Regulation der Glutamatsynthese in *Bacillus subtilis* durch die Glutamatdehydrogenase RocG und das Aktivatorprotein GltC

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von:
Fabian Moritz Commichau
aus Aachen

Göttingen 2006

D7

Referent: Prof. Dr. Jörg Stülke

Korreferent: Prof. Dr. Botho Bowien

Tag der mündlichen Prüfung: 1.11.2006

Danksagung

An aller erster Stelle möchte ich mich bei **Jörg** bedanken, daß ich in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen durfte. Nicht nur die Arbeit in Erlangen und Göttingen hat Spaß gemacht sondern auch die vielen spontanen Ausflüge außerhalb der Arbeitszeit (z. B. zum Monte Kaolino, Brocken und X-mal zum Europic (dort gibt es Flaschenbier für ~ 1 € und vorzügliches Essen), nach Dresden, zum WM-Spiel nach Berlin, nach Eisenach und Nürnberg…). Herrn **Prof. Dr. Bowien** danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern (Irene Reif, Philipp Tripal, Dr. Ralf Bertram, Dr. Christian Detsch, Dr. Matthias Merzbacher *et al.*) des Lehrstuhls von Prof. Dr. W. Hillen bedanken, daß sie mich zu Beginn meiner Doktorarbeit in Erlangen unterstützt und sehr freundlich aufgenommen haben. In vieler Hinsicht bedanke ich mich bei **Dr. Hans-Matti Blencke**. Besonders aber für seine Unkompliziertheit, daß ich die zwei Monate, die ich in Erlangen verbracht habe, im Haus seines Vaters unterkommen konnte, und daß er mir bei vielen Ausflügen die schöne Umgebung von Erlangen und Ansbach gezeigt hat. Die Grillabende in Erlangen ich nicht so schnell vergessen. Mit **Dr. Matthias Schmalisch** habe ich witzige Abende in Erlangen und Göttingen erlebt. Er war immer dazu bereit eine Kneipe aufzusuchen oder auf irgendeiner göttinger Studentenfete und Doktorfeiern ordentlich die Sau rauszulassen. Außerdem hat er sich für die Thematik meiner Arbeit (oder eigentlich alle Arbeiten, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Arbeitsgruppe) interessiert und immer gute Ideen gehabt und Vorschläge gemacht. Matthias, seitdem Du dorten (in Amerika) bist, kommen wir freitags viel früher in die Cafeteria!!! Matthias Schmalisch und Hans-Matti Blencke konnten mich schnell dazu bringen mir Inline Skates zuzulegen und beim erfolgreichsten deutschen Rollersoccer-Team aus Göttingen (**Andi Schmid** *et al.*) mitzumachen. Ohne euch wäre ich in meinem Leben wahrscheinlich niemals Deutscher Meister oder sogar Weltmeister geworden! **Oli** danke ich für die Unterstützung bei der Lösung von Computerproblemen und für die Ausflüge (zusammen mit Matthias) zu Burger King in Erlangen und Göttingen. Sehr amüsant waren dabei die Unterhaltungen zwischen den "zwei" Computerspezialisten Oli und Matthias, aber schmackhaft finde ich das "Essen" von Burger King immer noch nicht. Unvergessen bleibt auch die vierstündige (oder noch länger?) Fahrt auf dem Standstreifen der Autobahn von Bamberg nach Göttingen. Auf dieser Fahrt hat Oli versucht, mir die Architektur verschiedener Prozessoren zu erklären. Der Monolog war sehr interessant, aber verstanden habe ich überhaupt nichts! **Sven**: Ich danke dir vielmals für deine nicht immer realisierbaren aber durchaus geistreichen

Vorschläge bei den langen Sitzungen im Déjà vu, der letzten Absteige Göttingens für Leute, die nicht mehr wissen wohin…! Wer spült sich jetzt mit mir die Sorgen von der Seele? “Jetzt aber nun mal ganz im Ernst”: Damit es beim nächsten Mal nicht wieder zwei Minuten werden, einfach ein Paar Kippen und/oder Flaschen weniger! Die Technische Angestellte **Sabine Lentes** hat mich mit unzähligen LacZ-Messungen, Klonierungen, Butterkeksen und diversen anderen Leckereien… bei meiner Arbeit tatkräftig unterstützt. Dafür danke ich ihr sehr! Sebastian Hübner, Claudine Hames, Kalpana Sigh, Hinnerk Eilers, Sarah Wildenhain, Dr. Boris Görke, Julia Busse, Christina Herzberg, Barabara Herbst *et al.* danke ich für die gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit. Bei den Praktikantinnen/-en **Anke Hornbach, Katrin Gunka** und **Sascha-Rene Jürgens** sowie den Diplomanden, **Jan “Bossi” Schleider** und **Nico Pietack** muß ich mich dafür bedanken, daß sie meine Betreuung aushalten oder ausgehalten haben. Hoffentlich hat/wird diese Betreuung bei euch keine dauerhaften Schäden hinterlassen! Meinem Bruder Basse und der lieben Anne danke ich für die mentale Unterstützung, daß sie mich überzeugen konnten, bei den weniger erfolgreichen Phasen meiner Arbeit nicht alles hinzuschmeißen, sondern die Doktorarbeit zu Ende zu bringen. Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern **Gitti** und **Volker** bedanken, die mich all die Jahre nicht nur finanziell unterstützt haben sondern auch da waren, wenn es irgendwo Probleme gab!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1. Zusammenfassung **1**

2. Einleitung **2**

2.1. Bedeutung von *Bacillus subtilis* in Industrie und Forschung **2**
2.2. Mikrobielle Regulationsvorgänge **3**
2.3. Das PTS **4**
2.3.1. Der Aufbau des PTS 4
2.3.2. Regulatorische Einflüsse des PTS auf den bakteriellen Stoffwechsel 6
Die Kohlenstoff-Katabolitenrepression 6
Die Phänotypen der *ccpA*-Mutante 8
2.4. Koordination von Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsel **10**
2.4.1. Regulation zentraler Stoffwechselwege durch die C- und die N-Quelle 10
2.4.2. Ein spezifisches PTS stellt eine direkte Verbindung zwischen C- und N-Stoffwechsel her 12
2.5. Die Wege der Ammoniumassimilation und der Glutamatstoffwechsel **13**
2.5.1. Ammoniumassimilation in *E. coli* 14
2.5.2. Ammoniumassimilation in *B. subtilis* 15
Regulation der Glutaminsynthetase 16
Die Glutamatsynthase: Aufbau des *gltAB*-Operons 17
Die Glutamatsynthase: Regulation des *gltAB*-Operons 18
Mutanten mit veränderter Regulation des *gltAB*-Operons 19
Die Funktion der Glutamatdehydrogenasen in *B. subtilis* 20
Die Regulation der Glutamatdehydrogenasen 21

2.6. Ziele der Arbeit **23**

3. Material und Methoden **24**

3.1. Bakterienstämme und Plasmide ... 24

3.2. Medien ... 24

Bakterienmedien und fakultative Zusätze ... 24

Antibiotika ... 27

3.3. Methoden ... 28

3.3.1. Allgemeine Methoden ... 28

3.3.2. Anzucht von Bakterien ... 28

3.3.3. Transformation von *E. coli* ... 29

3.3.4. Transformation von *B. subtilis* ... 29

Herstellung von kompetenten Zellen ... 29

Transformation der kompetenten Zellen ... 30

3.3.5. Präparation und Nachweis von DNA ... 30

Aufreinigung von Plasmid-DNA über modifizierte Alkali/SDS-Lyse ... 30

Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis* ... 30

DNA-Gelelektrophorese ... 31

Sequenzierung von DNA ... 31

Restriktion und Ligation von DNA ... 31

Dephosphorylierung von DNA ... 31

Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 32

Lösungen für das Arbeiten mit DNA ... 33

3.3.6. Arbeiten mit Proteinen ... 33

Zellaufschluss mit Lysozym ... 33

Zellaufschluss mit der French Press ... 34

Denaturierende Proteingelelektrophorese ... 34

Westernblot ... 34

Überproduktion von Proteinen ... 35

Aufreinigung von Proteine über Ni^{2+}-NTA Säule ... 35

Aufreinigung über Strep-Tactin-Sepharose® Säule ... 35

Dialyse von Proteinen ... 36

DNA-Gelretardationsanalyse ... 36

Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen ... 37

3.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten ... 40
Amylasetest auf Stärkeplatten ... 40
Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität ... 40
Bestimmung der β-Xylosidaseaktivität ... 41
3.3.8. Transkriptomanalyse mittels Microarray ... 43

4. Ergebnisse ... 44

4.1. Die Regulation des *gltAB*-Operons durch Kohlenstoff- und Stickstoffquellen .. 44
4.1.1. Regulation des *gltAB*-Operons durch C-Quellen ... 44
4.1.2. Die Rolle der Katabolitenrepression bei der Regulation des *gltAB*-Operons ... 46
4.1.3. Stickstoffquellenabhängige Regulation des *gltAB*-Operons ... 48
Die Rolle von Glutamat bei der C-Quellen-abhängigen Regulation des *gltAB*-Operons ... 48
Der Einfluß anderer Glutamatquellen ... 49
4.1.4. Einfluß allgemeiner und spezifischer Regulatoren auf die Expression des *gltAB*-Operons ... 51
Die Rolle des allgemeinen Regulatorproteins TnrA ... 51
Die Rolle des spezifischen Regulatorproteins GltC ... 52
4.2. Die Rolle der Glutamatdehydrogenasen RocG und GudB bei der Regulation des *gltAB*-Operons ... 54
4.2.1. Die Funktion von RocG bei der Synthese und dem Abbau von Glutamat ... 55
4.2.2. Inverse Regulation der Glutamatsynthase und der Glutamatdehydrogenase ... 57
4.2.3. Die Inhibition von RocG durch die C-Quelle ... 58
4.2.4. Regulation des *gltAB*-Operons in Mutanten mit veränderter RocG-Expression ... 61
4.2.5. Aktivierung und Funktion der kryptischen Glutamatdehydrogenase GudB ... 65
Die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase GudB ... 65
Expression Glutamatdehydrogenase GudB in einer *rocG*-Mutante ... 67
4.2.6. Überexpression von RocG ... 69
Test des xyloseinduzierbaren Systems zur Überexpression von RocG ... 70
Expression der Glutamatsynthase in Gegenwart einer hohen RocG-Menge ... 71
4.3. Hemmung der GltC-Aktivität durch RocG ... 73

4.3.1. Der Einfluß der N-Quelle auf die RocG-abhängige Hemmung von GltC 73
4.3.2. Aktivierung von RocG durch Glutamat 76
4.4. Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem Aktivatorprotein GltC und seinem Zielpromotor 79
4.4.1. *In vivo*-Aktivität des C-terminal markierten Regulators GltC 79
Expression des C-terminal markierten Proteins 80
Regulation des *gltAB*-Operons durch das markierte GltC-Protein 81
4.4.2. Gelretardationsexperimente mit GltC und der *gltAB*-Promotorregion 81
4.5. Charakterisierung von Mutanten des Glutamatstoffwechsels 83
4.5.1. Die Wachstumsgeschwindigkeit in ammoniumhaltigen Medium wird durch die C-Quelle bestimmt 85
4.5.2. Expression der Glutamatdehydrogenasen in den *sgd*-Mutanten 87
4.5.3. Identifizierung der Mutationen 89
4.5.4. Transkriptomanalysen mit ausgewählten *sgd*-Mutanten 91

5. Diskussion 97

5.1. Abstimmung zwischen Glutamatsynthese und –abbau in *B. subtilis* 97
5.2. Die Glutamatdehydrogenase RocG: Ein Protein mit zwei Funktionen 100
5.3. Regulation der Glutamatdehydrogenaseaktivität 109
5.4. Ein Modell zur Regulation des *gltAB*-Operons 114
5.5. Ausblick 116

6. Literaturverzeichnis 118

7. Anhang 139

7.1. Materialien 139
7.1.1. Chemikalien 139
7.1.2. Hilfsmittel 140
7.1.3. Geräte und Apparaturen 141
7.1.4. Kommerziell erhältliche Systeme 141

7.1.5. Proteine, Antikörper und Enzyme 142

7.2. Oligonukleotide 142

7.3. Bakterienstämme 146

7.4. Plasmide 152

7.5. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme 156

7.6. Vollständige Liste der Transkriptomanalysen mit ausgewählten *sgd*-Mutanten 157

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	% (volume/volume) (Volumenprozent)
% (w/v)	% (weight/volume) (Massenprozent)
Abb.	Abbildung
α-KGA	α-Ketoglutarat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Kohlenstoff
CAA	Casamino acids
CCR	Kohlenstoff-Katabolitenrepression
CDP*	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2‘-(5‘-Chlor)Tricyclo[3.3.1.13,7]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
deion. Wasser	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EI	Enzym I
EII	Enzym II
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GDH	Glutamatdehydrogenase
Glc	Glukose
GOGAT	Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
H_2O_{MP}	Millipore-Wasser
Kap.	Kapitel
LB	Luria Bertani (Medium)
mRNA	messenger RNA
MU	Miller Units
N	Stickstoff
NAD^+	Nicotinamid-adenindinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenindinucleotid (reduzierte Form)
$NADP^+$	Nicotinamid-adenindinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenindinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
OD_x	optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge λ=x nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PNPX	p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid
PTS	Phosphoenolpyruvat:Zucker Phosphotransferasesystem
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Succinat
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SP	Sporulationsmedium
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units (Einheiten)
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid
ZAP	Zellaufschlusspuffer

1. Zusammenfassung

Bacillus subtilis kann eine Vielzahl von C-Quellen verwerten. Die höchsten Wachstumsraten erreicht das Bakterium mit der bevorzugten C-Quelle Glukose. Damit *B. subtilis* die C-Quelle effizient nutzen kann, müssen der C-Stoffwechsel und der N-Stoffwechsel genau aufeinander abgestimmt werden. Die Glutamatsynthese ist der Knotenpunkt zwischen diesen beiden Zweigen des Stoffwechsels. Bei der Glutamatsynthese wird durch die Glutamatsynthase (GOGAT) eine Aminogruppe auf α-Ketoglutarat, ein Schlüsselintermediat des C-Stoffwechsels, übertragen. Das bei dieser Reaktion gebildete Glutamat dient als Aminogruppendonor für die Biosynthese aller anderen Aminosäuren und der Nukleinsäuren. In *B. subtilis* kann der Aminogruppendonor Glutamat nur durch die GOGAT synthetisiert werden. Das zweite, in vielen anderen Bakterien an der Glutamatsynthese beteiligte Enzym, die Glutamatdehydrogenase (GDH), ist in *B. subtilis* nur katabol aktiv. Es ist bekannt, daß die GOGAT beim Wachstum von *B. subtilis* mit Glukose zur Deckung des Glutamatbedarfs stark exprimiert wird. Unter diesen Bedingungen wird die Bildung der katabolen GDH durch Glukose reprimiert. Beim Wachstum von *B. subtilis* mit einer weniger bevorzugten C-Quelle und einer guten N-Quelle wird die katabole GDH stark exprimiert und die Expression der GOGAT verhindert. Die Expression der GOGAT ist abhängig von dem Aktivatorprotein GltC. Unklar war bisher, wie die Aktivität dieses Transkriptionsregulators reguliert wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die GDH neben ihrer enzymatischen Funktion im Glutamatstoffwechsel das Aktivatorprotein GltC inhibiert. Die genetischen Daten sprechen für eine Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen. Die GDH kann das Aktivatorprotein GltC jedoch nur dann inaktivieren, wenn *B. subtilis* mit einer guten Glutamatquelle wächst, und die GDH enzymatisch aktiv ist. Die Wechselwirkung zwischen der GDH und GltC kann bei Wachstum mit Glukose durch ein Intermediat des C-Stoffwechsels aufgehoben werden. Dieses Intermediat konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Vorstellbar wäre, daß das $NADH_2$, welches in der Glykolyse gebildet wird, einen Einfluß auf die Interaktion zwischen den beiden Proteinen hat. Durch diesen einzigartigen Regulationsmechanismus wird der Glutamatstoffwechsel in *B. subtilis* genau auf die verfügbaren Ressourcen des C- und N-Stoffwechsels abgestimmt.

2. Einleitung

Bakterien gehören neben anderen Mikroorganismen zu den am weitesten verbreiteten Organismen auf der Erde. Im Laufe der Evolution hat sich eine Vielzahl von Bakterien entwickelt, die die unterschiedlichsten Lebensräume besiedeln und mit den dort vorherrschenden Bedingungen, wie z. B. dem Nährstoffangebot, zurechtkommen können (Whitman *et al*., 1998; Stephens, 2000; Curtis & Sloan, 2004). Die Besiedlung der Habitate hat zu einer großen Diversität der bakteriellen Stoffwechselleistungen geführt. Aufgrund ihrer vielfältigen Stoffwechselleistungen sind die Bakterien sowohl für die Mikrobiologie und als auch für die Industrie interessante Forschungsobjekte.

2.1. Die Bedeutung von *Bacillus subtilis* für Forschung und Industrie

Das ubiquitär verbreitete und Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis* ist in der heutigen Forschung der Modellorganismus für die Firmicutes. Zu den Firmicutes gehören z. B. der Wundbranderreger *Clostridium perfringens* und das zellwandlose Bakterium *Mycoplasma pneumoniae*. *B. subtilis* ist aufgrund seiner natürlichen Kompetenz genetisch einfach zu manipulieren. Die genetische Handhabung des Bakteriums wurde durch die Sequenzierung des Genoms weiter erleichtert (Kunst *et al.*, 1997). Das Genom von *B. subtilis* besitzt eine Größe von circa 4,3 Mb und weist einen niedrigen GC-Gehalt auf. Die 2 bis 3 µm großen Zellen des Bakteriums sind peritrich begeißelt und können sich dadurch schnell fortbewegen.

Durch die natürliche Bereitschaft von *B. subtilis* DNA aufzunehmen konnten erstmalig Verfahren zur Erstellung von Genkarten des bakteriellen Genoms entwickelt werden (Dubnau, 1967; Lepesant-Kejzlarova *et al.*, 1975). Aufgrund der Eigenschaft von *B. subtilis,* hitzeresistente Endosporen zu bilden, ist das Bakterium ein Modellsystem zur Beschreibung der Vorgänge bei der Zelldifferenzierung (Barak *et al.*, 2005). *B. subtilis* ist im Gegensatz zu einigen verwandten *Bacillus*-Arten, z. B. *B. anthracis* oder *B. cereus*, apathogen. Die Erforschung von *B. subtilis* kann deshalb zum Verständnis der Lebensweise der pathogenen Verwandten des Bakteriums beitragen.

B. subtilis ist nicht nur ein interessantes Untersuchungsobjekt in der Forschung. Das Bakterium wird in der Industrie zur Gewinnung von Antibiotika und Enzymen eingesetzt. Zu

den bekanntesten Antibiotika, die von *B. subtilis* gebildet werden, gehört das Polypeptidantibiotikum Bacitracin (Craig *et al.*, 1949). Dieses Antibiotikum hemmt die Zellwandsynthese einiger Gram-positiver Bakterien, wie z. B. *Staphylococcus aureus* (Krawitt & Ward, 1963; Chatterjee & Park, 1964). Aufgrund seiner nierenschädigenden Wirkung wird es heutzutage nur noch zur Behandlung von Hautinfektionen oder in der Veterinärmedizin als Futtermittelzusatz eingesetzt (Kunin, 1967). Enzyme, wie z. B. Amylasen und Lipasen sowie die Endoprotease Subtilisin, werden ebenfalls in großem Umfang mit Hilfe von *B. subtilis* gewonnen (Pierce *et al.*, 1992). Diese Enzyme werden in der Industrie als Waschmittelzusätze verwendet.

Neben der Produktion von Antibiotika und interessanter Enzyme wird *B. subtilis* in der Industrie außerdem zur Synthese von Riboflavin (Vitamin B2) eingesetzt. Riboflavin dient als Vorstufe der Flavocoenzyme FAD und FMN. Der menschliche Organismus kann Riboflavin nicht synthetisieren und muß das Vitamin daher mit der Nahrung aufnehmen. Riboflavin wird vielen Lebensmitteln zugesetzt, um die Qualität dieser Lebensmittel zu steigern. Bis vor wenigen Jahren beruhte die industrielle Herstellung von Riboflavin ausschließlich auf einem chemisch-technischen Verfahren. Dieses Verfahren zur Riboflavinherstellung ist jedoch aufgrund höherer Kosten nahezu vollständig durch die biotechnologische Riboflavingewinnung mit Hilfe von *B. subtilis* verdrängt worden (Bacher *et al.*, 2000).

2.2. Mikrobielle Regulationsvorgänge

Das Bodenbakterium *B. subtilis* ist beim Wachstum in seiner natürlichen Umgebung einer Vielzahl von physikalischen oder chemischen Einflüssen, wie z. B. Strahlung, starken Temperaturschwankungen oder osmotischem Streß ausgesetzt. Das Überleben des Bakteriums kann daher nur durch die Anpassung des Stoffwechsels an die physikalischen und chemischen Gegebenheiten des Habitats ermöglicht werden. *B. subtilis* kann sich durch Fortbewegung oder durch die Fähigkeit zur Bildung hitzeresistenter Sporen den störenden Umwelteinflüssen entziehen. Der Stoffwechsel des Bakteriums kann sich jedoch auch durch eine allgemeine Streßantwort auf ungünstige Umweltfaktoren einstellen. Bei Hitzeeinwirkung oder ungünstigen osmotischen Bedingungen wird in *B. subtilis* eine Auswahl von Genen

exprimiert, deren Produkte das Wachstum unter diesen ungünstigen Bedingungen ermöglichen (Boylan *et al.*, 1993; Hecker *et al.*, 1996; Helmann *et al.*, 2001).

Neben der Anpassung an physikalische und chemische Streßfaktoren muß das Bakterium auch mit dem Nährstoffangebot seines Habitates zurechtkommen. Dem heterotroph lebenden Bakterium *B. subtilis* stehen in seinem Lebensraum eine Vielfalt von Polysacchariden, Proteinen, Peptiden, Lipiden und Nukleinsäuren zur Verfügung. Durch die schnelle Aufnahme und Verwertung der zur Verfügung stehenden Nährstoffe wird es dem Bakterium ermöglicht, sich gegen die in der Rhizosphäre befindlichen konkurrierenden Mikroorganismen durchzusetzen. *B. subtilis* kann eine Vielzahl von Polymeren durch seine reiche Ausstattung an hydrolysierenden Enzymen (z. B. α-Amylase, Mannanasen, Levanase, Proteasen, Lipasen, Nukleasen, u.a.) in ihre Monomere zerlegen und nach anschließender Aufnahme zum Wachstum nutzen (Yamazaki *et al.*, 1983; Araujo & Ward, 1990; Martin *et al.*, 1987). Die energiereichen C-Quellen können durch verschiedene Aufnahmesysteme in das Bakterium transportiert werden. Zum einen können die C-Quellen durch einfache Transportprozesse, wie z. B. erleichterte Diffusion, mit Hilfe von ATP-Transportern, durch Symporter und Antiporter, in die Zelle gelangen (Saier, 2002). Zum anderen können die Kohlenhydrate auch durch ein spezielles Aufnahmesystem, das Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferasesystem (PTS), in die Zelle transportiert werden (Postma *et al.*, 1993).

2.3. Das PTS

2.3.1. Der Aufbau des PTS

Bakterien können Zucker mit Hilfe eines speziellen Transportsystems, dem Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferasesystem (PTS), aufnehmen. Das PTS unterscheidet sich von anderen Transportsystemen dadurch, daß der Zucker bei seiner Aufnahme gleichzeitig phosphoryliert wird und dadurch direkt in die Glykolyse einfließen kann (Abb. 2.1.). Das PTS besteht aus den allgemeinen Komponenten, dem Enzym I (EI) und dem kleinen hitzestabilen Protein HPr sowie einer für die C-Quelle spezifischen Permease, dem Enzym II (EII). Die Permease besteht aus mindestens drei Domänen bzw. Proteinen (Postma *et al.*, 1993). Die glukosespezifische Permease EII^{Glc} von *B. subtilis* setzt sich beispielsweise aus den zwei cytoplasmatischen Domänen, $EIIA^{Glc}$ und $EIIB^{Glc}$, sowie der

membrangebundenen Domäne, dem $EIIC^{Glc}$, zusammen (Zagorec and Postma, 1992; Postma *et al.*, 1993).

Bei der durch das PTS katalysierten Aufnahme von Glukose wird der Zucker phosphoryliert, wobei der Phosphatrest von Phosphoenolpyruvat (PEP), einem Intermediat der Glykolyse, in einer Phosphorylierungskaskade zunächst über das EI auf HPr übertragen wird (Abb. 2.1.).

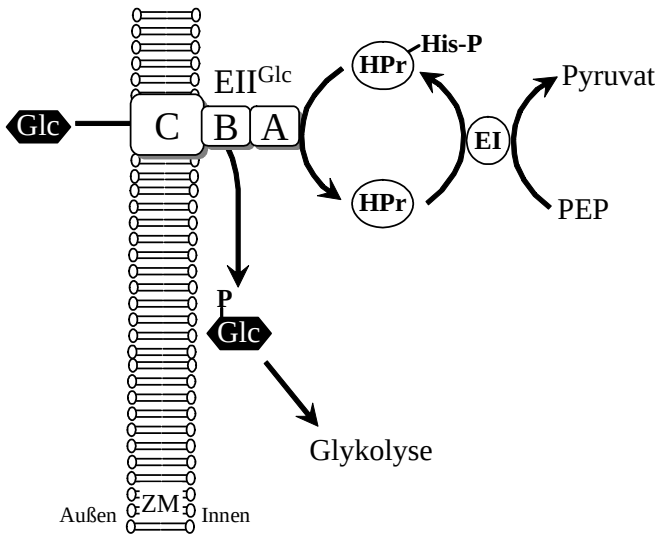

Abb. 2.1. Glukosetransport durch das PTS in *B. subtilis*.

Bei der Übertragung der Phosphatgruppe von PEP über EI, HPr und EIIAB auf die Glukose wird der Zucker durch die Permease EIIC in die Zelle transportiert. Glukose-6-Phosphat wird in der Glykolyse weiter umgewandelt.

ZM = Zellmembran, Glc = Glukose.

Das am His15-Rest phosphorylierte HPr (HPr-His-P) überträgt den Phosphatrest auf die $EIIA^{Glc}$-Domäne des glukosespezifischen EII. Die $EIIB^{Glc}$-Domäne übernimmt den Phosphatrest von der $EIIA^{Glc}$-Domäne und überträgt ihn schließlich auf die Glukose. Nach seiner Phosphorylierung und Translokation durch die $EIIC^{Glc}$-Domäne des EII^{Glc} kann der Zucker dann in der Glykolyse weiter umgewandelt werden.

2.3.2. Regulatorische Einflüsse des PTS auf den bakteriellen Stoffwechsel

Unter den Transportsystemen nimmt das PTS eine besondere Rolle ein, da es neben der Aufnahme von Kohlenhydraten auch in viele regulatorische Vorgänge der Zelle involviert ist (Postma *et al.*, 1993; Stülke & Schmalisch, 2004). Das PTS spielt sowohl in *B. subtilis* als auch in *E. coli* eine wichtige Rolle beim Auffinden von verwertbaren Kohlenhydraten. Die Information über die Anwesenheit von Zuckern, die über das PTS aufgenommen werden können, kann durch Komponenten des PTS an das chemotaktische System weitergeleitet werden und erleichtert dem Bakterium die Lokalisation dieser C-Quelle (Lengeler *et al.*, 1989; Bischoff & Ordal, 1992; Garrity *et al.*, 1998).

Neuerdings gibt es Hinweise dafür, daß die pathogenen Eigenschaften einiger Bakterien durch das PTS reguliert werden (Deutscher *et al.*, 2005). In dem Gram-positiven pathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* wird die Epression der Virulenzgene durch die C-Quelle reguliert. Es konnte gezeigt werden, daß in Gegenwart von Glukose das Regulatorprotein PrfA, welches die Transkription der Virulenzgene aktiviert, durch Komponenten des PTS inhibiert wird (Herro *et al.*, 2005).

Die Kohlenstoff-Katabolitenrepression

Beim Wachstum in Gegenwart von zwei verschiedenen C-Quellen, z. B. Glukose und Maltose, verwertet *B. subtilis* zuerst den bevorzugten Zucker Glukose, da dieser Zucker die höchste Wachstumsrate ermöglicht. Erst dann, wenn die Glukose verbraucht ist, wird die zweitrangige C-Quelle genutzt. Die C-Quellen-abhängige Repression der Gene, deren Produkte für die Aufnahme und Verwertung alternativer C-Quellen benötigt werden, bezeichnet man als Kohlenstoff-Katabolitenrepression (CCR; Stülke & Hillen, 1999; Stülke & Hillen, 2000). Die CCR wurde zuerst bei *B. subtilis* entdeckt (Monod, 1942). Bei der CCR in *B. subtilis* spielt die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrKP) eine zentrale Rolle. Das Enzym kann, unter Verwendung von ATP als Phosphatdonor, sowohl das HPr als auch das funktionell homologe Protein Crh an dem konservierten Rest der Aminosäure Serin (Ser-46) phosphorylieren (Galinier *et al.*, 1997). Die phosphorylierten Proteine HPr-Ser-P bzw. Crh-Ser-P agieren als Korepressoren von CcpA (**c**atabolite **c**ontrol **p**rotein **A**), dem globalen Regulatorprotein des C-Stoffwechsels (Henkin *et al.*, 1991; Henkin, 1996; Jones *et al.*, 1997;

Kraus *et al.*, 1998; Schumacher *et al.*, 2004). Das Crh-Protein besitzt im Gegensatz zu HPr keine Phosphorylierungstelle an Postion 15 und spielt bei der CCR eine untergeordnete Rolle (Galinier *et al.*, 1997; Görke *et al.*, 2004). Der HPr-Ser-P-CcpA- bzw. Crh-Ser-P-CcpA-Proteinkomplex kann an sogenannte *cre*-Sequenzen (**c**atabolite **r**esponsive **e**lements) binden (Abb. 2.2.). Die *cre*-Sequenzen sind spezifische Bindestellen, die sich in Promotorbereichen kataboler Gene oder auch im Leserahmen CcpA-regulierter Gene befinden können (Deutscher *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1995; Galinier *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2005).

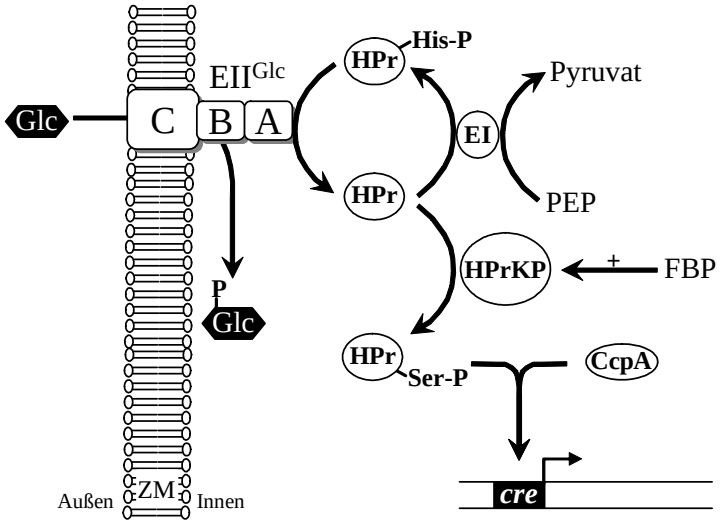

Abb. 2.2. Die CCR in *B. subtilis*.

Der Phosphorylierungsstatus von HPr reguliert die CCR. In Anwesenheit von Glukose kann HPr durch die HPrKP am Serin 46 phosphoryliert werden. HPr-Ser-P reprimiert im Komplex mit CcpA durch die Bindung an *cre*-Seuqenzen die Transkription kataboler Operons.

ZM = Zellmembran, Glc = Glukose, FBP = Fruktose-1,6-Bisphosphat, *cre* = catabolite responsive elements.

Unter den Genen, welche durch CcpA reguliert werden, gibt es sowohl Gene, deren Transkription durch CcpA aktiviert wird, als auch solche, die durch CcpA reprimiert werden. Die CcpA-abhängig regulierten Gene können zwei Klassen zugeordnet werden (Blencke *et al.*, 2003). Zur ersten Klasse gehören Gene, die direkt durch CcpA reguliert werden. In *B. subtilis* werden die Gene *pta* und *ackA*, die für die Enzyme des Überflußstoffwechsels kodieren, beim Wachstum mit Glukose direkt durch CcpA aktiviert. In den Promotorbereichen beider Gene befinden sich *cre*-Sequenzen (Grundy *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 1999; Presecan-Siedel *et al.*, 1999; Tobisch *et al.*, 1999). Die Synthese der β-Glukanase, eines glukanhydrolysierenden Enzyms, wird hingegen CcpA-abhängig reprimiert (Krüger *et al.*, 1993). Auch das *xyl*-Operon wird beim Wachstum mit Glukose durch CcpA reprimiert

(Jacob *et al.*, 1991; Kraus *et al.*, 1994). Ein weiteres Beispiel für eine glukoseabhängige Repression, die direkt durch CcpA vermittelt wird, ist das *rocG*-Gen. Dieses Gen kodiert für eine Glutamatdehydrogenase und wird in Gegenwart von Glukose durch CcpA reprimiert (Belitsky & Sonenshein, 1998; Belitsky *et al.*, 2004).

In die zweite Klasse fallen Gene, die in ihrem Promotorbereich keine Bindestelle für CcpA haben, deren Expression jedoch indirekt durch CcpA reguliert wird. Das *gapA*-Operon und das *gltAB*-Operon können dieser Klasse zugeordnet werden. Das *gapA*-Gen kodiert für das Schlüsselenzym der Glykolyse, die Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase (Doan & Aymerich, 2003). Das *gapA*-Gen wird wie das *gltAB*-Operon, welches für die Glutamatsynthase (GOGAT) kodiert, beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart von Glukose indirekt durch CcpA aktiviert. In der *ccpA*-Mutante können das *gapA*- und das *gltAB*-Operon durch Glukose nicht induziert werden (Ludwig *et al.*, 2002a; Wacker *et al.*, 2003).

Es gibt unter den C-Quellen, die von *B. subtilis* verwertet werden können, sowohl C-Quellen, die eine starke CCR ausüben, als auch solche, die zu einer geringen CCR führen (Stülke & Hillen, 1999). Es ist bisher nicht bekannt, durch welche Eigenschaften der C-Quelle das Ausmaß der CCR bestimmt wird (Schmalisch, 2004). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der HPrKP sowie die Bindung zwischen dem HPr-Ser-P-CcpA-Komplex und der *cre*-Sequenz durch Fruktose-1,6-Bisphosphat (FBP) stimuliert wird (Ramström *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 2005). Eine Korrelation zwischen der intrazellulären FBP-Konzentration und der CCR konnte jedoch nicht hergestellt werden (Schmalisch, 2004).

Die Phänotypen der *ccpA*-Mutante

Die Phänotypen der *ccpA*-Mutante lassen sich klar voneinander unterscheiden. Zum einen gibt es in der *ccpA*-Mutante keine CCR. Solche Gene, die beim Wachstum des Wildtypstamms in Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose durch CcpA aktiviert oder reprimiert werden, sind in der *ccpA*-Mutante nicht mehr durch Glukose reguliert. Zum anderen hat die *ccpA*-Mutante einen Wachstumsdefekt. Die *ccpA*-Mutante ist im Gegensatz zum Wildtypstamm nicht in der Lage, mit Glukose und Ammonium als C- und N-Quelle (C-Glc-Medium) zu wachsen. Die Glutamatauxotrophie der *ccpA*-Mutante in C-Glc-Medium ist auf die fehlende Expression der GOGAT zurückzuführen. Der Wachstumsdefekt der *ccpA*-

Mutante kann daher behoben werden, wenn dem Medium der Aminogruppendonor Glutamat zugesetzt wird (Faires *et al.*, 1999). Die Glutamatauxotrophie der *ccpA*-Mutante kann auch aufgehoben werden, wenn das *gltAB*-Operon artifiziell induziert wird (Wacker *et al.*, 2003).

Wie bereits oben erwähnt, können in der *ccpA*-Mutante sowohl das *gapA*- als auch das *gltAB*-Operon durch Glukose nicht induziert werden. Die Ursache dafür, daß in der *ccpA*-Mutante diese Operons in Gegenwart von Glukose nicht exprimiert werden, ist die verringerte Glukoseaufnahme durch die *ccpA*-Mutante (Ludwig *et al.*, 2002a; Wacker *et al.*, 2003). Die HPrKP ist in der *ccpA*-Mutante hyperaktiv und phosphoryliert das HPr am Serinrest vollständig. Da sich die beiden Phosphorylierungsstellen am HPr gegenseitig ausschließen, kann HPr in der HPr-Ser-P-Form nicht am His-Rest phosphoryliert werden (Reizer *et al.*, 1998). Die Folge ist eine verringerte Glukoseaufnahme, da der für die Aufnahme erforderliche Phosphatrest durch das HPr nicht mehr geliefert werden kann. Die Glukoseaufnahme kann jedoch wiederhergestellt werden, wenn das Serin an Position 46 von HPr gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht wird (*ptsH1*-Mutation). Durch die Wiederherstellung der Glukoseaufnahme in der *ccpA ptsH1*-Doppelmutante können sowohl das *gapA*-Operon als auch das *gltAB*-Operon durch Glukose wieder induziert werden und der Stamm ist in der Lage, in C-Glc-Medium zu wachsen (Ludwig *et al.*, 2002a; Wacker *et al.*, 2003).

Der Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante in C-Glc-Medium ist jedoch nicht alleine auf die Glutamatauxotrophie zurückzuführen. Durch den Zusatz von Glutamat zu C-Glc-Medium erreicht die *ccpA*-Mutante nicht die Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtypstamms. Es konnte gezeigt werden, daß in der *ccpA*-Mutante das *ilv-leu*-Operon, welches für Enzyme kodiert, die an der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Valin und Leucin beteiligt sind, nicht so stark wie im Wildtypstamm exprimiert wird. CcpA aktiviert in Gegenwart von Glukose das *ilv-leu*-Operon (Ludwig *et al.*, 2002b; Tojo *et al.*, 2005; Shivers & Sonenshein, 2005). Der Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante ist daher erst durch den Zusatz der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Valin und Leucin sowie der Aminosäuren Methionin und Glutamat zu C-Glc-Medium vollständig aufgehoben (Ludwig *et al.*, 2002b). Da der Einfluß von CcpA auf die Expression des *ilv-leu*-Operons eher schwach ist, das *gltAB*-Operon hingegen durch CcpA stark aktiviert wird, ist der Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante hauptsächlich auf die Glutamatauxotrophie zurückzuführen.

2.4. Koordination von Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsel

2.4.1. Regulation zentraler Stoffwechselwege durch die C- und N-Quelle

Wie in allen Organismen, so sind auch in *B. subtilis* der C-Stoffwechsel und der N-Stoffwechsel durch die Synthese von Glutamat miteinander verknüpft (Abb. 2.3.; Commichau *et al.*, 2006a). Die Aminosäuren Glutamat und Glutamin sind die Aminogruppendonoren für nahezu alle N-haltigen Verbindungen in der Zelle. Sowohl Glutamat als auch Glutamin liefern die Aminogruppen für die Synthese der Purine und Pyrimidine sowie alle anderen Aminosäuren in der Zelle (Schreier, 1993). Damit die Glutamatsynthese effizient ablaufen kann, müssen der C-Stoffwechsel und der N-Stoffwechsel sehr präzise aufeinander abgestimmt werden. Es ist zum einen für das Bakterium nicht sinnvoll, die Enzyme der Glutamatsynthese stark zu exprimieren, wenn α-Ketoglutarat als Vorstufe für den Aminogruppendonor Glutamat vom C-Stoffwechsel nicht nachgeliefert werden kann. Zum anderen sollten glutamatabbauende Enzyme nur dann gebildet werden, wenn die Zelle mit Glutamat oder einer N-Quelle, die in Glutamat umgewandelt werden kann (z. B. Arginin), gut versorgt wird (Abb. 2.3.; Abschnitt 2.5.2.). Die Glutamatsynthese und auch die Glutamatverwertung werden deshalb sowohl durch Signale des C-Stoffwechsels als auch durch Signale des N-Stoffwechsels reguliert (Commichau *et al.*, 2006a). Wie bereits in Abschnitt 2.3.2. erwähnt wird das *ilv-leu*-Operon, welches für Enzyme kodiert, die an der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin beteiligt sind, durch Glukose CcpA-abhängig aktiviert (Tojo *et al.*, 2005; Shivers & Sonenshein, 2005). Mit Hilfe einer Microarray-Analyse wurde entdeckt, daß das globale Regulatorprotein des N-Stoffwechsels TnrA beim Wachstum von *B. subtilis* mit einer schlechten N-Quelle (z. B. Glutamat), das *ilv-leu*-Operon reprimiert (Yoshida *et al.*, 2003). Beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart der bevorzugten N-Quelle Glutamin und guter Ammoniumversorgung wird das *ilv-leu*-Operon nicht durch TnrA reprimiert (Tojo *et al.*, 2004; Tojo *et al.*, 2005; Shivers and Sonenshein, 2005). Die Synthese der der verzweigtkettigen Aminosäuren wird also zum einen durch die C-Quelle reguliert, und ist zum anderen auf die Verfügbarkeit von Glutamin sowie die Glutaminsynthese angepaßt. Erst wenn *B. subtilis* mit guten C- und N-Quellen, wie z. B. Glukose und Glutamin, wächst, wird das *ilv-leu*-Operon stark exprimiert.

In *B. subtilis* werden nicht nur die Glutamatsynthese und die Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren durch Signale des C- und N-Stoffwechsels reguliert, sondern

auch zentrale Stoffwechselwege, wie z. B. einige Gene der Glykolyse und des Citratzyklus (TCC; Rosenkrantz *et al.*, 1985). Das *citB*-Gen, welches für die Aconitase kodiert, wird synergistisch durch Glukose und Glutamat reprimiert (Blencke *et al.*, 2006). Die Regulation des *citB*-Gens durch die C-Quelle ist bereits gut untersucht worden. Beim Wachstum von *B. subtilis* mit Glukose wird das *citB*-Gen indirekt durch das globale Regulatorprotein CcpA und direkt durch den spezifischen Regulator CcpC reprimiert (Kim *et al.*, 2002a, 2002b; Kim *et al.*, 2003). Die Regulation der Expression der Aconitase durch die N-Quelle ist noch nicht vollständig verstanden. Das *citB*-Gen wird durch alle N-Quellen reprimiert, die in α-Ketoglutarat und Ammonium umgewandelt werden können. Die katabole Glutamatdehydrogenase RocG, welche die Umwandlung von Glutamat zu α-Ketoglutarat und Ammonium katalysiert, scheint in die Regulation des *citB*-Gens involviert zu sein (Blencke *et al.*, 2006). Das *rocG*-Gen wird durch Arginin induziert und durch Glukose CcpA-abhängig reprimiert (siehe Abschnitt 2.5.2.; Belitsky & Sonenshein, 1998; Belitsky *et al.*, 2004).

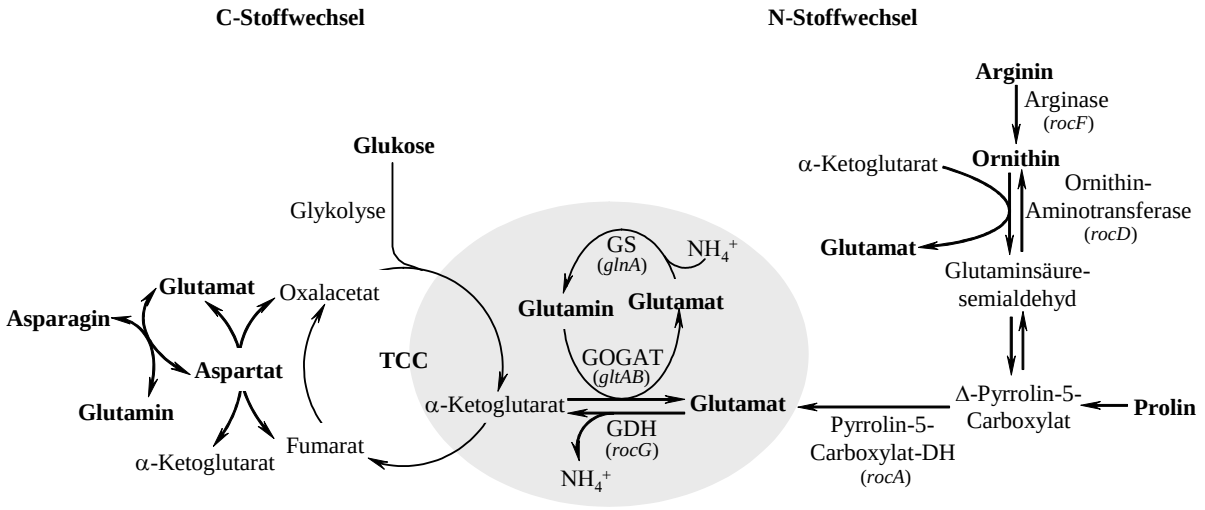

Abb. 2.3. Die Verknüpfung von C- und N-Stoffwechsel.

Bei der Glutamatsynthese in *B. subtilis* wird durch die GS die Aminogruppe von Glutamin auf α-Ketoglutarat, welches aus dem Citratzyklus abgezogen wird, übertragen. Der GOGAT-Zyklus ist grau unterlegt. In Klammern sind die Gene dargestellt, die für die entsprechenden Enzyme kodieren. Die Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin, Arginin, Ornithin und Prolin können in Glutamat umgewandelt und als Aminogruppendonor genutzt werden.

TCC = Citratzyklus; GS = Glutaminsynthethase; GOGAT = Glutamatsynthase; GDH = Glutamatdehydrogenase.

Die Regulation des *gapA*-Operons ist neben der Regulation des TCC ein weiteres Beispiel für die Regulation zentraler Stoffwechselwege durch die C- und die N-Quelle. Das *gapA*-Operon kodiert neben der Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase, dem zentralen Enzym der Glykolyse, für weitere Enzyme der Glykolyse (Fillinger *et al.*, 2000). Das *gapA*-Operon wird synergistisch durch die Inaktivierung des Repressors CggR beim Wachstum mit Glukose und verzweigtkettigen Aminosäuren induziert (Abschnitt 2.3.2.; Ludwig *et al.*, 2001).

2.4.2. Ein spezifisches PTS stellt eine direkte Verbindung zwischen C- und N-Stoffwechsel her

Sowohl *E. coli* als auch viele andere Proteobakterien besitzen ein spezifisches PTS, welches nicht an der Aufnahme von Kohlenhydraten beteiligt ist, sondern in die Regulation des N-Stoffwechsels involviert ist (Commichau *et al.*, 2006a). Die Gene *ptsP*, *ptsO* und *ptsN*, die für die paralogen Proteine des Zucker-PTS kodieren, sind in einem Operon zusammen mit einem Gen lokalisiert, welches den alternativen Sigmafaktor σ^{54} der RNA-Polymerase kodiert. Dieser Sigmafaktor ist in die Regulation vieler Gene des N-Stoffwechsels involviert (Buck *et al.*, 2000; Reitzer & Schneider, 2001). Die Proteine wurden daher als EI^{Ntr}, NPr und $EIIA^{Ntr}$ bezeichnet (Reizer *et al.*, 1992). Die Permeasedomäne des EII fehlt bei diesem spezifischen PTS, es existiert nur die phosphorylierbare Permeasedomäne $EIIA^{Ntr}$. Ausgehend von PEP kann der Phosphatrest über EI^{Ntr} und NPr auf $EIIA^{Ntr}$ übertragen werden. Der Phosphattransfer ist spezifisch und es findet keine Interaktion mit den Komponenten des zuckerspezifischen PTS statt (Rabus *et al.*, 1999).

ptsN-Mutanten von *E. coli*, die das $EIIA^{Ntr}$ nicht exprimieren, zeigen in Abwesenheit von Ammonium und in Gegenwart bestimmter C-Quellen (z. B. Intermediate des TCC) und der N-Quelle Alanin einen Wachstumsdefekt (Powell *et al.*, 1995). Wie der Wildtyp so ist auch die *ptsN*-Mutante nicht in der Lage, in Gegenwart von leucinhaltigen Peptiden zu wachsen, da es zur Akkumulation von Leucin in der Zelle kommt. Leucin inhibiert die Acetolactatsynthase, ein Schlüsselenzym bei der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Neuere Untersuchungen zeigten, daß die nichtphosphorylierte Form des $EIIA^{Ntr}$ die Aktivität der Acetolactatsynthase stimuliert und das Wachstum in Gegenwart leucinhaltiger Peptide ermöglicht. Sowohl *ptsP*- als auch *ptsO*-Mutanten, in denen die Übertragung des Phosphatrests von PEP auf $EIIA^{Ntr}$ unterbrochen ist,

können ebenfalls in Gegenwart leucinhaltiger Peptide wachsen. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Expression der Acetolactatsynthase durch unphosphoryliertes $EIIA^{Ntr}$ aktiviert wird (Lee *et al.*, 2005). Es kann daher angenommen werden, daß die Komponenten des „N-PTS“ eine wichtige Rolle bei der Abstimmung zwischen dem C- und dem N-Stoffwechsel (z. B. der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren in *E. coli*) spielt.

