

Proteinphosphorylierung in Bakterien – Regulation von Genexpression, Transportfunktionen und Stoffwechselvorgängen

Von Josef Deutscher* und Milton H. Saier, Jr.

Die wichtige Rolle der Proteinphosphorylierung zur Regulation der unterschiedlichsten Prozesse in eukaryontischen Zellen ist seit langem bekannt und sehr gut untersucht; der eindeutige Nachweis der Proteinphosphorylierung in Bakterien gelang dagegen erst vor weniger als einem Jahrzehnt. Mittlerweile kennt man fünf bakterielle Proteine, deren Aktivität durch reversible Phosphorylierung kontrolliert wird: Die Phosphorylierung der Isocitrat-Dehydrogenase steuert unter bestimmten Wachstumsbedingungen den weiteren Abbauweg von Isocitrat über entweder den Citratcyclus oder den Glyoxylatcyclus. Die Phosphorylierung von HPr, einem Phosphorylcarrier-Protein des Phosphotransferase-Systems, reguliert in Gram-positiven Bakterien die Kohlenhydrataufnahme über dieses Transportsystem. Die Phosphorylierung der Glycerin-Kinase in *Streptococcus faecalis* reguliert den Transport und den Abbau von Glycerin. Die Phosphorylierung des Stickstoffregulator-Proteins I (NR_I) in *E. coli* steuert die Genexpression der Enzyme, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind. Die Phosphorylierung der Citrat-Lyase-Ligase bei *Clostridium sphenoides* schließlich reguliert die Umwandlung der Citrat-Lyase von der inaktiven Mercapto- in die aktive Acetylform und damit den weiteren Abbauweg von Citrat. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß in *E. coli* mehr als hundert Proteine phosphoryliert werden. Man darf daher erwarten, daß die Proteinphosphorylierung bei Bakterien eine genauso wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Prozesse spielt, wie dies bei Eukaryontenzellen der Fall ist.

1. Einleitung

Zahlreiche Enzymaktivitäten werden durch Proteinmodifizierungsreaktionen gesteuert, die nach der Proteinbiosynthese (posttranslational) stattfinden. Die kovalente, reversible Modifizierung eines Proteins erfordert sowohl den enzymatisch katalysierten Transfer der modifizierenden Gruppe von einem Donormolekül zum Protein als auch die enzymatische Abspaltung dieser Gruppe vom Protein (Abb. 1). Diese beiden entgegengesetzt wirkenden Enzymaktivitäten – Modifizierung und Demodifizierung eines Proteins – werden häufig durch „second messengers“ (c-AMP, c-GMP, Ca²⁺) oder durch zelluläre Metabolite geregelt. Das Verhältnis von modifiziertem Protein zu unmodifiziertem Protein in einer Zelle hängt von der Abstimmung dieser beiden Enzymaktivitäten ab. Da modifiziertes und unmodifiziertes Enzym meist verschiedene K_M- und V_{max}-Werte gegenüber ihren Substraten aufweisen, ist damit ein Mechanismus zur Regulation der Enzymaktivität gegeben. Bei Enzymen, deren Aktivität zusätzlich durch Effektormoleküle geregelt wird (Allosterie), kann die Modifizierung auch eine veränderte Affinität zum Effektor und auf diesem Weg eine veränderte Enzymaktivität bewirken. Ein weiterer, kürzlich entdeckter Mechanismus der Enzymregulation durch Proteinmodifizierung, der als „zero order“-Ultrasensitivität bezeichnet wurde, wird in Abschnitt 2 ausführlich besprochen werden.

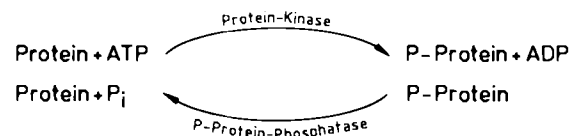


Abb. 1. Reaktionen bei einer reversiblen Proteinmodifizierung, dargestellt am Beispiel der Phosphorylierung eines Proteins.

Unter den reversiblen, posttranslationalen Proteinmodifizierungen (Tabelle 1) nimmt die Proteinphosphorylierung die wichtigste Stellung ein. 1943 beobachteten Cori und Green, daß die Glycogen-Phosphorylase, die Glycogen unter Bildung von Glucose-1-P abbaut, in zwei inein-

Tabelle 1. Auflistung der am häufigsten vorkommenden, reversiblen Proteinmodifizierungen, der zugehörigen Donormoleküle und der dabei im Protein modifizierten Aminosäuren.

Modifizierung	Donormolekül	Modifizierte Aminosäure
Phosphorylierung	ATP, GTP, PEP	Serin Threonin Tyrosin Histidin
Methylierung	S-Adenosylmethionin	Aspartat Glutamat Lysin Histidin Glutamin
Acetylierung	Acetyl-CoA	Lysin Cystein
Sulfatierung	3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat	Tyrosin
ADP-Ribosylierung	NAD ⁺	Arginin Lysin Glutamat
Nucleotidylierung (Adenylylierung, Uridylierung)	ATP, UTP	Tyrosin Serin
Tyrosylierung	Tyrosin	Carboxylterminus

[*] Dr. J. Deutscher
Max-Planck-Institut für Systemphysiologie
Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund 1
Prof. Dr. M. H. Saier, Jr.
Department of Biology, C-016
University of California, San Diego
La Jolla, CA 92093 (USA)

ander umwandelbaren Formen, die sie als a und b bezeichneten, vorkommt^[1]. Es dauerte aber noch zwölf Jahre, bis nachgewiesen wurde, daß Phosphorylase a die phosphorylierte und Phosphorylase b die unphosphorylierte Form des Enzyms sind^[2,3]. Glycogen-Phosphorylase war damit das erste Protein, bei welchem Phosphorylierung und Dephosphorylierung nachgewiesen werden konnten. Phosphorylierte und unphosphorylierte Form des Enzyms unterscheiden sich in ihrer Aktivität und verhalten sich darüber hinaus verschieden bei der allosterischen Aktivierung durch Adenosinmonophosphat^[4]. In der Folge konnte gezeigt werden, daß auch die Phosphorylase-Kinase, jenes Enzym, das die Phosphorylierung der Glycogen-Phosphorylase katalysiert, durch reversible Phosphorylierung reguliert wird^[5]. Als wenig später nachgewiesen wurde, daß auch das Enzym Glycogen-Synthetase, das Glycogen aus UDP-Glucose bildet, in phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form vorkommt^[6], war man überzeugt, das Phänomen der reversiblen Proteinphosphorylierung sei auf Proteine des Glycogenmetabolismus beschränkt. Bald fand man jedoch, daß auch die Aktivität anderer Enzyme, z. B. der mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase^[7], durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird. Vor allem erkannte man, daß die Phosphorylase-Kinase von einer c-AMP-abhängigen Protein-Kinase phosphoryliert wird, die neben der Phosphorylase-Kinase noch zahlreiche andere Proteinsubstrate phosphoryliert. Dies erklärt zum Teil die vielfältigen Effekte, die von c-AMP in der Zelle ausgeübt werden^[8,9]. Heute weiß man, daß die Phosphorylierung von Proteinen so unterschiedliche Prozesse wie Protein-, Kohlenhydrat-, Lipid- und Nucleinsäurestoffwechsel, DNA-Reparatur, Genexpression, Muskelkontraktion sowie Rezeptor- und Transportfunktionen reguliert. Bei all diesen Prozessen werden die Proteine meist an einem Serin-, weniger häufig an einem Threoninrest phosphoryliert (Abb. 2).

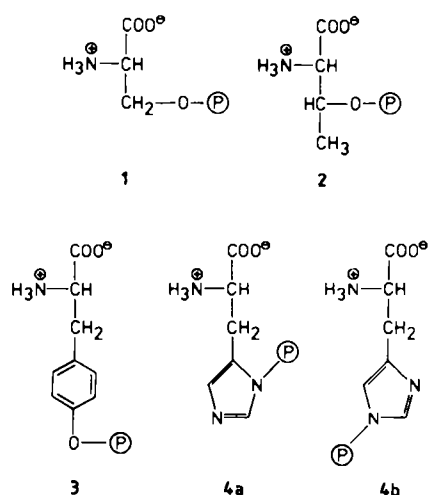


Abb. 2. Strukturformeln der in Phosphoproteinen am häufigsten anzutreffenden phosphorylierten Aminosäuren Serin 1, Threonin 2, Tyrosin 3 und Histidin 4a und 4b. Nicht selten beobachtet man, daß in einem Protein zwei oder mehr Aminosäuren phosphoryliert werden können.

Ende der siebziger Jahre wurde entdeckt, daß pp60^{v-src}, jenes Protein, das die transformierenden Eigenschaften des Rous-Sarcoma-Virus bewirkt, Proteinkinase-Aktivität

hat^[10]. Anders als die bis dahin bekannten Protein-Kinasen phosphoryliert pp60^{v-src} in Proteinen jedoch nicht einen Serin- oder Threonin-, sondern einen Tyrosinrest^[11]. Heute kennt man acht Protein-Tyrosinkinasen, die alle das Produkt viraler Onkogene sind. Diese viralen Onkogene leiten sich vermutlich alle von zellulären Protoonkogenen ab, deren Genprodukte normale regulatorische Funktionen in der Zelle erfüllen. Im Gegensatz dazu weisen virale Onkogene Mutationen oder DNA-Deletionen auf, die vermutlich die Transformation einer Zelle nach der Virusinfektion bedingen. Die Identifizierung der Proteinsubstrate Onkogen-codierter Protein-Tyrosinkinasen ist daher heute ein Hauptziel bei der Erforschung der Transformation oder Differenzierung von Zellen^[1].

Anders als bei Viren, Pilzen und höheren Organismen war es bei Bakterien lange zweifelhaft, ob auch bei ihnen die Proteinphosphorylierung zur Regulation zellulärer Prozesse genutzt wird. Roseman et al. hatten 1964 das bakterielle Phosphotransferase-System (PTS), ein Transportsystem für Zucker und Zuckeralkohole, in *Escherichia coli* entdeckt^[12] und gefunden, daß die Proteine dieses Transportsystems phosphoryliert werden. Enzym I und die verschiedenen Enzyme III des PTS werden an N-3 eines Histidins (vgl. 4b) und HPr und die verschiedenen Enzyme II an N-1 eines Histidins (vgl. 4a) phosphoryliert (Abb. 2) (HPr ist ein Phosphorylcarrier-Protein des PTS). Die Phosphorylierung dieser Proteine am Histidin erfüllt jedoch keine regulatorische, sondern eine katalytische Funktion, d. h. die Proteine bilden eine Phosphorylierungskette, wobei die Phosphatgruppe ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) als Phosphatdonor auf den zu transportierenden Zucker übertragen wird (vgl. dazu Abb. 4). Obwohl die PEP-abhängige Phosphorylierung der Proteine des PTS damit nicht unter die Kategorie der hier besprochenen reversiblen Proteinphosphorylierung zur Erfüllung regulatorischer Funktionen fällt, wird uns dieses Transportsystem in den Abschnitten 3 und 4 ausführlich beschäftigen.

