenden *glnK*₁ und das GTG-Startcodon von *amtB*₁ überlappt mit dem Stopcodon von *glnK*₁. Stromaufwärts des Translationsstarts liegt eine Sequenzregion, die Ähnlichkeit zu der σ^{54} -abhängigen Promotorsequenz zeigt. Ob diese Sequenzregion in *A. diazotrophicus* eine regulatorische Rolle spielt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Alle σ^{54} -abhängigen Promotoren benötigen zudem einen Transkriptionsaktivator, wie z. B. NtrC oder das NifA-Protein. Es konnten jedoch keine Bindestellen für diese Transkriptionsaktivatoren in der analysierten Sequenz gefunden werden, eine biologische Bedeutung dieser möglichen σ^{54} -Konsensussequenz ist daher fraglich. Der Kodierbereich des *amtB*₁-Gens umfasst 1389 nt und endet mit dem Stopcodon (TGA) an Position 2360. Im 3'-Bereich dieses Gens liegt ein perfekter 13 bp GC-reicher „inverted repeat“, der von 5 bp unterbrochen ist und dem eine T-reiche Region folgt (Position 2386-2417, s. Anhang II, S. 174). Damit sind die Kriterien eines Rho-unabhängigen Terminators erfüllt (D.3.1.2, S. 88). Die physikalische Anordnung der Gene in dieser Region ähnelt der Anordnung in *E. coli* (van Heeswijk *et al.*, 1996), *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998) und *Azorhizobium caulinodans* (Michel-Reydellet *et al.*, 1998). In *Bacillus subtilis* sind die Gene *nrgB* (*glnB*-Homolog) und *nrgA* (Ammoniumtransport-Protein) zwar auch benachbart, liegen aber in umgekehrter Reihenfolge (*nrgAB*) (Wray *et al.*, 1994). In *Azospirillum brasilense* ist das *amtB*-Gen nicht mit den *glnB* oder *glnK*-Genen geclustert und benötigt für die Transkription das NtrBC-Zweikomponentensystem (Milcamps *et al.*, 1996; Van Dommelen *et al.*, 1998).

D.3.3.3 Eigenschaften des abgeleiteten Proteins GlnK1

Das aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Protein (*glnK*₁-Genprodukt) kodiert für ein Protein von 112 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 12,281 kD. Datenbankvergleiche zeigten, dass das Protein hohe Ähnlichkeiten mit den allen bislang beschriebenen P_Z/GlnK – Proteinen aufweist (Tab. 4, S. 98). Die höchste Übereinstimmung mit dem P_Z-Protein aus *Azospirillum brasilense* (de Zamaroczy *et al.*, 1996) beträgt 66% Identität und 77% Ähnlichkeit unter Berücksichtigung konservativer AminosäureAustausche. Ein Homologievergleich mit weiteren in der Genbank-Datenbank verfügbaren P_{II}-homologen Proteinen ist in Tabelle 4 dargestellt. Das GlnK1-Protein hat eine 59,8% Übereinstimmung der Aminosäurepositionen mit dem P_{II}-Protein (GlnB) aus *A. diazotrophicus* (D.3.1.3, S.88). Wie in P_{II} kommt auch in GlnK1 ein konservierter Tyrosinrest an Position 51 und das für die Interaktion mit dem Enzym UTase/UR wichtige Tyrosin-46 vor. Das Serin-49 des P_{II}-Proteins, für das in dem Cyanobakterium *Synechococcus* nachgewiesen wurde, dass es die Phosphorylierungsstelle ist (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1994), ist im putativen GlnK1 von *A. diazotrophicus* (genauso wie im putativen P_{II} aus *A. diazotrophicus*) durch Alanin ersetzt (Abb. 29, S. 99).

D. ERGEBNISSE

Tab. 4. Homologien zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *glnK₁amtB₁*-Region und Proteinsequenzen anderer Organismen.

ORF	Homologes Gen	Genprodukt	Organismus	Taxonomische Einordnung	Größe des Proteins (AS)	% identische AS	% ähnliche AS
ORF1		UbiH	<i>Escherichia coli</i>	γ-Subgruppe Proteobakterien	392	43	54
		UbiH-homologes Protein	<i>Azospirillum brasilense</i>	α	246	35	52
ORF2 (<i>glnK₁</i>)	<i>glnK</i>	P _z	<i>Azospirillum brasilense</i>	α-Subgruppe Proteobakterien	112	67	75
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ	112	66	77
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Escherichia coli</i>	γ	112	64	75
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	γ	112	64	75
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Rhizobium etli</i>	α	116	64	73
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	α	112	63	71
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	α	112	62	73
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	α	112	52	69
ORF3 (<i>amtB₁</i>)	<i>amtB</i>	Ammonium Transporter	<i>Azospirillum brasilense</i>	α	438	49	62
	<i>amtB</i>		<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ	436	45	56
	<i>amtB</i>		<i>Azorhizobium caulinodans</i>	α	493	44	55
	<i>nrgA</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	Gram ⁺	404	42	52
		Hypothetische AMT-Protein	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Archaea	412	41	54
	<i>amtB</i>		<i>Rhizobium etli</i>	α	474	41	54
	<i>amtP</i>	„low affinity“ AMT-System	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Gram ⁺	438	33	47
	<i>amt</i>	„high affinity“ AMT-System	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Gram ⁺	452	31	44
	<i>amtA</i>	Ammonium-transporter	<i>Synechococcus PCC7002</i>	Cyanobakterien	484	27	43
	<i>mep2</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryonten	499	30	43
	<i>mep3</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- „ -	489	29	43
	<i>mep1</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- „ -	492	26	41

D. ERGEBNISSE



Abb. 29. Proteinsequenzvergleich zwischen GlnK/P_z aus verschiedenen Proteobakterien. Berücksichtigt wurden Proteinsequenzen aus *Azorhizobium caulinodans* (Michel-Reydellet *et al.*, 1998), *E. coli* (van Heeswijk *et al.*, 1995); *Klebsiella pneumoniae* (Jack *et al.*, 1999), *Rhizobium etli* (Tate *et al.*, 1998), *Rhodospirillum rubrum* (Zhang *et al.*, 2000, nicht publiziert, Accession Nr. AAF28331), *Herbaspirillum seropedicae* (Benelli *et al.*, 1997, nicht publiziert, AAB46605), *Azospirillum brasilense* (de Zamaroczy *et al.*, 1996), *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998) und *Acetobacter diazotrophicus* GlnK1. Der konservierte Aminosäurerest Tyrosin-51, der die mögliche Uridylylierungsstelle ist, ist mit * gekennzeichnet. Das Multiple Alignment wurde mit dem Programm MeqAlign des Programm-Pakets DNASTar nach der Clustal-Methode erstellt.

D.3.3.4 Das *amtB*₁-Gen liegt auf dem Chromosom stromabwärts des *glnK*₁-Gens und kodiert für ein Protein der Familie der Ammoniumtransporter

Stromabwärts des *glnK*₁-Gens schließt sich ein ORF an, der für ein putatives Protein von 463 AS (von GTG-Startcodon) mit einem Molekulargewicht von 47,6 kD kodiert und dessen Aminosäuresequenz einen signifikanten Grad an Identität zu AmtB-Proteinen aus *Azospirillum brasilense* (49%)(Van Dommelen *et al.*, 1998), *Azotobacter vinelandii* (45%)(Meletzus *et al.*, 1998), *Azorhizobium caulinodans* (44%)(Michel-Reydellet *et al.*, 1998) und *Bacillus subtilis* (NrgA, 42%)(Wray *et al.*, 1994) aufweist. Die Amt-Proteine wurden in einigen Bakterien, Hefen und Pflanzen experimentell als Hochaffinitäts-(Methyl)ammoniumtransporter identifiziert.

Diese Proteine bilden eine neue Familie der Transportproteine, die allgegenwärtig in Natur vorkommt – die Mep/Amt-Familie. Die Transportproteine dieser Familie enthalten 11-12 Transmembrandomänen. Der N-Terminus und der C-Terminus dieser Proteine sind auf der inneren Seite der Zytoplasmamembran lokalisiert (N_{IN}C_{IN}) (Thomas *et al.*, 2000b).

Eine Hydrophobizitätsanalyse des abgeleiteten Proteins mit dem Programm Protean des DNASTar-Pakets nach (Kyte & Doolittle, 1982) zeigt hydrophobe Bereiche, die die Transmembrandomänen repräsentieren (nicht gezeigt). Eine Computeranalyse der Sekundärstruktur des *amtB*-Genprodukts mit den Programmen HMMTOP (Tusnady & Simon, 1998, <http://www.enzim.hu/hmmtop/>) und TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998, <http://www.cbs.dtu.dk/services/tmhmm/>) bestätigt das Vorkommen von 12 Transmembranhelices mit der Orientierung N_{IN}C_{IN} (Abb. 30).

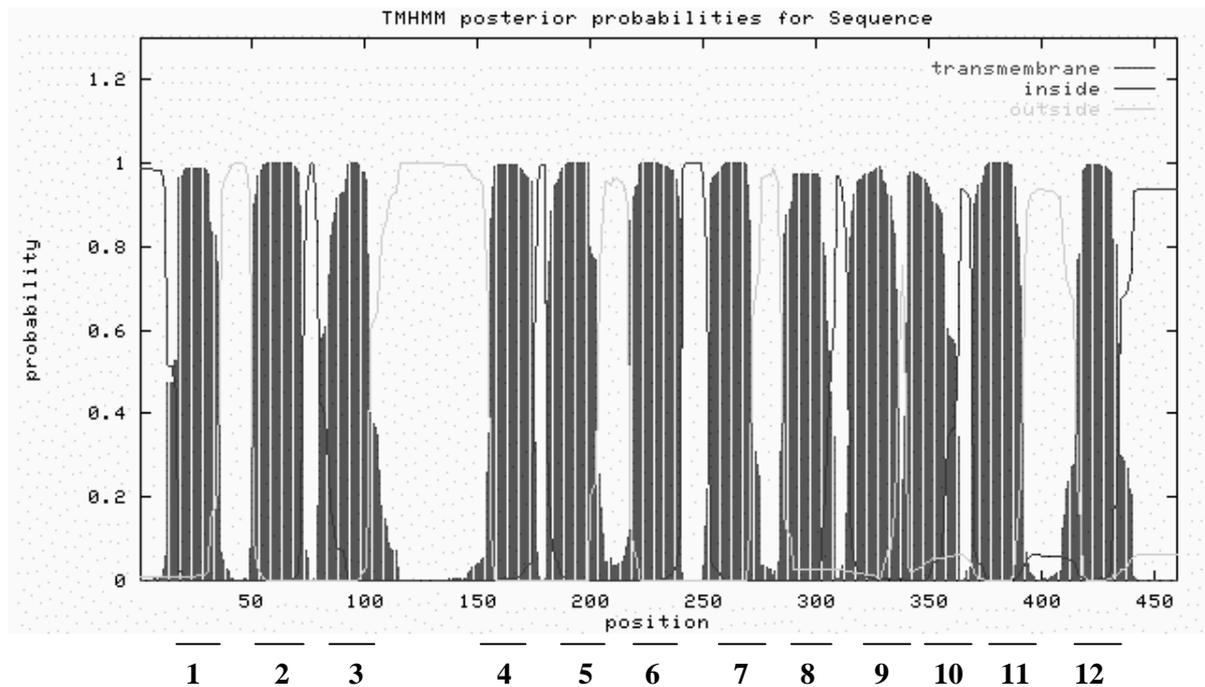


Abb. 30. Sekundärstruktur des AmtB1 von *A. diazotrophicus* (erhalten mit dem Programm TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998). Die horizontalen Linien zeigen die Transmembranhelices.

Die Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den AmtB-Proteinen und die Sekundärstruktur, die charakteristisch für die Proteine der Mep/Amt-Familie (Marini *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2000b) ist, sprechen dafür, dass das AmtB von *A. diazotrophicus* zu dieser Familie der Ammoniumtransporter gehört. Weitere Untersuchungen zum Phänotyp der AmtB-Mutanten und der Funktion des AmtB vor allem in Hinblick auf eine Aufnahme des Ammonium Struktur-Analogons [C¹⁴]-Methylammonium sollten im weiteren diese Hypothese prüfen. Ein Proteinalignment der Amt-Proteine ist in Anhang IV (S. 181) dargestellt.

D.3.4 Interposonmutagenese des *glnK*₁-Gens

Obwohl in einigen Organismen ein zweites Homolog des *glnB*-Gens beschrieben wurde und nach neueren Untersuchungen fast ubiquitär in Prokaryonten vorkommt, ist sehr wenig über die physiologische Rolle des Genproduktes – des GlnK bzw. P_Z-Proteins bekannt. Um das

von *glnK₁* kodierte Protein phänotypisch charakterisieren zu können, wurden wie schon für *glnB* beschrieben, Mutationen in das chromosomale *glnK₁*-Gen über Interposonmutagenese eingeführt. Wie die Sequenzanalyse zeigen konnte, weist die *glnK₁*-Kodierregion nur eine singuläre *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle auf. Diese wurde für die Insertion der Interposongenkassette in das *glnK₁*-Gen unter Verwendung des Plasmids pOP8 herangezogen. Die verwendete Resistenzgen-Kassette *gusAcat* entstammt hierbei dem Plasmid pWM4 (Metcalf & Wanner, 1993) und trägt ein promotorloses Reportergen, das für die β -Glukuronidase kodiert – *uidA* (*gusA*), und ein von seinem eigenem Promotor exprimiertes Chloramphenicolacetyltransferase-Gen - *cat*. Weiterhin hat dieses Interposon einen Transkriptionsterminator und ist somit polar bezüglich der Transkription stromabwärts des Insertionsortes lokalisierter Gene, wenn diese Gene ein Operon bilden und keinen eigenen Promotor haben. Die Plasmide pOP4 und pOP5 tragen das *gusAcat*-Interposon in die singuläre *Bgl*II-Schnittstelle des pOP8 in beiden Orientierung inseriert. Dabei wurde im Plasmid pOP5, das die Reportergen Kassette in *glnK₁* in α -Orientierung trägt, eine Transkriptionsfusion erzeugt, die eine Untersuchung der Expression des *glnK₁* Gens über die Messung der β -Glukuronidase-Aktivität ermöglichen sollte. Die DNA aus den Plasmiden pOP4 und pOP5 wurde mittels Elektroporation in *A. diazotrophicus* eingeführt und eine erfolgreiche Mutagenese über Southern Hybridisierung von Gesamt-DNA aus den nach der homologen Rekombination entstandenen Klonen gegen mit Digoxigenin-markierte *glnK₁*- oder *gusAcat*-Sonden verifiziert (Abb. 31).

Der Stamm *A. diazotrophicus* UBI125 trägt das *gusAcat*-Interposon in α -Orientierung, UBI 126 wurde über die Insertion des Interposons in β -Orientierung konstruiert (Abb. 32).

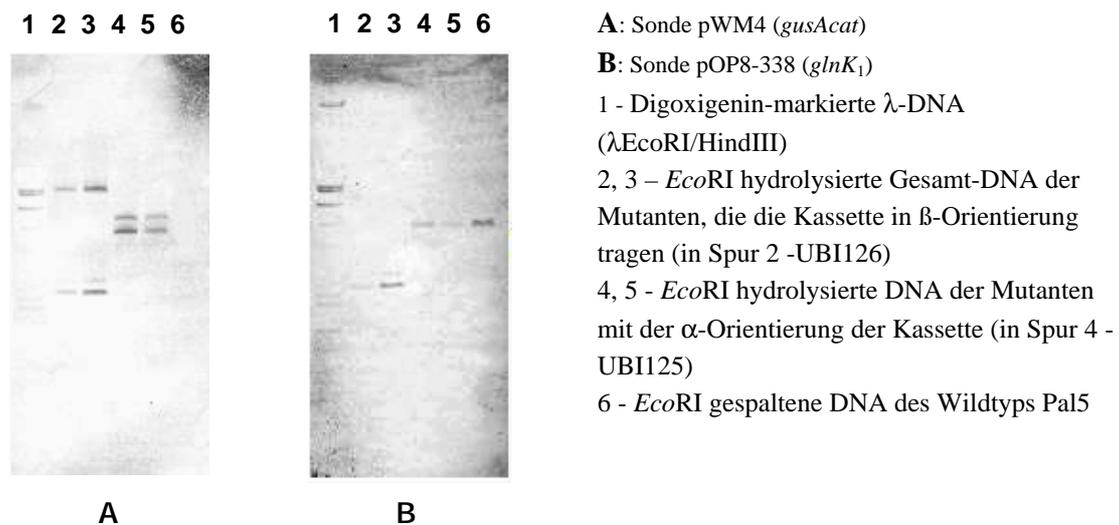


Abb. 31. Nachweis der Mutation im chromosomalen *glnK₁*-Gen aus *Acetobacter diazotrophicus*. Hydrolysierte Gesamt-DNA der Mutanten und des Wildtyps wurde mit den Digoxigenin-markierten Proben pWM4 (A) und *glnK₁* eines Deletionsderivats des Plasmids pOP8 (pOP8-338)(B) hybridisiert.

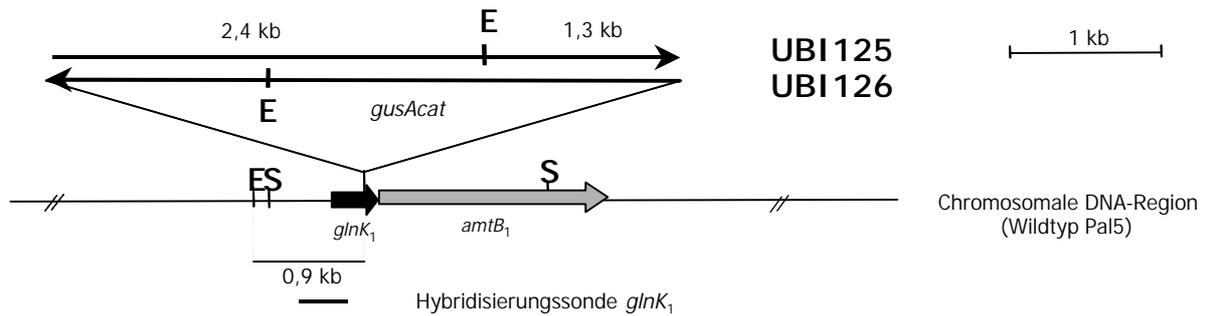


Abb. 32. Physikalische Karte der *glnK₁amtB₁*-Region und Mutationen in *glnK₁*. Der Mutantenstamm UBI125 trägt die Kasette in α -Orientierung in dem *glnK₁*-Gen (entstand nach der Rekombination mit der Plasmid-DNA pOP5). UBI126 ist eine *glnK₁*-Mutante mit der Kasette in β -Orientierung (Transformation mit dem Plasmid pOP4). E – *EcoRI*, S – *SalI*. Die Lage der Hybridisierungssonde *glnK₁* (pOP8-338) und die Größe der Fragmente sind dargestellt.

D.3.5 Mutagenese des *amtB₁*-Gens

Ein 1,9 kb *SmaI*-Fragment des Hybridplasmids pOP7, das das *amtB₁*-Gen trägt, wurde in den Vektor pSUP401 (Simon *et al.*, 1986) kloniert (Plasmid pOP88). Im weiteren erfolgte dann die Insertion des Interposons *gusAaphII* (pWM6) zwischen die *BclI*-Schnittstellen des *amtB₁*-Gens unter Verlust des internen 0,5 kb großen *BclI*-Fragments (Plasmide pOP113 und pOP116). (Abb. 33). Um die korrekte Insertion in das chromosomale *A. diazotrophicus* *amtB₁*-Gen über homologe Rekombination nachzuweisen, wurden nach der Elektroporation auf Kanamycin-resistente Ampicillin-sensitive-Kolonien einer Kontrollhybridisierung unterzogen.

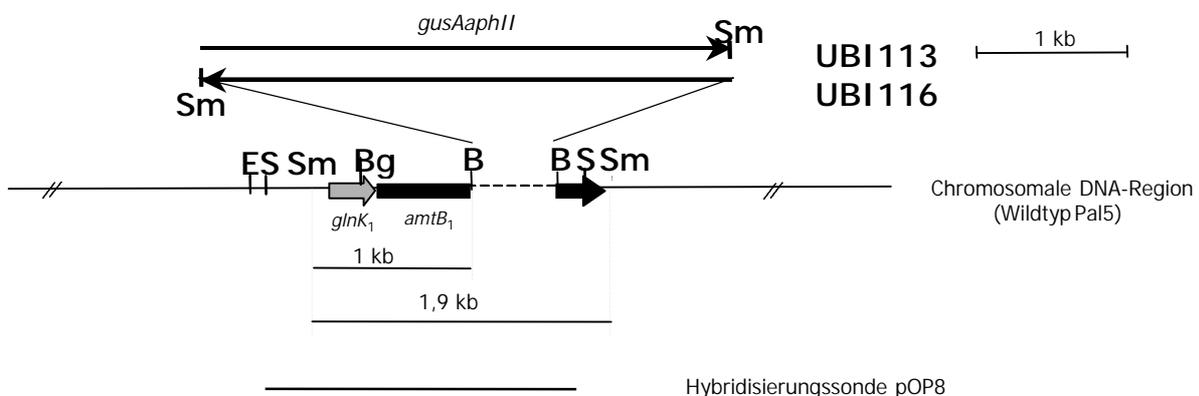


Abb. 33. Physikalische Karte der *glnK₁amtB₁*-Region und Mutationen in *amtB₁*. Die *amtB₁*-Mutantenstämme von *Acetobacter diazotrophicus* UBI113 und UBI116 wurden über Transformation des Wildtyps Pal5 mit den Plasmiden pOP113 (α -Orientierung der Kanamycin-resistenten Kasette im *amtB₁*) bzw. pOP116 (β -Orientierung) konstruiert. E – *EcoRI*, S – *SalI*, B – *BclI*, Sm – *SmaI*, Bg – *BglII*. Die Lage der Hybridisierungsprobe für *amtB₁* und die Größe der Fragmente sind dargestellt.

Die verwendeten Digoxigenin-markierten Hybridisierungsproben waren die über Nick-Translation markierten Plasmide pOP8 (mit dem Wildtyp-*amtB*₁) und pWM6 (Kassetten-Donor).

Die Southern Hybridisierung bestätigte die Integration der Plasmide pOP113 und pOP116 über homologe Rekombination und Doppelcrossover in das chromosomale *amtB*₁-Gen und damit den Verlust des Wildtyp-Gens (Abb. 34). Die physikalische Anordnung des Interposons in den resultierenden Mutantan UB113 und UBI116 ist in Abb. 33 (S. 102) dargestellt.

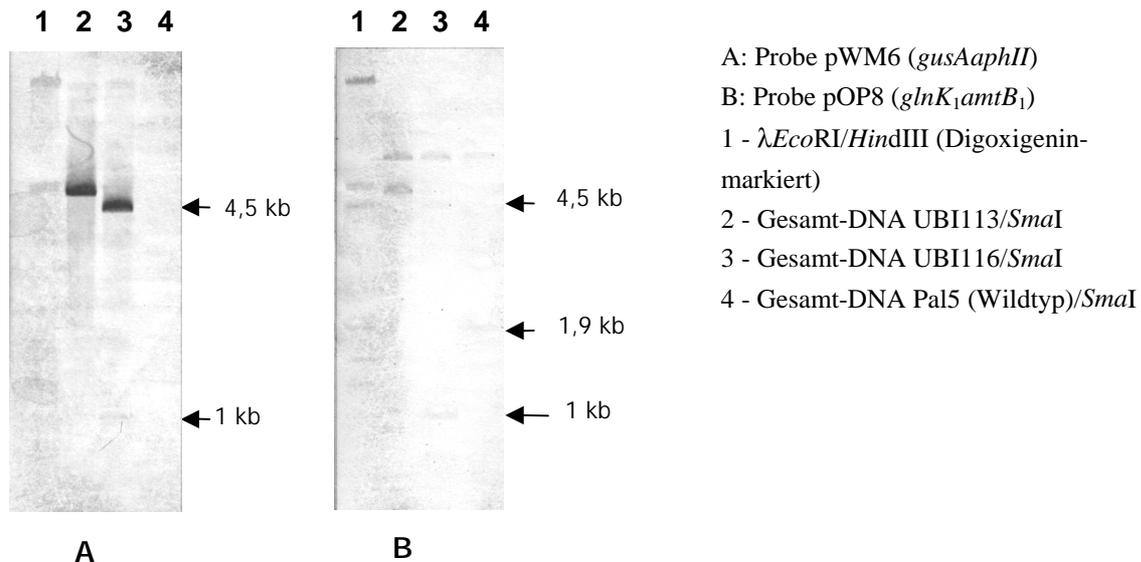


Abb. 34. Southern Hybridisierung zum Nachweis der chromosomalen *amtB*₁-Mutanten in *Acetobacter diazotrophicus*. Für die Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierten Sonden verwendet: **A** – pWM6 (*gusAaphII*-Kassette), **B** – pOP8. Wie erwartet, ergibt sich ein Signal mit 1,9 kb großem Fragment in dem Wildtyp bei der Hybridisierung mit pOP8, während diese Bande mit dem pWM6 als Sonde fehlt

D.3.6 Analyse der *glnK*₁- und *amtB*₁-Genexpression über die Messung der β -Glukuronidase-Aktivität

Die Messung der Enzymaktivität der β -Glukuronidase wurde unter Verwendung der *A. diazotrophicus* Mutanten UBI125 und UBI126 (*glnK*₁ ::*gusAcat*) bzw. UBI113 und UBI116 (*amtB*₁ ::*gusAaphII*) sowie dem Wildtypstamm Pal5 als Kontrolle durchgeführt (Abb. 35).

Die Bakterien-Stämme wurden hierzu jeweils auf Minimalmedium mit zwei unterschiedlichen NH₄⁺-Konzentrationen angezogen, um den Einfluss des fixierten Stickstoffs auf die Genexpression zu überprüfen - 1 mM Ammonium (N₂-Fixierung) versus 20 mM Ammonium (reprimierende Bedingungen). Die Meßwerte des Enzymaktivität sind anhand des Substratumsatzes der β -Glukuronidase in nmol/min/OD₆₀₀ in der Tabelle 5 dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte von drei unabhängigen GUS-Aktivitäts-Messungen angegeben.

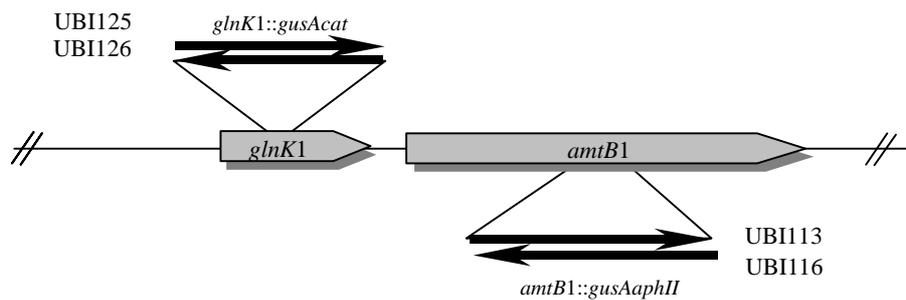


Abb. 35. Schematische Darstellung der *gusA*-Fusionen in der chromosomalen *glnK1:amtB1*-Region. Die Pfeile zeigen die Orientierung der Kassetten im Chromosom in entsprechenden Genen. Die Bezeichnung der Mutanten-Stämme ist dargestellt.

Die Mutante UBI 113, die die Insertion des Reportergens innerhalb des *amtB1*-Kodierbereichs trägt, zeigt eine gesteigerte GUS-Aktivität unter Ammoniummangel (Tab. 5). Bei Analyse der Expression der Genfusion im Stamm UBI116, der diese Kasette in der β -Orientierung trägt, zeigte sich lediglich eine geringe aber im Vergleich mit dem Wildtyp PAL5 signifikante, GUS-Aktivität. Diese ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass DNA-Sequenzen stromabwärts des *amtB1*-Gens als Promotorsequenz von der RNA-Polymerase erkannt werden. Eine Analyse der GUS-Expression in der Mutanten UBI125 (*glnK1::gusAcat*), wie sie der Stamm UBI113 den Charakter einer Stickstoff-regulierten Genexpression auf. Dennoch zeigte sich auch hier unter reprimierenden Bedingungen über dem Basallevel des Wildtypstammes liegendes Expressionslevel.

Tab. 5. Expression der *glnK1::gusA* und *amtB1::gusA* Fusionen in *Acetobacter diazotrophicus*. U -Umsatz der β -Glukuronidasesubstrates in nmol/min/OD₆₀₀. Die Ergebnisse sind als Messwerte von drei unabhängiger Experimenten dargestellt. Die Standardabweichung beträgt 10%. Bakterien wurden ü. N. in Minimalmedium LGI mit 1 mM bzw. 20 mM Ammonium angezogen.

β -Glukuronidase-Aktivität (U)		
Stamm	1 mM NH ₄ ⁺	20 mM NH ₄ ⁺
Pal5	0,6	0
UBI113	340,2	60,1
UBI116	30,4	21,3
UBI125	143,8	83,3
UBI126	0	0

Damit besteht die Möglichkeit, dass

- glnK1* und *amtB1* kotranskribiert werden und
- eine Basalexpression über einen konstitutiven Promotor erfolgt.

(c) Zusätzlich kann diese Expression unter Ammoniummangel Bedingungen unter Verwendung eines wahrscheinlich RpoN-NtrC abhängigen Promotors gesteigert werden (D.3.3.2, S. 96).

D.3.7 Konstruktion von *glnBglnK₁*-Doppelmutanten

Die Konstruktion von *glnBglnK₁*-Doppelmutanten erfolgte durch die Einführung des Plasmids pOP16 (*glnB::aphII*) in die Mutante *A. diazotrophicus* UBI125 (*glnK₁::gusAcat*) mittels Elektroporation und homologer Rekombination. Die so etablierte Doppelmutante UBI130 (*glnBglnK₁*; Km^RCm^R) wurde wiederum mittels Southern Hybridisierung verifiziert (Abb. 36) und der Phänotyp der Mutanten wurde im weiteren untersucht.

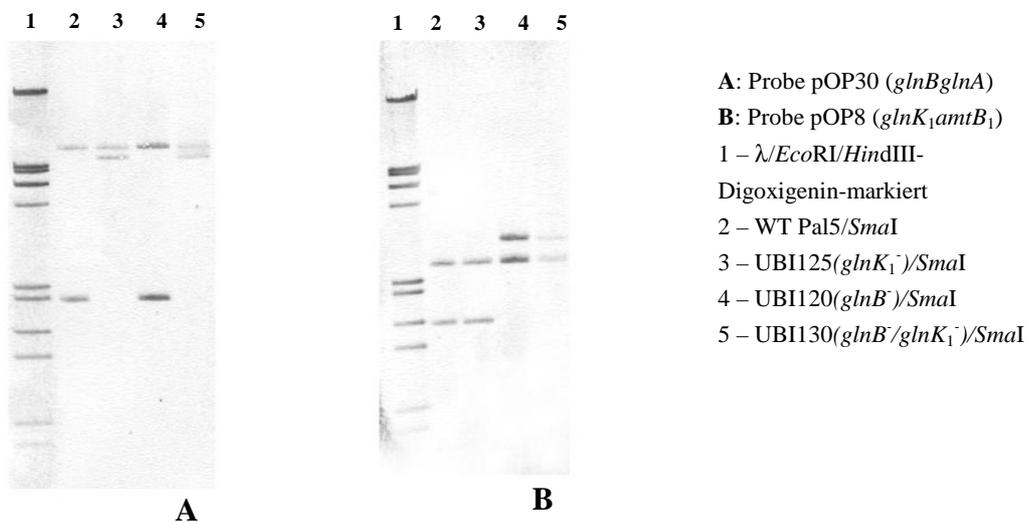


Abb. 36. Verifikation der *glnBglnK₁*-Doppelmutante (UBI130) über Southern Hybridisierung. Gesamt-DNA von *A. diazotrophicus* wurde mit *SmaI* gespalten und gegen die Digoxigenin-markierten Sonden pOP30 (*glnB*, A) bzw. pOP8 (*glnK₁*, B) hybridisiert. Die Hybridisierung zeigt die Veränderung in den chromosomalen *glnB*- und *glnK₁*-Regionen im Doppelmutanten-Stamm UBI130.

D.4 Untersuchungen zur Expression der P_{II}-homologen Proteine im *A. diazotrophicus* Wildtypstamm PAL5 sowie in *glnB*- und *glnK₁*-Mutanten-Stämmen

Die Expression der beiden P_{II}-homologen Proteine wurde in Western Blot-Experimenten unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen das P_{II}-Protein aus *Rhodospirillum rubrum* untersucht. Ein mit dem zu erwartenden Molekulargewicht korrelierendes Protein von ca. 12,5 kD wurde zunächst im *A. diazotrophicus* Wildtypstamm Pal5 und in beiden Mutantenstämmen – der *glnB*-Mutante UBI120 und *glnK₁*-Mutante UBI125 detektiert (Abb. 37). Die Gene, die für P_{II}-homologe Proteine kodieren, sind also mit den Antikörpern

gegen *R. rubrum*-P_{II} nachweisbar und laufen im SDS-PAGE mit gleicher Mobilität. Überraschenderweise zeigte sich jedoch wider Erwarten, dass auch in der Doppelmutante UBI130 weiterhin ein Signal vergleichbaren Molekulargewichts auftrat.

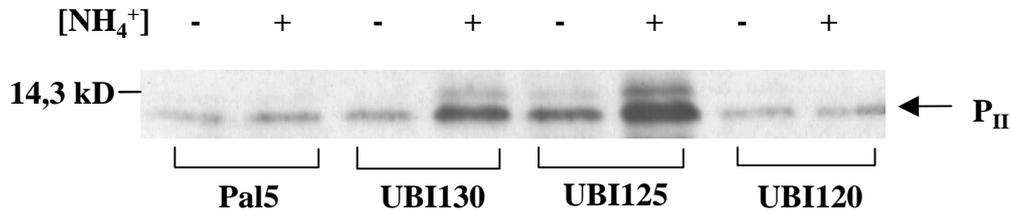


Abb. 37. Western Blot-Analyse der Expression P_{II}-homologer Proteine in zellfreien Extrakten aus *A. diazotrophicus* unter Verwendung von Anti-P_{II} Antikörpern aus *R. rubrum*. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Gegenwart von 1mM NH₄⁺ (-) oder 20 mM NH₄⁺ (+). Pal5 – *A. diazotrophicus* Wildtypstamm; UBI130 – *glnB::aphII, glnK1::gusAcat*; UBI125 – *glnK1::gusAcat*; UBI120 – *glnB::aphII*.

Diese Ergebnisse des Western Blots haben deutliche Hinweise auf die Existenz eines dritten P_{II}-homologen Proteins in *A. diazotrophicus* gegeben. Aufgrund des Vorkommens des dritten P_{II}-homologen Proteins lässt es sich aber derzeit über die Regulationsmechanismen der Expression der P_{II}-homologen Proteine in dem Wildtypstamm Pal5 und in Mutanten, die unter Ammoniummangel und im Ammoniumüberschuss angezogen wurden, keine Aussagen machen, da bislang keine Mutante in dem dritten Gen zur Verfügung stehen und die beobachteten Signale von Proteingemischen der verbleibenden Proteine herrühren können.