2.5. Die Wege der Ammoniumassimilation und der Glutamatstoffwechsel

Mikroorganismen können den Aminogruppendonor Glutamat auf verschiedene Weise synthetisieren. Es lassen sich vier Synthesewege voneinander unterscheiden (Schreier, 1993): (i) Die Aminierung von α-Ketoglutarat zu Glutamat im GOGAT-Zyklus (Abb. 2.3.). Bei der Glutamatsynthese durch den GOGAT-Zyklus wird zunächst in einer ATP-abhängigen Reaktion, die durch die Glutaminsynthetase (GS) katalysiert wird, Ammonium auf Glutamat übertragen, wobei ein Molekül Glutamin entsteht. Die folgende glutamatliefernde Reaktion wird durch das zentrale Enzym des GOGAT-Zyklus, die GOGAT, katalysiert. Die GOGAT überträgt die δ-Aminogruppe von Glutamin auf α-Ketoglutarat und nutzt dafür $NADPH_2$ als Kofaktor. Aus dieser Reaktion gehen zwei Moleküle Glutamat hervor. Ein Glutamatmolekül steht für die Ammoniumassimilation der GS als Akzeptormolekül zur Verfügung und das andere Glutamatmolekül kann im bakteriellen Stoffwechsel für die Synthese anderer N-haltiger Verbindungen als Aminogruppendonor genutzt werden. (ii) Die reduktive Aminierung von α-Ketoglutarat durch die Glutamatdehydrogenase (GDH). Die GDH überträgt, unter Verwendung von $NADH_2$ oder $NADPH_2$ als Kofaktor, Ammonium auf α-Ketoglutarat. Die meisten Organismen nutzen die anabole Funktion der GDH zur Assimilation von Ammonium (Schreier, 1993). (iii) Durch eine Transaminierungsreaktion, bei der die α-Aminogruppe einer Aminosäure auf α-Ketoglutarat übertragen wird. Diese Reaktion kann z. B. durch eine Glutamat:α-Ketoglutarat-Aminotransferase katalysiert werden. (iv) Durch den Abbau von Aminosäuren zu Glutamat. Die Glutaminase katalysiert in *B. subtilis* die Umwandlung von Glutamin zu Glutamat (Satomura *et al.*, 2005).

2.5.1. Ammoniumassimilation in *E. coli*

Das Gram-negative Bakterium *E. coli* kann verschiedene N-Quellen verwerten. Als bevorzugte N-Quelle nutzt *E. coli* jedoch Ammonium, da mit dieser N-Quelle die höchsten Wachstumsraten erreicht werden (Reitzer, 2003). *E. coli* kann Ammonium sowohl über die GS (ein Enzym des GOGAT-Zyklus) als auch mit Hilfe einer anabolen GDH assimilieren (Helling, 1994; Helling, 1998).

Beim Wachstum von *E. coli* in Gegenwart geringer Ammoniumkonzentrationen kommt es zu einer globalen Änderung der Genexpression in der Zelle. Diese kollektive Antwort des Stoffwechsels auf die schlechte Ammoniumversorgung der Zelle wird als Ntr-response (**ni**t**r**ogen-**r**egulated response) bezeichnet (Reitzer, 2003). Eine zentrale Rolle bei der „Ntr-response“ spielt ein Zweikomponentensystem, welches aus der Kinase NtrB und dem Regulatorprotein NtrC besteht. Bei schlechter N-Versorgung wird der Regulator NtrC durch die NtrB phosphoryliert und aktiviert die Expression von mehr als 100 Enzymen, die die Aufnahme und Umwandlung alternativer N-Quellen katalysieren (Reitzer, 2003). Unter den aktivierten Genen ist auch das *gln ntrAB*-Operon, welches für die GS und die Proteine NtrB und NtrC des Zweikomponentensystems kodiert (Magasanik, 1989). Zur Steigerung der Ammoniumaufnahme wird die Expression des *amtB*-Gens, welches für den Ammoniumtransporter AmtB kodiert, ebenfalls durch den phosphorylierten Regulator NtrC-P aktiviert. Da die GS eine höhere Affinität zu Ammonium aufweist als die GDH, wird bei geringen Ammoniumkonzentrationen Ammonium mit Hilfe der GS assimiliert (Helling, 1994; Helling, 1998; Reitzer, 2003).

Bei hohen Ammoniumkonzentrationen wird in *E. coli* das Ammonium hauptsächlich mit Hilfe der GDH assimiliert. Die Umschaltung von der Ammoniumassimilation durch GS auf die GDH-abhängige Ammoniumassimilation wird in *E. coli* durch das regulatorische PII-Protein, welches durch das *glnB*-Gen kodiert wird, gesteuert (Reitzer, 2003). PII-Proteine existieren sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Organismen und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des N-Stoffwechsels (Arcondéguy *et al.*, 2001; Ninfa & Jiang, 2005). *E. coli* besitzt neben dem PII-Protein das paraloge PII-Protein GlnK. Dieses Protein wird zusammen mit dem *amtB*-Gen im *glnk amtB*-Operon kodiert. GlnK kann die Funktionen von PII teilweise übernehmen (van Heeswijk *et al.*, 1996; Atkinson & Ninfa, 1998). Bei guter Versorgung mit Ammonium wird die GS schwächer exprimiert, da durch das PII der Phosphattransfer zwischen der Kinase NtrB und dem Aktivatorprotein NtrC

unterbunden wird (Reitzer, 2003). Der unphosphorylierte Regulator NtrC kann sowohl die Expression des *gln ntrAB*-Operons als auch die des *amtB*-Gens sowie der übrigen Gene des Ntr-Regulons nicht aktivieren. Die schwach exprimierte GS wird bei einer hohen Glutaminkonzentration zusätzlich durch eine kovalente Modifizierung (Adenylylierung) inhibiert (Reitzer, 2003). Die Adenylylierung wird durch die Adenylyltransferase (AT) katalysiert, deren Aktivität ebenfalls durch das PII stimuliert wird (Rhee *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1998). Die Ammoniumaufnahme über den Transporter AmtB wird durch das zweite PII-Protein GlnK reguliert (Durand & Merrick, 2006). Sobald die Ammoniumversorgung schlechter wird und der α-Ketoglutaratspiegel in der Zelle steigt werden sowohl PII als auch GlnK durch Uridylylierung inhibiert (PII-UMP bzw. GlnK-UMP). Das PII-UMP kann die Adenylylierungsfunktion der AT nicht mehr stimulieren, es aktiviert jedoch die Deadenylylierung der GS durch die AT. Damit steht die hochaffine GS für die Ammoniumassimilation wieder zur Verfügung. Das modifizierte PII-Protein kann auch den Phosphattransfer zwischen der Kinase NtrB und dem Aktivatorprotein NtrC nicht mehr verhindern. Somit können bei schlechter Ammoniumversorgung wieder solche Gene durch den Regulator NtrC aktiviert werden, die die Aufnahme und Umwandlung alternativer N-Quellen katalysieren (Ntr-response).

In *E. coli* entscheidet daher der Zustand des regulatorischen PII-Proteins darüber, ob Ammonium über die hochaffine und energieaufwendige Reaktion der GS, oder mit Hilfe der energetisch günstigeren aber niedrigaffinen GDH, assimiliert wird. Der Zustand bzw. der regulatorische Einfluß des PII-Proteins auf den N-Stoffwechsel von *E. coli* wird wiederum durch das Angebot der bevorzugten N-Quelle Ammonium bestimmt.

2.5.2. Ammoniumassimilation in *B. subtilis*

Im Gegensatz zu *E. coli* nutzt *B. subtilis* Glutamin als bevorzugte N-Quelle. In Abwesenheit von Glutamin kann jedoch auch Ammonium als N-Quelle genutzt werden. Die Ammoniumaufnahme erfolgt in *B. subtilis* durch das membranständige Transportprotein NrgA (Detsch & Stülke, 2003). Der Ammoniumtransporter NrgA wird neben dem Protein NrgB durch das *nrgAB*-Operon kodiert. Beim Wachstum in Gegenwart geringer Ammonium- und Glutaminkonzentrationen aktiviert TnrA, das globale Regulatorprotein des N-Stoffwechsels, das *nrgAB*-Operon (Wray *et al.*, 1996, Wray *et al.*, 2000). Die genaue

Funktion von NrgB im N-Stoffwechsel von *B. subtilis* ist bisher nicht bekannt. Das NrgB-Protein gehört zu den PII-Proteinen, die in den meisten Organismen (z. B. *E. coli*, siehe Abschnitt 2.5.1.) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gene des N-Stoffwechsels sowie der Regulation der Enzyme des N-Stoffwechsels spielen (Wray *et al.*, 1994; Ninfa & Jiang, 2005). Da es im NrgB-Protein keine der Modifizierungsstellen gibt, die für die PII-Proteine charakteristisch sind, ist auch nicht bekannt, ob das Protein in *B. subtilis* in Abhängigkeit von der N-Quelle modifiziert wird (Detsch & Stülke, 2003).

In *B. subtilis* erfolgt die Ammoniumassimilation ausschließlich durch die Übertragung von Ammonium durch die GS auf die Aminosäure Glutamat im GOGAT-Zyklus (Abb. 2.3.). Die Glutamatdehydrogenase ist in *B. subtilis* nicht an der Ammoniumassimilation beteiligt (Belitsky & Sonenshein, 1998).

Regulation der Glutaminsynthetase

Die GS wird in *B. subtilis* durch das *glnA*-Gen kodiert, welches Bestandteil des *glnAR*-Operons ist (Gardner & Aronson, 1984; Fisher *et al.*, 1984; Strauch *et al.*, 1988). In Gegenwart der bevorzugten N-Quelle Glutamin wird die Expression der GS durch die Bindung des Regulatorproteins GlnR im Promotorbereich des *glnRA*-Operons reprimiert (Brown & Sonenshein, 1996). Der Repressor GlnR wird durch das erste Gen des *glnRA*-Operons kodiert und gehört zur MerR-Familie von Transkriptionsregulatoren. GlnR reprimiert in Gegenwart von Glutamin auch die Expression des Regulators TnrA (Schreier *et al.*, 1989; Fisher, 1999; Zalieckas *et al.*, 2006). TnrA kann daher in Gegenwart von Glutamin keine der Gene und Operons aktivieren, deren Genprodukte an der Aufnahme und Umwandlung alternativer N-Quellen beteiligt sind (Wray *et al.*, 1996; Wray *et al.*, 2001). Beim Wachstum von *B. subtilis* mit Glutamat als einziger N-Quelle sowie in Abwesenheit von Ammonium und Glutamat reprimiert TnrA das *glnRA*-Operon. GlnR ist unter diesen Bedingungen nicht aktiv (Fisher, 1999; Zalieckas *et al.*, 2006). Durch die TnrA-abhängige Regulation des *glnRA*-Operons wird gewährleistet, daß die GS nur bei ausreichender Ammonium-Versorgung exprimiert wird.

Neben der Regulation der Expression der GS auf transkriptioneller Ebene wird die Aktivität des Enzyms durch Glutamin gehemmt (Deuel & Prusiner, 1974). Die durch Glutamin inhibierte GS kann mit dem Regulatorprotein TnrA interagieren (Wray *et al.*, 2001;

Fisher *et al.*, 2002; Wray & Fisher, 2005). Durch die Interaktion zwischen der GS und TnrA wird die Regulation der Gene des TnrA-Regulons verhindert. Bei *B. subtilis* steuert also sowohl die Ammonium- als auch die Glutaminversorgung der Zelle die Aktivität des globalen Regulatorproteins TnrA.

Die Glutamatsynthase: Aufbau des *gltAB*-Operons

Die GOGAT ist ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein und wird in *B. subtilis* durch das *gltAB*-Operon kodiert (Deshpande & Kane, 1980). Die große Untereinheit der GOGAT wird durch das *gltA*-Strukturgen kodiert, und katalysiert die Umwandlung von Glutamin und H_2O zu Glutamat und Ammonium. Das Ammoniummolekül wird unter Verwendung von $NADPH_2$ als Kofaktor durch die kleine Untereinheit des Enzyms, welche durch das *gltB*-Gen kodiert wird, auf α-Ketoglutarat übertragen (Matsuoka & Kimura, 1986).

Die Transkription des *gltAB*-Operons wird durch das Regulatorprotein GltC aktiviert (Bohannon & Sonenshein, 1989). Das Aktivatorprotein GltC gehört zur LysR-Familie von Transkriptionsregulatoren (Henikoff *et al.*, 1988, Schell, 1993). Bisher ist nicht bekannt, ob neben dem *gltAB*-Operon noch andere Gene bzw. Operons durch GltC reguliert werden. Das *gltC*-Gen liegt stromaufwärts vom *gltAB*-Operon, und die Promotoren sowie die regulatorischen Bereiche beider Gene sind überlappend angeordnet (Abb. 2.4.).

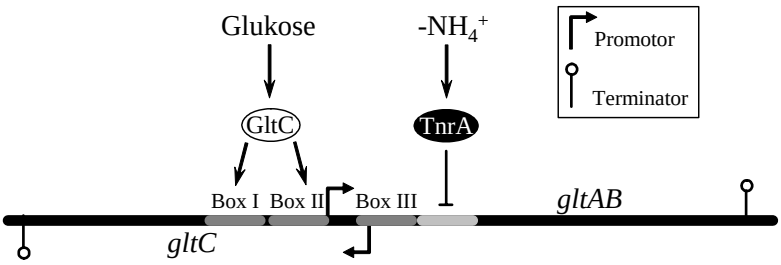

Abb. 2.4. Der Aufbau des *gltAB*-Operons.
Die Bindestellen von GltC sind mit Box I, Box II und Box III bezeichnet. TnrA bindet stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt des *gltAB*-Operons.

Die drei Bindestellen von GltC im *gltC*-*gltAB*-Promotorbereich (Box I, Box II und Box III) wurden durch Mutationsanalysen charakterisiert (Belitsky *et al.*, 1995; Belitsky &

Sonenshein, 1995). Die Bindung von GltC an Box I im *gltC-gltAB*-Promotorbereich bewirkt die Repression des *gltC*-Gens und damit die Inhibition der eigenen Synthese. Durch die negative Autoregulation wird die Menge des Aktivatorproteins GltC in der Zelle konstant gehalten (Reif, 2004; Belitsky *et al.*, 1995). Die Bindung von GltC an Box II bewirkt die Aktivierung der Transkription des *gltAB*-Operons. Die Funktion der dritten möglichen Bindestelle (Box III) ist bisher nicht bekannt (Belitsky *et al.*, 1995). Die Bindung von GltC im *gltC-gltAB*-Promotorbereich konnte noch nicht nachgewiesen werden (Reif, 2004; Belitsky *et al.*, 1995). Durch eine Punktmutation im *gltR*-Gen, welches für den LysR-Typ-Regulator GltR kodiert, kann die Funktion von GltC übernommen werden. Die Funktion des Wildtypproteins ist hingegen nicht bekannt (Belitsky & Sonenshein, 1997).

Die Glutamatsynthase: Regulation des *gltAB*-Operons

In *B. subtilis* wird der Aminogruppendonor Glutamat ausschließlich durch die GOGAT gebildet (Abb. 2.3.). *B. subtilis* besitzt keine anabole Glutamatdehydrogenase zur Assimilation von Ammonium (Belitsky & Sonenshein, 1998). Beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose und der N-Quelle Ammonium, aktiviert das Regulatorprotein GltC die Transkription des *gltAB*-Operons. In Abwesenheit von Ammonium bindet TnrA im Promotorbereich des *gltAB*-Operons und verhindert die Expression der GOGAT auch in Gegenwart von Glukose (Wray *et al.*, 1996; Belitsky *et al.*, 2000). Das Signal der C-Quelle, welches die Aktivierung des spezifischen Regulators GltC bewirkt, ist bisher nicht identifiziert worden. Die Aufnahme der bevorzugten C-Quelle Glukose ist jedoch für die Aktivierung der Expression des *gltAB*-Operons zwingend erforderlich. Es konnte gezeigt werden, daß in der *ccpA*-Mutante die Glukoseaufnahme über das PTS verringert ist und die GOGAT nicht mehr exprimiert wird (Ludwig *et al.*, 2002a; Wacker *et al.*, 2003). Die *ccpA*-Mutante ist daher auxotroph für Glutamat (siehe auch Abschnitt 2.3.2.; Faires *et al.*, 1999). Durch die Wiederherstellung der Glukoseaufnahme in der *ccpA ptsHI*-Doppelmutante wird das *gltAB*-Operon durch Glukose induziert und der Stamm ist nicht mehr glutamatauxotroph. Die artifizielle Induktion des *gltAB*-Operons ermöglicht der *ccpA*-Mutante ebenfalls in Gegenwart von Glukose und Ammonium den Aminogruppendonor Glutamat herzustellen (Wacker *et al.*, 2003). Die verringerte Glukoseaufnahme durch die

ccpA-Mutante ist daher die Ursache dafür, daß das Signal zur Aktivierung von GltC nicht generiert werden kann (Wacker *et al.*, 2003).

Das *gltAB*-Operon wird beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart von Glukose durch Glutamat schwach und durch Arginin stark reprimiert (Bohannon *et al.*, 1985; Wacker, 2002; Reif, 2004; Belitsky & Sonenshein, 2004). Der Mechanismus der Glutamat- bzw. Argininrepression ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Durch *in vitro*-Messungen konnte gezeigt werden, daß Glutamat die Aktivität von GltC inhibiert (Picossi-Goñi *et al.*, 2005). Es gibt auch Hinweise dafür, daß die katabole Glutamatdehydrogenase RocG in die Regulation des *gltAB*-Operons involviert ist (Belitsky & Sonenshein, 2004; Commichau *et al.*, 2006b). Durch die Inaktivierung der katabolen Glutamatdehydrogenase RocG wird die GOGAT unabhängig von der C-Quelle exprimiert (Belitsky *et al.*, 2004; Commichau *et al.*, 2006b). Es wird daher vermutet, daß RocG in Abwesenheit von Glukose das Aktivatorprotein GltC durch einen bisher unbekannten Mechanismus inaktiviert, und so die Repression des *gltAB*-Operons bewirkt. Die C-Quellen-abhängige Regulation des *rocG*-Gens könnte die obige Vermutung bestätigen. Es konnte gezeigt werden, daß das *rocG*-Gen durch C-Quellen, die zur CCR führen, reprimiert wird, da sich im Promotorbereich eine Bindestelle für CcpA befindet (Belitsky *et al.*, 2004). Die Verringerung der RocG-Menge in der Zelle durch die CCR könnte demnach die Ursache für die C-Quellen-abhängige Aktivierung der Expression des *gltAB*-Operons sein.

Die Repression des *gltAB*-Operons durch Glutamat oder eine gute Glutamatquelle wie z. B. Arginin ist physiologisch durchaus sinnvoll, da die Glutamatsynthese über den GOGAT-Zyklus ein energieverbrauchender Prozeß ist. Die Expression der GOGAT wird also genau auf die Verfügbarkeit der C- und N-Quellen abgestimmt.

Mutanten mit veränderter Regulation des *gltAB*-Operons

Wie bereits in Abschnitt 2.3.2. beschrieben kann die *ccpA*-Mutante mit der bevorzugten C-Quelle Glukose und Ammonium als N-Quelle nicht wachsen. Ausgehend von der *ccpA*-Mutante konnten *sgd*-Mutanten (**s**uppression of **g**rowth **d**efect) isoliert werden, die nicht mehr glutamatauxotroph sind. Im Gegensatz zum Laborstamm 168 sind diese Mutanten sogar in der Lage, mit Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle zu wachsen (Faires *et al.*, 1999; Wacker, 2002). Die isolierten *sgd*-Mutanten können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Es

gibt zum einen Mutanten, in denen das *gltAB*-Operon durch Glukose wieder induziert werden kann. Zum anderen gibt es Mutanten, in denen die Glutamatsynthase konstitutiv exprimiert wird. Die Ursachen, die zur Wiederherstellung der C-Quellen-abhängigen Regulation des *gltAB*-Operons, bzw. die zur konstitutiven Expression des *gltAB*-Operons führen, sind nicht bekannt (Faires *et al.*, 1999). In einer *sgd*-Mutante, die der zweiten Gruppe zugeordnet werden kann, konnte eine *in frame* Deletion im *rocG*-Gen, welches für die katabole Glutamatdehydrogenase RocG kodiert, identifiziert werden (Wacker, 2002). Wie bereits oben erwähnt wird die GOGAT in Abwesenheit von RocG unabhängig von der C-Quelle exprimiert. Es kann daher vermutet werden, daß RocG eine wichtige Rolle bei der Regulation des *gltAB*-Operons spielt (Commichau *et al.*, 2006b).

Die Funktion der Glutamatdehydrogenasen in *B. subtilis*

In *B. subtilis* kodieren sowohl das *rocG*- als auch das *gudB*-Gen für Glutamatdehydrogenasen (Belitsky & Sonenshein; 1998). Aufgrund einer Insertion von neun Basenpaaren in einem Bereich des *gudB*-Leserahmens, der für das aktive Zentrum des Enzyms kodiert, ist das GudB-Protein enzymatisch inaktiv. Durch den Verlust der Insertion im *gudB*-Gen kann GudB1 jedoch die Funktion von RocG übernehmen (Belitsky & Sonenshein, 1998). Das *rocG*-Gen kodiert für die enzymatisch aktive Glutamatdehydrogenase RocG. Beide Enzyme, sowohl RocG als auch das aktivierte Enzym GudB1, katalysieren *in vivo*, unter Verwendung von NAD^+ als Kofaktor, ausschließlich die oxidative Desaminierung von Glutamat zu α-Ketoglutarat und Ammonium. Die Verwendung von NAD^+ als Kofaktor ist für katabole Glutamatdehydrogenasen typisch (Smith *et al.*, 1975). RocG trägt daher in *B. subtilis* nicht zur Glutamatsynthese bei (Belitsky & Sonenshein, 1998). Erstaunlicherweise ist *B. subtilis* nicht in der Lage, Glutamat als alleinige C-Quelle zu verwerten (Belitsky & Sonenshein, 1998; Blencke, 2002). Vermutlich wird die enzymatisch aktive Glutamatdehydrogenase RocG zu schwach exprimiert, so daß die beim Glutamatabbau gebildete Menge des Kohlenstoffrückgrats α-Ketoglutarat nicht ausreicht, um das Wachstum mit Glutamat als C-Quelle zu ermöglichen.

Die Regulation der Expression der Glutamatdehydrogenasen

Damit die Transkription eines Gens iniitiert werden kann, muß die RNA-Polymerase durch einen sogenannten Sigmafaktor zu einer spezifischen Sequenz im Promotorbereich des Gens dirigiert werden, und es kommt zur Ausbildung eines geschlossenen Komplexes. Der geschlossene Komplex, welcher aus Sigmafaktor, der RNA-Polymerase und dem Promotor besteht, kann in einen offenen Komplex übergehen und die RNA-Polymerase beginnt mit der mRNA-Synthese. Der offene Komplex kann unabhängig von anderen Transkriptionsfaktoren gebildet werden (Wösten, 1998). In *B. subtilis* kodiert das *sigL*-Gen für den Sigmafaktor σ^L, welcher, wie der Sigmafaktor σ^{54} in *E. coli*, zu einer besonderen Gruppe von Sigmafaktoren gehört (Débarbouillé *et al.*, 1991; Buck *et al.*, 2000; Reitzer & Schneider, 2001). Diese Sigmafaktoren können die RNA-Polymerase zu einer spezifischen Promotorsequenz des zu transkribierenden Gens dirigieren und es kommt zur Bildung des geschlossenen Komplexes. Der offene Komplex kann jedoch nur in Anwesenheit eines spezifischen Aktivatorproteins gebildet werden. Die Aktivatorproteine binden an sogenannte Enhancer-Elemente, die sich circa 100 bp stromaufwärts oder -abwärts vom Transkriptionsstartpunkt befinden (Wösten, 1998). Die Ausbildung des offenen Komplexes ist außerdem mit der Spaltung von Nukleotiden durch die spezifischen Aktivatorproteine verbunden. Die Nukleotidspaltung ist wiederum abhängig von der Wechselwirkung des Aktivatorproteins mit einem Effektormolekül (Buck *et al.*, 2000). Das Aktivatorprotein NtrC, welches im Stickstoffstoffwechsel von *E. coli* eine wichtige Rolle spielt (siehe auch Abschnitt 2.5.1.), kann die Ausbildung des offenen Komplexes erst durch ATP-Spaltung bewirken. Die Spaltung von ATP wird durch Phosphorylierung des Aktivators stimuliert (Wedel & Kustu, 1995). Die Transkriptionsinitiation mit Hilfe des Sigmafaktors σ^L bietet den Vorteil, daß die σ^L-abhängigen Gene sehr genau reguliert werden können. In Abwesenheit des spezifischen Aktivators wird das Gen nur schwach exprimiert. Durch Stimulation des Aktivators kann das Gen jedoch auch sehr stark exprimiert werden (Buck *et al.*, 2000).

In *B. subtilis* werden sowohl die Gene des RocR-Regulons als auch das *bkd*-Operon und das *acoA*-Gen σ^L-abhängig transkribiert (Helmann & Moran, 2002). Neben dem *rocG*-Gen gehören auch das *rocABC*- und das *rocDEF*-Operon zum RocR-Regulon (Gardan *et al.*, 1995; Gardan *et al.*, 1997). Das *rocABC*- und das *rocDEF*-Operon kodieren für Proteine bzw. Enzyme, die die Aufnahme und die Umwandlung von Arginin und Ornithin zu Glutamat katalysieren (Abb. 2.3.). In Gegenwart von Arginin und Ornithin werden sowohl das *rocG*-

Gen als auch das *rocABC*- und das *rocDEF*-Operon durch AhrC und RocR aktiviert (Abb. 2.5.; Calogero *et al.*, 1994; Gardan *et al.*, 1995; Gardan *et al.*, 1997). RocR aktiviert durch seine Bindung im intergenischen DAS/UAS-Bereich (**d**ownstream **a**ctivating **s**equence/**u**pstream **a**ctivating **s**equence) zwischen dem *rocG*-Gen und dem *rocABC*-Operon, sowie in einem stromaufwärts gelegenen Bereich (UAS-Bereich) des *rocDEF* Operons, die Transkription des RocR-Regulons (Gardan *et al.*, 1995; Gardan *et al.*, 1997; Belitsky & Sonenshein, 1999; Ali *et al.*, 2003). Das Regulatorprotein AhrC aktiviert die Transkription des *rocABC*- und des *rocDEF*-Operons durch seine Bindung an spezifische Operatorsequenzen (ARG-Boxen) in den Promotorregionen beider Operons (Klingel *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997).

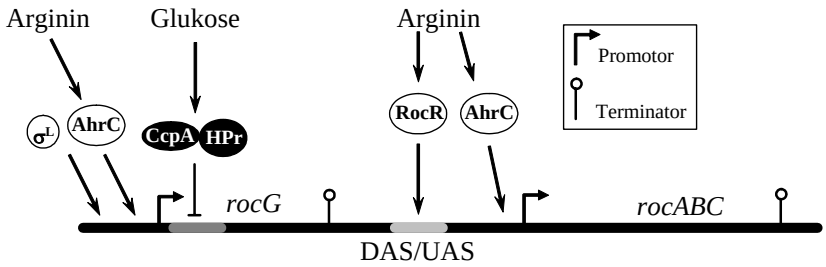

Abb. 2.5. Regulation des *rocG*-Gens durch die C- und die N-Quelle.
Die Regulatoren AhrC und RocR aktivieren das *rocG*-Gen bzw. das *rocABC*-Operon in Gegenwart von Arginin. Die Transkription ist abhängig vom Sigmafaktor σ^L. Der HPr-Ser-P-CcpA-Komplex kann in Gegenwart von Glukose das *rocG*-Gen reprimieren.

Die Transkription des *rocG*-Gens wird ebenfalls durch AhrC aktiviert (Commichau *et al.*, 2006b). Die Bindung des Aktivators AhrC im Promotorbereich von *rocG* wurde noch nicht nachgewiesen. AhrC besitzt im Gegensatz zu RocR noch eine weitere Funktion im Argininstoffwechsel. Neben der Aktivierung des *rocR*-Regulons durch AhrC in Gegenwart von Arginin, reprimiert AhrC die Expression der Enzyme, die für die Synthese von Arginin benötigt werden (Mountain & Baumberg, 1980; Czaplewski *et al.*, 1992). Eine nukleotidspaltende Funktion der Aktivatoren RocR und AhrC konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Expression von RocG wird neben der N-Quellen-abhängigen Regulation auch durch die C-Quelle reguliert (Baumberg & Harwood, 1979; Kane *et al.*, 1981). In Gegenwart von Glukose reprimiert CcpA durch die Bindung an die *cre*-Sequenz im Promotorbereich des *rocG*-Gens die Expression der katabolen Glutamatdehydrogenase (Abb. 2.5.; Belitsky *et al.*,

2004). Die Expression des Sigmafaktors σ^L wird ebenfalls in Gegenwart von Glukose durch CcpA reprimiert. Im Leserahmen des *sigL*-Gens befindet sich eine *cre*-Sequenz (Choi *et al.*, 2005). Beim Wachstum von *B. subtilis* mit Glukose wird das *rocG*-Gen daher zum einen durch die direkte Interaktion von CcpA mit dem *rocG*-Promotor reprimiert, und zum anderen wird durch die Verringerung der σ^L-Menge das Expressionsniveau von RocG indirekt durch Glukose kontrolliert. Das *gudB*-Gen wird nur schwach reguliert (Belitsky & Sonenshein *et al.*, 1998).

2.6. Ziele der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, daß die Glutamatsynthase in Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose und der N-Quelle Ammonium stark exprimiert wird. Das Signal der C-Quelle, welches die Aktivierung des Regulators GltC bewirkt ist bisher nicht identifiziert worden. Unklar ist auch, ob das Aktivatorprotein mit seinem Zielpromotor tatsächlich interagieren kann. In Gegenwart von Glukose wird das *gltAB*-Operon durch Glutamat schwach reprimiert. Die Aminosäure Arginin hingegen reprimiert das *gltAB*-Operon in Gegenwart von Glukose vollständig. Die katabole Glutamatdehydrogenase scheint bei Regulation des *gltAB*-Operons durch die N-Quelle eine zentrale Rolle zu spielen.

Mit Hilfe einer Reportergenfusion zur Bestimmung der Expression der Glutamatsynthase und der Bestimmung der RocG-Expression mit Hilfe von Westernblot-Analysen kann die Rolle von RocG und der Einfluß verschiedener C- und N-Quellen auf die Regulation des *gltAB*-Operons genauer untersucht werden. Weiterhin kann die Charakterisierung von Mutanten des Glutamatstoffwechsels dazu beitragen, die Regulation des *gltAB*-Operons besser zu verstehen.

3. Material und Methoden

Materialien: Chemikalien, Hilfsmittel, Geräte, Apparaturen, kommerziell erhältliche Systeme sowie Proteine, Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (Abschnitt 7.).

3.1. Bakterienstämme und Plasmide

Siehe Anhang dieser Arbeit, Abschnitt 7.3. und Abschnitt 7.4.

3.2. Medien

Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deion. Wasser angesetzt und 25 min im Dampfdrucktopf bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und sterilfiltriert. Alle Angaben beziehen sich auf Wasser, andere Lösungsmittel sind angegeben.

Bakterienmedien und fakultative Zusätze

B. subtilis wurde in C-Minimalmedium, versetzt mit verschiedenen Zusätzen, angezogen. Dabei wurden folgende Varianten des C-Minimalmediums verwendet: Für das C-Glc-Medium wurde das C-Minimalmedium mit Glukose (Glc) (0,5% w/v) versetzt. Die beiden Minimalmedien CE-Glc und CS-Glc enthalten neben dem C-Glc-Medium Kaliumglutamat (E) (Endkonzentration 8 g/l) bzw. Natriumsuccinat (S) (Endkonzentration 6 g/l). Im CSE-Glc-Medium sind dem C-Glc-Medium Kaliumglutamat (E) (Endkonzentration 8 g/l) und Natriumsuccinat (S) (Endkonzentration 6 g/l) zugesetzt.
Für die Transkriptomanalysen wurde ein definiertes Aminosäuregemisch als zusätzliche N-Quelle verwendet, um den Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante auszugleichen. Die Zusammensetzung des Gemisches ist in Tab. 3.1. dargestellt.
Der Einfluß des im C-Medium enthaltenen Ammoniums wurde getestet, indem das C-Medium ohne Ammoniumsulfat angesetzt wurde. Zusätzlich wurde dann die ammoniumhaltige Eisenquelle Ammoniumeisencitrat durch $FeCl_3$ ersetzt. Weitere Variationen der N- und C-Quellen sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Aminosäure[1]	Stammlösungen der Aminosäuren in %	Zugegebenes Volumen in ml für 100 ml Medium	Enkonzentration im Medium in %
Isoleucin	0,25	1	0,0025
Leucin	0,25	2	0,0025
Methionin	2,5	0,08	0,002
Valin	2,5	0,16	0,004

Tab. 3.1. Zusammensetzung des synthetischen Aminosäuregemisches

[1]Die Stammlösungen wurden in Wasser angesetzt.

Den Grundmedien wurden zur Verfestigung bei Herstellung von Plattenmedien 15 g/l Agar zugesetzt.

LB-Medium (1l)	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
5 x C-Salze (1l)	20 g	KH_2PO_4
	80 g	K_2HPO_4 x 3 H_2O
	16,5 g	$(NH_4)_2SO_4$
III'-Salze (1l)	0,232 g	$MnSO_4$ x 4 H_2O
	12,3 g	$MgSO_4$ x 7 H_2O
1x C-Minimalmedium mit Ammonium	100 ml	1 x C-Salze
	1 ml	Tryptophan (5 mg ml^{-1})
	1 ml	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml^{-1})
	1 ml	III'-Salze

1x C-Minimalmedium ohne Ammonium		100 ml	1 x C-Salze
		1 ml	Tryptophan (5 mg ml^{-1})
		1 ml	Eisen(III)-Chlorid (2,2 mg ml^{-1})
		1 ml	III'-Salze
1x CSE-Medium		100 ml	1 x C-Salze
		1 ml	Tryptophan (5 mg ml^{-1})
		1 ml	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml^{-1})
		1 ml	III`-Salze
		2 ml	Kaliumglutamat (40%)
		2 ml	Natriumsuccinat (30%)
SP-Medium (1l)		8 g	Nutrient Broth
		0,25 g	$MgSO_4$ x 7 H_2O
		1 g	KCl
			ad. 1000 ml deion. Wasser
			anschließende Zugabe von:
		1 ml	$CaCl_2$ (0,5 M)
		1 ml	$MnCl_2$ (10 mM)
		2 ml	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml^{-1})
MNGE (10 ml)		9,2 ml	1x MN-Medium
		1 ml	Glukose (20%)
		50 µl	Kaliumglutamat (40%)
		50 µl	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml^{-1})
		100 µl	Tryptophan (5 mg ml^{-1})
		30 µl	$MgSO_4$ (1 M)
	+/-	100 µl	CAA (10%)

10 × MN-Medium (1l)	136 g	K_2HPO_4 x 3 H_2O
	60 g	KH_2PO_4
	10 g	Natriumcitrat x 2 H_2O
Stärkeplatten	7,5 g	Nutrient-Broth
	5 g	Stärke
X-Gal		Stammlösung: 40 mg/ml X-Gal in DMF Endkonzentration von 40 µg/ml in Medien

Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Ampicillin, Spectinomycin, Lincomycin und Kanamycin wurden dazu in deion. Wasser gelöst, Chloramphenicol und Erythromycin in 70% Ethanol. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca. 50°C wurden die Antibiotika zu den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben.

Selektionskonzentration für *E. coli*:

Ampicillin	100 µg ml^{-1}
Spectinomycin	100 µg ml^{-1}
Kanamycin	50 µg ml^{-1}

Selektionskonzentration für *B. subtilis*:

Kanamycin	5 µg ml^{-1}
Chloramphenicol	5 µg ml^{-1}
Erythromycin[1]	2 µg ml^{-1}
Lincomycin[1]	25 µg ml^{-1}
Spectinomycin	100 µg ml^{-1}

[1]Zur Selektion auf *ermC* wurde eine Mischung aus Erythromycin und Lincomycin in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet.

3.3. Methoden

3.3.1. Allgemeine Methoden

Eine Zusammenfassung der allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit angewendet wurden, ist in Tab. 3.2. aufgeführt.

Methode	**Referenz**
Absorptionsmessung	Sambrook *et al.*, 1989
Ethidiumbromidfärbung von DNA	Sambrook *et al.*, 1989
Fällung von Nukleinsäuren	Sambrook *et al.*, 1989
Gelelektrophorese von DNA	Sambrook *et al.*, 1989
Gelelektrophorese von Proteinen (denaturierend)	Laemmli, 1970
Ligation von DNA-Fragmenten	Sambrook *et al.*, 1989
Proteinmengenbestimmung	Bradford, 1976
Plasmidpräparation aus *E. coli*	Sambrook *et al.*, 1989
Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen	Sambrook *et al.*, 1989
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	Sanger *et al.*, 1977

Tab. 3.2. Allgemeine Methoden

3.3.2. Anzucht von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und 200 U min^{-1} in Reagenzgläsern oder Schikanekolben angezogen. *B. subtilis* wuchs in LB-Medium, CSE-Medium oder MNGE-Medium bei 37°C oder 28°C in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Beimpft wurde von frischen Vereinzelungsplatten bzw. aus Übernachtkulturen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

Zur Berechnung der Generationszeit wurde die optische Dichte der Kulturen im Bereich des logarithmischen Wachstums herangezogen. Die Generationszeit (g) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$g = \frac{\lg 2 \cdot (t_2 - t_1)}{\log K_2 - \log K_1}$$

g	Generationszeit (min)		
t_1	Zeitpunkt 1 (min)	t_2	Zeitpunkt 2 (min)
K_1	OD_{600} zum Zeitpunkt 1	K_2	OD_{600} zum Zeitpunkt 2

3.3.3. Transformation von *E. coli*

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, dann 200 µl zu 10-100 ng DNA gegeben, der Ansatz gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Reaktionsgefäß 1,5 min auf 42°C erwärmt und nach Zugabe von 800 µl LB-Medium zunächst für etwa 1 min auf Eis und anschließend für 1 h bei 37°C im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 50 bzw. 100 µl und der abzentrifugierte Rest auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin, Spectinomycin oder Kanamycin) ausplattiert.

3.3.4. Transformation von *B. subtilis*

Herstellung von kompetenten Zellen

In 10 ml MNGE-Medium (mit CAA) wurde mit einer Übernachtkultur eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD_{600} verfolgt. Bei einer OD_{600} von 1,3 wurden die Zellen mit gleicher Menge an MNGE-Medium ohne CAA verdünnt. Danach wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37°C geschüttelt. Die anschließende Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 5000 U min^{-1} und RT für 5 min. Der Überstand wurde in ein steriles Greinergefäß dekantiert. Das Pellet wurde in 1/8 des Überstandes resuspendiert und eine Glycerinkonzentration von 10%

eingestellt. Aliquots von 300 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Transformation der kompetenten Zellen

Die zu 300 µl aliquotierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit folgender vorpipettierter Lösung versetzt: 1,7 ml 1 x MN
43 µl 20% Glukose
34 µl 1 M $MgSO_4$

Zu 400 µl dieser Zellsuspension wurde 0,1-1 µg DNA gegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl Expressionslösung (500 µl Hefeextrakt (5%), 250 µl CAA (10%), 250 µl deion. Wasser, 50 µl Tryptophan (5mg/ml), 50 µl Antibiotikum (C_{fin} = 1/100 der Selektionskonzentration)) zupipettiert und für weitere 60 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

3.3.5. Präparation und Nachweis von DNA

Aufreinigung von Plasmid-DNA über modifizierte Alkali/SDS-Lyse

Die Plasmidisolation wurde mittels alkalischer Lyse und anschließender chromatographischer Aufreinigung durchgeführt. Dabei wurden 1,5 ml ÜN-Kultur eingesetzt und die Isolation unter Verwendung des Nucleospin-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolation der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue Kits (250). Hierzu wurden 1,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen Übernachtkultur 2 min bei 13000 U min^{-1} abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 180 µl Lyse-Puffer resuspendiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolation der chromosomalen DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

DNA-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung und zur präparativen Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit 1% Agarosegelen durchgeführt. Die Agarosegele hatten eine Dimension von 8,5 cm Länge, 10 cm Breite und waren 3-5 mm dick. Die Agarosegele wurden nach dem Gießen (60°C) durch Abkühlen auf RT verfestigt, die Proben mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100-120 V, bis der DNA-Farbmarker das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Danach wurden die Gele in Ethidiumbromid 5 min gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und anschließend unter UV-Licht (254 nm) fotografiert. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der λ-DNA-Marker verwendet. Bei 365 nm konnten DNA-Banden aus präparativen Gelen ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die Elution der DNA erfolgte mit dem Nucleospin Extract 2 in 1 nach Anleitung des Herstellers.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden im Göttinger Genomics Laboratory und von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt.

Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Enzymmenge und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und dem Reaktionsvolumen. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es wurden zwischen 10 und 100 ng Vektor-DNA und ein 1-5facher Überschuss an Fragment eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte für mindestens 2 h oder ÜN bei Raumtemperatur.

Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung des 5´-Endes von DNA-Fragmenten wurde mit von Hilfe Shrimps-Alkalischer-Phosphatase (SAP) unter Einsatz des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Einem Ansatz mit einer DNA-Endkonzentration von ca. 3-10 ng/µl wurden 1 µl SAP (1000 Units/µl) zugesetzt. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach

erneut 1 µl SAP zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde das Enzym 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde stets mit chromosomaler DNA oder zirkulärer Plasmid-DNA als Matrizen-DNA durchgeführt.

Reaktionsansatz (100 µl) :
2 µl Primer 1 (20 pmol)
2 µl Primer 2 (20 pmol)
3 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
10 µl 10 x *Pfu*-Polymerase Puffer
1 µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U μl^{-1})
2 µl dNTPs (12,5 µmol ml^{-1})
80 µl deion. Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	96°C	5 min
30	Denaturierung	96°C	1 min
	Annealing	50-60°C	1 min
	Primer Extension	72°C	1-4 min
1	Endlauf	72°C	10 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.

Lösungen für das Arbeiten mit DNA

Agarosegel 1% für DNA-Gelelektrophorese	1% (w/v) Agarose in 1x TAE
DNA-Farbmarker 5 x für DNA-Gelelektrophorese	5 ml Glycerin (100%) 4,5 ml deion.Wasser 200 µl TAE (50 x) 0,01 g Bromphenolblau 0,01 g Xylencyanol
Lyse-Puffer für Isolation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*	50 mg Lysozym 50 µl Tris-HCl pH 8,0 (1 M) 10 µl EDTA pH 8,0 (0,5 M) 2,5 ml Millipore-Wasser
TAE-Puffer 50 x für DNA-Gelelektrophorese	2 M Tris 57,1 ml Essigsäure (100%) 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

3.3.6. Arbeiten mit Proteinen

Zellaufschluß durch Lysozym

Bakterienkulturen wurden für 5 min bei 8500 U min^{-1} und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl einer Lösung aus Z-Puffer/LD-Mix (4 ml Z-Puffer + 100 µl LD-Mix) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte für 30 min bei 37°C. Das Gemisch wurde anschließend zum Abtrennen der Zelltrümmer abzentrifugiert (13000 U min^{-1}, 30 min, 4 °C).

Zellaufschluß mit der French Press

Die vorgekühlte Bombe wurde mit der Bakteriensuspension gefüllt. Nach Verschluss der Bombe wurde die noch eingeschlossene Luft vollständig herausgedrückt. Nach Schließung des Ablassventils wurde die Bombe in die French Press eingespannt und unter Druck gesetzt. Der Aufschluss erfolgte bei einem Zellinnendruck von 1400 bar (20000 psi) und wurde dreimal durchgeführt.

Denaturierende Proteingelelektrophorese

Denaturierende Proteingele wurden nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970) hergestellt. Die Gele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel, wurden mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (2 x) versetzt und vor der Auftragung 10 min. auf 95°C erhitzt. Bei 100 V erfolgte die Auftrennung der Proteine im Gel.

Westernblot

Der Blot von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Semi Dry Blot Apparatur. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst 30 Sekunden in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol (100%) und anschließend 5 min. in Transferpuffer inkubiert. Nach dem einstündigen Transfer bei 0,8 mA / cm^2 wurde die PVDF-Membran drei Stunden in Milchblockinglösung (Blotto) geschwenkt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit polyklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Protein. Der GltC Antikörper wurde 1:25000 und der Antikörper gegen RocG 1:15000 in Blotto verdünnt eingesetzt. Nach zwei Waschschritten von je 30 min in Blotto erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt), der 1:100000 in Blotto verdünnt zum Einsatz kam. Nach drei weiteren 20-minütigen Waschschritten mit Blotto wurde die Membran in deion. Wasser gespült und anschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 min in Puffer III inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP*. Das Chemilumineszenz-System ChemiSmart (peqlab) wurde zur Dokumentation der Signale verwendet.

Überproduktion von Proteinen

Zur Überexpression von Proteinen wurde l Liter LB/Ampicillin-Medium mit 10 ml einer Übernachtkultur von einem Stamm, der das entsprechende Überexpressionsplasmid trug, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Zur Überprüfung der Überproduktion wurde vor der Induktion und vor der Zellernte wurde je eine Probe entnommen. Die Proben wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und das Zellpellet sowie der Überstand wurden auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die Kultur wurde 2 bzw. 3 h nach der Induktion geerntet und 10 min bei 5000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde das Gemisch in der Ultrazentrifuge 1h bei 4°C bei 45000 U/min. zentrifugiert.

Aufreinigung von Proteinen über Ni^{2+}-NTA Säule

Zur Aufreinigung der Proteine mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulchen (BIO-RAD) verwendet. Dabei wurde die Säule zunächst mit 4 ml Ni-NTA Superflow (QIAGEN) beladen und dann mit ZAP äquilibriert. 20 ml Proteinrohlysat wurde über die Matrix gegeben. Mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer (10 mM, 20 mM, (je 20 ml); 50 mM, 100 mM 200 mM und 500 mM (je 10 ml) Imidazol) wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen und danach das *His*-tag-tragende Protein eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden auf einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die aufgereinigtes Protein enthielten, wurden über Nacht dialysiert und anschließend mittels Bradford-Reagenz auf ihre Proteinkonzentration getestet (Bradford *et al.*, 1976).

Aufreinigung über Strep-Tactin-Sepharose® Säule

Die Überexpression und der Zellaufschluss mittels French Press wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Aufreinigung des Proteins wurde eine *Strep*-Tactin Sepharose® Säule (IBA) mit einem Matrixvolumen von 1ml verwendet. Diese Matrix bindet spezifisch eine

Sequenz von acht Aminosäuren (WSHPQFEK). Die Bindung kann durch eine Verdrängungsreaktion mit D-Desthiobiotin wieder aufgehoben werden. Dadurch können Proteine, die mit dieser Aminosäuresequenz versehen sind, aus einem Proteingemisch getrennt werden. Zuerst wurde die Säule mit 5 ml Puffer W äquilibriert. Dann konnte die Säule mit 10 ml Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 5 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 3 ml Puffer E in Fraktionen von je 500 µl eluiert werden. Zur Regeneration der Säulenmatrix wurden dreimal 5 ml Puffer R und zweimal mit 4 ml Puffer W auf die Säule gegeben. Die, bei der Elution erhaltenen Fraktionen, wurden wie oben beschrieben überprüft.

Dialyse von Proteinen

Bei der Aufreinigung eines Proteins über eine N-terminale Hexahistidin-Sequenz oder *Strep*-tag-Sequenz ist zum Ablösen des an die Säule gebundenen Proteins Imidazol bzw. Desthiobiotin notwendig, welches weitere Versuche mit dem aufgereinigten Protein negativ beeinflussen kann. Um das Imidazol bzw. das Desthiobiotin aus der Proteinpräperation zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 12-14 kDa) gegen Zellaufschlusspuffer mit 1 mM DTT dialysiert. Das Volumen des Dialysepuffers betrug das 1000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung.