Ein erster Bericht über eine c-AMP-abhängige Protein-Kinase in *E. coli*, die Histone aus Kalbsthymus phosphoryliert, stammt von Kuo und Greengard (1969)^[13]. Wenige Jahre später beobachteten Rahmsdorf et al. Proteinphosphorylierung in *E. coli* nach Infektion mit dem Bakteriophagen T7^[14]. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Protein-Kinase nicht vom *E. coli*-Genom, sondern von den frühen Genen des Phagengenoms codiert wird^[15]. Diese Protein-Kinase wird unmittelbar (etwa 4 min) nach der Infektion synthetisiert und führt dann zur Phosphorylierung von 40 bis 50 Proteinen von *E. coli*. Darunter befinden sich einige ribosomale Proteine, aber auch die β - und β' -Untereinheit der *E. coli*-RNA-Polymerase^[16]. Die Phosphorylierung dieser Proteine durch die Protein-Kinase des Bakteriophagen T7 führt vermutlich dazu, daß die Synthese von *E. coli*-Wirtsproteinen eingestellt wird und danach nur noch Proteine des Bakteriophagen T7 synthetisiert werden.

Der erste eindeutige Nachweis einer bakteriellen Protein-Kinase, die auch Bakterienproteine phosphoryliert, gelang Wang und Koshland bei *Salmonella typhimurium*^[17].

[*] Der interessierte Leser sei darauf hingewiesen, daß die Phosphorylierung von Proteinen in Eukaryontenzellen ausführlich in folgendem Werk zusammengefaßt ist: P. D. Boyer, E. G. Krebs (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 17 (1986) und Vol. 18 (1987), Academic Press, New York.

Diese Autoren fanden nach Puls-Label-Experimenten mit ^{32}P -Phosphat vier phosphorylierte Proteine und konnten später auch vier Protein-Kinasen mit unterschiedlicher Substratspezifität und unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Inhibitoren nachweisen^[18]. Das erste bakterielle Protein, das als Ziel einer bakteriellen Protein-Kinase identifiziert wurde, war die Isocitrat-Dehydrogenase aus *E. coli*^[19]. Die Regulation dieses Proteins wird zusammen mit der Phosphorylierung der Isocitratlyase in Abschnitt 2 behandelt werden. In Abschnitt 3 werden wir die ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr des bakteriellen Phosphotransferase-Systems in Gram-positiven Bakterien besprechen, bevor wir in Abschnitt 4 auf die ungewöhnliche Regulierung der Dihydroxyaceton/Glycerin-Kinase von *Streptococcus faecalis* durch reversible Phosphorylierung mit P-his-HPr eingehen werden. Danach werden wir die Phosphorylierung des Stickstoffregulator-Proteins I (NR_I) durch das Stickstoffregulator-Protein II (NR_{II}) behandeln, einen Prozeß, der die Transkription des für Glutamin-Synthetase codierenden *glnA*-Gens in *E. coli* reguliert. Im letzten Abschnitt werden wir weitere Proteinphosphorylierungs-Reaktionen in Bakterien besprechen und einen Ausblick auf die künftige Forschung geben.

2. Regulation der Isocitrat-Dehydrogenase von *E. coli* durch reversible Phosphorylierung

Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) ist ein Enzym des Citratcyclus, das Isocitrat unter NADP-abhängiger Oxidation und unter CO_2 -Abspaltung zu α -Ketoglutarat umsetzt. Der Abbauweg von Isocitrat über den Citratcyclus dient vornehmlich der Energiegewinnung. Isocitrat kann aber auch von der Isocitrat-Lyase (ICL) im ersten Schritt des Glyoxylatcyclus zu Glyoxylat und Succinat gespalten werden. Glyoxylat wird unter Verbrauch von Acetyl-CoA weiter zu Malat umgesetzt; der Glyoxylat-Seitenweg mündet damit wieder in den Citratcyclus (Abb. 3)^[20]. Das ebenfalls entstehende Succinat kann für die Synthese von Zellbausteinen verwendet werden. Die Enzyme des Glyoxylat-Seitenweges sind induzierbar, d. h. sie werden von den Bakterienzellen nur dann synthetisiert, wenn sie auf Acetat, Ethanol oder Fettsäuren als einziger C-Quelle wachsen. Unter diesen Bedingungen ist der Glyoxylatcyclus für die Bakterien der einzige Weg, um Zellbausteine zu erzeugen. Isocitrat muß dann sowohl zur Energiegewinnung über den Citratcyclus als auch zur Bildung von Zellbausteinen über den Glyoxylatcyclus metabolisiert werden. *Garnak* und *Reeves* hatten beobachtet, daß die ICDH-Aktivität abnahm, wenn *E.-coli*-Zellen auf Acetat als C-Quelle wuchsen. Diese Verminderung der ICDH-Aktivität ging mit der Phosphorylierung des Enzyms einher^[19]. Die phosphorylierte Form des Enzyms konnte von *E.-coli*-Zellen, die auf ^{32}P -Phosphat gewachsen waren, gereinigt werden. Partielle Säurehydrolyse des gereinigten, mit ^{32}P -Phosphat markierten Proteins und anschließende Trennung der Hydrolyseprodukte ergab, daß die ICDH an einem Serinrest phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung der ICDH führt zu einem nahezu vollständigen Verlust der Enzymaktivität unter V_{max} -Bedingungen^[21,22]. Spaltung von phosphorylierter, radioaktiv markierter ICDH mit entweder Trypsin^[23] oder

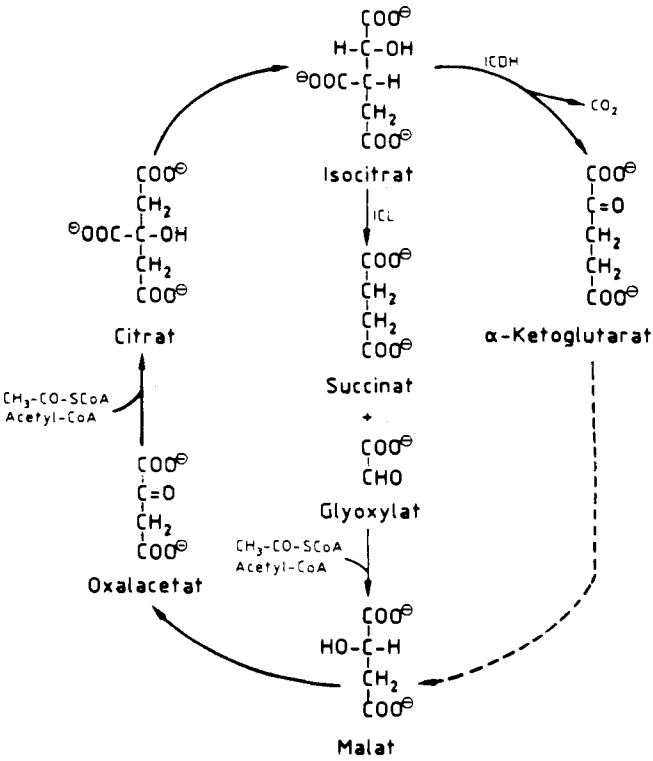


Abb. 3. Abbauwege von Isocitrat in *E. coli* über entweder den Citratcyclus (katalysiert von Isocitrat-Dehydrogenase, ICDH) oder den Glyoxylatcyclus (katalysiert von Isocitrat-Lyase, ICL). Das dabei entstehende Succinat kann für Biosynthesereaktionen verwendet werden, während Glyoxylat mit Acetyl-CoA zu Malat umgesetzt wird. Damit mündet der Glyoxylatcyclus wieder in den Citratcyclus.

Chymotrypsin^[24] ergab jeweils nur ein radioaktiv markiertes Peptid, das isoliert und sequenziert wurde. Die Sequenz in der Umgebung des phosphorylierten Serins in ICDH ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Es ist keine Homologie zu Phosphorylierungsstellen eukaryontischer Phosphoproteine zu erkennen. P-ICDH, das aus Zellen isoliert wurde, und P-ICDH, das in vitro mit ATP und ICDH-Kinase hergestellt worden war, hatten übereinstimmende Phosphorylierungsstellen. Interessant ist, daß die Sequenz um das phosphorylierte Serin (Arg-Ser-Leu-Asn) auch in Dihydrofolat-Reduktase aus Hühnerleber, einem anderen NADPH-abhängigen Enzym, vorkommt^[25]. Da bei der Dihydrofolat-Reduktase diese Sequenz nahe der NADP-Bin-

Tabelle 2. Aminosäuresequenzen der Phosphorylierungsstellen von Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) aus *E. coli* und der HPr-Proteine aus *S. aureus*, *S. faecalis* und *B. subtilis*. Die Sternchen bezeichnen die phosphorylierte Aminosäure. Für HPr aus *E. coli* konnte eine ATP-abhängige Phosphorylierung nicht nachgewiesen werden.

ICDH (<i>E. coli</i>)	-Pro-Val-Gly-Gly-Gly-Ile-Arg-Ser [*] -Leu-Asn-Val-Ala-Leu-Arg-106	119
HPr (<i>S. aureus</i>)	-Gly-Lys-Lys-Val-Asn-Leu-Lys-Ser [*] -Ile-Met-Gly-Val-Met-Ser-39	52
HPr (<i>S. faecalis</i>)	-Gly-Lys-Ser-Val-Asn-Leu-Lys-Ser [*] -Ile-Met-Gly-Val-Met-Ser-39	52
HPr (<i>B. subtilis</i>)	-Gly-Lys-Thr-Val-Asn-Leu-Lys-Ser [*] -Ile-Met-Gly-Val-Met-Ser-39	52
HPr (<i>E. coli</i>)	-Gly-Lys-Ser-Ala-Ser-Ala-Lys-Ser-Leu-Phe-Lys-Leu-Gln-Thr-39	52

dungsstelle liegt, wurde vermutet, daß das phosphorylierte, NADPH-abhängige ICDH das Coenzym nicht mehr binden kann. Wie durch Fluoreszenz-Titrationsexperimente gezeigt werden konnte, bindet NADPH tatsächlich nicht an phosphorylierte, inaktive ICDH, wohl aber stöchiometrisch an aktive, unphosphorylierte ICDH^[26]. Dieser Effekt beruht auf der negativen Ladung der Phosphatgruppe: Wird nämlich der phosphorylierbare Serinrest in Position 113 der Aminosäuresequenz der ICDH gegen einen Asparaginsäurerest ausgetauscht, führt dies ebenfalls zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms^[114].