D.5 Untersuchung der Modifikation des P_{II}-Proteins in *Acetobacter diazotrophicus*

Die posttranslationale Modifikation der P_{II}-homologen Proteine erfolgt, soweit bekannt in den Proteobakterien am Aminosäurerest Tyrosin-51 als Antwort auf den zellulären N-Status. Um zu überprüfen, ob auch die Proteine P_{II} und GlnK1 aus *A. diazotrophicus* diesem Modifikationsmechanismus unterliegen, wurden zunächst zellfreie Extrakte sowohl aus stickstofffixierenden Kulturen als auch Kulturen, die unter Ammonium-Überschuss angezogen wurden, hergestellt. Nach der Inkubation mit [α -³²P]UTP wurden die Proteine in einem 18%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Autoradiographie zeigte ein deutliches erkennbares Signal, dass mit der Größe des P_{II}-Proteins korreliert (Abb. 38, A, S. 107).

Um zu zeigen, dass das beobachtete Signal die Folge einer Uridylylierungsreaktion ist, wurde parallel eine Behandlung der *in vitro* markierten Extrakte mit dem Enzym „snake venom phosphodiesterase“ durchgeführt. Die Enzymaktivität dieses Enzyms überführt das UMP-modifizierte Protein durch eine Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen dem Protein und dem UMP in die nicht modifizierte Form. Damit ist eine entsprechende Modifikation

nicht mehr nachweisbar (Abb. 38, B). Wird das untersuchte Protein nicht oder z. B. über Phosphorylierung modifiziert wie für *Synechococcus* sp. beschrieben (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1994), bleibt die Phosphodiesterase-Behandlung ohne Auswirkung. Daher lässt sich aus Abb. 38 und Abb. 39 schließen, dass es sich hier um Uridylylierungs-Signale handelt. Die Modifikation des P_{II}-Proteins durch Uridylylierung wurde z. B. in *Rhodospirillum rubrum* (Johansson & Nordlund, 1997) oder *Rhizobium leguminosarum* (Colonna-Romano *et al.*, 1993) nachgewiesen.

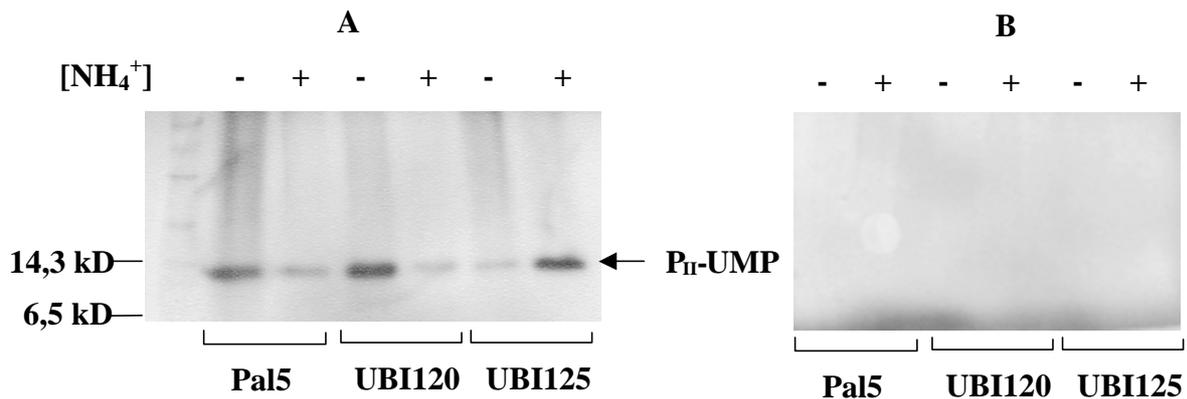


Abb. 38. Modifikation der PII und GlnK1 in *Acetobacter diazotrophicus* (A) und die Wirkung der SVPD auf die modifizierten (uridylylierten) Proteine (B). Zellfreie Proteinextrakte wurden von Zellen, deren Anzucht in Gegenwart von 1mM NH_4^+ (-) oder 20 mM NH_4^+ (+) erfolgte, hergestellt. Pal5 – *A. diazotrophicus* Wildtypstamm; UBI120 – *glnB::Km*; UBI125 – *glnK1::gusAcat*.

Der Einbau von $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-UMP}$ wurde über die Zugabe von α -Ketoglutarat, einem Effektor der UTase (*glnD*), zum Reaktionsgemisch stimuliert. Dabei würde *in vitro* mehr radioaktiv-markiertes UMP in die Proteinextrakte eingebunden, die *in vivo* in geringer uridylyliertem Zustand vorlagen. Wenn die von der UTase katalysierte Modifikation des P_{II}-Proteins in *A. diazotrophicus* wie in *E. coli* unter Ammonium-limitierten Bedingungen stattfindet, würden die Proteinextrakte aus den Zellen, die unter diesen Bedingungen angezogen wurden und bereits in uridylyliertem Zustand in der Zelle vorliegen, weniger Substrat für die *in vitro* Uridylylierung darstellen und das Signal intensiver in zellfreien Extrakten aus unter Ammonium-Überschuss angezogenen Bakterien sein sollte (Abb. 38, 39).

Da die durchgeführten Western Blot-Analysen (D.4, S. 106) vermuten ließen, dass *A. diazotrophicus* über eine dritte Kopie eines P_{II}-homologen Proteins verfügt, wurde auch die *glnBglnK1*-Doppelmutante (UBI130) auf die Uridylylierung des potentiellen dritten P_{II}-homologen Proteins untersucht. Interessanterweise zeigte sich auch hier ein radioaktives Signal gleicher Größe wie im Wildtyp Pal5 (Abb. 39).

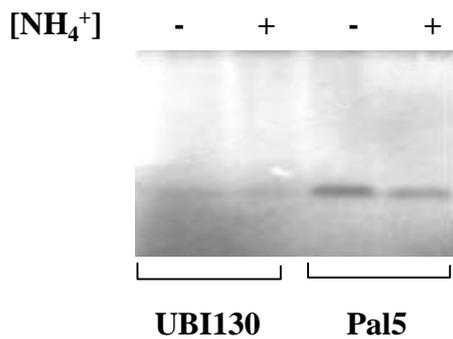


Abb. 39. Untersuchung der Modifikation der P_{II}-Proteine in der Doppelmutante UBI130 von *A. diazotrophicus*. Zellfreie Proteinextrakte wurden von Zellen, deren Anzucht in Gegenwart von 1mM NH₄⁺ (-) oder 20 mM NH₄⁺ (+) erfolgte. Pal5 – *A. diazotrophicus* Wildtypstamm; UBI130 – *glnB*::Km, *glnK*₁::*gusAcat*.

Damit stützen auch die Ergebnisse der Autoradiographie die Hypothese, dass *A. diazotrophicus* mehr als zwei P_{II}-homologe Proteine besitzt. Das beobachtete Signal des Stamms UBI130 ist im Unterschied zum Wildtyp von gleicher Intensität unabhängig von den Anzuchtbedingungen (N⁺ versus N⁻) (Abb. 39). Weiterhin scheint das beobachtete Uridylylierungs-Signal in zellfreien Extrakten des Stamms UBI125 (*GlnK*₁-Mutante), im Unterschied zum Wildtypstamm Pal5 und der Mutante UBI120 (P_{II}-Mutante), intensiver in Extrakten der Zellen zu sein, die unter Ammonium-Überschuss angezogen wurden (Abb. 38, A). Um diesen Effekt bzw. die Regulation der P_{II}-Modifikation in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli zu untersuchen, sind jedoch weitere Experimente notwendig, da im Rahmen dieser Arbeit keine Einzelmutanten des dritten *glnB*-homologen Gens sowie unterschiedliche Kombinationen von Doppelmutanten unter Berücksichtigung des dritten *glnB*-homologen Genlocus erzeugt werden konnten und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beobachteten Signale aus einem Gemisch dieser Proteine herrühren.

D. 6 *A. diazotrophicus* trägt ein drittes *glnB*-homologes Gen - *glnK*₂

D.6.1 Identifizierung des *glnK*₂*amtB*₂-Genlocus

Um die Existenz eines dritten P_{II}-homologen Proteins, das aufgrund der beiden oben beschriebenen Experimente (Abb. 37, 39) postuliert wurde, über molekularbiologische Daten zu belegen, wurde versucht, die korrespondierende chromosomale Genregion zunächst in *E. coli* zu klonieren. Als Ausgangspunkt hierzu erfolgte Southern Hybridisierung unter Verwendung von *A. diazotrophicus* Gesamt-DNA. Da, wie bereits im Fall von *glnB* und *glnK*₁ gezeigt, eine Homologie zu den bereits identifizierten *glnB*-homologen Genen auf DNA-Ebene zu erwarten war, wurden diese unter Bedingungen erniedrigter Stringenz als Hybridisierungsproben eingesetzt. Hierbei konnte unter Verwendung des Plasmids pOP8 (*glnK*₁*amtB*₁) als Probe das Auftreten eines zusätzlichen Hybridisierungssignals von 3,2 kb nach Auftrennung von *SalI*-hydrolysiertes Gesamt-DNA nachgewiesen werden (Abb. 40). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die korrespondierende chromosomale Genregion über Hybridisierungsexperimente mit der zuvor beschriebenen λ-Phagen-Genbank identifiziert.

Aus einer Anzahl von Genbank-Klonen gelang es einen, als EMBL-P3 bezeichneten Bakteriophagen zu isolieren, der ein *SalI*-Restriktionsfragment von 3,2 kb trägt. Diese DNA wurde mit dem durch die Restriktionsendonuklease *SalI* linearisierten Vektor pUC19 ligiert und in *E. coli* transformiert. Das konstruierte Hybridplasmid wurde als pOP80 bezeichnet und die Nukleinsäuresequenz der inserierten chromosomalen DNA wurde ermittelt.

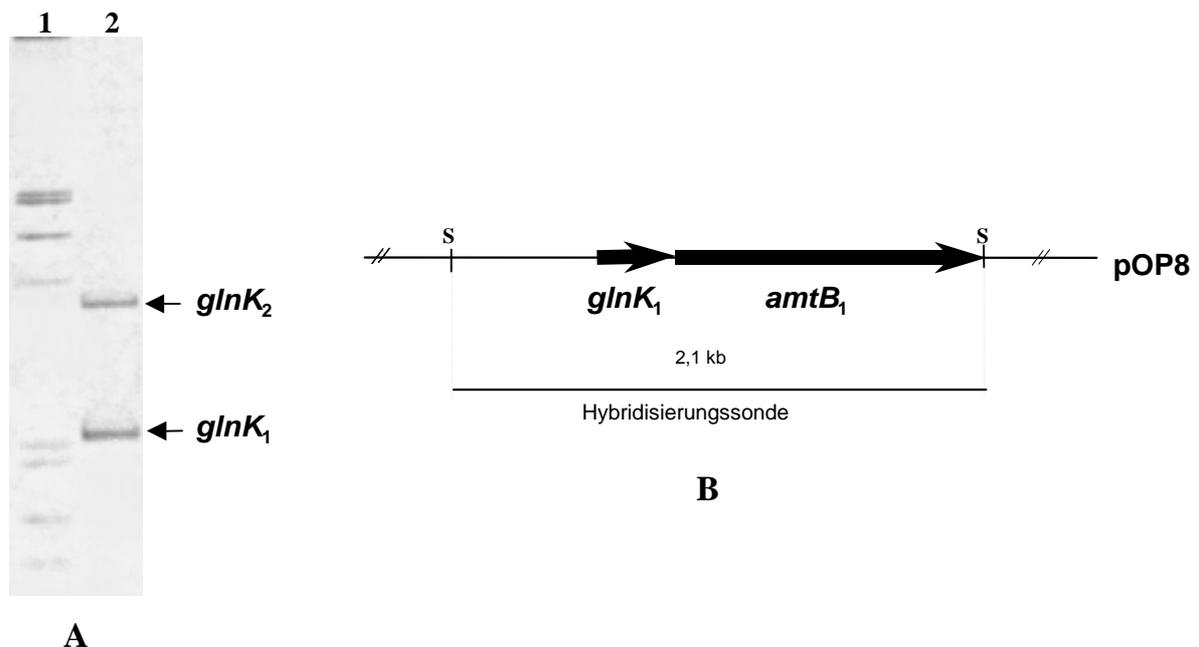


Abb. 40. Southern Hybridisierung zur Isolierung des zu *glnK₂amtB₂* Fragments (*glnK₁amtB₁*-Homolog). A: *diazotrophicus* Pal5 (Wildtypstamm) Gesamt-DNA wurde mit dem Enzym *SalI* gespalten (A: Spur1 – Digoxigenin-markierte λ -DNA/*EcoRI*/*HindIII*; Spur 2 – *SalI*-hydrolysierte Gesamt-DNA) und gegen die 2,1 kb große Digoxigenin-markierte *glnK₁amtB₁*-Sonde (B) hybridisiert. Die beiden Signale entsprechen den *SalI*-Fragmenten mit den Größen 2,1 kb (*glnK₁amtB₁*) und 3,2 kb (*glnK₂amtB₂*). S - *SalI*.

D.6.2 Sequenzanalyse der *glnK₂amtB₂*-Genregion und Charakterisierung der abgeleiteten Genprodukte

Der sequenzierte DNA-Bereich umfasst das komplette 3,2 kb *SalI*-Restriktionsfragment des Phagen EMBL-P3 mit einer Länge von 3208 bp. Im Rahmen der Sequenzanalyse konnten zunächst drei offene Leserahmen identifiziert werden, die im weiteren über Datenbankvergleiche untersucht wurden. Die physikalische Karte der sequenzierten DNA-Region ist in Abb. 41 gezeigt.

- Der erste ORF ist auf der kloniert vorliegenden DNA Region nur unvollständig vorhanden. Die abgeleitete Proteinsequenz von 337 AS hat bis zu 57% Übereinstimmung zur C-terminalen Region von D-Alanin-Dehydrogenasen (D-Aminosäuren-Dehydrogenasen, *dada*-Genprodukt) anderer Organismen.

- Die Nukleotidsequenz des ORF2 ist komplett vorhanden und auf der Ebene der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu 66% identisch mit den Genprodukten der Gene *glnZ* bzw. *glnK* aus *Azospirillum brasilense* (de Zamaroczy *et al.*, 1996), *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998) und *E. coli* (van Heeswijk *et al.*, 1995). Die Nukleotidsequenz dieses 336 nt langen ORFs beginnt mit dem Startcodon ATG an Position 1574 und endet mit einem Stopcodon an Position 1909 und kodiert damit für ein Protein von 112 AS mit einem korrespondierenden Molekulargewicht von 12,308 kD. Das Gen wurde *glnK₂* genannt.
- Der dritte ORF kodiert für ein Protein, das signifikante Homologien zu Proteinen der Amt-Familie, wie AmtB und NrgA, aufweist. Das abgeleitete Protein ist zu 53% der Aminosäurepositionen identisch zu dem AmtB-Protein aus *Azospirillum brasilense* (Van Dommelen *et al.*, 1998) und 43% zum Transmembranprotein NrgA aus *Bacillus subtilis* (Wray *et al.*, 1994). Das putative Startcodon dieses Proteins ist ein GTG an Position 1909. Alternativ kommt ein Startcodon ATG an Position 1966 in Betracht. Eine mögliche Shine-Dalgarno Sequenz (GGAGA) konnte aber nur vor dem GTG Startcodon in einem Abstand von 8 nt identifiziert werden. Der Translationsstart des ORF3 -Proteins überlappt damit wahrscheinlich mit dem Stopcodon des ORF2. Dieses *amtB*-Homolog wurde *amtB₂* genannt.

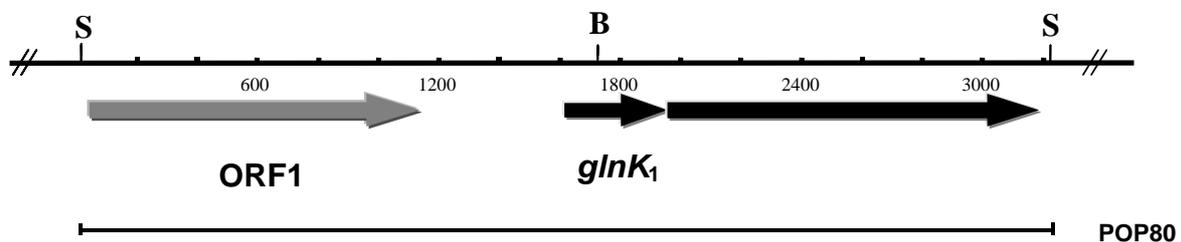


Abb. 41. Physikalische Karte der *glnK₂amtB₂*-Region. Die identifizierten Gene sind als Pfeile dargestellt. Das Plasmid pOP80 ist ein pUC19-Derivat mit dem 3,2 kb *SalI*-Fragment. S – *SalI*, B – *BglII*. ORF1 zeigt signifikante Homologien zu den *dadA*-Genen (D-Aminosäure-Dehydrogenasen (Tab. 6, S. 113).

In dem sequenzierten Bereich konnten keine putativen Promotorsequenzen und keine konservierten Bindestellen für bekannte Transkriptionsaktivatoren stromaufwärts der beiden Gene (*glnK*-Homolog und *amtB*-Homolog) identifiziert werden. Die Promotorregion der Gene *glnK₂* und *amtB₂* ist in Abb. 42 dargestellt. Der Bereich stromaufwärts des *glnK₂*-Gens ist AT-reich und könnte wahrscheinlich auf eine konstitutive Expression des *glnK₂*-Gens (oder des *glnK₂amtB₂*-Operons) hinweisen.

Sekundärstruktur lässt sich schließen, dass das putative Protein ein Protein der AmtB/Mep-Familie ist und an Ammoniumtransport in *A. diazotrophicus* beteiligt sein könnte. Das von sequenzierten Region abgeleitete 434 AS lange Polypeptid zeigt 85,5% Identität zum abgeleiteten AmtB1-Protein (mit der Länge von 463 AS von einem GTG-Startcodon) in diesem Organismus.

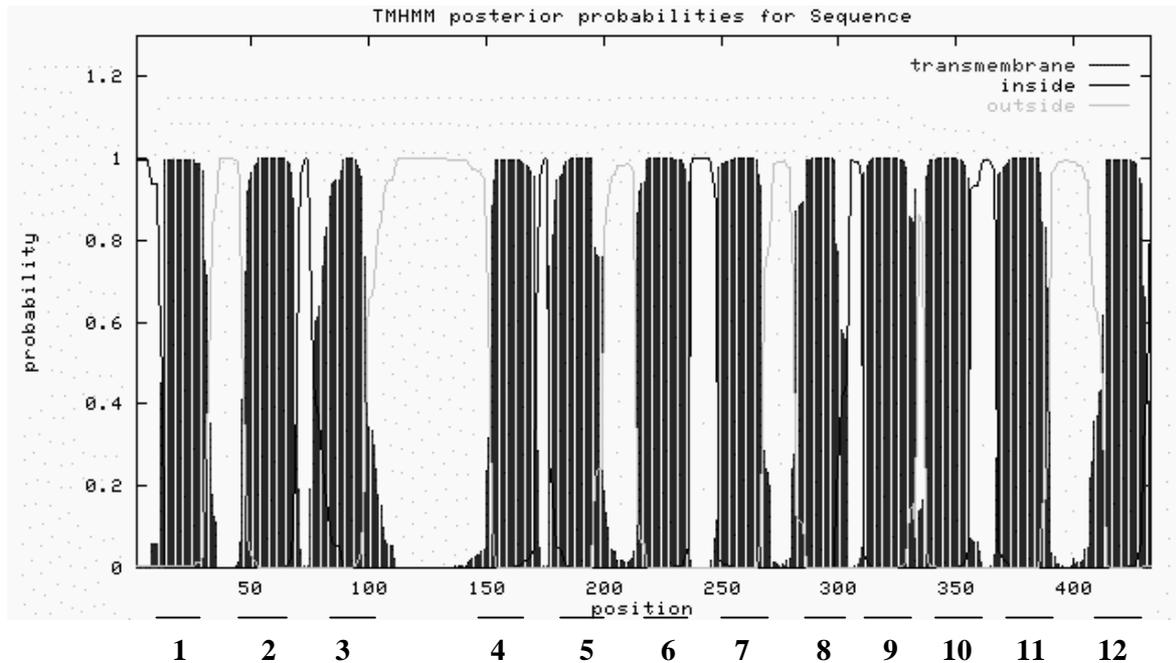


Abb. 43. Transmembrandomäne des AmtB2-Proteins von *A. diazotrophicus*. Sekundärstruktur wurde mit dem Programm TMHMM ermittelt. Die horizontalen Linien zeigen die Transmembranhelices.

Basierend auf diesen Daten zeigt sich, dass das Plasmid pOP80 eine dritte Kopie eines *glnB*-Homologen sowie für ein zweites Ammoniumtransport-homologes Protein kodiert. Aufgrund der Konservierung der Genanordnung dieser Genloci wurden diese als *glnK₂* und *amtB₂* bezeichnet. Somit konnten erstmals in einem Organismus der α -Subgruppe der Proteobakterien drei *glnB*-homologe Gene (*glnB*, *glnK₁*, *glnK₂*) nachgewiesen werden. Die Coexistenz mehrerer *amtB*-homologer Gene ist demgegenüber auch für andere Organismen dieser taxonomischen Gruppe beschrieben oder postuliert (Thomas *et al.*, 2000a). In der Tabelle 6 ist ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *glnK₂* und *amtB₂* mit den homologen Proteinen anderer Organismen dargestellt.

Auf DNA-Ebene sind *glnK₁amtB₁* und *glnK₂amtB₂*-Gene von *A. diazotrophicus* zu 74% identisch. Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen dieser Bereiche ist in Anhang V (S. 184) dargestellt.

D. ERGEBNISSE

Tab. 6. Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei ORFs des Plasmids pOP80, mit in den in der Datenbank erhaltenen Aminosäuresequenzen anderer Organismen sowie den abgeleiteten Genprodukte der *glnK*₁ und *amtB*₁-Gene von *A. diazotrophicus*. * - Vergleich der partiellen abgeleiteten Proteinsequenz des *amtB*₂-Gens.

ORF	Homologes Gen	Genprodukt	Organismus	Taxonomische Anordnung	Größe des Proteins (AS)	% identische AS	% ähnliche AS
ORF1	<i>dadA</i>	D-Alanin-Dehydrogenase	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	α-Subgruppe	416	57	72
	<i>dadA</i>	D-Aminosäuren-Dehydrogenase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-Subgruppe	432	51	65
	VC0786		<i>Vibrio cholerae</i>	- „ -	421	54	70
	<i>dadA</i>		<i>Escherichia coli</i>	- „ -	432	51	68
ORF2 (<i>glnK</i> ₂)	<i>glnZ</i>	P _Z	<i>Azospirillum brasilense</i>	α-Subgruppe Proteobakterien	112	66	83
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ-Subgruppe	112	66	81
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Escherichia coli</i>	- „ -	112	66	79
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	- „ -	112	65	80
	<i>glnK</i>	GlnK	<i>Rhizobium etli</i>	α-Subgruppe	112	65	79
	<i>glnK</i>₁	GlnK1	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	- „ -	112	70	95
ORF3 (<i>amtB</i> ₂)	<i>amtB</i>	AmtB	<i>Azospirillum brasilense</i>	α-Subgruppe	438	53	65
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-Subgruppe	442	51	60
			<i>Neisseria meningitidis</i>	β-Subgruppe	434	51	65
			<i>Azorhizobium caulinodans</i>	α-Subgruppe	493	42	54
	<i>nrgA</i>	NrgA	<i>Bacillus subtilis</i>	Gram ⁺	404	43	56
	<i>amtB</i>	AmtB	<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ-Subgruppe	436	47	58
			<i>Xantomonas citri</i>	γ-Subgruppe	491	43	55
			<i>Rhizobium etli</i>	α-Subgruppe	474	40	53
	<i>amtB</i>₁	AmtB1	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	- „ -	463	87	97*

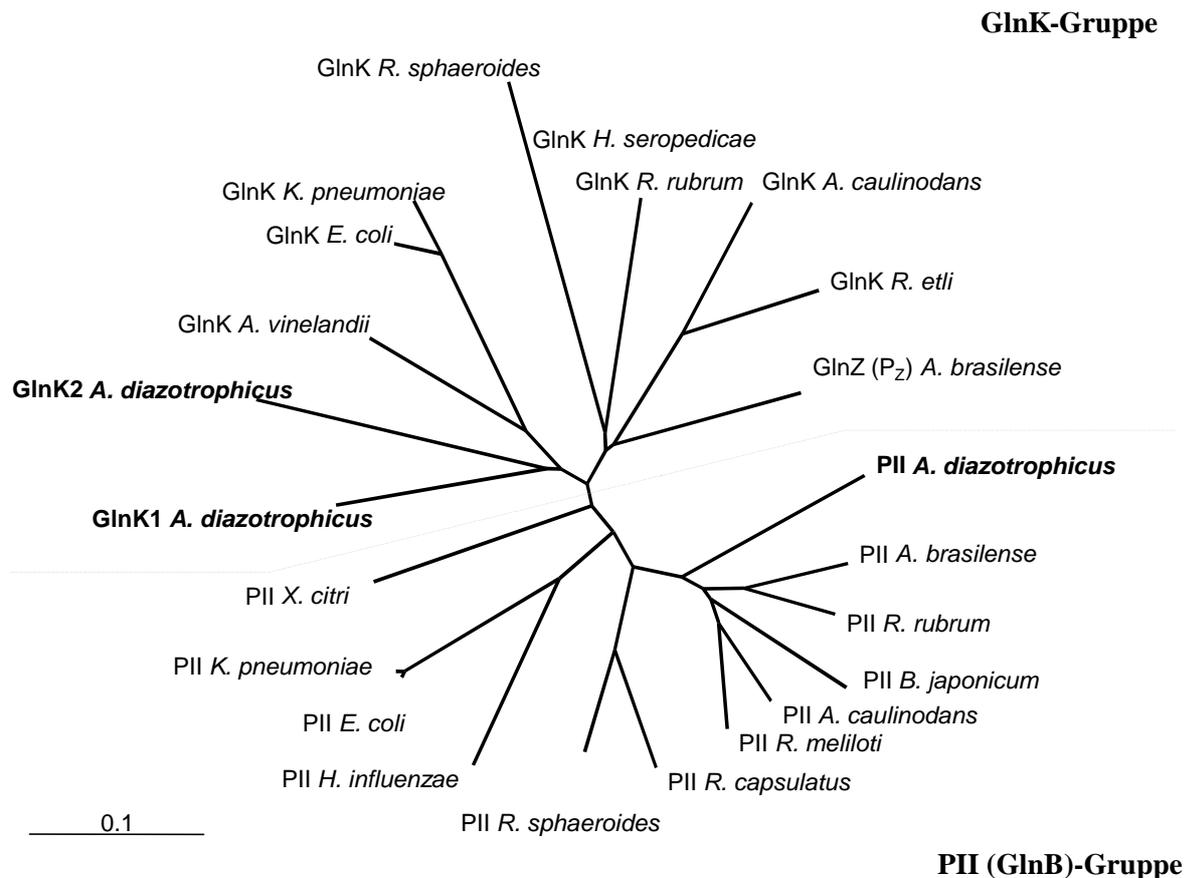


Abb. 45. Phylogenetischer Stammbaum der bekannten P_{II}-homologen Proteine der Proteobakterien, der die relative Stellung der in dieser Arbeit identifizierten *A. diazotrophicus* Proteine P_{II}, GlnK1 und GlnK2 zeigt. Alle Proteinsequenzen wurden bei NCBI oder SWISSPROT erhalten.

D. 7 Analyse des Einflusses der Mutationen in *glnB* und *glnK₁*-Genen auf die physiologischen Eigenschaften von *A. diazotrophicus*

Das Wachstum der Stämme UBI120, UBI130 und UBI125, die die chromosomalen Mutationen in den untersuchten Genen tragen, wurden unter verschiedenen physiologischen Bedingungen analysiert. Aus der Analyse des Wachstums lassen sich die Phänotypen von Mutanten in Bezug auf die Fähigkeit zur Verwertung von unterschiedlichen Stickstoffquellen und somit mögliche Beteiligung von *glnB/glnK₁* an der Regulation der Stickstoff-Assimilation bestimmen. In diazotrophen Mikroorganismen beeinflussen Aminosäuren die Stickstofffixierung (Hartmann *et al.*, 1988; Yoch & Pengra, 1966). Dabei zeigen sich Unterschiede im Metabolismus der Aminosäuren in den verschiedenen untersuchten Spezies. Die Untersuchung der Regulation von Aminosäureverwertung sowie der N₂-Fixierung könnte potentiell praktische Bedeutung für die endophytischen Assoziation von *A. diazotrophicus* mit

der Wirtspflanze haben. Das Wachstumsverhalten wurde zunächst auf LGI-Minimalmedium-Agarplatten (C.18.2, S. 75) mit den verschiedenen Aminosäuren als N-Quelle und im weiteren in Flüssigkultur anhand der Messung der optischen Dichte bei 600 nm untersucht. Die Messung des Wachstums erfolgte über einen Zeitraum von über 80 Stunden. In Flüssigkulturen traten Unterschiede bereits in Vollmedium auf, wo die *glnB*-Mutanten (UBI120) und *glnK₁*-Mutanten (UBI125) langsamer als der Wildtyp wachsen. Während die Generationszeit des Wildtyps Pal5 unter den hier gewählten Bedingungen 5 h beträgt, liegt die Generationszeit der *glnB*- und *glnK₁*-Einzelmutanten bei 6-7 h. Die Doppelmutation in den Genen *glnB* und *glnK₁* führt zu einer zusätzlichen Verlängerung der Generationszeit auf ca. 10 Stunden (Abb. 46).

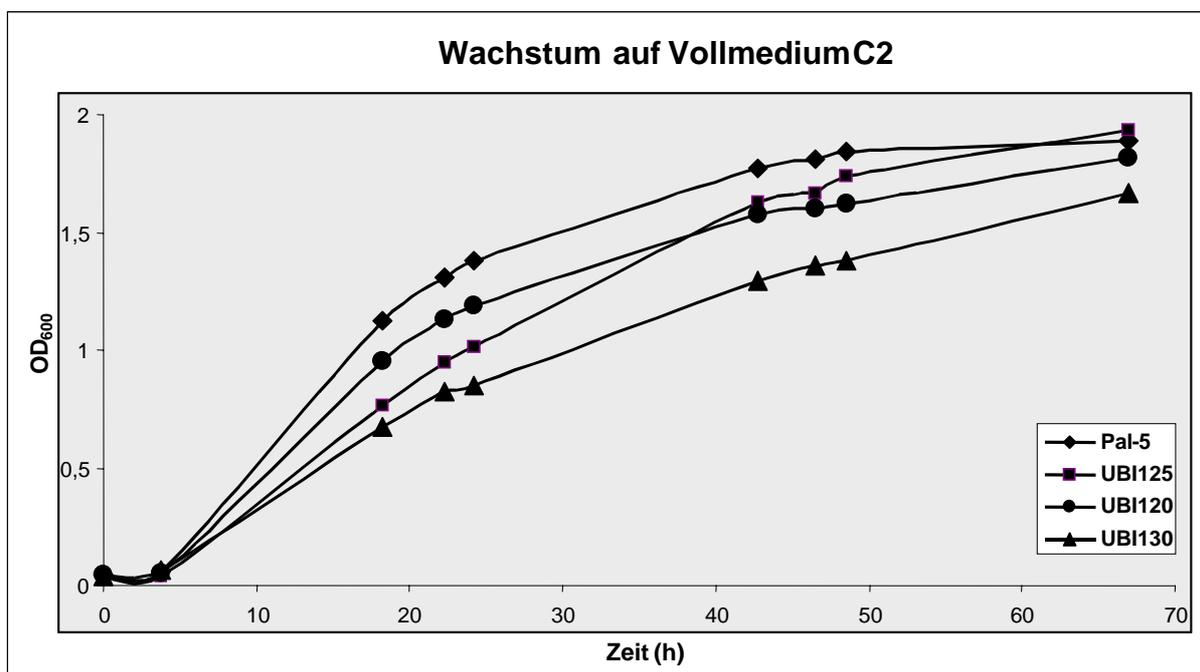


Abb. 46. Wachstum der Mutanten auf Vollmedium C2. Pal5 – Wildtypstamm, UBI120 – *glnB*-Mutante, UBI125 – *glnK₁*-Mutante, UBI130 – *glnB/glnK₁*-Doppelmutante .

Außerdem zeigen *glnB*-Mutanten ein verzögertes Wachstum auf Alanin (Abb. 47, A) als einziger Stickstoffquelle und *glnK₁*-Mutanten einen intermediären Phänotyp mit einer signifikanten Verlängerung der Generationszeit. Diese phänotypischen Unterschiede der Einzelmutanten mit inaktivierten *glnB*- und *glnK₁*-Genen weisen möglicherweise auf unterschiedliche Funktionen dieser beiden Proteine im Organismus in der Regulation des N-Stoffwechsels hin. Die Inaktivierung des *glnK₁*-Gens führt nicht zu grundsätzlichen Veränderungen des Wachstumsverhaltens des Bakterienstammes unter allen getesteten Bedingungen. Doppelmutanten wachsen auf allen getesteten Medien langsamer, was auf die globale regulatorische Rolle der beiden Proteine – P_{II} und GlnK1 hinweist (Abb. 46, 47).