DNA-Gelretardationsanalyse

Zur Überprüfung der DNA-bindenden Eigenschaften von GltC wurden DNA-Gelretardationsanalysen durchgeführt. Durch die Bindung des Proteins an die DNA wird die Wanderung der DNA während der Gelelektrophorese gegenüber der freien DNA verzögert. Um den Nachweis der spezifischen Bindung zu erbringen, wurde dem Ansatz zusätzlich unspezifische DNA zugesetzt.
Der Ansatz wurde in Binde-Puffer 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden dann auf ein natives PAA-Gel (6%) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in nativem Protein Gel Puffer bei 4°C mit 60 V. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen

Auftragepuffer 5 x für Gelretardationsanalyse	5 x TEB 50% Glycerin
Binde-Puffer für Gelretardationsanalyse	20 mM Tris HCl pH 8 50 mM NaCl 10 mM MgCl 0,5 mM EDTA 5% Glycerin 1 mM DTT
Blotto für Westernblot	1 x TBS 2,5% Magermilchpulver 0,1% Tween 20
Entfärbelösung für Proteingelelektrophorese	10% Essigsäure
Färbelösung für Proteingelelektrophorese	0,5% Coomassie Brillant Blue R250 10% Essigsäure 45% Methanol 44,5% H_2O
IPTG	1 M IPTG, sterilfiltriert
PAA-Gel (6%) für Gel- Retardationsanalyse	2,0 ml Acrylamid-Bisacrylamid (39:1) (40%) 7.89 ml Na-Acetat-Puffer 1 x 100 µl APS (10%) 10 µl TEMED

Puffer III für Westernblot	0,1 M Tris 0,1 M NaCl pH 9,5 mit HCl eingestellt
Puffer E	100 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R	100 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA (Hydroxy-azophenyl-benzol Säure)
Puffer W	100 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Probenpuffer 5 x für native Proteingelelektrophorese	3,1 ml Tris-HCl pH 8,8 (1M) 5 ml Glycerol (100%) 1,4 ml deion.Wasser
Sammelgel für denaturierende Proteingelelektrophorese	0,75 ml Acrylamid-Bisacrylamid (39:1) (40%) 0,65 ml Tris-HCl pH 6,8 (1 M) 5,35 ml deion.Wasser 0,375 ml SDS (2%) 200 µl APS (10%) 10 µl TEMED

SDS-Probenpuffer 2 x für denaturierende Proteingelelektrophorese	1,4 ml Tris-HCl pH 7,0 (1 M) 3 ml Glycerin (100%) 2 ml SDS (20%) 1,6 ml β-Mercaptoethanol (100%) 0,01 g Bromphenolblau 2 ml deion.Wasser
Na-Acetat-Puffer 10 x für Gel- Retardationsanalyse	250 mM Tris-Acetat auf pH 5,5 mit konzentrierter Essigsäure eingestellt
TBS 10 x	60 g Tris 90 g NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen ad 1 l mit deion.Wasser
Trenngel (12,5%) für denaturierende Proteingelelektrophorese	4,6 ml Acrylamid-Bisacrylamid (39:1) (40%) 1,3 ml Tris-HCl pH 8,8 (1 M) 1,5 ml Tris-Borat pH 8,8 (1 M) 6,5 ml deion.Wasser 800 µl SDS (2%) 200 µl APS (10%) 12,5 µl TEMED
Transferpuffer für Westernblot auf PVDF-Membran	15,2 g Tris 72,1 g Glycin 750 ml Methanol (100%) ad 5 l mit deion.Wasser

Waschlösung	45% Methanol
für Proteingelelektrophorese	10% Essigsäure
	45% H_2O
Zellaufschlußpuffer ZAP	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	200 mM NaCl

3.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Amylasetest auf Stärkeplatten

B. subtilis besitzt ein Amylasegen, *amyE*. Dieses Gen findet häufig Anwendung, wenn Reportergenkonstrukte über doppelt homologe Rekombination in das Genom von *B. subtilis* eingeführt werden sollen. Das funktionale *amyE* kann sehr einfach nachgewiesen werden und hat zusätzlich den Vorteil, dass es für *B. subtilis* nicht essentiell ist. Der Nachweis erfolgt auf Stärkeplatten. Ist das Gen intakt, wird Amylase gebildet und die Stärke wird von den Bakterienzellen abgebaut. Wurde das Gen durch Rekombinationsereignisse zerstört, wird keine Amylase gebildet und die Stärke wird nicht angegriffen. Der Nachweis erfolgt, indem auf Platten jeweils ein *amyE*-Wildtypstamm und die Klone mit der erwarteten Rekombination auf einer Stärkeplatte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert werden. Am nächsten Morgen wird Iod-Kaliumiodid-Lösung aufgetropft und auf der Platte verteilt. Um die Ausstriche mit einem intakten *amyE*-Gen bildet sich ein deutlich sichtbarer Hof. Wurde das *amyE*-Gen jedoch zerstört, ist kein Hof erkennbar.

Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität

Die Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität wurde nach Miller (1972) durchgeführt. Die Messung beruht auf der enzymatischen Umwandlung von o-Nitrophenyl-β-D-galakto-pyranosid in Galaktose und o-Nitrophenol durch die β-Galaktosidase. o-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ

bestimmt werden. Bei jedem Stamm wurde für jeden Effektor die β-Galaktosidaseaktivität mindestens zweier unabhängig angezogener Kulturen bestimmt.
Die zu analysierenden Bakterienstämme wurden bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 geschüttelt, anschließend 1,5 ml der Kultur 5 min mit 13000 U min^{-1} bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen auf Eis gestellt.
Anschließend wurde das Pellet in 400 µl Z-Puffer/LD-Mix resuspendiert, für 10 min bei 37°C inkubiert und dann abzentrifugiert (2 min, 13000 U min^{-1}, 4°C). Der erhaltene Überstand (Zellextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Zellextrakt wurden 100 µl entnommen und mit 700 µl Z-Puffer vermischt. Diese Ansätze wurden für 5 min bei 28°C vorinkubiert. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 200 µl einer ONPG-Lösung (4 mg ml^{-1} in 1 x Z-Puffer) zugegeben. Sobald eine deutliche Gelbfärbung festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 420 nm. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Zellextrakt. Die Proteinmengenbestimmung des Zellextraktes erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München). Die spezifische β-Galaktosidaseaktivität in Units/mg Protein wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Units mg}^{-1}\text{ Protein} = \frac{1500 \times A_{420}}{\Delta t \text{ x } V \text{ x } A_{595} \text{ x } 1{,}7 \text{ x } 4{,}4}$$

A_{420}	Absorption von o-Nitrophenol
Δt	Zeitdifferenz zwischen Start und Stopp der Reaktion in min
V	eingesetztes Volumen an Zellkultur in ml
A_{595} x 1,7	Proteingehalt des Zellextraktes in mg ml^{-1}

Bestimmung der β-Xylosidaseaktivität

Die Bestimmung der β-Xylosidaseaktivität erfolgt nach Lidner *et al.* (1994). Ähnlich der Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität beruht die Messung hierbei auf der enzymatischen Umwandlung von PNPX (p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid) in Xylose und p-Nitrophenol

durch die β-Xylosidase. p-Nitrophenol ist in wässriger Lösung ebenfalls als gelber Farbstoff erkennbar und kann photometrisch quantitativ bestimmt werden.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte in CSE-Medium mit 0,1 % Xylose bei 37°C unter Schütteln. Die Zellextrakte wurden wie bei der Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität gewonnen. Die Reaktion wurde in einem Ansatz aus 700 ml Z-Puffer und 100 ml Zellextrakt bei 28°C durchgeführt. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 200 µl einer PNPX-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer ohne β-Mercaptoethanol) zugegeben. Sobald eine deutliche Gelbfärbung festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 ml 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Extinktionswerte der Proben bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Zellextrakt. Die Aktivität wurde entsprechend der Vorschrift zur Messung der β-Galaktosidaseaktivität errechnet, wobei eine Einheit diejenige Enzymmenge ist, die in einer Minute bei 28°C 1 nmol p-Nitrophenol bildet.

Lysozym/DNase (LD-Mix)	100 mg Lysozym in 10 ml deion. Wasser gelöst, dann 10 mg DNase zugegeben, à 500 µl aliquotiert, bei -20°C gelagert
Iod-Kaliumiodidlösung	100 g KJ 50 g J ad 1000 ml mit Wasser
Z-Puffer	60 mM Na_2HPO_4 40 mM NaH_2PO_4 10 mM KCl 1 mM $MgSO_4$ 50 mM β-Mercaptoethanol

3.3.8. Transkriptomanalyse mittles Microarray

Die vergleichende Transkriptomanalyse (Abschnitt 4.5.4.) wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Biol. O. Schilling durchgeführt. Die Kulturen mit den Stämmen *B. subtilis* 168, QB5407, QB5412 und QB5413 wurden in CSE-Glc-Medium angezogen und bei einer OD_{600} von 0,6 geerntet. Die Pellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Die Arbeitsschritte von der Isolation der RNA bis zur Auswertung der Microarrays wurden von Herrn O. Schilling und Frau C. Herzberg durchgeführt (Schilling *et al.*, 2006).

4. Ergebnisse

4.1. Die Regulation des *gltAB*-Operons durch Kohlenstoff- und Stickstoffquellen

4.1.1. Regulation des *gltAB*-Operons durch C-Quellen

Das *gltAB*-Operon wird durch gute C-Quellen, wie zum Beispiel durch die Zucker Glukose und Fruktose, stark induziert. Beide C-Quellen werden über ein für sie spezifisches EII des PTS aufgenommen (Tab. 4.1.). Das *gltAB*-Operon kann jedoch auch durch C-Quellen induziert werden, die nicht über ein PTS in die Zelle transportiert werden. Zu diesen C-Quellen gehören die Zuckeralkohole Sorbitol und Glycerin (Wacker *et al.*, 2003). Der molekulare Mechanismus der C-Quellen-abhängigen Induktion des *gltAB*-Operons ist bisher noch nicht aufgeklärt.

Mit dem folgenden Experiment sollte der Fragestellung nachgegangen werden, worin sich die regulatorischen Einflüsse verschiedener C-Quellen bezüglich des *gltAB*-Operons unterscheiden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es Gemeinsamkeiten zwischen den C-Quellen gibt, die das *gltAB*-Operon induzieren können. Es wäre denkbar, daß das Aufnahmesystem der C-Quelle an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist, oder daß die Umwandlung der C-Quelle in der Zelle eine wichtige Eigenschaft der induzierenden oder nichtinduzierenden C-Quellen ist. Es wurden daher zum einen C-Quellen verwendet, die auf unterschiedliche Weise in die Zelle gelangen. Zum anderen wurden C-Quellen eingesetzt, die nach ihrer Aufnahme direkt in die Glykolyse oder erst über den Pentosephosphatweg umgewandelt werden, und dann in die Glykolyse einfließen. Die Expression des *gltAB*-Operons in Gegenwart verschiedener C-Quellen wurde im Stamm GP342 mit Hilfe einer *gltA*-*lacZ*-Fusion ermittelt (Tab. 4.1.).

Die in Tabelle 4.1. dargestellten Ergebnisse zeigen, daß C-Quellen wie Glukose und Glycerin, die direkt in der Glykolyse umgewandelt werden, das *gltAB*-Operon induzieren. Die C-Quellen *myo*-Inositol, N-Acetyl-Glucosamin (NAG) und Maltose werden ebenfalls über die Glykolyse umgewandelt, können das *gltAB*-Operon jedoch nicht induzieren. Demnach ist eine Klassifizierung der C-Quellen bezüglich ihres Umwandlungsweges in der Zelle nicht möglich. Das Aufnahmesystem der jeweiligen C-Quelle ist ebenfalls nicht an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt. Es gibt sowohl unter den induzierenden und als auch unter den nichtinduzierenden Zuckern C-Quellen, die über das PTS oder über spezifische Transportsysteme aufgenommen werden. Zu den C-Quellen, die über ein spezifisches EII des

PTS aufgenommen werden und das *gltAB*-Operon nicht induzieren können, gehören die beiden Zucker Maltose und NAG.

C-Quelle	ß-Galaktosidase-Aktivität (MU)	Aufnahme (-system)	Abbau-weg	Referenz (Aufnahme und Umwandlung)
keine	13	-	-	-
Glukose	174	PTS	Glykolyse	Zagorec & Postma *et al.*, 1992
NAG	13	PTS	Glykolyse	Reizer *et al.*, 1999
Ribose	16	*rbsDACB*	PP-Weg	Woodson & Devine, 1994
Arabinose	23	*araNPQ*	PP-Weg	Sá-Nogueira *et al.*, 1997
Maltose	27	PTS	Glykolyse	Schönert *et al.*, 2006
myo-Inositol	26	*iolF*	Glykolyse	Yoshida *et al.*, 2002
Glukonat	27	*gntP*	PP-Weg	Fujita *et al.*, 1986
Glycerin	77	*glpF*	Glykolyse	Beijer & Rutberg, 1992
Glucosamin	84	PTS	Glykolyse	Reizer *et al.*, 1999
Mannose	87	PTS	Glykolyse	Reizer *et al.*, 1999
Saccharose	97	PTS	Glykolyse	Fouet *et al.*, 1987; Zukowski *et al.*, 1990
Sorbitol	104	*gutP*	Glykolyse	Chalumeau *et al.*, 1978
Mannitol	127	PTS	Glykolyse	Reizer *et al.*, 1999
Fruktose	158	PTS	Glykolyse	Reizer *et al.*, 1999

Tab. 4.1. Beziehung zwischen der Expression der Glutamatsynthase sowie Aufnahme und Umwandlung verschiedener C-Quellen.

Der Stamm GP342 (wt) wurde in CSE-Minimalmedium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die Ergebnisse dieses Experiments lassen daher die Schlußfolgerung zu, daß der molekulare Mechanismus der Regulation des *gltAB*-Operons durch die verwendeten C-Quellen nicht mit dem Aufnahmesystem oder dem Umwandlungsweg in der Zelle verknüpft ist.

4.1.2. Die Rolle der Katabolitenrepression bei der Regulation des *gltAB*-Operons

Die von *B. subtilis* bevorzugte C-Quelle Glukose führt zu einer starken Katabolitenrepression in der Zelle (Stülke & Hillen, 1999). Das durch Xylose induzierbare *xynB*-Gen kodiert für die β-Xylosidase und die Expression des *xynB*-Gens unterliegt der Katabolitenrepression. Die β-Xylosidaseaktivität beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart verschiedener C-Quellen ist demnach ein Maß für die Stärke der Katabolitenrepression (Galinier *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der durch die C-Quelle verursachten Katabolitenrepression und der Regulation des *gltAB*-Operons geben könnte, wurden die Aktivitäten der β-Xylosidase und der β-Galaktosidase in *B. subtilis* GP342 in Gegenwart verschiedener C-Quellen miteinander verglichen (Tab. 4.2.). Die Expression der Glutamatsynthase wurde mit Hilfe der *gltA-lacZ*-Fusion bestimmt.

Sollte es einen Faktor geben, welcher an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist und dessen Expression durch die C-Quelle reguliert wird, so wäre eine direkte Korrelation zwischen der Katabolitenrepression und der Expression des *gltAB*-Operons zu erwarten. Die in Tab. 4.2. dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Expression des *gltAB*-Operons invers mit der Katabolitenrepression korreliert. In Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose wird das *gltAB*-Operon stark exprimiert und das *xynB*-Gen maximal reprimiert. Je geringer die durch die C-Quelle verursachte Katabolitenrepression ist, desto schwächer wird das *gltAB*-Operon exprimiert.

Durch eine Transkriptomanalyse konnte gezeigt werden, daß das *gltAB*-Operon indirekt durch CcpA, das globale Regulatorprotein des C-Stoffwechsels, reguliert wird (Blencke *et al.*, 2003). Die obigen Ergebnisse lassen demnach zwei Schlußfolgerungen zu: Zum einen könnte ein Faktor, der positiv in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreift, durch gute C-Quellen CcpA-abhängig induziert werden. Dies hätte zur Folge, daß in Gegenwart guter C-Quellen die erhöhte Konzentration dieses Faktors zur starken Expression des *gltAB*-Operons beiträgt. Alternativ wäre es denkbar, daß die Expression eines negativ wirkenden Faktors in Gegenwart

bevorzugter C-Quellen CcpA-abhängig reprimiert wird, was die Expression des *gltAB*-Operons ermöglicht.

	β-Xylosidaseaktivität (MU)	**β-Galaktosidaseaktivität (MU)**	
C-Quelle	**mit Glutamat**	**mit Glutamat**	**ohne Glutamat[1]**
keine	1403	13	k.W.[2]
Glukose	35	150	388
Fruktose	60	158	485
Ribose	720	16	k.W.
NAG	520	13	161
Maltose	492	27	180
Arabinose	494	23	214
myo-Inositol	133	26	303
Glukonat	120	27	120
Glukosamin	105	84	331
Mannose	96	87	296
Glycerin	82	77	337
Saccharose	180	97	226
Sorbitol	122	44	321
Mannitol	72	127	291

Tab. 4.2. Vergleich der β-Xylosidaseaktivität mit der β-Galaktosidaseaktivität in Gegenwart verschiedener C-Quellen und der Einfluß von Glutamat auf die Expression der Glutamatsynthase.

Der Stamm GP342 (wt) wurde in CS-Medium mit 0,2 % Xylose angezogen.

[1]Zur Bestimmung der Expression der Glutamatsynthase ohne Glutamat wurden die Zellen ohne Xylose angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

[2]k.W. = kein Wachstum.

Für die erste der beiden vorgeschlagenen Möglichkeiten gibt es bisher keine experimentellen Hinweise. Für die zweite der beiden oben genannten Möglichkeiten hingegen gibt es bereits experimentelle Hinweise. Die katabole Glutamatdehydrogenase RocG ist in die Regulation des *gltAB*-Operons involviert und kann das Aktivatorprotein GltC möglicherweise inaktivieren (Abschnitt 4.2.2.; Abb. 5.3).

4.1.3. Stickstoffquellenabhängige Regulation des *gltAB*-Operons

Die Rolle von Glutamat bei der C-Quellen-abhängigen Regulation des *gltAB*-Operons

Die Zugabe der Aminosäure Glutamat in Gegenwart von Glukose führt zu einer etwa zwei- bis dreifachen Repression des *gltAB*-Operons (Bohannon & Sonenshein, 1985; Belitsky & Sonenshein, 2004). Es gibt Hinweise darauf, daß Glutamat die Aktivität des Regulatorproteins GltC *in vitro* hemmen kann (Picossi-Goñi *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob auch nichtinduzierende Zucker wie zum Beispiel Arabinose oder Glukonat das *gltAB*-Operon in Abwesenheit von Glutamat induzieren können, wurde die Expression der *gltA-lacZ*-Fusion in Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen ohne Glutamat gemessen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 4.2. dargestellt.

In glutamathaltigem Medium ohne Glukose wird das *gltAB*-Operon nicht induziert. Offensichtlich fehlt unter diesen Bedingungen das von der C-Quelle gelieferte Signal, welches die Induktion des *gltAB*-Operons vermittelt. Durch die Zugabe von Glutamat in glukosehaltigem Medium ist die Expression der Glutamatsynthase erwartungsgemäß um den Faktor zwei erniedrigt (Wacker, 2002). Erstaunlicherweise können jedoch auch schlechte C-Quellen, wie z.B. Arabinose, das *gltAB*-Operon in Abwesenheit von Glutamat induzieren (Tab. 4.2.).

Die Meßergebnisse zeigen, daß die Regulation des *gltAB*-Operons durch die Aminosäure Glutamat mit der Katabolitenrepression verknüpft ist. Möglicherweise wird das Regulatorprotein GltC, welches die Transkription des *gltAB*-Operons aktiviert, direkt durch Glutamat inhibiert. Die C-Quellen-abhängige Regulation der Glutamataufnahme könnte eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß der Repression *gltAB*-Operons durch Glutamat sein. Im Genom von *B. subtilis* existieren die zwei Gene *gltP* und *gltT*, die für Glutamatsymporter kodieren (http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/). Der Glutamattransporter

GltP wurde bereits funktionell charakterisiert (Tolner *et al.*, 1995). Die Funktion und Regulation des zweiten möglichen Transportproteins ist nicht bekannt. Es ist bisher auch nicht untersucht worden, ob die beiden Gene *gltP* und *gltT* durch Glukose reguliert werden. Weiterhin zeigten Messungen der intrazellulären Aminosäurepools, daß die Glutamatkonzentration in der Zelle kaum variiert (Blencke, 2004). Die indirekte Regulation des *gltAB*-Operons durch eine C-Quellen-abhängige Regulation der Glutamataufnahme kann deshalb ausgeschlossen werden. Um die Glutamatrepression zu erklären, könnte man sich folgende Regulationsmechanismen vorstellen: Zum einen wäre es denkbar, daß die Aktivität eines negativ wirkenden Faktors, dessen Expression durch CcpA reprimiert wird, durch die Aminosäure Glutamat stimuliert wird. Beim Wachstum mit der schlechten C-Quelle Arabinose wäre dieser Faktor nicht durch die C-Quelle reprimiert, und könnte zusammen mit Glutamat die Expression des *gltAB*-Operons verhindern oder herabsetzen. Als der negative Faktor, der in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreift, wurde die katabole Glutamatdehydrogenase RocG vorgeschlagen (Abschnitt 4.2.2.; Abb. 5.3.). Zum anderen könnte die Expression oder die Aktivität eines Faktors, welcher positiv in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreift, durch Glutamat verhindert bzw. gehemmt werden. Für den letzten der beiden vorgeschlagenen Regulationsmechanismen gibt es keine Hinweise.

Der Einfluß anderer Glutamatquellen

Die Aminosäuren Glutamin, Asparagin, Aspartat, Prolin, Arginin und Ornithin können zu Glutamat umgewandelt werden (Abb. 2.3.). Der regulatorische Einfluß von Glutamat auf die Expression des *gltAB*-Operons in Gegenwart verschiedener C-Quellen wurde bereits untersucht (siehe Abschnitt 4.1.3.; Bohannon & Sonenshein 1989, 2004; Wacker, 2002). Die Aminosäure Arginin führt zur vollständigen Repression des *gltAB*-Operons (Reif, 2004; Belitsky & Sonenshein, 2004). Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die oben genannten Aminosäuren das *gltAB*-Operon unterschiedlich stark reprimieren. Dazu wurde die Expression der *gltA-lacZ*-Fusion in *B. subtilis* GP342 in Gegenwart verschiedener Glutamatquellen bestimmt (Tab. 4.3.).

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)							
Glukose	**-**	**Asn**	**Pro**	**Glu**	**Asp**	**Gln**	**Arg**	**Orn**
-	k.W.[1]	19	19	13	13	11	7	11
+	637	428	488	234	192	169	12	16

Tab. 4.3. Expression der *gltA-lacZ*-Fusion in Gegenwart verschiedener Glutamatquellen.
Der Stamm GP342 (wt) wurde in CS-Minimalmedium angezogen. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Aminosäuren Asparagin (Asn), Prolin (Pro), Glutamat (Glut), Aspartat (Asp), Glutamin (Gln), Arginin (Arg) und Ornithin (Orn) betrugen 0,5 %. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.
[1]k.W. = kein Wachstum.

Die Aminosäuren Prolin und Asparagin reprimieren das *gltAB*-Operon in Gegenwart von Glukose sehr schwach. Wie das Glutamat, so reprimieren auch Aspartat und Glutamin das *gltAB*-Operon etwa zweifach. Arginin und Ornithin nehmen eine Sonderstellung unter den verwendeten Glutamatquellen ein. In glukosehaltigem Medium reprimieren Arginin und Ornithin die Epression der Glutamatsynthase vollständig. Durch den Abbau eines Moleküls Arginin werden zwei Moleküle Glutamat freigesetzt (Belitsky & Sonenshein, 1998). Die erhöhte Glutamatfreisetzung in der Zelle beim Abbau von Arginin könnte möglicherweise die Ursache für die starke Repression durch Arginin sein. Das *gltAB*-Operon wird jedoch auch bei gleichen Glutamat- und Argininkonzentrationen nur durch Arginin vollständig reprimiert (Tab. 4.4.). Sogar bei einem fünfachen Überschuß von Glutamat zu Arginin wird das *gltAB*-Operon durch Glutamat nicht so stark reprimiert wie durch Arginin.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)					
Aminosäure (mM)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**
Glutamat	364	231	180	183	161	146
Arginin	364	18	14	12	12	20

Tab. 4.4. Expression der *gltA-lacZ*-Fusion in Gegenwart verschiedener Glutamat- und Argininkonzentrationen.
Der Stamm GP342 (wt) wurde in CS-Minimalmedium mit Glukose als C-Quelle angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Arginin und Ornithin werden beide über den Argininabbauweg in Glutamat überführt. Über diesen Abbauweg wird auch die Aminosäure Prolin zu Glutamat umgewandelt (Abb. 2.3.). Erstaunlicherweise reprimiert Prolin das *gltAB*-Operon nur schwach. Die Ergebnisse dieses Experiments weisen jedoch darauf hin, daß eine Komponente des Argininabbauwegs an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist (siehe Kapitel 4.2.2.; Abb. 5.3.). Physiologisch ist die Repression des *gltAB*-Operons durchaus sinnvoll. Arginin und Ornithin sind für *B. subtilis* sehr gute N-Quellen (Belitsky & Sonenshein, 1998). Für das Bakterium wäre es deshalb energetisch ungünstig, die Glutamatsynthase in Gegenwart von Arginin oder Ornithin zu exprimieren.

4.1.4. Der Einfluß allgemeiner und spezifischer Regulatoren auf die Expression des *gltAB*-Operons

Die Rolle des allgemeinen Regulatorproteins TnrA

Das globale Regulatorprotein des Stickstoffstoffwechsels TnrA ist an der ammoniumabhängigen Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt (Wray *et al.*, 1996). Bei Ammoniummangel verhindert TnrA durch seine Bindung im Promotorbereich des *gltAB*-Operons die Expression der Glutamatsynthase (Belitsky *et al.*, 2000).

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)			
Stamm	**Ammonium**	**CSE**	**CSE + Glc**	**CS + Glc**
GP342 (wt)	+	8	160	283
GP723 (*ΔtnrA*)	+	8	134	342
GP342 (wt)	-	19	14	k.W.[1]
GP723 (*ΔtnrA*)	-	14	115	k.W.

Tab. 4.5. Einfluß von Glukose auf die *gltAB*-Expression in der *tnrA*-Mutante.
Die Kulturen wurden in CS-Minimalmedium mit und ohne Ammonium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.
[1]k.W. = kein Wachstum.

Um auszuschließen, daß TnrA an der glukoseabhängigen Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist, wurde die Expression der *gltA-lacZ*-Fusion, im Wildtyp GP342 und in der *tnrA*-Mutante GP723 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht (Tab. 4.5.).

Das *gltAB*-Operon wird sowohl im Wildtyp als auch in der *tnrA*-Mutante in ammoniumhaltigem Medium durch Glukose induziert. In Gegenwart von Glutamat ist die *gltAB*-Expression in beiden Stämmen beim Wachstum mit Glukose um den Faktor zwei erniedrigt. Das *gltAB*-Operon kann also auch in der *tnrA*-Mutante durch Glutamat reprimiert werden. Erwartungsgemäß wird nur in der *tnrA*-Mutante das *gltAB*-Operon in Minimalmedium ohne Ammonium durch Glukose induziert. Ohne Ammonium bindet TnrA im Promotorbereich des *gltAB*-Operons und verhindert dessen Expression. In der *tnrA*-Mutante ist die ammoniumabhängige Regulation des *gltAB*-Operons aufgehoben. In Medium ohne Glutamat und Ammonium können beide Stämme nicht wachsen. Ohne Glukose wird die Glutamatsynthase weder im Wildtyp noch in der *tnrA*-Mutante exprimiert. Die Meßergebnisse zeigen, daß das Signal der C-Quelle keinen Einfluß auf die TnrA-abhängige Regulation des *gltAB*-Operons hat.

Die Rolle des spezifischen Regulatorproteins GltC

Die Expression des *gltAB*-Operons wird durch das Aktivatorprotein GltC vermittelt. In einer *gltC*-Mutante kann das *gltAB*-Operon nicht mehr durch Glukose induziert werden, deshalb ist eine *gltC*-Mutante auxotroph für Glutamat (Bohannon & Sonenshein, 1989). Durch Komplementationsanalysen sollte überprüft werden, ob die Expression des Aktivatorproteins GltC in einer *gltC*-Mutante zur Wiederherstellung der Regulation des *gltAB*-Operons führt. Zu diesem Zweck wurde das Aktivatorprotein GltC in der *gltC*-Mutante plasmidständig überproduziert.

Eine Westernblot-Analyse zeigt, daß das Aktivatorprotein plasmidständig exprimiert wird (Abb. 4.1.).

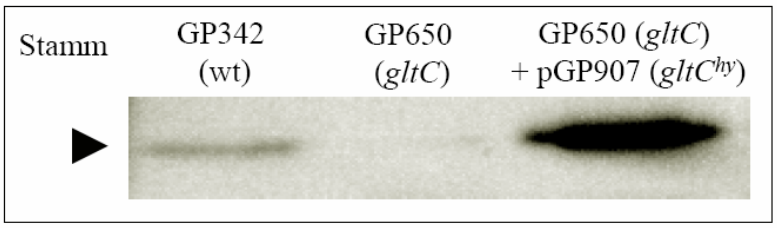

Abb. 4.1. Westernblot-Analyse zum Nachweis von GltC.

Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt), GP650 (*gltC*) und dem Stamm GP650 (*gltC*), der das Komplementationsplasmid pGP907 enthielt, wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von GltC erfolgte mit polyklonalen GltC-Antikörpern. Die Zellen wurden in CSE-Medium mit Glukose angezogen. Der Pfeil markiert das von GltC gelieferte Signal.

Die Überexpression des Aktivatorproteins in der *gltC*-Mutante ermöglicht auch das Wachstum mit Glukose und Ammonium als C- und N-Quelle (Abb. 4.2.). Die Regulation des *gltAB*-Operons ist in der komplementierten Mutante wiederhergestellt (Tab. 4.6.). Auffällig ist die erhöhte Expression der Glutamatsynthase in Abwesenheit von Glukose. Dies könnte an der hohen zellulären Konzentration des Regulatorproteins GltC liegen (Abb. 4.1.).

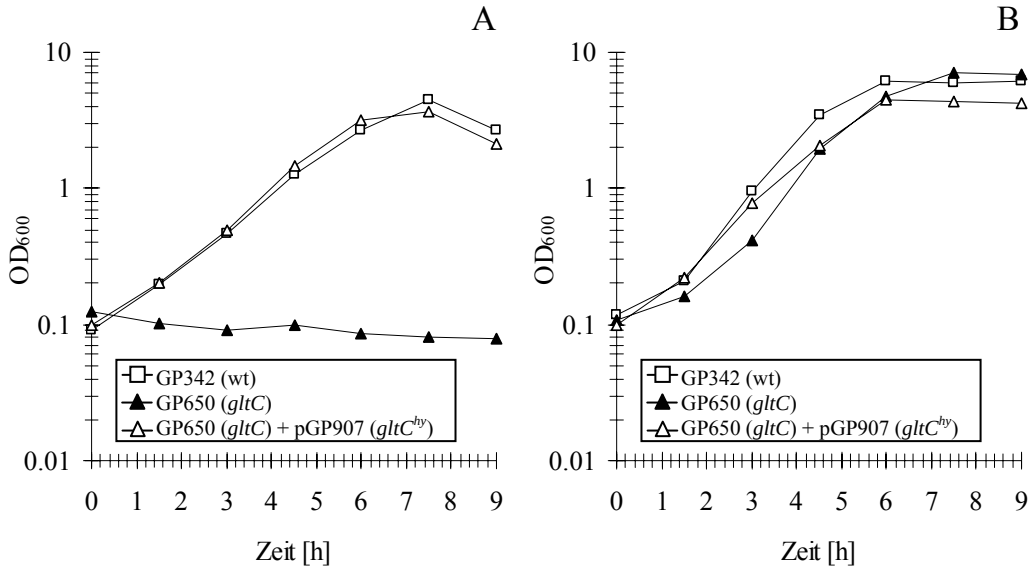

Abb. 4.2. Komplementation der *gltC*-Mutante.

Im Abbildungsteil A ist das Wachstum der Stämme GP342 (wt), GP650 (*gltC*) und GP650 (*gltC*) + pGP907 ($gltC^{hy}$) in CS-Medium mit Glukose dargestellt. Abbildungsteil B zeigt das Wachstum dieser Stämme in CS-Medium mit Glukose und Glutamat.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)	
Stamm	**CSE**	**CSE + Glc**
GP342 (wt)	6	173
GP650 (*gltC*)	13	6
GP650 + pGP907 (*gltC* + *gltC*^{hy})	76	202

Tab. 4.6. Wiederherstellung der Regulation des *gltAB*-Operons in der *gltC*-Mutante.
Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das glukoseabhängige Signal für die Induktion des *gltAB*-Operons durch das Aktivatorprotein GltC vermittelt wird. Außerdem wird der Aminogruppendonor Glutamat in *B. subtilis* ausschließlich durch die Glutamatsynthase gebildet. Deshalb kann der Stamm ohne die Expression der Glutamatsynthase in Minimalmedium ohne Glutamat nicht wachsen (Abb. 4.2.).

4.2. Die Rolle der Glutamatdehydrogenasen RocG und GudB bei der Regulation des *gltAB*-Operons

In *B. subtilis* kodieren sowohl das *rocG*-Gen und als auch das *gudB*-Gen für Glutamatdehydrogenasen. Aufgrund einer Insertion von neun Basenpaaren im Leserahmen von *gudB* ist die Glutamatdehydrogenase GudB enzymatisch inaktiv. Das *rocG*-Gen kodiert für die enzymatisch aktive Glutamatdehydrogenase RocG (Belitsky & Sonenshein, 1998). Es gibt Glutamatdehydrogenasen, die NADH + H^+ oder NADPH + H^+ als Kofaktor benötigen. Glutamatsynthetisierende Glutamatdehydrogenasen verwenden NADPH + H^+ als Kofaktor. RocG benötigt NADH + H^+ als Kofaktor und gehört damit zu den katabolen Glutamatdehydrogenasen (Smith *et al.*, 1975).

4.2.1. Die Funktion von RocG bei der Synthese und dem Abbau von Glutamat

In *B. subtilis* katalysiert RocG ausschließlich die reduktive Deaminierung von Glutamat zu α-Ketoglutarat und Ammonium (Kimura *et al.*, 1977; Kane & Deshpande, 1979; Belitsky & Sonenshein, 1998). Die enzymatisch aktive Glutamatdehydrogenase ist daher nicht an der Glutamatsynthese beteiligt. Dies konnte durch die Wachstumsexperimente mit der *gltC*-Mutante bestätigt werden, in der die Glutamatsynthase nicht mehr exprimiert wird (siehe Kapitel 4.1.4.).

Arginin kann im Gegensatz zu Glutamat als alleinige C- und N-Quelle genutzt werden (Belitsky & Sonenshein, 1998). Offensichtlich ermöglicht die Expression der Enzyme des Argininabbauwegs, daß das Kohlenstoffgerüst von Arginin über die katabole Reaktion der Glutamatdehydrogenase RocG und den Citratzyklus in den C-Stoffwechsel einfließen kann (Abb. 2.3.). Das in Folge des Argininabbaus freigesetzte Glutamat dient bei anabolen Reaktionen als Aminogruppendonor. Möglicherweise ist eine zu geringe RocG-Menge in der Zelle dafür verantwortlich, daß *B. subtilis* Glutamat als C-Quelle nicht verwerten kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde die katabole Glutamatdehydrogenase RocG im Wildtyp plasmidständig überproduziert.

Die Überproduktion der katabolen Glutamatdehydrogenase RocG wurde mit Hilfe einer Westernblot-Analyse überprüft (Abb. 4.3.).

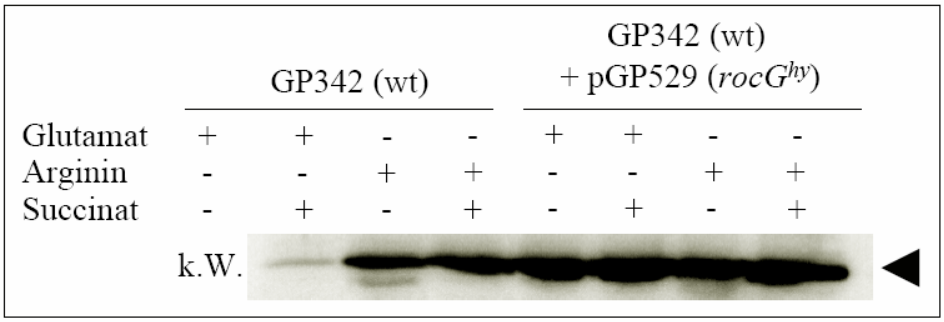

Abb. 4.3. Westernblot-Analyse zum Nachweis von RocG.

Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt) und GP342 (wt), der das Plasmid pGP529 für die Überexpression von RocG enthielt, wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Aminosäuren betrugen 0,5 %. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Der Pfeil markiert das von RocG gelieferte Signal. k.W. = kein Wachstum.

Die Westernblot-Analyse in Abbildung 4.3. zeigt, daß Arginin das *rocG*-Gen im Wildtyp GP342 induziert. In Gegenwart von Glutamat wird die Glutamatdehydrogenase RocG nur schwach exprimiert. Die C-Quelle Succinat hat keinen Einfluß auf die Expression von RocG. Durch die Transformation des Wildtyps GP342 mit dem Plasmid zur Überexpression von RocG wird die Glutamatdehydrogenase unter allen Wachstumsbedingungen stark exprimiert. Mit Succinat als C-Quelle und Glutamat als N-Quelle können der Wildtyp und der Stamm mit dem RocG-Überexpressionsplasmid wachsen. Der Wildtyp kann jedoch Glutamat als C-Quelle nicht verwerten (Abb. 4.4. A). Erst durch die Überexpression von RocG wird das Wachstum mit Glutamat als C-Quelle ermöglicht (Abb. 4.4. B).

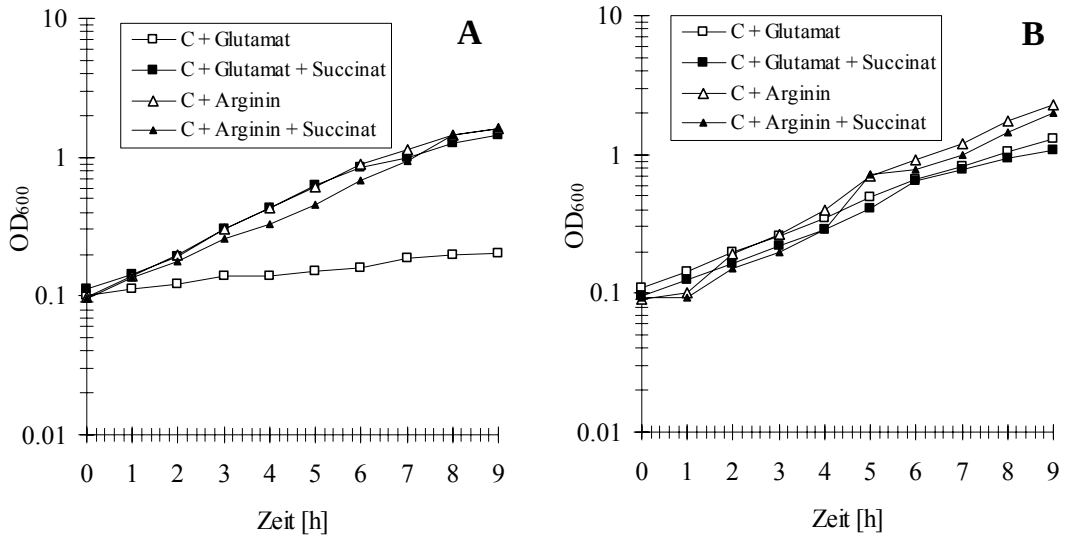

Abb. 4.4. Nutzung von Glutamat und Arginin als C-Quelle.

In Abbildungsteil A ist das Wachstum des Stamms GP342 (wt) dargestellt. Abbildungsteil B zeigt das Wachstum des Stamms GP342 (wt), in dem RocG mit Hilfe des Plasmids pGP529 überproduziert wird. Glutamat und Arginin wurden als C-Quelle in einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die fehlende Induktion des *rocG*-Gens durch Glutamat ist demnach die Ursache dafür, daß *B. subtilis* Glutamat als C-Quelle nicht nutzen kann.

4.2.2. Inverse Regulation der Glutamatsynthase und der Glutamatdehydrogenase

In *B. subtilis* wird die Glutamatsynthase beim Wachstum in Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose und einer schlechten N-Quelle wie Ammonium stark exprimiert (Tab. 4.2.). Unter diesen Bedingungen wird die Expression des glutamatabbauenden Enzyms RocG durch die Bindung von CcpA im Promotorbereich des *rocG*-Gens verhindert (Belitsky *et al.*, 2004; Reif, 2004). Es konnte gezeigt werden, daß in einer *rocG*-Mutante das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert wird (Wacker, 2002). Die Verringerung der RocG-Menge durch die Katabolitenrepression oder die Inaktivierung des *rocG*-Gens ermöglicht also die Expression der Glutamatsynthase. Beide Beobachtungen führen zu der Annahme, daß die Glutamatdehydrogenase RocG an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist (Belitsky & Sonenshein, 2004; Commichau *et al.*, 2006b).

Mit dem folgenden Experiment sollte der Fragestellung nachgegangen werden, welche Rolle die Glutamatquelle bei der RocG-abhängigen Repression des *gltAB*-Operons spielt. Dazu wurde der Wildtypstamm GP342 in An- und Abwesenheit von Glukose angezogen und die Expression der Glutamatdehydrogenase mit Hilfe einer Westernblot-Analyse in Gegenwart verschiedener Aminosäuren untersucht (Abb. 4.5.). Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Aminosäuren Arginin und Ornithin das *rocG*-Gen induzieren (Reif, 2004). Die Expression des *gltAB*-Operons wurde mit Hilfe der *gltA-lacZ*-Fusion ermittelt (Tab. 4.3.).

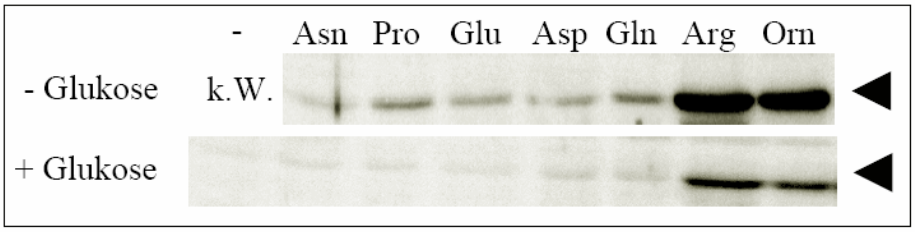

Abb. 4.5. Expression der Glutamatdehydrogenase RocG in Gegenwart verschiedener Glutamatquellen. Die Proteinlösungen des Stamms GP342 (wt) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Der Stamm GP342 (wt) wurde in CS-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Der Pfeil markiert das von RocG gelieferte Signal. k.W. = kein Wachstum.

Die in Abbildung 4.5. dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die RocG-Expression in Gegenwart der Aminosäuren Arginin und Ornithin maximal ist. Alle anderen verwendeten

Glutamatquellen induzieren das *rocG*-Gen nicht. Durch die Zugabe von Glukose kann RocG nur noch in arginin- und ornithinhaltigem Medium nachgewiesen werden.

Das *gltAB*-Operon wird invers zum *rocG*-Gen exprimiert. In Gegenwart verschiedener Glutamatquellen und in Abwesenheit von Glukose wird das *gltAB*-Operon nicht exprimiert und RocG kann detektiert werden (Tab. 4.3.; Abb. 4.5.). Durch die Zugabe von Glukose wird die Glutamatsynthase nur in Abwesenheit der Glutamatquellen Arginin und Ornithin, also bei einer geringen RocG-Menge, exprimiert. Die Glutamatquellen Asparagin, Prolin, Glutamat, Aspartat und Glutamin hingegen reprimieren das *gltAB*-Operon in glukosehaltigem Medium das *gltAB*-Operon geringfügig.

In Abschnitt 4.1.2. wurde ein Faktor postuliert, der negativ in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreift, und dessen Expression durch CcpA reprimiert wird. Die Ergebnisse des oben beschriebenen Experiments liefern weitere Hinweise für die Vermutung, daß es sich bei diesem Faktor um die katabole Glutamatdehydrogenase RocG handelt. Das *rocG*-Gen wird durch CcpA reprimiert (Belitsky *et al.*, 2004). Die inverse Korrelation zwischen der Expression des *gltAB*-Operons und der durch die C-Quelle ausgeübten Katabolitenrepression könnte demnach auf das Expressionsniveau von RocG zurückzuführen sein. Die Ergebnisse in Abschnitt 4.1.3. zeigen jedoch, daß das *gltAB*-Operon auch beim Wachstum ohne Glutamat und mit schlechten C-Quellen (z.B. Arabinose), die eine geringe Katabolitenrepression ausüben, exprimiert wird. Unter diesen Bedingungen wird das *rocG*-Gen durch die C-Quelle nicht reprimiert. Erst durch die Zugabe von Glutamat wird das *gltAB*-Operon reprimiert. Offensichtlich kann RocG also nur dann in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreifen, wenn *B. subtilis* in glutamathaltigem Medium wächst. Es kann also vermutet werden, daß das *gltAB*-Operon synergistisch durch Glutamat und RocG reprimiert wird (Abschnitt 4.3.; 5.3.).

4.2.3. Inhibition von RocG durch die C-Quelle

Die Glutamatdehydrogenase RocG wird über die C-Quelle CcpA-abhängig reguliert. In Gegenwart guter C-Quellen, wie zum Beispiel durch Glukose, wird das *rocG*-Gen stark reprimiert. In einer *ccpA*-Mutante ist die C-Quellen-abhängige Regulation von *rocG* aufgehoben (Reif, 2004; Belitsky *et al.*, 2004). Das *gltAB*-Operon kann in der *ccpA*-Mutante nicht mehr induziert werden. Neben der Katabolitenrepression ist in der *ccpA*-Mutante auch die Zuckeraufnahme über das PTS verringert (Ludwig *et al.*, 2002a). In einer *ccpA ptsH1*-

Doppelmutante ist die Zuckeraufnahme wiederhergestellt und das *gltAB*-Operon kann durch Glukose wieder induziert werden (Wacker *et al.*, 2003).

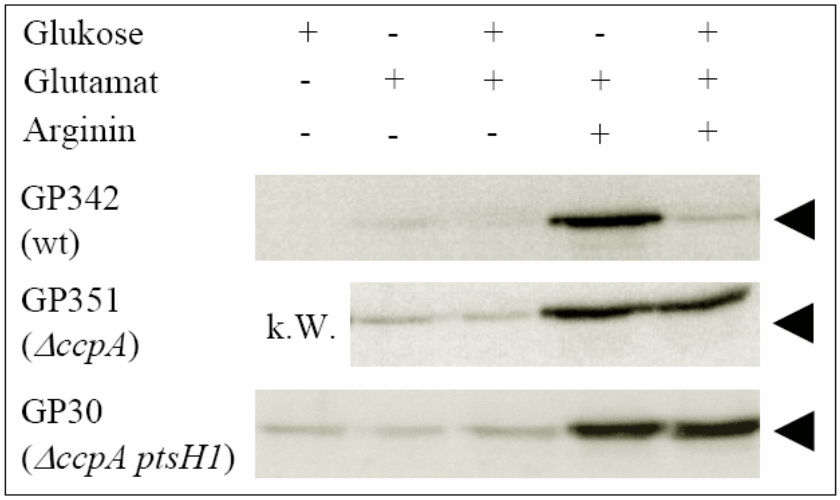

Abb. 4.6. Expression der Glutamatdehydrogenase RocG in der *ccpA*- und der *ccpA ptsH1*-Mutante.
Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt), GP351 (*ccpA*) und GP30 (*ccpA ptsH1*) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Der Stämme wurden in CS-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Die Pfeile markieren das von RocG gelieferte Signal. k.W. = kein Wachstum.

Um zu demonstrieren, daß das *gltAB*-Operon trotz Anwesenheit von RocG durch Glukose induziert werden kann, wurde die Expression von RocG in der *ccpA ptsH1*-Doppelmutante untersucht und mit der Expression der Glutamatsynthase verglichen (Abb. 4.6. und Tab. 4.7.). Dazu wurde der Stamm GP30 unter verschiedenen Bedingungen angezogen und RocG in einer Westernblot-Analyse detektiert. Als Kontrollstämme wurden die *ccpA*-Mutante GP351 und der Wildtypstamm GP342 verwendet.

Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse sind in Abbildung 4.6. dargestellt. In Gegenwart von Arginin wird RocG in allen drei Stämmen stark exprimiert. Im Wildtyp ist die RocG-Menge in Gegenwart von Glukose aufgrund der Katabolitenrepression verringert. Sowohl in der *ccpA*-Mutante als auch in der *ccpA ptsH1*-Mutante ist die CcpA-abhängige Regulation durch Glukose aufgehoben. Daher wird in beiden Mutanten auch in Gegenwart von Glukose das *rocG*-Gen durch Arginin stark induziert. Im Gegensatz zum Wildtyp ist sowohl in der *ccpA*-Mutante als auch in der *ccpA ptsH1*-Mutante die RocG-Menge in glukosehaltigem Medium erhöht. Die *ccpA*-Mutante wächst in glukosehaltigem Medium nur

durch die Zugabe von Glutamat, da die Glutamatsynthase nicht exprimiert wird. Die *ccpA ptsH1*-Doppelmutante hingegen kann in glukosehaltigem Medium auch ohne Glutamat wachsen (Tab. 4.7.; Wacker *et al.*, 2003). Es wurde vorgeschlagen, daß der Grund für die fehlende Induktion des *gltAB*-Operons in der *ccpA*-Mutante offenbar die schlechte Glukoseaufnahme über das PTS ist. Dies könnte dazu führen, daß das induzierende Signal aus dem C-Stoffwechsel, welches das Regulatorprotein GltC aktiviert, nicht geliefert werden kann (Wacker *et al.*, 2003). Eine weitere Erklärung wäre die Derepression der Glutamatdehydrogenase RocG in der *ccpA*-Mutante. Die erhöhte RocG-Menge könnte die Ursache dafür sein, daß das *gltAB*-Operon nicht mehr induziert werden kann. In Abschnitt 4.2.2. wurde gezeigt, daß es eine inverse Korrelation zwischen der Expression der Glutamatsynthase und der Expression von RocG gibt. Es wäre daher denkbar, daß die erhöhte RocG-Menge in der Zelle die Expression der Glutamatsynthase verhindert.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)				
Stamm	**CS + Glc**	**CSE**	**CSE + Glc**	**CSE + R**	**CSE + R + Glc**
GP342 (wt)	435	10	175	8	20
GP351 (*ccpA*)	k.W.[1]	10	12	7	7
GP30 (*ccpA ptsH1*)	366	26	133	22	30

Tab. 4.7. Regulation des *gltAB*-Operons durch Glukose und die Glutamatquellen Glutamat und Arginin. Die Stämme wurden in CS-Minimalmedium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.
[1]k.W. = kein Wachstum.

In der *ccpA ptsH1*-Doppelmutante kann das *gltAB*-Operon jedoch auch in Gegenwart von RocG durch Glukose induziert werden (Abb. 4.6. und Tab. 4.7.). Wie oben erwähnt kann die *ccpA ptsH1*-Doppelmutante im Gegensatz zur *ccpA*-Mutante Glukose wieder aufnehmen. Die Wiederherstellung der Regulation des *gltAB*-Operons könnte zum einen dadurch erklärt werden, daß RocG durch ein Signal der C-Quelle oder ein Metabolit des C-Stoffwechsels inaktiviert wird, und somit der reprimierende Einfluß von RocG auf das *gltAB*-Operon in Anwesenheit einer guten C-Quelle verloren geht. Zum anderen könnte aber auch der erhöhte Glutamatbedarf beim Wachstum mit Glukose dazu führen, daß die Glutamatkonzentration

leicht erniedrigt ist, und RocG damit seinen reprimierenden Einfluß auf das *gltAB*-Operon verliert. Die in den Abschnitten 4.1.3. und 4.2.2. vorgestellten Experimente liefern Hinweise dafür, daß RocG und Glutamat synergistisch das *gltAB*-Operon reprimieren. Diese Hypothese ist allerdings schwierig zu überprüfen, da sich die zelluläre Glutamatkonzentration nur geringfügig ändert (Blencke, 2004).

4.2.4. Regulation des *gltAB*-Operons in Mutanten mit veränderter RocG-Expression

RocR ist ein positiver Regulator des Arginin-Katabolismus und stimuliert die SigL-abhängigen Promotoren der beiden Operons *rocABC* und *rocDEF* sowie den Promotor des *rocG*-Gens (Abschnitt 2.5.; Calogero *et al.*, 1994; Gardan *et al.*, 1995, 1997). Neben den Genen des RocR-Regulons werden auch die Operons *levDEFG-sacC*, *bkd* und *acoABCL* SigL-abhängig transkribiert (Helmann & Moran, 2002). Die Gene des RocR-Regulons werden zusätzlich durch das Regulatorprotein AhrC aktiviert (Mountain & Baumberg, 1980; Czaplewski *et al.*, 1992).

Um den Einfluß der RocG-Menge auf die Regulation des *gltAB*-Operons zu untersuchen, wurde die Expression der Glutamatsynthase in einer *sigL*- und einer *ahrC*-Mutante untersucht. Im Fall einer direkten Korrelation der Expression der Glutamatsynthase und der RocG-Menge sollte die Expression der Glutamatsynthase in den Regulatormutanten erhöht sein. Die RocG-Mengen in den Regulatormutanten wurden mit Hilfe einer Westernblot-Analyse ermittelt und mit dem Expressionsmuster von RocG in den isogenen Wildtypstämmen GP342 und GP669 verglichen (siehe Abb. 4.7.).

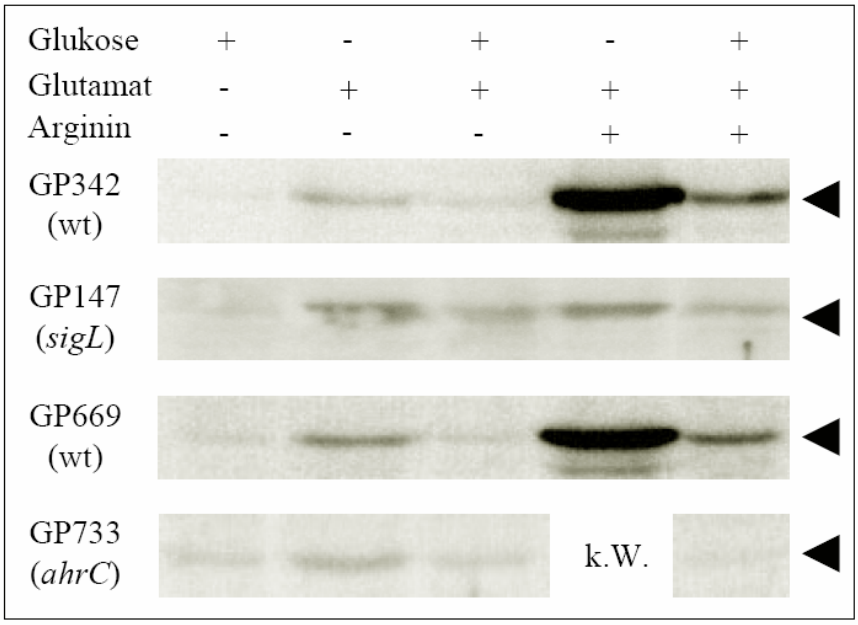

Abb. 4.7. Expression der Glutamatdehydrogenase RocG in der *sigL*- und der *ahrC*-Mutante.
Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt), GP733 (*ahrC*), GP669 (wt) und GP147 (*sigL*) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Die Stämme wurden in CS-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Der Pfeil markiert das von RocG gelieferte Signal. k.W. = kein Wachstum.

Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse zeigen, daß das *rocG*-Gen sowohl in der *sigL*-Mutante als auch in der *ahrC*-Mutante durch Arginin nicht mehr induziert werden kann (Abb. 4.7.). Sowohl der Sigmafaktor σ^L als auch das Aktivatorprotein AhrC werden für die Expression der Glutamatdehydrogenase RocG benötigt (Helmann & Moran, 2002; Mountain & Baumberg, 1980; Czaplewski *et al.*, 1992). In Abwesenheit von Glukose und Arginin ist die RocG-Menge in allen drei Stämmen nahezu gleich hoch. Die Ergebnisse zeigen, daß RocG auch in Abwesenheit des Sigmafaktors σ^L oder des Aktivatorproteins AhrC exprimiert werden kann. Der Einfluß der Katabolitenrepression auf die RocG-Expression ist jedoch zu beobachten, da die RocG-Menge ist in allen drei Stämmen beim Wachstum mit Glukose erniedrigt ist (Abb. 4.7.). Im Wildtyp kann das *rocG*-Gen auch in Anwesenheit von Glukose durch Arginin schwach induziert werden.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)				
Stamm	**CS + Glc**	**CSE + Glc**	**CSE**	**CSE + R + Glc**	**CSE + R**
GP342 (wt)	435	175	10	20	8
GP147 *(sigL)*	549	76	8	99	9
GP669 (wt)	683	201	8	7	5
GP733 (*ahrC*)	758	376	46	550	k.W.[1]

Tab. 4.8. Regulation des *gltAB*-Operons in der *sigL*- und der *ahrC*-Mutante.
Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.
[1]k.W. = kein Wachstum.

Sowohl im Wildtyp als auch in den beiden Regulatormutanten wird das *gltAB*-Operon in glutamatfreiem Medium beim Wachstum mit Glukose stark exprimiert (Tab. 4.8.). Durch die Zugabe von Glutamat wird das *gltAB*-Operon etwa zwei- bis fünffach reprimiert. Der Grund für die Glutamatrepression könnte zwei Ursachen haben: Zum einen könnte eine geringe RocG-Menge dazu ausreichen, um zusammen mit Glutamat das *gltAB*-Operon zu reprimieren (Abb. 5.3.). Wie an den Ergebnissen der Westernblot-Analyse zu erkennen ist, wird RocG auch in Abwesenheit der Regulatoren σ^L und AhrC exprimiert (Abb. 4.7.). Zum anderen könnte die Glutamatrepression auf die Hemmung des Aktivatorproteins GltC zurückzuführen sein (Picossi-Goñi *et al.*, 2005). Die erste der beiden genannten Möglichkeiten kann jedoch ausgeschlossen werden, da in einer *rocG*-Mutante die Repression durch Glutamat ebenfalls zu beobachten ist (Commichau *et al.*, 2006b). Außerdem ist die RocG-Menge aufgrund der Katabolitenrepression in der Zelle sehr niedrig (Abb. 4.7.).

Im Gegensatz zum Wildtypstamm und der *sigL*-Mutante wird in der *ahrC*-Mutante die Glutamatsynthase in glukosefreiem Medium schwach exprimiert. Die erhöhte Expression des *gltAB*-Operons in der *ahrC*-Mutante könnte durch eine geringere RocG-Menge in der Zelle erklärt werden. Diese Vermutung kann durch die Westernblotanalyse bestätigt werden (Abb. 4.7.). In dem isogenen Wildtypstamm GP669 ist in glutamathaltigem Minimalmedium mehr RocG vorhanden als in der *ahrC*-Mutante. Die Verringerung der RocG-Menge führt daher zu einer stärkeren Expression der Glutamatsynthase. In der *sigL*-Mutante liegt RocG offensichtlich in einer ausreichend hohen Konzentration vor, um das *gltAB*-Operon in Abwesenheit von Glukose zu reprimieren.

Sowohl in der *sigL*-Mutante als auch in der *ahrC*-Mutante wird das *gltAB*-Operon in glukosehaltigem Medium durch Arginin nicht reprimiert. In beiden Mutanten ist die RocG-Menge im Vergleich zu den isogenen Wildtypstämmen erniedrigt. In der *ahrC*-Mutante wird die Glutamatsynthase allerdings im Vergleich zur *sigL*-Mutante stärker exprimiert. Offensichtlich liegt dies an der niedrigeren RocG-Menge in der *ahrC*-Mutante (Abb. 4.7.). Die starke Expression der Glutamatsynthase in den beiden Regulatormutanten beim Wachstum mit Glukose und Arginin, wäre durch die verringerte Argininaufnahme und -umwandlung zu Glutamat zu erklären. Die Proteine bzw. Enzyme, die an der Aufnahme und Umwandlung von Arginin beteiligt sind, werden im *rocABC*- und dem *rocDEF*-Operon kodiert. Beide Operons werden durch σ^L und AhrC aktiviert (Helmann & Moran, 2002; Mountain & Baumberg, 1980; Czaplewski *et al.*, 1992). Durch die Inaktivierung von *sigL* und *ahrC* addieren sich deshalb möglicherweise zwei Effekte: Zum einen kann das *rocG*-Gen durch Arginin nicht mehr induziert werden und wird gleichzeitig durch Glukose reprimiert. Zum anderen wird weniger Arginin aufgenommen und zu Glutamat umgewandelt. In beiden Regulatormutanten ist daher die synergistische Repression des *gltAB*-Operons durch RocG und Glutamat in Gegenwart von Glukose aufgehoben. Daß die Argininaufnahme sowohl in der *sigL*-Mutante als auch in der *ahrC*-Mutante beeinträchtigt ist, konnte bereits gezeigt werden (Débarbouillé *et al.*, 1991; Gardan *et al.*, 1997).

In Abwesenheit von Glukose wird in argininhaltigem Medium weder im Wildtyp noch in den beiden Regulatormutanten das *gltAB*-Operon exprimiert (Tab. 4.8.). Wie in CSE-Medium, so ist offensichtlich auch in argininhaltigem CSE-Medium die RocG-Menge hoch genug, so daß RocG und Glutamat das *gltAB*-Operon synergistisch reprimieren können. Die *ahrC*-Mutante kann im Gegensatz zum Wildtypstamm und der *sigL*-Mutante in glukosefreiem Medium mit Arginin nicht wachsen. Möglicherweise liegt dies an der niedrigen Expression von RocG. Es ist bekannt, daß bei Abwesenheit einer aktiven Glutamatdehydrogenase *B. subtilis* mit Arginin in glukosefreiem Medium nicht wachsen kann. Offensichtlich kommt es wie in der *rocG*-Mutante auch in der *ahrC*-Mutante in Gegenwart von Arginin zur Akkumulation eines toxischen Intermediates aus dem Argininabbauweg (Belitsky & Sonenshein, 1998).

Die Ergebnisse des Experiments zeigen, daß die katabole Glutamatdehydrogenase RocG negativ in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreift und daß Arginin oder ein Metabolit des Argininabbauwegs (z.B. Glutamat) eine wichtige Rolle bei der RocG-abhängigen Regulation des *gltAB*-Operons spielt (Abb. 5.3.).

4.2.5. Aktivierung und Funktion der kryptischen Glutamatdehydrogenase GudB

Wie in Abschnitt 4.2. erwähnt, kodieren im Laborstamm 168 von *B. subtilis* zwei Gene für Glutamatdehydrogenasen. Das *rocG*-Gen kodiert für die enzymatisch aktive und das *gudB*-Gen für die enzymatisch inaktive Glutamatdehydrogenase (Belitsky & Sonenshein, 1998). Es wurde bereits gezeigt, daß die aktive Glutamatdehydrogenase RocG an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist (Abschnitt 4.2.4.; Belitsky & Sonenshein, 2004). Unklar ist jedoch, ob die Glutamatdehydrogenasen aktiv sein müssen, um an der Regulation des *gltAB*-Operons mitzuwirken. Möglicherweise reicht auch die Expression eines inaktiven Proteins aus, um die Expression der Glutamatsynthase zu beeinflussen. Bisher wurde nicht untersucht, ob die inaktive Glutamatdehydrogenase GudB in einer *rocG*-Mutante exprimiert wird.

Die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase GudB

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Aktivität der Glutamatdehydrogenasen RocG bzw. GudB mit dem regulatorischen Einfluß auf das *gltAB*-Operon verknüpft ist. Dazu wurde der Wildtyp GP342 mit chromosomaler DNA einer *rocG*-Mutante (Stamm GP362) transformiert. Nach der Transformation wurden fünf Transformanten vereinzelt und folgendermaßen charakterisiert: Die Expression der Glutamatsynthase wurde mit Hilfe der *gltA-lacZ*-Fusion ermittelt. Bei Abwesenheit einer aktiven Glutamatdehydrogenase wird das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert (Belitsky & Sonenshein, 2004; Commichau *et al.*, 2006b). Neben der Regulation der Glutamatsynthase wurde außerdem überprüft, ob die Transformanten in der Lage sind, mit Succinat und Ammonium (CS-Medium) als C- bzw. N-Quelle zu wachsen (Tab. 4.9.). *B. subtilis* kann in Abwesenheit einer aktiven Glutamatdehydrogenase in CS-Medium wachsen (Wacker, 2002; Commichau *et al.*, 2006b). In einem zusätzlichen Kontrollexperiment wurden die Transformanten in glukosefreiem Medium mit Arginin als N-Quelle angezogen Eine Transformante mit inaktiver Glutamatdehydrogenase sollte mit Arginin, aufgrund der Anreicherung von toxischen Intermediaten des Argininabbauwegs, nicht wachsen können (Belitsky & Sonenshein, 2004). Die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase GudB wurde mittels Sequenzierung überprüft. Bei der Aktivierung dieses Proteins verliert der Leserahmen

neun Basenpaare, die in einem Bereich liegen, der für das aktive Zentrum des Enzyms kodiert (Belitsky & Sonenshein, 1998). Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm GP342 verwendet.

Stamm	**Regulation des *gltAB*-Operons**	***gudB*-Sequenz**	**Wachstum auf CS-Platten**	**Arginin**
GP342 (wt)	wt	wt	-	nicht toxisch
Transformante 1	wt	*gudB1*	-	nicht toxisch
Transformante 2	konstitutiv	wt	++	toxisch
Transformante 3	wt	*gudB1*	-	nicht toxisch
Transformante 4	wt	*gudB1*	-	nicht toxisch
Transformante 5	konstitutiv	wt	++	toxisch

Tab. 4.9. Die Phänotypen einer *rocG*- und einer *rocG gudB1*-Mutante.
Die Sequenz von *gudB* wurde mit dem Primern HMB74, IR3 und IR6 überprüft. Die Expression der Glutamatsynthase wurde in CSE und CSE-Glc-Medium ermittelt. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei zwei der fünf untersuchten Transformanten (Tranformanten 2 und 5) die Expression der Glutamatsynthase konstitutiv ist (Tab. 4.9.). Wie bereits oben erwähnt, wird bei Abwesenheit einer aktiven Glutamatdehydrogenase die Expression des Glutamatsynthase nicht mehr durch die C-Quelle reguliert. Demnach sollte in diesen beiden Transformanten die Wildtypsequenz des *gudB*-Gens vorliegen bzw. die zweite Glutamatdehydrogenase GudB inaktiv sein. Diese Vermutung konnte mittels Sequenzierung bestätigt werden. Es konnte auch gezeigt werden, daß nur die Transfomanten in der Lage sind, Succinat und Ammonium (CS-Medium) als C- und N-Quelle zu verwerten, in denen keine aktive Glutamatdehydrogenase exprimiert wird (Tranformanten 2 und 5). Die Abwesenheit einer aktiven Glutamatdehydrogenase ermöglicht das Wachstum in CS-Medium (Abschnitt 4.5.1.; Commichau *et al.*, 2006b). Möglicherweise wird in den Transformanten, die keine aktive Glutamatdehydrogenase exprimieren, das synthetisierte Glutamat nicht abgebaut und dadurch das Wachstum mit einer schlechten C-Quelle wie Succinat ermöglicht. Die Abwesenheit einer enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase könnte auch dazu führen,

daß das Aktivatorprotein GltC durch die Glutamatdehydrogenase nicht inhibiert wird, und der Regulator GltC die Transkription des *gltAB*-Operons auch ohne Glukose ermöglicht (Abb. 5.4.).

Erwartungsgemäß konnten von den fünf untersuchten Transformanten nur solche in Gegenwart von Arginin wachsen, in denen eine enzymatisch aktive Glutamatdehydrogenase GudB1 exprimiert wird (Tranformanten 1, 3 und 4). Bei Abwesenheit einer enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase kann das aufgenommene Arginin nicht vollständig zu α-Ketoglutarat umgewandelt werden und es kommt vermutlich zur Anreicherung eines toxischen Intermediates des Argininabbauwegs (Belitsky & Sonenshein, 1998).

Die Ergebnisse des Experiments lassen die Schlußfolgerung zu, daß die enzymatische Aktivität der Glutamatdehydrogenasen RocG und GudB1 mit dem regulatorischen Einfluß auf das *gltAB*-Operon verknüpft ist, da erst die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase GudB die Regulation des *gltAB*-Operons wiederherstellt.

Expression der Glutamatdehydrogenase GudB in einer *rocG*-Mutante

Eine *rocG*-Mutante mit inaktiver Glutamatdehydrogenase wächst sehr schlecht auf einem Vollmedium wie SP-Medium, da diese Medium die Aminosäuren Arginin und Ornithin enthält. Beim Wachstum auf SP-Platten kommt es zur Anreicherung von toxischen Intermediaten des Argininabbauwegs, weil die Arginin und Ornithin über den Argininabbauweg nicht in den Citratzyklus einfließen können (Abb. 2.3.; Belitsky & Sonenshein, 1998). Die *rocG gudB1*-Mutante hingegen wächst sehr gut auf diesem Medium. In dieser Mutante kann das vom Argininabbauweg kommende Glutamat in α-Ketoglutarat umgewandelt werden. Die *rocG*-Mutante und die *rocG gudB1*-Mutante lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Phänotyps auf SP-Platten einfach voneinander unterscheiden. Die *rocG*-Mutante bildet durchscheinende Kolonien. Die *rocG gudB1*-Mutante hingegen ist vom Wildtyp phänotypisch nicht zu unterscheiden (Commichau *et al.*, 2006b).

Um zu untersuchen, ob in einer *rocG*-Mutante die Glutamatdehydrogenase GudB gebildet wird, wurden die *rocG*- und die *rocG gudB1*-Mutante glutamathaltigem Minimalmedium mit und ohne Glukose angezogen. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Als Kontrollen wurden der Wildtyp GP342 und die *gudB*-Mutante mitangezogen. Außerdem wurde die Expression der Glutamatsynthase ermittelt (Tab. 4.10.).

Bei Abwesenheit einer enzymatisch inaktiven Glutamatdehydrogenase sollte das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert werden (Commichau *et al.*, 2006b).

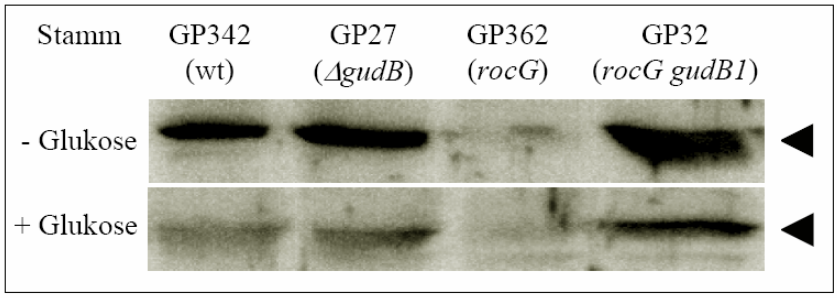

Abb. 4.8. Westernblot-Analyse zum Nachweis der Glutamatdehydrogenase GudB1 .
Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt), GP27 (*ΔgudB*), GP362 (*rocG*) und GP32 (*rocG gudB1*) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG bzw. GudB1 erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Die Stämme wurden in CSE-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Die Pfeile markieren die von RocG und GudB1 gelieferten Signale.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)	
Stamm	**CSE**	**CSE + Glc**
GP342 (wt)	12	128
GP27 (*ΔgudB*)	11	201
GP362 (*rocG*)	268	409
GP32 (*rocG gudB1*)	26	192

Tab. 4.10. Die Expression der Glutamatsynthase in Abhängigkeit der Glutamatdehydrogenase-Aktivität.
Die Stämme wurden in CSE-Minimalmedium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die Westernblot-Analyse zeigt, daß die enzymatisch inaktive Glutamatdehydrogenase GudB mit polyklonalen RocG-Antikörpern in der *rocG*-Mutante nicht nachgewiesen werden kann (Abb. 4.8.). Erst die Aktivierung des Enzyms ermöglicht die Detektion der Glutamatdehydrogenase GudB1 mit Hilfe der RocG-Antikörper. Das *rocG*-Gen wird durch Glukose stark reprimiert. Dies wurde bereits in Abschnitt 4.2.2. gezeigt. Die Expression der

Glutamatsynthase GudB1 im Stamm GP32 wird durch Glukose schwach reprimiert. Die glukoseabhängige Regulation des *gudB1*-Allels ist bisher nicht untersucht worden. Im Promotorbereich des *gudB*-Gens konnte keine CcpA-Bindestelle identifiziert werden (Blencke *et al*, 2003).

Im Wildtyp und in der *gudB*-Mutante kann das *gltAB*-Operon durch Glukose induziert werden. Das inaktive GudB-Protein ist demnach nicht in die Regulation des *gltAB*-Operons involviert. Die Abwesenheit einer enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase führt zur konstitutiven Expression des *gltAB*-Operons (Commichau *et al.*, 2006b). Durch die Aktivierung von GudB ist die glukoseabhängige Regulation des *gltAB*-Operons wieder hergestellt (Tab. 4.10.).

Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse lassen folgende Schlußfolgerungen zu: Die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase GudB ermöglicht zwar die Detektion des Proteins mit Hilfe polyklonaler RocG-Antikörper und die Wiederherstellung der Regulation des *gltAB*-Operons. Die Frage, ob die enzymatische Aktivität der Glutamatdehydrogenase oder das inaktive Protein mit dem regulatorischen Einfluß auf die Expression der Glutamatsynthase verknüpft ist, bleibt jedoch unbeantwortet. Die Insertion der neun Basenpaare im *gudB*-Leserahmen könnte zum einen dazu führen, daß das Transkript instabil ist und somit das enzymatisch inaktive Protein nicht gebildet wird. Zum anderen könnte aber auch die Insertion der drei Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins für die Instabilität verantwortlich sein oder den Nachweis mit Hilfe des RocG-Antikörpers verhindern.

4.2.6. Überexpression von RocG

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression der Glutamatsynthase mit der RocG-Menge in der Zelle korreliert (Abschnitt 4.2.2.). Außerdem wurde mit Hilfe von Regulatormutanten, in denen die RocG-Menge verringert ist, gezeigt, daß die Glutamatsynthase stärker exprimiert wird (Abb. 4.7. und Tab. 4.8.). Bei Abwesenheit einer enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase wird das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert (Tab. 4.10.; Belitsky & Sonenshein, 2004; Commichau *et al.*, 2006b). Der Mechanismus der RocG-abhängigen Regulation des *gltAB*-Operons ist noch unverstanden. Vorgeschlagen wurde ein Modell, in dem die Glutamatdehydrogenase mit dem Regulator GltC interagieren kann und so dessen Aktivität inhibiert (Abb. 5.3.; Tripal, 2003). Die Protein-Protein-

Interaktion zwischen dem Aktivatorprotein GltC und der katabolen Glutamatdehydrogenase RocG konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Reif, 2004).

Um den Einfluß der RocG-Menge auf die Regulation des *gltAB*-Operon genauer zu untersuchen, wurde ein Plasmid konstruiert, mit dem das *rocG*-Gen xyloseabhängig induziert werden kann. Dazu wurde ein 443 bp langes DNA-Fragment, welches die Ribosomenbindestelle und 422 bp vom 5'-Ende des *rocG*-Gens enthielt, in das Plasmid pX2 (Mogk *et al.*, 1997) hinter dem xyloseinduzierbaren Promotor eingebracht. Das klonierte DNA-Fragment enthielt keine *cre*-Sequenz, da der Einfluß der Katabolitenrepression auf die *rocG*-Expression ausgeschlossen werden sollte. Die *cre*-Sequenz befindet sich 35 Basenpaare hinter dem Transkriptionsstartpunkt im Promotorbereich des *rocG*-Gens (Belitsky *et al.*, 2004). In Gegenwart von Xylose wird das durch das Plasmid pX2 kodierte Repressorprotein XylR inaktiviert und der Promotor vor dem zu exprimierenden Gen kann abgelesen werden. Die Klonierungsstrategie ist in Abschnitt 3.1. beschrieben. Mit dem entstandenen Plasmid pGP952 wurde der Wildtypstamm GP342 transformiert. Im erhaltenen Stamm GP752 sollte die Expression von RocG durch Xylose induziert werden können.

Test des xyloseinduzierbaren Systems zur Überexpression von RocG

Zunächst wurde mit Hilfe einer Westernblot-Analyse getestet, ob das xyloseinduzierbare System zur kontrollierten Expression von RocG, funktioniert. Dazu wurde der nach der Transformation erhaltene Stamm GP752 in Medien jeweils mit und ohne Xylose angezogen. Außerdem sollte getestet werden, ob die C-Quelle Glukose und die N-Quelle Arginin einen Effekt auf das Wachstum des Stamms und die Expression von RocG haben. Das Ergebnis der Westernblot-Analyse ist in Abbildung 4.9. dargestellt.

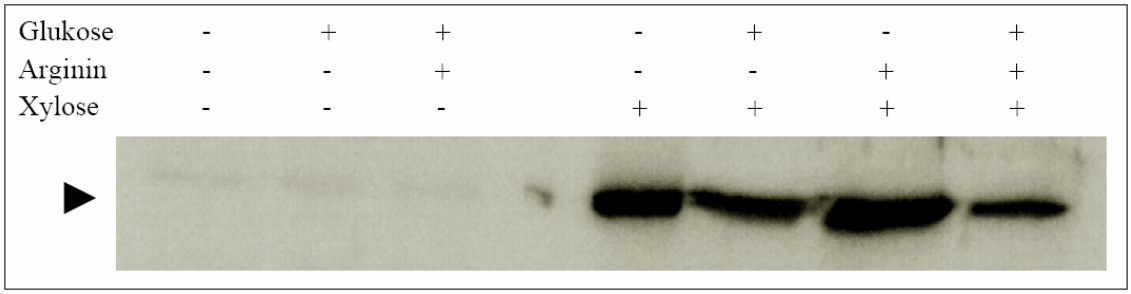

Abb. 4.9. Test des xyloseinduzierbaren Systems.

Die Proteinlösungen des Stamms GP752 wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Der Stamm wurde in CS-Medium angezogen. Die Endkonzentration der Xylose betrug 1,5 %. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Der Pfeil markiert das von RocG gelieferte Signal.

Abbildung 4.9. zeigt, daß die katabole Glutamatdehydrogenase RocG im Stamm GP752 nach der Zugabe von Xylose stark exprimiert wird. Die CcpA-abhängige Regulation durch Glukose ist nahezu aufgehoben. Einen geringen Einfluß der Katabolitenrepression ist jedoch erkennbar. In Gegenwart von Glukose ist das RocG-Signal etwas schwächer. Die glukoseanhängige Regulation des xyloseinduzierbaren Systems könnte auf die Stimulation des Repressorproteins XylR durch Glukose bzw. Glukose-6-Phosphat zurückzuführen sein. Die Glykolyseintermediate Glukose und Glukose-6-Phosphat können die Inaktivierung des Repressors durch Xylose verringern und der Repressor kann schwach an seinen Zielpromotor binden (Dahl *et al.*, 1995). Die schwächere Expression von RocG in Gegenwart von Glukose könnte durch diesen Effekt erklärt werden.

In Abwesenheit von Xylose zeigt der Stamm GP752 den Phänotyp einer *rocG*-Mutante, da der Stamm ohne Glukose mit Arginin nicht wachsen kann (Abschnitt 4.2.5.). Erst durch die Induktion des *rocG*-Gens durch Xylose kann das toxische Intermediat aus dem Argininabbauweg über RocG in den Citratzyklus überführt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß das xyloseinduzierbare System zur kontrollierten Expression von RocG funktioniert.

Expression der Glutamatsynthase in Gegenwart einer hohen RocG-Menge

Um den Einfluß der RocG-Menge auf die Expression des *gltAB*-Operons zu testen, wurde der Stamm GP752 in Minimalmedium mit und ohne Glukose angezogen. In Abschnitt 4.2.3. wurde gezeigt, daß die Aktivität bzw. der regulatorische Einfluß der katabolen

Glutamatdehydrogenase RocG auf die Expression der Glutamatsynthase durch die C-Quelle reguliert werden kann. Man kann daher vermuten, daß es neben der Kontrolle auf transkriptioneller Ebene durch den globalen Regulator des C-Stoffwechsels CcpA einen zusätzlichen Regulationsmechanismus auf der Ebene der Enzymaktivität gibt (Abb. 5.3.). Durch die Zugabe von Glutamat und Arginin unter nichtinduzierenden und induzierenden Bedingungen sollte daher der Einfluß der beiden Aminosäuren auf die Aktivität der Glutamatdehydrogenase RocG untersucht werden. Als Kontrolle für dieses Experiment wurde der Wildtypstamm GP342 unter den entsprechenden Bedingungen mit angezogen.

Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 4.11. dargestellt. Im Wildtyp GP342 wird das *gltAB*-Operon durch Glukose induziert. Die Aminosäure Glutamat reprimiert das *gltAB*-Operon etwa zweifach. In Gegenwart von Arginin ist das *gltAB*-Operon vollständig reprimiert. Die Zugabe des Zuckers Xylose zum Medium hat auf die Regulation des *gltAB*-Operons im Wildtyp keinen Einfluß (Abschnitt 4.1.2.). In xylosefreiem ist das *gltAB*-Operon im Stamm GP752 wie im Wildtyp reguliert. Ohne Xylose wird die Glutamatdehydrogenase RocG nur sehr schwach exprimiert (Abb. 4.9.). Offensichtlich reicht die geringe RocG-Expression jedoch dazu aus, das *gltAB*-Operon zusammen mit der Aminosäure Glutamat zu reprimieren. Durch die Induktion des *rocG*-Gens mit dem Zucker Xylose ist das *gltAB*-Operon nicht mehr durch Glutamat reprimierbar. Erst in Gegenwart von Arginin wird das *gltAB*-Operon wieder vollständig reprimiert.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)					
Stamm	**Xylose**	**CS + Glc**	**CSE**	**CSE + Glc**	**CSE + R**	**CSE + R + Glc**
GP342 (wt)	-	417	12	210	8	23
GP752 (p_{xyl}::*rocG*)	-	297	29	119	k.W.[1]	16
GP752 (p_{xyl}::*rocG*)	+	387	740	325	8	20

Tab. 4.11. Der Einfluß der RocG-Menge auf die Expression der Glutamatsynthase.

Die Endkonzentrationen der zugesetzeten Xylose betrug 1,5 %. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

[1]k.W. = kein Wachstum.

Die Zugabe von Arginin stellt die RocG-vermittelte Repression des *gltAB*-Operons wieder her. Möglicherweise ist ein Metabolit aus dem Argininabbauweg in der Lage, die katabole Glutamatdehydrogenase RocG zu aktivieren, so daß das Enzym in die Regulation des *gltAB*-Operons wieder eingreifen kann. Durch Arginin werden auch die Arginin-Transporter RocC und RocF induziert (Calogero *et al.*, 1994; Gardan *et al.*, 1995, 1997). Demnach sollten sowohl die Konzentrationen der Intermediate des Argininabbauwegs als auch die Glutamatkonzentration höher sein als beim Wachstum mit Glutamat. Die starke Expression der Glutamatsynthase in glutamathaltigem Minimalmedium ohne Glukose und Arginin sowie einer hohen zellulären RocG-Konzentration könnte dadurch zu Stande kommen, daß der aktivierende Metabolit des Argininabbauwegs in geringerer Konzentration vorliegt. Scheinbar müssen die Glutamatedehydrogenase RocG und der aktivierende Metabolit in einem bestimmten Verhältnis in der Zelle vorliegen, damit das *gltAB*-Operon reprimiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß es neben der CcpA-abhängigen Regulation des *rocG*-Gens einen weiteren Regulationsmechanismus auf Proteinebene gibt.

4.3. Hemmung der GltC-Aktivität durch RocG

4.3.1. Der Einfluß der N-Quelle auf die RocG-abhängige Hemmung von GltC

Der Regulationsmechanismus des *gltAB*-Operons ist bisher noch nicht vollständig verstanden. In Abschnitt 4.1.4. wurde gezeigt, daß die Expression des *gltAB*-Operons durch das Aktivatorprotein GltC vermittelt wird. In Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose wird die Glutamatsynthase stark exprimiert (Tab. 4.1.). Ein Signal aus dem C-Stoffwechsel könnte zum einen das Regulatorprotein GltC direkt stimulieren. Zum anderen könnte ein negativer Faktor, welcher beim Wachstum mit Glukose nicht exprimiert wird, an der Regulation beteiligt sein. Das *gltAB*-Operon würde in diesem Fall indirekt durch die C-Quelle reguliert werden. Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei dem negativen Faktor um die katabole Glutamatdehydrogenase RocG handelt (Abschnitt 4.2.2.). Das *rocG*-Gen wird zum einen durch CcpA reprimiert, zum anderen wird das *gltAB*-Operon in Abwesenheit einer aktiven Glutamatdehydrogenase konstitutiv exprimiert (Belitsky & Sonenshein, 2004; Commichau *et al.*, 2006b). Denkbar wäre, daß RocG das Aktivatorprotein GltC inaktivieren kann (Abb. 5.3.). Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem

Aktivatorprotein GltC und RocG wurde bereits vorgeschlagen (Tripal, 2003). Die Interaktion konnte jedoch nicht bewiesen werden (Reif, 2004). Die in den Abschnitten 4.2.2. und 4.2.6. beschriebenen Experimente zeigen jedoch, daß RocG zusammen mit einer Glutamatquelle an der Regulation des *gltAB*-Operons beteiligt ist.

Mit dem folgenden Experiment sollte gezeigt werden, daß die RocG-abhängige Repression des *gltAB*-Operons durch GltC vermittelt wird. Dazu wurde RocG im Wildtyp, in einer *gltC*-Mutante und in Stämmen, welche konstitutiv aktive GltC-Varianten exprimieren, plasmidständig überexprimiert. Im Wildtyp sollte das *gltAB*-Operon in Abhängigkeit von der RocG- und der Glutamatmenge reguliert sein. Bei einer hohen RocG-Menge und einer hohen Glutamatkonzentration wäre zu erwarten, daß das *gltAB*-Operon vollständig reprimiert wird. Ohne Glutamat oder bei einer verringerten Glutamatmenge sollte der reprimierende Einfluß von RocG verschwinden (Abschnitt 4.1.3.). In der *gltC*-Mutante sollte das *gltAB*-Operon nicht mehr exprimiert werden können. In Stämmen mit konstitutiv aktiven GltC-Varianten wäre die Erwartung, daß die Glutamatsynthase vollständig unabhängig von RocG und Glutamat exprimiert wird. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tabelle 4.12. dargestellt.

Erwartungsgemäß wird das *gltAB*-Operon im Wildtyp durch Glukose induziert (Tab. 4.12.). Durch die Zugabe von Ornithin kann die Glutamatsynthase auch in glukosehaltigem Medium nicht mehr exprimiert werden. In der *gltC*-Mutante kann das *gltAB*-Operon nicht mehr induziert werden. Die glukoseabhängige Regulation des *gltAB*-Operons ist daher GltC-abhängig (siehe auch Abschnitt 4.1.4.). Der Stamm GP651 ist eine *gltC*-Mutante, bei der das *gltC*-Allel des Wildtyps unter der Kontrolle des eigenen Promotors im *amyE*-Gen integriert ist (Abchnitt 3.1.). Die Position des *gltC*-Gens im Genom hat jedoch keinen Einfluß auf die Regulation des *gltAB*-Operons durch die C- und die N-Quelle, da das *gltAB*-Operon wie im Wildtyp reguliert ist (Tab. 4.12.). Die Stämme GP652, GP653 und GP654 sind ebenfalls *gltC*-Mutanten, bei denen im *amyE*-Gen mutierte *gltC*-Allele integriert sind. Die Varianten des Aktivatorproteins GltC sorgen für eine konstitutive Expression des *gltAB*-Operons (Abschnitt 3.1.). Das *gltAB*-Operon wird auch ohne Glukose exprimiert und der reprimierende Einfluß von Ornithin ist aufgehoben.

Stamm	*rocG*^{hy}	Relevanter Genotyp	β-Galaktosidaseaktivität (MU)			
			-	+ Glc	+ Orn	+ Orn + Glc
GP669	-	Wildtyp	9	201	4	15
GP650	-	*gltC*	21	14	19	13
GP651	-	*gltC amyE::(gltC)*	8	141	4	10
GP652	-	*gltC amyE::(gltC(P*^{88} $\rightarrow$ *L))*	983	690	555	777
GP653	-	*gltC amyE::(gltC(I*^{160} $\rightarrow$ *K))*	410	690	414	609
GP654	-	*gltC amyE::(gltC(T*^{99} $\rightarrow$ *A))*	1582	1339	1881	1189
GP669 + pGP529	+	Wildtyp	434	470	42	152
GP650 + pGP529	+	*gltC*	11	11	18	14
GP651 + pGP529	+	*gltC amyE::(gltC)*	442	444	32	85
GP652 + pGP529	+	*gltC amyE::(gltC(P*^{88} $\rightarrow$ *L))*	2427	792	1365	823
GP653 + pGP529	+	*gltC amyE::(gltC(I*^{160} $\rightarrow$ *K))*	4165	1217	3353	1207
GP654 + pGP529	+	*gltC amyE::(gltC(T*^{99} $\rightarrow$ *A))*	2466	1388	2127	1414

Tab. 4.12. Die Überexpression von RocG in GltC-Mutanten mit konstitutiver Expression des *gltAB*-Operons.

Die in der Tabelle dargestellten Stämme wurden in CSE-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die Überexpression von RocG im Wildtyp und in der *gltC*-Mutante, bei der das *gltC*-Allel im *amyE*-locus integriert ist führt dazu, daß das *gltAB*-Operon unabhängig von der C-Quelle exprimiert wird. In Abschnitt 4.2.6. wurde bereits gezeigt, daß die Überexpression von RocG in glutamathaltigem Minimalmedium zur Expression des *gltAB*-Operons führt. Vermutlich wird durch die starke Überexpression des glutamatabbauenden Enzyms die Glutamatmenge in der Zelle verringert. Da RocG offensichtlich nur mit Glutamat oder einer Glutamatquelle in die Regulation des *gltAB*-Operons eingreifen kann (siehe Abschnitt 4.2.6.; Abb. 5.3.), ist dies eine mögliche Erklärung für starke Expression der Glutamatsynthase. Durch die Zugabe von Ornithin wird das *gltAB*-Operon in Abwesenheit von Glukose jedoch wieder vollständig reprimiert. Auch in glukosehaltigem Medium ist die Expression des *gltAB*-

Operons in Gegenwart von Ornithin reduziert. Ornithin oder ein Intermediat des Argininabbauwegs müssen daher den inaktivierenden Einfluß von RocG auf GltC wiederherstellen. Weder in der *gltC*-Mutante noch in der *gltC*-Mutante, welche das Überexpressionsplasmid für RocG enthält, kann das *gltAB*-Operon induziert werden. Die glukoseabhängige Regulation des *gltAB*-Operons erfolgt damit ausschließlich durch das Aktivatorprotein GltC. Auch die RocG-abhängige Repression des *gltAB*-Operons wird durch GltC vermittelt. Die GltC-Mutanten ermöglichen die Expression des *gltAB*-Operons auch in Gegenwart einer hohen RocG- und Glutamatkonzentration. Erstaunlicherweise ist in den *gltC*-Mutanten die Expression der Glutamatsynthase durch die Überexpression von RocG erhöht. Möglicherweise stimuliert α-Ketoglutarat, das Abbauprodukt von Glutamat, die Aktivität von GltC (Picossi-Goñi *et al.*, 2005).

Die obigen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß in der Zelle die Versorgung mit Glutamat oder einer Glutamatquelle durch die katabole Glutamatdehydrogenase RocG gemessen wird. Die Aktivität von RocG entscheidet über den Zustand von GltC. Ohne Glutamat wird auch in Gegenwart einer hohen RocG-Menge die Glutamatsynthase exprimiert. Erst durch eine gute Glutamatquelle (z.B. Ornithin) wird GltC durch RocG inaktiviert und das *gltAB*-Operon kann nicht mehr transkribiert werden. Glutamat alleine kann das *gltAB*-Operon nicht reprimieren, da in der *rocG*-Mutante die Glutamatsynthase konstitutiv exprimiert wird (Tab. 4.10.; Commichau *et al.*, 2006b).

4.3.2. Aktivierung von RocG durch Glutamat

In Abschnitt 4.3.1. konnte gezeigt werden, daß durch die Überexpression der katabolen Glutamatdehydrogenase RocG in Abwesenheit der bevorzugten C-Quelle Glukose das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert wird. Das *gltAB*-Operon wird jedoch durch die Zugabe von Arginin oder Ornithin wieder stark reprimiert (Tab. 4.12.). Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob RocG durch ein Intermediat des Argininabbauwegs aktiviert werden muß, damit dieses Enzym das Aktivatorprotein GltC inhibieren kann und die Repression des *gltAB*-Operons bewirkt. Dazu wurden die *rocF*-Mutante GP657, die *rocD*-Mutante GP658 und der Wildtyp GP669 in glukosehaltigem Medium angezogen und der Einfluß der N-Quellen Arginin und Ornithin auf die Expression der Glutamatsynthase mit Hilfe der *gltA-lacZ*-Fusion untersucht (Tab. 4.13.).

Stamm	β-Galaktosidaseaktivität (MU)		
	-	+ R	+ Orn
GP669 (wt)	234	12	17
GP657 (*ΔrocF*)	181	74	36
GP658 (*ΔrocD*)	130	147	117

Tab. 4.13. Regulation des *gltAB*-Operons durch Arginin und Ornithin in der *rocF*- und in der *rocD*-Mutante.

Die in der Tabelle dargestellten Stämme wurden in CSE-Glc-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

E = Glutamat, R = Arginin und Orn = Ornithin.

Die Arginase katalysiert die Umwandlung von Arginin zu Ornithin und wird durch das *rocF*-Gen kodiert. Das *rocD*-Gen kodiert für die Ornithin-Aminotransferase, die die Umwandlung von Ornithin zu γ-Glutaminsemialdehyd katalysiert (Abb. 2.3.). Sowohl durch die *rocF*-Mutante als auch durch die *rocD*-Mutante werden Arginin und Ornithin aufgenommen. Ornithin kann jedoch nur in der *rocF*-Mutante zu Glutamat umgewandelt werden (Gardan *et al.*, 1997). Sollten entweder Arginin oder Ornithin die stimulierenden Effektoren sein, die die Hemmung von GltC durch RocG aktivieren, so sollte durch die Zugabe beider Aminosäuren das *gltAB*-Operon sowohl in der *rocF*- als auch in der *rocD*-Mutante beim Wachstum in Gegenwart von Glukose reprimiert werden. Ist jedoch Glutamat der Effektor von RocG, so sollte nur in der *rocF*-Mutante die Zugabe von Ornithin die Repression des *gltAB*-Operons bewirken.

Die Ergebnisse des Experiments zeigen, daß das *gltAB*-Operon in der *rocF*-Mutante unter induzierenden Bedingungen erst durch die Zugabe von Ornithin 5-fach reprimiert wird (Tab. 4.13.). In der *rocF*-Mutante hingegen wird das *gltAB*-Operon durch Arginin nur 2,5-fach reprimiert. Es kann daher vermutet werden, daß es sich bei dem Effektor von RocG um die Aminosäure Glutamat handelt. Die mit Hilfe der *rocD*-Mutante gewonnenen Ergebnisse sind eindeutiger (Tab. 4.13.). Weder Arginin noch Ornithin bewirken eine starke Repression des *gltAB*-Operons. Da in der *rocD*-Mutante sowohl Arginin als auch Ornithin nicht in Glutamat umgewandelt werden können, weisen die Ergebnisse darauf hin, daß es sich bei dem Effektor von RocG um den Aminogruppendonor Glutamat handelt.

Um zu überprüfen, ob das *rocG*-Gen auch in beiden Mutanten des Argininabbauwegs durch Ornithin induziert werden kann, wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt (Abb. 4.10.).

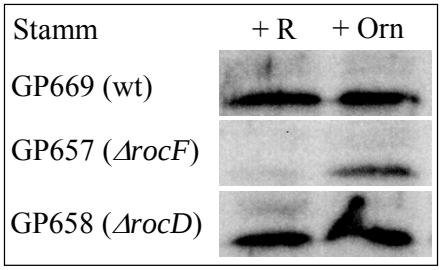

Abb. 4.10. Westernblot-Analyse zum Nachweis von RocG in Mutanten des Argininabbauwegs. Die Proteinlösungen der Stämme GP669 (wt), GP657 (*ΔrocF*) und GP658 (*ΔrocD*) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Die Zellen wurden in CSE-Medium mit Glukose angezogen. Der Pfeil markiert das von RocG gelieferte Signal.