ICDH-Kinase, das Enzym, das die Phosphorylierung der ICDH katalysiert, wurde zuerst von *LaPorte* und *Koshland* gereinigt^[27]. Ein überraschendes Ergebnis war, daß dieses Enzym ($M_r = 66\,000$) nicht nur ICDH-Kinase, sondern auch P-ICDH-Phosphatase-Aktivität besaß. Zwei entgegengesetzt wirkende Enzymaktivitäten sind hier auf einer Polypeptidkette vereint. Eine ähnliche Beobachtung war zuvor schon für die Enzyme 6-Phosphofructo-2-Kinase und Glutaminsynthetase-Adenyltransferase gemacht worden^[28]. Die Regulation der beiden Enzymaktivitäten ICDH-Kinase und ICDH-Phosphatase erfolgt durch intrazelluläre Metabolite. Isocitrat, Pyruvat, ADP, Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat und 3-Phosphoglycerat hemmen alle die ICDH-Kinase-Aktivität und stimulieren die ICDH-Phosphatase-Aktivität, die wiederum von NADPH gehemmt wird^[29]. Citrat, Fructose-6-phosphat und Glyoxylat inhibieren nur die ICDH-Kinase-Aktivität und haben keinen Einfluß auf die ICDH-Phosphatase-Aktivität^[30]. Unter in-vivo-Bedingungen stimuliert Pyruvat sowohl in Wildtypstämmen als auch in Stämmen mit defektem Pyruvatmetabolismus die ICDH-Aktivität^[30]. Dies deutet auf eine direkte Wechselwirkung von Pyruvat mit ICDH-Kinase/Phosphatase hin. Der wichtigste Effektor der ICDH-Kinase/Phosphatase scheint aber Isocitrat zu sein. Bei Wachstum von *E.-coli*-Zellen auf Acetat treten hohe Konzentrationen von Isocitrat (bis 0,6 mM) auf, die zum einen den Abbau von Isocitrat über den Glyoxylat-Seitenweg ermöglichen, da die Isocitrat-Lyase einen relativ hohen K_M -Wert für Isocitrat hat (um 1 mM), und die zum anderen zur Dephosphorylierung der P-ICDH und damit zu erhöhter ICDH-Aktivität führen^[31].

Im Zusammenhang mit der Regulation der ICDH durch reversible Phosphorylierung wurde auch der Fall der „zero order“-Ultrasensitivität diskutiert^[32]. Obwohl schon früher mathematisch formuliert, gelang am Beispiel der ICDH-Kinase/Phosphatase zum erstenmal der experimentelle Nachweis dieses Regulationsmechanismus. Das Phänomen beruht darauf, daß ein relativ geringer Anstieg der maximalen Geschwindigkeit eines Konverterenzyms (im Falle der ICDH also ICDH-Phosphatase oder ICDH-Kinase) unter Bedingungen, bei denen das Konverterenzym im Sättigungsbereich arbeitet, zu einer erheblichen Verschiebung des Verhältnisses von modifiziertem Protein zu nicht-modifiziertem Protein führen kann^[33]. Gerade dieses Verhältnis ist, wie schon angedeutet, von größter Bedeutung für die Aktivität eines Enzyms, das reversibel phosphoryliert wird.

Die Bedeutung der Phosphorylierung der ICDH für die Regulation des Stoffwechselflusses durch den Glyoxylat-Seitenweg wird noch dadurch hervorgehoben, daß ICDH-Kinase/Phosphatase zusammen mit den Enzymen des

Glyoxylat-Seitenweges, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, das Glyoxylat(*ace*)-Operon bildet. Die Regulation der beiden konkurrierenden Stoffwechselwege Citratcyclus und Glyoxylatcyclus scheint noch komplexer zu sein, da auch das zweite, um Isocitrat konkurrierende Enzym, die Isocitrat-Lyase (vgl. Abb. 3), in vitro phosphoryliert wird^[34]. Die Phosphorylierung dieses Enzyms erfolgt jedoch nicht an einem Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest, sondern an N-1 eines Histidinrestes (vgl. 4a in Abb. 2)^[115]. Anders als bei ICDH scheint die phosphorylierte Form der Isocitrat-Lyase die aktive Form zu sein. Weitere Untersuchungen werden sicherlich über die Bedeutung dieser Phosphorylierung in vivo Auskunft geben. Deutlich wird aber schon jetzt, daß die Regulation der Enzyme an der Verzweigung von Citratcyclus und Glyoxylatcyclus für Enterobacteriaceen von größter Wichtigkeit ist. Die Aufteilung des Stoffflusses auf beide Cyclen für sowohl Energiegewinnung als auch Bereitstellung von Biosynthesemolekülen ermöglicht es den *E.-coli*-Zellen, auf Acetat oder Ethanol als einziger C-Quelle zu wachsen. Die Fähigkeit, auf unterschiedlichsten Substraten gedeihen zu können, ist eines der hervorstechenden Merkmale von Bakterien. Welch komplexe zelluläre Prozesse dafür manchmal notwendig sind, wird am Beispiel der Regulation von ICDH und Isocitrat-Lyase durch reversible Proteinphosphorylierung deutlich.

3. Regulation der Kohlenhydrataufnahme über das Phosphotransferase-System bei Gram-positiven Bakterien

Anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien enthalten ein Transportsystem für Kohlenhydrate, das 1964 von *Kundig*, *Ghosh* und *Roseman* erstmals beschrieben und als bakterielles Phosphotransferase-System (PTS) bezeichnet wurde^[12]. Es ist ein wesentliches Merkmal dieses Transportsystems, daß Zucker oder Zuckerkalkohole während des Transports in die Zelle phosphoryliert werden. Transport und Phosphorylierung sind aneinander gekoppelt^[35]. Energie- und Phosphatdonor für Transport und Phosphorylierung ist Phosphoenolpyruvat. Die Phosphatgruppe wird dabei über eine Phosphorylierungskette, die meist aus vier Proteinen besteht, während des Transportvorganges auf den Zucker übertragen (Abb. 4). So wichtige Monosaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, aber auch Zuckerkalkohole wie Mannit und Sorbit und Disaccharide wie Lactose und Sucrose werden über das PTS aufgenommen. Die Proteine Enzym I und HPr sind die allgemeinen, nicht für einen bestimmten Zucker spezifischen Protein-Komponenten des PTS, während es für jeden Zucker, der über das PTS transportiert wird, ein für diesen Zucker spezifisches Enzym-II/Enzym-III-Paar gibt, wie in Abbildung 4 für Lactose und Mannit dargestellt. Enzym I, HPr und Enzym III sind wasserlösliche Proteine, und nur Enzym II ist ein integrales Membranprotein, dessen Polypeptidkette die Lipiddoppelschicht der Membran vermutlich mehrmals durchquert^[36]. Wie schon in Abschnitt 1 erwähnt, ist die Phosphatgruppe bei den Proteinen des PTS an N-1 (HPr, Enzym II) oder N-3 (Enzym I, Enzym III) eines Histidinrestes gebunden.

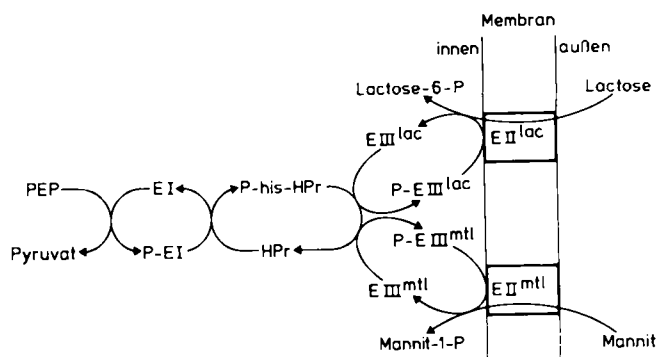


Abb. 4. Schematische Darstellung der Proteinphosphorylierungskette des Phosphotransferase-Systems. Die Phosphatgruppe wird von Phosphoenolpyruvat (PEP) über die Proteine Enzym I (E I), HPr, Enzym III (E III) und Enzym II (E II) auf das Zuckermolekül während dessen Transport in die Zelle übertragen. Für jeden Zucker gibt es ein spezifisches Enzym-II-/Enzym-III-Paar. Bei *S. aureus* und *S. faecalis* werden Lactose und Mannit nach dem abgebildeten Schema in die Zelle transportiert.

Im Zusammenhang mit dem Regulationsphänomen der Inducer-Expulsion entdeckte man, daß HPr auch einer ATP-abhängigen Phosphorylierung unterliegt^[37]. Die Inducer-Expulsion ist ein Regulationsmechanismus, bei dem nicht-metabolisierbare Zuckernanaloga wie 2-Desoxyglucose oder Methyl- β -thiogalactosid, die über das PTS in die Zelle aufgenommen und als phosphorylierte Zucker akkumuliert werden, aus der Zelle als unphosphorylierte Zucker ausgeschleust werden, sobald ein metabolisierbarer PTS-Zucker, wie Glucose oder Mannose, dem Wachstumsmedium zugegeben wird^[38,39]. Dieser Regulationsmechanismus erwies sich als unabhängig von intrazellulärem ATP. Genauere Untersuchungen ergaben, daß die Zuckerphosphat-Phosphatase, die von den intrazellulär akkumulierten, nicht weiter metabolisierbaren Zuckerphosphaten die Phosphatgruppe abspaltet, ATP benötigt, was auf eine mögliche Phosphorylierung dieses Enzyms hindeutete^[40]. Tatsächlich beobachtete man, daß unter den Bedingungen der Inducer-Expulsion bei *Streptococcus pyogenes* ein Protein mit niedrigem Molekulargewicht phosphoryliert wird, das jedoch nicht die erwartete Zuckerphosphat-Phosphatase-Aktivität aufwies, sondern als HPr des PTS identifiziert wurde^[37].

