

**Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Lars Nolden

aus Bonn

Köln, September 2001

Berichterstatter:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Reinhard Sterner

Tag der Disputation: 30. November 2001

Mechanisms of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum is a Gram-positive soil bacterium which is widely used in biotechnology for the production of amino acids. An essential step in the production of amino acids and in bacterial growth in general, is the assimilation of nitrogen. *C. glutamicum* is capable to utilize several nitrogen sources like ammonium, glutamate, glutamine and urea. Depending on the amount and kind of the available nitrogen source certain enzymes and transport systems are synthesized respectively activated. To avoid waste of energy and resources a strict regulation of nitrogen metabolism on the level of protein activity and gene expression is necessary. This regulation is designated "nitrogen control". In this work the expression regulation and the signal transduction in nitrogen metabolism of *C. glutamicum* was investigated in detail. In *C. glutamicum* the expression of nitrogen regulated genes is regulated by the global repressor protein AmtR. Under good nitrogen supply of the cell AmtR represses the expression of the genes *amt*, *glnA*, *gltB*, *gltD*, the *amtB-glnK-glnD* operon and of two other ORFs of unknown function.

To derepress AmtR-controlled genes under nitrogen starvation the presence of the signal transduction protein GlnK (encoded by *glnK*) and the uridylyltransferase (encoded by *glnD*) is essential. GlnK is uridylylated by the uridylyltransferase under nitrogen starvation respectively deuridylylated under good nitrogen supply and transfers this signal to AmtR. Deletion of *glnK* and *glnD* impairs the cellular response to nitrogen starvation. In contrast to the enterobacteria, however, the uridylyltransferase in *C. glutamicum* cannot be the primary sensor of the nitrogen status as the expression of *glnD* is also regulated by AmtR and overexpression of *glnD* leads to a deregulation of AmtR-controlled genes even under good nitrogen supply. These effects are not compatible with a nitrogen sensor function of the uridylyltransferase. Therefore, at least one until now unknown primary nitrogen sensor and a nitrogen sensing mechanism different from the enterobacteria must exist.

This regulation mechanism is also present in *Corynebacterium diphtheriae* and seems to be conserved in other mycolic acid-containing actinomycetes, too.

Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives Bodenbakterium, das in der Biotechnologie in großem Maßstab für die Produktion von Aminosäuren eingesetzt wird. Ein essentieller Schritt bei der Synthese der Aminosäuren und generell im bakteriellen Wachstum ist die Assimilation von Stickstoff. *C. glutamicum* ist in der Lage, mehrere Stickstoffquellen zu verwerten, darunter Ammonium, Glutamat, Glutamin und Harnstoff. In Abhängigkeit von der Konzentration und der Art der verfügbaren Stickstoffquelle werden bestimmte Enzyme und Transportsysteme synthetisiert bzw. aktiviert. Um eine Verschwendung von Energie und Ressourcen zu vermeiden, ist eine strikte Regulation des Stickstoff-Metabolismus auf der Ebene der Genexpression und der Proteinaktivität notwendig. Die beteiligten Regulationsprozesse werden unter dem Begriff "Stickstoff-Kontrolle" zusammengefasst. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Genexpression und die globale Signaltransduktion im Stickstoff-Metabolismus von *C. glutamicum* detailliert untersucht. Die Expression Stickstoff-regulierter Gene wird in *C. glutamicum* durch den globalen Repressor AmtR reguliert. AmtR reprimiert bei guter Stickstoff-Versorgung die Expression der Gene *amt*, *glnA*, *gltB*, *gltD*, des *amtB-glnK-glnD*-Operons und die zweier anderer Gene, deren Funktion noch unbekannt ist.

Für die Derepression AmtR-kontrollierter Gene unter Stickstoff-Mangel ist die Anwesenheit des Signaltransduktionsproteins GlnK (kodiert von *glnK*) und der Uridyltransferase (kodiert von *glnD*) essentiell. GlnK wird unter Stickstoff-Mangel von der Uridyltransferase uridyliert bzw. bei guter Stickstoff-Versorgung deuridyliert und transferiert dieses Signal zu AmtR. Die Deletion von *glnK* und *glnD* verhindert die zelluläre Antwort auf Stickstoff-Mangel. Im Gegensatz zu den Enterobakterien kann die Uridyltransferase in *C. glutamicum* jedoch nicht der zentrale Sensor des Stickstoff-Status sein, da die Expression des *glnD*-Gens selbst unter AmtR-Kontrolle steht und die Überexpression von *glnD* zu einer Deregulation AmtR-kontrollierter Gene bereits bei guter Stickstoff-Versorgung führt. Diese Effekte sind nicht vereinbar mit einer Stickstoff-Sensorfunktion der Uridyltransferase. Daher muss noch wenigstens ein weiterer, bis jetzt noch unbekannter, übergeordneter Stickstoff-Sensor existieren. Dieser Mechanismus der Kontrolle des Stickstoff-Metabolismus existiert auch in *Corynebacterium diphtheriae* und ist in anderen Mycolsäure-haltigen Actinomyceten wahrscheinlich ebenfalls konserviert.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	10
1. Bakterienstämme und Plasmide	10
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
2.1.1 Nährmedien für <i>E. coli</i>	15
2.1.2 Nährmedien für <i>C. diphtheriae</i> und <i>C. glutamicum</i>	15
2.1.3 Antibiotika	15
2.1.4 Kultivierungsbedingungen	16
3. Biochemische Techniken	17
3.1 Aufnahmemessungen.....	17
3.1.1 Bestimmung der Methylammoniumaufnahme.....	17
3.1.2 Bestimmung der Harnstoffaufnahme	17
3.2 Herstellung von Zellextrakten	18
3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellextrakten	18
3.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	18
3.4.1 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität	18
3.4.2 Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität.....	20
3.4.3 Bestimmung der Urease-Aktivität.....	21
3.5 Native PAGE und Western-Blot.....	22
4. Molekularbiologische Techniken	24
4.1 DNA-Techniken	24
4.1.1 Plasmid-Präparationen aus <i>E. coli</i>	24
4.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i> und <i>C. diphtheriae</i>	24
4.1.3 Restriktion und Ligation von DNA und Agarose- Gelelektrophorese.....	25
4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion: PCR und RT-PCR	25
4.1.5 Klonierung von PCR-Fragmenten	26
4.1.6 Ortsgerichtete Mutagenese	27
4.1.7 Gelretardationstests	27
4.1.8 DNA-Sequenzierung	29