Es ist bereits bekannt, daß Ornithin der Effektor des RocR-Regulons ist, daher sollte in beiden verwendeten Mutanten das *rocG*-Gen durch Ornithin induziert werden (Gardan *et al.*, 1997). In der *rocD*-Mutante sollte das *rocG*-Gen auch durch Arginin induziert werden. In der Tat wird sowohl in der *rocF*-Mutante als auch in der *rocD*-Mutante die GDH in Gegenwart von Ornithin exprimiert. Erwartungsgemäß wird RocG beim Wachstum der *rocF*-Mutante in Gegenwart von Arginin nicht exprimiert, da Arginin nicht in den Effektor (Ornithin) des RocR-Regulons umgewandelt werden kann. Mit dem in Abschnitt 4.2.2. gezeigten Experiment konnten bereits Hinweise dafür gesammelt werden, daß Glutamat oder eine Glutamatquelle nur dann das *gltAB*-Operon reprimieren kann, wenn auch RocG exprimiert wird. Die Ergebnisse des obigen Experiments zeigen, daß RocG das Aktivatorprotein GltC nur dann inhibiert, wenn in die zelluläre RocG-Menge hoch ist und *B. subtilis* gleichzeitig mit einer guten Glutamatquelle, wie z. B. Arginin oder Ornithin, versorgt wird. Aus den Experimenten kann man daher schlußfolgern, daß in *B. subtilis* der Glutamatpool bzw. die Glutamatversorgung offensichtlich mit Hilfe der katabolen Glutamatdehydrogenase RocG gemessen wird.

4.4. Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem Aktivatorprotein GltC und seinem Zielpromotor

Das Aktivatorprotein GltC gehört zur LysR-Familie von Transkriptionsregulatoren und aktiviert die Transkription des *gltAB*-Operons in Abhängigkeit von der C-Quelle (Schell, 1993; Abschnitt 4.1.4.). GltC wird durch das *gltC*-Gen, welches stromaufwärts des *gltAB*-Operons liegt, kodiert (Bohannon & Sonenshein, 1989). Die Promotoren des *gltAB*-Operons und des *gltC*-Gens sind überlappend angeordnet. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, daß es für GltC im *gltC-gltAB*-Promotorbereich vermutlich zwei Bindestellen gibt (Belitsky *et al.*, 1995). Die Interaktion zwischen dem Aktivatorprotein GltC und seinem Zielpromotor konnte *in vitro* bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Variante des GltC-Proteins, bei der N-terminal ein Hexahistidinrest angehängt wurde, kann eine *gltC*-Mutante nicht komplementieren und ein DNA-Fragment des *gltC-gltAB*-Promotorbereichs nicht binden (Tripal, 2003; Reif, 2004). Möglicherweise sind N-terminal markierte Varianten von GltC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht aktiv, weil sich im N-terminalen Bereich der Regulatoren der LysR-Familie das DNA-bindende Helix-Turn-Helix-Motiv befindet (Schell, 1993).

4.4.1. *In vivo*-Aktivität des C-terminal markierten Regulators GltC

Um die Interaktion zwischen GltC und seinem Zielpromotor zu zeigen, wurde eine Variante des Aktivatorproteins hergestellt, bei der am C-Terminus ein Strep-tag angehängt ist. Zunächst sollte die *in vivo*-Aktivität des markierten Regulators überprüft werden. Dazu wurde das für einen Strep-tag kodierende DNA-Fragment, mittels PCR mit dem 3'-Ende eines weiteren DNA-Fragments fusioniert, welches neben dem *gltC*-Leserahmen auch den *gltC-gltA*-Promotorbereich enthielt. Nach der PCR sollte das für den Strep-tag kodierende DNA-Fragment mit dem 3'-Ende des *gltC*-Leserahmens fusioniert sein. Das PCR-Produkt wurde dann mit dem Integrationsvektor pAC5 für *B. subtilis* kloniert, so daß der *gltA*-Promotor DNA-Fragments mit dem *lacZ*-Gen des Vektors fusioniert ist. Das Aktivatorprotein GltC sollte durch diese Klonierungsstrategie unter der Kontrolle des eigenen Promotors mit einem Strep-tag versehen in einer *gltC*-Mutante exprimiert werden. Dazu wurde der Vektor in den *amyE*-Lokus einer *gltC*-Mutante integriert (Abschnitt 3.1.). Mit dem erhaltenen Stamm kann

mit Hilfe von Westernblot-Analysen und der Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität untersucht werden, ob der am C-Terminus angehängte Strep-tag einen Einfluß auf die Aktivität von GltC hat und dadurch die Regulation des *gltAB*-Operons beeinflußt wird. Sollte der Strep-tag keinen Einfluß auf die Aktivität von GltC haben, so wäre zu erwarten, daß in Gelshift-Experimenten das Protein mit seinem Zielpromotor interagieren kann.

Expression des C-terminal markierten Proteins

Zunächst wurde mit GltC-spezifischen Antikörpern untersucht, ob das mit einem Strep-tag versehene Aktivatorprotein in einer *gltC*-Mutante exprimiert wird. In Abschnitt 4.3. wurde bereits gezeigt, daß die Position des *gltC*-Allels im Chromosom keinen Einfluß auf die Regulation des *gltAB*-Operons hat. In Abb. 4.11. sind die Ergebnisse der Westernblot-Analyse dargestellt. Als Kontrolle wurden der Wildtyp GP342 und eine *gltC*-Mutante verwendet.

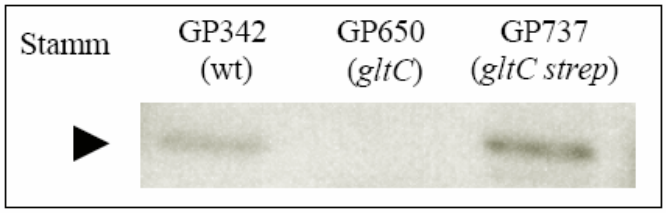

Abb. 4.11. Westernblot-Analyse zum Nachweis von GltC. Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt), GP650 (*gltC*) und dem Stamm GP737, der das mit einem Strep-tag versehene Aktivatorprotein GltC exprimiert, wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von GltC erfolgte mit polyklonalen GltC-Antikörpern. Die Zellen wurden in CSE-Medium mit Glukose angezogen. Der Pfeil markiert das von GltC gelieferte Signal.

Die obigen Ergebnisse zeigen, daß das C-terminal markierte Regulatorprotein in einer *gltC*-Mutante (Stamm GP737) exprimiert wird.

Regulation des *gltAB*-Operons durch das markierte GltC-Protein

In dem folgenden Experiment sollte mit Hilfe der *gltA-lacZ*-Fusion untersucht werden, ob das *gltAB*-Operon in dem Stamm GP737, welcher das markierte GltC-Protein exprimiert (Abb. 4.11.), durch Glukose induziert werden kann. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 4.14. dargestellt.

	β-Galaktosidaseaktivität (MU)	
Stamm	**CSE**	**CSE + Glc**
GP342 (wt)	6	160
GP650 (*gltC*)	6	13
GP737 (*gltC strep*)	20	208

Tab. 4.14. Aktivierung der *gltA-lacZ*-Fusion durch das C-terminal markierte Regulatorprotein GltC.
Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Sowohl in der *gltC*-Mutante, in der das markierte Aktivatorprotein exprimiert wird, als auch im Wildtyp wird das *gltAB*-Operon durch Glukose induziert. Die C-Quellen-abhängige Regulation des *gltAB*-Operons wird also durch den C-terminal angefügten Strep-tag nicht verändert. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse und der Messung der β-Galaktosidase-Aktivität zeigen klar, daß das markierte Aktivatorprotein exprimiert wird und das *gltAB*-Operon aktivieren kann. Das C-terminal markierte Protein sollte also auch in der Lage sein, das DNA-Fragment, welches die vermeintlichen GltC-Bindestellen enthält, *in vitro* zu binden.

4.4.2. Gelretardationsexperimente mit GltC und der *gltAB*-Promotorregion

Wie bereits oben beschrieben, kann ein N-terminal markiertes GltC-Protein nicht an ein DNA-Fragment binden, welches die vorgeschlagenen Bindestellen für das Aktivatorprotein enthält. Die Experimente in Abschnitt 4.4.1. zeigen jedoch, daß ein C-terminaler Strep-tag keinen Einfluß auf die *in vivo*-Aktivität von GltC hat. Um zu testen, ob

das C-terminal markierte Aktivatorprotein an den *gltC-gltAB*-Promotorbereich bindet, benötigt man das Aktivatorprotein in großer Menge und Reinheit. Zu diesem Zweck wurde der *gltC*-Leserahmen, bei dem am 3'-Ende die kodierende Sequenz für den Strep-tag mittels PCR angefügt wurde, in ein Überexpressionsplasmid kloniert (Abschnitt 3.1.). In Abbildung 4.12. ist die Aufreinigung des markierten Aktivatorproteins dargestellt.

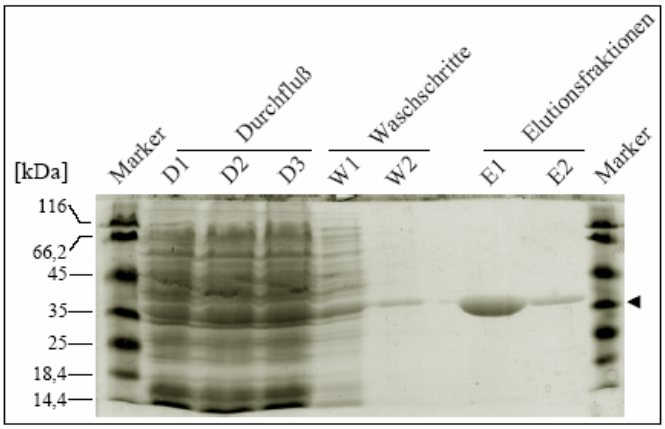

Abb. 4.12. Aufreinigung des markierten Aktivatorproteins GltC.

Von den Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden jeweils 20 µl in die Taschen eines 12 %igen PAA-Gels gegeben. Der Pfeil markiert das C-terminal markierte GltC-Protein mit einem Molekulargewicht von 36,06 kDa. Das Molekulargewicht des Wildtypproteins ist 34,02 kDa. Zur Größenabschätzung des aufgereinigten Proteins wurde der Prestained-Proteinmarker der Firma Fermentas verwendet.

Nach der Dialyse betrug die Konzentration der ersten Elutionsfraktion 1,13 µg/µl. Es zeigte sich, daß das dialysierte Protein mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden kann ohne auszufallen. Um die Interaktion von GltC mit seinen Bindestellen im *gltC-gltAB*-Promotorfragment nachzuweisen, wurde das entsprechende DNA-Fragment mit den Primern IW1 und IW2 durch eine PCR amplifiziert. Bei dem DNA-Fragment handelt es sich um das PCR-Produkt, welches auch für die Herstellung der *gltA-lacZ*-Fusion verwendet wurde (Wacker *et al.*, 2003; Abschnitt 3.1.). Da das für die *gltA-lacZ*-Fusion verwendete DNA-Fragment in Abhängigkeit von GltC reguliert wird, sollte das überexprimierte und gereinigte GltC-Protein mit diesem DNA-Fragment interagieren können. Als Kontrolle wurde ein Fragment des *citB*-Promotors aus *B. subtilis* verwendet. Dieses DNA-Fragment wurde mit Hilfe der Primer HL53 und HL54 durch PCR amplifiziert. Steigende Mengen (von 2,5 bis 10 pMol) des gereinigten und dialysierten Aktivatorproteins GltC wurden mit jeweils 2 pMol der beiden Promotorfragmente in Bindepuffer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend

wurden die Ansätze in einem 6%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 4.13. sind die Ergebnisse eines Gelretardationsexperiments dargestellt.

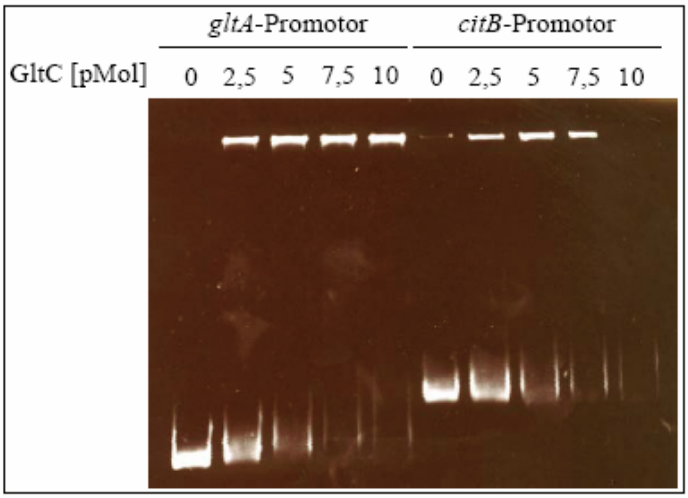

Abb. 4.13. Gelretardationsexperiment mit dem markierten Aktivatorprotein GltC.
Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 2,5 Stunden bei 4°C mit Hilfe eines 6 %igen PAA-Gels in Na-Acetatpuffer (pH 5.5).

Die Ergebnisse in Abbildung 4.13. zeigen, daß sowohl das *gltA*- als auch das *citB*-Promotorfragment von dem C-terminal markierten Regulator GltC gebunden wird. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Affinitäten des Proteins zu den beiden Promotorfragmenten festgestellt werden. Die Bindung zwischen dem aufgereinigten Aktivatorprotein und dem *gltA*-Promotorfragment ist daher unspezifisch. Auffällig ist, daß das Protein nicht in das PAA-Gel einlaufen kann. Offensichtlich bildet das Protein in dem verwendeten Puffersystem hochmolekulare Komplexe, die nicht in die Matrix des PAA-Gels einlaufen können. Möglicherweise könnte dieses Problem durch die Verwendung eines anderen Puffersystems behoben werden. Fraglich ist jedoch, ob dadurch auch die Spezifität des Proteins bezüglich des *gltA*-Promotors erhöht werden kann.

4.5. Charakterisierung von Mutanten des Glutamatstoffwechsels

Glutamat ist in allen Organismen der Aminogruppendonor für die Synthese stickstoffhaltiger Verbindungen. In *B. subtilis* ist die Glutamatsynthese der Knotenpunkt

zwischen C- und N-Stoffwechsel. Zum Erreichen maximaler Wachstumsraten und zur optimalen Verwertung der zur Verfügung stehenden C- und N-Quellen, müssen die Glutamatsynthese und der Glutamatabbau optimal aufeinander abgestimmt sein (Commichau *et al.*, 2006a). In *B. subtilis* wird beim Wachstum mit Glukose und Ammonium das Glutamat ausschließlich durch die Glutamatsynthase synthetisiert. Die katabole Glutamatdehydrogenase RocG wird unter diesen Wachstumsbedingungen nicht exprimiert (Abschnitt 4.2.2.). In Gegenwart von Arginin und Succinat wird RocG stark exprimiert und das *gltAB*-Operon ist reprimiert. Unter diesen Bedingungen katalysiert RocG den letzten Schritt des Argininabbaus und inaktiviert vermutlich gleichzeitig den Transkriptionsregulator GltC (Abschnitt 4.3.). Durch die Inaktivierung von GltC kann die Glutamatsynthase nicht exprimiert werden. Die Kontrolle der Glutamatsynthese und des Glutamatabbaus durch die C- bzw. N-Quelle ermöglicht die optimale Nutzung der verfügbaren Nährstoffe.

Trotz seiner genetischen Ausstattung ist der Laborstamm *B. subtilis* 168 nicht in der Lage, in CS-Medium, welches Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle enthält, zu wachsen. Die *ccpA*-Mutante ist zusätzlich nicht in der Lage mit Glukose in ammoniumhaltigem Medium zu wachsen (Faires *et al.*, 1999). In der *ccpA*-Mutante wird zum einen die Glutamatsynthase nicht exprimiert (Tab. 4.7.), so daß unter diesen Wachstumsbedingungen offensichtlich nicht genug Glutamat synthetisiert werden kann (Wacker *et al.*, 2003). Zum anderen wird Glukose sehr schlecht aufgenommen (Ludwig *et al.*, 2002a). Die artifizielle Induktion des *gltAB*-Operons in der *ccpA*-Mutante ermöglicht das Wachstum mit Glukose in ammoniumhaltigem Medium. Auch durch die Wiederherstellung der Glukoseaufnahme in der *ccpA ptsH1*-Mutante kann Ammonium als einzige N-Quelle genutzt werden (Tab. 4.7. Wacker *et al.*, 2003). In der *ccpA ptsH1*-Mutante kann das *gltAB*-Operon wieder durch Glukose induziert werden.

Durch die Zugabe von Glutamat zu CS- bzw. CS-Glc-Medium können der Wildtyp bzw. die *ccpA*-Mutante wachsen. Offensichtlich können der Wildtypstamm mit Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle und die *ccpA*-Mutante mit Glukose und Ammonium als C- und N-Quelle nicht genug des Aminogruppendonors Glutamat synthetisieren. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, daß die Inaktivierung des glutamatabbauenden Enzyms RocG das Wachstum in CS-Medium ermöglicht (Abschnitt 4.2.5.). Möglicherweise ist jedoch die Inaktivierung von GltC durch RocG die Ursache dafür, Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle nicht nutzen zu können (Abb. 5.3.). *rocG*-Mutanten, die zum Wachstum auf CS-Platten in der Lage sind, wurden bei einer Transposonmutagenese und anschließender

Selektion auf CS-Platten isoliert (Commichau *et al.*, 2006b). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden ausgehend von einer *ccpA*-Mutante Stoffwechselmutanten isoliert, die in ammoniumhaltigem Medium mit Succinat oder Glukose als C-Quelle wachsen können (Wacker, 2002). Diese Mutanten werden als *sgd*-Mutanten bezeichnet, wobei *sgd* für „**s**uppression of **g**rowth **d**efect“ steht. Die isolierten Mutanten wurden als GP348 (*sgd-7*) und GP350 (*sgd-9*) bezeichnet (Commichau *et al.*, 2006b). In beiden *sgd*-Mutanten wird das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert (Commichau *et al.*, 2006b). Es ist bereits bekannt, daß bei Abwesenheit einer enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase die Glutamatsynthase konstitutiv exprimiert wird, und *B. subtilis* dann in der Lage ist, Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle zu verwerten (Abb. 4.14.).

Mit dem im folgenden Abschnitt (Abschnitt 4.5.1.) beschriebenen Experiment sollte untersucht werden, ob der Glutamatabbau durch die katabole Glutamatdehydrogenase die Wachstumsgeschwindigkeit mit verschiedenen C-Quellen bestimmt. Außerdem sollte die Ursache für den *sgd*-Phänotyp der beiden *sgd*-Mutanten GP348 (*sgd-7*) und GP350 (*sgd-9*) gefunden werden (Abschnitt. 4.5.2.).

4.5.1. Die Wachstumsgeschwindigkeit in ammoniumhaltigem Medium wird durch die C-Quelle bestimmt

In Abschnitt 4.2.2. wurde gezeigt, daß die Expression der katabolen Glutamatdehydrogenase RocG durch die C-Quelle reguliert wird. Beim Wachstum mit Glukose wird das *rocG*-Gen CcpA-abhängig reprimiert (Belitsky *et al.*, 2004). In Abwesenheit einer guten C-Quelle hat CcpA keinen Einfluß auf die Expression von RocG. Es besteht also ein direkter Zusammenhang zwischen der durch die C-Quelle ausgeübten Katabolitenrepression und der RocG-Menge.

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Wachstumsgeschwindigkeit des Bakteriums durch die RocG-Menge beim Wachstum in ammoniumhaltigem Medium bestimmt wird. Eine *rocG*-Mutante sollte im Gegensatz zum Wildtyp auch mit schlechten C-Quellen, wie z. B. Succinat, in ammoniumhaltigem Medium gut wachsen können, da die glutamatabbauende Glutamatdehydrogenase fehlt. Der Wildtyp hingegen, sollte mit Succinat als C-Quelle nur durch den Zusatz von Glutamat wachsen können.

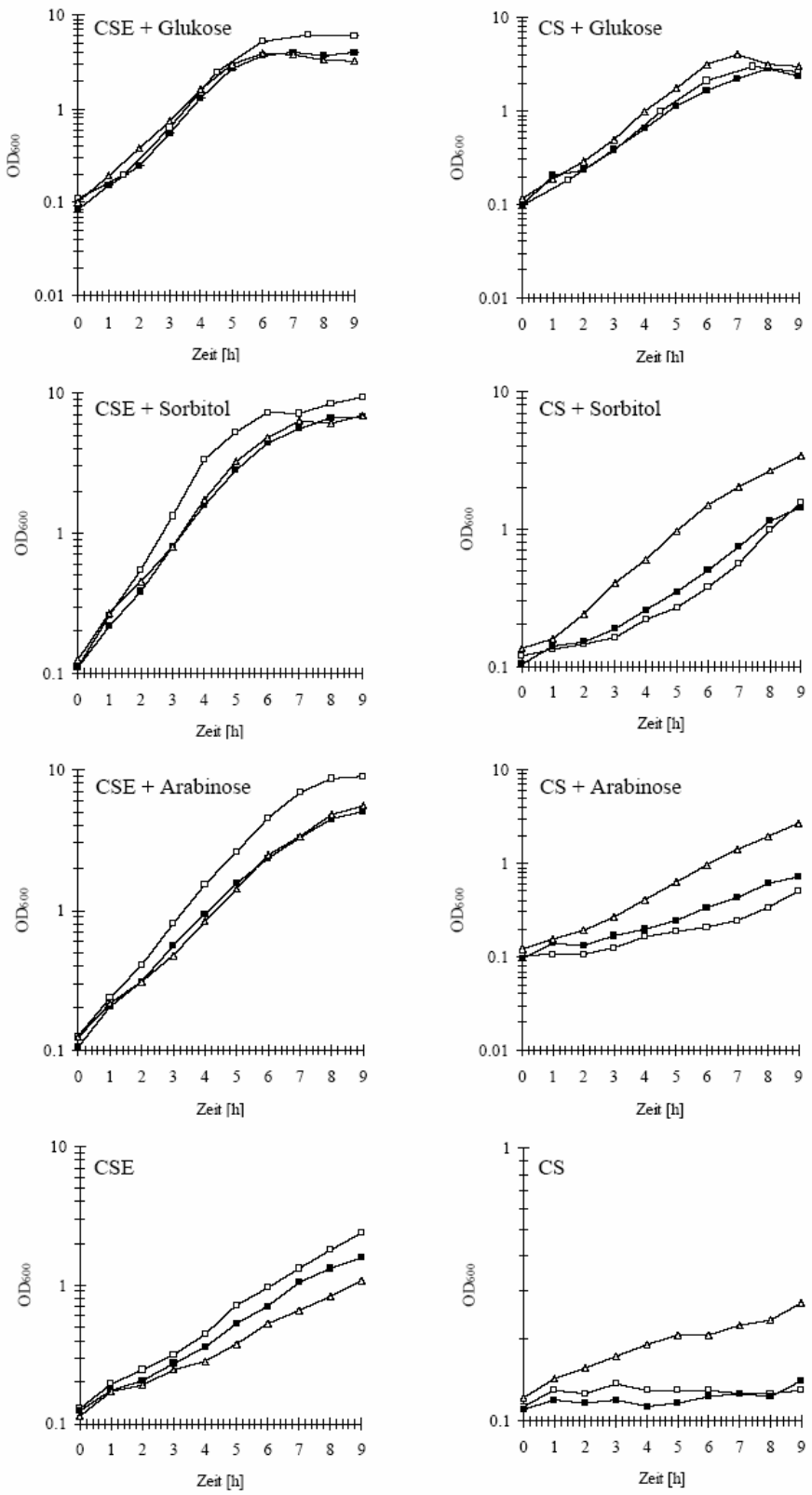

Abb. 4.14. Die Wachstumsgeschwindigkeit von *B. subtilis* wird in glutamatfreiem Medium wird durch die C-Quelle bestimmt.Der Wildtyp GP342 (-□-), die *gudB*-Mutante GP27 (-■-) und die *rocG gudB*-Mutante GP28 (-Δ-) wurden in CS- und CSE-Medium angezogen. Die Endkonzentrationen der zugesetzten C-Quellen Arabinose, Sorbitol und Glukose betrug 0,5 %. Hier sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen gezeigt.

Außerdem sollte es eine direkte Korrelation zwischen der durch die C-Quelle ausgeübten Katabolitenrepression und der Wachstumsgeschwindigkeit mit der entsprechenden C-Quelle geben. Der Wildtyp und die *rocG gudB*-Mutante wurden in CS-Medium und in CSE-Medium, dem jeweils die C-Quellen Arabinose, Sorbitol und Glukose zugegeben wurden, angezogen. Als Kontrollstamm wurde die *gudB*-Mutante mitangezogen. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abb. 4.14. dargestellt.

Wie man in Abb. 4.14. sehen kann, wachsen der Wildtyp, die *gudB*-Mutante und die *rocG gudB*-Doppelmutante in glukosehaltigem Medium mit Ammonium als N-Quelle sehr gut. Mit Sorbitol oder Arabinose als C-Quelle wachsen der Wildtyp und die *gudB*-Mutante langsamer als die *rocG gudB*-Doppelmutante. Offensichtlich wird sowohl im Wildtyp als auch in der *gudB*-Mutante das *rocG*-Gen durch die schlechten C-Quellen nicht stark genug reprimiert, so daß der Aminogruppendonor Glutamat das Wachstum limitiert. Durch den Zusatz von Glutamat wachsen der Wildtyp und die *gudB*-Mutante mit den C-Quellen Arabinose und Sorbitol genauso gut wie die *rocG gudB*-Doppelmutante. Die *rocG gudB*-Doppelmutante kann im Gegensatz zum Wildtyp und der *gudB*-Mutante sogar mit Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle wachsen.

Daß die Inaktivierung des *rocG*-Gens das Wachstum auf CS-Platten ermöglicht, konnte bereits gezeigt werden (Commichau *et al.*, 2006b). Die Ergebnisse zeigen, daß das Wachstum des Laborstamms 168 in ammoniumhaltigem Medium mit schlechten C-Quellen durch die Glutamatsynthese bzw. den Glutamatabbau in der Zelle bestimmt wird. Beim Wachstum mit schlechten C-Quellen wird *rocG* durch CcpA nicht reprimiert, und RocG kann das durch die Glutamatsynthase synthetisierte Glutamat wieder abbauen. Es besteht daher eine direkte Korrelation zwischen der C-Quellen-abhängigen Regulation des *rocG*-Gens und der Wachstumsgeschwindigkeit.

4.5.2. Expression der Glutamatdehydrogenasen in den *sgd*-Mutanten

Die *sgd*-Mutanten zeigen auf einem Komplexmedium wie SP-Medium einen heterogenen Phänotyp. Durch die Inkubation der *sgd*-Mutanten auf SP-Platten lassen sich durchscheinende und normal erscheinende Koloniearten vereinzeln. Die normal erscheinenden Kolonien lassen sich von den Wildtypkolonien nicht unterscheiden. Da es bereits bekannt ist, daß es bei der Abwesenheit von RocG zur Aktivierung der kryptischen

Glutamatdehydrogenase GudB kommt (Abschnitt 4.2.5.; Commichau *et al.*, 2006b), wurden die *gudB*-Allele in den normal erscheinenden Kolonien, die von beiden *sgd*-Mutanten isoliert wurden, durch Sequenzierung mit Hilfe der Primer HMB74, IR3 und IR6 analysiert. In den normal erscheinenden Kolonien wurde die kryptische Glutamatdehydrogenase GudB durch Verlust der Insertion von neun Basenpaaren aktiviert. Die Instabilität des *sgd*-Pänotyps und damit der Verlust der Eigenschaft auf CS-Platten zu wachsen, ist also bei beiden *sgd*-Mutanten auf die Aktivierung von GudB zurückzuführen.

Da die konstitutive Expression des *gltAB*-Operons in den beiden *ccpA*-Mutanten *sgd-7* und *sgd-9* auf die Abwesenheit von RocG zurückzuführen sein könnte (Abschnitt 4.2.2.), wurde die RocG-Expression mit Hilfe eines Westernblots analysiert (Abb. 4.15.). Damit die Expression von RocG in argininhaltigem CSE-Medium untersucht werden konnte, wurden für die Westernblotanalyse Derivate der *sgd*-Mutanten verwendet, in denen GudB in der enzymatisch aktiven Form vorliegt. In Abwesenheit einer enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase ist Arginin toxisch (Abschnitt 4.2.5.).

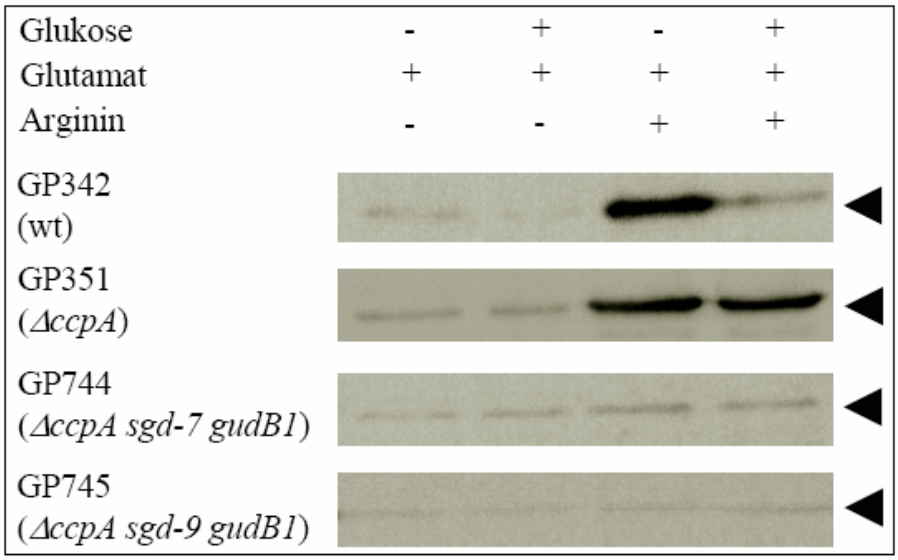

Abb. 4.15. Westernblot-Analyse zum Nachweis der Glutamatdehydrogenasen in den *sgd*-Mutanten.
Die Proteinlösungen der Stämme GP342 (wt), GP351 (*ccpA*), GP744 (*ccpA sgd-7*) und GP745 (*ccpA sgd-9*) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Der Stämme wurden in CS-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Die Pfeile markieren die von RocG gelieferten Signale.

Die Westernblot-Analyse zeigt, daß das *rocG*-Gen im Wildtyp durch Glukose CcpA-abhängig reprimiert wird (Abb. 4.15.). Durch Arginin wird das *rocG*-Gen stark induziert. Trotz der starken Induktion durch Arginin ist das von RocG gelieferte Signal in glukosehaltigem Medium schwächer. Im Gegensatz zum Wildtyp wird in der *ccpA*-Mutante das *rocG*-Gen nicht mehr durch die C-Quelle reguliert. Sowohl in CSE-Glc- als auch in CSE-Glc-Medium, welches Arginin enthält, wird *rocG* durch Glukose nicht reprimiert. In den beiden den beiden *sgd*-Mutanten wird die die Glutamatdehydrogenase RocG nicht exprimiert. Die polyklonalen RocG-Antikörper erkennen nur die enzymatisch aktive Glutamatdehydrogenase GudB1. In Abschnitt 4.2.5. wurde bereits gezeigt, daß nur die Expression der enzymatisch aktiven Glutamatdehydrogenase GudB1 mit Hilfe der RocG-Antikörper nachgewiesen werden kann. Das schwache Signal in der Westernblotanalyse ist daher auf das GudB1 zurückzuführen.

Die Westernblotanalyse läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Abwesenheit von RocG zur konstitutiven Expression der Glutamatsynthase führt. Außerdem wird durch das Fehlen des glutamatabbauenden Enzyms RocG das Wachstum mit Succinat und Ammonium ermöglicht (Abb. 4.14.).

4.5.3. Identifizierung der Mutationen

Für die Expression der Glutamatdehydrogenase RocG wird zum einen der alternative Sigmafaktor σ^L benötigt (Abb. 4.7.; Débarbouillé *et al.*, 1991), zum anderen ist die Transkription des *rocG*-Gens von den beiden Aktivatoren AhrC und RocR abhängig (Gardan *et al.*, 1997). In Abwesenheit der beiden Regulatoren kann RocG nicht vollständig exprimiert werden (Abb. 4.7.). Zwischen dem *rocG*-Gen und dem *rocABC*-Operon befindet sich die Bindestelle (DAS-Region) des Regulators RocR (Belitsky & Sonenshein, 1999; Ali *et al.*, 2003). Es war daher nahe liegend, neben der DAS-Region sowohl die Leserahmen als auch die Promotorbereiche der Regulatoren, die an der Regulation des *rocG*-Gens beteiligt sind, mittels Sequenzierung zu überprüfen. Außerdem wurden die Promotorbereiche und die Leserahmen der *rocG*-Allele in beiden *sgd*-Mutanten überprüft. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in (Abschnitt 7.2.) dargestellt. Weder in den Genen, die für die Regulatorproteine σ^L, AhrC und RocR kodieren, noch in den Promotorbereichen der entsprechenden Gene und der DAS-Region, konnten Mutationen gefunden werden. Die

Promotorbereiche der *rocG*-Allele in den beiden *sgd*-Mutanten wiesen ebenfalls keine Mutationen auf. In dem *rocG*-Gen der *sgd-7*-Mutante wurde bereits eine *in frame*-Deletion von 210 Basenpaaren gefunden (Wacker, 2002). Diese Deletion von 70 Aminosäuren führt zum Verlust der Aminosäuren von Postition 76 bis 145 im RocG-Protein. Die Aminosäure Lysin an Position 116 im aktiven Zentrum von RocG ist hiervon auch betroffen (Abb. 4.16.). In der *sgd-9*-Mutante konnte ebenfalls eine Mutation im *rocG*-Gen identifiziert werden. Die Deletion der Base G an Position 766 im *rocG*-Leserahmen führt zu einem um 126 Aminosäuren verkürzten Protein, in dem die Sequenz der letzten 42 Aminosäuren aufgrund des *frame shifts* ab Position 766 verändert ist (Abb. 4.16.).

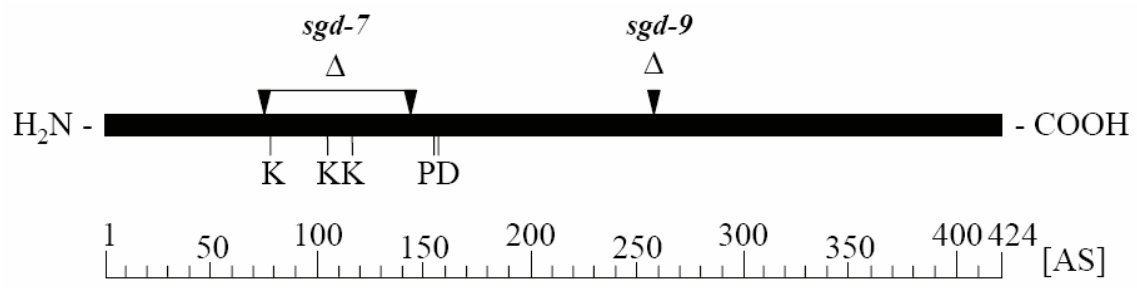

Abb. 4.16. Lokalisation der Mutationen in der *sgd-7*- und der *sgd-9*-Mutante.
Die Aminosäuren Lysin (Positionen 95, 104 und 115), Prolin (Position 153) und Aspartat (Position 156) befinden sich im aktiven Zentrum des Proteins und sind an der Glutamatbindung beteiligt (Stillman *et al.*, 1993). AS = Aminosäuren.

Erstaunlicherweise können die verkürzten RocG-Varianten beider *sgd*-Mutanten und auch die enzymatisch inaktive Glutamatdehydrogenase GudB in einer *rocG*-Mutante (siehe Abb. 4.8.) mit Hilfe des RocG-Antikörpers nicht in einer Westernblot-Analyse nachgewiesen werden. Möglicherweise sind die beiden Transkripte instabil, so daß sie nicht translatiert werden können und dadurch die Proteine nicht nachweisbar sind. Es wäre aber auch denkbar, daß die synthetisierten Proteine direkt nach ihrer Fertigstellung durch zelluläre Proteasen abgebaut werden. Das Ausbleiben des Signals durch die Glutamatdehydrogenasen bei der Westernblotanalyse könnte vielleicht auch durch die Mißfaltung der gebildeten Proteine zustande kommen, so daß der RocG-Antikörper diese Proteine nicht erkennen kann.

4.5.4. Transkriptomanalysen mit ausgewählten *sgd*-Mutanten

Wie in Abschnitt 4.5.2. beschrieben wurde, können ausgehend von der *ccpA*-Mutante *sgd*-Mutanten isoliert werden, die in der Lage sind, sowohl mit Glukose und Ammonium als auch mit Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle zu wachsen. Die *ccpA*-Mutante kann weder Glukose noch Succinat in ammoniumhaltigem Medium verwerten (Abschnitt 4.5.2.). Die Mutanten *sgd-1* und *sgd-2* sind ebenfalls *ccpA*-Mutanten und wurden in C-Glc-Medium isoliert (Faires *et al.*, 1999). Beide Mutanten können auch auf CS-Platten wachsen. In der *ccpA*-Mutante kann das *gltAB*-Operon nicht mehr durch Glukose induziert werden und RocG ist dereprimiert (Tab. 4.7.; Abb. 4.6.). Eine *ccpA*-Mutante ist daher glutamatauxotroph. In den beiden *sgd*-Mutanten hingegen kann das *gltAB*-Operon durch Glukose induziert werden (Faires *et al.*, 1999). Die Ursache für die wiederhergestellte C-Quellen-abhängige Regulation des *gltAB*-Operons in den *sgd*-Mutanten ist bisher nicht aufgeklärt worden. Eine Mutation in dem glutamatabbauenden Enzym RocG kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Inaktivierung des *rocG*-Gens zur konstitutiven Expression der Glutamatsynthase führt. Die *rocG*-Allele beider *sgd*-Mutanten wurden durch Sequenzierung überprüft (Wacker, 2002). Außerdem ist der Phänotyp der beiden *sgd*-Mutanten stabil. Der Phänotyp einer *rocG*-Mutante hingegen ist sehr instabil (Abschnitt 4.2.5.). Die Funktionalität von RocG kann daher nicht betroffen sein. Die Fähigkeit der beiden *sgd*-Mutanten, in C-Glc- und CS-Medium zu wachsen, könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen könnten der Glutamatverbrauch verringert und die Glutamatsynthese erhöht sein. Zum anderen könnten jedoch auch glutamatabbauende oder -verbrauchende Reaktionen vollständig blockiert sein. Durch die veränderte Abstimmung zwischen Glutamatsynthese und -abbau wäre *B. subtilis* in der Lage, auch mit C-Quellen zu wachsen, die die Glutamatsynthase normalerweise nicht induzieren können.

Um die Regulation der Gene der zentralen Stoffwechselwege (die Glykolyse und der Citratzyklus) und ausgewählter Gene des N-Stoffwechsels in den beiden *sgd*-Mutanten zu untersuchen, sollte die Expression der Gene mit Hilfe einer vergleichenden Trankriptomanalyse untersucht werden. Da beide *sgd*-Mutanten ausgehend von einer *ccpA*-Mutante isoliert wurden, mußte das Transkriptom beider Stämme zunächst mit der *ccpA*-Mutante verglichen werden. Durch einen Vergleich der *ccpA*-Mutante mit dem Wildtyp sollten dann die Transkriptomdaten der *sgd*-Mutanten indirekt mit den Ergebnissen des Wildtyps verglichen werden können.

		Stamm		
Stoffwechselweg	**Gen**	**168 (wt)**	**QB5412 (*ccpA sgd1*)**	**QB5413 (*ccpA sgd2*)**
Glykolyse & Überflußstoffwechsel	*gapA*	2.4	1.1	1.4
	eno	2.3	1.1	1
	ldh	0.2	-	1.7
	alsS	0.9	0.5	0.3
	pta	1.1	0.14	0.12
	ackA	4	0.9	0.6
Citratzyklus	*citZ*	0.06	0.8	1.1
	citB	0.1	0.7	0.85
	icd	0.3	0.7	1.0
	odhA	0.2	0.35	0.55
	odhB	0.3	0.5	0.7
	sucCD	0.2	0.6	0.65
	sdhCA	0.3	0.65	0.8
	mdh	0.3	0.7	1.15
N-Stoffwechsel	*gltA*	2.1	1.75	0.85
	gltB	7	9	5.5
	rocG	0.1	0.15	0.2
	rocDEF	-	0.3	-
	rocABC	0.2	0.2	0.1
	gudB	0.3	0.5	0.8
	aspB	2.5	2	4
	nrgA	0.35	0.4	0.2

Tab. 4.15. Ergebnisse der vergleichenden Microarrayanalyse.
Die Expressionslevel ausgewählter Gene des Wildtypstamms 168 und der beiden *sgd*-Mutanten QB5412 und QB5413 wurden indirekt mit Hilfe der *ccpA*-Mutante QB5407 miteinander verglichen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Microarrayexperiments sind in Tab. 4.15. dargestellt. Der Wildtyp 168, der Stamm QB5407 (*ccpA*) sowie die *sgd*-Mutanten QB5412

(*sgd1*) und QB5413 (*sgd2*) wurden in CSE-Glc-Medium angezogen. Dem Minimalmedium wurde ein synthetisches Aminosäuregemisch zugesetzt, um den Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante auszugleichen (Abschnitt 3.2.).

Die vollständigen Ergebnislisten der Microarrayanalyse sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt. Zur Auswertung des Experiments wurden nur solche Werte in Betracht gezogen, die auf eine veränderte Regulation der ausgesuchten Gene schließen lassen. Die Ergebnisse der Microarrayanalyse zeigen, daß das *gltAB*-Operon in den beiden *sgd*-Mutanten und im Wildtyp exprimiert wird (Tab. 4.15.). In einer *ccpA*-Mutante wird das *gltAB*-Operon nicht mehr durch Glukose induziert. Dies konnte für die beiden *sgd*-Mutanten bereits mit Hilfe einer *gltA-lacZ*-Fusion gezeigt werden (Faires *et al.*, 1999). Die Gene des RocR-Regulons werden in der *ccpA*-Mutante durch Glukose nicht reprimiert (Abb. 4.6.; Belitsky *et al.*, 2004). Die Gene des RocR-Regulons werden jedoch in beiden *sgd*-Mutanten CcpA-unabhängig schwächer exprimiert. Zur Bestätigung des Mircoarrayexperiments wurde mit Hilfe einer Westernblot-Analyse die RocG-Expression überprüft (Abb. 4.17.).

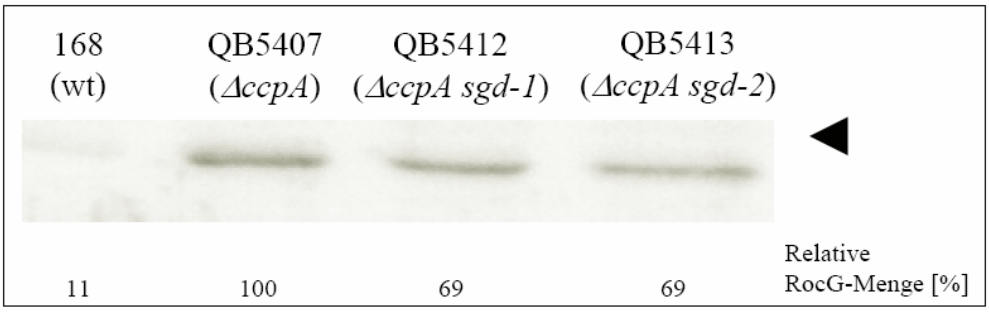

Abb. 4.17. Westernblot-Analyse zum Nachweis der Glutamatdehydrogenasen.
Die Proteinlösungen der Stämme 168 (wt), QB5407 (*ccpA*), QB5412 (*ccpA sgd-1*) und QB5413 (*ccpA sgd-2*) wurden in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von RocG erfolgte mit polyklonalen RocG-Antikörpern. Der Stämme wurden in CSE-Glc-Medium angezogen. Hier sind Ergebnisse einer repräsentativen Einzelmessung gezeigt. Der Pfeil markiert das von RocG gelieferte Signal. Das RocG-Signal des Stamms QB5407 wurde als maximale RocG-Expression definiert, da in der *ccpA*-Mutante nicht durch die C-Quelle reguliert ist. Die Auswertung der RocG-Expression erfolgte densitometrisch mit Hilfe der Software Totallab.

Wie erwartet, zeigen die Ergebnisse der Westernblot-Analyse, daß die katabole Glutamatdehydrogenase RocG in den beiden *sgd*-Mutanten um den Faktor 1,5 schwächer exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung für die glukoseabhängige Regulation dieser Gene

könnte die Mutation in einem unbekannten Regulatorprotein sein, welches in Gegenwart von Glukose die Expression der Gene des RocR-Regulons verhindert. Da unter den für die Microarrayanalyse ausgewählten Genen jedoch keine Gene sind, die für Regulatorproteine kodieren, kann diese Hypothese nicht überprüft werden. Außerdem können Mutationen in Genen, die zu einer veränderten Spezifität von Regulatorproteinen führen, mit Hilfe dieses Microarrayexperiments nicht identifiziert werden. In Abschnitt 4.2.4. wurde gezeigt, daß die Verringerung der RocG-Expression zu einer stärkeren Expression der Glutamatsynthase führt. Die Induktion des *gltAB*-Operons könnte daher durch die glukoseabhängige Repression von *rocG* in den *sgd*-Mutanten QB5412 und QB5413 erklärt werden. Das *gudB*-Gen wird im Wildtypstamm 168 im Gegensatz zur *ccpA*-Mutante und den *sgd*-Mutanten reprimiert. Da *gudB* für die enzymatisch inaktive Glutamatdehydrogenase kodiert (Belitsky & Sonenshein, 1998), kann die veränderte *gudB*-Expression keinen Einfluß auf die Regulation des *gltAB*-Operons haben. In der *sgd-1*-Mutante wird die Aspartataminotransferase, welche durch *aspB* kodiert wird, stärker exprimiert. Das Enzym ist in der Aspartatsynthese involviert und katalysiert die Übertragung der Aminogruppe von Glutamat auf Oxalacetat (Abb. 2.3.). Die umgekehrte Reaktion von α-Ketoglutarat und Aspartat zu Glutamat und Oxalacetat könnte zur Glutamatsynthese in der Zelle beitragen. Die Vermutung müßte jedoch durch die Analyse einer *aspB*-Mutante überprüft werden. Das *nrgA*-Gen, welches für den Ammoniumtransporter NrgA kodiert, wird sowohl in den *sgd*-Mutanten als auch im Wildtypstamm im Gegensatz zur *ccpA*-Mutante, schwächer exprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß eine *ccpA*-Mutante Ammonium als alleinige N-Quelle nicht nutzen kann (Faires *et al.,* 1999). Eine mögliche Erklärung für die erniedrigte Expression des Ammoniumtransporters könnte daher die bessere Glutamatversorgung im Wildtyp und in den *sgd*-Mutanten im Vergleich zur *ccpA*-Mutante sein. Bei N-Mangel wird das *nrgA*-Gen, welches Bestandteil des *nrgAB*-Operons ist, induziert (Atkinson & Fisher, 1991).

Der Citratzyklus wird CcpA-abhängig durch Glukose reprimiert (Blencke *et al.,* 2003). Zu den am stärksten regulierten Genen des Citratzyklus gehören das *citZ*-Gen und das *citB*-Gen. *citZ* kodiert für die Citratsynthase und wird direkt CcpA-abhängig reguliert. Die Aconitase ist durch *citB* kodiert und wird indirekt CcpA-abhängig reguliert (Kim *et al*, 2002b). Die Microarrayanalyse zeigt, daß beide Gene in den *sgd*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp starker exprimiert werden. Die erhöhte Expression der Gene kann durch die Abwesenheit von CcpA in den *sgd*-Mutanten erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass es in den Mutanten *sgd-1* und *sgd-2* keine Katabolitenrepression gibt (Faires *et al.,* 1999). Die

Ergebnisse des Microarrayexperiments stimmen daher gut mit den Angaben der Literatur überein.

Die Gene *gapA* und *eno* kodieren in *B. subtilis* für Enzyme der Glykolyse (Fillinger *et al.,* 2000; Leyva-Vazquez & Setlow, 1994). Die Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Das *gapA*-Gen ist neben dem *eno*-Gen Bestandteil des hexacistronischen *gapA*-Operons, welches durch Zucker und verschiedene Aminosäuren induziert wird (Ludwig *et al.*, 2001). Eine *ccpA*-Mutante kann Zucker wie z.B. Glukose schlecht aufnehmen. Die verringerten Expressionen der Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase und der Enolase in den *sgd*-Mutanten weist daher darauf hin, daß auch die beiden *sgd*-Mutanten Glukose schlechter aufnehmen können.