Während der genaue Mechanismus der Inducer-Expulsion weiter im Dunkeln blieb, erwies sich die ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr als wichtig für die Regulation der Transportaktivität des PTS in Gram-positiven Bakterien. Neben HPr aus *S. pyogenes* wird auch HPr von *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium histolyticum*, *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus brevis* ATP-abhängig phosphoryliert, nicht jedoch HPr aus Gram-negativen Bakterien wie *E. coli*^[41-44,62]. Im Gegensatz zur PEP-abhängigen, von Enzym I katalysierten Phosphorylierung von HPr, die an einem Histidinrest stattfindet, wird bei der ATP-abhängigen Phosphorylierung ein Serinrest modifiziert (P-ser-HPr, am Serin phosphoryliertes HPr; P-his-HPr, am Histidin phosphoryliertes HPr). P-ser-HPr kann seine Phosphatgruppe nicht auf Zucker übertragen^[37]. Phosphorylierte, radioaktiv markierte Peptide konnten von ³²P-ser-HPr aus *S. faeca-*

lis^[45] und aus *S. aureus*^[*] isoliert und sequenziert werden (Tabelle 2). Von beiden Proteinen ist die Aminosäuresequenz bekannt; eine Zuordnung der Peptide war daher möglich. Danach wird Serin-46 in der Aminosäuresequenz von HPr ATP-abhängig phosphoryliert. Der Bereich um Serin-46 ist bei den drei aus Gram-positiven Bakterien isolierten HPr-Proteinen, deren Aminosäuresequenz bekannt ist (*S. aureus*, *S. faecalis*, *B. subtilis*^[46,47]), fast völlig gleich (Tabelle 2). HPr aus *E. coli* zeigt im Vergleich dazu nur geringe Homologie um Serin-46, was erklären dürfte, daß HPr aus *E. coli* von der HPr-Kinase Gram-positiver Bakterien nicht phosphoryliert wird.

Die ATP-abhängige HPr-Kinase, die die Bildung von P-ser-HPr katalysiert, wurde aus *S. faecalis*^[41], *S. pyogenes*^[42], *L. brevis*^[**] und *B. subtilis*^[***] gereinigt. Die Aktivität dieser Enzyme wird von intrazellulären Metaboliten wie Gluconat-6-P, 2-P-Glycerat und Fructose-1,6-diphosphat (FDP) stimuliert und von Phosphat inhibiert. P-ser-HPr-Phosphatase wurde von *S. faecalis* gereinigt^[48]. Dieses Enzym benötigt für optimale Aktivität hohe Phosphat-Konzentrationen (um 50 mM). Die ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr am Serin-46 führt zum nahezu vollständigen Verlust der PEP-abhängigen Phosphorylierung am Histidin^[49]. P-ser-HPr wird von PEP und Enzym I mehr als tausendmal langsamer phosphoryliert als HPr. Umgekehrt wird auch P-his-HPr deutlich langsamer von ATP und HPr-Kinase phosphoryliert als HPr^[41,42]. Die beiden Phosphorylierungsstellen am HPr scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen; die Bildung des zweifach phosphorylierten P₂(ser,his)HPr ist offenbar nur sehr schwer möglich. Die PEP-abhängige Phosphorylierung von P-his-HPr wird durch verschiedene Arten von Enzym III beschleunigt^[49]. Die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung ist nicht klar. Möglicherweise erklärt sie, daß einige PTS-Zucker bevorzugt gegenüber anderen in die Zelle transportiert werden. Wie am Beispiel der Phosphorylierung von *o*-Nitrophenylgalactosid, einem Lactoseanalogon^[48], und von Mannit^[****] durch die entsprechenden PTS-Enzyme aus *S. aureus* gezeigt werden konnte, führt die Phosphorylierung am Serin bei diesen beiden PTS-Substraten zu einer 150fachen Verminderung der PTS-Aktivität unter *V*_{max}-Bedingungen.

Da Wachstum von *S. aureus*-Zellen auf Lactose oder Mannit, wie auch auf anderen PTS-Zuckern, zu erhöhter Synthese von P-ser-HPr führt, lag die Vermutung nahe, daß die Bildung von P-ser-HPr zur Regulation der PTS-katalysierten Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle dient. Interessant waren in diesem Zusammenhang Arbeiten über die Regulation der Pyruvat-Kinase durch intrazelluläre Metabolite bei *S. lactis*^[50]. Dieses Enzym wird fast ebenso reguliert wie die HPr-Kinase aus *S. faecalis* und *S. pyogenes*, d. h. sie wird durch Phosphat-Konzentrationen über 3 mM gehemmt und durch FDP (25 mM) stimuliert. Untersuchungen über die Konzentrationsänderungen von FDP, PEP und Phosphat in *S. lactis*-Zellen, die aus einem Medium ohne C-Quelle in ein Glucose-haltiges Medium überführt wurden, hatten ergeben, daß im Medium ohne

[*] W. Hengstenberg, unveröffentlichte Ergebnisse.

[**] J. Reizer, A. Peterkofsky, A. Romano, unveröffentlichte Ergebnisse.

[***] J. Reizer, M. H. Saier, unveröffentlichte Ergebnisse.

[****] N. Meyer, J. Deutscher, unveröffentlichte Ergebnisse.

C-Quelle die Zellen etwa 50 mM Phosphat und etwa 5 bis 10 mM PEP enthielten, wogegen die Konzentration an FDP sehr niedrig (1 mM) war^[50, 51]. Die Anwesenheit von Glucose im Medium führte jedoch zu einem raschen Anstieg der FDP-Konzentration auf ca. 25 mM, während die Konzentrationen von Phosphat und PEP auf 3 mM bzw. 1 mM sanken. Dieser für Glucose beobachtete Effekt gilt sicher für alle über den Embden-Meyerhof-Weg abgebauten Kohlenhydrate und damit für nahezu alle PTS-Zucker. Die Aufnahme eines PTS-Zuckers in die Zelle und die damit verbundene Änderung der Konzentrationen von Glycolyse-Intermediaten und von Phosphat dürften nach dem in Abbildung 5 vorgeschlagenen Mechanismus zur Bildung von P-ser-HPr führen. Die hohe Konzentration von Phosphat in einem Medium ohne C-Quelle inhibiert die HPr-Kinase und stimuliert die P-ser-HPr-Phosphatase. Unter diesen Bedingungen wird überwiegend freies HPr in der Zelle vorliegen. Bei Aufnahme eines PTS-Zuckers in die Zelle führt dessen Abbau zu einem raschen Anstieg der FDP-Konzentration und zu einem Abfall der Phosphat-Konzentration. FDP stimuliert die HPr-Kinase; die Bildung von P-ser-HPr verlangsamt die Aufnahme von Kohlenhydrat in die Zelle. Gleichzeitig stimuliert FDP die Pyruvat-Kinase, was zu einer erhöhten Synthese und Umsetzung von ATP führt, die wiederum die intrazelluläre Phosphat-Konzentration ansteigen lassen. Dies aktiviert die P-ser-HPr-Phosphatase, die P-ser-HPr wieder zu freiem HPr umsetzt. In der Zelle wird sich ein Gleichgewicht einstellen, bei dem die Aktivitäten von HPr-Kinase, Pyruvat-Kinase und P-ser-HPr-Phosphatase so aufeinander abgestimmt sind, daß die Aufnahme eines Kohlenhydrats über das PTS dem Verbrauch dieses Kohlenhydrats angeglichen ist. Kürzlich gelang es, durch spezifische Mutagenese Serin-46 in HPr von *B. subtilis* gegen Alanin auszutauschen und das mutierte HPr, das nicht mehr ATP-abhängig phosphoryliert werden kann, jedoch 50% der PTS-Aktivität des

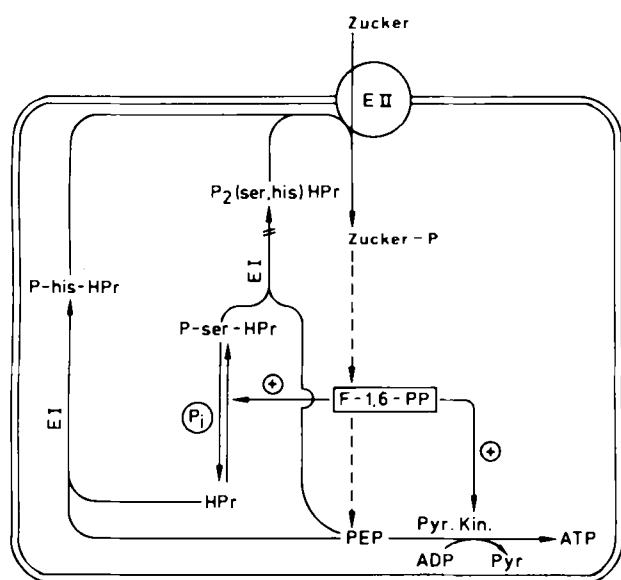


Abb. 5. Vermutlicher Einfluß der Phosphorylierung von HPr an einem Serinrest auf die Zuckeraufnahme über das Phosphotransferase-System in Grampositiven Bakterien. Die Abkürzungen bedeuten: E I, Enzym I; E II, Enzym II; P-ser-HPr, an Serin-46 phosphoryliertes HPr; P-his-HPr, an Histidin-15 phosphoryliertes HPr; P₂(ser,his)HPr, an Serin-46 und Histidin-15 phosphoryliertes HPr; Pyr.Kin., Pyruvat-Kinase; F-1,6-PP, Fructose-1,6-diphosphat; Pyr, Pyruvat; ⊕, Stimulierung.

normalen HPr hat, nach Expression in *E. coli* zu reinigen^{[47] [7]}. Dieses HPr kann daher nicht mehr von der HPr-Kinase reguliert werden. Das veränderte Gen für HPr wurde in einer Mutante ohne HPr-Aktivität exprimiert^[47]. Diese Experimente sollten Aussagen über die Bedeutung der P-ser-HPr-Bildung in vivo ermöglichen und sollten auch klären, ob ein Zusammenhang zwischen P-ser-HPr-Bildung und Inducer-Expulsion besteht oder ob dies zwei voneinander unabhängige Ereignisse sind, die aber unter gleichen Bedingungen beobachtbar sind.

Erwähnt sei noch, daß kürzlich über eine zweite ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr aus *S. salivarius* an N-3 eines Histidinrests berichtet wurde^[43]. Über die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierung ist jedoch nichts bekannt, und es ist auch nicht geklärt, ob Histidin-15, das PEP-abhängig an N-1 phosphoryliert wird, von dieser Phosphorylierung betroffen ist oder ob ein anderer Histidinrest in diesem HPr ATP-abhängig phosphoryliert wird.