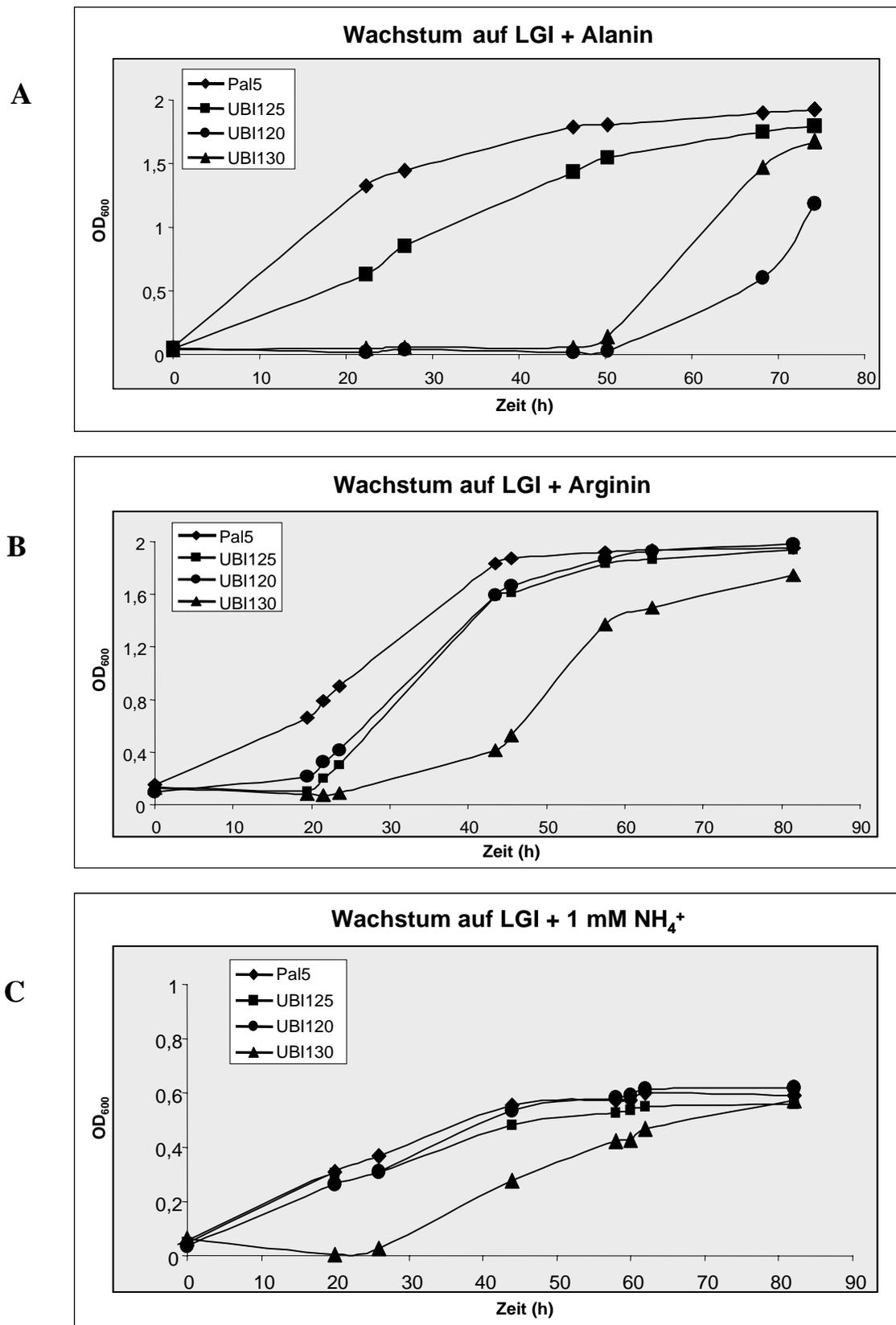


Abb. 47. Wachstum der Mutanten auf Minimalmedium LGI + Alanin (A), LGI + Arginin (B), LGI + 1 mM NH₄⁺ (C). Pal5 – Wildtypstamm, UBI120 – *glnB*⁻, UBI125 – *glnK₁*⁻, UBI130 – *glnB/glnK₁*⁻

In einigen Organismen wurde Beteiligung des *rpoN* (σ^{54})-Faktors an der Regulation der Gene, die für die Beweglichkeit des Organismus verantwortlich sind, beschrieben (Milcamps *et al.*, 1996). Wenn NtrC als Regulator der σ^{54} -abhängigen Promotoren an diesem Prozess beteiligt ist, könnte auch das P_{II}-Protein direkt oder indirekt in diese Regulation involviert sein. Der Beweglichkeitstest wurde mit in dieser Arbeit konstruierten Mutanten sowie mit den *ntrC*- (Meletzus, nicht veröffentlicht) und *ntrA*-Mutanten (Reth, 2000) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl *glnB*, *glnBglnK₁*-Doppelmutanten als auch *glnK₁*-Mutanten in dieser Funktion beeinträchtigt sind (Abb. 48, A) während *ntrC*- und *ntrA*-Mutanten keine signifikante Unterschiede zum Wildtyp Pal5 in Beweglichkeit zeigen (Abb. 48, B). Das Ntr-System ist anscheinend an der Regulation der Motilität in *A. diazotrophicus* unter ausgewählten experimentellen Bedingungen nicht beteiligt.

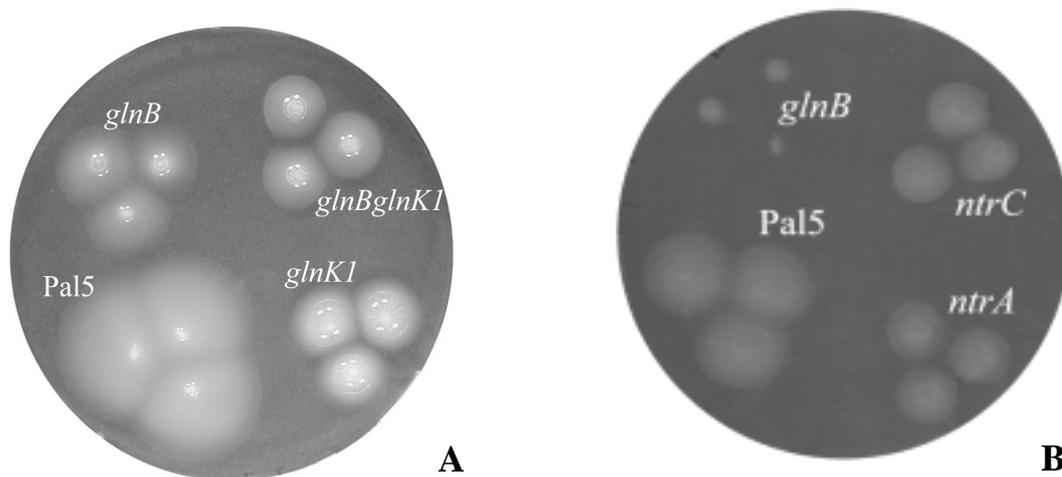


Abb. 48. Beweglichkeit der Mutanten. **A** – Einfluss der *glnB*, *glnK₁* und *glnBglnK₁*-Doppelmutation; **B** – Vergleich der Beweglichkeit der *glnB*-Mutante mit den *ntrC*- und *ntrA*-Mutanten. Bakterien wurden auf Weichagarplatten (0,3%) mit Minimalmedium LGI + 1 mM NH₄Cl angeimpft, bei 30°C inkubiert und die Wachstumseigenschaften wurden verglichen.

D. 8 Untersuchung der Funktion P_{II}-homologer Proteine in der Regulation der Stickstofffixierung

D.8.1 Analyse der Nitrogenaseaktivität in dem *glnB*-Mutantenstamm

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass P_{II}-homologe Proteine in einigen diazotrophen Organismen nicht nur an der Regulation des N-Metabolismus, sondern auch an der Regulation der Stickstofffixierung beteiligt sind. So zeigen z. B. in *Azospirillum brasilense* *glnB*-Mutanten einen Nif⁻ Phänotyp und das P_{II}-Protein scheint die Aktivität des Transkriptionsaktivators der *nif*-Gene, NifA, zu regulieren (Arsene *et al.*, 1996). In *Klebsiella*

pneumoniae ist das GlnK-Protein an der Regulation der Aktivität von NifA durch NifL in Abhängigkeit von Ammonium und Sauerstoff beteiligt (Jack *et al.*, 1999). Um die Rolle der Genprodukte P_{II} und GlnK1 in der Stickstofffixierung in *A. diazotrophicus* zu bestimmen, sollte die Expression und die Aktivität der Nitrogenase in den Mutantenstämmen unter reprimierenden (LGI + 20 mM NH₄⁺) und dereprimierenden (LGI + 1 mM NH₄⁺) Bedingungen anhand der Messung der Nitrogenaseaktivität in Acetylenreduktionsexperimenten untersucht werden. Aufgrund seiner relativ geringen Substratspezifität katalysiert der Nitrogenasekomplex nicht nur die N₂-Reduktion, sondern auch die Reduktion von Acetylen zu Ethylen. Letztere ist gaschromatographisch nachweisbar. Die Mutantenstämme und der Wildtypstamm Pal5 wurden hierzu bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in Testmedium (LGI + 1mM bzw. 20 mM NH₄⁺) bei 30°C angezogen (OD₆₀₀ = 0,5-0,8). Nach einer Zugabe von Acetylen und einer weiteren 4 stündigen Inkubation bei 30°C erfolgte die gaschromatographische Bestimmung des gebildeten Ethylens. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass alle getesteten Mutanten (*glnB*, *glnK*₁, *glnB**glnK*₁ und *amtB*₁) wie der Wildtyp zur Stickstofffixierung fähig sind. In den Mutanten UBI113 (*amtB*₁::*gusAaph*) und UBI125 (*glnK*₁::*gusAcat*) sind keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp in der Ammonium-abhängigen Regulation der Stickstofffixierung zu beobachten. Interessanterweise zeigte sich, dass die Mutante UBI120 (*glnB*::*aphII*) auch eine, wenn auch reduzierte, Nitrogenaseaktivität unter reprimierenden Wachstumsbedingungen aufweist (Abb. 49, S. 120). Die Nitrogenaseaktivität ist im Vergleich zum Wildtyp in Gegenwart von 1 mM Ammonium erhöht und ist auch nach Anzucht in 20 mM Ammonium als Stickstoffquelle detektierbar. Um die Regulation der Nitrogenaseaktivität (oder *nif*-Expression) in Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration in *glnB* Mutanten genauer zu untersuchen, wurden die Bakterienkulturen für dieses Experiment mit unterschiedlichen NH₄⁺-Konzentrationen angezogen und das nach der Acetylenzugabe gebildete Ethylen wurde gemessen. Die Nitrogenaseaktivität des Wildtyps Pal5 in Gegenwart von 1 mM NH₄⁺ (diazotrophe Bedingungen) wurde als 100% Standard vorgegeben. Wie der Abb. 49 zu entnehmen, ist beim Wildtyp keine signifikante Nitrogenaseaktivität ab einer Ammonium-Konzentration von 10 mM im Medium nachweisbar. Demgegenüber zeigt die Mutante UBI120 noch ca. 20% und in Gegenwart von 20 mM Ammonium noch 10% der Ausgangsaktivität des Wildtyps unter dereprimierenden Bedingungen. Nach Inkubation der Bakterienkulturen mit 30 mM NH₄⁺ und mehr wurde keine Aktivität der Nitrogenase mehr nachgewiesen. Aus diesem Experiment wird die Rolle des P_{II}-Proteins in der Stickstofffixierung ersichtlich – das *glnB*-Genprodukt ist direkt oder indirekt an der Expression der *nif*-Gene, die für die Nitrogenase kodieren, beteiligt. Weder das Protein GlnK1 noch das GlnK2-Protein können die Funktion des P_{II}-Proteins in der N₂-Fixierung ersetzen.

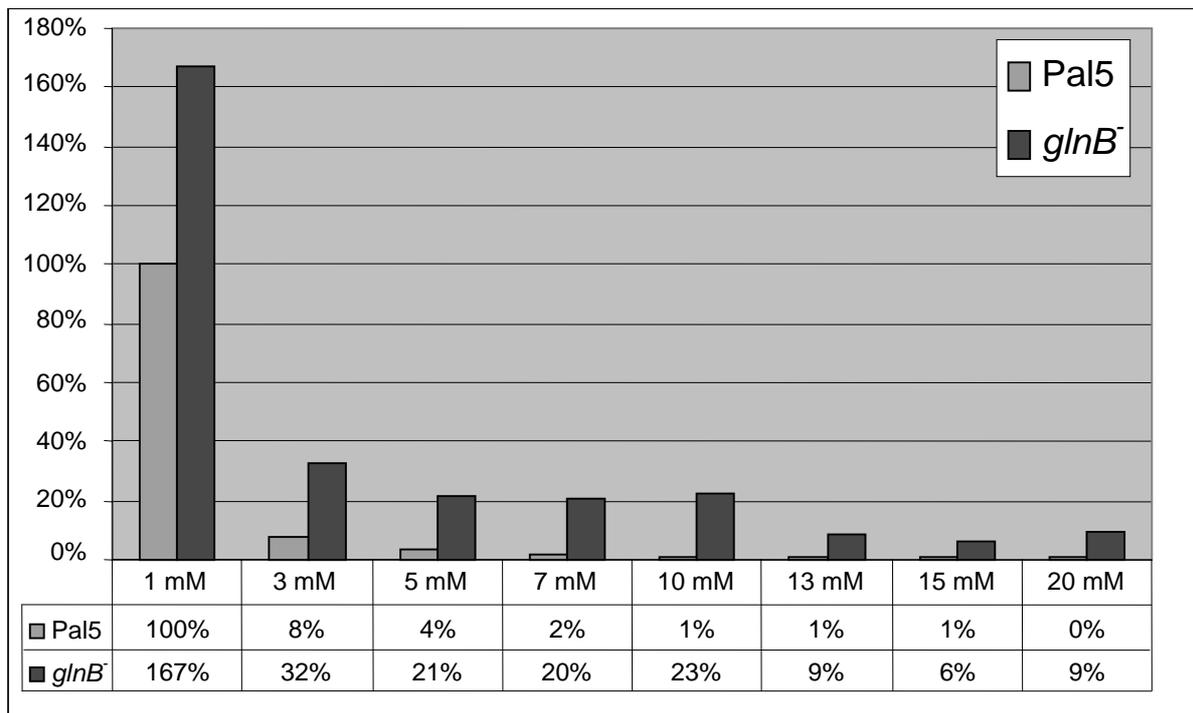


Abb. 49. Nitrogenase-Aktivität in *glnB*-Mutanten. Bakterienkulturen wurden in Minimalmedium mit der entsprechenden NH_4^+ -Konzentrationen angezogen und die Aktivität der Nitrogenase wurde mittels Messung der Acetylenreduktion bestimmt.

D.8.2 Analyse der Expression der Nitrogenase über Western Blot-Analyse

Zur Bestätigung der unter D.8.1 dargestellten Ergebnisse zur Rolle der P_{II} -homologen Proteinen in der Regulation in der *nif*-Expression wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen die Dinitrogenase-Reduktase (Fe-Protein) des Nitrogenasekomplexes aus *Rhodospirillum rubrum* durchgeführt. Die Bakterienkulturen wurden zunächst diazotroph (LGI + 1 mM NH_4^+) und unter reprimierenden Bedingungen (LGI + 40 mM NH_4^+) angezogen. Zellfreie Proteinextrakte aus diesen Kulturen wurden in 10%-SDS-PAGE aufgetrennt. Während des diazotrophen Wachstums exprimieren die Bakterien die Nitrogenase, die im Immunoblot mit den Fe-Protein-Antikörpern zu sehen ist (Abb. 50, S. 121). In Bakterien, die Ammonium aus dem Medium als Stickstoffquelle verwendet haben, ist keine Nitrogenase nachweisbar. Das Expressionsmuster der Nitrogenase ist in Wildtyp Pal5 und in den *glnB*- und *glnK*₁-Mutanten gleich (Abb. 50). Auch über die Messung der Acetylenreduktion konnte keine Nitrogenaseaktivität unter reprimierenden Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 49).

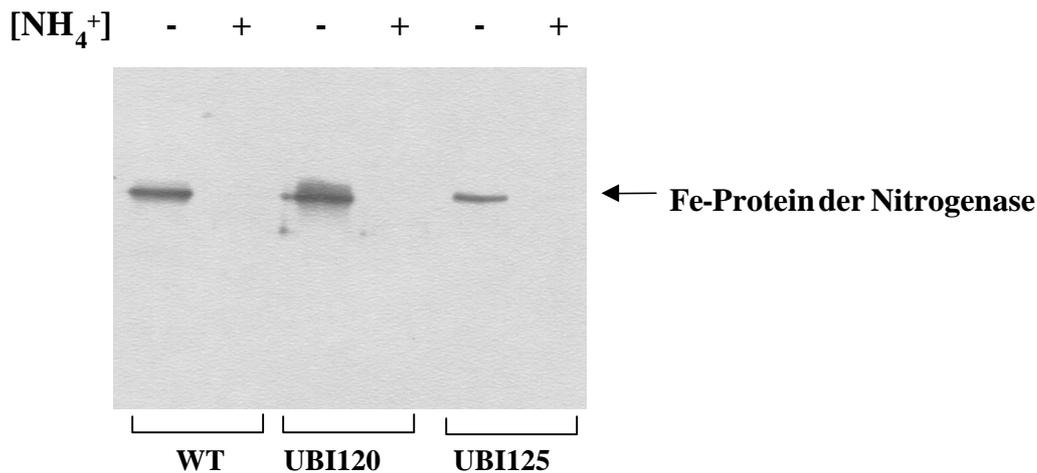


Abb. 50. Einfluss von NH_4^+ auf die Expression der Nitrogenase im *A. diazotrophicus* Wildtyp Pal5 und in *glnB*- und *glnK₁*-Mutanten. Der immunologische Nachweis der Nitrogenase erfolgte unter Verwendung von Antikörpern gegen das Fe-Protein der Nitrogenase aus *Rhodospirillum rubrum*. Die Proteinextrakte wurden aus Zellen isoliert, die unter diazotrophen Bedingungen (1 mM NH_4^+) oder in Gegenwart von hohen Ammoniumkonzentrationen (40 mM) angezogen wurden. Pal5 – Wildtyp *A. diazotrophicus*; UBI120 – *glnB*-Mutante; UBI125 – *glnK₁*-Mutante.

Erfolgt jedoch eine Anzucht der Bakterienstämme in Gegenwart von 20 mM NH_4^+ so ist in der Western Blot Analyse sowohl in *glnB*-Mutanten als auch in *glnB/glnK₁*-Doppelmutanten das Fe-Protein nachweisbar (Abb. 51). Diese Ergebnisse bestätigen damit mit guter Korrelation die Messungen der Nitrogenaseaktivität (D.8.1, Abb. 49, S. 120) und unterstützen die Bedeutung des P_{II}-Proteins in der Regulation der N_2 -Fixierung in *A. diazotrophicus*. Die Expression der *nif*-Gene in einer *ntrC*-Mutante zeigt das Wildtyp-Expressionsmuster und unterstützt eine NtrC-unabhängige Regulation der Nitrogenase-Expression in *A. diazotrophicus*.

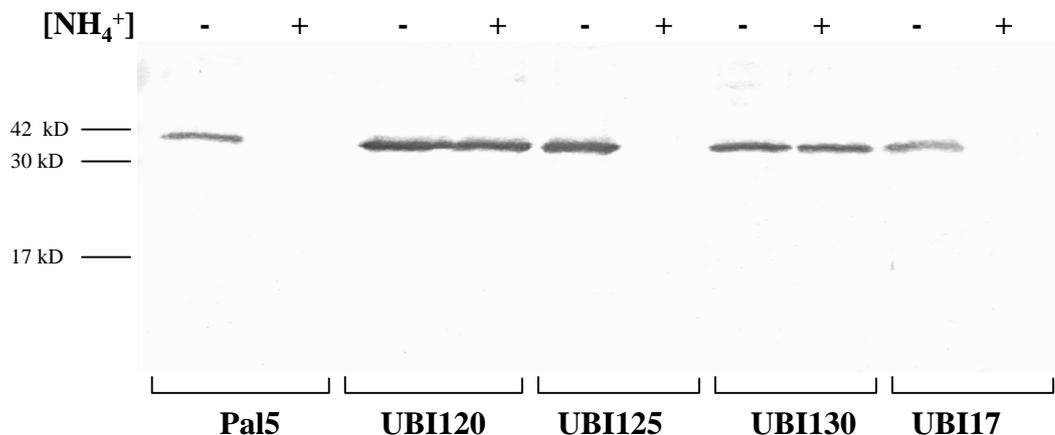


Abb. 51. Einfluss des PII Proteins auf die Expression des Fe-Proteins der Nitrogenase in *A. diazotrophicus*. Der immunologische Nachweis der Nitrogenase erfolgte unter Verwendung von Antikörpern gegen das Fe-Protein der Nitrogenase aus *Rhodospirillum rubrum*. Die Proteinextrakte wurden aus den Zellen isoliert, die unter diazotrophen Bedingungen (1 mM NH_4^+) oder reprimierenden Ammoniumkonzentrationen (20 mM) erfolgte. Pal5 – Wildtyp *A. diazotrophicus*; UBI120 – *glnB*-Mutante; UBI125 – *glnK₁*-Mutante; UBI130 – *glnB/glnK₁*-Mutante, UBI17 – *ntrC*-Mutante (Meletzus, pers. Mitt.).

D.8.3 Expression der Nitrogenase in einer *glnD*-Mutante

Eine zentrale Bedeutung in der Messung des zellulären Stickstoffstatus der Zelle wird dem Genprodukt des *glnD*-Gens, dem UTase/UR-Enzym, zugewiesen. Aus der Analyse der Rolle des P_{II}-Proteins in der Regulation der Expression der *nif*-Gene stellt sich die Frage, ob die Uridylyltransferase (*glnD*-Genprodukt) über die Modifizierung des P_{II}-Proteins in Abhängigkeit von N-Status der Zelle an der Regulation der Stickstofffixierung beteiligt ist und das P_{II}-Protein in seiner uridylylierten Form für diese Regulation benötigt wird. Mutanten in diesem Gen (UBI60, *glnD*::Km, Meletzus, unveröffentlicht), zeigen einen pleiotrophen Phänotyp und sind nicht in der Lage auf Minimalmedium mit Ammonium als alleiniger N-Quelle zu wachsen. Um die Expression der Nitrogenase zu untersuchen, wurden die Bakterien daher im C2-Vollmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Phase angezogen, mit N-freiem Minimalmedium gewaschen, in Medium mit Ammonium-Überschuss und Ammonium-Mangel überführt und für 4 Stunden inkubiert. Das Gesamtprotein dieser Kulturen wurde dann im 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Western Blot Analysen mit den Antikörpern gegen das Fe-Protein der Nitrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* zeigten, dass in *glnD*-Mutanten unter diazotrophen Bedingungen die Nitrogenase (ca. 37 kD Bande, Abb. 52). Wahrscheinlich ist daher das P_{II}-Protein in seinem nicht modifizierten Zustand an der Regulation der N₂-Fixierung beteiligt und die fehlende Funktion der Uridylyltransferase hat keinen Einfluss auf diesen Prozess. Eine *glnD*-unabhängige Beteiligung des GlnK-Proteins (unabhängig von der Modifikation über Uridylylierung durch GlnD) an der Regulation der Stickstofffixierung ist bereits in *Klebsiella pneumoniae* postuliert worden (Jack *et al.*, 1999).

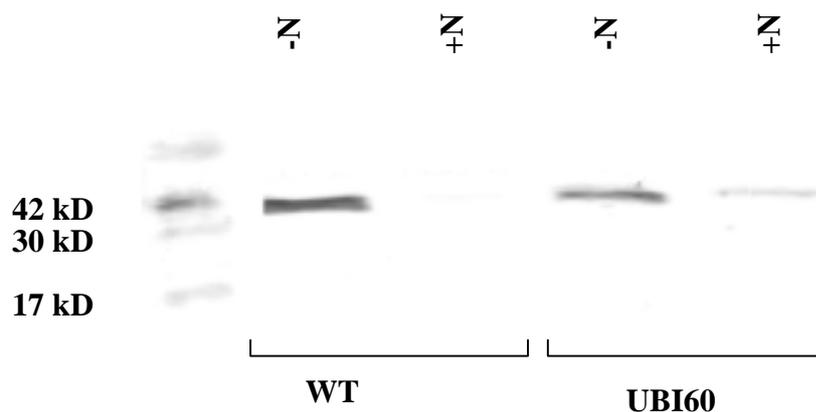


Abb. 52. Expression der Nitrogenase in einer *glnD*-Mutante. Pal5 – Wildtyp; UBI60 – *glnD*-Mutante (*glnD*::Km). Die Proteinextrakte wurden aus Zellen isoliert, die zuerst im C2-Vollmedium angezogen wurden (OD₆₀₀ ca. 0,7), dann wurden die Zellen gewaschen und in Minimalmedium LGI mit 0,5 mM (diazotrophe Bedingungen) oder 20 mM (reprimierende Bedingungen) NH₄⁺ transferiert und 4 h bei 30°C weiter inkubiert.

D. 9 Versuche zur Inaktivierung des *glnA*-Gens, um die physiologische Rolle des Genproduktes zu bestimmen

Um die physiologische Rolle des *glnA*-Genproduktes, der Glutamin-Synthetase, in *A. diazotrophicus* zu bestimmen und anschließend die Funktion des Proteins anhand der Analyse der Mutanten zu charakterisieren, wurde versucht, das *glnA*-Gen über eine Interposonmutagenese zu inaktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es aber nicht, chromosomalen *glnA*-Mutanten unter Verwendung verschiedener Resistenzgenkassetten, zu erzeugen. Nach der Elektroporation des *A. diazotrophicus* Pal5 und Selektion auf Kanamycinresistenz der Interposonkassette (z.B. *gusA*-Km^R aus pWM6) wurden zwar Km^R-Klone erhalten, es konnte aber in keinem Fall über die Southern Hybridisierung ein Doppelcrossover im *glnA*-Bereich nachgewiesen werden. Eine Integration über Singlecrossover konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, so dass die getesteten Kanamycinresistenten Klone wahrscheinlich das Ergebnis einer illegitimen Rekombination mit dem Chromosom sind

D.9.1 Untersuchung der Glutamin-Aufnahme in *Acetobacter diazotrophicus* Pal5

Da keine *glnA*-Mutanten konstriert werden konnten, obwohl Glutamin ins Medium zugegeben wurde, um den Mutanten das Wachstum im Fall einer Auxotrophie für Glutamin zu ermöglichen, sollte überprüft werden, ob *A. diazotrophicus* in der Lage ist, Glutamin aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen. Dafür wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem [¹⁴C]-Glutamin gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 (S. 124) dargestellt. Als Kontrolle wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue verwendet. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass ein Hochaffinitäts-Transportsystem für Glutamin zu maximaler Derepression kommt, wenn die Zellen unter Bedingungen limitierten N-Angebots wachsen. Dabei konnte die höchste Aktivität des Hochaffinitäts-Glutamintransports in einem Medium mit Glutamat als Stickstoffquelle beobachtet werden (Willis *et al.*, 1975). Deswegen wurde für *E. coli* Minimalmedium M9 mit Glutamat als N-Quelle verwendet. *A. diazotrophicus* wurde in LGI Minimalmedium mit unterschiedlichen Stickstoffquellen angezogen (N-frei, 1 mM NH₄⁺, 20 mM NH₄⁺, Na-Glutamat). Die Zellen von *E. coli* bzw. *A. diazotrophicus* wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen, mit Minimalmedium gewaschen und in die Testmedien überführt. Nach einer Präinkubation für 2 Stunden erfolgte die Zugabe von [¹⁴C]-Glutamin mit einer Endkonzentration von 3,75 µM und eine Probeentnahme in definierten Zeitintervallen. Die Ergebnisse der Scintillationsmessung stellen sich wie folgt dar: *E. coli* Zellen zeigen eine lineare Glutamin-Aufnahme während des Experiments. *A. diazotrophicus* Pal5 ist in der Lage das radioaktive Substrat aufzunehmen. Die Aufnahme zeigt hier jedoch keine lineare Steigerung der Radioaktivitätsmenge in *A. diazotrophicus* wie bei *E. coli* beobachtet.

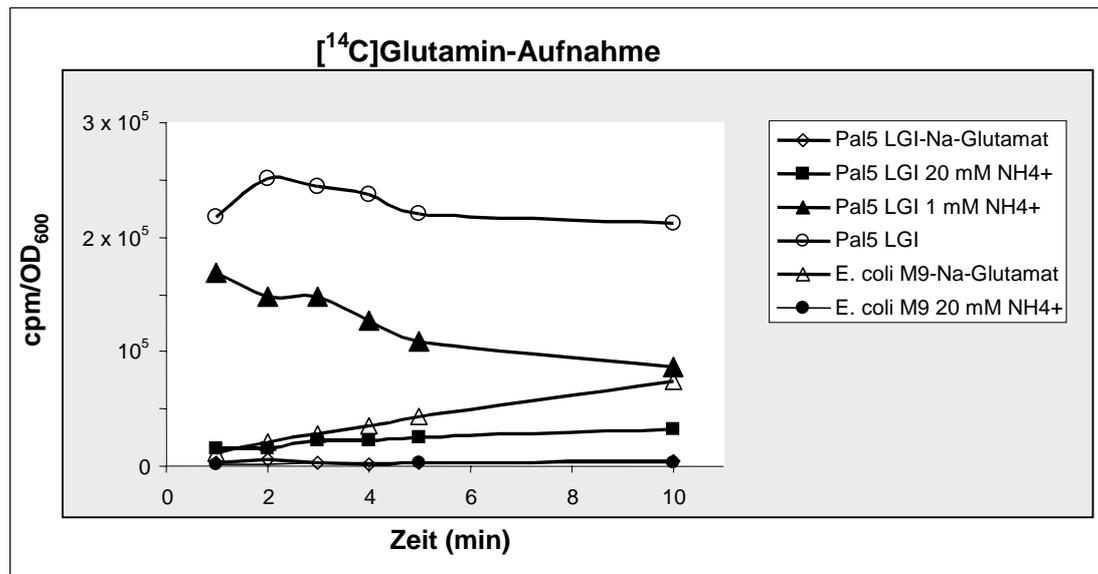


Abb. 53. Messung der Aufnahme von [¹⁴C]-Glutamin in *A. diazotrophicus* Pal5

Die Werte der in einer Minute aufgenommenen Radioaktivität in *A. diazotrophicus* sind im Vergleich zu *E. coli* im N-freiem Medium ca. 100-fach höher. Im Gegensatz hierzu war die Aufnahme in Zellen, die in Gegenwart von 20 mM Ammonium angezogen wurden, deutlich reduziert und ist wahrscheinlich einer stickstoffabhängigen Regulation des Transportsystems unterworfen. Im Unterschied zu *E. coli* inhibiert Glutamat die Aufnahme der radioaktiven Substanz vollständig. Dieses Transportsystem wird in *A. diazotrophicus* also durch Ammonium und Glutamat reprimiert und zeigt die höchste Aktivität in Ammonium-freiem Medium. Die Zugabe von 1 mM Ammonium führt zur mehr als doppelten Reduktion der Aktivität des Transportsystems.

D.9.2 Analyse der Expression der Glutamin-Synthetase

Die Tatsache, dass es in *A. diazotrophicus* in Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist, chromosomale *glnA*-Mutanten zu erhalten, führt zum Schluss, dass dieses Gen essentiell für diesen Organismus zu sein scheint und eine Mutation im *glnA*-Gen damit letal sein könnte. Wie in D.3.1.2 (S. 86) dargestellt, lassen die Daten zur Nukleotidsequenz dieser Genregion vermuten, dass das *glnA*-Gen mit dem *glnB*-Gen in einem Operon organisiert vorliegt und beide Gene kotranskribiert werden. Um den Effekt der Insertionsmutation in *glnB* auf die GS-Expression zu untersuchen, wurden Immunoblots mit Antikörpern gegen die *Rhodospirillum rubrum* Glutamin-Synthetase durchgeführt (Abb. 54). Im Immunoblot zeigten *glnK₁*-Mutanten (UBI125) keine Unterschiede zum Wildtyp bezüglich der delektierten Proteinmenge. In *glnB*-Mutanten ist demgegenüber im Vergleich zum Wildtyp nur eine schwache, aber konstitutiv exprimierte GS-Bande sowohl nach Anzucht unter diazotrophen Bedingungen, als auch in mit hohen Ammoniumkonzentrationen angezogenen Kulturen zu

erkennen. Western Blots zeigten, dass die Mutation im *glnB*-Gen in diesem Fall einen bedingten polaren Effekt auf die *glnA*-Expression hat. Worauf die Reduktion der GS-Expression zurückzuführen ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Zum einen, besteht hier die Möglichkeit, dass die abgeschwächte Expression von einem eigenen konstitutiven Promotor aus erfolgt, zum anderen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Insertion des Interposons zu einer Reduktion der Halbwertszeit der polycistronischen mRNA führt und damit die Expression der Glutamin-Synthetase indirekt beeinflusst. Eine mit dem Wildtyp vergleichbare GS-Expression ist in *ntrC*-Mutante (Meletzus, nicht veröffentlicht) vorhanden. Falls die GS von einem eigenem Promotor exprimiert wird, dann steht dieser nicht unter Kontrolle des Ntr-Systems.

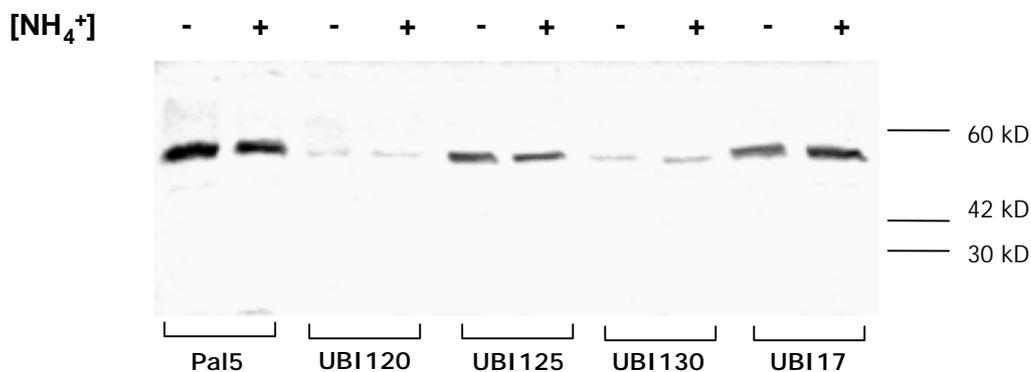


Abb. 54. Western Blot Analyse der Expression der Glutamin-Synthetase in *A. diazotrophicus* im Wildtyp Pal5 und Einfluss der Mutation im *glnB*-Gen. Die Bakterien wurden in Gegenwart von 1mM NH_4^+ (-) oder 20 mM NH_4^+ (+) angezogen. Pal5 – *A. diazotrophicus* Wildtypstamm; UBI120 – *glnB::Km*; UBI125 – *glnK1::gusAcat*; UBI130 – *glnB::Km, glnK1::gusAcat*; UBI17 – *ntrC*⁻ (Meletzus, nicht veröffentlicht)

D.10 Untersuchungen zur Bedeutung des *amtB*₁-Genproduktes für die Methylammonium-Aufnahme

In einigen Organismen, wie z. B. *E. coli* (Soupene *et al.*, 1998; Stevenson & Silver, 1977), *Azorhizobium caulinodans* (Michel-Reydelle *et al.*, 1998), *Rhizobium etli* (Tate *et al.*, 1998) oder *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998), wurde gezeigt, dass das Genprodukt des *amtB*-Gens ein Hochaffinitäts-Transportsystem für Ammonium bildet und für das Wachstum auf niedrigen Ammoniumkonzentrationen notwendig ist (Soupene *et al.*, 1998). Da das abgeleitete Genprodukt des *amtB*₁-Gens von *A. diazotrophicus* signifikante Homologien zu den untersuchten Proteinen der Mep/Amt-Familie und deren charakteristische Sekundärstruktur mit 12 Transmembrandomänen aufweist, sollte gezeigt werden, ob das AmtB₁-Protein an dem Ammoniumtransport in diesem Organismus beteiligt ist. Um diese

Hypothese zu überprüfen, wurden *amtB*₁-Mutanten konstruiert (Abb. 33, S. 102) und untersucht. Die *A. diazotrophicus* Mutante UBI113 (*amtB*₁::*gusAaphII*) zeigt die gleichen Wuchseigenschaften wie der Wildtyp bei Anzucht in Vollmedium und ist zudem in der Lage, auf limitierten Ammonium-Konzentrationen zu wachsen (Abb. 55). Interessanterweise hat der Stamm UBI113 auf Minimalmedium mit 1 mM Ammonium als alleiniger Stickstoffquelle eine kürzere Generationszeit und erreichte einen höheren Zelliter als der Wildtyp-Stamm PAL5 unter den getesteten Bedingungen (Abb. 55).