Die Gene *pta* und *ackA* kodieren in *B. subtilis* für Enzyme des Überflußstoffwechsels (Shin *et al.*, 1999; Grundy *et al.*, 1993). Beide Enzyme werden CcpA-abhängig durch Glukose induziert (Blencke *et al.*, 2003). Erwartungsgemäß wird die Acetatkinase, welche durch das *ackA*-Gen kodiert wird, in den *sgd*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp schwächer exprimiert. Erstaunlicherweise wird die Phosphotransacetylase, welche durch das *pta*-Gen kodiert wird, in den *sgd*-Mutanten sehr schwach exprimiert. In *B. subtilis* werden die Gene des *alsSD*-Operons und das *ldh*-Gen unter anaroben Bedingungen exprimiert (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2000). Die Gene des *alsSD*-Operons kodieren für Enzyme, welche in die Produktion von 2,3-Butandiol involviert sind. Die Lactat-Dehydrogenase wird durch das *ldh*-Gen kodiert und katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. Das *alsSD*-Operon wird in beiden *sgd*-Mutanten schwächer exprimiert als im Wildtyp und der *ccpA*-Mutante. Aus der Beobachtung, daß mit Ausnahme des *ldh*-Gens, die Gene des Überflußstoffwechsels (*pta*, *ackA* und *alsS*) in den *sgd*-Mutanten schwächer exprimiert werden, könnte man die Vermutung ableiten, daß die Auschleusung von Kohlenstoffverbindungen durch den Überflußmetabolismus verringert wird und Succinat möglicherweise als C-Quelle besser genutzt werden kann. Die Ergebnisse des Microarrayexperiments sollten zur Bestätigung der Vermutung jedoch mit Hilfe von *lacZ*-Fusionen überprüft werden.

Die Eigenschaft der beiden Stämme, in C-Glc- und CS-Medium zu wachsen, kann durch die geringere Expression von RocG nicht erklärt werden. In Abschnitt 4.5.4. wurde gezeigt, daß nur die Inaktivierung von RocG das Wachstum auf CS-Platten ermöglicht. Weiterhin kann aufgrund der Stabilität des Phänotyps der Mutanten *sgd-1* und *sgd-2*, eine Mutation in *rocG*, die zur Inaktivierung der enzymatischen Funktion von RocG führt, ausgeschlossen werden. Möglicherweise haben beide *sgd*-Mutanten die Fähigkeit erlangt, den

Aminogruppendonor Glutamat neben der von der Glutamatsynthase katalysierten Reaktion auf anderem Wege in ausreichender Menge zu synthetisieren, so daß sie in der Lage sind, mit Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle zu wachsen. Die Ursache für den *sgd*-Phänotyp in den Stämmen QB5412 (*sgd-1*) und QB5413 (*sgd-2*) konnte mit Hilfe dieses Microarrayexperiments nicht ermittelt werden.

5. Diskussion

5.1. Abstimmung zwischen Glutamatsynthese und -abbau in *B. subtilis*

B. subtilis konkurriert in seinem natürlichen Habitat mit einer Vielzahl anderer Organismen um die zur Verfügung stehenden Nährstoffe. Um sich bei dieser starken Konkurrenz zu behaupten, muß *B. subtilis* die vorkommenden Nährstoffe (C- und N-Quelle, u. a. Nährstoffe) möglichst schnell aufnehmen und verwerten. *B. subtilis* erreicht die höchsten Wachstumsraten bei der Verwertung der bevorzugten C-Quelle Glukose. Die Glukose wird bei ihrer Verwertung jedoch nicht vollständig zu CO_2 oxidiert, sondern nach ihrer Umwandlung in der Glykolyse über den Überflußstoffwechsel als Essigsäure ausgeschieden (Grundy *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 1999; Presecan-Siedel *et al.*, 1999). Diese Strategie, Nährstoffe ineffizient aber schnell zu verwerten, um sich gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen durchzusetzen, scheint bei vielen Bakterien vorzukommen. Dabei wird in Kauf genommen, daß die in der C-Quelle konservierte Energie durch die Bakterien nicht vollständig genutzt wird (Pfeiffer *et al.*, 2001).

Damit die Bakterien mit der zur Verfügung stehenden C-Quelle maximale Wachstumsraten erreichen können, müssen der C- und der N-Stoffwechsel optimal aufeinander abgestimmt sein. Ein schnelles Wachstum ist nur dann möglich, wenn der Aminogruppendonor Glutamat, welcher für die Synthese aller anderen N-haltigen Verbindungen benötigt wird, in einer ausreichend großen Menge gebildet wird. Zur Synthese von Glutamat muß Ammonium aufgenommen und auf das Akzeptormolekül α-Ketoglutarat übertragen werden (Abb. 2.3.). Die Bildung von Glutamat geschieht in Bakterien hauptsächlich auf zwei Wegen: Zum einen kann das Glutamat über den GOGAT-Zyklus und zum anderen mit Hilfe einer anabolen GDH synthetisiert werden (Schreier, 1993). Das Gram-negative Bakterium *E. coli* kann Glutamat über beide Wege synthetisieren. Wie *E. coli*, so können die meisten Bakterien Ammonium sowohl mit Hilfe des GOGAT-Zyklus aus auch durch eine anabole GDH assimilieren (Schreier, 1993).

B. subtilis synthetisiert den Aminogruppendonor Glutamat ausschließlich mit Hilfe der energieverbrauchenden Reaktion der GS im GOGAT-Zyklus (Bohannon & Sonenshein, 1989). Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, daß die GDH in *B. subtilis* ein kataboles Enzym ist und nicht zur Glutamatsynthese beiträgt. Daher ist eine *gltC*-Mutante, in der die GOGAT nicht exprimiert wird, auxotroph für Glutamat (Abschnitt 4.1.4.). *B. subtilis*

stellt jedoch keine Ausnahme unter den Bakterien da. Das Bakterium *Rhizobium etli* kann Ammonium ebenfalls nur mit Hilfe des GOGAT-Zyklus assimilieren (Castillo *et al.*, 2000). Es gibt jedoch auch *Bacillus*-Spezies, die Ammonium sowohl über den GOGAT-Zyklus als auch mit Hilfe einer anabolen GDH assimilieren können. Die Bakterien *B. licheniformis* und *B. megaterium* besitzen beide eine anabole GDH, die Ammonium auf α-Ketoglutarat übertragen kann (Hemmilä & Mäntsälä, 1978; Kim & Hollocher, 1982). Die GDH in *B. licheniformis* besitzt sowohl eine anabole als auch eine katabole Funktion und es wird vermutet, daß dieses Enzym eine wichtige Rolle bei der Konstanthaltung des Glutamatpools spielt (Meers & Pedersen, 1972). In dem N_2-fixierenden Bakterium *B. polymyxa* nimmt die GDH die primäre Position bei der Ammoniumassimilation ein (Kanamori *et al.*, 1987). In bestimmten Isolaten des Bakteriums *Bacteroides fragilis* wird Ammonium ebenfalls hauptsächlich mit einer anabolen GDH assimiliert (Abrahams & Abratt, 1998). Die Art und Weise, wie die Bakterien den Aminogruppendonor Glutamat synthetisieren und welche N- und C-Quelle diese Bakterien bevorzugt nutzen, steht möglicherweise in direktem Zusammenhang mit dem Nährstoffangebot in ihrem natürlichen Habitat (Belitsky, 2002). Das Gram-negative Bakterium *Alcanivorax borkumensis* kann ausschließlich Alkane als C-Quelle verwerten (Yakimov *et al.*, 1998). Das Bakterium ist daher besonders in solchen Habitaten verbreitet, in denen Alkane vorkommen.

Damit *B. subtilis* beim Wachstum in Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose und der N-Quelle Ammonium eine ausreichende Menge des Aminogruppendonors Glutamat bilden kann, muß das glutamatabbauende Enzym RocG in Gegenwart von Glukose reprimiert werden. In der Tat wird die Expression des Enzyms in *B. subtilis* beim Wachstum mit Glukose durch das globale Regulatorprotein des C-Stoffwechsels CcpA reprimiert (Belitsky *et al.*, 2004; Reif, 2004, Bertram *et al.*, 2006). Durch diesen Regulationsmechanismus wird gewährleistet, daß beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart der C-Quelle Glukose mit Hilfe des GOGAT-Zyklus der Glutamatbedarf gedeckt wird und hohe Wachstumsraten erzielt werden können (Abb. 5.1. A).

Beim Wachstum mit einer schlechten C-Quelle, wie z. B. Succinat, und in Anwesenheit von Arginin wird die katabole GDH RocG stark exprimiert und Arginin kann über den Argininabbauweg zu Glutamat umgewandelt werden (Abb. 5.1. B; Gardan *et al.*, 1995; Gardan *et al.*, 1997). Das *gltAB*-Operon hingegen wird unter diesen Bedingungen stark reprimiert. Die Repression des *gltAB*-Operons wird durch RocG vermittelt (siehe Abschnitt 5.2.). Die argininabhängige Regulation des *gltAB*-Operons ist sinnvoll, da die GOGAT in

Gegenwart von Arginin nicht zur Synthese von Glutamat benötigt wird. Durch die inverse Regulation der GOGAT und der GDH RocG wird in der Zelle für eine konstante Glutamatversorgung gesorgt.

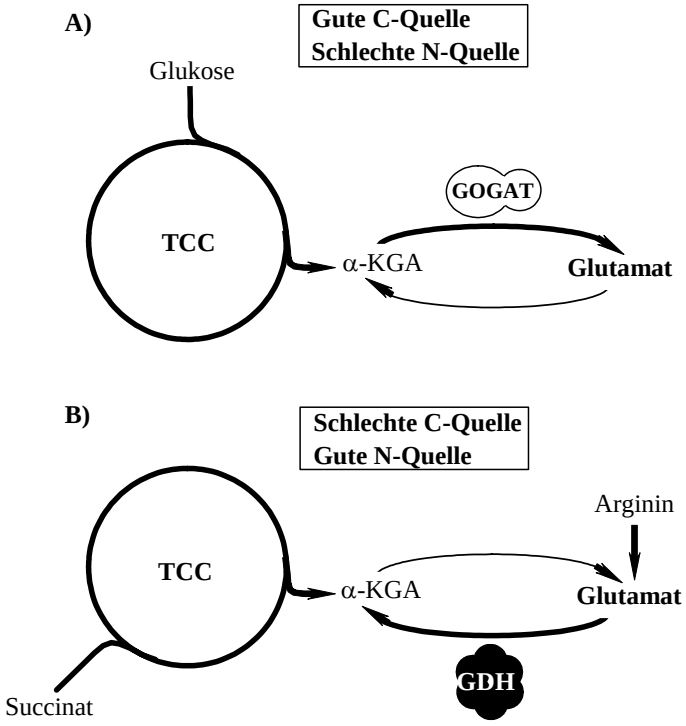

Abb. 5.1. Abstimmung zwischen Glutamatsynthes und -abbau in *B. subtilis*

A) In Gegenwart von Glukose und Ammonium wird die GOGAT stark exprimiert, um beim Wachstum von *B. subtilis* mit der bevorzugten C-Quelle den Glutamatbedarf der Zelle zu decken.

B) Beim Wachstum mit der schlechten C-Quelle Succinat und der N-Quelle Arginin kann zum einen der Aminogruppendonor Glutamat gebildet werden und zum anderen kann das C-Gerüst von Glutamat in den C-Stoffwechsel einfließen und für anabole Reaktionen genutzt werden.

α-KGA = α-Ketoglutarat.

Die Nutzung nur eines Weges zur Assimilation bringt auch Nachteile mit sich. Beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart von C-Quellen, die zu einer schwachen CCR führen, kann die Expression der katabolen GDH durch das globale Regulatorprotein des C-Stoffwechsels CcpA, nicht verhindert werden (Belitsky *et al*., 2004). *B. subtilis* kann daher mit schlechteren C-Quellen, wie z. B. Sorbitol oder Arabinose, nicht so schnell wie mit der bevorzugten C-Quelle Glukose wachsen, da die GDH Glutamat abbauen kann (Abschnitt 4.5.1.). In Abwesenheit von Glukose limitiert daher der Aminogruppendonor Glutamat die

Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 4.14.). Durch die Inaktivierung des glutamatabbauenden Enzyms kann *B. subtilis* die im Vergleich zu Glukose minderwertigeren C-Quellen Sorbitol und Arabinose besser verwerten und sogar die C-Quelle Succinat in Gegenwart der N-Quelle Ammonium nutzen (Abb. 4.14.; Commichau *et al.*, 2006b). Unter bestimmten Wachstumsbedingungen ist die katabole Funktion der GDH für *B. subtilis* jedoch essentiell. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die GDH benötigt wird, damit das Bakterium die Aminosäure Arginin als C-Quelle nutzen kann (Abb. 4.4.). In Abwesenheit von RocG kann das Bakterium Arginin nicht als alleinige C-Quelle nutzen, da die Umwandlung von Glutamat in α-Ketoglutarat nicht möglich ist und damit das C-Gerüst der Aminosäure nicht in den C-Stoffwechsel einfließen kann (Abb. 2.3.; Abb. 5.1. B). Im Wildtypstamm von *B. subtilis* wird die GDH allerdings zu schwach exprimiert, um Glutamat als C-Quelle nutzen zu können. Erst die Überexpression der GDH ermöglicht die Nutzung von Glutamat als C-Quelle (Abb. 4.4.). Die Nutzung von Arginin hingegen wird dadurch ermöglicht, daß die GDH in Gegenwart von Arginin stark exprimiert wird (Gardan *et al.*, 1995 & 1997).

Da in *B. subtilis* die Expression des einzigen glutamatbildenden Enzyms (die GOGAT) durch die GDH reguliert wird (Abschnitt 5.2.), welches zusätzlich als Enzym in der Zelle den Aminogruppendonor Glutamat in großem Umfang abbauen kann und damit für die Verwertung von Arginin essentiell ist, wird das Substratspektrum des Bakteriums durch diesen Regulationsmechanismus der Glutamatbiosynthese stark eingeschränkt. *B. subtilis* kann nur solche C-Quellen nutzen, die das glutamatabbauende Enzym RocG reprimieren, damit Ammonium durch die Reaktionen des GOGAT-Zyklus assimiliert werden kann. Auf die katabole Funktion von RocG kann jedoch nicht verzichtet werden, weil dieses Enzym für die Verwertung von Arginin als C-Quelle benötigt wird. Die Nutzung zweier Wege zur Ammoniumassimilation kann unter bestimmten Bedingungen einen Wachstumsvorteil bieten. In der späten Wachstumsphase trägt die anabole GDH in dem Cyanobakterium *Synechocystis* signifikant zur Ammoniumassimilation bei (Chávez *et al.*, 1999).

5.2. Die Glutamatdehydrogenase RocG: Ein Protein mit zwei Funktionen

Der Wildtypstamm von *B. subtilis* kann trotz seiner genetischen Ausstattung, durch die er in der Lage sein sollte, Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle (CS-Medium) verwerten zu können, in CS-Medium nicht wachsen. Die *ccpA*-Mutante kann im Gegensatz

zum Wildtyp auch in glukosehaltigem Medium die N-Quelle Ammonium (C-Glc-Medium) nicht nutzen (Faires *et al.*, 1999). Durch die artifizielle Induktion des *gltAB*-Operons in der *ccpA*-Mutante ist der Stamm jedoch in der Lage, mit Glukose und Ammonium als C- und N-Quelle zu wachsen (Wacker *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse zeigen, daß die *ccpA*-Mutante in C-Glc-Medium das Ammonium deshalb nicht assimilieren kann, weil die Expression der GOGAT durch GltC nicht aktiviert wird (Faires *et al*., 1999; Wacker *et al*. 2003, Commichau *et al.*, 2006b). Der Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante in C-Glc-Medium und die Glutamatauxotrophie des Wildtypstamms in CS-Medium könnten jedoch auch auf den Glutamatabbau durch RocG zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, daß ausgehend von der *ccpA*-Mutante in glukosehaltigem Medium mit Ammonium als N-Quelle sogenannte *sgd*-Mutanten isoliert werden konnten, in denen die glutamatabbauende GDH inaktiviert wurde. Diese *ccpA rocG*-Doppelmutanten können sogar in CS-Medium wachsen. Es konnte ausgehend vom Wildtypstamm in CS-Medium eine *sgd*-Mutante isoliert werden, in der das *rocG*-Gen ebenfalls inaktiviert wurde (Commichau *et al.*, 2006b). RocG verhindert daher sowohl das Wachstum der *ccpA*-Mutante in C-Glc- und CS-Medium als auch das Wachstum des Wildtypstamms in CS-Medium. Da in der *ccpA*-Mutante die Glukoseaufnahme verringert ist, wäre es vorstellbar, daß die enzymatische Funktion von RocG in der *ccpA*-Mutante durch ein Intermediat des C-Stoffwechsels nicht inaktiviert werden kann. Die C-Quellen-abhängige Inaktivierung der GDH wäre auch eine Erklärung dafür, warum der Wildtypstamm von *B. subtilis* nicht in der Lage ist, in CS-Medium zu wachsen. Möglicherweise kann in Gegenwart der C-Quelle Succinat im Wildtypstamm das Intermediat des C-Stoffwechsels gebildet werden, welches die enzymatische Funktion der GDH inhibiert.

Die Eigenschaft der *rocG*-Mutanten, in CS-Medium wachsen zu können, muß jedoch nicht alleine auf den Verlust der glutamatabbauenden Funktion der GDH zurückzuführen sein. Das *gltAB*-Operon wird sowohl in einer *rocG*- als auch in einer *rocG ccpA*-Doppelmutante konstitutiv exprimiert. Es ist daher naheliegend anzunehmen, daß RocG neben seiner enzymatischen Funktion zusätzlich in der Lage ist, durch eine Interaktion mit GltC das Aktivatorprotein zu inhibieren. Die Interaktion zwischen RocG und GltC kann auch die Korrelation zwischen der durch die C-Quelle ausgeübten CCR und der Expression der GOGAT im Wildtypstamm erklären (Tab. 4.2.). Beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart der bevorzugten C-Quelle Glukose wird die Expression der GDH durch CcpA verhindert (Belitsky *et al.*, 2004). Unter diesen Bedingungen ist die Interaktion zwischen

RocG und GltC nicht möglich und das Aktivatorprotein GltC kann die Transkription des *gltAB*-Operons aktivieren. In Gegenwart einer C-Quelle, die zu einer schwachen CCR führt, kann RocG zum einen Glutamat abbauen und zum anderen das Regulatorprotein GltC daran hindern, die Transkription des *gltAB*-Operon zu aktivieren. Dieser Regulationsmechanismus würde erklären, warum in *B. subtilis* die GOGAT und die GDH invers exprimiert werden und warum *B. subtilis* in der Lage ist, Succinat und Ammonium in Abwesenheit einer der katabolen GDH RocG zu verwerten. Eine wichtige Rolle, sowohl bei der Inhibition als auch bei der Stimulation der Interaktion zwischen RocG und dem Aktivatorprotein GltC, spielt der Aminogruppendonor Glutamat. Es konnte gezeigt werden, daß die GDH das Aktivatorprotein GltC nur inhibieren kann, wenn *B. subtilis* mit Glutamat oder einer Glutamatquelle (z. B. Arginin) versorgt wird. Offensichtlich muß das katabole Enzym Glutamat abbauen, um GltC inhibieren zu können. (siehe auch folgenden Abschnitt 5.3.). Da der Aktivitätszustand von RocG offensichtlich die Glutamatversorgung von *B. subtilis* wiederspiegelt, erscheint es durchaus sinnvoll, daß das katabole Enzym RocG das Aktivatorprotein GltC nur dann inhibiert, wenn die Zelle mit einer guten N-Quelle wie Arginin versorgt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, daß die katabole GDH RocG neben ihrer enzymatischen Funktion noch eine weitere Funktion besitzt. RocG ist in der Lage, den Transkriptionsaktivator GltC des *gltAB*-Operons in Abhängigkeit von der C-Quelle und der N-Quelle zu inhibieren (Abschnitt 5.3.; Abb. 5.2.). Der direkte Nachweis einer Interaktion zwischen RocG und GltC muß jedoch noch erbracht werden.

Proteine, die neben ihrer enzymatischen Funktion noch eine weitere Funktion besitzen, werden als „Moonlighting“-Proteine bezeichnet (Jeffrey, 1999). Mittlerweile ist sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten von einer Vielzahl von Proteinen bekannt, daß sie neben ihrer enzymatischen Funktion im zellulären Stoffwechsel noch eine bzw. mehrere regulatorische Funktion(-en) haben können (Jeffrey, 1999, 2003, 2004; Moore, 2004). Es gibt „Moonlighting“-Proteine die neben ihrer enzymatischen Funktion durch direkte Interaktion mit der DNA als Transkriptionsregulatoren wirken oder in die Regulation der Translation (RNA-Bindung) involviert sind. Es gibt auch „Moonlighting“-Proteine, die indirekt durch die Modulation der Aktivität von Transkriptionsregulatoren oder RNA-bindenden Proteinen die Genexpression beinflussen. Einige Beispiele sind in Tabelle 5.1. dargestellt.

Regulationsmechanismus	Organismus	Enzym	Effektor/Signal	Target	Referenz
DNA-Bindung	*E. coli, B. subtilis*	BirA	Biotin	*bir*-Operon	1
	E. coli, S. typhimurium	PutA	Prolin	Promotorregion des *put*-Operons	2,3
	S. typhimurium	NadR	NMN/$NADH_2$	Promotorregion der NAD^+-Biosynthesegene	4,5
RNA-Bindung	*B. subtilis, E. coli, S. cerevisiae*	Aconitase	Eisen	*Iron-responsive elements*	6,7,8
	H. sapiens, Rind	GDH	unbekannt	Cytochrom c-Oxidase-mRNA	9,10
Modulation der Aktivität eines DNA-bindenden Proteins	*B. subtilis*	GS	Glutamin	TnrA	11
	B. subtilis	GDH	Glutamat	GltC	Diese Arbeit
Kovalente Modifikation eines Regulatorproteins	*E. coli*	EII^{Bgl}	Salicin	Bgl	12
	B. subtilis	EII^{Glc}	Glukose	GlcT	13

Tab. 5.1. Ausgewählte Beispiele für Enzyme mit zusätzlichen Funktionen im Stoffwechsel verschiedener Organismen.

[1]Rodionov *et al.*, 2006; [2]Scarpulla & Soffer, 1978; [3]Brown & Wood, 1992; [4]Holley *et al.*, 1985; [5]Tritz & Chandler, 1973; [6]Serio *et al.*, 2006; [7]Kiley & Beinert, 2003, [8]Beinert *et al.*, 1996; [9]Preiss *et al.*, 1995; [10]Preiss & Lightowlers, 1993; [11]Wray *et al.*, 2001; [12]Görke, 2003; [13]Schmalisch *et al.*, 2003.

In einigen Proteobakterien gibt es beispielsweise ein trifunktionales Flavoprotein, welches in den Abbau von Prolin involviert ist. Das Protein wird in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* als PutA (**P**roline **ut**ilization **A**) bezeichnet und katalysiert die Umwandlung von Prolin in Glutamat. Diese Umwandlung ist mit zwei enzymatischen Schritten verbunden. Beide Reaktionen werden von PutA katalysiert (Scarpulla & Soffer, 1978; Menzel & Roth, 1981a; Wood, 1987; Brown & Wood, 1992). Die N-Quelle Prolin bestimmt die Lokalisation von PutA in der Zelle. In Abwesenheit von Prolin akkumuliert PutA im Cytoplasma und verhindert durch seine Bindung im intergenischen Bereich des *put*-Operons neben seiner eigenen Synthese auch die Bildung des Prolintransporters PutP (Menzel & Roth, 1981b; Wood, 1981; Maloy & Roth, 1983; Gu *et al.*, 2004). Beim Wachstum von *E. coli* und *S. typhimurium* in Gegenwart von Prolin ist PutA an der Membran lokalisiert, da der beim Prolinabbau reduzierte Kofaktor $FADH_2$ durch eine membranassoziierte Elektronentransportkette reoxidiert werden muß. Das enzymatisch aktive PutA kann sowohl seine eigene Synthese als auch die des Prolintransporters PutP nicht reprimieren. Die regulatorische Funktion und die beiden enzymatischen Funktionen von PutA werden daher durch die N-Quelle Prolin bestimmt (Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993; Surber & Maloy, 1999). Durch die Bestimmung der Struktur von PutA konnten die drei Funktionen bestimmten Bereichen des Proteins zugeordnet werden (Lee *et al.*, 2003). Durch diesen Regulationsmechanismus des Prolinstoffwechsels wird das katabole Enzym, welches gleichzeitig zwei Reaktionen katalysieren kann, nur dann verstärkt gebildet, wenn das abzubauende Substrat vorhanden ist. Das Beispiel PutA zeigt, daß sich die beiden Funktionen des Proteins, als Repressor oder als Enzym zu fungieren, gegenseitig ausschließen. Im Fall von RocG schließen sich die beiden Funktionen des Enzyms nicht aus. RocG ist bei der Inhibition des Aktivatorproteins GltC enzymatisch aktiv (siehe Abschnitt 5.3.).

Die Eigenschaft von Regulatorproteinen, mehrere Funktionen im bakteriellen Stoffwechsel auszuüben ist nicht auf PutA beschränkt. In den beiden Proteobakterien *E. coli* und *S. typhimurium* gibt es ein weiteres multifunktionales Protein. Das Repressorprotein NadR reprimiert bei einem hohen intrazellulären NAD^+-Pool die Gene, deren Produkte an der Synthese von NAD^+ beteiligt sind (Abb. 5.2. A; Holley *et al.*, 1985; Tritz & Chandler, 1973; Zhu *et al.*, 1988). NAD^+ fungiert als Korepressor von NadR. Die Fähigkeit zur DNA-Bindung konnte sowohl für NadR aus *E. coli* als auch für das homologe Protein aus *S. typhimurium* gezeigt werden. Sobald die intrazelluläre NAD^+-Konzentration absinkt, wirkt NadR nicht mehr als Repressor und stimuliert gleichzeitig die Aufnahme des NAD^+-Precursors

Nikotinamidmononukleotid (NMN) durch das Membranprotein PnuC (Foster *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1991). Für das Regulatorprotein aus *E. coli* konnte auch eine enzymatische Funktion nachgewiesen werden. NadR kann den Adenylylrest von ATP auf NMN übertragen und damit zur NAD^+-Synthese in der Zelle beitragen (Raffaelli *et al.*, 1999). Dieser Regulationsmechanismus gewährleistet einen konstanten Pool des Moleküls NAD^+, das bei vielen Reaktionen des Stoffwechsels als Kofaktor dient.

Zwischen dem NadR-abhängigen Regulationsmechanismus im NAD^+-Stoffwechsel von *E. coli* und der Rolle von RocG im Glutamatstoffwechsel von *B. subtilis* gibt es einige Parallelen. Beide Proteine sind enzymatisch aktiv und können als Repressoren wirken, wobei NadR durch direkte DNA-Bindung reprimiert und RocG die Expression des *gltAB*-Operons durch Inhibition des Aktivatorproteins GltC indirekt verhindert (Abb. 5.2. A) & B)). Die enzymatischen Aktivitäten unterscheiden sich jedoch, da NadR ein anaboles Enzym ist und RocG als kataboles Enzym Glutamat abbaut. Sowohl im Fall von NadR als auch bei der Regulation des *gltAB*-Operons durch RocG können die Effektoren (NAD^+ bei NadR und Glutamat bei RocG) die Einflüsse der regulatorischen Funktionen der Enzyme stimulieren. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse belegen, daß RocG das Aktivatorprotein GltC nur zusammen mit Glutamat inhibieren kann (Abschnitt 5.3.). Die beiden Effektoren NAD^+ und Glutamat werden durch diejenigen Enzyme gebildet, deren Expression durch die Repressoren NadR bzw. RocG verhindert wird. Beide Regulationsmechanismen sind elegante Lösungen, um die zellulären Konzentrationen wichtiger Moleküle des bakteriellen Stoffwechsels konstant zu halten. Ein gravierender Unterschied zwischen dem NadR-abhängigen und dem RocG-abhängigen Regulationsmechanismus ist jedoch die Regulation der Effektoren selbst. NadR reguliert durch die Repression des *nadR*-Gens seine eigene Synthese. Dieser Mechanismus der Genregulation wird als autogene Regulation bezeichnet und ist charakteristisch für viele Regulatorproteine (Maloy & Stewart, 1993). Die Transkription des *rocG*-Gens wird durch spezifische Regulatorproteine aktiviert oder reprimiert (Abschnitt 2.5.2.; Abb. 2.4.).

In *E. coli* gibt es neben PutA und NadR ein weiteres sehr gut untersuchtes Regulatorprotein, welches ebenfalls eine enzymatische Funktion besitzt. Als Enzym katalysiert BirA die posttranslationale Modifikation der biotinabhängigen Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) (Barker & Campbell, 1981; Cronan, 1989). Dabei wird Biotin zunächst durch die Addition von AMP aktiviert (Biotinyl-5'-AMP). Anschließend wird der Biotinoylrest auf eine Untereinheit der ACC übertragen. Die Biotinylierung der ACC ist

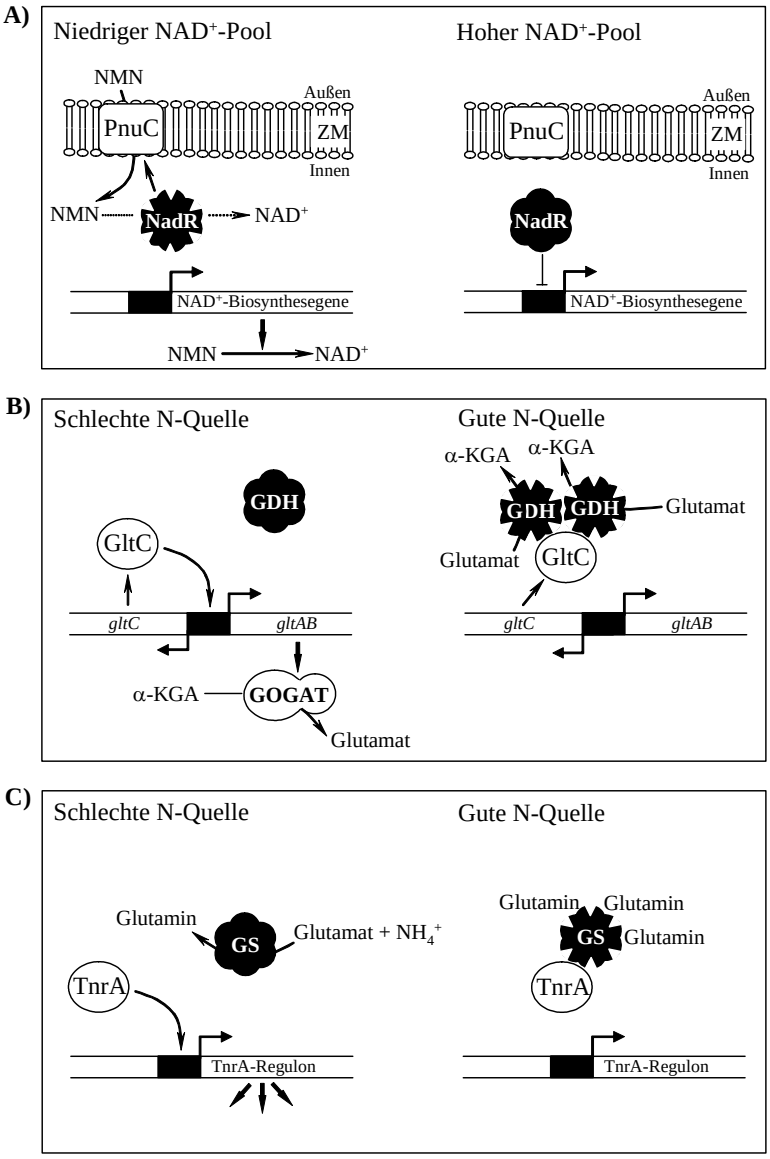

Abb. 5.2. Regulation des bakteriellen Stoffwechsels durch multifunktionale Proteine

A) Das NadR-System zur Regulation der NAD^+-Biosynthese in *E. coli*. Bei einem niedrigen NAD^+-Pool stimuliert NadR die Aufnahme von NMN und katalysiert auch die Umwandlung von NMN in NAD^+. NadR kann unter diesen Bedingungen nicht die Gene des NAD^+-Biosynthesewegs reprimieren. Bei einem hohen NAD^+-Pool reprimiert NadR die Gene des NAD^+-Biosynthesewegs.

B) Regulation der Glutamatsynthese in *B. subtilis* durch Protein-Protein-Wechselwirkung: Beim Wachstum mit der schlechten N-Quelle Ammonium kann GltC die Transkription des *gltAB*-Operons aktivieren und die GOGAT synthetisiert den Aminogruppendonor Glutamat. In Gegenwart von Arginin ist die glutamatabbauende GDH aktiv und inhibiert das Aktivatorprotein GltC.

C) Regulation der TnrA-Aktivität, des globalen Regulatorproteins des N-Stoffwechsels in *B. subtilis*: Bei schlechter N-Versorgung aktiviert TnrA die Transkription von Genen, deren Produkte die Aufnahme und Umwandlung von alternativen N-Quellen katalysieren. Bei guter N-Versorgung wird TnrA durch die feedback-inhibierte GS inhibiert.

NMN = Nikotinamidmononukleotid; α-KGA = α-Ketoglutarat

essentiell für die Funktion des Enzyms. Die ACC katalysiert die erste Reaktion im Fettsäurebiosyntheseweg und spielt daher eine wichtige im bakteriellen Stoffwechsel (Cronan & Waldrop, 2002). Der Regulator BirA reprimiert in Anwesenheit von Biotin das Operon, welches für Enzyme aus dem Biotinbiosyntheseweg kodiert (Cronan, 1989). Wie NadR und RocG so benötigt auch BirA einen Kofaktor. Es konnte gezeigt werden, daß BirA nur zusammen mit dem Kofaktor Biotinyl-5'-AMP an seinen Operator binden kann. Die Eigenschaft, von BirA als Biotinligase oder Repressor zu fungieren, wird durch die Konformation des Proteins bestimmt. BirA ist in seinem Grundzustand ein Monomer, wenn es jedoch den Kofaktor Biotinyl-5'-AMP gebunden hat, können zwei mit Biotinyl-5'-AMP beladene BirA-Monomere kooperativ an den Biotinoperator binden (Abbott & Beckett, 1993; Eisenstein & Beckett, 1999). Wie im Fall von BirA, so könnte man sich auch für die RocG-abhängige Inhibition von GltC vorstellen, daß durch die Konformation oder den Aktivitätszustand von RocG die hemmende Wirkung des Enzyms auf GltC moduliert wird (Abschnitt 5.3.). Der genaue Mechanismus der Konformationsänderungen bei BirA, die die zwei unterschiedlichen Funktionen im Biotinstoffwechsel determinieren, ist noch nicht bekannt. Es wird vorgeschlagen, daß die Bindung der biotinylierten Untereinheit der ACC die Homodimerisierung von BirA- Biotinyl-5'-AMP inhibiert und dadurch die Repression der Genes des Biotinbiosynthesewegs verhindert wird (Weaver *et al.*, 2001). BirA ist der einzige und erste Transkriptionsregulator von dem bekannt ist, daß seine Aktivität sowohl in Bakterien als auch in Archaeen durch ein konserviertes Signal gesteuert wird (Rodionov *et al.*, 2001). Auch in *B. subtilis* konnte der Regulator BirA identifiziert werden. Das Protein ist ebenfalls in die Regulation der Biotinbiosynthese involviert und besitzt auch eine enzymatische Funktion (Bower *et al.*, 1995).

Die oben beschriebenen Beispiele zeigen, daß es in einem gut untersuchten Mikroorganismus, wie z. B. *E. coli*, mehrere bifunktionale oder multifunktionale Proteine gibt, deren Regulationsmechanismen dem Regulationsmechanismus von RocG im N-Stoffwechsel von *B. subtilis* in vielen Punkten ähnelt. In *B. subtilis* gibt es neben BirA und RocG noch ein weiteres Enzym des N-Stoffwechsels, welches neben seiner enzymatischen Funktion auch mit einem Transkriptionsregulator interagieren kann (Abb. 5.2. C)). Die GS katalysiert zum einen die Umwandlung von Glutamat und Ammonium in Glutamin und kann zum anderen mit TnrA, dem globalen Regulatorprotein des N-Stoffwechsels, interagieren. Damit die GS mit TnrA interagieren kann, muß das Enzym durch Glutamin inhibiert sein (Deuel & Prusiner, 1974; Wray *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2002; Wray & Fisher, 2005). Durch

die Interaktion zwischen der GS und dem Regulatorprotein TnrA können die Gene, die für Proteine und Enzyme kodieren, die die Aufnahme und Umwandlung alternativer N-Quellen katalysieren, nicht exprimiert werden. Die energieaufwendige globale Änderung der Genexpression durch TnrA wird also verhindert, wenn *B. subtilis* in Gegenwart von Glutamin wächst (Abb. 2.4.). Der physiologische Sinn der Hemmung von GltC durch RocG ist mit der Hemmung von TnrA durch die GS vergleichbar. Die Expression des glutamatsynthetisierenden Enzyms GOGAT wird erst dann durch RocG verhindert, wenn *B. subtilis* mit einer guten Glutamatquelle wie z. B. Arginin versorgt wird. Ein bedeutender Unterschied zwischen beiden Regulationsmechanismen ist jedoch der Zustand der beiden Enzyme. Bei der GS muß die enzymatische Funktion des Proteins, die Umwandlung von Ammonium und Glutamat in Glutamin, gehemmt werden (Wray *et al.*, 2001). Die katabole GDH RocG muß hingegen vermutlich in ihrem aktiven Zustand vorliegen, damit die zweite Funktion des Enzyms, die Hemmung des Aktivatorproteins GltC, ins Spiel kommt (Abschnitt 5.3.).

Wie im Fall von PutA, NadR und BirA bei den Enterobakterien sind sowohl die Mechanismen der Regulation des globalen Regulatorproteins des N-Stoffwechsels TnrA durch die GS als auch die Regulation des Aktivatorproteins GltC durch RocG interessante Beispiele für die Verlagerung mehrerer unterschiedlicher Funktionen auf ein einziges Protein in *B. subtilis*. Durch Nutzung multifunktionaler Proteine können bei einer konstanten Protein- bzw. Enzymzahl sowohl die Anzahl der Regulationsvorgänge als auch die Anzahl enzymatischer Umsetzungen in der Zelle gesteigert werden. Die „Verwendung“ einer beschränkten Anzahl von Regulatoren bei der Regulation des *gltAB*-Operons ermöglicht *B. subtilis* jedoch nicht die Nutzung von Succinat und Ammonium als C- und N-Quelle. Die Nutzung von C-Quellen, wie z. B. Succinat, die zu einer geringen CCR führen, wäre möglicherweise nicht eingeschränkt, wenn die GDH in *B. subtilis* Glutamat synthetisieren könnte. Der Regulationsmechanismus der Glutamatbiosynthese in *B. subtilis* ist zwar einzigartig, das Subtratspektrum dieses Bakteriums wird aber dadurch eingeschränkt.

5.3. Regulation der Glutamatdehydrogenaseaktivität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression der GOGAT und der GDH invers korrelieren und daß das katabole Enzym RocG das Aktivatorprotein GltC inhibiert. Es ist deshalb naheliegend anzunehmen, daß die Repression des *gltAB*-Operons durch Arginin allein darauf zurückzuführen ist, daß Arginin das *rocG*-Gen stark induziert. Für die NAD^+-abhängige GDH des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* konnte jedoch gezeigt werden, daß das Enzym allosterisch durch Arginin aktiviert wird (Lu & Abdelal, 2001). Vorstellbar wäre daher, daß der inaktivierende Einfluß der katabolen GDH auf die Aktivität des Regulatorproteins GltC durch einen „*forward*-Mechanismus“ reguliert wird. Möglicherweise aktiviert ein Metabolit des Argininabbauwegs die GDH allosterisch. Die beiden Aminosäuren Arginin und Ornithin konnten jedoch als Effektoren von RocG ausgeschlossen werden. In der *rocD*-Mutante, in der das *rocG*-Gen durch Arginin und Ornithin induziert wird (Abb. 4.12.), die Umwandlung von Arginin bzw. Ornithin zu Glutamat jedoch nicht möglich ist (Abb. 2.3.), wird das *gltAB*-Operon durch die Zugabe dieser beiden Aminosäuren nicht reprimiert. Es kann daher angenommen werden, daß Glutamat derjenige Effektor von RocG ist, welcher die Interaktion zwischen der GDH und dem Aktivatorprotein GltC stimuliert. Für die bedeutende Rolle von Glutamat bei der Inaktivierung des Regulatorproteins GltC durch RocG gibt es weitere experimentelle Hinweise. In glutamathaltigem Minimalmedium können nur diejenigen C-Quellen (z. B. Glukose oder Fruktose; Tab. 4.2.) das *gltAB*-Operon induzieren, die eine starke CCR ausüben. Unter diesen Bedingungen ist der Effektor von RocG (das Glutamat) zwar vorhanden, die GDH wird jedoch nicht exprimiert. Beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart der weniger bevorzugten C-Quellen, wie z. B. Arabinose oder Glukonat, wird das *gltAB*-Operon nur in Abwesenheit von Glutamat exprimiert, da diese C-Quellen das *rocG*-Gen nicht reprimieren. Unter diesen Bedingungen kann daher RocG durch die Zugabe von Glutamat aktiviert werden und das Regulatorprotein GltC inaktivieren. Für die katabolen GDH’s aus *P. aeruginosa*, *Halobacterium halobium* und *Clostridium symbiosum* konnte *in vitro* gezeigt werden, daß die Aktivitäten dieser Enzyme durch das Substrat Glutamat stimuliert werden (Bonete *et al.*, 1996; Lu & Abdelal, 2001; Hayden & Engel, 2001). Offensichtlich führt die Bindung eines Glutamatmoleküls an eine Untereinheit dieser GDH’s zur Steigerung der Affinität für das Substrat bei den anderen Enzymuntereinheiten. Dieser Regulationsmechanismus wird als positive Kooperativität bezeichnet und könnte möglicherweise auch eine Rolle bei der Interaktion zwischen dem

Aktivatorprotein GltC und RocG spielen. Das in Abb. 5.3. A dargestellte Modell zeigt, daß beim Wachstum von *B. subtilis* in Abwesenheit einer guten Glutamatquelle, wie z. B. Arginin, die GDH nur mäßig aktiv ist, und daher eine geringe Affinität zu GltC aufweist.

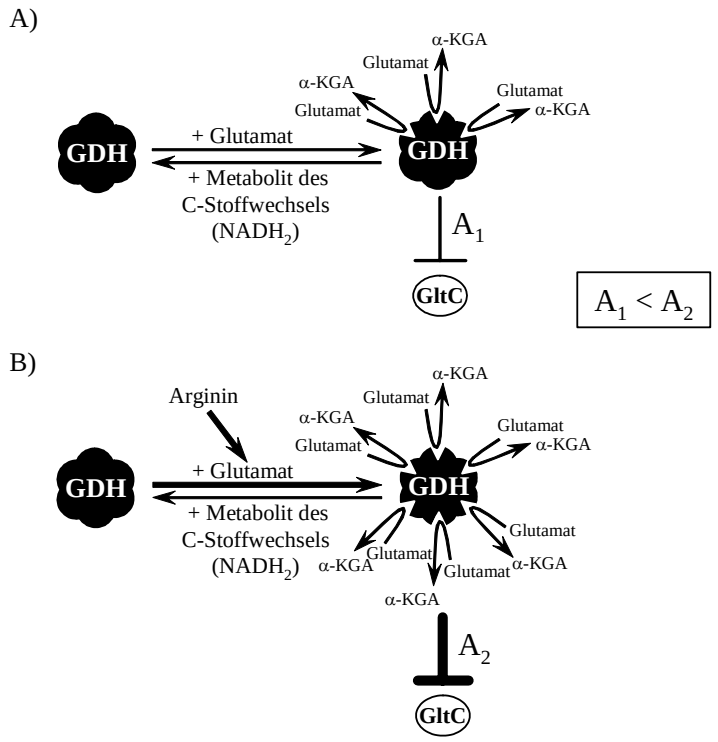

Abb. 5.3. Aktivierung der RocG-GltC-Interaktion durch Glutamat

A) Bei schlechter Glutamatversorgung sind nicht alle RocG-Moleküle aktiv und die Affinität von RocG zu GltC ist niedrig (A_1). Möglicherweise kann RocG durch einen unbekannten Metaboliten (Metabolit des C-Stoffwechsels oder $NADH_2$) allosterisch gehemmt werden.

B) In Gegenwart einer hohen Glutamatkonzentration (z. B. beim Wachstum von *B. subtilis* mit Arginin) sind die meisten RocG-Moleküle aktiv und besitzen eine hohe Affinität (A_2) zu GltC.

Es wäre vorstellbar, daß diejenige Konformation von RocG, die eine Interaktion mit GltC ermöglicht, erst dann stabil ist, wenn *B. subtilis* mit der Aminosäure Arginin wächst. Unter diesen Wachstumsbedingungen wird in der Zelle viel Glutamat gebildet, welches durch die GDH zu α-Ketoglutarat umgewandelt werden kann (Gardan *et al.*, 1997; Abb. 4.4.). Möglicherweise ist die Stabilisierung des aktiven Zustands die Voraussetzung dafür, daß RocG mit dem Aktivatorprotein GltC interagieren kann (Abb. 5.3. B).

Dieses mechanistische Modell der RocG-GltC-Interaktion könnte auch einen anderen interessanten Effekt erklären. Die GOGAT wird in Abwesenheit von Glukose

erstaunlicherweise stark exprimiert, wenn RocG im Wildtypstamm von *B. subtilis* überexprimiert wird (Abschnitt 4.2.6.). Daß die GDH ein ausschließlich kataboles Enzym ist, konnte gezeigt werden (Abschnitt 4.2.1.). Es muß daher angenommen werden, daß bei der Überexpression der GDH viel α-Ketoglutarat gebildet wird, welches die Aktivität von GltC stimuliert. Es wurde bereits vorgeschlagen, daß α-Ketoglutarat das Effektormolekül von GltC ist (Picossi-Goñi *et al.*, 2005). Eine Erklärung dafür, warum bei einer hohen RocG-Menge das Aktivatorprotein GltC durch die GDH nicht inaktiviert werden kann, könnte die Abhängigkeit der RocG-GltC-Interaktion von der Glutamatkonzentration sein. Wie oben vorgeschlagen wurde, unterscheidet sich möglicherweise die Konformation des inaktiven Enzyms von dem Zustand der aktiven GDH (in Abb. 5.3. A und B angedeutet). Bei einer im Vergleich zur Glutamatkonzentration hohen RocG-Menge, würde der Aminogruppendonor Glutamat zwar in α-Ketoglutarat umgewandelt werden, möglicherweise befinden sich jedoch erst bei einer hohen Glutamatkonzentration (z. B. beim Wachstum in Gegenwart von Arginin oder Ornithin) ausreichend viele RocG-Moleküle in dem Konformationszustand, der die Interaktion zwischen der GDH und dem Aktivatorprotein GltC ermöglicht. In der Tat kann bei einer hohen RocG-Menge der reprimierende Einfluß der GDH auf das *gltAB*-Operon durch die Zugabe von Arginin oder Ornithin wiederhergestellt werden (Abschnitt 4.2.1.). Diese Beobachtungen zeigen, daß sowohl die RocG-Menge als auch die Glutamatquelle eine entscheidende Rolle bei der Repression des *gltAB*-Operons spielen.

Die Interaktion zwischen der GDH und dem Aktivatorprotein GltC konnte *in vitro* bisher nicht nachgewiesen werden. Die GDH aus *B. subtilis* ist extrem kältesensitiv und verliert nach ihrer Aufreinigung schnell an enzymatischer Aktivität (Jahns, 1992; Khan *et al.*, 2005). Dies ist vermutlich auch der Grund, warum die Existenz einer enzymatisch aktiven GDH in *B. subtilis* lange Zeit umstritten war (Phibbs & Bernlohr, 1971; Kane *et al.*, 1981). Die experimentellen Ergebisse dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, daß RocG enzymatisch aktiv sein muß, um mit GltC interagieren zu können. Es ist daher essentiell, die Interaktion zwischen RocG und GltC *in vivo* zu untersuchen.