4. Regulation der Glycerin-Kinase von *Streptococcus faecalis* durch P-his-HPr

Glycerin wird von Bakterien in allen bisher untersuchten Fällen durch erleichterte Diffusion in die Zelle aufgenommen^[52]. Ein in die Cytoplasmamembran eingelagertes Protein, der Glycerin-Facilitator, der eine für Glycerin und Dihydroxyaceton spezifische Pore bildet^[53], katalysiert den raschen Konzentrationsausgleich zwischen Wuchsmedium und Zellinnerem. Der Transportvorgang erfordert keine Energie, und die Glycerin-Konzentration in der Zelle kann daher maximal die Konzentration im Medium erreichen. Glycerin wird aber intrazellulär durch Glycerin-Kinase rasch zu Glycerinphosphat oder durch Glycerin-Dehydrogenase und Dihydroxyaceton-Kinase zu Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt. Die phosphorylierten Metabolite werden vom Glycerin-Facilitator nicht als Substrat erkannt und bleiben in der Zelle eingeschlossen. Daraus resultiert ein Nettofluß von Glycerin in die Zelle. Die Glycerin-Kinase ist daher sowohl für den Transport als auch für den Abbau von Glycerin wichtig. In den Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Salmonella typhimurium* wird die Aktivität der Glycerin-Kinase durch allosterische Interaktion mit Enzym III^{glc} des PTS reguliert^[54, 55]. Bei der Suche nach Enzym III^{glc} in Gram-positiven Bakterien entdeckte man, daß in *S. faecalis* ein Protein mit $M_r = 55\,000$ in Gegenwart der beiden PTS-Proteine Enzym I und HPr PEP-abhängig phosphoryliert wird^[56]. Obwohl dieses Protein wegen der von Enzym I und HPr katalysierten Phosphorylierung für ein Enzym III gehalten wurde (vgl. Abb. 4), konnte keine Enzym-III-Aktivität für dieses Protein gefunden werden. Versuche, für dieses Protein eine regulatorische Funktion ähnlich der des Enzyms III^{glc} bei Gram-negativen Bakterien nachzuweisen, führten zu seiner Identifizierung als Glycerin-Kinase^[57]. Dihydroxyaceton (DHA) erwies sich jedoch als besseres Substrat für dieses Enzym (niedrigerer K_m - und größerer V_{max} -Wert), weshalb es als DHA-/Glycerin-Kinase bezeichnet wurde. Abhängig von der Sauerstoffversorgung kann Glycerin von *S. faecalis* entweder

[*] J. Reizer, unveröffentlichte Ergebnisse.

(unter aeroben Bedingungen) zu Glycerinphosphat phosphoryliert werden oder (unter anaeroben Bedingungen) zuerst zu DHA reduziert und dann phosphoryliert werden^[58]. Die Phosphorylierung von sowohl DHA als auch Glycerin wird vermutlich von der DHA-/Glycerin-Kinase katalysiert. Die PEP-abhängige Phosphorylierung der DHA-/Glycerin-Kinase durch P-his-HPr findet an N-3 eines Histidinrests statt und führt zu einer zehnfachen Steigerung der Enzymaktivität^[57]. Die Phosphorylierung der DHA-/Glycerin-Kinase durch P-his-HPr ist jedoch langsam verglichen mit der Phosphorylierung von Enzym-III-Proteinen durch P-his-HPr. Phosphorylierte DHA-/Glycerin-Kinase kann die Phosphatgruppe zurück auf HPr übertragen, wobei wieder P-his-HPr entsteht.

Die Aufnahme eines PTS-Zuckers bei Gram-positiven Bakterien hemmt die Aufnahme von Glycerin^[59]. Zusätzlich war bei *B. subtilis* beobachtet worden, daß die Aufnahme von Glycerin in Mutanten ohne Enzym-I-Aktivität nahezu vollständig inhibiert war, daß also der Glycerintransport in vivo von einem funktionierenden PTS abhängt, obwohl Glycerin nicht über dieses Transportsystem in die Zelle gelangt^[60]. Die Abhängigkeit der Glycerinaufnahme vom PTS führte zu folgender Interpretation der Phosphorylierung der DHA-/Glycerin-Kinase durch P-his-HPr: Nehmen *S. faecalis*-Zellen keinen Zucker über das PTS auf, dann sind die Proteinkomponenten des PTS überwiegend phosphoryliert^[61]. Unter diesen Bedingungen wird die DHA-/Glycerin-Kinase von P-his-HPr phosphoryliert. Das phosphorylierte Enzym zeigt eine zehnfach erhöhte Aktivität, und Glycerin kann bei Abwesenheit eines PTS-Zuckers rasch von *S. faecalis* aufgenommen und metabolisiert werden. Ist jedoch ein PTS-Zucker im Medium vorhanden, dann sind die PTS-Proteine überwiegend unphosphoryliert^[61], da die Phosphatgruppe von den PTS-Proteinen rasch auf den Zucker übertragen wird. In der Konkurrenz um die Phosphatgruppe von P-his-HPr wird DHA-/Glycerin-Kinase gegenüber Enzym III unterliegen, da sie in vitro deutlich langsamer phosphoryliert wird als Enzym III^[57]. DHA-/Glycerin-Kinase wird daher bei Aufnahme eines PTS-Zuckers in der unphosphorylierten, weniger aktiven Form vorliegen. Dieses Modell erklärt sowohl die verlangsamte Aufnahme von Glycerin bei Anwesenheit eines PTS-Zuckers im Wachstumsmedium als auch die Abhängigkeit der Glycerinaufnahme von funktionsfähigen PTS-Proteinen (Enzym I und HPr).

Die Phosphorylierung der DHA-/Glycerin-Kinase ist jedoch in dreierlei Hinsicht ungewöhnlich. Erstens wirkt nicht ein Nucleosidtriphosphat als Phosphatdonor, sondern ein phosphoryliertes Protein (P-his-HPr), dessen Phosphatgruppe von PEP stammt. Zweitens scheint es keine P-Protein-Phosphatase zu geben, die die Phosphatgruppe von P-DHA-/Glycerin-Kinase abspaltet, sondern der Phosphattransfer ist reversibel – der Phosphorylierungszustand der DHA-/Glycerin-Kinase hängt vom Phosphorylierungszustand des HPr ab. Drittens ist die Phosphatgruppe in P-DHA-/Glycerin-Kinase an N-3 eines Histidinrests gebunden, was ebenfalls ungewöhnlich ist, aber die Reversibilität des Phosphattransfers zwischen HPr und DHA-/Glycerin-Kinase ermöglicht. Trotz dieser Besonderheiten erfüllt die Phosphorylierung der DHA-/Glycerin-Kinase die Kriterien einer reversiblen Proteinmodifizierung, die der Regulation einer Enzymaktivität dient. Die

Bedeutung dieser Phosphorylierungsreaktion für die Glycerinaufnahme intakter Zellen muß allerdings noch nachgewiesen werden.

Es sei noch erwähnt, daß kürzlich auch bei *Bacillus stearothermophilus* gezeigt werden konnte, daß die Glycerin-Kinase dieses Bakteriums von PEP, Enzym I und HPr phosphoryliert wird^[62]. Allerdings liegen hier noch keine Ergebnisse über eine Steigerung der Enzymaktivität durch Phosphorylierung oder eine Reversibilität des Phosphattransfers zwischen HPr und DHA-/Glycerin-Kinase vor. Umgekehrt scheint bei *B. subtilis* die Regulation der Glycerin-Kinase eher dem bei *E. coli* und *S. typhimurium* beobachteten Mechanismus einer allosterischen Interaktion mit Enzym III^[81c] zu folgen^[62].

5. Regulation der Transkription des *glnA*-Gens (Glutamin-Synthetase) durch Proteinphosphorylierung bei Enterobacteriaceen

Enterobacteriaceen wie *E. coli*, *S. typhimurium* oder *Klebsiella aerogenes* können auf einer Reihe anorganischer und organischer Stickstoffverbindungen, z. B. N_2 , NH_3 und NO_3^- oder Histidin, Prolin und Arginin, als einziger Stickstoffquelle wachsen und stickstoffhaltige Moleküle synthetisieren. Langjährige Forschungsarbeiten in vielen Laboratorien ermöglichten es nun, einen molekularen Mechanismus zu formulieren, der die Regulation der anabolischen und katabolischen Reaktionen des Stickstoffmetabolismus umfaßt^[63]. Für die Regulation der Glutamin-Synthetase wurde eine allosterische Interaktion mit mehreren Effektoren nachgewiesen^[63-65]. Bei diesem dodekaedrisch aus Untereinheiten aufgebauten Enzym wird eine kumulative Feedback-Inhibierung beobachtet, d. h. die Inhibitoren wie Histidin, Tryptophan, Alanin, Glycin, AMP, CTP, Carbamylphosphat und Glucosamin-6-phosphat binden an unterschiedliche Stellen des Enzyms, und die inhibitorische Wirkung eines jeden einzelnen Effektors kumuliert sich zu einer Gesamtinhibition. Dieser Mechanismus ermöglicht es den Bakterien, die Stoffwechselrate von Stickstoffverbindungen genau dem Bedarf anzupassen. Die Aktivität der Glutamin-Synthetase wird aber auch durch reversible, kovalente Proteinmodifizierung gesteuert. Adenylylierung der Glutamin-Synthetase an einem Tyrosinrest führt sowohl zu einer erniedrigten Enzymaktivität als auch zu einer veränderten allosterischen Regulation durch die Inhibitoren. Das Enzym, das die Adenylylierung der Glutamin-Synthetase katalysiert, wird seinerseits durch ein tetrameres Protein, das als P_{II} bezeichnet wird, allosterisch reguliert^[67]. P_{II} wiederum wird uridylyliert; diese Reaktion ist der Adenylylierung analog^[68]. Sowohl die Adenylyl-Transferase als auch die Uridylyl-Transferase sind bifunktionelle Enzyme, die wie die ICDH-Kinase/Phosphatase die Modifizierungs- und Demodifizierungsreaktion eines Proteins katalysieren. Intrazelluläre Stoffwechselintermediate wie α -Ketoglutarat, Glutamin oder Glutaminsäure, deren Konzentrationen von der Verfügbarkeit von Stickstoff im Medium abhängen, regulieren durch allosterische Interaktion die Aktivitäten dieser beiden Enzyme^[66, 69].