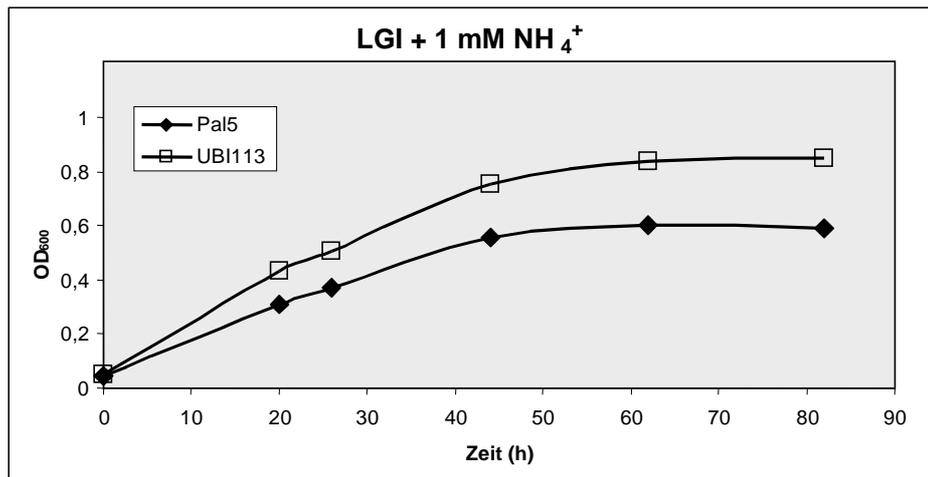


Abb. 55. Wachstum der *amtB*₁-Mutanten auf Minimalmedium mit niedriger Ammonium-Konzentration. Pal5 – Wildtypstamm, UBI113 - *amtB*₁-Mutante.

Um die Funktion des AmtB1-Proteins in *A.diazotrophicus* in Bezug auf seine Rolle im Ammoniumtransport zu untersuchen, sollten Aufnahmestudien durchgeführt werden. Da das radioaktive Isotop ¹³N eine Halbwertszeit von nur ~ 10 min hat und Ammonium in der Zelle sehr schnell assimiliert wird, wurde für die Aufnahme-Experimente ein radioaktiv-markiertes Ammonium-Analogen – [¹⁴C]-Methylammonium verwendet (Hackett *et al.*, 1970). Die Wildtyp-Bakterien und Mutanten wurden in LGI Minimalmedium mit 1 mM NH₄⁺ als Stickstoffquelle angezogen, mit LGI-Minimalmedium gewaschen und in ein N-freies Medium überführt. Für die Methylammonium-Aufnahme-Messung wurde [¹⁴C]-Methylammonium zu den Bakterienkulturen in einer Endkonzentration von 10 μM zugegeben. Die Bakterien wurden bei 30°C inkubiert und in Zeitintervallen von 4 min wurden Proben entnommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 56 dargestellt. Die AmtB1-Mutanten sind in der Lage, Methylammonium aufzunehmen, aber die Fähigkeit, dieses Substrat in die Zelle zu transportieren, ist deutlich reduziert (bis zu 40%) im Vergleich mit dem Wildtypstamm Pal5. Diese Ergebnisse zeigen, dass mindestens noch ein weiteres Protein, das die Funktion der Aufnahme des Methylammoniums in UBI113 übernimmt, vorhanden sein sollte.

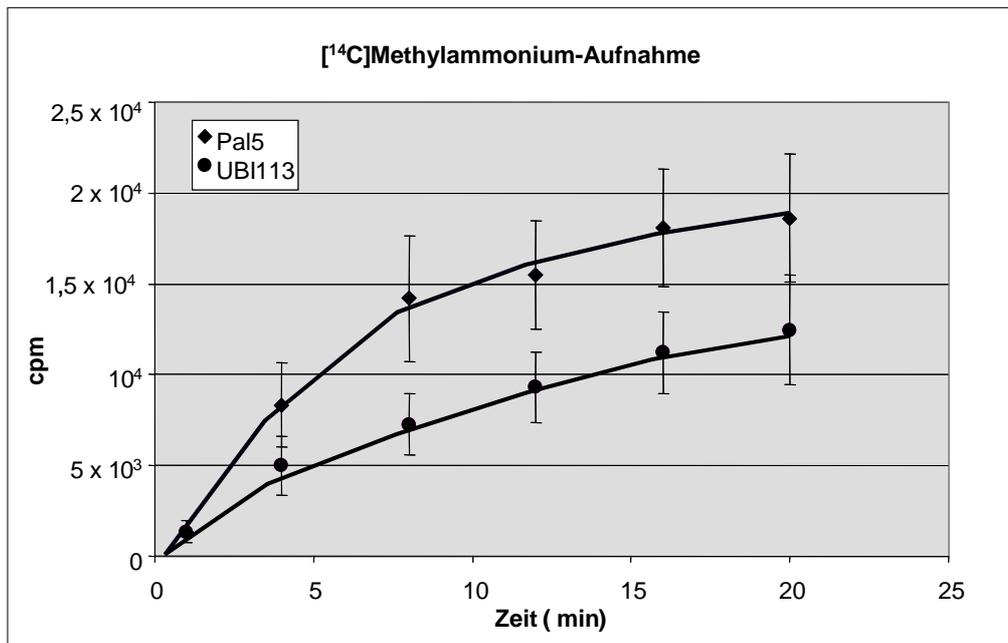


Abb. 56. Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Methylammonium im Wildtypstamm Pal5 und in der Mutante UBI113 (*amtB₁::gusAaph*). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Vertikale Linien zeigen die Standardabweichung. Die Bakterien wurden in Minimalmedium mit 1 mM NH_4^+ bis zur log-Phase angezogen, gewaschen und in NH_4^+ -freiem LGI-Medium resuspendiert. 5 ml Kultur wurden für den Test verwendet. Nach 15 min Inkubation bei 30°C im Schüttler wurden 25 μl $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ (50 nmol) zu der Bakterienkultur zugegeben. Die Proben (0,5 ml) wurden nach 4, 8, 12, 16 und 20 min entnommen und über eine HA-Membran (0,45 μm , Millipore) mit konstantem Vakuum filtriert. Die Filter wurden 3 mal gewaschen, luftgetrocknet und in ein Gefäß mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit überführt. Die Radioaktivität wurde mit einem Scintillationszähler bestimmt. Die Methylammonium-Aufnahme ist als cpm/min/OD₆₀₀ dargestellt

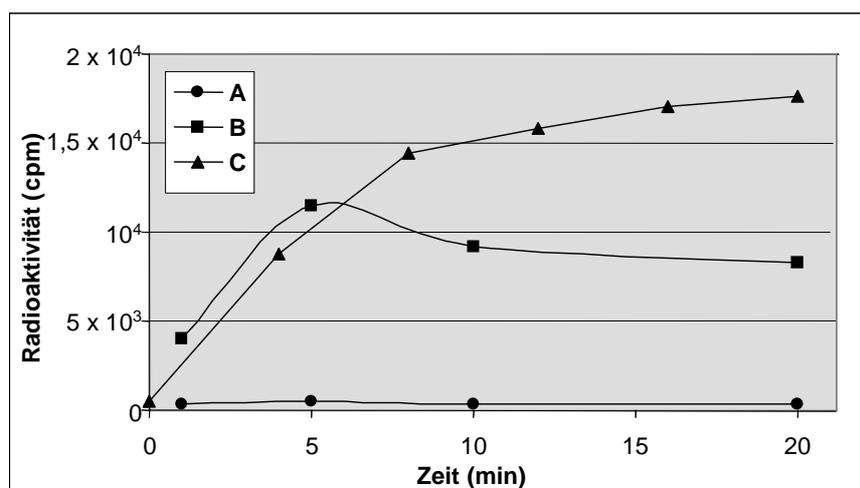


Abb. 57. Inhibierung der $[^{14}\text{C}]$ -Methylammonium-Aufnahme durch Ammonium. Im Aufnahme Experiment wurde *A. diazotrophicus* Wildtyp-Stamm Pal5 eingesetzt. A – Bakterienkultur wurde in Minimalmedium LGI mit 20 mM Ammonium inkubiert; B – zu der Kultur, die in NH_4^+ -freiem Medium vorinkubiert wurde, wurde nach 5 min nach $[^{14}\text{C}]$ -Methylammonium-Zugabe 100 μM NH_4^+ zugegeben; C – die Bakterien wurden im Ammonium-freiem Minimalmedium inkubiert und $[^{14}\text{C}]$ -Methylammonium-Aufnahme wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Als wahrscheinliches Kandidatengen kommt hierfür das *amtB*₂-Gen, bzw. sein Genprodukt in Betracht.

Wie für *E. coli* (Soupene *et al.*, 1998) beschrieben, inhibiert eine Ammoniumzugabe zu der Kultur während des Experiments die Methylammonium-Aufnahme kompetitiv (dies unterstützt das Vorkommen eines aktiven Transportsystems für Ammonium) und Kulturen, die mit 20 mM Ammonium im Medium angezogen wurden und im gleichen Medium getestet wurden, zeigten nur die Hintergrundwerte für eine Methylammoniumaufnahme (Abb. 57).

Die Messung der Methylammonium-Aufnahme wurde im weiteren unter Verwendung der *glnB* und *glnK*₁-Mutanten durchgeführt, um einen Einfluss dieser regulatorischen Proteine auf die Expression oder Aktivität dieses Ammoniumtransport-Systems zu untersuchen. (Abb. 58).

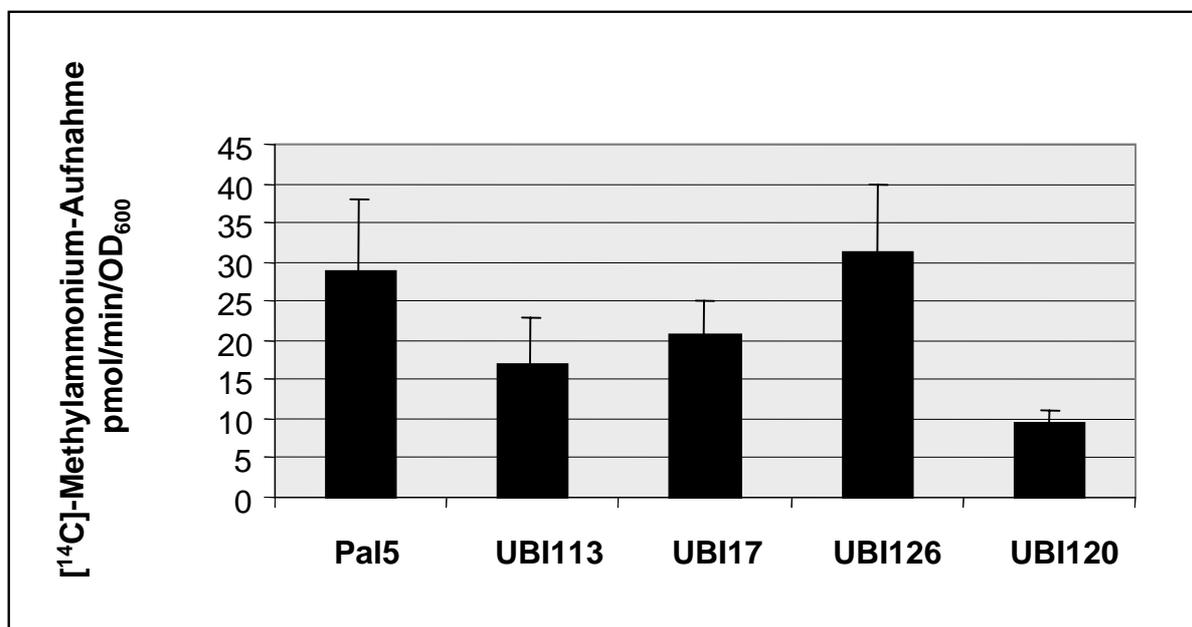


Abb. 58. Aufnahme von [¹⁴C]-Methylammonium im Wildtypstamm Pal5 und in den Mutanten UBI113 (*amtB*₁::*gusAaph*), UBI126 (*glnK*₁::*gusAcat*), UBI120 (*glnB*::*aphI*) und UBI17 (*ntrC*::*gusAaph*). Methylammonium-Aufnahme wurde als pmol/min/OD₆₀₀ dargestellt (kalkuliert wie (cpm)/(spezifische Aktivität × $v \times OD_{600}$), wobei die Spezifische Aktivität ist 100 cpm/pmol). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Vertikale Linien zeigen die Standardabweichung.

Unter beschriebenen experimentellen Bedingungen konnte Wildtyp Pal5 28 pmol/OD₆₀₀/min [¹⁴C]-Methylammonium aufnehmen. Im Stamm UBI113 (*amtB*₁-Mutante) wie schon in Abb. 57 gezeigt ist, war der Methylammoniumtransport reduziert im Vergleich zum Wildtyp auf 17 pmol/OD₆₀₀/min. Eine höhere Rate des Methylammoniumtransports wurde in der *glnK*₁-Mutante UBI126 beobachtet – bis zu 32 pmol/OD₆₀₀/min. Demgegenüber ist in der *glnB*-Mutanten UBI120 die Fähigkeit, die radioaktive Substanz zu akkumulieren, stark reduziert. Es wurde nur 9 pmol/OD₆₀₀/min ¹⁴C-Methylammonium in die Zellen transportiert.

Die Mutante UBI126 trägt die Insertionskassette von pWM4 (*gusAcat*, s. Abb. 32, S. 102) in Gegenorientierung der Transkriptionsrichtung des *glnK₁*-Gens, bildet somit keine Reportergenfusion und führt wahrscheinlich zur Expression des *amtB₁*-Gens bei der Inaktivierung des *glnK₁*. Als Konsequenz ist die Methylammoniumaufnahme in dieser Mutante vergleichbar mit dem Wildtypstamm Pal5. Daraus folgt, dass das GlnK1 selbst wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Methylammoniumtransport hat. Eine Reduzierung in der Methylammoniumaufnahme wurde auch in einer *ntrC*-Mutante UBI17 (Meletzus, pers. Mitt.) beobachtet.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass nur die Inaktivierung der Gene *amtB₁* und *glnB* einen Einfluss auf die Fähigkeit, Methylammonium aufzunehmen, hat.

E. Diskussion

E.1 Organisation und Sequenzvergleich der für *glnB*-homologe Gene kodierenden Regionen

In Eubakterien und Archaea dienen die weit verbreiteten Signaltransduktionsproteine – die P_{II}-Proteine - als die zentrale Einheit für die Integration von Signalen über den Kohlenstoff- und Stickstoffstatus der Zelle (Ninfa & Atkinson, 2000). Diese Signaltransduktionsproteine verwenden dann diese Information, um den Stickstoff-Metabolismus zu kontrollieren. In Mikroorganismen tritt eine Stickstoff-abhängige Regulation unter allen Wachstumsbedingungen auf. Eine Antwort auf Variationen des Stickstoffangebotes umfasst als eine erste Stufe eine geringfügige Modulation der enzymatischen Kapazität der Zelle. Schwerwiegender N-Hunger führt in diazotrophen Mikroorganismen zu grundsätzlichen Änderungen im enzymatischen Profil und zur Aktivierung des energetisch hochaufwendigen Prozesses der N₂-Fixierung, die in einigen Organismen zur Entwicklung der spezialisierten Zellenart (z. B. Heterocysten in *Anabaena*, Symbiosomen der Rhizobien-Bakteroide in Leguminosen) führt.

In den am besten untersuchten Enterobakterien bildet das P_{II}-Protein (das *glnB*-Genprodukt) zusammen mit den Genprodukten der Gene *glnD*, *rpoN*, *ntrC* und *ntrB* das globale Ntr-System, das die Expression der Stickstoff-abhängigen Promotoren kontrolliert (Merrick & Edwards, 1995). Sensor des N-Signals ist das GlnD-Protein, das das Verhältnis von 2-Ketoglutarat zu Glutamin in der Zelle misst und durch reversible kovalente Modifikation die Funktionen des P_{II}-Proteins in der N-Kontrolle steuert. P_{II} (GlnB) moduliert wiederum die Aktivität des Zweikomponentensystems NtrBC.

Die Gene, die an der Stickstoffregulation oder –Assimilation in *A. diazotrophicus* beteiligt sind, wurden identifiziert und partiell charakterisiert. Diese Gene sind *ntrBC*, *rpoN*, *glnD* (Lee *et al.*, 1998, Nawroth, 1998), *glnB*, *glnK₁*, *glnA* und *glnK₂* (diese Arbeit). Die Gene *glnB* und *glnK₁* wurden mittels PCR unter Verwendung degenerierter *glnB*-Primer, das *glnK₂*-Gen über Southern Hybridisierung mit dem *glnK₁amtB₁*-Fragment als Sonde, isoliert.

Das Vorkommen dieser paralogen Proteine (Genprodukte *glnB*-homologer Gene) in mehreren Kopien ist eine allgemeine Eigenschaft von Proteobakterien der α -Gruppe. Zwei P_{II}-homologe Proteine wurden in den meisten bekannten α -Proteobakterien beschrieben. Allerdings sind drei *glnB*-homologe Gene bislang nur für *Azoarcus* sp. BH72 (β -Gruppe, Gene *glnB*, *glnK*, *glnY*) beschrieben (Martin & Reinhold-Hurek, 1998; Martin *et al.*, 2000). Die physiologische Rolle jedes einzelnen dieser Proteine wird derzeit untersucht. Diese Arbeit zeigt erstmals das Vorkommen von drei P_{II}-homologen Proteinen P_{II}, GlnK1, GlnK2 in einem Organismus der α -Gruppe.

Anhand der multiplen Alignments der Sequenzen der P_{II}-Proteine und der Genorganisation im Genom ist es möglich, die *glnB*-homologen Gene in distinkte Gruppen mit gemeinsamen

Eigenschaften einzuteilen. Eine Gruppe schließt die *glnB*-Gene ein, die monocistronisch oder mit *glnA* oder *nadE*-Gen geclustert vorliegen.

Tab. 7. Genorganisation der *glnB*-homologen Kodierregionen in verschiedenen Organismen.

Organismus	<i>glnB</i> -homologe Gene	<i>glnK</i> -homologe Gene	Mit <i>nif</i> -Genen geclusterte <i>glnB</i> -homologe Gene
<u>Proteobacteria</u>			
<u>α-Proteobacteria</u>			
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnZaat</i>	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnK₁amtB₁</i> <i>glnK₂amtB₂</i>	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>glnBglnA</i>		
<i>Rhizobium etli</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>glnBglnA</i>		
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>glnBglnA</i>	<i>glnKamtB</i>	
<u>β-Proteobacteria</u>			
<i>Azoarcus</i> sp.	<i>nadE, glnB</i>	<i>glnKamtB</i> <i>glnYamtY</i>	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>nadE, glnB</i>	<i>glnK</i>	
<u>δ-Proteobacteria</u>			
<i>Desulfovibrio gigas</i>			<i>nifHnifI₁</i>
<u>γ-Proteobacteria</u>			
<i>Azotobacter vinelandii</i>		<i>glnKamtB</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>glnB</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>mog, glnB, ydgD</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>glnB</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>glnB</i>	<i>glnKamtB</i>	
<i>Xantomonas citri</i>		<i>glnAglnK</i>	
<u>Firmicutes</u>			
<u>Bacillus/Clostridium</u>			
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>amtB, glnK</i>	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>		<i>amtB, glnK</i>	<i>nifH, nifI₁, nifI₂</i>
<i>Lactococcus lactis</i>		<i>amtB, glnK</i>	
<u>Actinobacteria</u>			
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		<i>amtB, glnK, glnD</i>	
<i>Streptomyces coelicolor</i>		<i>amtB, glnK, glnD</i>	
<u>Thermus/Deinococcus</u>			
<i>Deinococcus radiodurans</i>		<i>glnKamtB</i>	
<u>Thermotogales</u>			
<i>Thermotoga maritima</i>		<i>amtB, glnK</i>	
<u>Aquificales</u>			
<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>glnB, glnA, amtB</i>		<i>glnB_i, nasA, narB</i>

E. DISKUSSION

<u>Cyanobacteria</u>			
<i>Anabaena PCC7120</i>	<i>glnB</i>		
<i>Nostoc punctiforme</i>	<i>glnB</i>		
<i>Synechocystis PCC6803</i>	<i>glnB</i>		
<i>Synechococcus PCC7942</i>	<i>glnB</i>		
<u>Archaeobacteria</u>			
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	<i>amtB, glnK (x3)</i>		
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	<i>amtB, glnK (x2)</i>	<i>nifH, nifI₁, nifI₂, nifD, nifK</i>	
<i>Methanococcus maripaludis</i>		<i>nifH, nifI₁, nifI₂, nifD, nifK</i>	
<u>Rotalgen</u>			
<i>Cyanidium caldarium</i>	<i>glnB</i>		
<i>Porphyra purpurea</i>	<i>glnB</i>		
<u>Dikotyledone Pflanzen</u>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>GLB1</i>		
<i>Glycine max</i>	<i>GLB1</i>		
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>GLB1</i>		
<i>Ricinus communis</i>	<i>GLB1</i>		

Die abgeleiteten Proteine dieser Gruppe haben in Proteobakterien und Cyanobakterien Lysin an Aminosäureposition 3 und Glutamat oder Aspartat an Position 5.

Eine zweite Gruppe bilden die Gene, die mit einem *amtB*-Gen geclustert vorliegen und als *glnK* bezeichnet werden. Eine Ausnahme ist das *glnZ*-Gen in *A. brasilense*, in dessen direkter Nachbarschaft kein *amtB*-Gen identifiziert werden konnte. Das Genpaar *glnKamtB* ist konserviert in meisten bekannten bakteriellen Organismen. Die *glnK*-Genprodukte haben charakteristische hydrophobe Aminosäurereste an Position 3 (Leucin, Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin) und Isoleucin, Threonin oder Methionin an Position 5. Einige Organismen besitzen mehrere *amtBglnK*-Genpaare. Die werden *glnK₂amtB₂* usw. bezeichnet.

Eine dritte Gruppe der *glnB*-homologen Gene wird von Genen gebildet, die mit *nif*-Genen geclustert sind und als *nifI*-Gene bezeichnet werden. Diese Nomenklatur ist von Merrick et al. vorgeschlagen (pers. Mitt.).

A. diazotrophicus besitzt also drei *glnB*-homologe Gene, die die konservierte Genanordnung der α -Proteobakterien zeigen: *glnBA*, *glnK₁amtB₁*, *glnK₂amtB₂* (Tab. 7, nach Merrick et al., pers. Mitt.)

E.1.1 Die *glnBA*-Region in *A. diazotrophicus*

Das *A. diazotrophicus glnB*-Gen, das für den Signaltransduktor P_{II} kodiert, liegt wie in vielen anderen Bakterien einem *glnA*-Gen direkt benachbart (Tab. 7). In der Promotorregion der *glnBA*-Gene in *A. diazotrophicus* konnte eine Konsensussequenz, die Ähnlichkeit zu dem σ^{70} -abhängigen Promotor aufweist, identifiziert werden (Abb. 21, S. 87). Dies würde zur

konstitutiven Expression des *glnB*-Gens führen. Diese Sequenz überlappt mit einer Konsensussequenz für eine Bindestelle des Transkriptionsaktivators NtrC, der in phosphoryliertem Zustand entweder als positiver oder als negativer Regulator der Transkription für die verschiedenen Promotoren agieren kann. Ähnliche σ^{70} -abhängige Promotoren wurden auch vor dem *glnB*-Gen in *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* oder *Azospirillum brasilense* gefunden (Martin *et al.*, 1989; Foster-Hartnett *et al.*, 1994; Johansson & Nordlund, 1996; de Zamaroczy *et al.*, 1990). In *B. japonicum* wird das *glnB*-Gen unter N-Überschuss von einem σ^{70} -abhängigen Promotor exprimiert und dabei durch NtrC partiell reprimiert. Unter N-limitierenden Bedingungen erfolgt die Expression von einem σ^{54} -abhängigen Promotor mit NtrC als Transkriptionsaktivator. Als Konsequenz für den Organismus bleibt die Expressionshöhe des *glnB*-Transkripts konstant (Martin *et al.*, 1989). In *Rhodobacter capsulatus* oder *Rhodobacter sphaeroides* (Foster-Hartnett & Kranz, 1994; Zinchenko *et al.*, 1994) zeigen die von NtrC-regulierten *glnB*-Promotoren keine Ähnlichkeiten zu -12/-24 Sequenzen des σ^{54} -abhängigen Promotoren.

In *A. diazotrophicus* konnten wie in *R. sphaeroides* oder *R. capsulatus* keine Sequenzen stromaufwärts des *glnB*-Gens gefunden werden, die der σ^{54} -Konsensussequenz ähnlich sind und von NtrC unter N-Mangel aktiviert werden könnten. Da in *A. diazotrophicus* bisher keine Ergebnisse einer Primer-Extension oder S1-Mapping-Analyse und keine Reporterfusionen für das *glnB*-Gen vorliegen, ist eine Aussage zur *glnB*-Expression bislang nicht möglich.

In allen oben beschriebenen Organismen zeigen sich zudem Unterschiede im Expressionsmuster des *glnA*-Gens. So folgt aus der benachbarten Lage der Gene *glnB* und *glnA* nicht zwingend eine Kotranskription der beiden Gene. Im Bezug auf die unterschiedlichen Funktionen dieser beiden Genprodukte (P_{II} ist ein Regulatorprotein und die Glutamin-Synthetase ist ein anabolisches Enzym) könnte der Bedarf der Zelle in diesen Proteinen unterschiedlich sein und eine Regulation der Transkription des *glnA*-Gens unabhängig vom *glnB*-Gen erfordern.

So erfolgt die Expression des *glnA*-Gens in *B. japonicum* von einem eigenen konstitutiven σ^{70} -abhängigen Promotor (Martin *et al.*, 1989). Die Existenz eines eigenen *glnA*-Promotors zwischen benachbart auf dem Chromosom lokalisierten *glnB*- und *glnA*-Genen wurde auch für *Azospirillum brasilense* (de Zamaroczy *et al.*, 1990; de Zamaroczy *et al.*, 1993) und *Rhizobium leguminosarum* (Amar *et al.*, 1994) über Expressionsstudien mit Reporterfusionen belegt. Im Gegensatz hierzu wurde für *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* und *Azorhizobium caulinodans* eine posttranskriptionale Prozessierung eines *glnBA*-Transkripts postuliert (Borghese & Wall, 1995; Johansson & Nordlund, 1996; Michel-Reydellet *et al.*, 1997). Zusätzlich zu dem *glnBA*-Transkript tritt hier auch eine *glnA*-mRNA auf, die nicht als Folge einer Transkription eines eigenen Promotors, sondern als Produkt der Spaltung der mRNA durch die RNase E zwischen den *glnB* und *glnA*-

Genen entsteht. Ein spezifischer *glnA*-Promotor zwischen den *glnB* und *glnA*-Genen konnte in diesen Organismen bislang nicht nachgewiesen werden.

In *Azospirillum brasilense* besitzt das *glnBA*-Operon drei unterschiedliche, selektiv aktivierte, Stickstoff-abhängig regulierte Promotoren. Unter Stickstoff-Überschuss erfolgt eine niedrige Expression der *glnBA*-Gene von einem σ^{70} -abhängigen Promotor *glnBp1*. Hier erfolgt zudem die Bildung eines *glnA*-Transkripts, das in größeren Mengen als das *glnBA*-Transkript von einem eigenem noch nicht näher charakterisierten Promotor aus gebildet wird. Unter Stickstoff-Mangel wird eine maximale *glnBA*-Transkription durch einen σ^{54} -Promotor (*glnBp2*) erreicht. Unter diesen Bedingungen sind nur geringe Mengen eines monocistronischen *glnA*-Transkripts detektierbar. Die Expression dieser beiden Gene ist zwar Stickstoff-abhängig reguliert, benötigt aber kein NtrC, sondern einen anderen alternativen, noch nicht identifizierten Transkriptionsaktivator (de Zamaroczy *et al.*, 1993).

Während in *Rhodobacter capsulatus*, wo das *glnA*-Gen zusammen mit *glnB* von einem σ^{70} -abhängigen NtrC-regulierten Promotor transkribiert wird, eine Tn5-Insertion in das *glnB*-Gen zu Glutamin-Auxotrophie führt und somit die Abwesenheit eines eigenen *glnA*-Promotors unterstützt (Kranz *et al.*, 1992), benötigt eine *glnB*-Mutante in *A. brasilense* dagegen kein Glutamin für das normale Wachstum, sodass eine Transkription des *glnA*-Gens unabhängig von *glnB* von eigenem Promotor erfolgen sollte (de Zamaroczy *et al.*, 1993).

In *A. diazotrophicus* wurde die Expression der Glutamin-Synthetase sowie der Einfluss von Insertionsmutation im *glnB*-Gen auf die GS-Expression mit Antikörpern gegen die GS aus *Rhodospirillum rubrum* im Western Blot untersucht (Abb. 54, S. 125). In *A. diazotrophicus* scheint die Expression des *glnA*-Gens konstitutiv zu sein, da gezeigt werden konnte, dass sowohl unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen als auch unter Stickstoff-Überschuss vergleichbare Mengen an GS-Protein im Wildtyp Pal5 nachweisbar waren (Abb. 54, S. 125). Die GS-Expression war auch in *glnB*-Mutanten im Western Blot nachweisbar. Die Expression der Glutamin-Synthetase in dieser Mutante ist aber im Vergleich zum Wildtyp nur sehr schwach. Dabei ist die GS-Proteinmenge in *glnB*-Mutanten (wie auch im Wildtyp) in Proteinextrakten, isolierten aus Zellen, die unter Bedingungen unterschiedlichen Stickstoffangebots (N-Limitierung und N-Überschuss) angezogen wurden, gleich. Die Tatsache, dass die GS in der *glnB*-Mutante exprimiert wird und keine Glutamin-Auxotrophie in dieser Mutante auftritt (wie in *Azospirillum brasilense*, s. oben), könnte darauf hinweisen, dass die GS-Expression von einem eigenem *glnA*-Promotor aus konstitutiv erfolgen sollte. Eine Regulation der GS-Aktivität sollte dann hauptsächlich auf posttranslationaler Ebene stattfinden.

In der Nukleotidsequenz des *glnA*-Promotorbereichs wurde eine Sequenzregion stromaufwärts des *glnA*-Gens identifiziert, die Ähnlichkeiten zur σ^{54} -Konsensussequenz TGGCAC-N₅-TTGCA/T (Morett & Buck, 1989) aufweist (Abb 21, S. 87). Die σ^{54} -abhängigen Promotoren benötigen aber einen Transkriptionsaktivator wie z. B. NtrC oder das NifA-Protein, um einen offenen Promotorkomplex zu bilden und den Promotor zu aktivieren

(Cannon *et al.*, 1995; Merrick, 1993). Keine der bekannten Konsensussequenzen der Bindestellen solcher Aktivatorproteine konnte in der Promotorregion des *glnA*-Gens identifiziert werden. Die Abwesenheit derartiger Bindestellen für eines dieser Aktivatorproteine lässt vermuten, dass entweder ein alternativer Transkriptionsaktivator benötigt wird, oder die der σ^{54} -Konsensussequenz-ähnliche Sequenzregion in *glnA*-Promotorbereich keine physiologische Bedeutung in *A. diazotrophicus* hat. Eine Funktion des NtrC-Proteins als positiver Regulator der GS-Expression kann ausgeschlossen werden, da in NtrC-Mutanten das gleiche GS-Expressionsmuster wie im Wildtyp beobachtet wurde (Abb. 54, S. 125).

Bei der Erklärung der schwachen Expression der Glutamin-Synthetase in einer *glnB*-Mutante kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Insertion des Interposons in das *glnB*-Gen zu einer Reduktion der Halbwertszeit der polycistronischen mRNA führt und damit die GS-Expression indirekt beeinflusst.

Eine konstitutive Expression der Glutamin-Synthetase in *A. diazotrophicus* wurde auch von A.Ureta (pers. Mitt.) postuliert. Die Änderung der GS-Aktivität sollte bei der konstitutiven Expression des Gens auf der posttranslationalen Regulation der Enzymsaktivität beruhen. Die Glutamin-Synthetase wird in *A. diazotrophicus* (wie in *E. coli*) durch Adenylylierung modifiziert und unterliegt einer Kontrolle durch Feedback-Inhibitoren (Ureta, pers. Mitt.).

E.1.2 *glnK₁amtB₁* und *glnK₂amtB₂*-Kodierregionen

Neben der zuvor beschriebenen *glnBglnA*-Genregion konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *A. diazotrophicus* über zwei weitere *glnB*-homologe Gene *glnK₁* und *glnK₂* verfügt. Diese beiden Gene liegen im Chromosom den *amtB*-Genen (*amtB₁* bzw. *amtB₂*) benachbart. Das Vorkommen von mehreren Ammoniumtransportern wurde für einige andere Organismen beschrieben, z. B. Mep1, Mep2 und Mep3 in *Saccharomyces cerevisiae* (Marini *et al.*, 1994; Marini *et al.*, 1997), zwei Ammoniumtransporter in *Rhodobacter sphaeroides* (Cordts & Gibson, 1987) und *Anacystis nidulans* (Boussiba *et al.*, 1984). Multiple Kopien des *glnKamtB*-Operons wurden in einigen Vertretern der Archaeobakterien identifiziert (Tab. 7, S. 131). Es ist zwar aus anderen Organismen bekannt, dass das GlnK ein zytoplasmatisches Signaltransduktionsprotein ist, das am Ammoniumsensing-Mechanismus beteiligt ist und dass das *amtB*-Gen für ein Protein der Ammoniumtransporter-Familie kodiert, die physiologische Rolle der beiden Genprodukte ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Bislang wurden keine prokaryontische Organismen gefunden, in denen nur das *amtB*-homologe Gen im Genom vorliegt, das *glnK*-Gen aber nicht vorkommt, was auf eine mögliche Wechselwirkung der beiden Genprodukte GlnK und AmtB miteinander hinweisen könnte (Thomas *et al.*, 2000a). In *E. coli* sind diese Gene für normales Wachstum nicht erforderlich. Die Anordnung der Gene in den *glnK₁amtB₁*- und *glnK₂amtB₂*-Regionen ähnelt der Anordnung in *E. coli*, *Azotobacter vinelandii* und *Azorhizobium caulinodans*. In *Bacillus subtilis*, einem Gram-positiven Bakterium, sind die Gene *nrgB* (*glnB*-Homolog) und *nrgA* (Ammoniumtransport

Protein) zwar auch benachbart, liegen aber in umgekehrter Reihenfolge (*nrgAB*). In *Azospirillum brasilense* (Van Dommelen *et al.*, 1998) und *Corynebacterium glutamicum* (Siewe *et al.*, 1996) liegt das *amtB*-Gen nicht mit den *glnB* oder *glnK*-Genen benachbart.