4.2	RNA-Techniken	30
4.2.1	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> und <i>C. diphtheriae</i> und RNA-Gelelektrophorese	30
4.2.2	RNA-Hybridisierungen	31
4.2.3	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes.....	33
4.2.4	Präparation von RNA-Sonden durch <i>in-vitro</i> -Transkription	34
4.3	Techniken zur Manipulation von Zellen	34
4.3.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	34
4.3.2	Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten und von <i>lacZ</i> -Fusionsstämmen	36
III.	Ergebnisse	38
1.	Regulation der Aufnahme von Stickstoffquellen	38
1.1	Expressionsregulation des <i>amt</i> -Gens.....	38
1.2	Expressionsregulation des <i>amtB</i> -Gens	43
2.	Regulation der Assimilation von Stickstoffquellen	46
2.1	Regulation der <i>glnA</i> -Expression	46
2.2	Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität.....	48
2.3	Untersuchungen zur Funktion und Regulation des <i>glnA2</i> -Gens.....	50
2.4	Regulation der <i>gltBD</i> -Expression.....	55
2.5	Regulation der <i>gdh</i> -Expression	57
2.6	Untersuchungen zur Expressionsregulation der Urease-Gene	58
3.	AmtR, ein globaler Regulator der Stickstoff-Kontrolle	61
3.1	Isolierung weiterer AmtR-kontrollierter Gene.....	61
3.2	Untersuchungen zu einer möglichen Autoregulation der <i>amtR</i> -Expression.....	64
4.	Untersuchungen zur Signaltransduktion im Stickstoff-Metabolismus von <i>C. glutamicum</i>	66
4.1	Einfluß der Deletion von <i>glnD</i> und <i>glnK</i> auf die Gen- expression in <i>C. glutamicum</i>	66
4.2	Bedeutung der Uridylylierung von GlnK für die Genexpression.....	69
4.3	Einfluß der Überexpression von <i>glnD</i> und <i>glnK</i> auf die Genexpression.....	71

5. <i>C. glutamicum</i> als Modellorganismus für Mycolsäure-	
haltige Actinomyceten	77
5.1 Genetische Organisation des Stickstoff-Metabolismus	
von <i>C. diphtheriae</i>	77
5.2 Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität in <i>C. diphtheriae</i>	79
5.3 Nachweis der Operonstruktur von <i>amtB-glnK-glnD</i> und	
<i>glnA2-glnE</i> in <i>C. diphtheriae</i>	80
5.4 Untersuchung der Expressionsregulation in <i>C. diphtheriae</i>	81
IV. Diskussion.....	85
1. AmtR, ein globaler Regulator der Stickstoff-	
Kontrolle in <i>C. glutamicum</i>	85
2. Untersuchungen zur Signaltransduktion im Stickstoff-	
Metabolismus von <i>C. glutamicum</i>	88
3. <i>C. glutamicum</i> als Modellorganismus für Mycolsäure-	
haltige Actinomyceten	92
V. Zusammenfassung.....	94
VI. Literaturverzeichnis	96
VII. Anhang	103
1. Plasmidkonstruktionen	103
2. Stammkonstruktionen.....	113

Abkürzungen

Abkürzungen

Ap ^R	Resistenz gegen Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
Cm ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
DIG	Digoxigenin
dpm	Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
F	Farad
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOGAT	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobasen
Km ^R	Resistenz gegen Kanamycin
kV	Kilovolt
MA	Methylammonium
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Nx ^R	Resistenz gegen Nalidixinsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PP _i	anorganisches Phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	<u>R</u> apid <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds
RT	Raumtemperatur (20-22 °C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TG	Trockengewicht
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol

I. Einleitung

Stickstoff ist ein für alle Lebewesen, darunter auch Bakterien, essentielles Element. Molekularer Stickstoff N_2 , der mit 78% Anteil an der Erdatmosphäre die größte Stickstoff-Reserve darstellt, kann jedoch wegen seiner Reaktionsträgheit von den meisten Organismen nicht direkt assimiliert werden. Nur einige wenige Bakterien, darunter Vertreter der Gattung *Rhizobium*, sind in der Lage molekularen Stickstoff direkt zur Synthese von Ammonium zu nutzen (Stickstoff-Fixierung), welches dann auch von anderen Organismen assimiliert werden kann. Ammonium wird dann durch Nitrifikation bzw. Denitrifikation in andere Stickstoff-Verbindungen umgewandelt (Abb. 1).