Zusätzlich zur Regulation der Glutamin-Synthetase durch Allosterie und Proteinmodifizierung schien auch die Transkription des für die Glutamin-Synthetase codierenden

den *glnA*-Gens einer Regulation zu unterliegen, wobei ursprünglich eine Beteiligung der Glutamin-Synthetase selbst angenommen wurde^[70-72]. Nachfolgende Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Produkte zweier neben dem Gen für Glutamin-Synthetase (*glnA*) liegender regulatorischer Gene (*ntrB* und *ntrC*) sowie das Produkt eines weiteren regulatorischen Gens (*ntrA* oder *rpoN*), das aber weit entfernt vom *glnA*-Gen und von den beiden anderen regulatorischen Genen lokalisiert ist (Abb. 6), die Expression des *glnA*-Gens steuern^[73,74]. Die Produkte von *ntrA*, *ntrB* und *ntrC* kontrollieren aber auch die Expression von *ntrB* und *ntrC*, nicht jedoch von *ntrA*^[75].

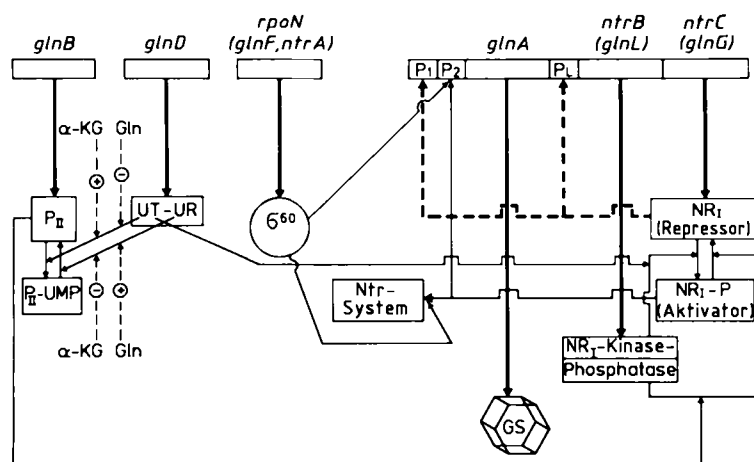


Abb. 6. Vorgeschlagener Mechanismus zur Regulation der Genexpression der am Stickstoffmetabolismus von *E. coli* beteiligten Enzyme [63]. Die fetten, ausgezogenen Pfeile weisen auf die jeweiligen Genprodukte hin, die mageren, ausgezogenen Pfeile kennzeichnen Protein-Protein-Interaktionen, die fetten, unterbrochenen Pfeile Protein-DNA-Interaktionen und die mageren, unterbrochenen Pfeile Interaktionen von Metaboliten mit Proteinen (⊕, stimulatorisch; ⊖, inhibitorisch). Die Abkürzungen bedeuten: GS, Glutamin-Synthetase; UT-UR, Uridylyltransferase-Uridylylremoving-Enzym; P_{II}-UMP, uridylyliertes P_{II}; NR_I-P, phosphoryliertes NR_I; α-KG, α-Ketoglutarat; Gln, Glutamin; *rpoN*, weiteres regulatorisches Gen; P₁, P₂ und P_L bezeichnen Promotorstellen (Bindestellen der RNA-Polymerase) auf der DNA. Umfassende Erläuterung siehe Text.

In den letzten Jahren wurden die Produkte der drei *ntr*-Gene identifiziert und partiell charakterisiert, was zu einem klareren Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Regulation der Transkription des *glnA*-Gens, das die Glutamin-Synthetase codiert, führte. Das Genprodukt des *ntrA*-Gens ist ein Protein mit $M_r = 60000$, das als Sigma-Faktor (σ^{60}) an RNA-Polymerase bindet, wobei es andere Sigma-Faktoren verdrängt. Mit σ^{60} beladene RNA-Polymerase-Moleküle transkribieren überwiegend nur Operone, deren Proteinprodukte am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind^[75]. Das *ntrC*-Gen codiert ein DNA-Bindeprotein (Stickstoffregulator-Protein), das als NR_I bezeichnet wurde^[76,77] und das sich neben mit σ^{60} beladener RNA-Polymerase als notwendig für die in-vitro-Transkription des *glnA*-Gens erwies^[78]. Das Genprodukt von *ntrB*, das NR_{II} genannt wurde^[79], wandelt NR_I reversibel von einem Transkriptionsrepressor in einen Transkriptionsaktivator um. Diese Modifizierungsreaktion wurde als ATP-abhängige Phosphorylierung von NR_I identifiziert^[80]. Auch NR_{II} ist ein bifunktionelles Enzym, das sowohl Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung von NR_I katalysiert und daher als NR_I-Kinase/Phosphatase bezeichnet wurde. An der Regulation der Transkription des Glutaminsynthetase-Gens sind auch die zuvor erwähnten Proteine P_{II} und Uridylyl-Transferase, die von den Genen *glnB* bzw. *glnD* codiert werden, beteiligt. Eine Serie von Proteinmodifizierungsreaktionen, die zu veränderten Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen führt, ermöglicht es den Bakterien, die Biosynthese der am Stickstoffmetabolismus beteiligten Enzyme bei Stickstoffmangel rasch anzuschalten und bei ausreichender Versorgung mit Stickstoff ebenso rasch wieder abzuschalten. In Abbildung 6 ist dieser Me-

chanismus schematisch dargestellt. Die Aktivität der NR_I-Kinase/Phosphatase wird von P_{II} und dem Enzym reguliert, das die Uridylylierung von P_{II} katalysiert (Uridylyltransferase-Aktivität UT; Uridylylremoving-Aktivität UR). Die UT-Aktivität, die zur Bildung von P_{II}-UMP führt, wird von α-Ketoglutarat stimuliert und von Glutamin inhibiert, während umgekehrt die UR-Aktivität von Glutamin stimuliert und von α-Ketoglutarat inhibiert wird^[66]. Stickstoffmangel, der eine hohe intrazelluläre Konzentration von α-Ketoglutarat und eine niedrige Glutamin-Konzentration bedingt, führt zur Umwandlung von P_{II} zu P_{II}-UMP, während umgekehrt bei hinreichender Versorgung der Bakte-

NR_i-Phosphatase-Aktivität der NR_i-Kinase/Phosphatase und stimuliert deren NR_i-Kinase-Aktivität. Wie ebenfalls in Abbildung 6 schematisch dargestellt, führt die Phosphorylierung von NR_i zu einer veränderten Interaktion mit der DNA. Anders als NR_i, das an den Promotor P_i bindet, was die Transkription inhibiert, bindet P-NR_i an den Promotor P₂ und stimuliert auf diese Weise die Transkription des *glnA*-Operons. Unter bestimmten Bedingungen werden dabei auch die *ntrB*- und *ntrC*-Gene transkribiert. Die Expression dieser beiden Gene scheint aber auch durch die Bindung von NR_i an den Promotor P_L unter Inhibierung der Transkription gesteuert zu werden^[85]. Daneben wird von den *ntr*-Genprodukten auch die Expression von Aminosäure-Permeasen und anderen am Stickstoffmetabolismus beteiligten Enzymen reguliert. Das Ntr-Regulationssystem ist das erste Beispiel, bei dem ein Transkriptionsrepressor durch Proteinphosphorylierung zu einem Transkriptionsaktivator umfunktioniert wird.

Die Beteiligung der Proteinphosphorylierung an der Regulation der Transkription bei Eukaryonten ist schon früher diskutiert worden^[86–88]. Es gibt fundierte genetische Hinweise, daß auch die Transkription bestimmter Proteine des bakteriellen Phosphotransferase-Systems durch Proteinphosphorylierung kontrolliert wird^[89]. Interessant ist, daß NR_i Sequenzhomologie zu einer Reihe anderer Transkriptionsaktivatoren zeigt, z. B. den Proteinen der Gene *phoB* und *ompR* bei *E. coli*^[116]. In Analogie zu NR_i wird auch für die Proteine PhoB und OmpR vermutet, daß sie einer reversiblen Proteinmodifizierung unterliegen, wobei die Proteine PhoR bzw. EnvZ jeweils als modifizierendes Enzym fungieren sollen. PhoR und EnvZ wiederum zeigen Homologie zu NR_i, der NR_i-Kinase/Phosphatase. Das Proteinpaar PhoB/PhoR ist wichtig für die Expression bestimmter Enzyme beim Wachstum der Zellen unter phosphatlimitierenden Bedingungen, wogegen das Proteinpaar OmpR/EnvZ auf Veränderungen der extrazellulären Osmolarität anspricht^[116]. Eine gewisse Homologie dieser Proteine besteht auch zu den an der Chemotaxis beteiligten Proteinen Tar, Tsr und Trg von *E. coli*, die ebenfalls auf extrazelluläre Signale reagieren^[117]. Alle drei Proteine sind integrale Membranproteine, die als Chemorezeptoren für Aspartat (Tar), Serin (Tsr) sowie Ribose und Galactose (Trg) fungieren und Änderungen der extrazellulären Konzentration ihrer jeweiligen Liganden ins Zellinnere signalisieren. Dabei spielt reversible Proteinmodifizierung (Methylierung an Glutamatresten) durch die Enzyme CheB und CheR eine wesentliche Rolle. Möglicherweise liegt der Signalübertragung in allen diesen Fällen, trotz unterschiedlicher reversibler Proteinmodifizierung, ein gemeinsames Prinzip zugrunde.

6. Weitere Proteinphosphorylierungsreaktionen in Bakterien

Die Veröffentlichung von Wang und Koshland über die Proteinphosphorylierung in *S. typhimurium*^[117] verursachte eine intensive Suche nach der Phosphorylierung von Proteinen bei anderen Bakterien. Neben den in den vorangegangenen Abschnitten zitierten Arbeiten erschien eine Reihe von Veröffentlichungen über die Proteinphosphorylierung

bei *Halobacterium halobium*^[90], bei *Myxococcus xanthus*^[91], bei *Rhodospirillum rubrum*^[118], beim Archaeobakterium *Sulfolobus acidocaldarius*^[92], bei *Clostridium sphenoides*^[93], bei *Synechococcus 6301*^[94], bei *Rhodocyclus gelatinosus*^[95], bei *Rhodomicrobium vannielii*^[96], bei *Bacillus subtilis*^[97] und bei *Mycoplasma gallisepticum*^[98]. Proteinmodifizierung durch eine phosphathaltige Gruppe war bei *Rhodospirillum rubrum*^[99, 100], *Rhodobacter capsulatus*^[101] und *Chromatium vinosum*^[102] nachgewiesen worden. Diese Modifizierungsreaktion wurde als ADP-Ribosylierung identifiziert^[103]. Einige der aufgeführten Beispiele sollen im folgenden näher besprochen werden.