In vielen Organismen werden diese beiden Gene kotranskribiert. Die Expression des *glnKamtB*-Operons ist in den meisten untersuchten Organismen Ammonium-abhängig reguliert mit der Ausnahme von *Azotobacter vinelandii* (Meletzus *et al.*, 1998). In diesem Proteobakterium der γ -Gruppe wurde eine schwache konstitutive Expression des *glnKamtB*-Operons nachgewiesen.

Anhand der Sequenzanalyse der *glnK₁amtB₁*-Region in *A. diazotrophicus* ist eine Stickstoff-abhängige Regulation der Expression des *glnK₁*-Gens wahrscheinlich. Stromaufwärts des *glnK₁*-Gens wurde eine mögliche σ^{54} -abhängige Promotorsequenz identifiziert, die nur 70 bp von einer möglichen Bindestelle des Transkriptionsaktivators NtrC entfernt ist. Diese Konsensussequenz für die Bindung des NtrC-Proteins überlappt mit einer putativen -10-Region eines σ^{70} -abhängigen Promotors (Abb. 28, S. 96). Messungen der Aktivität der β -Glukuronidase in *glnK₁::gusAcat*-Transkriptionsfusion sprechen für die schwache Ammonium-unabhängige Expression des *glnK₁*-Gens unter Wuchsbedingungen mit Ammonium-Überschuss (Tab. 5, S. 104). Diese basale Expression des *glnK₁*-Gens bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen korreliert mit dem Vorkommen eines schwachen konstitutiven Promotors oder könnte durch minimale NtrC~P-Mengen, die auch in Gegenwart von hohen NH_4^+ -Konzentrationen in der Zelle vorhanden sind, aktiviert werden. Die Expression des *glnK₁*-Gens in Bakterienkulturen unter diazotrophen Bedingungen ist höher als unter Bedingungen mit hohen Ammoniumkonzentrationen (Tab. 5, S. 104). Daher kann eine Verwendung des putativen σ^{54} -abhängigen Promotors unter diesen Bedingungen postuliert werden. Eine NtrC- und σ^{54} -abhängige Expression des *glnK*-Gens ist auch für *E. coli*, *Rhizobium etli*, *Azorhizobium caulinodans*, *Klebsiella pneumoniae* und für das *glnZ*-Gen von *A. brasilense* beschrieben (Atkinson & Ninfa, 1998; de Zamaroczy, 1996; de Zamaroczy *et al.*, 1998; Jack *et al.*, 1999; Michel-Reydellet *et al.*, 1998; Tate *et al.*, 1998; van Heeswijk *et al.*, 1996). Eine vergleichbare Regulation der Expression konnte auch für das *amtB₁*-Gen über analoge GUS-Aktivitätsmessung bestätigt werden. Die beiden Gene in *A. diazotrophicus* werden daher wahrscheinlich kotranskribiert.

In der Sequenz des zweiten *glnK₂amtB₂*-Operons konnten vor dem *glnK₂*-Gen keine putativen Promotorsequenzen und keine konservierten Bindestellen für bekannte Transkriptionsaktivatoren identifiziert werden. Der Vergleich der Promotorbereiche der *glnK₁amtB₁*- und *glnK₂amtB₂*-Regionen zeigt große Unterschiede in der Nukleotidsequenz (Anhang V, S. 184). Die Promotorregion des *glnK₂amtB₂*-Kodierbereichs ist AT-reich und könnte auf eine Transkription des Operons von einem konstitutiven Promotor hinweisen. Weitere Untersuchungen, wie z. B. Reporterfusionen sind hier im Rahmen zukünftiger Arbeiten notwendig.

E. 2 Expression der P_{II}-homologen Proteine

Die Expression der P_{II}-Proteine wurde im Wildtyp und unter Berücksichtigung der zu dieser Zeit etablierten Einzelmutanten in *glnB* und dem *glnK₁*-Gen sowie der *glnBglnK₁*-Doppelmutanten untersucht. In dem Mutantenstamm UBI130 (*glnB*::Km, *glnK₁*::*gusAcat*) wird das GlnK2-Protein exprimiert, dabei scheint dessen Expression unabhängig vom interzellulären N-Status dieser Mutante zu sein (Abb. 37, S. 106). In allen anderen getesteten Proteinextrakten ist eine Mischung aus zwei (GlnK1 und GlnK2 in der *glnB*-Mutante, P_{II} und GlnK2 in der *glnK₁*-Mutante) oder drei (Wildtyp Pal5) Proteinen vorhanden. Daher ist zu diesem Zeitpunkt keine sichere Aussage über den Ammonium-abhängigen Regulationsmechanismus der Expression der P_{II}-homologen Proteine in dem Wildtypstamm Pal5 und den Mutanten möglich, da bislang keine Mutante in dem dritten Gen zur Verfügung steht. Reporterfusionen und spezifische Antikörper für die P_{II}-homologen Proteine sind für die weitere Untersuchungen der Expression erforderlich.

E. 3 Struktur und Funktion der P_{II}-Proteine

Neue Studien über bakterielle P_{II}-Proteine zeigen, wie die selektive Steuerung mehrfacher Rezeptoren eines Proteins zu Koordination der Antworten auf unterschiedliche Stimuli und zur Anpassung des Systems an wechselnde Umgebungen führen kann. Die P_{II}-Proteine liegen in ihrer biologisch aktiven Form als Trimere vor (de Mel *et al.*, 1994). Durch die Interaktion mit der ATase (*glnE*-Genprodukt) sind sie an der Regulation der Aktivität der Glutaminsynthetase, durch die Interaktion mit der NtrB-Histidinkinase an der Regulation der Genexpression über das NtrBC-Zweikomponentensystem und durch Interaktion mit dem Transkriptionsaktivator NifA an der Regulation der Stickstofffixierung beteiligt. Kleine Effektmoleküle wie Glutamin und α -Ketoglutarat regulieren die P_{II}-Aktivität in *E. coli*. Ein Signal über N-Mangel (z. B. niedrige Glutaminkonzentrationen) führt zur Modifikation des P_{II}-Proteins (Uridylylierung) durch das UTase/UR-Enzym (*glnD*-Genprodukt) und zur Deuridylylierung bei hohen Stickstoffkonzentrationen. Außerdem binden α -Ketoglutarat (Signal des intrazellulären C-Status) und ATP direkt an das P_{II}-Protein. Das P_{II}-Protein (*glnB*-Genprodukt) von *A. diazotrophicus* ist zu 70,5% identisch mit dem am besten untersuchten P_{II} aus *E. coli*, bei dem mittels ortsspezifischer Mutagenese einige wichtige aktiven Stellen des Proteins charakterisiert werden konnten (Jiang *et al.*, 1997)

Die Mutationen in den Aminosäurenresten Y51, Y46, G89 sowie Δ 47-53 inhibieren in *E. coli* die Uridylylierung des P_{II}-Proteins durch die UTase/UR bzw. die Interaktion mit diesem Enzym, wobei nur die Tyrosine Y51 und Y46 essentiell für die Bindung des Sensorenzyms Uridylyltransferase sind (Jiang *et al.*, 1997). Der Aminosäurerest Y46, der den Uridylylierungsgrad des P_{II}-Proteins in *E. coli* beeinflusst (Jaggi *et al.*, 1996), ist in den P_{II}-Proteinen der α -Proteobakterien hoch konserviert und auch im *A. diazotrophicus*-P_{II} vorhanden (Abb. 59, S. 138).

(Abb. 59) und das P_{II}-Protein könnte demzufolge in diesem Organismus in ähnlicher Weise wie in Enterobakterien an der Signaltransduktion des N-Status der Zelle beteiligt sein.

A. diazotrophicus besitzt zwei weitere P_{II}-homologe Proteine, GlnK1 und GlnK2. Die beiden Proteine GlnK1 und GlnK2 zeigen untereinander und zu den GlnK-Proteinen anderer Organismen einen höheren Grad an Ähnlichkeiten (bis zu 67%) als zu dem P_{II}-Protein (GlnB) von *A. diazotrophicus* (56,9% Identität zwischen P_{II} und GlnK1 und 61,6% Identität zwischen P_{II} und GlnK2-Proteinen). Die physiologische Rolle der meisten bekannten GlnK-Proteinen anderer Organismen ist noch nicht geklärt.

Interessanterweise wurde in *K. pneumoniae* (γ -Gruppe der Proteobakterien) festgestellt, dass der Austausch des Aminosäurerestes D54N (Aspartat – Asparagin) im funktionell wichtigen T-Loop des P_{II}-Proteins zur einer Änderung der Funktion des Proteins führt, so dass diese P_{II}-Mutante zum größten Teil die Rolle des GlnK-Proteins in der Regulation der NifA-Aktivität übernehmen kann (Arcondeguy *et al.*, 2000). Falls diesem Aminosäurerest eine wichtige Rolle in Regulatorfunktion des GlnK zukommen sollte, wäre eine Konservierung dieser Aminosäureposition zu fordern (wie z. B. des Tyrosin 51). Ein Asparaginrest an Position 54 ist jedoch in keinen der drei P_{II}-homologen Proteine in *A. diazotrophicus* vorhanden (Abb. 44, S. 114)

Die potentielle Modifikationsstelle Tyrosin-51 im T-Loop des Proteins dagegen liegt in den P_{II}-, GlnK1- und GlnK2-Proteinen aus *A. diazotrophicus* konserviert vor. Aufgrund dieser Daten ist eine posttranslationale Modifikation dieser Proteine über Uridylierung wahrscheinlich. Die Untersuchungen der Modifikation der P_{II}- und GlnK-Proteine mit radioaktiv markiertem [α ³²P]-UTP im zellfreien Proteinextrakten von Zellen, die unter diazotrophen Bedingungen oder unter Ammonium-Überschuss angezogen wurden, zeigten, dass zumindest GlnK2 in *A. diazotrophicus* uridyliert wird (Abb. 39, S. 108). Nach der Uridylierungsreaktion, die von α -Ketoglutarat positiv beeinflusst wird, wird *in vitro* ein stärkeres Signal in den Proteinextrakten erwartet, die vor der Reaktion weniger uridylierte Proteine enthalten. In der *glnBglnK1*-Doppelmutante (nur GlnK2 ist vorhanden) sind die radioaktiven Signale gleich intensiv unabhängig von den Wuchsbedingungen. Das GlnK2-Protein sollte daher unter den getesteten Bedingungen gleich uridyliert vorliegen, falls seine Expression ebenfalls konstitutiv ist. Über die Stickstoff-abhängige Modifikation der anderen Proteine (P_{II} und GlnK1) lässt sich aus diesen Experimenten keine Aussage treffen, da eine Mischung aus zwei Proteinen in den Extrakten vorhanden ist und keine Informationen über die Stickstoff-abhängige Expression jedes einzelnen Proteins und seinen regulatorischen Einflusses auf die Expression der anderen bekannt ist. Es ist aber wahrscheinlich, dass alle drei P_{II}-homologe Proteine in *A. diazotrophicus* uridyliert werden. In dem bisher einzigen bekannten Organismus mit drei P_{II}-homologen Proteinen, *Azoarcus* sp. BH72, wird eines dieser Proteine, GlnY, konstitutiv modifiziert. In einer *glnBK*-Doppelmutante, in der nur das modifizierte GlnY vorhanden ist, wurde eine konstitutive *nif*-Expression nachgewiesen (Martin, pers. Mitt.).

E. 4 Rolle der P_{II}-Proteine in N₂-Fixierung

A. diazotrophicus kann unter mikroaeroben Bedingungen und bei niedrigem Stickstoff-Gehalt der Zelle Stickstoff aus der Atmosphäre mittels des Nitrogenase-Enzymkomplexes zu Ammonium konvertieren. Das ca. 32 kb große *nif*-Cluster, das unter anderem die Strukturgene für die Eisen-Molybdän-Nitrogenase, *nifHDK*, beinhaltet, wurde in *A. diazotrophicus* identifiziert und partiell charakterisiert (Sevilla *et al.*, 1997). Am ausgeprägtesten sind Ähnlichkeiten in der Genorganisation des *nif*-Clusters zwischen *A. diazotrophicus* und *A. brasilense* (Lee *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2000). Diese beiden Organismen kommen in der Natur in einer Assoziation mit monokotylen wirtschaftlich bedeutsamen Pflanzen vor (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Die Regulation der Stickstofffixierung und die Analyse der Gene, die an diesem Prozess beteiligt sind, ist in beiden Organismen Gegenstand intensiver Untersuchungen. Außerdem zeigen auch die regulatorischen Proteine P_{II}, GlnK1 und GlnK2 (kodiert von den *glnB*-, *glnK1*- und *glnK2*-Genen) von *A. diazotrophicus* den höchsten Grad an Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu den Genprodukten der *glnB*- und *glnZ*-Genen aus *A. brasilense*. Die phänotypische Charakterisierung der Genprodukte dieser Gene zeigt aber, dass sie in beiden Organismen an unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Stickstofffixierung beteiligt sind.

Die Inaktivierung des *glnB*-Gens in *A. brasilense* führt zu einem Nif⁻-Phänotyp, während *glnB*-Mutanten in *A. diazotrophicus* Nif⁺ sind. Dass das Genprodukt des *glnB*-Gens an der Regulation der Stickstofffixierung beteiligt ist, zeigt trotz des Nif⁺-Phänotyp der *glnB*-Mutanten die noch vorhandene Aktivität der Nitrogenase in Gegenwart von 20 mM NH₄⁺ (Abb. 49, S. 120). Die Expression der *nif*-Gene in *A. diazotrophicus* benötigt wie in allen bislang untersuchten Gram-negativen diazotrophen Mikroorganismen einen Transkriptionsaktivator, NifA, das Genprodukt des *nifA*-Gens (Lee *et al.*, 1998). Da die N₂-Fixierung ein Energie-aufwendiger Prozess ist, wird eine präzise Kontrolle der *nif*-Genexpression benötigt. Die Expression und Aktivität des NifA-Proteins unterliegen deswegen einer strengen Regulation in Abhängigkeit von Sauerstoff und von der Konzentration an gebundenem Stickstoff. Das *nifA*-Gen liegt in *A. diazotrophicus*, im Unterschied zum *A. brasilense* *nifA*-Gen, geclustert mit den anderen *nif*-Genen vor. Die Sauerstoff-abhängige Regulation des NifA-Proteins erfolgt in *A. diazotrophicus* posttranslational und beruht auf einer direkten O₂-Sensitivität des NifA-Proteins. Eine Domänenstruktur mit einem Metall-bindenden Cysteinmotiv ist charakteristisch für die NifA-Proteine der α-Proteobakterien (Teixeira *et al.*, 1999; Wülling, 1998). Demgegenüber ist den Bakterien der γ-Gruppe eine Regulation der NifA-Aktivität durch das NifL-Protein in Abhängigkeit von O₂ gemeinsam. Die NifA-Proteine selbst sind in diesen Organismen Sauerstoff-tolerant.

Die Ammoniumkontrolle der *nif*-Genexpression in den Proteobakterien der γ -Gruppe wird auch über das NifL-Protein über eine direkte NifL-NifA Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelt (Austin *et al.*, 1994). In *A. diazotrophicus*, wie in den anderen α -Proteobakterien, konnte aber kein NifL-Protein nachgewiesen werden und die Ammonium-abhängige Regulation der NifA-Aktivität sollte (falls eine Kontrolle auf posttranslationaler Ebene überhaupt vorhanden ist) über einen anderen Mechanismus erfolgen.

Während die Expression des *nifA*-Gens in *A. diazotrophicus* von O₂ unabhängig ist, konnte eine Ammonium-abhängige Regulation der *nifA*-Expression in diesem Bakterium nachgewiesen werden (Teixeira *et al.*, 1999). Der Mechanismus der Regulation der *nifA*-Transkription durch Ammonium ist unbekannt, ist aber von NtrC oder σ^{54} unabhängig (Reth, 2000; Teixeira *et al.*, 1999).

Eine NtrC-unabhängige P_{II}-abhängige Regulation der NifA-kontrollierten Transkription der *nif*-Gene wurde bereits in *Azospirillum brasilense* beschrieben (de Zamaroczy *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1992).

In diesem Bakterium wird das *nifA*-Gen konstitutiv exprimiert, unabhängig von O₂ oder NH₄⁺-Konzentrationen, die Expression ist aber unter diazotrophen Bedingungen erhöht. Mutationen in den *ntrBC*-Genen haben keinen größeren Effekt auf die *nifA*-Expression (Liang *et al.*, 1993), obwohl das *ntrC*-Genprodukt für die maximale Expression des *nifA*-Gens benötigt wird. Wie in *A. diazotrophicus*, wurden in *A. brasilense* keine σ^{54} -Konsensussequenzen im Promotorbereich des *nifA*-Gens gefunden. Trotz damit verbundener konstitutiver Anwesenheit des NifA-Transkriptionsaktivators, unterliegt die Expression der übrigen *nif*-Gene einer Stickstoff-abhängigen Regulation in diesem Organismus. Daraus folgt, dass die Aktivität des NifA-Proteins moduliert wird. In Experimenten mit NifA-Proteinen, die Deletionen in der N-terminalen Domäne tragen und anhand der Fähigkeit dieser verkürzten Proteine, die Transkription einer *nifH-lacZ*-Fusion zu aktivieren, wurde gezeigt, dass die N-terminale Domäne des NifA-Proteins eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität des Proteins hat. Da eine *glnB*-Mutante einen Nif-Phänotyp zeigt, obwohl die *nifA*-Expression im *glnB*-Hintergrund nicht beeinträchtigt war, wurde postuliert, dass das P_{II}-Protein die NifA-Aktivität direkt über eine Interaktion mit der N-terminalen Domäne in *A. brasilense* moduliert (Arsene *et al.*, 1996). Eine vergleichbare negative Regulation vermittelt durch die N-terminale Domäne von NifA in Gegenwart hoher Ammoniumkonzentrationen wurde für einen Vertreter der β -Gruppe der Proteobakterien, *Herbaspirillum seropedicae*, gezeigt (Monteiro *et al.*, 1999a, b; Souza *et al.*, 1999). In *H. seropedicae* wird allerdings zudem die Expression des *nifA*-Gens wahrscheinlich über NtrC und σ^{54} Stickstoff-abhängig reguliert. Man würde deswegen eine konstitutive Expression des *nifA*-Gens in *glnB*-Hintergrund erwarten. Wie in *A. brasilense*, zeigten *glnB*-Mutanten in *H. seropedicae* aber einen Nif-Phänotyp (Benelli *et al.*, 1997) und daher könnte das P_{II}-Protein an der Signaltransduktionskaskade des N-Status der Zelle direkt zum NifA-Protein in diesem Organismus beteiligt sein.

Anhand der Analyse der Nitrogenaseaktivität in *glnB*-Mutanten (D.8.1, S. 117) und basierend auf den bekannten Funktionen des P_{II} -Proteins in anderen Organismen, wird ersichtlich, dass P_{II} an der Regulation der Stickstofffixierung durch Ammonium beteiligt ist. Zielproteine einer P_{II} -abhängigen Regulation der Stickstofffixierung könnten entweder NifA selbst oder ein negativer Regulator der NifA-Aktivität sein.

Falls P_{II} in *A. diazotrophicus* an der Regulation der NifA-Aktivität beteiligt ist, sollte sich der Regulationsmechanismus von denen in *A. brasilense* und *H. seropedicae* unterscheiden, da

- (i) eine *glnB*-Mutante keinen Nif-Phänotyp zeigt;
- (ii) die N-terminale Domäne des NifA-Proteins keine signifikante Homologie zu dem untersuchten Protein von *A. brasilense* hat und
- (iii) die Nitrogenase-Aktivität weiterhin durch Ammonium in *glnB*-Mutanten reprimierbar ist (Abb. 49, S. 120).

Die Ergebnisse zur Expression der Nitrogenase zeigten, dass in einer *glnB*-Mutante das NifA-Protein in Gegenwart von 20 mM NH_4^+ im Medium noch aktiv ist. Die Aktivität der Nitrogenase beträgt allerdings nur noch ca. 15% der unter dereprimierenden Bedingungen erreichten Aktivitätswerte. Wenn die Regulation posttranslational erfolgen sollte, dann befindet sich nur ein Teil der NifA-Aktivität nicht mehr unter dieser Ammoniumkontrolle und bleibt aktiv. Das wäre unwahrscheinlich, wenn die NifA-Aktivität über eine stabile Proteininteraktion mit einem Inhibitor reguliert sein sollte. Da in *A. diazotrophicus* Pal5 (Wildtyp) keine signifikante *nifA*-Expression in Anwesenheit von 20 mM NH_4^+ im Medium nachgewiesen werden konnte (Teixeira *et al.*, 1999), sollte in einer *glnB*-Mutante zuerst die *nifA*-Expression beeinflusst werden, so dass die Expression des *nifA*-Gens sich einer Ammonium-Repression entziehen sollte. Diese Vermutungen legen nahe, dass eine P_{II} -abhängige Regulation möglicherweise auf der Ebene der Transkriptionsregulation des *nifA*-Gens erfolgt.

In *Rhodobacter capsulatus* führt eine *glnB*-Inaktivierung zu einer konstitutiven Expression der beiden Kopien des Transkriptionsaktivators NifAI und NifAII (Paschen, 1997). Die Auswirkung der *glnB*-Mutation auf die *nifA*-Expression in *R. capsulatus* liegt hier möglicherweise in einer Beteiligung des GlnB-Proteins an der Regulation der Expression der beiden *nifAI/nifAII*-Gene durch das Zweikomponenten-Regulationssystem NifR1/NifR2 (Analog des NtrBC-Zweikomponentensystem der Enterobakterien) (Hubner *et al.*, 1991). In einer *glnB*-Deletionsmutante wirkt NifR2 (ein NtrB-Homolog) ständig als Kinase und NifR1 (ein NtrC-Homolog) wird konstitutiv phosphoryliert und wirkt daher als konstitutiver Aktivator der Transkription σ^{54} -abhängiger Promotoren.

Dennoch ist die NifAI/NifAII-abhängige Expression der *nif*-Gene in *R. capsulatus* in einer *glnB*-Mutante, wie in *A. diazotrophicus*, durch NH_4^+ reprimierbar, wie anhand der Messung der Expression einer *nifH-lasZ*-Fusion in *glnB*-Mutanten, die unter reprimierenden Bedingungen etwa 17% der unter dereprimierenden Bedingungen erreichten Expression beträgt, gezeigt wurde (Paschen, 1997). Der Vergleich der Expressionswerte der

Reportergenfusion *nifH-lacZ* in der *glnB*-Mutante mit den Werten der NifAI^c/NifAII^c-abhängigen *nif*-Expression, die wie im Fall der Mutation in *glnB*-Gen zur Reduktion der Expression unter reprimierenden Bedingungen führen, ließen vermuten, dass die NH₄⁺-Kontrolle in *R. capsulatus* auf einer instabilen Wechselwirkung eines Inhibitors mit dem NifA-Protein oder auf der nicht-kovalenten Bindung eines Effektormolekül durch das NifA-Protein beruhen könnte. Es wurde für das P_{II}-Protein in *R. capsulatus* postuliert, dass P_{II} nicht in die NH₄⁺-Kontrolle der NifA-Aktivität involviert ist (Paschen, 1997).

Die Auswirkung der Inaktivierung des *glnB*-Gens auf die *nifA*-Expression (oder auf die Regulation der NifA-Aktivität) in *A. diazotrophicus* sollte in zukünftigen Arbeiten anhand der Messung der Expression der Reportergenfusionen der Gene *nifA* bzw. *nifB* in *trans* untersucht werden. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass zwei zusätzliche Regulatorproteine - GlnK1 und GlnK2 - in *A. diazotrophicus* an der Regulation beteiligt sein könnten. Da die P_{II}-Proteine vielseitige Wechselwirkungen bilden können, könnten die Proteine P_{II}, GlnK1 oder GlnK2 (bzw. PII~UMP, GlnK1~UMP, GlnK2~UMP) mit anderen regulatorischen Proteinen interagieren und damit über Signaltransduktionskaskaden weitere Regulationsmechanismen direkt oder indirekt beeinflussen. Die Regulation der *nifA*-Expression bzw. NifA-Aktivität wäre hier Teil einer Signaltransduktionskaskade.

Eine regulatorische Funktion des GlnK-Proteins in der Stickstofffixierung wurde in *Klebsiella pneumoniae* gezeigt. In diesem diazotrophen Proteobakterium der γ -Gruppe wird die Aktivität des NifA-Proteins über Interaktion mit dem NifL-Protein Stickstoff-abhängig reguliert. Die Expression des *nifLA*-Operons unterliegt einer Kontrolle durch das NtrBC-System, während die NifL-Aktivität über einen unbekanntem Faktor Ammonium-abhängig reguliert wird. In einem von Jack *et al.* (1999) vorgeschlagenem Modell wird die Rolle des Regulators der NifL-anhängigen Inhibierung des NifA-Proteins dem GlnK-Protein zugewiesen. Der Einfluss von *glnB*- bzw. *glnK*-Mutationen auf die *nifLA*-abhängige Expression wurde anhand von chromosomalen *pnifH-lacZ*-Fusion untersucht. Dabei wurde das *nifLA*-Operon von einem *plac*-Promotor unabhängig vom zellulären N-Status Plasmid-kodiert exprimiert und damit von Ntr-System entkoppelt. In Abwesenheit des GlnK-Proteins war das NifA-Protein nicht in der Lage, sich der Kontrolle des Inhibitors NifL zu entziehen und die *nifH*-Expression unter diazotrophen Bedingungen wurde auf 75% reduziert. Diese Kontrolle findet in diesem System wahrscheinlich über eine Interaktion des GlnK-Proteins mit dem Transkriptionsaktivator NifA statt, jedoch kann die Möglichkeit einer direkten Interaktion des GlnK-Proteins mit NifL nicht ausgeschlossen werden. Das GlnB-Genprodukt kann hierbei das GlnK-Protein nur teilweise ersetzen. Obwohl kein *nifL*-ähnliches Gen in *A. diazotrophicus* nachgewiesen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein bisher unbekanntes Regulatorprotein ähnliche Funktionen wie das NifL-Protein in der Regulation der NifA-Aktivität übernimmt und von P_{II} und/oder GlnK1/GlnK2 reguliert wird. *A. diazotrophicus* besitzt zwei GlnK-Proteine, die möglicherweise gleiche regulatorische Funktionen übernehmen könnten. In diesem Fall wäre es ohne Etablierung von *glnK*₂-

Mutanten und Doppelmutanten in zwei unterschiedlichen *glnB*-homologen Genen unmöglich, die Funktionen dieser beiden Proteine zu unterscheiden und ihre physiologische Rolle, besonders in der Stickstofffixierung, zu bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit der Beteiligung der P_{II}-Proteine an der Regulation ist die Stickstoff-abhängige posttranslationale Modifikation der Nitrogenase. Diese Inhibierung der Nitrogenase wird als „switch-off“ bezeichnet (Zumft & Castillo, 1978). Die posttranslationale Regulation der Aktivität der Nitrogenase unterliegt in einigen diazotrophen Bakterien einer Kontrolle durch DraT/DraG-System, das für *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodobacter capsulatus* beschrieben wurde (Fu *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 1990; Inoue *et al.*, 1996; Masepohl *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1992). DraT katalysiert hierbei den Transfer einer ADP-Ribosyl-Gruppe von NAD auf eine der Untereinheiten des Dinitrogenase-Reduktase-Dimers als Antwort auf eine Erhöhung der Konzentrationen an fixierten Stickstoff bzw. auf Energie-Limitierung z. B. bei Dunkelheit in den photosynthetischen Bakterien *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodobacter capsulatus* oder als Antwort auf anaerobe Wachstumsbedingungen in *Azospirillum brasilense*. DraG kann die ADP-Ribose von dem kovalent modifizierten Enzym entfernen und die Aktivität der Nitrogenase wiederherstellen.

In *R. rubrum* bewirkt eine Mutation in *ntrBC*, die zu einer sehr niedrigen *glnB*-Expression verglichen mit dem Wildtyp führt, eine Aufhebung der „switch-off“-Regulation durch Ammonium, während die Inaktivierung der Nitrogenase durch Dunkelheit weniger beeinflusst wurde (Zhang *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995b). Das P_{II}-Protein (*glnB*-Genprodukt) könnte in diesem photosynthetischen Bakterium also an einer Stickstoff-abhängigen Kontrolle des DraT, das in Abhängigkeit von NH₄⁺ und Energie-Status reguliert wird, beteiligt sein.

In *A. diazotrophicus* ist aber bisher nichts über eine posttranslationale Regulation der Nitrogenase bekannt und ein DraT/DraG-Regulationssystem konnte nicht nachgewiesen werden (Burriss *et al.*, 1991). In *A. brasilense* und *R. capsulatus* wurde zudem gezeigt, dass dem DraT/DraG-System zwar die wichtigste Rolle im Nitrogenase-„switch-off“ zugewiesen wird, dies aber nicht der einzige Mechanismus der Inaktivierung der Nitrogenase ist, da in Stämmen, in denen die Dinitrogenase-Reduktase nicht ADP-Ribosyliert werden kann, die Nitrogenase-Aktivität immer noch einer Repression durch NH₄⁺ unterliegt (Förster *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996). Der Mechanismus dieser Regulation ist bislang unbekannt.

In *Azoarcus* sp. BH72 scheinen die Genprodukte der *glnB*-homologen Gene auch in die Ammonium- und Energie-abhängige (Anaerobiosis) posttranslationale Modifikation des NifH-Proteins involviert zu sein. Dafür spricht die Tatsache, dass die über Ammonium-„switch-off“-modifizierte Form des NifH-Proteins in *glnB*- und *glnK*-Mutanten nicht nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte eine Modifizierung des NifH-Proteins als Antwort auf die anaerobe Wachstumsbedingungen in *glnBglnK*₁-Doppelmutanten, die nur GlnY-Protein exprimieren, nicht nachgewiesen werden (Martin, pers. Mitt.).

E. 5 Phänotypen der *glnB*-, *glnK*₁- und *glnBglnK*₁-Mutanten

In *A. diazotrophicus* sind alle in dieser Arbeit konstruierten Mutanten weiterhin in der Lage, Luftstickstoff zu fixieren (Nif⁺-Phänotyp). P_{II}-Proteine sind als an der Stickstoff-abhängigen Regulation der Expression von verschiedenen anabolischen und katabolischen Enzymen, die in N-Metabolismus involviert sind, beteiligte Proteine bekannt. Die aus anderen Systemen (vor allem *E. coli*) bekannten Phänotypen von *glnB*- und *glnK*-Mutanten, wurden als Basis für die physiologische Charakterisierung der *A. diazotrophicus*-Mutanten verwendet. Anhand der Untersuchungen der Wachstumseigenschaften der *glnB*- oder *glnK*₁-Mutanten sollten Aussagen über die Beteiligung dieser Proteine an der Regulation der Aminosäureassimilation in *A. diazotrophicus* ermöglicht werden.

Während *glnB*- und *glnK*₁-Einzelmutanten im Vergleich mit dem Wildtyp geringe Unterschiede in der Generationszeit in Vollmedium und in Minimalmedium mit den meisten getesteten Aminosäuren als N-Quelle zeigen, ist diese im Fall von *glnBglnK*₁-Doppelmutanten auf allen getesteten Medien deutlich erhöht. Der Unterschied ist besonders ausgeprägt beim Wachstum auf Arginin als einziger Stickstoffquelle. Die *glnB*-Mutanten in *A. diazotrophicus* wachsen langsamer als der Wildtyp oder *glnK*₁-Mutanten auf Minimalmedium mit Alanin als N-Quelle (Abb. 47, S. 117). Ob diese Unterschiede im Wuchsverhalten auf einer Deregulierung des Ntr-Systems beruhen, bleibt unklar, da das Wachstumsverhalten der *ntrC*-Mutanten auf diesen Medien gleich dem des Wildtyps Pa5 ist. In *E. coli* z. B. wird viel NtrC~P in der Zelle für das Wachstum auf Arginin benötigt, *glnB*- und *glnK*-Mutanten sind in der Lage, auf diesem Medium zu wachsen, *glnBglnK*-Doppelmutanten dagegen haben einen Wachstumsdefekt, der wahrscheinlich auf die Überexpression von Ntr-Genen und als Folge auf einen Bedarf an allen Aminosäuren zurückzuführen ist (Atkinson & Ninfa, 1998; Atkinson & Ninfa, 1999). Als Suppressor-Mutationen des Wachstumsdefekts in diesem Doppelmutantenstamm wurden zusätzliche Mutationen, die zum Verlust der NtrC oder NtrB-Proteine und somit zu weniger NtrC~P in der Zelle führen, gezeigt. Für das GlnK-Protein in *E. coli* wurde daher postuliert, dass es in einer Fein-Kontrolle eine wichtige Rolle im Erhalten der intrazellulären NtrC~P-Konzentration auf physiologischem Niveau spielt und somit das Ntr-Regulon kontrolliert. Da in *A. diazotrophicus* in *glnBglnK*₁-Doppelmutanten noch ein weiteres Regulatorprotein, GlnK2, vorhanden ist, und ein weiteres Zweikomponenten-Regulationssystem NtrXY an der Stickstoffkontrolle der Verwertung von N-Komponenten beteiligt sein könnte, lassen sich noch keine Aussagen über die Mechanismen dieser Regulation treffen. Das GlnK2-Protein in *A. diazotrophicus* kann wahrscheinlich die Funktionen der Proteine P_{II} und GlnK1 nicht ersetzen, da die *glnB*- und *glnK*₁-Mutanten unterschiedliche Phänotypen in Aminosäureverwertung zeigen.

In *E. coli* befinden sich die Gene *argT* (Arginin-Transport) (Schmitz *et al.*, 1987), *hisJQMP* (Histidin-Transport) (Schmitz *et al.*, 1987) und *glnHPQ* (Glutamin-Transport) (Nohno & Saito, 1987) unter Ntr-Kontrolle. Für *R. capsulatus* konnte demgegenüber eine Ntr-

unabhängige Expression der im Aminosäurekatabolismus involvierten *put*-Gene (Keuntje *et al.*, 1995) und des Enzyms Arginase (Moreno-Vivian *et al.*, 1992), die in Enterobakterien N-reguliert sind, gezeigt werden. Mutationen in Genen des Ntr-Systems *glnB*, *nifR1* (*ntrC*) and *nifR4* (*ntrA*) haben keinen Einfluss auf die *put*-Expression in diesem Bakterium (Keuntje *et al.*, 1995).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte der Gene *glnB* und *glnK₁* die Motilität von *A. diazotrophicus* beeinflussen, während keine signifikante Unterschiede zum Wildtyp in der Beweglichkeit der *ntrC*- und *ntrA*-Mutanten gezeigt werden konnten (Abb. 48, S. 118). Das Ntr-System ist anscheinend nicht an der Kontrolle der Motilität beteiligt. Aus diesen Ergebnissen ist allerdings nicht klar, ob die Proteine P_{II} und GlnK direkt in die Biosynthese der Flagella involviert sind oder indirekt über die Kontrolle des globalen energetischen Metabolismus wirken, was von de Zamaroczy *et al.* (1996) für das P_{II}-Protein aus *A. brasilense* postuliert wurde.