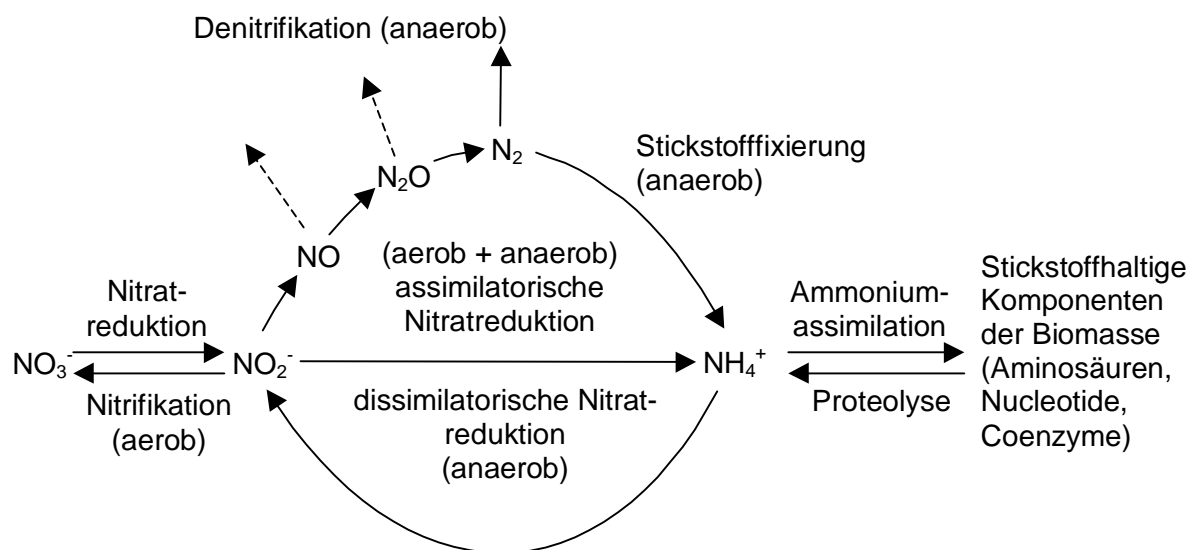
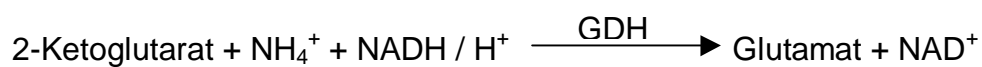


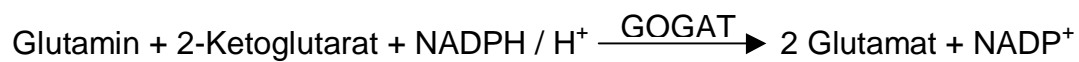
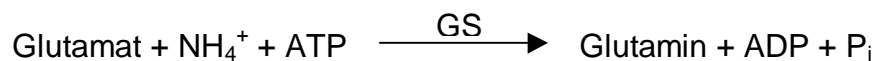
Abb. 1: Der Stickstoffkreislauf. Hauptkomponenten des Stickstoffkreislaufs sind Ammonium (NH_4^+), Nitrat (NO_3^-) und elementarer Stickstoff (N_2). Nur Bakterien sind zur Stickstofffixierung und dissimilatorischen Nitratreduktion befähigt, Nitrifikation und Denitrifikation erfolgen ausschließlich durch Prokaryoten (nach Munk, 2000).

Bakterien können in der Regel eine Vielzahl von Stickstoff-Verbindungen nutzen, darunter einfache anorganische Verbindungen wie Ammonium und Nitrat oder komplexe organische Verbindungen wie Aminosäuren und Nucleoside. In Abhängigkeit von den vorhandenen Stickstoffquellen werden unterschiedliche Enzyme und Transportsysteme synthetisiert bzw. aktiviert. Im allgemeinen wird jedoch Ammonium bevorzugt aufgenommen und assimiliert, dafür stehen den meisten Bakterien zwei Wege zur Verfügung:

A)



B)