Der Regulationsmechanismus der Inhibition des Aktivatorproteins GltC durch RocG muß jedoch verfeinert werden. Wie in Abschnitt 5.2. bereits erwähnt wurde, kann die *ccpA*-Mutante mit Glukose und Ammonium als C- und N-Quelle (C-Glc-Medium) nicht wachsen, da die GOGAT aufgrund der verringerten Glukoseaufnahme nicht exprimiert wird. Die *ccpA*-Mutante ist daher unter diesen Bedingungen glutamatauxotroph (Faires *et al.*, 1999, Wacker *et al.*, 2003). Die Glutamatauxotrophie der *ccpA*-Mutante ist auf zwei Ursachen

zurückzuführen: Zum einen inaktiviert RocG das Aktivatorprotein GltC und zum anderen ist RocG als kataboles Enzym aktiv, da das *rocG*-Gen nicht durch CcpA reprimiert wird. Die Inaktivierung des *rocG*-Gens ermöglicht der *ccpA*-Mutante das Wachstum in C-Glc-Medium (Commichau *et al.*, 2006b). In einer Suppressormutante, in der die Glukoseaufnahme wiederhergestellt ist (*ccpA ptsH1*-Mutante), kann das *gltAB*-Operon jedoch auch in Anwesenheit einer geringen RocG-Menge durch Glukose induziert werden (Tab. 4.7.; Abb. 4.6.; Ludwig *et al.*, 2002a; Wacker *et al.*, 2003). Aus dieser Beobachtung können zwei Schlußfolgerungen abgeleitet werden: (i) In der *ccpA ptsH1*-Mutante muß die glutamatabbauende Funktion von RocG durch die C-Quelle Glukose inhibiert werden, um das Wachstum mit Glukose und Ammonium zu ermöglichen; (ii) Die bevorzugte C-Quelle Glukose muß die GDH daran hindern, das Regulatorprotein GltC zu inhibieren, damit die GOGAT exprimiert werden kann. Die Inhibition der enzymatischen Aktivität von RocG und die Inhibition des Aktivatorproteins GltC durch RocG in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden C-Quelle sind zwei Effekte, die sich nicht klar voneinander trennen lassen. Die *ccpA ptsH1*-Mutante zeigt jedoch, daß das *gltAB*-Operon auch in Anwesenheit von RocG durch Glukose induziert werden kann. Um den Einfluß der C-Quelle auf die Aktivität von RocG und damit auf die Interaktion zwischen der GDH und GltC zu erklären, könnte man sich folgende Mechanismen vorstellen: (i) Die Aktivität von RocG könnte durch eine kovalente Modifikation reguliert werden; (ii) Möglicherweise inhibiert ein unbekannter Metabolit, welcher bei der Verwertung der C-Quelle Glukose gebildet wird, die Funktion der katabolen GDH.

Für die erste der beiden genannten Möglichkeiten, daß die enzymatischen Aktivitäten von GDH's durch eine Modifikation reguliert werden können, gibt es bereits Hinweise aus anderen Organismen. Bei der Hefe *Candida utilis* konnte gezeigt werden, daß die NAD^+-abhängige GDH in den Mitochondrien durch Phosphorylierung inaktiviert werden kann (Hemmings, 1978 & 1980). Diese Art der Modifizierung von GDH's konnte in prokaryotischen Organismen bisher nicht nachgewiesen werden. Bei der Regulation der Aktivität der mitochondrialen GDH des Menschen und des Rindes spielt die ADP-Ribosylierung eine wichtige Rolle (Herrero-Yraola *et al.*, 2001). Bisher konnte zwar der Nachweis erbracht werden, daß auch Proteine in *S. coelicolor* und *B. subtilis* durch ADP-Ribosylierung modifiziert werden können, der Einfluß dieser Modifikation auf die Funktionen der teilweise nicht identifizierten Proteine im bakteriellen Stoffwechsel ist jedoch noch unverstanden (Huh *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 2002). Die erste der zwei oben genannten

Möglichkeiten, durch die der Einfluß der C-Quelle auf die Aktivität von RocG erklärt werden könnte, konnte nicht bestätigt werden. Sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in anderen Arbeiten konnten keine Hinweise dafür erhalten werden, daß die GDH's in *B. subtilis* modifiziert werden.

Der zweite der oben dargestellten Regulationsmechanismen beinhaltet die Überlegung, daß die Aktivität von RocG möglicherweise durch einen Metaboliten moduliert wird, welcher bei der Verwertung von Glukose gebildet wird. Die C-Quelle könnte dadurch die Glutamatbildung durch die GOGAT indirekt und den Glutamatabbau durch RocG direkt beeinflussen. Offensichtlich kann dieser Metabolit, welcher sowohl den Glutamatabbau durch RocG als auch die Interaktion zwischen GltC und RocG verhindert, in der *ccpA*-Mutante nicht gebildet werden, da diese Mutante keine Glukose aufnehmen kann. Daher wird in der *ccpA*-Mutante das *gltAB*-Operon durch Glukose nicht induziert. Es wäre vorstellbar, daß der negative Effektor von RocG ein Intermediat des C-Stoffwechsels ist. Tatsächlich werden die katabolen GDH's aus *H. halobium, P. aeruginosa* und *B. subtilis* PCI 219 durch Intermediate des TCC inhibiert (Bonete *et al.*, 1996; Lu & Abdelal, 2001; Kimura *et al.*, 1977). In *B. subtilis* 168 kann die Inhibition der GDH durch ein Intermediat des TCC bei der Induktion des *gltAB*-Operons durch Glukose jedoch keine Rolle spielen. Beim Wachstum von *B. subtilis* in Gegenwart von Glukose werden die Gene des TCC und das *rocG*-Gen durch CcpA stark reprimiert (Kim *et al.*, 2002a, 2002b; Blencke *et al.*, 2003, Belitsky *et al.*, 2004). Die Konzentrationen der Metabolite des TCC sollten beim Wachstum mit Glukose somit eher niedrig sein. Bisher konnte das Intermediat des C-Stoffwechsels, das zur Inaktivierung der GDH führt, nicht identifiziert werden (Wacker *et al.*, 2003). Es wäre vorstellbar, daß sich das $NADH_2/NAD^+$-Verhältnis in der Zelle beim Wachstum von *B. subtilis* mit Glukose verändert, und daß das in der Glykolyse gebildete $NADH_2$ durch die Inhibition von RocG sowohl den Glutamatabbau als auch die Interaktion der GDH mit dem Aktivatorprotein GltC verhindert. NAD^+ dient katabolen GDH's als Kofaktor. Es wäre denkbar, daß $NADH_2$ ausschließlich katabole GDH's hemmt. Für die katabole GDH aus *Streptomyces clavuligerus* konnte gezeigt werden, daß das Enzym durch den Kofaktor $NADH_2$ inhibiert wird (Miñambres *et al.*, 2000). Bisher gibt es keine experimentellen Hinweise dafür, wie sich das $NADH_2/NAD^+$-Verhältnis in *B. subtilis* in Abhängigkeit von der C-Quelle verändert. Möglicherweise kann der Einfluß verschiedener Metabolite des C-Stoffwechsels auf die Aktivität von RocG erst klar gezeigt werden, wenn es gelingt, Bedingungen zu finden, um das Enzym *in vitro* genauer charakterisieren zu können.

5.4. Ein Modell zur Regulation des *gltAB*-Operons

Beim Wachstum von *B. subtilis* wird die Transkription des *gltAB*-Operons durch das Aktivatorprotein GltC aktiviert (Bohannon & Sonenshein, 1989; Wacker *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, daß die katabole GDH die Aktivität des Regulatorproteins GltC inhibiert und damit bei der Regulation des *gltAB*-Operons eine sehr wichtige Rolle spielt. In Abwesenheit von RocG aktiviert das Aktivatorprotein GltC das *gltAB*-Operon konstitutiv (Commichau *et al.*, 2006b). Es muß daher angenommen werden, daß der Regulator GltC in seinem Grundzustand ein aktives Protein ist. Das *rocG*-Gen wird im Wildtyp von *B. subtilis* durch Glukose stark reprimiert. Dies geschieht auf zwei Wegen: Zum einen wird das *rocG*-Gen direkt durch das globale Regulatorprotein des C-Stoffwechsels CcpA reprimiert (Belitsky *et al.*, 2004). Zum anderen wird die Expression von RocG indirekt durch die C-Quellen-abhängige Regulation des *sigL*-Gens reguliert (Choi *et al.*, 2005). Das *sigL*-Gen kodiert für den Sigmafaktor σ^L, welcher für die Transkription des *rocG*-Gens benötigt wird (Débarbouillé *et al.*, 1991; Helmann & Moran 2002). Durch das Ausmaß der durch die C-Quelle ausgeübten CCR wird daher in glutamathaltigem Medium indirekt über die RocG-Menge die Expression des *gltAB*-Operons gesteuert (Abb. 5.4.). Dieser Regulationsmechanismus erklärt die direkte Korrelation zwischen der Expression der GOGAT und der durch die jeweilige C-Quelle ausgeübten CCR (Tab. 4.2.). Oben wurde bereits erwähnt, daß in der *rocG*-Mutante das *gltAB*-Operon konstitutiv exprimiert wird. In Abwesenheit von RocG hat jedoch Glutamat in glukosehaltigem Medium auch einen Einfluß auf die Expression der GOGAT. Die Aktivität von GltC wird also nicht nur durch RocG, sondern auch direkt durch Glutamat beeinflußt (Abb. 5.4.). Dies konnte durch *in vitro*-Messungen bestätigt werden (Picossi-Goñi *et al.*, 2005). Mit Hilfe der *ccpA ptsH1*-Mutante kann demonstriert werden, daß das *gltAB*-Operon auch in Anwesenheit einer signifikanten Menge von RocG durch Glukose induziert werden kann.

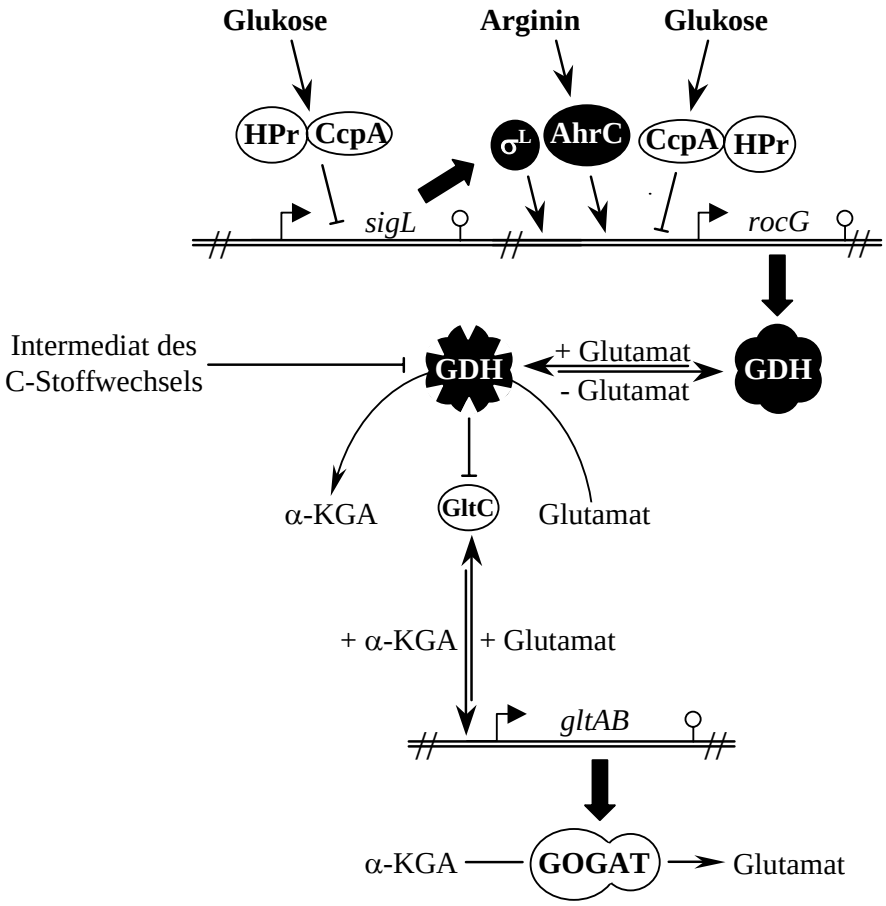

Abb. 5.4. Die komplexe Regulation des *gltAB*-Operons in *B. subtilis*

In Gegenwart von Glukose und Ammonium werden das *rocG*- und das *sigL*-Gen durch CcpA stark reprimiert. Die Verringerung der RocG-Menge in der Zelle bewirkt die Aktivierung der Transkription des *gltAB*-Operons durch das Regulatorprotein GltC. Die C-Quelle kann möglicherweise die Aktivität von RocG auch direkt beeinflussen. Beim Wachstum von *B. subtilis* mit einer guten N-Quelle, wie z. B. Arginin, wird die katabole GDH stark exprimiert und das Enzym kann zusammen mit Glutamat das Aktivatorprotein GltC inaktivieren. Möglicherweise wird die Aktivität von GltC auch *in vivo* durch α-Ketoglutarat und Glutamat beeinflußt. α-KGA = α-Ketoglutarat.

Die Qualität der C-Quelle spielt daher offensichtlich nicht nur eine große Rolle bei der indirekten Regulation des *gltAB*-Operons über das Expressionsniveau von RocG, sondern vermutlich auch bei der direkten Modulation der Aktivität von RocG (Abb. 5.4.). *In vitro* konnte außerdem demonstriert werden, daß α-Ketoglutarat die Bindung von GltC an den *gltAB*-Promotor stimuliert (Picossi-Goñi *et al.*, 2005). Die C-Quelle aktiviert daher

vermutlich nicht nur durch die Inhibition der GDH sowie die Repression des *rocG*-Gens indirekt die Expression der GOGAT, sondern auch durch die Stimulation von GltC (Abb. 5.4.).

In dieser Arbeit konnte weiterhin herausgearbeitet werden, daß die Glutamatquelle eine wichtige Rolle bei der Regulation des *gltAB*-Operons durch die GDH spielt. Um ein vollständiges Modell der Regulation des *gltAB*-Operons zu entwickeln, kann die Regulation des *gltAB*-Operons (wie in Abschnitt 5.3. diskutiert) nicht durch eine einfache Interaktion zwischen dem Aktivatorprotein und der katabolen GDH RocG erklärt werden. Beim Wachstum von *B. subtilis* mit einer guten Glutamatquelle, wie z. B. Arginin, wird die GOGAT nicht exprimiert. RocG interagiert mit GltC und hindert das Aktivatorprotein daran die Transkription des *gltAB*-Operons zu aktivieren. Die Interaktion zwischen RocG und GltC kann jedoch nur stattfinden, wenn die GDH durch Glutamat aktiviert ist bzw. Glutamat abbaut. Daher kann auch bei einer hohen RocG-Menge in der Zelle die GOGAT exprimiert werden. Das *gltAB*-Operon wird also synergistisch durch RocG und den Aminogruppendonor Glutamat verhindert. Im Gegensatz zu den Enterobakterien, in denen das Verhältnis von Glutamin zu α-Ketoglutarat eine wichtige Rolle bei der Regulation des N-Stoffwechsels spielt, wird in *B. subtilis* der Glutamatstoffwechsel vermutlich durch das Verhältnis von Glutamat zu α-Ketoglutarat reguliert (Hu *et al.*, 1999; Fisher, 1999; Reitzer, 2003). Insbesondere die Aktivität der bifunktionalen GDH wird vermutlich durch diese Metaboliten gesteuert, wodurch direkt Einfluß auf die Expression des einzigen glutamatbildenden Enzyms in *B. subtilis*, die GOGAT, genommen wird. Dieser effiziente und aufgrund der geringen Anzahl regulatorischer Komponenten optimierte Regulationsmechanismus sorgt dafür, daß *B. subtilis* auch bei starken Schwankungen des Nährstoffangebots ausreichend Glutamat, dem wichtigsten Aminogruppendonor der Zelle synthetisieren kann.

5.5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern eindeutige Hinweise dafür, daß das Aktivatorprotein GltC des *gltAB*-Operons durch die katabole GDH inhibiert werden kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß RocG das Aktivatorprotein nur dann inaktivieren kann, wenn *B. subtilis* mit einer guten Glutamatquelle wächst. Um die Vermutung zu bestätigen,

daß RocG direkt mit GltC interagieren zu können, ist es zwingend erforderlich, die Interaktion zwischen der GDH und dem Aktivatorprotein zu zeigen.

Neben dem Nachweis der Protein-Protein-Interaktion sollte außerdem gezeigt werden, daß durch die Inhibition von GltC durch RocG, das Aktivatorprotein daran gehindert wird, die Transkription des *gltAB*-Operons zu aktivieren. Für den Nachweis der Aktivierung der Transkription des *gltAB*-Operons durch GltC würden sich Footprintanalysen anbieten. Um die Interaktion zwischen RocG und GltC besser verstehen zu können, muß versucht werden, diese Interaktion *in vitro* zu zeigen. Es könnte dann versucht werden, den Einfluß der C-Quelle auf die Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Abbott, J. und D. Beckett. 1993. Cooperative binding of the *Escherichia coli* repressor of biotin biosynthesis to the biotin operator sequence. Biochemistry **32**: 9649-9656.

Abrahams, G. L. und V. R. Abratt. 1998. The NADH-dependent glutamate dehydrogenase enzyme of *Bacteroides fragilis* Bf1 is induced by peptides in the growth medium. Microbiology **144**: 1659-1667.

Ali, N. O., J. Jeusset, E. Larquet, E. Le Cam, B. Belitsky, A. L. Sonenshein, T. Msadek und M. Débarbouillé. 2003. Specificity of the interaction of RocR with the *rocG-rocA* intergenic region in *Bacillus subtilis*. Microbiology **149**: 739-750.

Araujo, A. und O. P. Ward. 1990. Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactanases. J Appl Bacteriol **68**: 253-261.

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

Atkinson, M. R. und S. H. Fisher. 1991. Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **173**: 23-27.

Atkinson, M. R. und A. J. Ninfa. 1998. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **32**: 431-447.

Bachem, S. und J. Stülke. 1998. Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the phosphotransferase system. J Bacteriol **180**: 5319-5326.

Bacher, A., S. Eberhardt, M. Fischer, K. Kis und G. Richter. 2000. Biosynthesis of vitamin B_2 (riboflavin). Annu Rev Nutr **20**: 153-167.

Barak, I., E. Ricca und S. M. Cutting. 2005. From fundamental studies of sporulation to applied spore research. Mol Microbiol **55**: 330-338.

Barker, D. F. und A. M. Campbell. 1981. The *birA* gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. J Mol Biol **146**: 451-467.

Baumberg, S. und C. R. Harwood. 1979. Carbon and nitrogen repression of arginine catabolic enzymes in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **137**: 189-196.

Beijer, L. und L. Rutberg. 1992. Utilization of glycerol and glycerol-3-phosphate is differently affected by the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett **79**: 217-220.

Beinert, H., M. C. Kennedy und C. D. Stout. 1996. Aconitase as ironminus signsulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. Chem Rev **96**: 2335-2374.

Belitsky, B. 2002. Biosynthesis of Amino Acids of the Glutamate and Aspartate Families, Alanine, and Polyamines. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Genes to Cells*, ASM Press, Washington, D.C. pp. 203-231.

Belitsky, B. R., P. J. Janssen und A. L. Sonenshein. 1995. Sites required for GltC-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase expression. J Bacteriol **177**: 5686-5695.

Belitsky, B. R., H. J. Kim und A. L. Sonenshein. 2004. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. J Bacteriol **186**: 3392-3398.

Belitsky, B. R. und A. L. Sonenshein. 1995. Mutations in GltC that increase *Bacillus subtilis gltA* expression. J Bacteriol **177**: 5696-5700.

Belitsky, B. R. und A. L. Sonenshein. 1997. Altered transcription activation specificity of a mutant form of *Bacillus subtilis* GltR, a LysR family member. J Bacteriol **179**: 1035-1043.

Belitsky, B. R. und A. L. Sonenshein. 1998. Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. J Bacteriol **180**: 6298-6305.

Belitsky, B. R. und A. L. Sonenshein. 1999. An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 10290-10295.

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

Belitsky, B. R. und A. L. Sonenshein. 2004. Modulation of activity of *Bacillus subtilis* regulatory Proteins GltC and TnrA by glutamate dehydrogenase. J Bacteriol **186**: 3399-3407.

Bertram, R., A. Wünsche, M. Sprehe und W. Hillen. 2006. Regulated expression of HPrK/P does not affect carbon catabolite repression of the *xyn* operon of *rocG* in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett **259**: 147-152.

Bischoff, D. S. und G. W. Ordal. 1992. *Bacillus subtilis* chemotaxis: a deviation from the *Escherichia coli* paradigm. Mol Microbiol **6**: 23-28.

Blencke, H. M. 2001. Genregulation des Zitronensäure-Zyklus in *Bacillus subtilis* als Spiegel der katabolen und anabolen Funktionen. Diplomarbeit. Universität-Erlangen-Nürnberg.

Blencke, H. M. 2004. Die Regulation der zentralen Stoffwechselwege in *Bacillus subtilis*. Doktorarbeit. Universität Erlangen-Nürnberg.

Blencke, H. M., G. Homuth, H. Ludwig, U. Mäder, M. Hecker und J. Stülke. 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. Metab Eng **5**: 133-149.

Blencke, H. M., I. Reif, F. M. Commichau, C. Detsch, I. Wacker, H. Ludwig und J. Stülke. 2006. Regulation of *citB* expression in *Bacillus subtilis*: integration of multiple metabolic signals in the citrate pool and by the general nitrogen regulatory system. Arch Microbiol **185**: 136-146.

Bohannon, D. E., M. S. Rosenkrantz und A. L. Sonenshein. 1985. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source. J. Bacteriol **163**: 957-964.

Bohannon, D. E. und A. L. Sonenshein. 1989. Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **171**: 4718-4727.

Bonete, M. J., F. Perez-Pomares, J. Ferrer und M. L. Camacho. 1996. NAD-glutamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium*: inhibition and activation by TCA intermediates and amino acids. Biochim Biophys Acta **1289**: 14-24.

Bower, S., J. Perkins, R. R. Yocum, P. Serror, A. Sorokin, P. Rahaim, C. L. Howitt, N. Prasad, S. D. Ehrlich und J. Pero. 1995. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis birA* gene product encoding a repressor of the biotin operon. J Bacteriol **177**: 2572-2575.

Boylan, S. A., A. R. Redfield, M. S. Brody und C. W. Price. 1993. Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **175**: 7931-7937.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254.

Brown, E. D. und J. M. Wood. 1992. Redesigned purification yields a fully functional PutA protein dimer from *Escherichia coli*. J Biol Chem **267**: 13086-13092.

Brown, S. W. und A. L. Sonenshein. 1996. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis glnRA* operon. J Bacteriol **178**: 2450-2454.

Buck, M., M.-T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo und J. D. Gralla. 2000. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^{N}) transcription factor. J Bacteriol **182**: 4129-4136.

Calogero, S., R. Gardan, P. Glaser, J. Schweizer, G. Rapoport und M. Débarbouillé. 1994. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. J Bacteriol **176**: 1234-1241.

Castillo, A., H. Toboada, A. Mendoza, B. Valderrama, S. Encarnacion und J. Mora. 2000. Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli*. Microbiology **146**: 1627-1637.

Chalumeau, H., A. Delobbe und P. Gay. 1978. Biochemical and genetic study of D-glucitol transport and catabolism in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **134**: 920-928.

Chatterjee, A. N. und J. T. Park. 1964. Biosynthesis of cell wall mucopeptide by a particulate fraction from *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 9-16.

Chávez, S., J. M. Lucena, J. C. Reyes, F. J. Florencio und P. Candau. 1999. The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions. J Bacteriol **181**: 808-813.

Choi, S. K. und M. H. Saier, Jr. 2005. Regulation of *sigL* expression by the catabolite control protein CcpA involves a road block mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. J Bacteriol **187**: 6856-6861.

Commichau, F. M., K. Forchhammer und J. Stülke. 2006a. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. Curr Opin Microbiol **9**: 167-172.

Commichau, F. M., I. Wacker, J. Schleider, H. M. Blencke, I. Reif, P. Tripal und J. Stülke. 2006b. Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. J Mol Microbiol Biotechnol *in press*.

Craig, L. C., H. M. Keith und J. W. Kernohan. 1949. Purity studies on polypeptide antibiotics: bacitracin. J Clin Invest **28**: 1014-1017.

Cronan, J. E., Jr. 1989. The *E. coli bio* operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. Cell **58**: 427-429.

Cronan, J. E., Jr. und G. L. Waldrop. 2002. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. Prog Lipid Res **41**: 407-435.

Cruz-Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser und D. Jahn. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. J Bacteriol **182**: 3072-3080.

Curtis, T. P. und W. T. Sloan. 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. Curr Opin Microbiol **7**:221-226.

Czaplewski, L. G., A. K. North, M. C. Smith, S. Baumberg und P. G. Stockley. 1992. Initial characterization of AhrC: the regulator of arginine metabolism genes in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **6**: 267-275.

Dahl, M . K., D. Schmiedel und W. Hillen. 1995. Glucose and glucose-6-phosphate interaction with XylR repressor proteins from *Bacillus* ssp. May contribute to regulation of xylose utilization. J Bacteriol **177**: 5467-5472.

Débarbouillé, M., I. Martin-Verstraete, F. Kunst und G. Rapoport. 1991. The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 9092-9096.

Deshpande, K. L. und J. F. Kane. 1980. Glutamate synthase from *Bacillus subtilis*: in vitro reconstitution of an active amidotransferase. Biochem Biophys Res Commun **93**: 308-314.

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

Deuel, T. F. und S. Prusiner. 1974. Regulation of glutamine synthetase from *Bacillus subtilis* by divalent cations, feedback inhibitors, and L-glutamine. J Biol Chem **249**: 257-264.

Deutscher, J., **R. Herro, A. Bourand, I. Mijakovic und S. Poncet.** 2005. P-Ser-HPr—A linke between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. Biochim Biophys Acta **1754**: 118-125.

Deutscher, J., E. Küster, U. Bergstedt, V. Charrier und W. Hillen. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. Mol Microbiol **15**: 1049-1053.

Deutscher, J., J. Reizer, C. Fischer, A. Galinier, M. H. Saier, Jr. und M. Steinmetz. 1994. Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrierprotein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **176**: 3336-3344.

Doan, T. und S. Aymerich. 2003. Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate. Mol Microbiol **47**: 1709-1721.

Dubnau, D., C. Goldwaithe, I. Smith und J. Marmur. 1967. Genetic mapping in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol **27**: 163-185.

Durand, A. und M. Merrick. 2006. *In vitro* analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. J Biol Chem *in press*.

Eisenstein, E. und D. Beckett. 1999. Dimerization of the *Escherichia coli* biotin repressor: corepressor function in protein assembly. Biochemistry **38**: 13077-13084.

Faires, N., S. Tobisch, S. Bachem, I. Martin-Verstraete, M. Hecker und J. Stülke. 1999. The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. J Mol Microbiol Biotechnol **1**: 141-148.

Fillinger, S., S. Boschi-Müller, S. Azza, E. Dervyn, G. Branlant und S. Aymerich. 2000. Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. J Biol Chem **275**: 14031-14037.

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

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

Fisher, S. H. und M. Débarbouillé. 2002. Nitrogen Source Utilization and Its Regulation. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. *Bacillus subtilis and Its Closest Realtives: from Genes to Cells*, ASM Press, Washington, D.C. pp. 181-191.

Fisher, S. H., M. S. Rosenkrantz und A. L. Sonenshein. 1984. Glutamine synthetase gene of *Bacillus subtilis*. Gene **32**: 427-438.

Foster, J. W., Y. K. Park, T. Penfound, T. Fenger und M. P. Spector. 1990. Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional *nadR* regulator and the *nadA-pnuC* operon. J Bacteriol **172**: 4187-4196.

Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier und G. Rapoport. 1987. *Bacillus subtilis* sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: Expression in *Escherichia coli* and homology to enzymes II from enteric bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A **84**: 8773-8777.

Friden, H., L. Rutberg, K. Magnusson und L. Hederstedt. 1987**.** Genetic and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* mutants defective in expression and function of cytochrome b-558. Eur J Biochem **168**: 695-701.

Fujita, Y., T. Fujita, Y. Miwa, J. Nihashi und Y. Aratani. 1986. Organisation and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **261**:13744-13753.

Fujita, Y., Y. Miwa, A. Galinier und J. Deutscher. 1995. Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt* cis-acting catabolite- responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl- phosphorylated HPr. Mol Microbiol **17**: 953-960.

Galinier, A., J. Deutscher und I. Martin-Verstraete. 1999. Phosphorylation of either Crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. J Mol Biol **286**: 307-314.

Galinier, A., J. Haiech, M. C. Kilhoffer, M. Jaquinod, J. Stülke, J. Deutscher und I. Martin-Verstraete. 1997. The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 8439-8444.

Gardan, R., G. Rapoport und M. Débarbouillé. 1995. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol **249**: 843-856.

Gardan, R., G. Rapoport und M. Débarbouillé. 1997. Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **24**: 825-837.

Gardner, A. L. und A. I. Aronson. 1984. Expression of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene in Escherichia coli. J Bacteriol 158: 967-971.

Garrity, L. F., S. L. Schiel, R. Merrill, J. Reizer, M. H. Saier, Jr. und G. W. Ordal. 1998. Unique regulation of carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis* by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein McpC. J Bacteriol **180**: 4475-4480.

Gonzy-Treboul, G., J. H. de Waard, M. Zagorec und P. W. Postma. 1991. The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for EII^{Glc} and $EIII^{Glc}$ domains. Mol Microbiol **5**: 1241-1249.

Gonzy-Treboul, G., M. Zagorec, M. C. Rain-Guion und M. Steinmetz. 1989. Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. Mol Microbiol **3**: 103-112.

Görke, B. 2003. Regulation of the *Escherichia coli* antiterminator protein BglG by phosphorylation at multiple sites and evidence for transfer of phosphoryl groups between monomers. J Biol Chem **278**: 46219-46229.

Görke, B., L. Fraysse und A. Galinier. 2004. Drastic differences in Crh and HPr synthesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **186**: 2992-2995.

Grundy, F. J., D. A. Waters, S. H. Allen und T. M. Henkin. 1993. Regulation of th *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. J Bacteriol **175**: 7348-7355.

Guérout-Fleury, A. M., K. Shazand, N. Frandsen und P. Stragier. 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. Gene **167**: 335-336.

Gu, D., **Y. Zhou, V. Kallhoff, B. Baban, J. J. Tanner und D. F. Becker.** 2004. Identification and characterization of the DNA-binding domain of the multifunctional PutA flavoenzyme. J Biol Chem **279**: 31171-31179.

Hanson, K. G., K. Steinhauer, J. Reizer, W. Hillen und J. Stülke. 2002. HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. Microbiology **148**: 1805-1811.

Hayden, B. M. und P. C. Engel. 2001. Construction, separation and properties of hybrid hexamers of glutamate dehydrogenase in which five of six subunits are contributed by the catalytically inert D165S. Eur J Biochem **268**: 1173-1180.

Hemmilä, I. A. und P. I. Mäntsälä. 1978. Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. Biochem J **173**: 45-52.

Hecker, M., W. Schumann und U. Völker. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **19**: 417-428.

Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? J Bacteriol **176**: 4664-4668.

Helling, R. B. 1998. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol **180**: 4571-4575.

Helling, R. B. 2002. Speed versus efficiency in microbial growth and the role of parallel pathways. J Bacteriol **184**: 1041-1045.

Helmann, J. D. und C. P. Moran, Jr. 2002. RNA polymerase and sigma factors. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Genes to Cells*, ASM Press, Washington, D.C. pp. 289-312.

Helmann, J. D., M. F. Wu, P. A. Kobel, F. J. Gamo, M. Wilson, M. M. Morshedi, M. Navre und C. Paddon. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. J Bacteriol **183**: 7318-7328.

Hemmings, B. A. 1978. Phosphorylation of NAD-dependent glutamate dehydrogenase from yeast. J Biol Chem **253**: 5255-5258.

Hemmings, B. A. 1980. Purification and properties of the phosphor and the dephospho forms of yeast NAD-dependent glutamate dehydrogenase. J Biol Chem **255**: 7925-7932.

Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo und J. C. Wallace. 1988. A large family of bacterial activator proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **85**: 6602-6606.

Henkin, T. M. 1996. The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett **135**: 9-15.

Henkin, T. M., F. J. Grundy, W. L. Nicholson und G. H. Chambliss. 1991. Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the Escherichia coli *lacI* and *galR* repressors. Mol Microbiol **5**: 575-584.

Herrero-Yraola, A., S. M. Bakhit, P. Franke, C. Weise, M. Schweiger, D. Jorcke und M. Ziegler. 2001. Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. EMBO J **20**: 2404-2412.

Herro, R., S. Poncet, P. Cossart, C. Buchrieser, E. Gouin, P. Glaser und J. Deutscher. 2005. How seryl-phosphorylated HPr inhibits PfrA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. J Mol Microbiol Biotechnol **9**: 2224-2234.

Holley, E. A., M. P. Spector und J. W. Foster. 1985. Regulation of NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: expression of *nad-lac* gene fusions and identification of a *nad* regulatory locus. J Gen Microbiol **131**: 2759-2770.

Huh, J. W., J. Shima und K. Ochi. 1996. ADP-Ribosylation of proteins in *Bacillus subtilis* and ist possible importance in sporulation. J Bacteriol **178**: 4935-4941.

Hu, P., T. Leighton, G. Ishkhanova und S. Kustu. 1999. Sensing of nitrogen limitation by *Bacillus subtilis*: comparison to enteric bacteria. J Bacteriol **181**: 5042-5050.

Ikeda, T. P., A. E. Shauger und S. Kustu. 1996. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. J Mol Biol **259**: 589-607.

Jacob, S., R. Allmansberger, D. Gärtner und W. Hillen. 1991. Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of

transcription and depends of a *cis* site in the *xylA* reading frame. Mol Gen Genet **229**: 189-196.

Jahns, T. 1992. Occurrence of cold-labile NAD-specific glutamate dehydrogenases in *Bacillus* species. FEMS Microbiol Lett **75**: 187-192.

Jeffrey, C. J. 1999. Moonlighting proteins. Trends Biochem Sci **24**: 8-11.

Jeffrey, C. J. 2003. Multifunctional proteins: examples of gene sharing. Ann Med **35**: 28-35.

Jeffrey, C. J. 2004. Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. Curr Opin Struct Biol **14**: 663-668.

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

Jones, B. E., V. Dossonnet, E. Küster, W. Hillen, J. Deutscher und R. E. Klevit. 1997. Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. J Biol Chem **272**: 26530-26535.

Jordan, S., A. Junker, J. D. Helmann und T. Mascher. 2006. Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. J Bacteriol **188**: 5153-5166.

Kanamori, K., R. L. Weiss und J. D. Roberts. 1987. Ammonium assimilation in *Bacillus polymyxa*. ^{15}N NMR and enzymatic studies. J Biol Chem **262**: 11038-11045.

Kane, J. F. und K. L. Deshpande. 1979. Properties of glutamate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. Biochem Biophys Res Commun **88**: 761-767.

Kane, J. F., Wakim und S. H. Fisher. 1981. Regulation of glutamate dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **148**: 1002-1005.

Khan, M. I., K. Ito, H. Kim, H. Ashida, T. Ishikawa, H. Shibata und Y. Sawa. 2005. Molecular properties and enhancement of thermostability by random mutagenesis of glutamate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem **69**: 1861-1870.

Kiley, P. J. und H. Beinert. 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol **6**: 181-185.

Kim, C. H. und T. C. Hollocher. 1982. ^{13}N isotope studies on the pathway of ammonia assimilation in *Bacillus megaterium* and *Escherichia coli*. J Bacteriol **151**: 358-366.

Kim, H. J., C. Jourlin-Castelli, S. I. Kim und A. L. Sonenshein. 2002a. Regulation of *Bacillus subtilis ccpC* gene by CcpA and CcpC. Mol Microbiol **43**: 399-410.

Kim, S. I., C. Jourlin-Castelli, S. R. Wellington und A. L. Sonenshein. 2003. Mechanism of repression by Bacillus subtilis CcpC, a LysR family regulator. J Mol Biol **334**: 609-624.

Kim, H. J., A. Roux und A. L. Sonenshein. 2002b. Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. Mol Microbiol **45**: 179-90.

Kimura, K., A. Miyakawa, T. Imai und T. Sasakawa. 1977. Glutamate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* strain PCI 219. I. Purification and properties. J Biochem (Tokyo) **81**: 467-476.

Klingel, U., C. M. Miller, A. K. North, P. G. Stockley und S. Baumberg. 1995. A binding site for activation by the *Bacillus subtilis* AhrC protein, a repressor/activator of arginine metabolism. Mol Gen Genet **248**: 329-340.

Kraus, A., C. Hueck, D. Gärtner und W. Hillen. 1994. Catabolite repression of *Bacillus subtilis xyl* operon involves a *cis* element functional in context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. J Bacteriol **176**: 1738-1745.

Kraus, A., E. Küster, A. Wagner, K. Hoffmann und W. Hillen. 1998. Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. Mol Microbiol **30**: 955-963.

Krawitt, E. L. und J. R. Ward. 1963. L phase variants related to antibiotic inhibition of cell wall biosynthesis. Proc Soc Exp Biol Med **114**: 629-631.

Krüger, S., J. Stülke und M. Hecker. 1993. Catabolite repression of beta-glucanase synthesis in *Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol **139 (Pt 9)**: 2047-2054.

Kunin, C. M. 1967. Nephrotoxicity of antibiotics. JAMA **202**: 204-208.

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature **390**: 249-256.

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

Lee, Y. H., S. Nadaraia, D. Gu, D. F. Becker und J. J. Tanner. 2003. Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. Nat Struct Biol **10**: 109-114.

Lee, C. R., B. M. Koo, S. H. Cho, Y. J. Kim, M. J. Yoon, A. Peterkofsky und Y. J. Soek. 2005. Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. Mol Microbiol **58**: 334-344.

Lengeler, J. W. und A. P. Vogler. 1989. Molecular mechanisms of bacterial chemotaxis towards PTS-carbohydrates. FEMS Microbiol Rev **5**: 81-92.

Lepesant-Kejzlarova, J., J. A. Lepesant, J. Walle, A. Billault und R. Dedonder. 1975. Revision of the linkage map of *Bacillus subtilis* 168: indications of circularity of the chromosome. J Bacteriol **121**: 823-834.

Leyva-Vazquez, M. A. und P. Setlow. 1994. Cloning and nucleotide sequences of the genes encoding triose phosphate isomerase, phosphoglycerate mutase, and enolase from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **176**: 3903-3910.

Lidner, C., **J. Stülke und M. Hecker.** 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. Microbiology 140: 753-757.

Lu, C. D. und A. T. Abdelal. 2001. The *gdhB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an arginine-inducible NAD^+-dependent glutamate dehydrogenase which is subject to allosteric regulation. J Bacteriol **183**: 490-499.

Ludwig, H., G. Homuth, M. Schmalisch, F. M. Dyka, M. Hecker und J. Stülke. 2001. Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. Mol Microbiol **41**: 409-422.

Ludwig, H., C. Meinken, A. Matin und J. Stülke. 2002b. Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis ccpA* mutant. J Baceriol **184**: 5174-5178.

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

Magasanik, B. 1989. Regulation of transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* by protein phosphorylation. Biochimie **71**: 1005-1012.

Maloy, S. R. und J. R. Roth. 1983. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: characterization of *put::Mu* d(Ap, lac) operon fusions. J Bacteriol **154**: 561-568.

Maloy, S. R. und V. Stewart. 1993. Autogenous regulation of gene expression. J Bacteriol **175**: 307-316.

Marino, M., **T. Hoffmann, R. Schmid, H. Mobitz und D. Jahn**. 2000. Changes in protein synthesis during adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. Microbiology **146**: 97-105.

Martin, I., M. Débarbouillé, E. Ferrari, A. Klier und G. Rapoport. 1987. Characterization of the levanase gene o *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. Mol Gen Genet **208**: 177-184.

Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier und G. Rapoport. 1992. Mutagenesis of the *Bacillus subtilis* "-12, -24" promoter of the levanase operon and evidence for the existence of an upstream activating sequence. J Mol Biol **226**:85-99.

Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier und G. Rapoport. 1994. Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. J Mol Biol **241**: 178-192.

Matsuoka, K. und K. Kimura. 1986. Glutamate synthase from *Bacillus subtilis* PCI 219. J Biochem (Tokyo) 99: 1087-1100.

Meers, J. L. und L. K. Pedersen. 1972. Nitrogen assimilation of *Bacillus licheniformis* organisms growing in chemostat cultures. J Gen Microbiol **70**: 277-286.

Menzel, R. und J. Roth. 1981a. Purification of the *putA* gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. J Biol Chem **256**: 9755-9761.

Menzel, R. und J. Roth. 1981b. regulation of the genes for proline utilization in *Salmonella typhimurium*: autogenous repression by the *putA* gene product. J Mol Biol **148**: 21-44.

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

Miller, C. M., S. Baumberg und P. G. Stockley. 1997. Operator interactions by the *Bacillus subtilis* arginine repressor/activator, AhrC: novel positioning and DNA-mediated assembly of a transcriptional activator at catabolic sites. Mol Microbiol **26**: 37-48.

Miñambres, B., E. R. Olivera, R. A. Jensen und J. M. Luengo. 2000. A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. J Biol Chem **275**: 39529-39542.

Miwa, Y., K. Nagura, S. Eguchi, H. Fukuda, J. Deutscher und Y. Fujita. 1997. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. Mol Microbiol **23**: 1203-1213.

Mogk, A., G. Homuth, C. Scholz, L. Kim, F. X. Schmid und W. Schumann. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. Embo J **16**: 4579-4590.

Monod, J. 1942. Recherches sur la croissane des cultures bactérienne. Thesis. University of Paris, France.

Moore, B. 2004. Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. Trends Plant Sci **9**: 221-228.

Mountain, A., und S. Baumberg. 1980. Map locations of some mutations conferring resistance to arginine hydroxamate in *Bacillus subtilis* 168. Mol Gen Genet **178**: 691-701.

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

Ninfa, A. J. und Jiang. 2005. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. Curr Opin Microbiol **8**: 168-173.

Ostrovsky de Spicer, P. und S. Maloy. 1993. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 4295-4298.

Pfeiffer, T., S. Schuster und S. Bonhoeffer. 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. Science **292**: 504-507.

Phibbs, P. V., Jr., und R. W. Bernlohr. 1971. Purification, properties, and regulation of glutamic dehydrogenase of *Bacillus licheniformis*. J Bacteriol **106**: 375-385.

Picossi-Goñi, S., B. R. Belitsky und A. L. Sonenshein. 2005. Use of *Geobacillus stearothermophilus* GltC to study the regulation of *Bacillus subtilis gltAB* genes. 13rd international conference on bacilli. San Diego, California, USA.

Pierce, J. A., C. R. Robertson und T. J. Leighton. 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog **8**: 211-218.

Postma, P. W., J. W. Lengeler und G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol Rev **57**: 543-594.

Powell, B. S., D. L. Court, T. Inada, Y. Nakamura, V. Michotey, X. Cui, A. Reizer, M. H. Saier, Jr. und J. Reizer. 1995. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIA^{Ntr} affects growth on

organic nitrogen and the conditional lethality of an *era*^{ts} mutant. J Biol Chem **270**: 4822-4839.

Preiss, T. A. und R. N. Lightowlers. 1993. Post-transcriptional regulation of tissue-specific isoforms. A bovine cytosolic RNA-binding protein, COLBP, associates with messenger RNA encoding the liver-form isopeptides of cytochrome c oxidase. J Biol Chem **268**: 10659-10667.

Preiss, T., **A. E. Sang, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers und R. N. Lightowlers.** 1995. The mRNA-binding protein COLBP is glutamate dehydrogenase. FEBS Lett **367**: 291-296.

Presecan-Siedel, E., A. Galinier, R. Login, J. Deutscher, A. Danchin, P. Glaser und I. Martin-Verstraete. 1999. Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **181**: 6889-6897.

Rabus, R., J. Reizer, I. Paulsen und M. H. Saier, Jr. 1999. Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. J Biol Chem **274**: 26185-26191.

Raffaelli, N., **T. Lorenzi, P. L. Mariani, M. Emanuelli, A. Amici, S. Ruggieri und G. Magni**. 1999. The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. J Bacteriol **181**: 5509-5511.

Ramström, H., S. Sanglier, E. Leize-Wagner, C. Philippe, A. Van Dorsselaer und J. Haiech. 2003. Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **278**: 1174-1185.

Reif, I. 2004. Regulation der Glutamatsynthese in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Universität Erlangen-Nürnberg.

Reitzer, L. und B. L. Schneider. 2001. Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54}-dependent genes in *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev **65**: 422-44.

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

Reizer, J., A. Reizer, M. H. Saier, Jr. und G. R. Jacobson. 1992. A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. Protein Sci **1**: 722-726.

Reizer, J., C. Hoischen, F. Titgemeyer, C. Rivolta, R. Rabus, J. Stülke, D. Karamata, M. H. Saier, Jr. und W. Hillen. 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. Mol Microbiol **27**: 1157-1169.

Reizer, J., S. Bachem, A. Reizer, M. Arnaud, M. Saier, Jr., und J Stülke. 1999. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis – the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. Microbiology **145**: 3419-3429.

Rhee, S. G., P. B. Chock und E. R. Stadtmann. 1989. Regulation of *Escherichia coli glutamine synthetase*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **62**: 37-92.

Rodionov, D. A., A. A. Mironov und M. S. Gelfand. 2002. Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in eubacteria and archaea. Genome Res **12**: 1507-1516.

Rosenkrantz, M. S., D. W. Dingman und A. L. Sonenshein. 1985. *Bacillus subtilis citB* gene is regulated synergistically by glucose and glutamine. J Bacteriol **164**: 155-164.

Saier, M. H., Jr. 1989. Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phophoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. Microbiol Rev **53**: 109-120.

Saier, M. H., Jr. 1998. Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. Biotechnol Bioeng **58**: 170-174.

Saier, M. H., Jr., S. R. Goldman, R. R. Maile, M. S. Moreno, W. Weyler, N. Yang, und I. T. Paulsen. 2002. Overall transport capabilities of *Bacillus subtilis*. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Genes to Cells*, ASM Press, Washington, D.C. pp. 113-128.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2. Edition. Cold Spring Harbour, N.Y.: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A **74**: 5463-7.

Sá-Nogueira, I., T. V. Nogueira, S. Soares und H. de Lencastre. 1997. The *Bacillus subtilis* L-arabinose (*ara*) operon nucleotide sequence, genetic organisation and expression. Microbiology **143**: 957-969.

Satomura, T., D. Shimura, K. Asai, Y. Sadaie, K. Hirooka und Y. Fujita. 2005. Enhancement of glutamine utilization in *Bacillus subtilis* through the GlnK-GlnL two-component regulatory system. J Bacteriol 187: 4813-4821.

Scarpulla, R. C. und R. L. Soffer. 1978. Membrane-bound proline dehydrogenase from *Escherichia coli*. Solubilization, purification, and characterization. J Biol Chem **253**: 5997-6001.

Schell, M. A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol **47**: 597-626.

Schilling, O., O. Frick, C. Herzberg, A. Ehrenreich, E. Heinzle, C. Wittmann und J. Stülke. 2006. Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: Transcription regulation is important but not sufficient for metabolic adaptation. Appl Environ Microbiol *eingereicht*.

Schirmer, F., S. Ehrt und W. Hillen. 1997. Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. J Bacteriol **179**: 1329-1336.

Schmalisch, H. M., S. Bachem und J. Stülke. 2003. Control of the *Bacillus subtilis* antiterminator protein GlcT by phosphorylation. Elucidation of the phosphorylation chain leading to inactivation of GlcT. J Biol Chem **278**: 51108-51115.

Schmalisch, H. M. 2004. Regulation der Glucoseaufnahme und -verwertung in *Bacillus subtilis* durch reversible Phosphorylierungen. Doktorarbeit. Universität Erlangen-Nürnberg.

Schönert, S., S. Seitz, H. Krafft, E. A. Feuerbaum, I. Andernach, G. Witz und M. K. Dahl. 2006. Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **188**: 3911-3922.

Schreier, H. J. 1993. Biosynthesis of glutamine and glutamate and the assimilation of ammonia. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics*, ASM Press, Washington, D.C. pp. 281-298.

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

Schreier, H. J. und A. L. Sonenshein. 1986. Altered regulation of the *glnA* gene in glutamine synthetase mutants of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **167**: 35-43.

Schumacher, M. A., G. S. Allen, M. Diel, G. Seidel, W. Hillen und R. G. Brennan. 2004. Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. Cell **118**: 731-741.

Seidel, G., **M. Diel, N. Fuchsbauer und W. Hillen.** 2005. Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. FEBS J **272**: 2566-2577.

Serio, A. W., K. B. Pechter und A. L. Sonenshein. 2006. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression. J Bacteriol **188**: 6396-6405.

Shin, B. S., S. K. Choi und S. H. Park. 1999. Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene. J Biochem (Tokyo) **126**: 333-339.

Shivers, R. P., und A. L. Sonenshein. 2005. *Bacillus subtilis ilvB* operon: an intersection of global regulons. Mol Microbiol **56**: 1549-1559.

Smith, E. L., B. M. Austen, K. M. Blumenthal, und J. F. Nyc. 1975. Glutamate dehydrogenases. P. D. Boyer. *The enzymes*. Academic Press, New York, N.Y. pp. 293-367.

Stephens, C. 2000. Microbiology: intimate strangers. Curr Biol **10**: 272-5.

Stillman, T. J., P. J. Baker, K. L. Britton und D. W. Rice. 1993. Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase. Role of water in substrate recognition and catalysis. J Mol Biol **234**: 1131-1139.