E. 6 Ist das *glnA*-Gen essentiell in *A. diazotrophicus*?

Das von der Nitrogenase produzierte Ammonium wird in *A. diazotrophicus* über den Glutamin-Synthetase/Glutamat Synthase-Stoffwechselweg assimiliert (Alvarez & Martinez Drets, 1995). Die Glutamin-Synthetase wird vom *glnA*-Gen kodiert, das im Chromosom wie in anderen Proteobakterien der α -Gruppe mit *glnB* geclustert vorliegt. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Interposonmutagenese des *glnA*-Gens nicht erfolgreich. Die Glutamin-Synthetase scheint daher in *A. diazotrophicus* ein essentielles Enzym zu sein.

Dies konnte auch für *Azospirillum brasilense* und in *Rhodospirillum rubrum* (Zhang *et al.*, 2000) gezeigt werden. Auch in diesen Organismen sind *glnA*-Nullmutanten offenbar letal.

Ein aktives Transportsystem für Glutamin ist erforderlich, um den *glnA*-Mutanten im Fall einer auftretenden Glutamin-Auxotrophie das Wachstum auf Medium unter Glutaminzugabe zu ermöglichen. In *E. coli* ist ein Hochaffinitätstransportsystem für Glutamin unter N-limitierenden Wachstumsbedingungen aktiv (Willis *et al.*, 1975). Um zu zeigen, ob *A. diazotrophicus* Glutamin als Substrat aufnehmen kann, wurden Aufnahme-Studien mit radioaktiv markiertem [¹⁴C]-Glutamin mit *A. diazotrophicus* Pal5 durchgeführt, die in Gegenwart von Glutamat, 1 mM Ammonium, 20 mM Ammonium als Stickstoffquelle oder im N-freiem Medium inkubiert wurden (Abb. 53, S. 124). Die Aufnahme-Rate von Glutamin war in *A. diazotrophicus* schon nach 1 Minute höher als im *E. coli*-Stamm, der zum Vergleich getestet wurde. *E. coli* zeigte eine lineare Glutamin-Aufnahme im Medium mit Glutamat als N-Quelle und Glucose als C-Quelle. Im Gegensatz hierzu konnte im Minimalmedium mit Glutamat als N-Quelle für *A. diazotrophicus* Pal5 keine Glutamin-Aufnahme gezeigt werden. Die höchste Rate des Substrattransports wurde im N-freiem Medium im Vergleich mit Kulturen in Medium mit 20 mM oder 1 mM Ammonium beobachtet. Die aufgenommene Radioaktivität bleibt während der 10-minütigen Experiment-Dauer weitgehend konstant. Die

Rate der Glutamin-Aufnahme variiert in Abhängigkeit vom N-Status und weist damit auf eine N-abhängige Regulation des Aufnahmesystems hin.

Für *Azotobacter vinelandii* konnte gezeigt werden, dass die Rate der Glutamin-Aufnahme unabhängig von N-Status des umgebenden Mediums ist, die Radioaktivität jedoch nach einer sehr kurzen Zeit als CO₂ verloren geht (Toukdarian *et al.*, 1990). Dieses könnte bedeuten, dass das aufgenommene Glutamin sehr schnell im Tricarbonsäurezyklus metabolisiert wird. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Aktivität der Glutaminase, die Glutamin zu Ammonium und Glutamat konvertiert. Das Glutamat wird dann in die Zelle aufgenommen und schnell oxidiert. Auch für *A. diazotrophicus* kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Glutaminase [¹⁴C]-Glutamin zu [¹⁴C]-Glutamat und Ammonium konvertiert und dass das Glutamat aufgenommen und gemessen wurde. Damit stände für *glnA*-Mutanten kein Glutamin zur Verfügung und der Verlust der Glutamin-Synthetase wäre zwangsläufig ein letales Ereignis.

E. 7 Einfluss der *glnD*-Mutation auf die Expression der Nitrogenase

Da die Energie, die Bakterienzelle für die Synthese und Aktivität der Nitrogenase aufbringen muß, sehr hoch ist, sollte ein Sensingmechanismus in diazotrophen Organismen sehr sensitiv und effektiv sein. Ein Schlüsselprotein in der Signaltransduktionskaskade des N-Status der Zelle ist das *glnD*-Genprodukt – die UTase. Diese misst das Verhältnis von Glutamin und α -Ketoglutarat in der Zelle, leitet es an das P_{II}-Protein (bzw. P_{II}-Paraloge) weiter und könnte somit in eine Stickstoff-abhängige Regulation der N₂-Fixierung involviert sein.

Während das *glnD*-Gen in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* für die Stickstofffixierung nicht essentiell ist (Schlüter *et al.*, 2000), wurde die Beteiligung des *glnD*-Genproduktes an der Regulation der N₂-Fixierung für *Azotobacter vinelandii* und *Azospirillum brasilense* gezeigt. Mutationen im *glnD*-Gen dieser Organismen führten zu einem Nif-Phänotyp (Contreras *et al.*, 1991; Santero *et al.*, 1988; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Dieser Phänotyp konnte in *A. vinelandii* durch Mutationen im *nifL*-Gen komplementiert werden und bestätigte die *glnD*-abhängige Kontrolle des NifA-Proteins durch das NifL-Protein. In *A. brasilense* wird eine P_{II}-abhängige Regulation des NifA postuliert und der Nif-Phänotyp der *glnD*-Mutante spricht dafür, dass das modifizierte P_{II}-Protein (P_{II}~UMP) die aktive Form für die Regulation der NifA-Aktivität ist.

In *A. diazotrophicus* zeigte eine *glnD*-Mutante einen pleiotrophen Phänotyp und ist nicht in der Lage, auf Ammonium als einziger N-Quelle zu wachsen (Meletzus, unveröffentlicht). Die Generationszeit dieser Mutante ist beim Wachstum auf Vollmedium bis auf 19 Stunden verlängert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *glnD*-Mutante in der Lage ist, die Nitrogenase unter dereprimierenden Bedingungen zu exprimieren (Abb. 52, S. 122). Zudem konnte über Western Blot-Analysen eine schwache Expression des *nifH*-Gens in der *glnD*-Mutante in Gegenwart von 20 mM NH₄⁺ gezeigt werden. Den gleichen Phänotyp zeigen *glnB*-Mutanten in *A. diazotrophicus*. Dies könnte bedeuten, dass

- (i) weder das P_{II}-Protein noch P_{II}-UMP für die *nif*-Genexpression unter diazotrophen Bedingungen benötigt wird;
- (ii) das P_{II}-Protein an der Regulation der Expression der *nif*-Gene (Reprimierung der Expression) unter Bedingungen hohen Stickstoffangebots beteiligt ist und
- (iii) das *glnD*-Genprodukt in dieser Regulation nicht direkt benötigt wird (Abb. 60, S. 150).

E. 36 Das Ammoniumaufnahme-System in *A. diazotrophicus*

In dieser Arbeit wurden zwei *amtB*-Gene, die für Proteine der Amt/Mep-Familie kodieren, identifiziert. Beide Gene liegen auf dem Chromosom *glnK*-Genen benachbart. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die partielle Charakterisierung der konservierten Genpaare *glnK₁amtB₁* und *glnK₂amtB₂*. Die Computeranalyse der Sekundärstruktur von AmtB1 und AmtB2-Proteine zeigte, dass die beiden abgeleiteten Proteine 12 Transmembrandomänen aufweisen und dass die geladenen N- und C-terminalen Regionen des AmtB1-Proteins zum Zytoplasma der Zelle orientiert sind (Abb. 30, S. 100; Abb. 43, S. 112). Das ist charakteristisch für die meisten Proteine dieser Familie (Thomas *et al.*, 2000b). Die Aminosäuresequenz des C-Terminus des AmtB2-Proteins ist bislang nicht bekannt.

Für die Proteine der Amt/Mep-Familie wurde postuliert, dass sie für den Ammoniumtransport in die Zelle benötigt werden, während Ammoniak-Moleküle über die Zytoplasmamembran frei diffundieren können. In einigen Organismen wurde diese Funktion über Verwendung des Strukturanalogs [¹⁴C]-Methylammonium nachgewiesen (Barnes *et al.*, 1983; Meletzus *et al.*, 1998; Michel-Reydellet *et al.*, 1998). Für *E. coli* wurde aber von (Soupene *et al.*, 1998) angenommen, dass AmtB in diesem Organismus Ammoniak-Moleküle als Substrat anstelle von NH₄⁺-Ionen verwendet (Soupene *et al.*, 1998). Die genaue Funktionen der Amt/Mep-Proteine ist also noch nicht endgültig geklärt. Die Proteine dieser Familie sind in Prokaryonten konserviert und kommen mit dem Paralog des P_{II}-Proteins GlnK zusammen vor. Das Genprodukt des *amtB₁*-Gens wurde in *A. diazotrophicus* einer Untersuchung der potentiellen Beteiligung am Ammoniumtransport in diesem Bakterium über die Bestimmung der Aufnahme des radioaktiv-markierten Ammonium-Analogs [¹⁴C]-Methylammonium unterzogen. Die Fähigkeit der Mutante UBI113 (*amtB₁::gusA-Km*), das Substrat aufzunehmen, war zwar reduziert (Abb. 56, S. 127), die Mutation hat aber keinen Einfluss auf das Wachstum auf niedrigen Ammoniumkonzentrationen und auf die Stickstofffixierung. Diese Reduzierung der Aufnahmerate des Methylammoniums weist auf das Vorkommen eines anderen Proteins hin, das einen Methylammoniumtransporter in diesem Mikroorganismus darstellt.

Die niedrige Methylammonium-Aufnahme in der *glnB*-Mutante ist wahrscheinlich auf eine geringe Expression der Glutamin-Synthetase in dieser Mutante zurückzuführen (Abb. 58, S. 128). Die niedrige GS-Aktivität dieser Mutante könnte zu einer Inhibierung des

Methylammoniumtransports führen, wie z. B. in *Klebsiella pneumoniae* gezeigt werden konnte (Kleiner & Castorph, 1982). Eine Korrelation zwischen der Aktivität der Glutamin-Synthetase und der Methylammonium-Aufnahme wurde auch für *Azotobacter vinelandii* gezeigt (Moore & Gordon, 1984). In *Azorhizobium caulinodans* wurde nachgewiesen, dass *glnBA*-Mutanten, die entsprechend keine GS exprimieren, nur zu niedrigen Raten an Methylammonium-Aufnahme fähig sind. Demgegenüber zeigen *glnB*-Mutante, die die GS überexprimieren, eine Erhöhung des Substrattransports (Michel-Reydellet *et al.*, 1998). In *A. diazotrophicus* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Methylammoniumtransport vom AmtB1-Protein und der GS-Aktivität abhängig ist (Abb. 58, S. 128). Es konnte zudem gezeigt werden, dass der Methylammoniumtransport in *ntrC*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp reduziert wird. Das Ntr-System spielt in diesem Organismus anscheinend keine bedeutende Rolle in der Regulation des Methylammoniumtransports.

Die Identifizierung eines zweiten Gens in *A. diazotrophicus*, der hohe Ähnlichkeiten zu *amtB*-Genen zeigt, bestätigte die Annahme, dass in diesem Organismus ein weiteres in Methylammonium-Aufnahme involviertes Protein existiert. Die Funktion und physiologische Rolle in der Ammonium-Aufnahme des AmtB2-Proteins sollte in zukünftigen Arbeiten nach der Durchführung der Mutagenese des *amtB₂*-Gens sowie einer Erzeugung von *amtB₁amtB₂*-Doppelmutanten untersucht werden.

E. 9 Ausblick

Das Stickstoff-abhängige Regulationssystem in *A. diazotrophicus* ist sehr komplex und unterscheidet sich sowohl generell als auch in Details von allen bislang untersuchten diazotrophen Organismen. Es wurden aber in dieser Arbeit wichtige Voraussetzungen für weitere Studien geschaffen. Die Gene, die für bedeutende Proteine unterschiedlicher Regulationskaskaden kodieren (die Signaltransduktoren P_{II}, GlnK1 und GlnK2, das Schlüsselprotein der Ammoniumassimilation, die Glutamin-Synthetase GlnA und die Proteine des Ammoniumtransport-Systems AmtB1 und AmtB2), wurden identifiziert, isoliert, und partiell charakterisiert. Es wurden molekularbiologische, physiologische und biochemische Methoden verwendet, um die Rolle und Funktionen der entsprechenden Gene bzw. Proteine zu klären. Eine mögliche Funktion des P_{II}-Proteins von *A. diazotrophicus* in der Regulation der N₂-Fixierung ist in der Abb. 60 (S. 150) dargestellt.

Aus Ergebnissen dieser Arbeit folgt, dass das P_{II}-Protein möglicherweise an der Inhibierung der *nifA*-Expression in Gegenwart hoher Konzentrationen des gebundenen Stickstoffs über einen noch nicht identifizierten Faktor beteiligt ist. In diesem Modell sind die Proteine GlnK1 und GlnK2 nicht berücksichtigt.

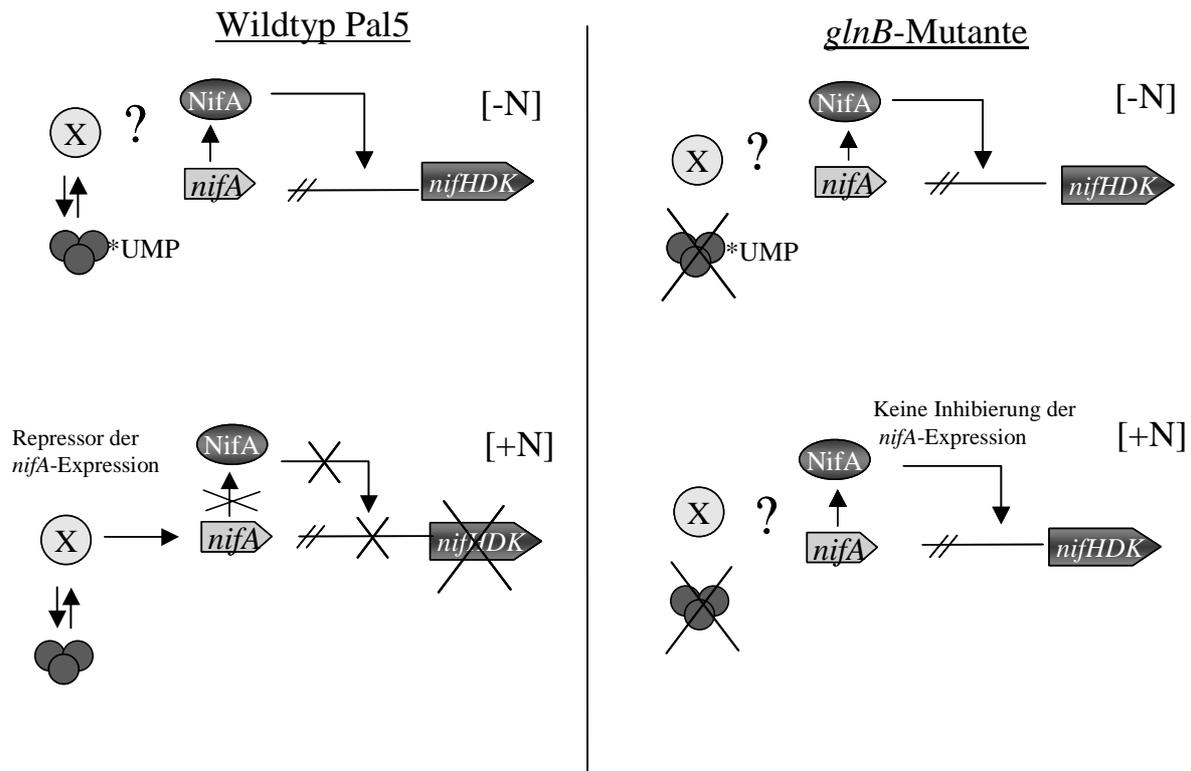


Abb. 60. Schematische Darstellung möglicher Funktion des P_{II}-Proteins von *A. diazotrophicus* an der Regulation der N₂-Fixierung in diesem Organismus. Das P_{II}-Protein ist als Trimer dargestellt; *nifA* - Gen für den Transkriptionsaktivator NifA; *nifHDK* – Strukturgene der Nitrogenase; X – unbekannter Faktor, der an der N-abhängigen Regulation der *nifA*-Transkription beteiligt ist.

Um die Regulationskaskaden, die von P_{II}-Proteinen beeinflusst werden, zu finden und genauer aufzuklären, sollte der Einfluss der unterschiedlichen Stimuli wie Ammonium, Glutamin, NAD, α -Ketoglutarat u. a. sowie der *glnD*-Mutation auf die Modifikation jedes einzelnen P_{II}-Paralogen mittels *in vitro* Uridylylierung untersucht werden. Es soll im weiteren untersucht werden, wie die einzelnen P_{II}-Proteine die Glutamin-Synthetase-Aktivität in Abhängigkeit von Ammoniumkonzentrationen modulieren.

Die Messung der Methylammonium-Aufnahme sollte, sobald eine *amtB*₂-Mutante vorliegt, die physiologische Rolle der AmtB-Proteine in *A. diazotrophicus* klären. Die Untersuchungen der Methylammonium-Aufnahme sollten in Nif⁻-Mutanten durchgeführt werden. Die Infektion der Zuckerrohr-Pflanzen mit den Mutanten sollte eine Antwort darauf geben, ob den P_{II}-Proteinen eine Rolle in der endophytischen Assoziation und assoziativen Stickstofffixierung zugewiesen werden kann. Diese weitere Untersuchungen der Regulation der *nif*-Expression in *A. diazotrophicus* sind für die Studien mit dem Schwerpunkt über die Übertragbarkeit der assoziativen BNF, von der die Zuckerrohr-Pflanzen profitieren, auf andere wirtschaftlich bedeutsame Pflanzen wichtig.

F. Literaturverzeichnis

- Agron, P. G.**, Ditta, G. S. & Helinski, D. R. (1993). Oxygen regulation of *nifA* transcription *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3506-3510.
- Almassy, R. J.**, Janson, C. A., Hamlin, R., Xuong, N. H. & Eisenberg, D. (1986). Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* **323**: 304-309.
- Altschul, S. F.**, Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, Z., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Alvarez, B.** & Martinez-Drets, G. (1995). Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* **48**: 918-924.
- Amar, M.**, Patriarca, E. J., Manco, G., Bernard, P., Riccio, A., Lamberti, A., Defez, R. & Iaccarino, M. (1994). Regulation of nitrogen metabolism is altered in a *glnB* mutant strain of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **11**: 685-693.
- Arcondeguy, T.**, Huez, I., Fourment, J. & Kahn, D. (1996). Symbiotic nitrogen fixation does not require adenylation of glutamine synthetase I in *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**: 33-40.
- Arcondeguy, T.**, Huez, I., Tillard, P., Gangneux, C., de Billy, F., Gojon, A., Truchet, G. & Kahn, D. (1997). The *Rhizobium meliloti* PII protein, which controls bacterial nitrogen metabolism, affects alfalfa nodule development. *Genes Dev.* **11**: 1194-1206.
- Arcondeguy, T.**, van Heeswijk, W. C. & Merrick, M. (1999). Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. *FEMS Microbiol Lett* **180**: 263-70.
- Arcondeguy, T.**, Lawson, D. & Merrick, M. (2000). Two residues in the T-loop of *Klebsiella pneumoniae* GlnK determine NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**: 38452-38456
- Arnold, W.** & Pühler, A. (1988). A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* **70**:171-179.
- Arsene, F.**, Kaminski, P. & 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.
- Atkinson, M. R.** & Ninfa, A. J. (1998). Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **29**: 431-447.
- Atkinson, M. R.** & Ninfa, A. J. (1999). Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**: 301-313.

-
- Austin, S.**, Buck, M., Cannon, W., Eydmann, T. & Dixon, R. (1994). Purification and *in vitro* activities of native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL.
J. Bacteriol. **176**: 3460-3465.
- Austin, S.**, Henderson, N. & Dixon, R. (1990). Characterisation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NifA and NifL *in vitro*.
Eur. J. Biochem. **187**: 353-360.
- Barnes, E. M., Jr.**, Zimniak, P. & Jayakumar, A. (1983). Role of glutamine synthetase in the uptake and metabolism of methylammonium by *Azotobacter vinelandii*.
J. Bacteriol. **156**: 752-7.
- Bauer, E.**, Kaspar, T., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (1998). Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator RegR.
J. Bacteriol. **180**: 15.
- Baumgarth, B.** (1999). Identifizierung und molekularbiologische Charakterisierung der Gene *nrfA* und *ntrX* aus *Acetobacter diazotrophicus*.
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Gentechnologie der Universität Bielefeld.
- Becker, A.**, Schmidt, M., Jäger, W. & Pühler, A. (1995). New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcription fusions.
Gene **162**: 37-39.
- Bender, R. A.**, Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F. & Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*.
J. Bacteriol. **129**: 1001-1009.
- Benelli, E.**, Buck, M., Moore, M., Harper, A., Souza, E. M., Funayama, S., Rigo, L. U. & Pedrosa, F. O. (1998). Purification and characterization of the PII protein from *H. seropedicae*.
In: Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W.E. (ed.) Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 38, p. 167. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Benelli, E.**, Souza, E. M., Funayama, S., Rigo, L. & Pedrosa, F. (1997). Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*.
J. Bacteriol. **179**: 4623-4626.
- Berger, D. K.**, Narberhaus, F. & Kustu, S. (1994). The isolated catalytic domain of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription *in vitro*: activation is inhibited by NifL.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 103-107.
- Birnboim, H. C.** & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1523.
- Boddey, R. M.**, Urquiaga, S., Reis, V. & Dobereiner, J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane.
Plant and Soil **137**: 111-117.
- Borghese, R.** & Wall, J. D. (1995). Regulation of the *glnBA* operon of *Rhodobacter capsulatus*.
J. Bacteriol. **177**: 4549-52.
- Boussiba, S.**, Dilling, W. & Gibson, J. (1984). Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2.
J. Bacteriol. **160**: 204-10.

- Bozouklian, H.** & Elmerich, C. (1986). Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene.
Biochimie **68**: 1181-1187.
- Brown, M. S.**, Segal, A. & Stadtman, E. R. (1971). Modulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation is mediated by metabolic transformation of the PII - regulatory protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**: 2949-2953.
- Buck, M.**, Cannon, W. & Woodcock, J. (1987). Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter.
Nucleic Acids Res. **17**: 2597-2611.
- Buck, M.**, Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. & Gralla, J. D. (2000). The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor.
J. Bacteriol. **182**: 4129-36.
- Buck, M.**, Miller, S., Drummond, M. & Dixon, R. (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes.
Nature **320**: 374-378.
- Bullock, W. C.**, Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection.
Biotechniques **5**: 376-379.
- Burris, R. H.**, Hartmann, A., Zhang, Y. & Fu, H. (1991). Control of nitrogenase in *Azospirillum* sp.
Plant and Soil **137**: 127-134.
- Cannon, W.**, Austin, S., Moore, M. & Buck, M. (1995). Identification of close contacts between the σ^N (σ^{54}) protein and promoter DNA in closed promoter complexes.
Nucleic Acids Res. **23**: 351-356.
- Cavalcante, V. A.** & Döbereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane.
Plant and Soil **108**: 23-31.
- Cheah, E.**, Carr, P. D., Suffolk, P. M., Vasudevan, S. G., Dixon, N. E. & Ollis, D. L. (1994). Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII.
Structure **2**: 981-90.
- Chiurazzi, M.**, Meza, R., Lara, M., Lahm, A., Defez, R., Iaccarino, M. & Espin, G. (1992). The *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III.
Gene **119**: 1-8.
- Colonna-Romano, S.**, Patriarca, E. J., Amar, M., Bernard, P., Manco, G., Lamberti, A., Iaccarino, M. & Defez, R. (1993). Uridylylation of the PII protein in *Rhizobium leguminosarum*.
FEBS Lett. **330**: 95-98.
- Colonna-Romano, S.**, Riccio, A., Guida, M., Defez, R., Lamberti, A., Iaccarino, M., Arnold, W., Prierer, U. & Pühler, A. (1987). Tight linkage of *glnA* and a putative regulatory gene in *Rhizobium leguminosarum*.
Nucleic Acids Res. **15**: 1951-1964.

- Contreras, A.**, Drummond, M., Bali, A., Blanco, G., Garcia, E., Bush, G., Kennedy, C. & Merrick, M. (1991). The product of the nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria.
J. Bacteriol. **173**: 7741-7749.
- Cordts, M. L.** & Gibson, J. (1987). Ammonium and methylammonium transport in *Rhodobacter sphaeroides*.
J. Bacteriol. **169**: 1632-1638.
- Costacurta, A.** & Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria.
Crit. Rev. Microbiol. **21**: 1-18.
- Cullen, P. J.**, Foster-Hartnett, D., Gabbert, K. K. & Kranz, R. G. (1994). Structure and expression of the alternative sigma factor, RpoN, in *Rhodobacter capsulatus*; physiological relevance of an autoactivated *nifU2-rpoN* superoperon.
Mol. Microbiol. **11**: 51-65.
- de Bruijn, F. J.**, Rossbach, S., Schneider, M., Ratet, P., Messmer, S., Szeto, W. W., Ausubel, F. M. & Schell, J. (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation.
J. Bacteriol. **171**: 1673-1682.
- de Mel, V. S.**, Kamberov, E. S., Martin, P. D., Zhang, J., Ninfa, A. J. & Edwards, B. F. (1994). Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **243**: 796-798.
- de Zamaroczy, M.** (1998). Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions.
Mol. Microbiol. **29**: 449-463.
- de Zamaroczy, M.**, Delorme, F. & Elmerich, C. (1990). Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*.
Mol. Gen. Genet. **224**: 421-430.
- de Zamaroczy, M.**, Paquelin, A. & Elmerich, C. (1993). Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*.
J. Bacteriol. **175**: 2507-2515.
- de Zamaroczy, M.**, Paquelin, A., Peltre, G., Forchhammer, K. & Elmerich, C. (1996). Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*.
J. Bacteriol. **178**: 4143-4149.
- Debelle, F.**, Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E., Denarie, J. & Truchet, G. (1986). Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol. **168**: 1075-1086.
- Ditta, G.**, Virts, E., Palomeras, A. & Kim, C. H. (1987). The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated.
J. Bacteriol. **169**: 3217-3223.

- Dixon, R.** (1984). Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene.
Nucleic Acids Res. **12**: 7811-7830.
- Dixon, R.** (1998). The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in γ -Proteobacteria.
Arch. Microbiol. **169**: 371-380.
- Döbereiner, J.** (1961). Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* derx in the rhizosphere of sugar cane.
Plant and Soil, **XV**: 211-216.
- Döbereiner, J.** (1992). History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants.
Symbiosis **13**: 1-13.
- Dong, Z., Canny, M., McCully, M., Roboredo, M., Cabadilla, C., Ortega, E. & Rodes, R.** (1994). A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast.
Plant Physiol. **105**: 1139-1147.
- Dong, Z., Hedrich, M., Bernard, K. & McCully, M.** (1995). Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*.
Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1843-1846.
- Dong, Z., McCully, M. & Canny, M.** (1997). Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data.
Annals of Botany (London) **80**: 147-158.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F. J. & Schell, J.** (1989). The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium.
Mol. Gen. Genet. **219**: 89-96.
- Dusha, I. & Kondorosi, A.** (1993). Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*.
Mol. Gen. Genet. **240**: 435-444.
- Eckhardt, T.** (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria.
Plasmid **1**: 584-588.
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. U. & Rotstein, S. H.** (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases.
Biochim. Biophys. Acta **1477**: 122-145.
- Engleman, E. G. & Francis, S. H.** (1978). Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade.
Arch. Biochem. Biophys. **191**: 602-612.
- Fischer, H. M.** (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia.
Microbiol. Rev. **58**: 352-386.
- Fischer, H. M., Babst, M., Kaspar, T., Acuna, G., Arigoni, F. & Hennecke, H.** (1993). One member of a *groESL*-like chaperonin multigen family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes.
EMBO J. **5**: 1165-1173.

- Flores-Encarnacion, M.**, Contreras-Zentella, M., Soto-Urzuza, L., Aguilar, G. R., Baca, B. E. & Escamilla, J. E. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* **181**: 6987-95.
- Förster, B.**, Maner, K., Fassbinder, F. & Oelze, J. (1999). Reversible inactivation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* strain W107I deleted in the *draTG* gene region. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 167-171.
- Forchhammer, K.** & Hedler, A. (1997). Phosphoprotein PII from cyanobacteria - analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **244**: 869-875.
- Forchhammer, K.** & Tandeau de Marsac, N. (1994). The PII 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.** & Tandeau de Marsac, N. (1995a). Functional analysis of the phosphoprotein PII (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **177**: 2033-2040.
- Forchhammer, K.** & Tandeau de Marsac, N. (1995b). Phosphorylation of the PII protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of *in vitro* kinase activity. *J. Bacteriol.* **177**: 5812-5817.
- Foster-Hartnett, D.** & Kranz, R. G. (1994). The *Rhodobacter capsulatus glnB* gene is regulated by NtrC at tandem *rpoN*-independent promoters. *J. Bacteriol.* **176**: 5171-5176.
- Frischauf, A.-M.**, Lehrach, H., Poustka, A. & Murray, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.
- Fu, H. A.**, Fitzmaurice, W. P., Roberts, G. P. & Burris, R. H. (1990). Cloning and expression of *draTG* genes from *Azospirillum lipoferum*. *Gene* **86**: 95-98.
- Fu, H. A.**, Hartmann, A., Lowery, R. G., Fitzmaurice, W. P., Roberts, G. P. & Burris, R. H. (1989). Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* **171**: 4679-4685.
- Fuentes-Ramirez, L.**, Jimenez Salgado, T., Abarca Ocampo, I. & Caballero Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* **154**: 145-150.
- Garcia, E.** & Rhee, S. G. (1983). Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. *J. Biol. Chem.* **258**: 2246-2253.
- Georgiadis, M. M.**, Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J. & Rees, D. C. (1992). Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**, 1653-9.

- Gillis, M.**, Kerters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Döbereiner, J. & De Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 361-364.
- Gussin, G. N.**, Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986). Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 567-591.
- Hackette, S. L.**, Skye, G. E., Burton, C. & Segel, I. H. (1970). Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium-¹⁴C as the substrate. *J. Biol. Chem.* **245**: 4241-4250.
- Hanson, T. E.**, Forchhammer, K., Tandeau de Marsac, N. & Meeks, J. C. (1998). Characterization of the *glnB* gene product of *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133: *glnB* or the PII protein may be essential. *Microbiology* **144**: 1537-1547.
- Hartmann, A.**, Fu, H. & Burris, R. H. (1988). Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 87-93.
- Henikoff, S.** (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**: 351-359.
- Holmes, D. S.** & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193.
- Holtel, A.** & Merrick, M. (1988). Identification of the *Klebsiella pneumoniae glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 134-138.
- Holtel, A.** & Merrick, M. J. (1989). The *Klebsiella pneumoniae* PII protein (*glnB* gene product) is not absolutely required for nitrogen regulation and is not involved in NifL- mediated *nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 474-480.
- Hopwood, D. A.**, Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. & Schrempf, H. (1985). Genetic manipulations of *Streptomyces*: A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Howitt, S. M.** & Udvardi, M. K. (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 152-70.
- Hsieh, M. H.**, Lam, H. M., van de Loo, F. J. & Coruzzi, G. (1998). A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13965-13970.
- Hubner, P.**, Willison, J. C., Vignais, P. M. & Bickle, T. A. (1991). Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173**: 2993-2999.
- Hurek, T.** & Reinhold-Hurek, B. (1995). Identification of grass-associated and toluene-degrading diazotrophs, *Azoarcus* spp., by analyses of partial 16S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2257-2261.

-
- Inoue, A.**, Shigematsu, T., Hidaka, M., Masaki, H. & Uozumi, T. (1996). Cloning, sequencing and transcriptional regulation of the *draT* and *draG* genes of *Azospirillum lipoferum* FS.
Gene **170**: 101-106.
- Jack, R.**, de Zamaroczy, M. & Merrick, M. (1999). The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*.
J. Bacteriol. **181**: 1156-1162.
- Jaggi, R.**, Ybarlucea, W., Cheah, E., Carr, P. D., Edwards, K. J., Ollis, D. L. & Vasudevan, S. G. (1996). The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*.
FEBS Lett. **391**: 223-228.
- Jiang, P.** & Ninfa, A. J. (1999). Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein.
J. Bacteriol. **181**: 1906-1911.
- Jiang, P.**, Peliska, J. A. & 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 PII protein.
Biochemistry **37**: 12782-12794.
- Jiang, P.**, Peliska, J. A. & 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. & Ninfa, A. J. (1998c). The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state.
Biochemistry **37**: 12802-12810.
- Jiang, P.**, Zucker, P., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., Tirasophon, W., Chandran, P., Schefke, B. R. & Ninfa, A. J. (1997). Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors.
J. Bacteriol. **179**: 4342-4353.
- Jimenez Salgado, T.**, Fuentes-Ramirez, L. E., Tapia Hernandez, A., Mascarua Esparza, M. A., Martinez Romero, E. & Caballero Mellado, J. (1997). *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria.
Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3676-3683.
- Johansson, M.** & Nordlund, S. (1996). Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*.
Microbiology **142**: 1265-1272.
- Johansson, M.** & Nordlund, S. (1997). Uridylylation of the P(II) protein in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*.
J. Bacteriol. **179**: 4190-4194.
- Kamberov, E. S.**, Atkinson, M. R. & Ninfa, A. J. (1995). The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP.
J. Biol. Chem. **270**: 17797-17807.