Bei hoher Konzentration von Ammonium gelangt Ammoniak, das mit Ammonium im Gleichgewicht steht, in ausreichender Menge durch Diffusion in die Zelle und wird dort durch die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) unter Verbrauch von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf 2-Ketoglutarat übertragen wobei Glutamat entsteht, das dann weiter im Zellstoffwechsel genutzt werden kann. Unter diesen Bedingungen hat die Glutaminsynthetase (GS) auf Grund von Feedback-Inhibierung und Adenylylierung nur eine geringe Aktivität (siehe unten). Bei geringen Ammoniumkonzentrationen kann die Glutamatdehydrogenase auf Grund ihrer geringen Affinität ($K_m \sim 1 \text{ mM}$) jedoch nicht genügend Ammonium zu Glutamat umsetzen. Stattdessen wird Ammonium durch die Glutaminsynthetase ($K_m \sim 200 \text{ }\mu\text{M}$) auf Glutamat übertragen, wobei Glutamin entsteht, das durch die Glutamatsynthase (GOGAT) zum Teil in Glutamat umgewandelt wird. Der Weg B kostet die Zelle jedoch pro Mol Ammonium ein Mol ATP, d.h. es handelt sich um eine energieaufwendige Reaktion. Daher ist es für die Zelle essentiell, die entsprechenden Stoffwechselwege sowohl auf Proteinaktivitätsebene als auch auf Genexpressionsebene in Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration strikt zu regulieren. Dies trifft natürlich auch für die Verwertung anderer Stickstoffquellen zu. Diese Regulationsprozesse werden unter

dem Begriff "Stickstoff-Kontrolle" zusammengefaßt und sind bisher besonders gut bei Enterobakterien untersucht worden (Überblick, siehe Merrick & Edwards, 1995a). In diesen Organismen existiert ein 2-Komponentensystem, das eine globale regulatorische Funktion im Stickstoff-Metabolismus hat. Sensor des Stickstoff-Status ist die Uridylyltransferase/deuridylylierendes Enzym (UTase, kodiert von *glnD*). Dieses bifunktionelle Enzym ändert seine Aktivität je nach der in der Zelle vorhandenen Menge an Glutamin. Hohe Konzentrationen an Glutamin inhibieren die Transferase-Aktivität und induzieren die deuridylylierende Aktivität. Unter Stickstoff-Mangel staut sich in der Zelle 2-Ketoglutarat an, da die Aktivität der GDH nicht ausreicht, um die geringen Ammoniummengen in Glutamat zu überführen. 2-Ketoglutarat bindet an das kleine trimere Protein P_{II} das von *glnB* kodiert wird. Dies führt zu einer Konformationsänderung von P_{II} in der es von der UTase an einem spezifischen Tyrosyl-Rest (Tyrosin-51) uridylyliert wird. Unter Stickstoff-Überschuß, d.h. bei einem hohen Glutaminspiegel, erfolgt jedoch eine Deuridylylierung. Das P_{II}-Protein wirkt als Signaltransduktor sowohl auf Aktivitätsebene als auch auf Expressionsebene. Genauer untersucht ist die Funktion von P_{II} bei der Aktivitätsregulation der Glutaminsynthetase (Abb. 2). Unter Stickstoff-Überschuß stimuliert die nicht modifizierte Form von P_{II} die Transferase-Aktivität des ebenfalls bifunktionellen Enzyms Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym (ATase), das die Aktivität der Glutaminsynthetase durch Adenylylierung eines spezifischen Tyrosinrestes reduziert. Tritt jedoch Stickstoff-Mangel auf, stimuliert die uridylylierte Form von P_{II} die deadenylylierende Funktion der ATase, wodurch die AMP-Reste von der Glutaminsynthetase entfernt werden und die Aktivität der Glutaminsynthetase zunimmt. Die Funktion der Metabolite 2-Ketoglutarat und Glutamin als Signal für den Stickstoff-Status der Zelle konnte durch *in-vitro*-Studien belegt werden (Jiang et al., 1998a; b; c).

Die Expressionsregulation im Stickstoff-Metabolismus der Enterobakterien erfolgt über das 2-Komponentensystem NtrB/NtrC (Abb. 2). Das Aktivatorprotein NtrC wird unter Stickstoff-Mangel von der Histidinkinase NtrB phosphoryliert, wobei diese Reaktion durch die uridylylierte Form von P_{II} stimuliert wird. Das phosphorylierte NtrC-Protein seinerseits aktiviert in dieser Form die Transkription verschiedener Gene. Umgekehrt blockiert die unter Stickstoff-Überschuß nicht-uridylylierte Form von P_{II} die Phosphorylierungsaktivität von NtrB und aktiviert stattdessen die