Strauch, M. A., A. I. Aronson, S. W. Brown, H. J. Schreier, A. L. Sonenshein. 1988. Sequence of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene region. Gene **71**: 257-265.

Stülke, J., **I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier und G. Rapoport.** 1997. Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. Mol Microbiol **25**: 65-78.

Stülke, J. und W. Hillen. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol **2**: 195-201.

Stülke, J. und W. Hillen. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annu Rev Microbiol **54**: 849-880.

Stülke, J. und M. H. Schmalisch. 2004. The bacterial phosphotransferase system: a perfect link of sugar transport and signal transduction. Topics Curr Genet **9**: 179-205.

Sugawara, K., N. Dohmae, K. Kasai, H. Saido-Sakanaka, S. Okamoto, K. Taiko und K. Ochi. 2002. Isolation and identification of novel ADP-ribosylated proteins from *Streptomyces coelicolor* A3(2). Biosci Biotechnol Biochem **66**: 2292-2296.

Surber, M. W. und S. Maloy. 1999. Regulation of flavine dehydrogenase compartmentalization: requirements for PutA-membrane association in *Salmonella typhimurium*. Biochim Biophys Acta **1421**: 5-18.

Tobisch, S., D. Zuhlke, J. Bernhardt, J. Stülke und M. Hecker. 1999. Role of CcpA in Regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **181**: 6996-7004.

Tojo, S., T. Satomura, K. Morisaki, J. Deutscher, K. Hirooka und Y. Fujita. 2005. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu*-Operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. Mol Microbiol **56**: 1560-1573.

Tojo, S., T. Satomura, K. Morisaki, K. Morisaki, K.-I. Yoshida, K. Hirooka und Y. Fujita. 2004. Negative transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon for biosynthesis of branched-chain amino acids through the *Bacillus subtilis* global regulator TnrA. J Bacteriol **186**: 7971-7979.

Tolner, B., **T. Ubbink-Kok, B. Poolman und W. N. Konings.** 1995. Characterization of the proton/glutamate symport protein of *Bacillus subtilis* and its functional expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol **177**: 2863-2869.

Tripal, P. 2003. Regulation der Ammoniumassimilation in *Bacillus subtlis.* Diplomarbeit. Universität Erlangen-Nürnberg.

Tritz, G. J. und J. L. Chandler. 1973. Recognition of a gene involved in the regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis. J Bacteriol **141**: 128-136.

van Heeswijk, W. C., S. Hoving, D. Molenaar, B. Stegeman, D. Kahn und H. V. Westerhoff. 1996. An alternative P_{II} protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **21**: 133-146.

Wacker, I. 2002. Regulation der Biosynthese von Glutaminsäure in *Bacillus subtilis* durch CcpA: Charakterisierung von *sgd*-Mutanten. Diplomarbeit. Universität Erlangen-Nürnberg.

Wacker, I., H. Ludwig, I. Reif, H. M. Blencke, C. Detsch und J. Stülke. 2003. The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. Microbiology **149**: 3001-3009.

Weaver, L. H., K. Kwon, D. Beckett und B. W. Matthews. 2001. Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 6045-6050.

Wedel, A. und S. Kustu. 1995. The bacterial enhancer-binding protein NtrC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. Genes Dev **9**: 2042-2052.

Weinrauch, Y., T. Msadek, F. Kunst und D. Dubnau. 1991. Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **173**: 5685-5693.

White, D. 2000. The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. 2. ed. New York: Oxford University Press.

Whitman, W. B., D. C. Coleman und W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 6578-6583.

Wood, J. M. 1981. Genetics of L-proline untilization in *Escherichia coli*. J Bacteriol **146**: 895-901.

Wood, J. M. 1987. Membrane association of proline dehydrogenase in *Escherichia coli* is redox dependent. Proc Natl Acad Sci U S A **84**: 373-377.

Woodson, K. und K. M. Devine. 1994. Analysis of ribose transport operon from *Bacillus subtilis*. Microbiology **140**: 1829-1838.

Wösten, M. M. 1998. Eubacterial sigma factors. FEMS Microbiol Rev **22**: 127-150.

Wray, L. V., Jr., M. R. Atkinson und S. H. Fisher. 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.

Wray, L. V., Jr., A. E. Ferson, K. Rohrer und S. H. Fisher. 1996. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 8841-8845.

Wray, L. V., Jr. und S. H. Fisher. 2005. A feedback-resistant mutant of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase with pleiotropic defects in nitrogen-regulated gene expression. J Biol Chem **280**: 33298-33304.

Wray, L. V., Jr., J. M. Zalieckas und S. H. Fisher. 2000. Purification and *in vitro* activities of the *Bacillus subtilis* TnrA transcription factor. J Mol Biol **300**: 29-40.

Wray, L. V., Jr., J. M. Zalieckas und S. H. Fisher. 2001. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. Cell **107**: 427-435.

Yakimov, M. M., P. N. Golyshin, S. Lang, E. R. Moore, W. R. Abraham, H. Lunsdorf und K. N. Timmis. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. Int J Syst Bacteriol **48**: 339-348.

Yamazaki, T., K. Ohmura, A. Nakayama, Y. Takeichi, K. Otozai, M. Yamasaki, G. Tamura und K. Yamane. 1983. Alpha-amylase genes (amyR2 and amyE+) from an alpha-amylase-hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: molecular cloning and nucleotide sequences. J Bacteriol **156**: 327-337.

Yoshida, K., Y. Yamamoto, K. Omae, M Yamamoto und Y. Fujita. 2002. Identification of two *myo*-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **184**: 983-991.

Yoshida, K., Y. Yamamoto, K. Omae, M Yamamoto und Y. Fujita. 2003. Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. Mol Microbiol **49**: 157-165.

Young, F. E. und J. Spizizen. 1961 Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **81**: 823-829.

Zagorec, M. und P. W. Postma. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet **234**: 325-328.

Zalieckas, J. M., L. V. Wray Jr. und S. H. Fisher. 2006. Cross-regulation of the *Bacillus subtilis glnRA* and *tnrA* genes provides evidence for DNA binding site discrimination by GlnR and TnrA. J Bacteriol **188**: 2578-2585.

Zhu, N., B. M. Olivera und J. R. Roth. 1988. Identification of a repressor gene involved in the regulation of NAD de novo biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol **170**: 117-125.

Zhu, N., B. M. Olivera und J. R. Roth. 1991. Activity of the nicotinamide mononucleotide transport system is regulated in *Salmonella typhimurium*. **173**: 1311-1320.

Zukowski, M. M., L. Miller, P. Cosgwell, K. Chen, S. Aymerich und M. Steinmetz. 1990. Nucleotide sequence of the *sacS* locus of *Bacillus subtilis* reveals the presence of two regulatory genes. Gene **130**: 153-155.

7. Anhang

7.1. Materialien

7.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Arginin	Sigma, München
Ammoniumeisen(III)citrat	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	Sigma, München
Antibiotika	Sigma, München
Blockingreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
ß-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Casein, sauer hydrolysiert	Sigma, München
CDP*	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brillant Blue, R350	Amersham, Freiburg
D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt
Desthiobiotin	Iba, Göttingen
Dimethylformamid	Sigma, München
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
HABA	Sigma, München
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid	Peqlap, Erlangen
Magermilchpulver, fettfrei	Oxoid, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg

Natriumsuccinat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ni^{2+} -Agarose Superflow	Qiagen, Hilden
Nutrient Broth	Merck, Darmstadt
o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	Sigma, München
p-Nitrophenol-β-D-Xylopyranosid	Sigma, München
Stärke	Sigma, München
Strep-Tactin Sepharose	Iba, Göttingen
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, München
Trypton	Oxoid, Heidelberg

Alle sonstigen verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden von Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen.

7.1.2. Hilfsmittel

Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Drogheda, Irland
Eppendorfgefäße	Greiner, Nürtingen
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen, Eppendorf, Sarstedt
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Halbmikroküvetten aus Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Kunststoffpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Mikroliterpipetten	Gilson, Düsseldorf
(2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf,
Polyethylenröhrchen	Greiner, Nürtingen
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifugenbecher	Beckmann, München

7.1.3. Geräte und Apparaturen

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Biofuge fresco	Heraeus Christ, Osterode
Blottingapparatur VacuGene™XI	Amersham, Freiburg
Chemilumineszenzsystem ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
French Press	Spectonic Unicam, England
Gelelektrophoreseapparaturen	EasyCast™ Minigelsystem, Peqlab, Erlangen
Heizblock Dri Block DB3	Techne, England
Horizontalschüttler 3006	GFL, Burgwedel
Kühlzentrifuge Avanti™ J-25	Beckman, München
Kulturschüttler Modell G10	New Brunswick, Neu-Isenburg
Magnet-Heizrührer	JAK Werk, Staufen
Mikroprozessor pH-Meter Calimatic	Knick, Berlin
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories California USA
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories California USA
Speed-Vac-Konzentrator	Bachofer, Reutlingen
Spektralphotometer Ultraspec 2000	Amersham, Freiburg
TE70 SemiPhor Semi-Dry Transfer Unit	Amersham, Freiburg
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman, München
Mini-Protean III System	Bio-Rad Laboratories, California USA
Waage Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach

7.1.4. Kommerziell erhältliche Systeme

DNA-Leitermix peqGOLD 100-10000 bp	Peqlab, Erlangen
Nucleospin	Macherey-Nagel, Düren
QIAamp Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden
Prestained Protein Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

7.1.5. Proteine, Antikörper und Enzyme

Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Sigma, München
Lysozym aus Hühnereiweiß (178000 U/mg)	Merck, Darmstadt
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Polyklonaler Antikörper gegen *B. subtilis* $(His)_6$GltC	Seqlab, Göttingen
Polyklonaler Antikörper gegen *B. subtilis* Strep-tag-RocG	Seqlab, Göttingen
Restriktionsendonukleasen	NEB Biolabs, Frankfurt am Main MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sekundärer AK Anti-Kaninchen IgG-AP gekoppelt	Promega, Mannheim
Shrimps-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

7.2. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) bezogen.

Name	Sequenz (5’ → 3’)	Verwendung	Schnittstelle
FC1	5’ACGCGGATCCAATCTCAAAATGAGATA GATGGATGTGAGACAAACATGGACGTG	Klonierung von *gltC* mit Ribosomenbindestelle	*Bam*HI
FC2	5’AAAGAATTCTTATTGATACTGCTCCAG CTTAGAGAAA	Klonierung von *gltC* in pAC5 mit IW2	*Eco*RI
FC3	5’AAAGAATTCTCATTATCCGCGATGCGG GTC	Klonierung von *gltC* in pAC5 mit IW2	*Eco*RI
FC4	5’AAAGAATTCTCATTAAAATAATATTTTT CCCGT	Klonierung von *gltC* in pAC5 mit IW2	*Eco*RI
FC5	5’AAAGAATTCTCATTATTTTACTTGAGG GAACTC	Klonierung von *gltC* in pAC5 mit IW2	*Eco*RI
FC6	5’AAAGAATTCTCTAAGCTGGAGCAGTAT	*gltC* Disruptionskassette	*Eco*RI

	CAA		
FC7	5’AAAGTCGACGGCCTTGGAATCGTC	*gltC* Disruptionskassette	*Sal*I
FC8	5’AAATGATCAGCGGCTTCTGAAAC	Klonierung von *gltA* in pBlueskript	*Bcl*I
FC9	5’TTTGGATCCCAATTTTCAGCCTGTTACGAATG	Klonierung von *gltA* in pBlueskript	*Bam*HI
FC10	5’GATCTAAATTATATATTGATTATATCGTTTTGAAAACC	Sequenzierung von *gltC*	-
FC11	5’CGTTTTGAAAACCTACAATGATTATAGAGTTG	Sequenzierung von *gltC*	-
FC12	5’AAACTGCAGTCATTATCCGCGATGCGGGTC	Klonierung von *gltC* in pBQ200	*Pst*I
FC13	5’AAACCCGGGATGTTTCAAAATAGTATG	Klonierung von *odhA* in pBlueskript	*Sma*I
FC14	5’TTTCTGCAGTTTCAAAATTGAAGCAAC	Klonierung von *odhA* in pBlueskript	*Pst*I
FC15	5’GTGGCACAAGGTGAAAAAATTACAG	Sequenzierung von *citZ*	-
FC16	5’AAAGGATCCTAAAATGTTTTCTAAATATGAATTACATACTGG	Klonierung von *icd* in pBQ200	*Bam*HI
FC17	5’AAAGGATCCGTGGCACAAGGTGAAAAAATTAC	Klonierung von *icd* in pWH844	*Bam*HI
FC18	5’TTTCTGCAGTTATTAGTCCATGTTTTTGAT	Klonierung von *icd* in pWH844 & pBQ200	*Pst*I
FC19	5’AAAGAGCTCGTGGCACAAGGTGAAAA	Klonierung von *icd* in pGP172	*Sac*I
FC20	5’TTTGGATCCTTATTAGTCCATGTTTTTGAT	Klonierung von *icd* in pGP172	*Bam*HI
FC21	5’CGGTATCCGTGCTTTGAACGTAGCG	Mutagenese von *icd*, 5’-P Ser→Ala	-
FC22	5’AAAGGATCCATGACAGCGACACGCG	Klonierung von *citZ* in pBlueskript	*Bam*HI
FC23	5’TTTCTCGAGGGCTCTTTCTTCAATCGG	Klonierung von *citZ* in pBlueskript	*Xho*I
FC24	5’AAAGGATCCATGGTACATTACGGATTAAAGG	Klonierung von *citA* in pBlueskript	*Bam*HI
FC25	5’TTTCTCGAGTGAAAGAACTTCCTCGGGA	Klonierung von *citA* in pBlueskript	*Xho*I
FC26	5’AAAGGATCCTAGTCAGCCCTGCAGGTA	Klonierung von *citB* in pBlueskript	*Bam*HI
FC27	5’TTTCTCGAGGGACTGCTTCATTTTTTCA	Klonierung von *citB* in	*Xho*I

	CG	pBlueskript	
FC28	5’AAACATATGGAGCTGCGCCAACTGCGT TATTTTATGG	Klonierung von *gltC* in pET3c	*Nde*I
FC29	5’TTTGGATCCCTATTATTTTTCGAACTGC GGGTGGCTCCATTGATACTGCTCCAGCTT AGAGAAAAATTG	Klonierung von *gltC* in pET3c	*Bam*HI
FC30	5’TCAATATGCTGTTTT	Sequenzierung von *sigL*	-
FC31	5’CAGTCGTTAGAACCG	Sequenzierung von *sigL*	-
FC32	5’AATCCTCCCGTCTAG	Sequenzierung von *sigL*	-
FC33	5’AGCGAAAATTCAGC	Sequenzierung von *rocR*	-
FC34	5’AGTATTCTCGGCACC	Sequenzierung von *rocR*	-
FC35	5’TTCTGATCAGGCTTC	Sequenzierung von *rocR*	-
FC36	5’TAATAGGGCGCTATT	Sequenzierung von *ahrC*	-
FC37	5’CATTACACCTCTTAT	Sequenzierung von *ahrC*	-
FC38	5’ TGAGAGCACGTG AGCAGCAATTTG	Sequenzierung von *gltA*	-
FC39	5’ CTATGGTACTCGT AGAACGCCC	Sequenzierung von *gltA*	-
FC40	5’ CCTTGGTTCAAT GGGGAATGACG	Sequenzierung von *gltA*	-
FC41	5’ GGACATGTTCACA CAGGCAGAG	Sequenzierung von *gltA*	-
FC42	5’ CTTACTGCCAGAA GCGGCGG	Sequenzierung von *gltA*	-
FC43	5’ TGCGATGTCATTC GGGTCCTTGA	Sequenzierung von *gltA*	-
FC44	5’ GAACAAAGCGTTT GGGATCTTCTCC	Sequenzierung von *gltA*	-
FC45	5’ CAGAGCTTCGCAA AAAGTTCATGGG	Sequenzierung von *gltA*	-
FC46	5’ CAAATGTCTTGAA GCCTAACGCAGC	Sequenzierung von *gltA*	-
FC47	5’ TTGTCGCACCGTA AAAAGCCACG	Sequenzierung von *gltA*	-
FC48	5’ CGCAATGGACTAC CTCACACTTG	Sequenzierung von *gltB*	-
FC49	5’ CGTGTGGCTGTTCA GGCCAC	Sequenzierung von *gltB*	-
FC50	5’ GTCATATCCTA GCAGGCCTCCGG	LFH-PCR (*yuxN*), Deletion von *citG*	-
Kan fwd	5’AAAGAATTCGATAAACCCAGCGAACCA TTTGA	Amplifikation von Km^R pDG792	*Eco*RI
Kann rev	5’TTTGAATTCATCGATACAAATTCCTCGT AGGC	Amplifikation von Km^R pDG792	*Eco*RI
FC51	5’CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCGG AAGACATGGTAAAACCAAAGGCG	LFH-PCR (*yuxN*), Deletion von *citG*	-
FC52	5’CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGC CATGGTGTCTCGTTCAATTCTGTATTCC	LFH-PCR (*gerAA*), Deletion von *citG*	-
FC53	5’ CGACCAAAATTGCC ACACGGCCG	LFH-PCR (*gerAA*), Deletion von *citG*	-
FC54	5’CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGTCCG	LFH-PCR (*icd*),	-

	GTAAAACCTGCTCCGATAACAG	Deletion von *mdh*	
FC55	5’CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGC TGACAGACTATGAAAGAGCGCAGCT	LFH-PCR (*phoP*), Deletion von *mdh*	-
FC56	5’ TTGGCTCCTCCAGT TTATACCCCAATC	LFH-PCR (*phoP*), Deletion von *mdh*	-
FC57	5’CAGAAGAAGCAGTTGAGAGTGCAAAG AG	LFH-PCR (*sucC*), Deletion von *sucD*	-
FC58	5’CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGCG GTAGAACCTGTAATCCCTTGCAC	LFH-PCR (*sucC*), Deletion von *sucD*	-
FC59	5’CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGG CAGAGACACCTTCTGTCATGGGTG	LFH-PCR (*smf*), Deletion von *sucD*	-
FC60	5’ GAACGTTTCTCTCA GGAAGTTCCTCG	LFH-PCR (*smf*), Deletion von *sucD*	-
FC61	5’ GGCTCCGTAATGAGAC GTCTGATC	Sequenzierung von *rocR*	-
FC62	5’ GAAAAGTGAAATCG GCAGAGGCACTG	Sequenzierung von *rocR*	-
FC63	5’ CTGCTCACATGTGA GCGGAAGG	Sequenzierung von *sigL*	-
FC64	5’ GCAGCATCACGTA TTCAGCTGGATG	Sequenzierung von *sigL*	-
FC65	5’ CTTCAGTTTGCAT TGGCCGGGAGA	Sequenzierung von *ahrC*	-
FC66	5’ CTCCTGTTAAAACC GTAAGCCCGC	Sequenzierung von *ahrC*	-
FC67	5’ GAGTATCCGCATTA ACACCATCAACC	*aspB*-Sonde	-
FC68	5’**CTAATACGACTCACTATAGGGAGACA** TAAACAGGCTTTCCGCCAGCG	*aspB*-Sonde	-
FC69	5’ AGCCTCAACTGAC ACAGGAGCTCA	*sigL*-Sonde	-
FC70	5’**CTAATACGACTCACTATAGGGAGA**TC AGCCAGCGCCACTCCTGATA	*sigL*-Sonde	-
FC71	5’GCGGTTGCTCATGCTGAGGATG	*ptb*-Sonde	-
FC72	5’**CTAATACGACTCACTATAGGGAGA**CA GATGCGCATATTGCCAGCGC	*ptb*-Sonde	-
FC73	5’AGCACTGGAAAGCAAGCCAGCTTG	LFH-PCR (*gltA*), Deletion von *gltB*	-
FC74	5’CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGGT CCCGCTCCGCAGGTTTTTC	LFH-PCR (*gltB*), Deletion von *gltB*	-
FC75	5’CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGG AAGTGGCGCGTGAAGTGGATC	LFH-PCR (*gltB*), Deletion von *gltB* fwd	-
FC76	5’GGTTCTGACGGCGCGGGTATC	LFH-PCR (*yogA*), Deletion von *gltB* rev	-
FC77	5’GACATAGACTGTTAACAGAACCAGCAA AC	LFH-PCR (*yrrI*), Deletion von *glnH* fwd	-
FC78	5’CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCAA	LFH-PCR (*glnH*), Deletion von	-

	GCGGCAAGCAAGATGACAGCG	*glnH* rev	
FC79	5’CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGG ATGAAGTCGGATGGCAGATACGATG	LFH-PCR (*glnH*), Deletion von *glnH* fwd	-
FC80	5’GGGAGGTTTCTGATCGTTTCAACGAG	LFH-PCR (*glnP*), Deletion von *glnH* rev	-
FC81	5’TCTGCAGGCCTGAATCATCGTGAC	Sequenzierung von *yogA*	-
FC82	5’GACGAGCCAAAAGGGTGACCATAAC	Sequenzierung von *yrrI*	-
FC83	5’GCAGCAGCTGTAATTTCAAGCTTAATC CC	Sequenzierung von *glnP*	-
FC84	5’GTTTGGCGGCTTACATGACGGG	Sequenzierung von DAS (*rocG*)	-
FC85	5’TCTATCGCTTCAGCCGTGTCCG	Sequenzierung von DAS (*rocG*)	-
FC86	5’AACGCGGATCCAGCCGGCCAAAAAAA CAATG	Klonierung von *rocG*-Fragment in pX2	*Bam*HI
FC87	5’AACGCGGATCCCCCTGCTCAGCCTTTC CAGTTCTCCA	Klonierung von *rocG*-Fragment in pX2	*Bam*HI
FC88	TTTAAGCTTCTATTATTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCATTGATACTG CTC CAGCT TAGAGAAAAATTG	Klonierung von *gltC* in pBQ200	*Pst*I
IR3	CGC**GGATCC**ACGCCGATTCAGAAGACG A	Sequenzierung von *gudB*	-
IR6	AAACGC**GTCGAC**CTCCGATTTCGAGCTT TTCA	Sequenzierung von *gudB*	-
HMB 74	CGCGGATCCAGAAGATTCTAGGAGGTTA AC	Sequenzierung von *gudB*	*Bam*HI
IW1	AAA GAA TTC GAT CAG CGG CTT CTG AAA CGT G	Klonierung des *gltA*-Promotorfragments	*Eco*RI
IW2	AAA GGA TCC TGA GCT TTT GGC ATT TGA TTG TAC GTC	Klonierung des *gltA*-Promotorfragments	*Bam*HI

Tab. 7.1. Oligonukleotide

Die angefügten Schnittstellen sind unterstrichen. Der T7-Promotor ist in Fettschrift dargestellt.

7.3. Bakterienstämme

Stamm	**relevanter Genotyp[1]**	**Referenz bzw. Konstruktion[2]**
E. coli		

Stamm	**relevanter Genotyp**[1]	**Referenz bzw. Konstruktion**[2]
DH5α	*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17* r_K^- m_K^+ *relA1 supE44* Φ80Δ*lac*ZΔ*M15* Δ(*lacZYA-argF*)U169	Sambrook *et al.*, 1989
BL21 (DE3)	F^-,*lon ompT* $r_B m_B$ *hsdS gal* (cI_{ts857} *ind*1 Sam7 *nin5 lac*UV5-T7 gene1)	Sambrook *et al.*, 1989
B. subtilis		
168	*trpC2*	Laborsammlung
3G18sdh12	*trpC2 ade met ΔsdhCA::cat*	Friden *et al.,* 1987
BB911	*gltC*(P88L) *amyE*::[*cat*Φ(*gltC-gusA)* Φ *(gltA-lacZ)*]	Belitsky and Sonenshein, 1995
BB941	*gltC*(I160K) *amyE*::[*cat*Φ(*gltC-gusA)* Φ *(gltA-lacZ)*]	Belitsky and Sonenshein, 1995
BB971	*gltC*(T99A) *amyE*::[*cat*Φ(*gltC-gusA)* Φ *(gltA-lacZ)*]	Belitsky and Sonenshein, 1995
GP27	*trpC2 gudB*::*cat amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Commichau *et al.,* 2006b
GP28	*trpC2 gudB*::*cat rocG*::Tn10 *spc amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Commichau *et al.,* 2006b
GP29	*trpC2 gudB*::*cat ccpA*::Tn917 *ermC amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Reif, 2004
GP30	*trpC2 ccpA*::Tn917 *ermC ptsH1 amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Reif, 2004
GP32	*trpC2 gudB1 rocG*::Tn10 *spc amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Commichau *et al.,* 2006b
GP147	*trpC2 sigL::spc amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Commichau *et al.,* 2006b
GP222	*trpC2* p_{xylA}::*gltA cat*	Reif, 2004
GP252	*trpC2 ΔtnrA amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Blencke *et al.,* 2006
GP335	*trpC2 ccpA::Tn917 ermC ptsH1*	Ludwig *et al*., 2002
GP342	*trpC2 amyE*::(*gltA-lacZ aphA3*)	Wacker *et al*., 2003
GP348	*trpC2 ccpA::Tn917 spc rocGΔ7 amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP350	*trpC2 ccpA::Tn917 spc rocGΔ9 amyE::(gltA-lacZ*	Commichau *et al.,* 2006b

Stamm	relevanter Genotyp[1]	Referenz bzw. Konstruktion[2]
	aphA3) (sgd-9)	
GP351	*trpC2 ccpA::Tn917 spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Wacker *et al*., 2003
GP362	*trpC2 rocG::Tn10 spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP650	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Tripal, 2003
SJB219	*trpC2 pheA1 citC ::spc*	Jin *et al.,* 1997
KMB252	*trpC2 pheA1 citC ::pKM112*	Matsuno *et al.,* 1999
QB5187	*trpC2 amyE::(levD-lacZ aphA3)*	Stülke *et al.,* 1995
QB5330	*trpC2 levR8 amyE::(bglP-lacZ phl)*	Stülke *et al.,* 1997
QB5407	*trpC2 ccpA::Tn917 spc*	Faires *et al.*, 1999
QB5412	*trpC2 ccpA::Tn917 spc sgd-1*	Faires *et al.*, 1999
QB5413	*trpC2 ccpA::Tn917 spc sgd-2*	Faires *et al.*, 1999
QB5585	*trpC2 rocF::aphA3 amyE::(rocD-lacZ cat)*	Gardan *et al.,* 1997
QB5618	*trpC2 rocD::aphA3 amyE::(rocD-lacZ cat)*	Gardan *et al.,* 1997
QB5619	*trpC2 ahrC::aphA3 amyE::(rocD-lacZ cat)*	Gardan *et al.,* 1997
QB7096	*trpC2 crh::aphA3*	Presecan-Siedel *et al.,* 1999
in dieser Arbeit konstruiert:		
GP651	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC gltA´-´lacZ cat)*	pGP908 → GP650 (siehe Kapitel 4.3.1.)
GP652	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC(P88L) gltA´-´lacZ cat)*	pGP953 → GP650 (siehe Kapitel 4.3.1.)
GP653	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC(I160K) gltA´-´lacZ cat))*	pGP954 → GP650 (siehe Kapitel 4.3.1.)
GP654	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC(T99A) gltA´-´lacZ cat)*	pGP955 → GP650 (siehe Kapitel 4.3.1.)
GP655	*trpC2 ΔrocF::aphA3*	QB5585 → 168 (siehe Kapitel 4.3.2.)
GP656	*trpC2 ΔrocD::aphA3*	QB5618 → 168 (siehe Kapitel 4.3.2.)
GP657	*trpC2 ΔrocF::aphA3 amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	GP655 → GP669 (siehe Kapitel 4.3.2.)

Stamm	**relevanter Genotyp**[1]	**Referenz bzw. Konstruktion**[2]
GP658	*trpC2 ΔrocD::aphA3 amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	GP656 → GP669 (siehe Kapitel 4.3.2.)
GP659	*trpC2 ccpC::aphA3 amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	pGP702 → GP669
GP660	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC(273) gltA´-´lacZ cat)*	pGP911 → GP650
GP661	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC(486) gltA´-´lacZ cat)*	pGP912 → GP650
GP662	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC(795) gltA´-´lacZ cat)*	pGP913 → GP650
GP663	*trpC2* p_{xylA}*::gltA amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	pGP526 → GP222
GP664	*trpC2 amyE::(gltC gltA´-´lacZ cat)*	pGP908 → 168
GP665[8]	*trpC2 odhA::aphA3 amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	pGP926 → GP669
GP666[8]	*trpC2 pheA2 citC::spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	pGP526 → SJB219
GP667[8]	*trpC2 pheA2 citC::pMK112 amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	pGP526 → KMB252
GP668	*trpC2 pta::aphA3*	pGP729 → 168
GP669	*trpC2 amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP670	*trpC2 pta::aphA3 amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	pGP919 → GP668
GP671[8]	*trpC2 odhA::spc*	pGP726 → 168
GP672[8]	*trpC2 icd::ermC amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	pGP936 → GP669
GP673[8]	*trpC2 hprK::ermC amyE::(gltA´-´lacZ cat)*	pGP211 → GP669
GP674	*trpC2 gudB::cat rocG::Tn10 spc ccpA::ermC gltB amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	GP29 → GP717
GP675	*trpC2 sgg1 gudB::cat rocG::Tn10 spc* $gltB^+$ *amyE::(gltA´-´lacZ aphA3)*	Ausstrich von GP717 auf C-Glc
GP676[8]	*trpC2 citA::ermC amyE::(gltA-lacZ cat)*	pGP944 → GP669
GP677	*trpC2 sgg2 gudB::cat rocG::Tn10 spc* $gltB^+$ *amyE::(gltA´-´lacZ aphA3)*	Ausstrich von GP717 auf C-Glc
GP678[8]	*trpC2 citZ::ermC amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	pGP942 → GP342
GP679	*trpC2 ccpA::Tn917 ermC ptsH1 amyE::(citB-*	pGP700 → GP335

Stamm	relevanter Genotyp[1]	Referenz bzw. Konstruktion[2]
	lacZ cat)	
GP680	*trpC2 crh::aphA3 amyE::(gltA-lacZ cat)*	QB7096 → GP669
GP681	*trpC2 ccpA::Tn917 ermC ptsH1 amyE::(citB-lacZ aphA3)*	pGP728 → GP335
GP682[8]	*trpC2 icd::ermC odhA::cat amyE::(gltA´-´lacZ aphA3)*	pGP936 → GP684
GP683[8]	*trpC2 citB::ermC amyE::(gltA´-´lacZ aphA3)*	pGP943 → GP342
GP684[8]	*trpC2 odhA::cat amyE::(gltA´-´lacZ aphA3)*	pGP928 → GP342
GP691	*trpC2 ΔgudB::cat*	Commichau *et al.,* 2006b
GP717	*trpC2 gudB::cat rocG::Tn10 spc gltB amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Ausstrich auf SP
GP718[3]	*trpC2 ΔcitG::spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	LFH-PCR-Produkt → GP342
GP719[4]	*trpC2 Δmdh::spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	LFH-PCR-Produkt → GP342
GP720[5]	*trpC2 ΔsucD::spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	LFH-PCR-Produkt → GP342
GP721	*trpC2 Δsdh::spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	GP743 → GP342
GP722	*trpC2 ccpA::ermC gudB::cat rocG::Tn10 spc amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	GP29 → GP28
GP723	*trpC2 ΔtnrA amyE::(gltA´-´lacZ aphA3)*	pGP526 → GP252 (siehe Kapitel 4.1.4.)
GP724	*trpC2 ccpA::Tn917 spc amyE::(gltA-´lacZ cat)*	QB5407 → GP669
GP725	*trpC2 rocG::aphA3 ΔgudB::cat*	pGP948 → GP691
GP726	*trpC2 rocG::aphA3*	pGP948 → 168
GP727	*trpC2 sgg1 gudB::cat rocG::Tn10 spc gltB*$^+$ *amyE::(bglP-lacZ phl)*	QB5330 → GP675
GP728	*trpC2 sgg1 gudB::cat rocG::aphA3 gltB*$^+$ *amyE::(bglP-lacZ phl)*	pGP948 → GP727
GP729	*trpC2 ahrC::aphA3*	Commichau *et al.,* 2006b
GP730	*trpC2 ccpA::Tn917 spc sgd-1 amyE::(levD -´lacZ*	QB5187 → QB5412

Stamm	relevanter Genotyp[1]	Referenz bzw. Konstruktion[2]
	aphA3)	
GP731	*trpC2 ccpA::Tn917 spc sgd-2 amyE::(levD -´lacZ aphA3)*	QB5187 → QB5413
GP732	*trpC2 ccpA::Tn917 amyE::(levD-´lacZ aphA3)*	QB5187 → QB5407
GP733	*trpC2 ahrC::aphA3 amyE::(gltA-´lacZ cat)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP734[6]	*trpC2 glnH::spc*	LFH-PCR-Produkt → 168
GP735	*trpC2 sgg1 gudB::cat rocG::aphA3 gltC::spc gltB*$^{+}$ *amyE::(bglP-lacZ phl)*	pGP910 → GP728
GP736[7]	*trpC2 sgg1 gudB::cat rocG::aphA3 gltB::spc amyE::(bglP-lacZ phl)*	LFH-PCR-Produkt→ GP728
GP737	*trpC2 gltC::Tn10 spc amyE::(gltC strep gltA´-´lacZ cat)*	pGP950 → GP650 (siehe Kapitel 4.4.1.)
GP738	*trpC2 gltC::Tn10 spc*	GP650 → 168
GP739	*trpC2 nrgA::cat*	GP252 → 168
GP740	*trpC2 nrgA::cat glnH::spc*	GP739 → GP734
GP741	*trpC2 ccpA::Tn917ΔgudB::cat spc rocGΔ7 amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP742	*trpC2 ccpA::Tn917 spc ΔgudB::cat rocGΔ9 gudB1 amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP743	*trpC2 ΔsdhCA ::cat*	3G18sdh12 → 168
GP744	*trpC2 ccpA::Tn917 spc rocGΔ7 gudB1 amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP745	*trpC2 ccpA::Tn917 spc rocGΔ9 gudB1 amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	Commichau *et al.,* 2006b
GP746	*trpC2 gudB::cat rocG::Tn10 spc*	Commichau *et al.,* 2006b
GP747	*trpC2 rocG::Tn10 spc*	Commichau *et al.,* 2006b
GP748	*trpC2 rocG::Tn10 spc sigL::aphA3*	Commichau *et al.,* 2006b
GP749	*trpC2 gudB1 rocG::Tn10 spc sigL::aphA3*	Commichau *et al.,* 2006b
GP750	*trpC2 gudB::cat sigL::aphA3*	Commichau *et al.,* 2006b
GP751	*trpC2 gudB::cat rocG::Tn10 spc sigL::aphA3*	Commichau *et al.,* 2006b

Stamm	relevanter Genotyp[1]	Referenz bzw. Konstruktion[2]
GP752	*trpC2* p_{xylA}*::rocG cat amyE::(gltA-lacZ aphA3)*	pGP952 → GP342 (siehe Kapitel 4.2.6.)

Tab. 7.2. In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Bakterienstämme

[1] -*lacZ* steht für eine translationale Promotor-*lacZ*-Fusion. [2] Der Pfeil (→) steht für eine Transformation.

[3,4,5,6,7] Diese Stämme wurden mit der Methode der *Long Flanking Homology*-PCR hergestellt (Jordan *et al.*, 2006). Es wurden die folgenden Primer-Kombinationen verwendet: GP718: FC50, FC51, FC52 und FC53; GP719: FC54, FC55, FC56 und FC17; GP720: FC57, FC58, FC59 und FC60; GP734: FC77, FC78, FC79 und FC80; GP736: FC73, FC74, FC75 und FC76.

[8] Die Stämme müssen mit chromosomaler DNA hergestellt werden oder mit den entsprechenden Plasmiden neu konstruiert werden. Die Sporenbildung ist bei den TCC-Mutanten beeinträchtigt.

7.4. Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz bzw. Konstruktion	Zweck, Linearisierung[1]
pBQ200	Erm^R	Martin-Verstraete *et al.*, 1994	Komplementationsversuche
pBlueskript SK II (+)		Stratagene	Klonierungsvektor
pAC5	Cm^R	Martin-Verstraete *et al.*, 1992	LacZ-Fusion; *Sca*I, *Pst*I
pAC7	Km^R	Weinrauch *et al.,* 1991	LacZ-Fusion; *Sca*I, *Pst*I
pET3c		Novagen	Überexpressionsvektor
pX2	Cm^R	Mogk *et al.,* 1997	Artifizielle Induktion
pSpectino	Spc^R	P. Trieu-Cout, Institut Pasteur, Frankreich	Spc-Resistenz
pWH844		Schirmer *et al.*, 1997	Überexpressionsvektor
pGP211	Spc^R	Hanson *et al.*, 2002	Deletion von *hprK*; *Sca*I
pGP526	Km^R	Wacker *et al.*, 2003	*gltA-lacZ*-Fusion; *Sca*I, *Pst*I
pGP529	Erm^R	Wacker, 2002	Expression von RocG
pGP700	Cm^R	Blencke *et al.*, 2006	*citB-lacZ*-Fusion; *Sca*I
pGP701		Blencke, 2001	*ccpC*-Deletion
pGP702	Km^R	Blencke *et al.*, 2006	*ccpC*-Deletion
pGP728	Km^R	Blencke *et al.*, 2006	*citB-lacZ*-Fusion; *Sca*I

pGP729	Km^R	Blencke *et al.*, 2006	*pta*-Deletion; *Sca*I
pGP906		Tripal, 2003	Überexpression von RocG
pDG792		Guerout-Fleury *et al.,* 1995	Cm-Resistenz
pDG647		Guerout-Fleury *et al.,* 1995	Erm-Resistenz
pDG1514		Guerout-Fleury *et al.,* 1995	Tet-Resistenz
in dieser Arbeit konstruiert:			
pGP907	Erm^R	*gltC* mit FC1-PT3 über *Bam*HI + *Pst*I in pBP200	Expression von GltC
pGP908	Cm^R	*gltC*-*gltA*-Promotor mit FC2-IW2 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	Expression von GltC
pGP909		*gltC*-Fragmente mit IW2 + IW1 und FC6 + FC7 über *Eco*RI + *Sal*I + *Bam*HI in pBlueskript KS II (+)	Deletion von *gltC*
pGP910	Spc^R	Spc^R aus pSpectino über *Eco*RI in pGP909	Deletion von *gltC; Pvu*I
pGP911	Cm^R	*gltC*-Fragment (273 bp) mit IW2-FC3 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	Expression eines GltC-Fragments*; Pst*I
pGP912	Cm^R	*gltC*-Fragment (486 bp) mit IW2-FC3 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	Expression eines GltC-Fragments*; Pst*I
pGP913	Cm^R	*gltC*-Fragment (795 bp) mit IW2-FC3 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	Expression eines GltC-Fragments*; Pst*I
pGP915		*gltC* mit FC1-PT3 über *Bam*HI + *Pst*I in pBlueskript KS II (+)	
pGP918	Erm^R	*gltC*-Fragment mit FC1-FC12 über *Bam*HI + *Pst*I in pBQ200	Expression eines GltC-Fragments
pGP919	Cm^R	Commichau *et al.*, 2006b	*gltA*-*lacZ*-Fusion; *Sca*I, *Pst*I
pGP924		*odhA* mit FC13-FC14 über *Sma*I + *Pst*I in pBlueskript SK	Deletion von *odhA*

pGP925		II pGP924 *Hind*III und Religation (525 bp-Fragment entfernt)	Deletion von *odhA*
pGP926	Spc^R	Spc^R aus pSpectino über *Eco*RI in pGP925	Deletion von *odhA; Sca*I
pGP927		pGP701 *Bgl*II / Religation (214 bp entfernt)	Deletion von *ccpC; Sca*I
pGP928	Cm^R	Cm^R (816 bp) mit CATfwd + CATrev über *Eco*RI in pGP925	Deletion von *odhA; Sca*I
pGP929	Erm^R	Erm^R aus pDG647 über *Bam*HI in pGP701 (*Bgl*II)	Deletion von *ccpC; Sca*I
pGP930	Spc^R	Spc^R aus pSpectino über *Eco*RI in pAC5	Austausch von Resistenzen; *Pst*I, *Sca*I
pGP931		*icd* mit FC17 + FC18 über *Bam*HI + *Pst*I in pWH844	Überexpression der IDH
pGP932		*icd* mit FC17 + FC18 + FC21 über *Bam*HI + *Pst*I in pWH844	Überexpression der IDH
pGP935	Erm^R	*icd* mit FC16 + FC18 über *Bam*HI + *Pst*I in pBQ200	Expression der IDH
pGP936	Erm^R	Erm^R mit *Bam*HI aus pDG647 über *Bgl*II in pGP931	Deletion von *icd; Nde*I
pGP937	Spc^R	Spc^R aus pSpectino über *Eco*RI in pGP526	Austausch von Resistenzen; *Pst*I, *Sca*I
pGP938		*citZ* mit FC22 + FC23 über *Xho*I + *Bam*HI in pBlueskript KS II (+)/	Deletion von *citZ*
pGP939		*citB* mit FC26 + FC27 über *Xho*I + *Bam*HI in pBlueskript SK II (+)	Deletion von *citB*
pGP940		*citA* mit FC24 + FC25 über	Deletion von *citA*

		*Xho*I + *Bam*HI in pBlueskript SK II (+)	
pGP941	Spc^R	Spc^R aus pSpectino über *Eco*RI in pGP938	Deletion von *citZ; Spe*I, *Not*I
pGP942	Erm^R	Erm^R mit *Eco*RI + *Pst*I aus pDG647 in pGP938	Deletion von *citZ; Spe*I, *Not*I
pGP943	Erm^R	Erm^R mit *Hind*III aus pDG647 in pGP939	Deletion von *citB*[2]
pGP944	Erm^R	Erm^R mit *Hind*III aus pDG647 in pGP940	Deletion von *citA*[2]
pGP945	Tet^R	Tet^R mit *Hind*III + *Pst*I aus pDG1514 in pGP940	Deletion von *citA*; *Not*I, *Spe*I, *Kpn*I
pGP946		*rocG* aus pGP906 mit *Sac*I + *Hind*III in pBlueskript SK II (+)	Deletion von *rocG*
pGP947		pGP946 *SacI*/ Religation *Eco*RI-Schnittstelle entfernt	Deletion von *rocG*
pGP948	Km^R	Km^R mit FC38 + FC39 aus pDG792 amplifiziert über *Eco*RI in pGP946	Deletion von *rocG*; *Sac*I
pGP949		*gltC* mit FC29 + IW2 über *Bam*HI in pBlueskrip SK II (+)	
pGP950	Km^R	*gltC* aus pGP949 mit *Bam*HI in pAC7	Expression von GltC-*strep*; *Pst*I
pGP951		*gltC* aus pGP950 mit kan check rev und FC28 über *Nde*I + *Bam*HI in pET3c	Überexpression von GltC-*strep*
pGP952	Cm^R	*rocG*-Fragment mit FC86 + FC87 über *Bam*HI in pX2	Artifizielle Induktion von *rocG*
pGP953	Cm^R	*gltC(P88L)* aus BB911 mit IW1 + FC2 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	Expression eines konstitutiv aktiven *gltC*-Allels; *Pst*I
pGP954	Cm^R	*gltC(I160K)* aus BB941 mit	Expression eines konstitutiv

		IW1 + FC2 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	aktiven *gltC*-Allels; *Pst*I
pGP955	Cm^R	*gltC(T99A)* aus BB971 mit IW1 + FC2 über *Bam*HI + *Eco*RI in pAC5	Expression eines konstitutiv aktiven *gltC*-Allels; *Pst*I

Tab. 7.3. In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide

Spc^R = Spectinomycinresistenz; Kan^R = Kanamycinresistenz; Erm^R = Erythromycinresistenz; Tet^R = Tetracyclinresistenz; Cm^R = Chloramphenicolresistenz; Für die Selektion in *E. coli* besitzen alle Plasmide das Ampicillinresistenz-Gen (*bla*), für die Selektion in *B. subtilis* sind die Selektionsmarker jeweils angegeben.

[1] Um die Zielgene zu deletieren, müssen die Plasmide mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert werden.

[2] Bei der Herstellung dieser Mutanten muß das mit den Klonierungsprimern erhaltene PCR-Produkt transformiert werden.

7.5. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

URL	Anbieter	Anwendung
http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/	Institut Pasteur, Paris	Sequenzrecherche im Genom von *B. subtilis*
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Literaturrecherche
http://www.molecularcloning.com	Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA	Molekularbiologische Protokolle
http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html	Max Heiman	Erkennung von Restriktionsschnittstellen
http://us.expasy.org/	Swiss Institute of Bioinformatics	Recherchen zur Proteinstruktur
http://www.ebi.ac.uk/clustalw/	European Bioinformatics Institute	Erstellen von Alignments
http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	Swiss Institute of Bioinformatics	Modifizieren von Alignments

Tab. 7.4. Genutzte Internetangebote

Programm	Hersteller	Anwendung
Bio1D	Vilber Lourmat	Auswertung von Chemilumineszenzsignalen
SegMan™ II 5.07	DNASTAR	Auswertung von Sequenzierdateien
Microsoft Office XP	Microsoft Inc.	Text- und Datenverarbeitung

Tab. 7.5. Genutzte Computerprogramme

7.6. Vollständige Liste der Transkriptomanalyse mit den ausgewählten *sgd*-Mutanten

		Stamm		
Stoffwechselweg	**Gen**	**168 (wt)**	**QB5412 (*ccpA sgd1*)**	**QB5413 (*ccpA sgd2*)**
Glykolyse, Überflußstoffwechsel, Aufnahme	*ptsG*	1	1,4	n.a.
	ptsH	1,4	1,6	1
	ptsI	1,1	1,5	1
	pgi	1,4	1	n.a.
	pfkA	1	0,7	0,85
	tpi	1,6	0,8	0,8
	pgk	1,6	0,8	0,8
	pgm	2	1	1,3
	pyk	1,1	0,9	0,9
	gapA	2,4	1.1	1.4
	eno	2,3	1.1	1
	ldh	0,2	-	1,7
	alsS	0,9	0,5	0,3
	alsD	0,3	0,5	0,3
	pta	1,1	0,14	0,12
	ackA	4	0,9	0,6
	crh	0,8	0,5	0,5

	pdhA	1,6	0,8	1,2
	pdhB	1,5	0,8	1
	pdhC	1,1	0,8	1,2
	pdhD	1,1	0,7	1
	fbp	0,6	0,65	0,5
	gapB	0,8	0,6	0,5
	pckA	0,4	0,85	0,6
	pycA	0,6	1,2	1,2
	zwf	1	0,8	1,05
	rpe	0,7	0,65	0,5
	ywlF	0,9	1	0,95
	tkt	0,8	1,4	1,7
	yqjI	1	0,85	1,05
	pyrAA	1	0,7	1,15
	dctP	n.a.	2	2,15
Citratzyklus	*citZ*	0.06	0.8	1.1
	citB	0.1	0.7	0.85
	icd	0.3	0.7	1.0
	odhA	0.2	0.35	0.55
	odhB	0.3	0.5	0.7
	sucCD	0.2	0.6	0.65
	sdhCA	0.3	0.65	0.8
	mdh	0.3	0.7	1.15
	citG	0,5	0,65	0,65
	malS	0,5	0,7	0,75
N-Stoffwechsel	*gltA*	2.1	1.75	0.85
	gltB	7	9	5.5
	rocG	0.1	0.15	0.2
	rocDEF	-	0.3	-
	rocABC	0.2	0.2	0.1
	gudB	0.3	0.5	0.8
	aspB	2.5	2	4
	nrgA	0.35	0.4	0.2

	glnA	1,3	1,3	2,3
	argC	0,7	0,7	1
	argG	0,6	0,6	0,85
	carA	0,6	0,7	0,85
	pps	0,4	0,5	0,4
	mleA	0,4	0,75	0,55
	ansA	0,5	0,65	0,45
	gltP	0,3	0,4	0,25
	gltT	0,75	0,75	0,9

Tab. 7.6. Vollständige Liste der Transkriptomanalyse mit den ausgewählten *sgd*-Mutanten

[1] n.a. = nicht auswertbar.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Fabian Moritz Commichau
Geburtsdatum, -ort	5.11.1976, Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Brigitte Commichau geb. Handrack;
	Volker Commichau
Geschwister	Sebastian Caspar Commichau,

Schulausbildung

1983-1985	Besuch der Grundschule Roetgen
1985-1996	Besuch der Freien Waldorfschule Aachen

Zivildienst

1996-1997	Altenpflegeeinrichtung, Rieseby Schleswig-Holstein

Studium

1997-2003	Studium der Biologie an der RWTH Aachen
1999	Vordiplom
2003	Diplom, Aachen im April 2003
2003-2006	Promotion an der Georg-August-Universität Göttingen