Halobakterien haben lichtgetriebene H⁺- und Cl⁻-Pumpen, die zur Bildung von Ionengradienten über die Membran dieser Bakterien führen; diese Gradienten lassen sich dann für Transportvorgänge und andere energieabhängige Prozesse nutzen. Werden Zellen von *Halobacterium halobium*, die im Dunkeln mit ³²P-Phosphat markiert worden waren, dem Licht ausgesetzt, dann werden drei zuvor phosphorylierte Proteine dephosphoryliert und bei anschließender Dunkelphase rasch wieder phosphoryliert^[90, 104]. Die Dephosphorylierung erwies sich als abhängig von Retinal, dem Coenzym der Proteine Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin, die die lichtgetriebene Bildung von Ionengradienten katalysieren. Es wird daher vermutet, daß die drei Phosphoproteine, deren Phosphorylierungszustand von der Lichteinwirkung abhängig ist, an der Transduktion der Photoenergie beteiligt sind. Lichtabhängige Phosphorylierung zweier Proteine wurde auch beim Cyanobakterium *Synechococcus 6301* beobachtet^[94]. Eines dieser Proteine war in der Thylakoidmembran, die auch Träger der beiden Photosysteme I und II ist, lokalisiert. Über eine mögliche regulatorische Funktion dieser Proteine gibt es noch keine Anhaltspunkte.

Myxococcus xanthus und *B. subtilis* sind Bakterien, die Sporen bilden können. Bei beiden ist die Sporenbildung aus vegetativen Zellen von einer Änderung des Proteinphosphorylierungs-Musters begleitet^[91, 97]. Bei *Myxococcus xanthus* waren es vor allem zwei Membranproteine, deren Phosphorylierungszustand sich nach Einleiten der Sporenbildung durch Glycerin wesentlich änderte^[91]. Möglicherweise sind diese Proteine wichtig für die Erhaltung der Zellform. Eine Beteiligung an der Bildung der Zellform wird auch für ein Phosphoprotein mit M_r = 55 000 aus *Mycoplasma gallisepticum* diskutiert^[98].

Bei *Rhodospirillum rubrum*^[99, 100], bei *Rhodobacter capsulatus*^[101] und bei *Chromatium vinosum*^[102] wird die Aktivität des Enzyms Nitrogenase durch eine Proteinmodifizierung reguliert, die man ursprünglich für eine Phosphorylierung gehalten hatte. Das Enzym besteht aus einem molybdän- und einem eisenhaltigen Protein. Beim eisenhaltigen Protein beobachtete man eine aktive und eine inaktive Form^[99, 101], die ineinander umwandelbar sind. Die aktive Form tritt dann auf, wenn Zellen unter Ammonium-Mangel gezogen werden. In der aktiven Form hat das Eisen-Protein von *Rhodospirillum rubrum* nur eine Untereinheit mit M_r = 30 000. Die inaktive Form weist auf SDS-Polyacrylamidgelen jedoch zwei Untereinheiten mit M_r = 30 000 und 31 500 auf^[99]. Markierungsexperimente mit ³²P-Phosphat ergaben, daß die schwerere Untereinheit der inaktiven Form kovalent gebundenes Phosphat enthält. Die Phosphatgruppe kann von dieser Untereinheit abge-

spalten werden, die damit wieder in die aktive Form ($M_r = 30000$) überführt wird. Eine ähnliche Verschiebung des auf SDS-Polyacrylamidgelen ermittelten Molekulargewichts durch Phosphorylierung wurde für das Eisen-Protein der Nitrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* (von $M_r = 33500$ nach 38000) beobachtet. Experimente bei *R. rubrum* ergaben schließlich, daß die Nitrogenase an einem Argininrest kovalent gebundene ADP-Ribose enthielt^[103]. Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß die Aktivität der Nitrogenase bei diesen Bakterien durch reversible ADP-Ribosylierung reguliert wird; bei Stickstoffmangel tritt die aktive Form des Eisen-Proteins und bei hinreichender Stickstoffversorgung die modifizierte, inaktivierte Form auf. In Analogie zu anderen ADP-Ribosylierungsreaktionen ist vermutlich auch hier NAD das Donormolekül (siehe Tabelle 1).

In *Clostridium sphenoides* unterliegt das Enzym Citrat-Lyase-Ligase einer reversiblen Proteinphosphorylierung^[93]. Dieses Enzym katalysiert selbst eine Proteinmodifizierungsreaktion, und zwar die Umwandlung der inaktiven Mercaptoform der Citrat-Lyase in die aktive Acetylform (siehe Tabelle 1). Die Citrat-Lyase-Ligase kommt ebenfalls in einer aktiven und einer inaktiven Form vor, wobei die aktive Form das phosphorylierte Enzym ist. Dephosphorylierung führt zu einer Inaktivierung des Enzyms. Glutaminsäure stimuliert nicht nur die Umwandlung der inaktiven, unphosphorylierten Citrat-Lyase-Ligase in die aktive, phosphorylierte Form, sondern ist neben Citrat auch für die Acetylierung der Citrat-Lyase durch die aktive, phosphorylierte Form der Citrat-Lyase-Ligase nötig^[105]. Auch hier besteht also eine Proteinmodifizierungskaskade, die den Abbau von Citrat zu entweder Glutaminsäure oder zu Acetat und Oxalacetat reguliert.

Bei *E. coli* beobachtete man eine Autophosphorylierung des *dnaK*-Genprodukts^[106]. Dieses Protein ist vermutlich an der Replikation der DNA der Bakteriophagen λ und M13 beteiligt^[107, 108]. Autophosphorylierung ist häufig ein Charakteristikum von Protein-Kinasen. Tatsächlich fand man, daß das *dnaK*-Genprodukt an der Phosphorylierung der Glutaminyl-tRNA-Synthetase und der Threonyl-tRNA-Synthetase beteiligt ist^[109]. Interessant ist auch, daß die Infektion von *E. coli*-Zellen mit dem Phagen M13 zu einer veränderten Phosphorylierung des vom *dnaK*-Gen codierten Proteins führte. Dabei ist nicht nur der Anteil an phosphoryliertem Protein wesentlich erhöht, sondern das zuvor an Serin phosphorylierte Protein ist nach Infektion mit M13 fast ausschließlich an Threonin phosphoryliert^[110].

Auch Protein-Tyrosinphosphorylierung wurde bei Bakterien (*E. coli* und *Rhodospirillum rubrum*) gefunden^[111, 118]. Bei *E. coli* handelt es sich um ein an Ribosomen assoziiertes Protein, das an einem Tyrosinrest phosphoryliert wird^[112]. Eine genaue Analyse der Phosphoproteine wurde bei *E. coli* durch zweidimensionale Geltechnik versucht, wobei die Proteine in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach der Größe getrennt wurden. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen wurden dabei 20^[113] und unter aeroben Wachstumsbedingungen 128 phosphorylierte Proteine gefunden^[112]. Die genaue Kenntnis des isoelektrischen Punktes und des Molekulargewichts sollte in einigen Fällen die Identifizierung der Phosphoproteine erleichtern.

Die große Zahl noch unbekannter Phosphoproteine und die offenbar weit über die Regulation von Transkription, Transportfunktionen und Stoffwechselvorgängen hinausgehende Bedeutung der Proteinphosphorylierung machen deutlich, daß diese Reaktion auch bei Bakterien eine so zentrale Rolle bei der Regulation der verschiedensten zellulären Prozesse spielt, wie dies zuvor bei Eukaryontenzellen gezeigt worden ist.

Eingegangen am 12. Oktober 1987 [A 685]

- [1] G. T. Cori, A. A. Green, *J. Biol. Chem.* 151 (1943) 31.
- [2] E. H. Fischer, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 216 (1955) 121.
- [3] E. W. Sutherland, U. D. Wosilait, *Nature (London)* 175 (1955) 169.
- [4] A. A. Green, G. T. Cori, C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* 142 (1942) 447.
- [5] E. G. Krebs, D. J. Graves, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 2867.
- [6] D. L. Friedmann, J. Larner, *Biochemistry* 2 (1963) 669.
- [7] T. C. Linn, F. H. Pettit, F. Hucho, L. J. Reed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64 (1969) 227.
- [8] D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 3763.
- [9] E. W. Sutherland, *Science (Washington, D.C.)* 177 (1972) 401.
- [10] M. S. Collett, R. L. Erikson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2021.
- [11] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1311.
- [12] W. Kundig, S. Ghosh, S. Roseman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 (1964) 1067.
- [13] J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.* 224 (1969) 3417.
- [14] H.-J. Rahmsdorf, P. Herrlich, S. H. Pai, M. Schweiger, H. G. Wittmann, *MGG Mol. Gen. Genet.* 127 (1973) 259.
- [15] H.-J. Rahmsdorf, S. H. Pai, H. Ponta, P. Herrlich, R. Roskoski, Jr., M. Schweiger, F. W. Studier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 586.
- [16] W. Zillig, H. Fujiki, W. Blum, D. Janekovic, M. Schweiger, H.-J. Rahmsdorf, H. Ponta, M. Hirsch-Kauffmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2506.
- [17] J. Y. J. Wang, D. E. Koshland, Jr., *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 7605.
- [18] J. Y. J. Wang, D. E. Koshland, Jr., *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4640.
- [19] M. Garnak, H. C. Reeves, *Science (Washington, D.C.)* 203 (1979) 1111.
- [20] H. L. Kornberg, *Biochem. J.* 99 (1966) 1.
- [21] G. A. Nimmo, A. C. Borthwick, W. H. Holms, H. G. Nimmo, *Eur. J. Biochem.* 141 (1984) 401.
- [22] D. C. LaPorte, D. E. Koshland, Jr., *Nature (London)* 305 (1983) 286.
- [23] P. J. Malloy, H. C. Reeves, J. Spiess, *Curr. Microbiol.* 11 (1984) 37.
- [24] A. C. Borthwick, W. H. Holms, H. G. Nimmo, *FEBS Lett.* 174 (1984) 112.
- [25] K. W. Volz, D. A. Matthews, R. A. Alden, S. T. Freer, C. Hansch, B. T. Kaufman, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2528.
- [26] D. Garland, H. G. Nimmo, *FEBS Lett.* 165 (1984) 259.
- [27] D. C. LaPorte, D. E. Koshland, Jr., *Nature (London)* 300 (1982) 458.
- [28] H. G. Nimmo, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 9 (1984) 475.
- [29] H. G. Nimmo, A. C. Borthwick, E. M. T. El-Mansi, W. H. Holms, C. MacKintosh, G. A. Nimmo, *Biochem. Soc. Symp.*, im Druck.
- [30] E. M. T. El-Mansi, H. G. Nimmo, W. H. Holms, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 797.
- [31] E. M. T. El-Mansi, H. G. Nimmo, W. H. Holms, *FEBS Lett.* 183 (1985) 251.
- [32] D. C. LaPorte, D. E. Koshland, Jr., *Nature (London)* 305 (1983) 286.
- [33] D. C. LaPorte, K. Walsh, D. E. Koshland, Jr., *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 14068.
- [34] E. F. Robertson, J. C. Hoyt, H. C. Reeves, *Curr. Microbiol.* 15 (1987) 103.
- [35] P. W. Postma, J. W. Lengeler, *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 232.
- [36] C. A. Lee, M. H. Saier, Jr., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 10761.
- [37] J. Deutscher, M. H. Saier, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 6790.
- [38] J. Reizer, C. Panos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5497.
- [39] J. Thompson, M. H. Saier, Jr., *J. Bacteriol.* 146 (1981) 885.
- [40] J. Reizer, M. J. Novotny, C. Panos, M. H. Saier, Jr., *J. Bacteriol.* 156 (1983) 354.
- [41] J. Deutscher, R. Engelmann, *FEMS Microbiol. Lett.* 23 (1984) 157.
- [42] J. Reizer, M. J. Novotny, W. Hengstenberg, M. H. Saier, Jr., *J. Bacteriol.* 160 (1984) 333.
- [43] E. B. Waygood, R. L. Mattoo, E. Erickson, *Can. J. Microbiol.* 32 (1986) 310.
- [44] C. S. Mimura, F. Poy, G. R. Jacobson, *J. Cell. Biochem.* 33 (1987) 161.
- [45] J. Deutscher, B. Pevec, K. Beyreuther, H.-H. Kiltz, W. Hengstenberg, *Biochemistry* 25 (1986) 6543.