Verglichen mit den Enterobakterien zeigt der Modellorganismus für Gram-positive Bakterien, *Bacillus subtilis*, einen grundsätzlich anderen Mechanismus der Stickstoff-Kontrolle, der jedoch noch nicht im Detail bekannt ist. *B. subtilis* hat, im Gegensatz zu den Enterobakterien, die Fähigkeit Sporen zu bilden, wodurch sich die Zellen ungünstigen Umweltbedingungen wie Stickstoff-Mangel entziehen können. Daher zeigt *B. subtilis* auch eine stark eingeschränkte Reaktion auf Stickstoff-Mangel. Ammonium wird zum Beispiel nur über den GS/GOGAT-Weg assimiliert, nicht jedoch über die Glutamatdehydrogenase, die hier nur dem Glutamat-Abbau dient (Kane et al., 1981). Zudem wird die Glutaminsynthetase nicht auf Aktivitätsebene reguliert (Deuel & Stadtman, 1970). Auch *B. subtilis* reguliert den Stickstoff-Metabolismus auf Expressionsebene, jedoch finden sich hier, wie am Beispiel der Regulation der *glnA*-Transkription gezeigt worden ist, ebenfalls deutliche Unterschiede zu den Enterobakterien. Die Regulation der *glnA*-Transkription erfolgt in *B. subtilis* nicht über einen Aktivierungsmechanismus, sondern über Repression. Das *glnA*-Strukturgen ist mit dem *glnR*-Gen für den spezifischen Transkriptionsregulator GlnR in einem Operon organisiert (Strauch et al., 1988). GlnR reprimiert unter Stickstoff-Überschuß die Transkription des *glnRA*-Operons und die einiger anderer Gene des Stickstoff-Metabolismus. Eine übergeordnete Kontrollfunktion wie in den Enterobakterien das System aus UTase, P_{II} und NtrB/NtrC scheint in *B. subtilis* das TnrA-Protein zu übernehmen. TnrA aktiviert unter Stickstoff-Mangel die Transkription einer Reihe von Operons, zudem scheint es an der Regulation des *glnRA*-Operons mit beteiligt zu sein (Wray et al., 1996, Abb. 3). Ungeklärt ist jedoch, welches Signal in *B. subtilis* maßgebend für den Stickstoff-Status ist (Schreier et al., 1989; Fisher, 1999).

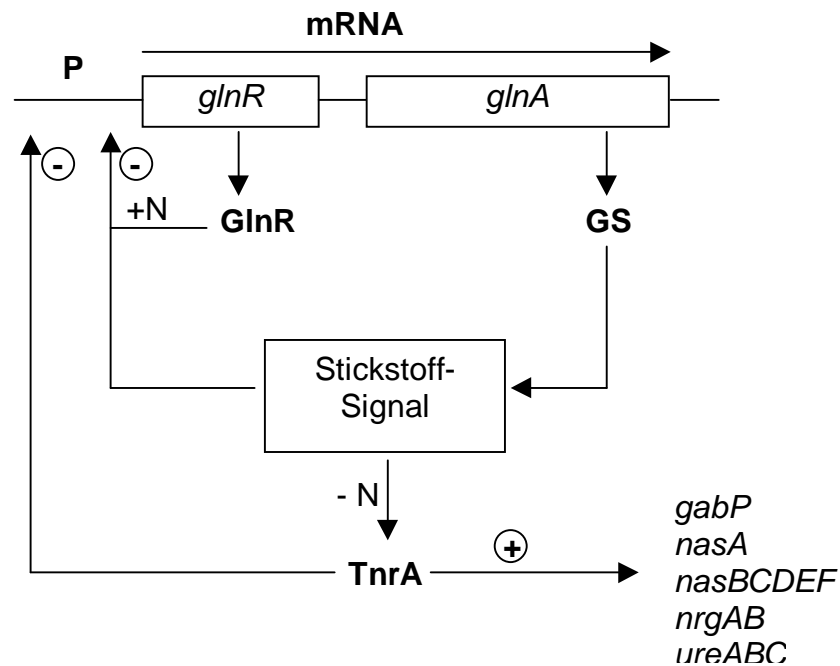


Abb. 3: Modell der Stickstoff-Kontrolle in *B. subtilis*: GlnR, operonspezifischer Regulator; GS, Glutaminsynthetase; TnrA, übergeordneter Regulator; P, Promotor; *gabP*, Gen für die γ -Aminobutyrat-Permease; *nasA*, *nasBCDEF*, Gene für die Nitrat-Assimilation; *nrgAB*, Gene für ein putatives Ammonium-Aufnahmesystem und ein P_{II} -Protein; *ureABC*, Gene für die Urease. +, Aktivierung der Genexpression; -, Repression der Genexpression (Wray et al., 1996).

B. subtilis kann jedoch nur bedingt als Modellorganismus für Mycolsäure-haltige Actinomyceten (hoher G + C-Gehalt, Gram-positiv) dienen, da er phylogenetisch (niedriger G + C-Gehalt, Gram-positiv) von diesen relativ weit abgesetzt ist. Zu den Mycolsäure-haltigen Actinomyceten gehören sowohl bedeutende human-pathogene Vertreter wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und *Corynebacterium diphtheriae* als auch biotechnologisch wichtige wie *Corynebacterium glutamicum*, das in dieser Arbeit untersucht wurde (Pascual et al., 1995; Chun et al., 1996). *C. glutamicum* wurde 1957 als natürlicher Glutamatproduzent isoliert und gewann auf Grund dieser Fähigkeit rasch große biotechnologische Bedeutung. Durch gezielte Stammoptimierung werden mit *C. glutamicum* mittlerweile ca. 1.000.000 t/a L-Glutamat und 450.000 t/a L-Lysin produziert, die Verwendung in der Lebensmittel- und Tierfuttermittelindustrie finden (Leuchtenberger, 1996). Außerdem wird *C. glutamicum* zunehmend auch zur fermentativen Produktion anderer Aminosäuren sowie für die Herstellung von