- Kaminski, P. A.**, Desnoues, N. & Elmerich, C. (1994). The expression of *nifA* in *Azorhizobium caulinodans* requires a gene product homologous to *Escherichia coli* HF-I, an RNA-binding protein involved in the replication of phage Q beta RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 4663-4667.
- Kaminski, P. A.** & Elmerich, C. (1998). The control of *Azorhizobium caulinodans nifA* expression by oxygen, ammonia and by the HFI-like protein, NrfA.
Mol. Microbiol. **28**: 603-613.
- Karg, T.** & Reinhold-Hurek, B. (1996). Global changes in protein composition of N₂-fixing-*Azoarcus* sp. strain BH72 upon diazosome formation.
J. Bacteriol. **178**: 5748-5754.
- Kennedy, C.**, Lee, S., Sevilla, M., Meletzus, D., Gunapala, N., Gardiol, A. and Davidson, S. (2000). Analysis of genes for nitrogen fixation and studies of plant growth enhancement in the diazotrophic endophyte of sugarcane, *Acetobacter diazotrophicus*.
In: Pedrosa, F. O., Hungria, M., Yates, G., Newton, W. E. (ed.) Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 38, pp. 401-404. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Keuntje, B.**, Masepohl, B. & Klipp, W. (1995). Expression of the *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein.
J. Bacteriol. **177**: 6432-6439.
- Kim, I. H.**, Kwak, S. J., Kang, J. & Park, S. C. (1998). Transcriptional control of the *glnD* gene is not dependent on nitrogen availability in *Escherichia coli*.
Mol Cells **8**: 483-90.
- Kim, J.** & Rees, D. C. (1992). Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein.
Science **257**: 1677-82.
- Kirchhof, G.**, Baldani, J. I., Reis, V. M. & Hartmann, A. (1998). Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues.
Can. J. Microbiol. **44**: 12-19.
- Kirchhof, G.**, Schloter, M., Amus, B. & Hartmann, A. (1997). Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes.
Soil Biol. Biochem. **29**: 853-862.
- Kleiner, D.** & Castorph, H. (1982). Inhibition of ammonium (methylammonium) transport in *Klebsiella pneumoniae* by glutamine and glutamine analogues.
FEBS Lett. **146**: 201-3.
- Kranz, R. G.**, Pace, V. M. & Caldicott, I. M. (1992). Inactivation, Sequence, and *lacZ* fusion analysis of a regulatory locus Required for repression of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*.
J. Bacteriol. **172**: 53-62.
- Kyte, J.** & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.
J. Mol. Biol. **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685.

- Lee, S.**, Sevilla, M., Meletzus, D., Teixeira, K., De Oliveira, A., Perlova, O., Nawroth, R., Baldani, I. & Kennedy, C. (1998). Analysis of nitrogen fixation and regulatory genes in the sugarcane endophyte *Acetobacter diazotrophicus*.
In: Malik, K. A., Mirza, M. S., Ladha, K. (ed.) Nitrogen Fixation with Non-legumes, pp. 11-19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lee, S.**, Sevilla, M., Reth, A., Meletzus, D., Gunapala, N. & Kennedy, C. (2000). Characterization of Nitrogen Fixation Genes and Plant Growth-Promoting Properties in *Acetobacter diazotrophicus*, an Endophyte of Sugarcane.
In: Stasey, G., Keen, N. T. (ed.) Plant-Microbe Interactions, Vol. 5, pp. 297-314. APS PRESS, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Leinhos, V.** & Vacek, O. (1994). Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat and rye.
Microbiol. Res. **109**: 31-35.
- Li, R. P.** & Macrae, I. C. (1991). Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane.
Soil Biol. Biochem. **23**: 999-1002.
- Liang, Y. Y.**, Arsene, F. & Elmerich, C. (1993). Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity.
Mol. Gen. Genet. **240**: 188-96.
- Liang, Y. Y.**, de Zamaroczy, M., Arsene, F., Paquelin, A. & Elmerich, C. (1992). Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products.
FEMS Microbiol. Lett. **79**: 113-9.
- Lima, E.**, Boddey, R. M. & Döbereiner, J. (1987). Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using ¹⁵N-aided nitrogen balance.
Soil Biol. Biochem. **19**: 165-170.
- Liotenberg, S.**, Campbell, D., Castets, A.-M., Houmard, J. & de Marsac, N. T. (1996). Modification of the PII protein in response to carbon and nitrogen availability in filamentous heterocystous cyanobacteria.
FEMS Microbiology Letters **144**: 185-190.
- Maniatis, T. E.**, Fritsch, F. & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marini, A.-M.**, Vissers, S., Urrestarazu, A. & Andre, B. (1994). Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO J. **13**: 3456-3463.
- Marini, A.-M.**, Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. & André, B. (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **17**: 4282-4293.
- Martin, D.** & Reinhold-Hurek, B. (1998). Identification and molecular analysis of multiple *GlnB* homologues in *Azoarcus* sp. BH72.
In: Elmerich, C., Kondoroski, A., Newton, W.E. (ed.) Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 31 p. 405. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Martin, G.** & Chelm, B. (1988). Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene.
J. Bacteriol. **170**: 5452-5459.
- Martin, G. B.**, Thomashow, M. F. & Chelm, B. K. (1989). *Bradyrhizobium japonicum glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters.
J. Bacteriol. **171**: 5638-5645.
- Martin, D. E.**, Hurek, T. & Reinhold-Hurek, B. (2000). Occurrence of three PII-like signal transmitter proteins in the diazotrophic proteobacterium *Azoarcus* sp. BH72.
Mol. Microbiol. **38**: 276-88.
- Masepohl, B.**, Krey, R. & Klipp, W. (1993). The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase.
J Gen Microbiol **139**: 2667-75.
- Meletzus, D.** (1988). Isolation und partielle Charakterisierung der Plasmide pCM2 und pCM3 aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 .
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Gentechnologie der Universität Bielefeld
- Meletzus, D.** & Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector.
J. Bacteriol. **173**: 184-190.
- Meletzus, D.**, Rudnick, P., Doetsch, N., Green, A. & Kennedy, C. (1998). Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*.
J. Bacteriol. **180**: 3260-3264.
- Merrick, M. J.** (1992). Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J. (ed.) Biological nitrogen fixation, pp. 835-876. Chapman & Hall, New York.
- Merrick, M. J.** (1993). In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N).
Mol. Microbiol. **10**: 903-909.
- Merrick, M. J.** & Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria.
Microbiol. Rev. **59**: 604-622.
- Metcalf, W. W.** & Wanner, B. L. (1993). Construction of new b-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement.
Gene **129**: 17-25.
- Michel-Reydellet, N.**, Desnoues, N., de Zamaroczy, M., Elmerich, C. & Kaminski, P. A. (1998). Characterisation of the *glnK-amtB* operon and the involvement of AmtB in methylammonium uptake in *Azorhizobium caulinodans*.
Mol. Gen. Genet. **258**: 671-677.
- Michel-Reydellet, N.**, Desnoues, N., Elmerich, C. & Kaminski, P. A. (1997). Characterization of *Azorhizobium caulinodans glnB* and *glnA* genes: involvement of the P(II) protein in symbiotic nitrogen fixation.
J. Bacteriol. **179**: 3580-3587.
- Michel-Reydellet, N.** & Kaminski, P. A. (1999). *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation.
J. Bacteriol. **181**: 2655-2658.

- Milcamps, A.**, Van Dommelen, A., Stigter, J., Vanderleyden, J. & de Bruijn, F. J. (1996). The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis.
Can. J. Microbiol. **42**: 467-478.
- Miranda-Rios, J.**, Sanchez-Pescador, R., Urdea, M. & Covarrubias, A. A. (1987). The complete nucleotide sequence of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* K12.
Nucleic Acids Res. **15**: 2757-2770.
- Monteiro, R. A.**, Souza, E. M., Funayama, S., Yates, M. G., Pedrosa, F. O. & Chubatsu, L. S. (1999a). Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*.
FEBS Lett. **447**: 283-286.
- Monteiro, R. A.**, Souza, E. M., Yates, M. G., Pedrosa, F. O. & Chubatsu, L. S. (1999b). In *trans* regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain.
FEMS Microbiol. Lett. **180**: 157-161.
- Moore, R. A.** & Gordon, J. K. (1984). Metabolism of methylammonium by *Azotobacter vinelandii*.
Arch Microbiol **140**: 193-197.
- Moreno-Vivian, C.**, Soler, G. & Castillo, F. (1992). Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. Purification and properties of arginase .
Eur. J. Biochem. **204**: 531-537.
- Morett, E.** & Buck, M. (1989). In vivo studies of σ^{54} -RNA Polymerase with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters: the role of NifA in the formation of an open promoter complex.
J. Mol. Biol. **210**: 65-77.
- Morett, E.**, Cannon, W. & Buck, M. (1988). The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA.
Nucleic Acids Res. **16**: 11469-11488.
- Nawroth, R.** (2000). Identifizierung und molekularbiologische Charakterisierung des Gens *glnD* aus *Acetobacter diazotrophicus*.
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Gentechnologie der Universität Bielefeld .
- Niehaus, K.**, Kapp, D. & Pühler, A. (1993). Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant.
Planta **190**: 415-425.
- Nienaber, A.**, Huber, A., Gottfert, M., Hennecke, H. & Fischer, H. M. (2000). Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization.
J. Bacteriol. **182**: 1472-1480.
- Ninfa, A. J.** & Atkinson, M. R. (2000). PII signal transduction proteins.
Trends Microbiol. **8**: 172-179.
- Ninnemann, O.**, Jauniaux, J. C. & Frommer, W. B. (1994). Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants.
EMBO J. **13**: 3464-3471.

- Nohno, T.** & Saito, T. (1987). Two transcriptional start sites found in the promoter region of *Escherichia coli* glutamine permease operon, *glnHPQ*.
Nucleic Acids Res. **15**: 2777.
- Paschen, A.** (1997). Regulation der Stickstoffixierung in dem phototrophen Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*: Charakterisierung der Ammonium-Repression der NifA-abhängigen Transkriptionsaktivierung.
Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld .
- Patriarca, E. J.**, Chiurazzi, M., Manco, G., Riccio, A., Lamberti, A., De Paolis, A., Rossi, M., Defez, R. & Iaccarino, M. (1992). Activation of the *Rhizobium leguminosarum glnII* gene by NtrC is dependent on upstream DNA sequences.
Mol. Gen. Genet. **234**: 337-345.
- Patriarca, E. J.**, Merrick, M. J. & Iaccarino, M. (1998). Down-regulation of the *Rhizobium* Ntr regulatory system: a mechanism to uncouple nitrogen fixation and assimilation in bacteroids.
In: Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W.E. (ed.) Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 31 p. 119. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Paula, M. A.**, Reis, V. M. & Döbereiner, J. (1991). Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*).
Biol. Fertil. Soils, **11**: 111-115.
- Pawlowski, K.**, Klosse, U. & de Bruijn, F. J. (1991). Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism.
Mol. Gen. Genet. **231**: 124-138.
- Peters, J. W.**, Fisher, K. & Dean, D. (1995). Nitrogenase structure and function: A Biochemical-Genetic Perspective.
Annu. Rev. Microbiol. **49**: 335-366.
- Pierrard, J.**, Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1993). Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium.
J. Bacteriol. **175**: 1358-1366.
- Purich, D. L.** (1998). Advances in the enzymology of glutamine synthesis.
Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. **72**: 9-42.
- Qian, Y.** & Tabita, F. R. (1998). Expression of *glnB* and a *glnB*-like gene (*glnK*) in a ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*.
J. Bacteriol. **180**: 4644-4649.
- Rees, D. C.**, Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J., Peters, J. W., Seefeldt, L. C. & Howard, J. B. (1998). Complex structures of nitrogenase.
In: Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W.E. (ed.) Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 31 pp. 11-16. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Reinhold-Hurek, B.** & Hurek, T. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes.
Trends. Microbiol. **6**: 139-144.

-
- Reis, V. M.**, Olivares, F. L. & Döbereiner, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat.
World J. Microbiol. Biotechnol. **10**: 401-405.
- Reitzer, L. J.** & Magasanik, B. (1986). Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter.
Cell **45**: 785-792.
- Reth, A.** (2000). Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung des *modABCcrpN*-Operons aus *Acetobacter diazotrophicus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Gentechnologie der Universität Bielefeld.
- Rhee, S. G.**, Chock, P. B. & Stadtman, E. R. (1985a). Glutamine synthetase from *Escherichia coli*.
Methods Enzymol. **113**: 213-241.
- Rhee, S. G.**, Chock, P. B. & Stadtman, E. R. (1989). Regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase.
Adv. Enzymol. **62**: 37-92.
- Rhee, S. G.**, Park, S. C. & Koo, J. H. (1985b). The role of adenylyltransferase and uridylyltransferase in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*.
Curr. Top. Cell Regul. **27**: 221-232.
- Rudnick, P.**, Meletzus, D., Green, A., He, L. & Kennedy, C. (1997). Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria.
Soil Biol. Biochem. **29**: 831-841.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F.**, Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- Santero, E.**, Toukdarian, A., Humphrey, R. & Kennedy, C. (1988). Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions, *nifA* and *nfrX*, in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*.
Mol. Microbiol. **2**: 303-314.
- Schlüter, A.**, Nöhlen, M., Krämer, M., Defez, R. & Priefer, U. B. (2000). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* *glnD* gene, encoding a uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for the nitrogen fixation.
Microbiology **146**: 2987-2996
- Schmitz, G.**, Durre, P., Mullenbach, G. & Ames, G. F. (1987). Nitrogen regulation of transport operons: analysis of promoters *argT* and *dhuA*.
Mol. Gen. Genet. **209**: 403-7.
- Seefeldt, L. C.**, Ryle, M. J., Chan, J. M. & Lanzilotta, W. N. (1998). Nucleotide hydrolysis and electron transfer reactions in nitrogenase catalysis.
In: Elmerich, C., Kondorosí, A., Newton, W.E. (ed.) Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 31 pp. 39-42. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sevilla, M.**, Meletzus, D., Teixeira, K., Lee, S., Nutakki, A., Baldani, I. & Kennedy, C. (1997). Analysis of NIF and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*.
Soil Biol. Biochem. **29**: 871-874.

- Shapiro, B. M.** & Stadtman, E. R. (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* **17**: 910-922.
- Sibold, L.**, Henriquet, M., Possot, O. & Aubert, J. P. (1991). Nucleotide sequence of *nifH* regions from *Methanobacterium ivanovii* and *Methanosarcina barkeri* 227 and characterization of *glnB*-like genes. *Res. Microbiol* **142**: 5-12.
- Sievers, M.**, Ludwig, W. & Teuber, M. (1994). Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodospila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 189-196.
- Siewe, R. M.**, Weil, B., Burkovski, A., Eikmanns, B. J., Eikmanns, M. & Kramer, R. (1996). Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **271**: 5398-5403.
- Simon, R.**, O'Connell, M., Labes, M. & Pühler, A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**: 640-659.
- Simon, R.**, Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-794.
- Soliman, A.** & Nordlund, S. (1989). Purification and partial characterization of glutamine synthetase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **994**: 138-141.
- Son, H. S.** & Rhee, S. G. (1987). Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. *J. Biol. Chem.* **262**: 8690-8695.
- Sonnhammer, E. L. L.**, von Heijne, G. & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: Glasgow, L., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D., Sensen, D. (ed.) Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 175-182. Menlo Park, CA: AAAI Press.
- Soupe, E.**, He, L., Yan, D. & Kustu, S. (1998). Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7030-7034.
- Souza, E. M.**, Pedrosa, F. O., Drummond, M., Rigo, L. U. & Yates, M. G. (1999). Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. *J. Bacteriol.* **181**: 681-4.
- Souza, E. M.**, Pedrosa, F. O., Machado, H. B., Drummond, M. & Yates, M. G. (1995). The N-terminus of the NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* is probably involved in sensing of ammonia. In: Tikhonovich, I. A., Provorov, N. A., Romanov, V. I., Newton, W. E. (ed.) Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications, pp. 260. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Steenhoudt, O.** & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 487-506.

- Stephan, M. P.**, Oliveira, M., Teixeira, K. R. S., Martinez-Drets, G. & Döbereiner, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 70-72.
- Stevenson, R.** & Silver, S. (1977). Methylammonium uptake by *Escherichia coli*: evidence for a bacterial NH_4^+ transport system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 1133-9.
- Swings, J.** (1992). The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Schleifer, K. H. (ed.) The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd Ed., Vol. 3, pp. 2268-2286. Springer-Verlag, New York.
- Tate, R.**, Cermola, M., Riccio, A., Iaccarino, M., Merrick, M., Favre, R. & Patriarca, E. J. (1999). Ectopic expression of the *Rhizobium etli amtB* gene affects the symbiosome differentiation process and nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 515-525.
- Tate, R.**, Riccio, A., Merrick, M. & Patriarca, E. J. (1998). The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH_4^+ transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 188-198.
- Teixeira, K. R. S.**, Wülling, M., Morgan, T., Galler, R., Zellermann, E.-M., Baldani, J. I., Kennedy, C. & Meletzus, D. (1999). Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 301-309.
- Thomas, G.**, Coutts, G. & Merrick, M. (2000a). The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet.* **16**: 11-14.
- Thomas, G. H.**, Mullins, J. G. & Merrick, M. (2000b). Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol. Microbiol.* **37**: 331-344.
- Toukdarian, A.**, Saunders, G., Selman-Sosa, G., Santero, E., Woodley, P. & Kennedy, C. (1990). Molecular analysis of the *Azotobacter vinelandii glnA* gene encoding glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* **172**: 6529-6539.
- Tusnányi, G. E.** & Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Applications to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**: 489-506.
- Udvardi, M. K.** & Day, D. A. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 493-523.
- Ureta, A.**, Alvarez, B., Ramon, A., Vera, M. & Martinez Drets, G. (1995). Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant and Soil* **172**: 271-277.

- Urquiaga, S.**, Cruz, K. H. S. & Boddey, R. (1992). Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **56**: 105-114.
- Van Dommelen, A.**, Keijers, V., Vanderleyden, J. & de Zamaroczy, M. (1998). (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **180**: 2652-2659.
- van Heeswijk, W.**, Kuppinger, O., Merrick, M. & Kahn, D. (1992). Localization of the *glnD* gene on a revised map of the 200-kilobase region of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 1702-1703.
- van Heeswijk, W. C.**, Hoving, S., Molenaar, D., Stegeman, B., Kahn, D. & Westerhoff, H. V. (1996). An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 133-146.
- van Heeswijk, W. C.**, Rabenberg, M., Westerhoff, H. V. & Kahn, D. (1993). The genes of the glutamine synthetase adenylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **9**: 443-57.
- van Heeswijk, W. C.**, Stegeman, B., Hoving, S., Molenaar, D., Kahn, D. & Westerhoff, H. V. (1995). An additional PII in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 153-157.
- Vanoni, M. A.** & Curti, B. (1999). Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 617-638.
- Wang, X. Y.**, Kolb, A., Cannon, W. & Buck, M. (1997). Nucleoprotein complex formation by the enhancer binding protein *nifA*. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3478-3485.
- Willis, R. C.**, Iwata, K. K. & Furlong, C. E. (1975). Regulation of Glutamine Transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122**: 1032-7.
- Woehle, D. L.**, Lueddecke, B. A. & Ludden, P. W. (1990). ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **265**: 13741-13749.
- Wray, L. V.**, Atkinson, M. R. & 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 PII protein. *J. Bacteriol.* **176**: 108-114.
- Wülling, M.** (1998). Molekularbiologische Analyse der Ammonium-abhängigen Expression des Transkriptionsaktivators NifA aus *Acetobacter diazotrophicus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Gentechnologie der Universität Bielefeld.
- Xu, Y.**, Cheah, E., Carr, P. D., van Heeswijk, W., Westerhoff, H. V., Vasudevan, S. G. & Ollis, D. (1998). GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J. Mol. Biol.* **282**: 149-165.
- Yamashita, M. M.**, Almasy, R. J., Janson, C. A., Cascio, D. & Eisenberg, D. (1989). Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **264**: 17681-17690.

-
- Yanisch-Perron, C.**, Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**: 103-119.
- Yoch, D. C.** & Pengra, R. M. (1966). Effect of amino acids on the nitrogenase system of *Klebsiella pneumoniae*.
J. Bacteriol. **92**: 618-622.
- Zhang, Y.**, Burris, R. H., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1993). Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*.
J. Bacteriol. **175**: 6781-6788.
- Zhang, Y.**, Burris, R. H., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1995a). Comparison studies of dinitrogenase reductase ADP-rybosyl transferase/dinitrogenase reductase activating glycohydrolase regulatory systems in *Rhodospirillum rubrum* and *Azospirillum brasilense*.
J. Bacteriol. **177**: 2354-2359.
- Zhang, Y.**, Burris, R. H., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1996). Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium.
J. Bacteriol. **178**: 2948-2953.
- Zhang, Y.**, Burris, R. H. & Roberts, G. P. (1992). Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*.
J. Bacteriol. **174**: 3364-3369.
- Zhang, Y.**, Cummings, A. D., Burris, R. H., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (1995b). Effect of an *nrBC* mutation on the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*.
J. Bacteriol. **177**: 5322-6.
- Zhang, Y.**, Pohlmann, E. L., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. (2000). Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*.
J. Bacteriol. **182**: 983-92.
- Zinchenko, V.**, Churin, Y., Shestopalov, V. & Shestakov, S. (1994). Nucleotide sequence and characterization of the *Rhodobacter sphaeroides glnB* and *glnA* genes.
Microbiology **140**: 2143-2151.
- Zumft, W. G.** & Castillo, F. (1978). Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*.
Arch. Microbiol. **117**: 53-60.

Eigene Publikationen

Meletzus, D., Teixeira, K., Perlova, O., Nawroth, R., Zeller, E., Morgan, T., Baldani, I. V., Kennedy, C. (1997): Characterization of genes involved in regulation of nitrogen fixation and ammonium sensing in *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W. E. (ed.) Biological nitrogen fixation for the 21st century. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 31 pp. 125-126, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Perlova, O., Nawroth, R., Meletzus, D. (1997): Identification and characterization of genes involved in the ammonium sensing mechanism in *Acetobacter diazotrophicus*. In: Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W. E. (ed.) Biological nitrogen fixation for the 21st century. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 31 p. 166, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Lee, S., Sevilla, M., Meletzus, D., Teixeira, K., De Oliveira, A., Perlova, O., Nawroth, R., Baldani, I. and Kennedy, C. (1998) Analysis of nitrogen fixation and regulatory genes in the sugarcane endophyte *Acetobacter diazotrophicus*. In Malik, K. A., Mirza, M. S. and Ladha, K. (ed.), Nitrogen Fixation with Non-legumes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 11-19.

Perlova, O., Ureta, A., Nordlund, S. and Meletzus, D. (1999). Identification and characterization of genes involved in the ammonium sensing mechanism in *Acetobacter diazotrophicus*. In: Pedrosa, F. O., Hungria, M., Yates, G., Newton, W. E. (ed.) Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 38, p. 137. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

In Vorbereitung

Perlova, O., Nawroth, R. and Meletzus, D. (2001). Isolation and molecular characterization of *Acetobacter diazotrophicus glnD* gene, encoding an uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme.

Perlova, O., Ureta, A., Nordlund, S. and Meletzus, D. (2001). Molecular analysis of the signal-transduction protein P_{II} (encoded by *glnB*) from *Acetobacter diazotrophicus*.

Anhang

Anhang I. Nukleotidsequenz (3681 bp) des *glnBA*-Fragments des Plasmids pOP26. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind unter der Nukleotidsequenz dargestellt (die des ORFs im Gegenstrang sind kursiv gezeichnet). Start- und Stopcodons sind fett gedruckt und schattiert. Potentielle Ribosomenbindungsstellen und Promotorsequenzen sind unterstrichen. Die Schnittstellen *EcoRI*, *BglII* und *SalI* sind als hellgraue Boxen gezeigt. „Inverted Repeats“ sind durch Pfeile gekennzeichnet. Potentielle Bindestelle des Transkriptionsregulators NtrC ist mit ***** gekennzeichnet.

TACCATAGAAGGCCGAGACCCGGAATCGCCGTGACCCGGCACCGTTTCGGTCAGGGCACGGCAGAACGCCAC 70
W L L G L G S D G H G P V T R D P C P L V G R

GTCGTCCCCCGCAAACCGGTCGAGCGGATATCCGCCACGATGAAATAGCTGCCGTGCACGGCAGCAGC 140
R G G R F R D L P Y G G R H F L Q R R V A A R

TCGAAGCCGGCGGCGCGCAGCCCGTCGGACAACAAGTCGCGCTTGGCCTGCATGTCGGCGGCAAGGGTGG 210
R L R R R A A R R V V L R A Q G A H R R C P H

TGAAATAATCCGTATCCTTGTCCAGCCCCACCGCGACCCGCGCGGCTGCAGGTTTCGGCGGCGTGGTGAAGG 280
H F L G Y G Q G A G G R G R P Q L N P P T T F T

TCAGAAGCTGGTGCGCCTTGGCGACGGTCGCGGCGATGGCGGCCGGCGCGGTGACATAGCCGACCTTCCA 350
L L Q H A K A V T A A I A A P A T V Y G V K W

TCCGGTCAGCGAGAAGCTCCTTGCCCGCGCTGCCGATGCGCACGCAACCGGGCGCATGCCCGGCAGGGTC 420
G T L S F S K G A S G I R V C R P R M G P L T

ATCAGCGGGATATGGCGCGCACCGCCGAATGTCAGGTGCTCGTACACCTCGTCACAGATCGCATAGACCT 490
M L P I H R A G G F T L H E Y V E D C I A Y V Q

GGTGGCGCGCCACCAGGTCGGCGATGAAGGCCAGTTCGTCCGGGCCGAAGACCTTGCCCGTCGGGTTTCAT 560
H R A V L D A I F A L E D P G F V K G T P N M

CGGGGAATTGAGCATGATTGCCTTGGTCCTGGGCCCCGAAAGCCGCCAGTTCGGCACGCGGCAGGGAC 630
P S N L M I A K T R P G F A A A L E A R P L S

CAGTCCGGCGGTGTGTCAGGCGCACCGGCCGCGCCACGGCACCCAGCGCGGGATCACCGGCAGGTAGGTGT 700
W D P P T L R V P R A V A G L A R I V P L Y T D

CATAGAGCGGTTCCAGCACACGACCTCATCCCCGGATCGACCATCGCCATCAGCGAGGCCGCCAGGGC 770
Y L P E L V V V E D G P D V M A M L S A A L A

CTCGGTCGCGCCGGAGGTCACGATCACCTCGGTGCGCCGGATCGACCGACAGGCCATAGAATCGCGCGTTC 840
E T A G S T V I V E T A P D V S L G Y F R A N

ANHANG I

TGTTGCCAAGGTATTCAGCCTGATCCAGGAACATTCCGTGGAAGCTGGTGGACCTGCGCTTCACGGACCCG 1960
V A K V F S L I Q E H S V E L V D L R F T D P

CGCGGCAAGTGGCACCACACCACGCAGCATATCTCGACGATCGAGCAGGACACGTTCCGCGACGGCTTCA 2030
R G K W H H T T Q H I S T I E Q D T F R D G F

TGTTGACGGATCGTCCATCGTCCGGCTGGAAGCCATCAACGAGAGCGACATGGTGCTGCTGCCCGACCC 2100
M F D G S S I V G W K A I N E S D M V L L P D P

GACGACGGCGGTTCATGGACCCGTTCTCGGCGAAGCCGCAGCTGATCCTGATCTGCGACATCATCGAGCCC 2170
T T A V M D P F S A K P Q L I L I C D I I E P

TCGACCGGGCAGTTCTACAACCGCGACCCCCGCGCCACCGCCAAGCTGGCCGAGGCCTACCTGAAGTCCA 2240
S T G Q F Y N R D P R A T A K L A E A Y L K S

EcoRI

CCGGCCTGGGCGACACGGCGTTTTTTCGGTCCGGAAGCCGAAATTCCTTCGTCTTCGACAGCGTCAAGTTCGG 2310
T G L G D T A F F G P E A E F F V F D S V K F G

CACGGGCCCGAATTTTCGGCATCTACCAGCTTGACAGCATCGAGGGGCCCCGGCGCCTCGCTGAAGGACTAT 2380
T G P N F G I Y Q L D S I E G P G A S L K D Y

SalI

CCCGAGGGCAACATGGGCCATCGCCCCGACGGTGAAGGGCGGCTATTTCCCCGTCCCAGCGGTCGACAGCG 2450
P E G N M G H R P T V K G G Y F P V P P V D S

AAAACGACCTGCGCGCCGAGATGCTGTCCACGATGGGCGAGATGGGCGCTGCCGATCGAAAAGCATCACCA 2520
E N D L R A E M L S T M G E M G L P I E K H H H

CGAGGTCGCGCAGTCGCAGCACGAGTTGGGCACCAAGTTTCGCGACGCTGGTGAAGTCCGCCGACTTTCATG 2590
E V A Q S Q H E L G T K F A T L V K S A D F M

BglII

CAGATCTACAATACTGCGTGCACAACGTCGCCATTCTACGGCAAGTCCGCGACGTTTCATGCCGAAGC 2660
Q I Y K Y C V H N V A H S Y G K S A T F M P K

CGATCTATGGCGACAACGGATCGGGCATGCACGTCCACCAGTCGATCTGGAAGAGCGGCAAGCCGGTCTT 2730
P I Y G D N G S G M H V H Q S I W K S G K P V F

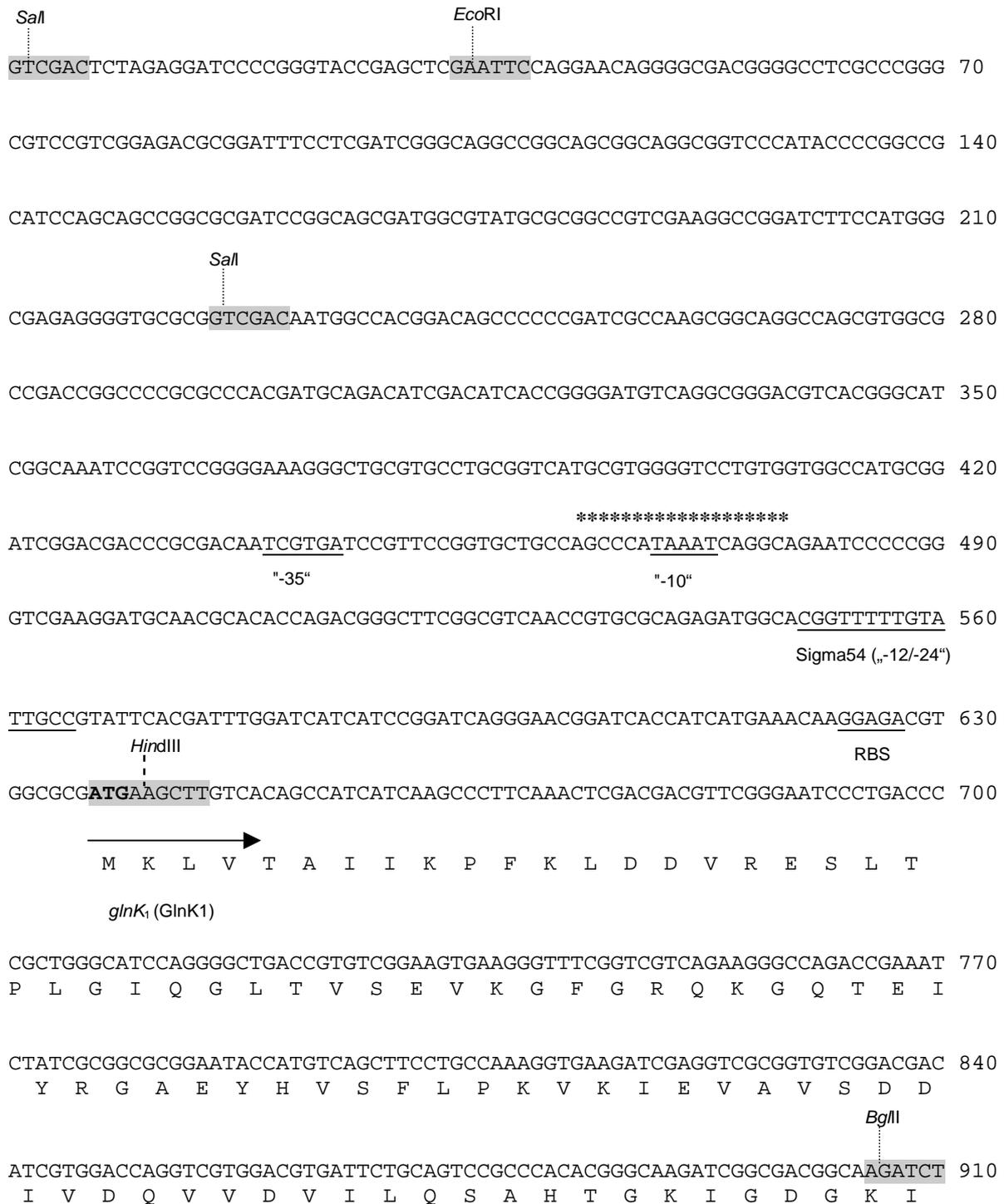
CGCCGGCAACGGCTATGCCGACCTGTCCGACCAGGCGCTGTATTACATCGGCGGCATCATCAAGCACGCC 2800
A G N G Y A D L S D Q A L Y Y I G G I I K H A

SalI

AAGGCGCTGAACGCCTTCACCAACCCGTCGACCAATTCTACAAGCGCCTGATCCCCGGGCTTCGAGGCGC 2870
K A L N A F T N P S T N S Y K R L I P G F E A

CGGTGCTGCTGGCCTATTTCGGCGCGCAACCGCTCGGCGTCTGCCGCATCCCGTATGCGACCAGCCCGAA 2940
P V L L A Y S A R N R S A S C R I P Y A T S P K

Anhang II. DNA-Sequenz (2460 bp) des *glnK₁amtB₁*-Fragments des Plasmids pOP7. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind unter der Nukleotidsequenz dargestellt. Start- und Stopcodons sind fett gedruckt und schattiert. Die Boxen bezeichnen die beiden möglichen Startcodons des *amtB₁*-Gens, wobei das erste mögliche Startcodon GTG mit dem Stopcodon TGA des *glnK₁* überlappt. Potentielle Ribosomenbindungsstellen und Promotorsequenzen sind unterstrichen. Die Schnittstellen *EcoRI*, *BglII*, *HindIII* und *SalI* sind als hellgraue Boxen gezeigt. „Inverted Repeats“ sind durch Pfeile gezeichnet. Eine Potentielle Bindestelle des Transkriptionsregulators NtrC ist mit ***** gekennzeichnet.