- [46] W. Hengstenberg, J. Deutscher in J. Reizer, A. Peterkofsky (Hrsg.): *Sugar Transport and Metabolism in Gram-Positive Bacteria*, Ellis Horwood, Chichester 1987, S. 215.
- [47] R. Eisermann, G. Gonzy-Treboul, J. Deutscher, W. Hengstenberg, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [48] J. Deutscher, U. Kessler, W. Hengstenberg, *J. Bacteriol.* 163 (1985) 1203.
- [49] J. Deutscher, U. Kessler, C.-A. Alpert, W. Hengstenberg, *Biochemistry* 23 (1984) 4455.
- [50] P. W. Mason, D. P. Carbone, R. A. Cushman, A. S. Waggoner, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1861.
- [51] J. Thompson, D. A. Torchia, *J. Bacteriol.* 158 (1984) 791.
- [52] E. C. C. Lin, *Annu. Rev. Microbiol.* 30 (1976) 535.
- [53] R. Z. Jin, E. C. C. Lin, *J. Gen. Microbiol.* 130 (1984) 83.
- [54] P. W. Postma, W. Epstein, A. R. J. Schuitema, S. O. Nelson, *J. Bacteriol.* 158 (1984) 351.
- [55] M. J. Novotny, W. L. Fredericksen, E. B. Waygood, M. H. Saier, Jr., *J. Bacteriol.* 162 (1985) 810.
- [56] J. Deutscher, *FEMS Microbiol. Lett.* 29 (1985) 237.
- [57] J. Deutscher, H. Sauerwald, *J. Bacteriol.* 166 (1986) 829.
- [58] N. J. Jacobs, P. J. VanDemark, *Arch. Biochem. Biophys.* 88 (1960) 250.
- [59] J. Reizer, M. J. Novotny, I. Stuver, M. H. Saier, Jr., *J. Bacteriol.* 159 (1984) 243.
- [60] P. Gay, P. Cordier, M. Marquet, A. Delobbe, *MGG Mol. Gen. Genet.* 121 (1973) 355.
- [61] S. O. Nelson, A. R. J. Schuitema, P. W. Postma, *Eur. J. Biochem.* 154 (1986) 337.
- [62] J. Reizer, A. Peterkofsky in J. Reizer, A. Peterkofsky (Hrsg.): *Sugar Transport and Metabolism in Gram-Positive Bacteria*, Ellis Horwood, Chichester 1987, S. 333.
- [63] Y. S. Halpern in S. Sanchez-Esquivel (Hrsg.): *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*, CRC Press, Boca Raton, im Druck.
- [64] E. R. Stadtman, P. B. Chock, *Curr. Top. Cell. Regul.* 13 (1978) 53.
- [65] R. J. Almassy, C. A. Janson, R. Hamlin, N.-H. Xuong, D. Eisenberg, *Nature (London)* 322 (1986) 304.
- [66] S. Kustu, J. Hirschman, J. C. Meeks, *Curr. Top. Cell. Regul.* 27 (1985) 201.
- [67] M. S. Brown, A. Segal, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 2949.
- [68] S. P. Adler, D. Purich, E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6264.
- [69] M. H. Saier, Jr.: *Enzymes in Metabolic Pathways*, Harper and Row, New York 1987, S. 226.
- [70] B. Tyler, A. B. Deleo, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 225.
- [71] R. A. Bender, B. Magasanik, *J. Bacteriol.* 132 (1977) 106.
- [72] B. Tyler, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 1127.
- [73] S. Kustu, D. Burton, E. Garcia, L. McCarter, N. McFarland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4576.
- [74] N. McFarland, L. McCarter, S. Artez, S. Kustu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2135.
- [75] T. P. Hunt, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 8453.
- [76] L. J. Reitzer, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5554.
- [77] L. J. Reitzer, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1979.
- [78] J. Hirschman, P.-K. Wong, K. Sei, J. Keener, S. Kustu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 7525.
- [79] A. J. Ninfa, S. Ueno-Nishio, T. P. Hunt, B. Robustell, B. Magasanik, *J. Bacteriol.* 168 (1986) 1002.
- [80] A. J. Ninfa, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5909.
- [81] F. Foor, Z. Reuveny, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2636.
- [82] F. R. Bloom, M. S. Levin, F. Foor, B. Tyler, *J. Bacteriol.* 134 (1978) 569.
- [83] R. Bueno, B. Magasanik, *Curr. Top. Cell. Regul.* 27 (1985) 201.
- [84] T. MacNeil, G. P. Roberts, D. MacNeil, B. Tyler, *MGG Mol. Gen. Genet.* 188 (1982) 325.
- [85] G. Pahel, D. M. Rothstein, N. Magasanik, *J. Bacteriol.* 150 (1982) 202.
- [86] C. S. Rubin, O. M. Rosen, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 831.
- [87] E. G. Krebs, J. B. Beavo, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 923.
- [88] P. Boerner, M. H. Saier, Jr., *J. Cell. Physiol.* 122 (1985) 316.
- [89] M. H. Saier, Jr., J. Deutscher, *Biol. Unserer Zeit* 18 (1988) 9.
- [90] J. L. Spudich, W. Stoeckenius, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 5501.
- [91] T. Komano, N. Brown, S. Inouye, M. Inouye, *J. Bacteriol.* 151 (1982) 114.
- [92] R. Skörko, *Eur. J. Biochem.* 145 (1984) 617.
- [93] G. Antranikian, C. Herzberg, G. Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 153 (1985) 413.
- [94] J. F. Allen, C. E. Sanders, N. G. Holmes, *FEBS Lett.* 193 (1985) 271.
- [95] B. Averbhoff, G. Antranikian, G. Gottschalk, *FEMS Microbiol. Lett.* 33 (1986) 299.
- [96] A. M. Turner, N. H. Mann, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 3433.
- [97] E. Köhler, G. Antranikian, *Arch. Microbiol.*, im Druck.
- [98] M. W. Platt, S. Rottem, Y. Milner, M. F. Basile, J. Reizer, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [99] P. W. Ludden, G. G. Preston, T. E. Dowling, *Biochem. J.* 203 (1982) 663.
- [100] J. W. Gotto, D. C. Yoch, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2868.
- [101] Y. Jouanneau, C. M. Meyer, P. M. Vignais, *Biochim. Biophys. Acta* 749 (1983) 318.
- [102] J. W. Gotto, D. C. Yoch, *Arch. Microbiol.* 141 (1985) 40.
- [103] M. R. Pope, S. A. Murrell, P. W. Ludden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3173.
- [104] E. N. Spudich, J. L. Spudich, *Methods Enzymol.* 88 (1982) 213.
- [105] G. Atranikian, F. Giffhorn, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 175.
- [106] M. Zylicz, J. H. LeBowitz, R. McMacken, C. Georgopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 6431.
- [107] H. Saito, H. Uchida, *J. Mol. Biol.* 113 (1977) 1.
- [108] D. I. Friedman, E. R. Olson, C. Georgopoulos, K. Tilly, I. Herskowitz, F. Banuett, *Microbiol. Rev.* 48 (1984) 299.
- [109] M. Wada, K. Sekine, H. Itikawa, *J. Bacteriol.* 168 (1986) 213.
- [110] C. Rieul, J.-C. Cortay, F. Bleicher, A. J. Cozzzone, *Eur. J. Biochem.* 168 (1987) 621.
- [111] M. Manai, A. J. Cozzzone, *FEMS Microbiol. Lett.* 17 (1983) 87.
- [112] J.-C. Cortay, C. Rieul, B. Duclos, A. J. Cozzzone, *Eur. J. Biochem.* 159 (1986) 227.
- [113] A. Quentmeier, G. Antranikian, *FEMS Microbiol. Lett.* 34 (1986) 231.
- [114] P. E. Thorsness, D. E. Koshland, Jr., *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10422.
- [115] E. F. Robertson, J. C. Hoyt, H. C. Reeves, *J. Biol. Chem.* 263 (1988).
- [116] G. N. Gussin, C. W. Ronson, F. M. Ausubel, *Annu. Rev. Genet.* 20 (1986) 567.
- [117] A. Krikos, N. Mutoh, A. Boyd, M. I. Simon, *Cell* 33 (1983) 615.
- [118] R. H. Vallejos, L. Holuigue, H. A. Lucero, M. Torruella, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126 (1985) 685.