Vitaminen eingesetzt. Auf Grund seiner biotechnologischen Bedeutung, seiner Apathogenität und seiner im Vergleich zu den pathogenen Actinomyceten guten genetischen Zugänglichkeit wurde *C. glutamicum* in den letzten Jahren intensiv untersucht. Im Hinblick auf den Einsatz in der Biotechnologie wurde vor allem die Aminosäure-Biosynthese und der Kohlenstoff-Metabolismus gut charakterisiert. Im Gegensatz dazu fehlen detaillierte Erkenntnisse über die Aufnahme von Stickstoffquellen, deren Assimilation und über die mit diesen Prozessen zusammenhängenden globalen Regulationsmechanismen. Erst in den letzten Jahren wurde dieses Gebiet intensiver bearbeitet. Dabei konnten wichtige an der Aufnahme und Assimilation von Stickstoffquellen beteiligte Gene isoliert werden und ein erstes Modell der Stickstoff-Kontrolle wurde erstellt (Jakoby, 1998, Abb. 4). *C. glutamicum* kann verschiedene Stickstoffquellen, darunter Ammonium, Glutamat, Glutamin und Harnstoff, verwerten. Die Aufnahme von Ammonium, Glutamat, Glutamin und Harnstoff erfolgt über spezifische Transportsysteme, deren Gene zum Teil bekannt sind, der Transport der anderen von *C. glutamicum* verwertbaren Stickstoffquellen (z.B. Allantoin, Arginin oder Ornithin) ist unbekannt. Ammonium wird bei hohen Konzentrationen wie bei den Enterobakterien über die Glutamatdehydrogenase assimiliert, bei geringen Konzentrationen erfolgt die Aufnahme über zwei spezifische Transportsysteme Amt und AmtB und die Assimilation über den GS/GOGAT-Weg. Amt ist in der Lage, sowohl Ammonium als auch Methylammonium aufzunehmen (Siewe et al., 1996), während AmtB ausschließlich Ammonium akzeptiert (Meier-Wagner et al., 2001). Für die Regulation der Amt-Aktivität insbesondere scheint die Glutaminsynthetase essentiell zu sein, da eine *glnA*-Deletionsmutante keine (Methyl)ammonium-Aufnahme mehr zeigte. Möglicherweise beruht dies darauf, dass für ein funktionelles Amt-System eine Interaktion mit der Glutaminsynthetase notwendig ist (Jakoby, 1998). Auf Expressionsebene konnte bisher für das *amt*-Gen, das für das Amt-System kodiert, eine Regulation in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung gezeigt werden. Die Expression des *amt*-Gens wird unter Stickstoff-Überschuß durch das Repressorprotein AmtR (kodiert von *amtR*) reprimiert. Ebenfalls isoliert wurde ein P_{II}-ähnliches Protein (GlnK, kodiert von *glnK*) und eine Uridylyltransferase (kodiert von *glnD*). Wie in den Enterobakterien konnte eine Uridylylierung von GlnK unter Stickstoff-Mangel nachgewiesen werden. Erste Experimente legten die Vermutung nahe, dass GlnK und die UTase wie in Enterobakterien eine regulatorische Funktion haben, da Insertionsmutanten von *glnK*

und *glnD* keine (Methyl)ammonium-Aufnahme mehr zeigten. Jedoch war nicht klar, auf welchem Mechanismus, d.h. auf Expressions- und/oder Aktivitätsebene, dieser Effekt beruhte (Jakoby, 1998).