ANHANG II

TCGTATCCAGCCTGGACAGCGTCATCCGCATCCGGACGCGGAGACGGGAGAAGACGCGCTGTGAGTCTC 980
 F V S S L D S V I R I R T R E T G E D A L
 RBS M S L
 →
amtB₁ (AmtB1)

CCCCGCACTATTTCGGACTTTCTCACCTCGCGGCACCACCATCGCCCTGGCCACGCTGGCCGGGGCGGCGC 1050
 P R T I R T F S P R G T T I A L A T L A G A A

TGCCGGCCATGCGCGCCCCGCCATGGCCGCCGATCCGGCCCCGCCCATCAACACCGGCGATAACCGC 1120
 L P A M A A P A M A A D P A P P A I N T G D T A

CTGGATGCTGGTCAGCACCGCGCTGGTGCTGATGATGACCGTACCGGGCCTGGCCCTGTTCTATGGCGGC 1190
 W M L V S T A L V L M M T V P G L A L F Y G G

ATGGTCCGCAAGAAGAACGTGCTGGCCACGCTGATGCAGTCTTCGCCATCTGCTGCATCGTCACGATTG 1260
 M V R K K N V L A T L M Q S F A I C C I V T I

TCTGGATGGTCGCGGGCTACAGCCTGGCGTTCCGGCACCGGGTCGCCCTACATCGGCGATCTGTCCCCTT 1330
 V W M V A G Y S L A F G T G S P Y I G D L S R F

CATGCTGAACGGCATCGGCGCGCAGATTTCCAAGGGTCCGATGTCGGCTTCACGCTGGGGCTGGGGTTCG 1400
 M L N G I G A Q I S K G S D V G F T L G L G S

GCCAACGCCACGGTGATGACGATCCCCGAGAGCGTCTTCATGATGTTCCAGATGACGTTTCGCGATCATCA 1470
 A N A T V M T I P E S V F M M F Q M T F A I I

CCCCGGCGCTGATCACCGGCGCCTTCGCCGAGCGCATGAAGTTCAGCGCGCTGTGCGTGTTCACCATCCT 1540
 T P A L I T G A F A E R M K F S A L C V F T I L

GTGGTCGCTGCTGGTCTATGCGCCGGTGCCTTGGGCTGGAGCCCCGCTTGGCTGGGTTCGCGGGGTTTC 1610
 W S L L V Y A P V A H W V W S P L G W V A G F

GGCGCCATCGATTTCCGCCGGCGGCACCGTGGTGCACATCAATGCCGGCGTCGCCGGCCTGGTCACGGCGC 1680
 G A I D F A G G T V V H I N A G V A G L V T A

TGGTGGTGGGCAAGCGGCAGGGCTACGGCCAGGACGATATGTCGCCCTTCAACCTGACCTATGCCGTCAT 1750
 L V V G K R Q G Y G Q D D M S P F N L T Y A V I

CGGCGCGTCGCTGCTGTGGGTTCGGCTGGTTCGGCTTCAATGCCGGGTTCGGCGGTAGGGGCCAACGGCCGC 1820
 G A S L L W V G W F G F N A G S A V G A N G R

GCCGGCATGGCGATGGCGACGACGAGATCGCCAGCGCCGCCCGGGGTGGCCTGGATGCTGGCCGAAT 1890
 A G M A M A T T Q I A S A A A G V A W M L A E

GGCCCCGACCGGCAAGCCGACGGTGGTGGCATCATTTCCGGCGCCGTCGGCGGACTGGTTCGCGATCAC 1960
 W A R T G K P T V L G I I S G A V G G L V A I T

ANHANG II

GCCCCGCCCGGCTTCGTGCTGCCGGGCGGGGCCCTGATCATCGGCCTGCTGGCCGGCGCGGTCTGCTAC 2030
 P A A G F V L P G G A L I I G L L A G A V C Y

TGGACCGCCACCACCATGAAGCACATGCTGGGCTATGACGACAGCCTGGACGCCTTCGGCGTGCATGGCA 2100
 W T A T T M K H M L G Y D D S L D A F G V H G

TCGGCGGCATCCTGGGCGCGCTGCTGACCGCGTGTGGCCTATGGCCCGCTTTCGGCCACCGACGCCAA 2170
 I G G I L G A L L T G V L A Y G P L S A T D A N

TCCCGCCGGGGTTCGTGGGGTCCTTCGCGCAGCTCGTCAACCAGGCCAAGGCCGTGGGCGTCACCATCGTC 2240
 P A G V V G S F A Q L V T Q A K A V G V T I V

SalI

TGGTGC GCGGTTCGTACCTTCGTCCTGCTGAAGATCGTTCGACCTCGCCATCGGCCTGCGCGTCCGGAGCG 2310
 W C A V V T F V L L K I V D L A I G L R V R S

AGGACGAAATCGAGGGGCTGGACATGACCCAGCACGGCGAACGCATCAACTGATCCATTTACCCGAACAA 2380
 E D E I E G L D M T Q H G E R I N

CAGACAGGCCGGCCCGGGTGCATGCCCGGGCCGGCCTTTTTCTTTCCGTATTCAAGTCAAACCTGTTATGG 2450



ATGATTGTCC 2460

Anhang III. DNA-Sequenz (3206 bp) des *glnK₂amtB₂*-Fragments auf dem Plasmid pOP80. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind unter der Nukleotidsequenz dargestellt. Start- und Stopcodons sind fett gedruckt und schattiert. Die Boxen bezeichnen die möglichen Startcodons des *amtB₂*-Gens, wobei das erste mögliche Startcodon GTG mit dem Stopcodon TGA des *glnK₂* überlappt. Potentielle Ribosomenbindungsstellen sind unterstrichen. Die Schnittstellen *EcoRI*, *BglIII*, *HindIII* und *SalI* sind als hellgraue Boxen gezeigt.

SalI

 GTCGACCGGCAGCCCGCGGCGGCGATGGAAACCTCCTTCGCCAATGCCGGCCAGGTCTCACCCGGCTATT 70
 V D R Q P A A A M E T S F A N A G Q V S P G Y

—————▶
dadA-Homolog (D-Aminosäure-Dehydrogenase), partiell

CCACGCCCTGGGCCATGCCCGGCCTGCCGCGCAAGGCGCTGGGCTGGATGCTGCAGAAGCACAGCCCGCT 140
 S T P W A M P G L P R K A L G W M L Q K H S P L

GGTCATCCGCGCGCGCATCGATTTTCGCGATGTTCCGCTGGATGACGCAATTGCTGACGAACTGCACCGAG 210
 V I R A R I D F A M F R W M T Q L L T N C T E

CACGCCTACGACGTCAACAAGGCGCGGATGCTGCGGATCGCGGAATACAGCCGCGACTGCCTGACGGCGC 280
 H A Y D V N K A R M L R I A E Y S R D C L T A

TGCGCGAGGAAACCGGCATCACCTATGACGACCGCCAGCGCGCCTGATCCAGCTTTTCCGCACCGACGC 350
 L R E E T G I T Y D D R Q R G L I Q L F R T D A

GCAGCTGGAGCACGCGCATGAGGACATGCGCCTGCTGGCCGAAAGCGAGGTACCGCACGAACTGCTGGAC 420
 Q L E H A H E D M R L L A E S E V P H E L L D

GTGGCGGCCATCGTCAGGCGCGAACC CGCCTGGCCCACGCGCACGATCTGCTGAAGGGGGGGCTGTTCC 490
 V A A I V R R E P G L A H A H D L L K G G L F

TGCCGGGCGATGAATCGGGCGACGCGCATATGTTACCCAGCGCCTGGCGCAGAAGGCCGAAGAACTGGG 560
 L P G D E S G D A H M F T Q R L A Q K A E E L G

CGTCACCTTCCACTACGAGACGGGCATCGAGGGGCTGGATGCCAGCGCGTCCGAGATCCTGGGCGTCCGC 630
 V T F H Y E T G I E G L D A S A S E I L G V R

ACGTCCACCGGCCGGATGACGGGCGATGCATACGTCGTGGCGCTGGGCAGCTATTCGCCGCTGCTGCTGC 700
 T S T G R M T G D A Y V V A L G S Y S P L L L

GGCCGATGGGAATCCGGTTGCCGGTCTATCCGGTCAAGGGCTATTCCCTGACCGTGCCCTGACCGACCC 770
 R P M G I R L P V Y P V K G Y S L T V P L T D P

GGATCGGGCCCCCGTCTCGACCGTGAATGACGAGACGTACAAGGTCGCCATGACCCGGCTGGGCGACCGT 840
 D R A P V S T V N D E T Y K V A M T R L G D R

ATCCGCATCGGCGGCACCGCGGAAGTACGAGGATAACGATCTGCGGCTGAGCCCCGACCGCGCGAAACGC 910
 I R I G G T A E L T G Y D L R L S P D R R E T

ANHANG III

TGGA~~ACTCTCCTTTTTCGGACCTGTTTCGGCGGGCGGCGACCTGGGCCGCGCCACCTACTGGACCGGCTTGCG~~ 980
 L E L S F S D L F G G G D L G R A T Y W T G L R

CCCC~~AATACGCCGGACGGCCCCCGGTGGTCCGGCCCCGTCGGGACGCTTCCGCAATCTGTGGCTGAATACG~~ 1050
 P N T P D G P R W S G P S G R F R N L W L N T

GGCC~~CACGGCACCTGGGCTGGACCATGGCCTGCGGGTCCGGACACATGCTGGCCGACCTGATCGCCGCCG~~ 1120
 G H G T L G W T M A C G S G H M L A D L I A A

GCGG~~CCGAACATTCCACACCTGGACCTGTGATCGACGCTACGCTTCTGAAGGATCGCGATCCGCGCCG~~ 1190
 G G R T F H T W T C R S T L R F L K D R D P R R

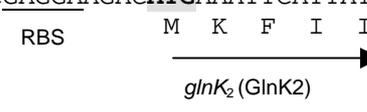
GTCG~~CCCCCTGCCGCCCCCAAGGCAGGGGGCTGTATCGCCCAAGTCAAACGGCTTTCATTACTGTATGTG~~ 1260
 S P P A R P K A G G C I A Q V K R L S L L Y V

TTCAG~~GCTGGGCAGGTTTTTCATGCGGTACGCGCCCTAAATCGGGTTCGGGCCCCACACCATGCCTTTTTT~~ 1330
 F R L G R F S C G T R P K S G R G P T P C L F

ATTT~~CACAATCGATGCAACCAGCGTTTCCGGATGCGTTTGA~~TGGACCGGGCTCCATCATTCGGATTTTCC 1400
 Y F T I D A T S V S G C V

GAAAC~~GCCTGATGACGACATGGTTGTCTCATCCCATCACTTTTTTGTTCACGACGGTTTTTTTGACGAC~~ 1470

ATGGA~~AATCCGGTAGCGGCTTCAGAACGATCTTTCGCTCGAAACGTTTTTGGCGAATGCAAGCATCGCAGCT~~ 1540

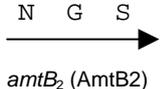
TTCCT~~GGAGACATATTCGCCTGCGAGGAAGACATG~~A~~AAATTCATTATAGCCATTATCAAGCCATTCAA~~ACT 1610
 RBS M K F I I A I I K P F K L


CGAC~~GATGTCGCGAAGCCCTGGGCACCATCGGCATCCAGGGACTGACCGTTACCGAAGTCAAAGGATAT~~ 1680
 D D V R E A L G T I G I Q G L T V T E V K G Y

GGCC~~GCCAGAAGGGACAGACCGAGATCTATCGCGGCGCGGAATATCAGATCCAGTTCGTGGCAAAAAGTGA~~ 1750
 G R Q K G Q T E I Y R G A E Y Q I Q F V A K V

AAAT~~CGAAGTCGCGGTGGCCGATTTCGATGCTGGATCAGGCGCTCGATAACCATTCGTGCCGCCGCCATAC~~ 1820
 K I E V A V A D S M L D Q A L D T I R A A A H T

CGGC~~CAGATCGGGGACGGCAAGATGTTTTGTTCTTGAAGTCAACAGGCCATTTCGTATCCGTACGAATGAA~~ 1890
 G T I G D G K M F V L E L Q Q A I R I R T N E

ACCG~~GGGAGATTGCCTTGTG~~AACGGGTCAAATTCCTGCTTCAGACGATTGACGCTGGCGGGCCCCGGCCGC 1960
 T G E I A L M N G S N S C F R R L T L A A P A A
 RBS


ANHANG III

CGCGATGGCCCTGCTGGCCGCCCCGTCGATCGCATCCGCCCGGATCCGGCCCCCTCTCCCCGATCAAC 2030
 A M A L L A A P S I A S A A D P A P P P P I N

ACCGGCGATACCGCCTGGATGCTGACCAGCACCGCGCTGGTGCTGATGATGACCGTGCCGGGCCTGGCCC 2100
 T G D T A W M L T S T A L V L M M T V P G L A

TGTTCTATGGCGGCATGGTCCGCAAGAAGAACGTGCTGGCCACGCTGATGCAGTCCTTCGCCATCTGCTG 2170
 L F Y G G M V R K K N V L A T L M Q S F A I C C

CATCATCACCGTCCTGTGGATGGTCCGCGGGCTACAGCCTGACGTTCCGGCACCGGGTCCGCCCTATATCGGC 2240
 I I T V L W M V A G Y S L T F G T G S P Y I G

GATCTGTCCCCTTCATGCTGAACGGCATCGGCGCGCAGATTTCCAAGGGTCCGATGTCGGCTTCACGC 2310
 D L S R F M L N G I G A Q I S K G S D V G F T

TGGGGCTGGGGTCCGCCAACGCCACGGTGATGACAATCCCCGAGAGCGTCTTCATGATGTTCCAGATGAC 2380
 L G L G S A N A T V M T I P E S V F M M F Q M T

GTTCGCGATCATCACCCCGGCGCTGATCGCCGGCTCGTTTTGCCGAGCGCATGAAGTTCAGCGCGCTGTGC 2450
 F A I I T P A L I A G S F A E R M K F S A L C

GTCTTCACCATCCTGTGGTGCCTGCTGGTCTATGCGCCGATCGCCCACTGGGTCTGGAGCCCGCTGGGCT 2520
 V F T I L W S L L V Y A P I A H W V W S P L G

GGGTCCGCGGGTTCGGCGCCGTCGATTTCCGCCGGCGGCACCGTGGTGCACATCAATGCCGGCATCGCAGG 2590
 W V A G F G A V D F A G G T V V H I N A G I A G

CCTGGTCACGGCGCTGGTGTGGGCAAGCGGCAGGGCTACGGCCAGGACGATATGTCGCCCTTCAACCTG 2660
 L V T A L V L G K R Q G Y G Q D D M S P F N L

ACCTATGCCGTCATCGGCGCGTCGCTACTATGGGTCCGGCTGGTTCGGCTTCAATGCCGGGTCCGGCCGTGG 2730
 T Y A V I G A S L L W V G W F G F N A G S A V

GCTCCAACGGCCCGCCGGCATGGCGATGGCGACGACGAGATCGCGACCGCCGCCCGCCGCTGTCTCTG 2800
 G S N G R A G M A M A T T Q I A T A A A G L S W

GATGCTGGCCGAATGGGCCCGCACCGGCAAGCCGACGGTGCTGGGCATCATTTCCGGCGCGGTGGCGGGC 2870
 M L A E W A R T G K P T V L G I I S G A V A G

CTGGTCCGATCACGCCCCGCCCGGCTTCGTGCTGCCGGGCGGGGCGCTGGTCATCGGCCTGATCACGG 2940
 L V A I T P A A G F V L P G G A L V I G L I T

GCGCCGTGTGCTATTTCCGCGGCGACGTCGCTGAAGCACATGCTGGGCTATGACGACAGCCTGGACGCCTT 3010
 G A V C Y F A A T S L K H M L G Y D D S L D A F

CGGCGTGCATGGCATCGGCGGCATCCTGGGCGCGCTGCTGACCGGTGTGCTGGCCTATGGCCCGCTTTCG 3080
 G V H G I G G I L G A L L T G V L A Y G P L S

ANHANG III

GCCACCGACGCCAACCCCGCCGGGGTCGTGGGGTCGTTTCGCGCAGTTCGTACCCAGGCCAAGGCCGTGG 3150

A T D A N P A G V V G S F A Q F V T Q A K A V

*Sa*I

GCGTCACCATCGTCTGGTGCGGCGTCGTGACCTTCATCCTGCTGAAGATCGTCGAC 3206

G V T I V W C G V V T F I L L K I V D

ANHANG IV

AmtB_A.caul.	GKAAAQSALDAVLADAGYIYKLG AIDFAGGTVVHINAGIAAFVGVCLIVGKRTG----	YGK	270
AmtB_R.etli	-----AGLIFS YGAIDFPGATVVHINAGNRGLVAAIMLGKRTG----	YKK	249
AmtB_A.bras.	-----GVLDYAGGTVVHINAGVAGLVAAIVLGKRRK-----	YPN	225
AmtB_A.vinel.	-----WGVLDFAAGT VVHINAGVAGLVACLVLGKRRK-----	YPG	225
AmtB1_A.diaz.	----- FGAIDFAGGT VVHINAGVAGLVLTALVVGKRRQ-----	YGQ	247
AmtB2_A.diaz.	----- FGAVDFAGGT VVHINAGIAGLVLTALVVGKRRQ-----	YGQ	243
AmtB_E.coli	-----HGALDFAGGT VVHINA IAGLVGAYLIGKRVG----	FGK	212
MEP3_S.cerev.	-----WGVLDWAGG NIEILSAVAGFVYSYFLGRRKE----	NLL	202
MEP1_S.cerev.	-----WGVLDWAGG NIEILSAVSGFVYSWFLGKRNE----	KLL	203
MEP2_S.cerev.	-----LGSLDYAGGL CVHLTSGHGLVYALILGKRNDPVTRKGM		220
	* : * : * . : : : . : * . : : * *		
AmtB_A.caul.	EAFQPHSLTTLV GAGLLVWGWF GFNAGSNLEANGLTALAMNFTIATCAAALSWMVVEW		330
AmtB_R.etli	EIMRPHSMTLTMV GASLLVWGWF GFNAGSNLEANGYASLAMINTFVA-AAAAVSWCIVES		308
AmtB_A.bras.	ENFAPHNLVLSLIGASMLVWGWF GFNAGSAVAADGRAGMAMLV TQIAAATAAMS WLLVEW		285
AmtB_A.vinel.	VAMTPHNLGYTLVGAAMLVWGWF GFNAGSR-SRNGTAGMAMLV TQIATAAAALAWIPA EW		284
AmtB1_A.diaz.	DDMSPFNLT YAVIGASLLVWGWF GFNAGSAVANGRAGMAMATTQ IASAAAGVAMWLA EW		307
AmtB2_A.diaz.	DDMSPFNLT YAVIGASLLVWGWF GFNAGSAVGSNGRAGMAMATTQ IATAAAGLSWMLA EW		303
AmtB_E.coli	EAFKPHNLPMVFTGTAILYIGWFGFNAGSAGTANEIAALAFVNTV VATAAAILGWIFGEW		272
MEP3_S.cerev.	INFRPHNVSMVTLGTSILWFGWLLFNAASLSPNMRSVYAFMNTCLSATTGGM TWCLLDY		262
MEP1_S.cerev.	INFRPHNVSLVTLGTSILWFGWLLFNSASSLSPNLRSVYAFMNTCLSAITGGM TWCLLDY		263
MEP2_S.cerev.	PKYKPHSVTSVVLGT VFLWFGWMMFFNGGSAGNATIRAWYSIMSTNLAAACGGLTWMVIDY		280
	* . . : * : * : * . * : * : * : * : * : * : *		
AmtB_A.caul.	LAKG-KPSMLGVVSGAVAGLVAVTPMAGFAGIMGSLV SGLIVGVLCFFFCTTVKNAFGYD		389
AmtB_R.etli	LARG-KASMLGGASGAVAGLVAITAAAGFAARWASIVLGLV VSPICYFFVDVVKNFNYD		367
AmtB_A.bras.	ATKG-KGSVLGIIISGAIAGLVAITPASGFVGP TGALVIGLAAGVICYWGATGLKRALGYD		344
AmtB_A.vinel.	LTHG-KPSFGHRLRRGRA--WWHHPGRGT VGPMPGALVIGLASG SICFYCATAVKRRFGYD		341
AmtB1_A.diaz.	ARTG-KPTVLGIIISGAVAGLVAITPAAGFVLPGGAL IIGLLAGAVCYWTATTMKHM LGYD		366
AmtB2_A.diaz.	ARTG-KPTVLGIIISGAVAGLVAITPAAGFVLPGGAL VIGLITGAVCYFAATSLKHM LGYD		362
AmtB_E.coli	ALRG-KPSLLGACSGAIAGLVGVT PACGYIGVGGAL IIGVVAGLAGLVGVTMLKRLLRVD		331
MEP3_S.cerev.	-RSEKKWSTVGLCSGIICGLVAATPSSGCI TLYGSLIQGI IAGVVCN-FATKIKYYLKVD		320
MEP1_S.cerev.	-RSEKKWSTVGLCSGIISGLVAATPSSGCI TLYGSLIQGIVAGVVCN-FATKIKYYAKVD		321
MEP2_S.cerev.	FRCRKWTTVGLCSGI IAGLVGITPAAGFVPIWSAVVIGVVTGAGCN-LAVDLKSLLRID		339
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
AmtB_A.caul.	DSLDFVGVHCIGGIFGAIATGIVVSPALGGTGI--FDYTTGKVAD--YDMATQVIAQVKA		445
AmtB_R.etli	DSLDFVGVHCIGGIIGALGTGILVNPALGGAGI--VDYSTADFAATYRG TATQVNLQAKG		425
AmtB_A.bras.	DSLDAFGVHGVGGIVGAILTG VFAQEAIGGT-----AGALEGNVG-----QIWTQVYG		392
AmtB_A.vinel.	DSLDAFGVHGVGGIVGAVLTGLFAAPALGG-----FGEIDSIAS-----QLWIIQIKG		388
AmtB1_A.diaz.	DSLDAFGVHGI GGILGALLTGVLAYGPLSAT-----DANPAGVVGS-----FAQLVTQAKA		417
AmtB2_A.diaz.	DSLDAFGVHGI GGILGALLTGVLAYGPLSAT-----DANPAGVVGS-----FAQFVTQAKA		413
AmtB_E.coli	DPDVDVGVHGVCGIVGCIMTGIFAASSLGG-----VGFAEGVTMG-----HQLLVQLES		380
MEP3_S.cerev.	DSLDLLAEHGIAGVVGLIFNALFAADWVIGMDG--TTKHKGGWLT HN---WKQMYIQIAY		375
MEP1_S.cerev.	DAMDILAEHGVAGVIGLIFNALFGADWVIGMDG--TTEHEGGWVTHN---YKQMYKQIAY		376
MEP2_S.cerev.	DGLDCYSIHGVGGCIGSVLTGIFAADYVNATAGSYISPIDGGWINHH---YKQVGYQLAG		396
	* * . * : * . * : . . . : . : * . *		
AmtB_A.caul.	VVVTLVWSGVGS AVLYYIVHAV--VGLRATVEREREGLDITEHGERAYHS-----		493
AmtB_R.etli	VLTTLLWSGIGSAILYKIVDVV--IGLRVSVEAEREGLDLSTHGEPAYHAS-----		474
AmtB_A.bras.	ILATIVYSAVGSFII LKVIDVV--MGLRVEDDVERDGLDLALHGETIH-----		438
AmtB_A.vinel.	VLFTVIYTG VATFVILKAIERV--IGLRIS EEEETMGLDLSLHNERGYNL-----		436
AmtB1_A.diaz.	VGVTIVWCAVVT FVLLKIVDLA--IGLRVRSEDEIEGLDMTQH GERIN-----		463
AmtB2_A.diaz.	VGVTIVWCGVVT FILLKIVDC-----		434
AmtB_E.coli	IAITIVWSGVVAFIGYKLADLT--VGLRVPEEQEREGLDVNSHGENAYNA-----		428
MEP3_S.cerev.	IGASAGYCAVVTAIICFVLGKIPGVHLRVTEEA EALGLDEDQIGEFAYDYVEVRRDYQW		435
MEP1_S.cerev.	IAASIGYTAAVTAIICFVLGYIPGMLRRISEEAEEAGMDEDQIGEFAYDYVEVRRDYLLW		436
MEP2_S.cerev.	ICAAALAWTVT VTSILLT MNAIPFLKLRLSADEEEELGTDAAQIGEF TTYEESTAYIP----		452
	: : : : :		

ANHANG IV

```

AmtB_A.caul. -----
AmtB_R.etli -----
AmtB_A.bras. -----
AmtB_A.vinel. -----
AmtB1_A.diaz. -----
AmtB2_A.diaz. -----
AmtB_E.coli -----
MEP3_S.cerev. GVDTDALHTTCNGANSASETNPTEDSQNSSLSATVSGQNEKSNNPKLHHAKEA--- 489
MEP1_S.cerev. GVDEDSQRSDVN-HRVNNAHLAAERSSSGTNSSSDGNGEMIQSEKILPIHQEDPANR 492
MEP2_S.cerev. ----EPIRSKTS-AQMPPPHENIDDKIVGNTDAEKNSTPSDASSTKNTDHIV----- 499

```

Anhang V. Vergleich der Nukleotidsequenz der beiden *glnKamtB*-Regionen von *Acetobacter diazotrophicus* – *glnK₁amtB₁* (oben) und *glnK₂amtB₂* (unten). Sequenzabweichungen sind grau dargestellt. Als Boxen sind Start- und Stopcodons gekennzeichnet. Potentielle Promotorstrukturen des *glnK₁amtB₁*-Operons sind oberhalb der Sequenz gezeigt. **** - NtrC-Bindestelle. Das Sequenzalignment wurde nach der Clustal-Methode mit dem Programm MegAlign des Programm-Pakets DNASTar erstellt.

GACGTCACGGGCATCGGCAAATCCGGTCCGGGGAAAGGGCTGCGTGCCTGCGGTCATGCG	60] Promotorbereich
AGGTTTTTCATGC...GGTA...CGCGCCCTAAATCCGGTCCGCGCCCCACA.CCATGCC	52	
-35		
TGGGGTCTGTGGTGGCCATGCGGATCGGACGACCCGCGACAATCGTGATCCGTTCCGGT	120	
TTTTTTATTTTACAATCGATGCA.ACCAG.CGTTTCCGGATGCGTTTGAT.GGACCGGC	108	
***** -10		
GCTGCCAGCCATAAATCAGGCAGAATCCCCGGGTGGAAGGATGCAACG.CACACCAGA	179	
GT.CCATCATTCCGATTTTCCGAAACGCCTGATGACGACATGGTTGTCGTCATCCCATC	166	
-12/-24 =====		
CGGGCTTCGGCGT.CAACCGTGCAGAGATGGCACGGTTTTTGTATTGCCGTATTCACG	238	
ACTTTTTTGTTCACGACGGTTTTTTTGCAGACATGGAAATCCGGTAGCGGCTTCAGAACG	226	
AT.TTGATC.ATCATCCGGATCAGGGAACGGATCACCATCAT...GAAACAAGGAGA	291	
ATCTTGCCTCGAAACGTTTTGGCGAATGCAAGCATCGCAGCTTCTCGGAGACATATTCG	286	
C.GTGGCGCG...ATGAAGCTTGTACAGCCATCATCAAGCCCTTCAAACCTCGACGACG	346	
CCTGCGAGGAAGACATGAAATTCATTATAGCCATTATCAAGCCATTCAAACCTCGACGATG	346	
<i>glnK₁</i> <i>glnK₂</i>		
TTCGGGAATCCCTGACCCCGCTGGGCATCCAGGGCTGACCGTGTCCGGAAGTGAAGGGTT	406	
TCCGCGAAGCCCTGGGCACCATCGGCATCCAGGACTGACCGTTACCGAAGTCAAAGGAT	406	
TCCGTCGTGAGAAGGGCCAGACCGAAATCTATCGCGGCGCGGAATACCATGTCAGCTTCC	466	
ATGGCCGCCAGAAGGGACAGACCGAGATCTATCGCGGCGCGGAATATCAGATCCAGTTCG	466	
TGCCAAAGGTGAAGATCGAGGTGCGGGTGTCCGACGACATCGTGGACCAGGTCGTGGACG	526	
TGGCAAAGTGAATCGAAGTTCGCGGTGGCCGATTTCGATGCTGGATCAGGCGCTCGATA	526	
TGATTC.TGCAGTCCGCCACACGGGCAAGATCGGCGACGGCAAGATCTTCGTATCCAGC	585	
CCATTTCGTGCCG.CCGCCATACCGGCACGATCGGGGACGGCAAGATGTTTGTCTTGAA	585	
CTGGACAGCGTCATCCGCATCCGGACGCGGAGACGGGAGAAGACGCGCTGTGAGTCTCC	645	
CTGCAACAGGCCATTTCGTATCCGTACGAATGAAACCGGGGAGATTGCCTTGTGA.....	639	
<i>amtB₁</i> <i>amtB₂</i>		

ANHANG V

CCCGCACTATTTCGGACTTTCTCACCTCGCGGCACCACCATCGCCCTGGCCACGCTGGCCGACGGGTCAA..TTCCTGCTTCAGACGATTGACGCTGGC..GGCCCGGCCGCCG	705 690
GGGCGGCGCTGCCGGCCATGGCCGCGCCCGCCATGGCCGCGGATCCGGCCCCGCCGCC. CGATGGCCCTGCTGGCCGCCCGTCGATCGCATCCGCCCGGATCCGGCCCTCCTCCCC	764 750
. .ATCAACACCGGCATACCGCCTGGATGCTGGTCAGCACCGCGCTGGTGCTGATGATGA CGATCAACACCGGCATACCGCCTGGATGCTGACCAGCACCGCGCTGGTGCTGATGATGA	822 810
CCGTACCGGGCCTGGCCCTGTTCTATGGCGGCATGGTCCGCAAGAAGAACGTGCTGGCCA CCGTGCCGGCCTGGCCCTGTTCTATGGCGGCATGGTCCGCAAGAAGAACGTGCTGGCCA	882 870
CGCTGATGCAGTCCTTCGCCATCTGCTGCATCGTCACGATTGCTGGATGGTCGCGGGCT CGCTGATGCAGTCCTTCGCCATCTGCTGCATCATCACCGTCTGTTGGATGGTCGCGGGCT	942 930
ACAGCCTGGCGTTTCGGCACCGGGTCGCCCTACATCGGCGATCTGTCCCCTTCATGCTGA ACAGCCTGACGTTTCGGCACCGGGTCGCCCTATATCGGCGATCTGTCCCCTTCATGCTGA	1002 990
ACGGCATCGGCGCGCAGATTTCCAAGGGGTCCGATGTCCGCTTCACGCTGGGGCTGGGGT ACGGCATCGGCGCGCAGATTTCCAAGGGGTCCGATGTCCGCTTCACGCTGGGGCTGGGGT	1062 1050
CGGCCAACGCCACGGTGATGACGATCCCCGAGAGCGTTCATGATGTTCCAGATGACGT CGGCCAACGCCACGGTGATGACAATCCCCGAGAGCGTTCATGATGTTCCAGATGACGT	1122 1110
TCGCGATCATCACCCCGGCGCTGATCACCGGCGCCTTCGCCGAGCGCATGAAGTTCAGCG TCGCGATCATCACCCCGGCGCTGATCGCCGGCTCGTTTGCCGAGCGCATGAAGTTCAGCG	1182 1170
CGCTGTGCGTGTTCACCATCCTGTGGTCGCTGCTGGTCTATGCGCCGGTCGCCCACTGGG CGCTGTGCGTGTTCACCATCCTGTGGTCGCTGCTGGTCTATGCGCCGATCGGCCCACTGGG	1242 1230
TCTGGAGCCCCTGGCTGGGTTCGCGGGGTTCCGGCGCCATCGATTTCCGGCGGCACCG TCTGGAGCCCCTGGGCTGGGTTCGCGGGGTTCCGGCGCCGTCGATTTCCGGCGGCACCG	1302 1290
TGGTGACATCAATGCCGGCGTCGCCGGCCTGGTCACGGCGCTGGTGGTGGGCAAGCGGC TGGTGACATCAATGCCGGCATCGCAGGCCTGGTCACGGCGCTGGTGCTGGGCAAGCGGC	1362 1350
AGGGCTACGGCCAGGACGATATGTCGCCCTTCAACCTGACCTATGCCGTATCGGCGCGT AGGGCTACGGCCAGGACGATATGTCGCCCTTCAACCTGACCTATGCCGTATCGGCGCGT	1422 1410
CGCTGCTGTGGGTTCGGCTGGTTCGGCTTCAATGCCGGGTTCGGCGGTAGGGGCCAACGGCC CGCTACTATGGGTTCGGCTGGTTCGGCTTCAATGCCGGGTTCGGCGGTAGGGGCCAACGGCC	1482 1470
GCGCCGGCATGGCGATGGCGACGACGAGATCGCCAGCGCCGCGCCGGGGTGGCCTGGA GCGCCGGCATGGCGATGGCGACGACGAGATCGCCAGCGCCGCGCCGGGGTGGCCTGGA	1542 1530
TGCTGGCCGAATGGGCCCGCACCGGCAAGCCGACGGTGCTGGGCATCATTTCCGGCGCCG TGCTGGCCGAATGGGCCCGCACCGGCAAGCCGACGGTGCTGGGCATCATTTCCGGCGCCG	1602 1590

ANHANG V

TCGGCGGACTGGTCGCGATCACGCCC GCCCGCGGCTTCGTGCTGCCGGGCGGGCCCTGA	1662
TGGCGGGCCTGGTCGCGATCACGCCC GCCCGCGGCTTCGTGCTGCCGGGCGGGCGCTGG	1650
TCATCGGCCTGCTGGCCGGCGCGGTCTGCTACTGGACCGCCACCACCATGAAGCACATGC	1722
TCATCGGCCTGATCACGGGCGCCGTGTGCTATTTTCGCGGCGACGTCGCTGAAGCACATGC	1710
TGGGCTATGACGACAGCCTGGACGCCTTCGGCGTGCATGGCATCGGCGGCATCCTGGGCG	1782
TGGGCTATGACGACAGCCTGGACGCCTTCGGCGTGCATGGCATCGGCGGCATCCTGGGCG	1770
CGCTGCTGACCGGCGTGTGCTGGCCTATGGCCCGCTTTTCGGCCACCGACGCCAATCCCGCCG	1842
CGCTGCTGACCGGTGTGCTGGCCTATGGCCCGCTTTTCGGCCACCGACGCCAACCCCGCCG	1830
GGTTCGTGGGGTCCTTCGCGCAGCTCGTACCCAGGCCAAGGCCGTGGGCGTCACCATCG	1902
GGTTCGTGGGGTCGTTTCGCGCAGTTCGTACCCAGGCCAAGGCCGTGGGCGTCACCATCG	1890
TCTGGTGCGCGGTCGTCACCTTCGTCCTGCTGAAGATCGTCGACCTCGCCATCGGCCTGC	1962
TCTGGTGCGGCGTCGTCACCTTCATCCTGCTGAAGATCGTCGAC //.....	1934
GCGTCCGGAGCGAGGACGAAATCGAGGGGCTGGACATGACCCAGCACGGCGAACGCATCA	2022
.....	
ACTGA	2027
.....	

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub für die Möglichkeit der Erstellung meiner Doktorarbeit am Lehrstuhl der Mikrobiologie/Gentechnologie bedanken. Bei ihm und Herrn Dr. D. Meletzus bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. S. Nordlund danke ich für die interessanten Diskussionen und produktive Zusammenarbeit.

Ich danke Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere Dr. K.-H. Gartemann für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, besonders bei der Erstellung dieser Arbeit, E.-M. Zellermann, A. Szmajdzinska und A. Battermann für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung und allen, die ich nicht speziell genannt habe, für das angenehme Arbeitsklima und die Zusammenarbeit.

Mein spezieller Dank gilt meinem Mann Leonid und meinen Kindern Aleksej und Artjom, die mit ihrem Verständnis und ihrer Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben. Ich bedanke mich ebenfalls bei allen meinen „Fans“ außerhalb des Lehrstuhls, deren emotionaler Beistand ein wichtiger Beitrag zu meiner Arbeit war.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Bielefeld, Januar 2001