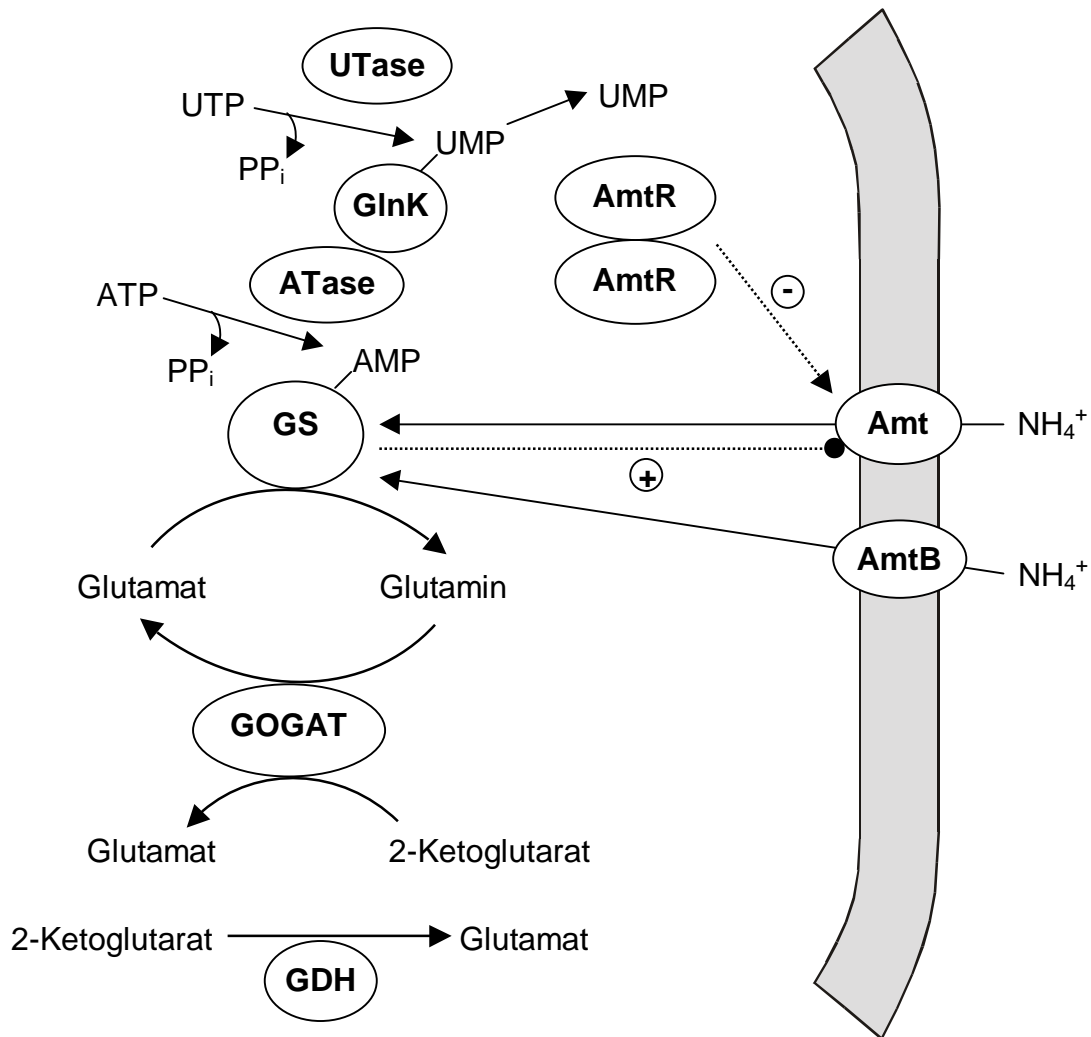


Abb. 4: Erstes Modell der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum*. Die Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) wird durch die ATase reguliert. Das GlnK-Protein schaltet das Enzym je nach seinem Uridylierungsstatus zwischen seinen beiden Aktivitäten um. Die De-/Uridylierung von GlnK erfolgt durch die UTase. Amt, AmtB, Ammonium-Aufnahmesysteme; AmtR, Repressor des *amt*-Gens; GDH, Glutamatdehydrogenase; GOGAT, Glutamatsynthase.

.....▶ Expressionsregulation ● Aktivitätsregulation

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von den bisher vorliegenden Daten, die Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum* genauer zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der Expressionsregulation von Genen des Stickstoff-Metabolismus. Von besonderem Interesse jedoch war die Identifizierung von Komponenten, die an der Wahrnehmung des Stickstoff-Status und der globalen Regulation des Stickstoff-Metabolismus beteiligt sind, sowie die Untersuchung der Regulationsmechanismen. Die Erstellung eines detaillierten Modells der Stickstoff-Kontrolle und der Versuch der Übertragung der an *C. glutamicum* gewonnenen Erkenntnisse auf andere Mycolsäure-haltige Actinomyceten sollte die Arbeit abschließen.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-, *C. glutamicum*- und *C. diphtheriae*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-, *C. glutamicum*-, und *C. diphtheriae*-Stämme und ihre Eigenschaften (Ap^R, Resistenz gegen Ampicillin; Cm^R, Resistenz gegen Chloramphenicol; Km^R, Resistenz gegen Kanamycin; Nx^R, Resistenz gegen Nalidixinsäure). Die Konstruktion der Stämme ist im Anhang beschrieben.

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96</i> <i>relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169</i> <i>ϕ80ΔlacZ ΔM15mcrA Δ(mmr hsdRMS</i> <i>mcrBC)</i>	Grant et al., 1990
JM109	<i>F⁻traD36 lac^f Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺ / e14</i> <i>(McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nx^R)</i> <i>endA1 hsdR17 (r_{km}^-) relA1 supE44</i> <i>recA1</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>C. glutamicum</i>		
Δ 268/283	ATCC 13032 mit Deletion der AmtR-Bindestelle B1 im <i>amt</i> -Promotor	diese Arbeit
Δ 304/320	ATCC 13032 mit Deletion der AmtR-Bindestelle B2 im <i>amt</i> -Promotor	diese Arbeit
Amt-lacZ	ATCC 13032, <i>amt-lacZ</i> -Fusion im Chromosom	diese Arbeit
ATCC 13032	Wildtyp	Abe et al., 1967

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
ATCCcg2b21Ins	ATCC 13032 <i>cg2b21_075::pK18cg2b21</i>	diese Arbeit
GlnA-lacZ	ATCC 13032, <i>glnA-lacZ</i> -Fusion im Chromosom	diese Arbeit
GltB-lacZ	ATCC 13032, <i>gltB-lacZ</i> -Fusion im Chromosom	diese Arbeit
LN-1.1	ATCC 13032 Δ <i>amtB</i>	diese Arbeit
LN-D	ATCC 13032 Δ <i>glnD</i>	diese Arbeit
LNLNA2	ATCC 13032 Δ <i>glnA2</i>	diese Arbeit
LNLNE	ATCC 13032 Δ <i>glnE</i>	diese Arbeit
MJ4-26	ATCC 13032 Δ <i>glnA</i>	Jakoby, 1997
MJ6-18	ATCC 13032 Δ <i>amtR</i>	Jakoby et al., 2000
NR-1	ATCC 13032 Δ <i>glnK</i>	diese Arbeit
UR4	ATCC 13032 <i>ureC::pK18ureC</i>	diese Arbeit
UR-GB	ATCC 13032 <i>ureD::pK18ureD</i>	diese Arbeit
<i>C. diphtheriae</i>		
DSM 43988	Wildtyp, apathogenes Isolat aus Rachenabstrich	DSMZ, Braunschweig
LN _{C.d.} -AmtR	<i>C. diphtheriae amtR::pK18mobamtR_{C.d.}</i>	diese Arbeit
LN _{C.d.} -GlnD	<i>C. diphtheriae glnD::pK18mobglnD_{C.d.}</i>	diese Arbeit

Tab. 2: Eingesetzte Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften. Die Konstruktion der Plasmide ist im Anhang beschrieben.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEM3z	Ap ^R , <i>lacZ</i> α <i>E. coli</i> -Vektor für <i>in-vitro</i> -Transkription	Promega, Mannheim
pGEM4z	Ap ^R , <i>lacZ</i> α <i>E. coli</i> -Vektor für <i>in-vitro</i> -Transkription	Promega, Mannheim
pGEM3z16SrRNA	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus dem 16SrRNA-Gen. 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zamt	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>amt</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zamtB	pGEM3z mit 0,7 kb Fragment aus <i>amtB</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zamtR	pGEM3z mit 0,4 kb-Fragment aus <i>amtR</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zamtR _{C.d.}	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>amtR</i> von <i>C. diphtheriae</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zgdh _{C.d.}	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>gdh</i> von <i>C. diphtheriae</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM4zgdh	pGEM4z mit 0,7 kb-Fragment aus <i>gdh</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zglnA	pGEM3z mit 0,6 kb-Fragment aus <i>glnA</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.	diese Arbeit
pGEM3zglnA _{C.d.}	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>glnA</i> von <i>C. diphtheriae</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zglnD	pGEM3z mit 0,7 kb-Fragment aus <i>glnD</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.	diese Arbeit
pGEM3zglnK	pGEM3z mit 0,3 kb-Fragment aus <i>glnK</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEM4z $glnK_{C.d.}$	pGEM4z mit 0,3 kb-Fragment aus <i>glnK</i> von <i>C. diphtheriae</i> . 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z $gltB$	pGEM3z mit 0,8 kb-Fragment aus <i>gltB</i> . 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pK18 Δ 268/283	pK18 <i>mobsacB</i> mit 0,6 kb-Fragment aus <i>amt</i> -Promotor mit Deletion der AmtR-Bindestelle B1	diese Arbeit
pK18 Δ 304/320	pK18 <i>mobsacB</i> mit 0,6 kb-Fragment aus <i>amt</i> -Promotor mit Deletion der AmtR-Bindestelle B2	diese Arbeit
pK18 Δ <i>glnA2</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 1,5 kb Fragment für <i>glnA2</i> -Deletion	diese Arbeit
pK18 Δ <i>glnD</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 1,6 kb Fragment für <i>glnD</i> -Deletion	diese Arbeit
pK18 Δ <i>glnE</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 1,2 kb Fragment für <i>glnE</i> -Deletion	diese Arbeit
pK18 Δ <i>glnK</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 1,4 kb Fragment für <i>glnK</i> -Deletion.	diese Arbeit
pK18 <i>amt-lacZ</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit <i>amt-lacZ</i> -Fusion	diese Arbeit
pK18 <i>amtR</i> $_{C.d.}$	pK18 <i>mob</i> mit 0,5 kb-Fragment aus <i>amtR</i> von <i>C. diphtheriae</i>	diese Arbeit
pK18 <i>cg2b21</i> Ins	pK18 <i>mob</i> mit 0,6 kb-Fragment aus ORF <i>cg2b21_075</i>	diese Arbeit
pK18 <i>glnA-lacZ</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 4 kb <i>glnA-lacZ</i> -Fusion	diese Arbeit
pK18 <i>glnD</i> $_{C.d.}$	pK18 <i>mob</i> mit 0,9 kb-Fragment aus <i>glnD</i> von <i>C. diphtheriae</i>	diese Arbeit
pK18 <i>gltB-lacZ</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit <i>gltB-lacZ</i> -Fusion	diese Arbeit
pK18 <i>mob</i>	Km ^R , <i>ori</i> pUC, <i>mob</i> <i>C. glutamicum</i> -Insertionsvektor	Schäfer et al., 1994

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pK18 <i>mobsacB</i>	Km ^R , <i>ori</i> pUC, <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Schäfer et al., 1994
pK18 <i>ureC</i>	pK18 <i>mob</i> mit 0,3 kb-Fragment aus <i>ureC</i>	diese Arbeit
pK18 <i>ureD</i>	pK18 <i>mob</i> mit 0,5 kb-Fragment aus <i>ureD</i>	diese Arbeit
pLacZi	<i>pCYC1</i> , <i>URA3</i> , <i>lacZ</i> , Ap ^r	Clontech Laboratories, Heidelberg
pMJ1	Cm ^R , <i>plac</i> , <i>ori</i> pUC, <i>ori C. glutamicum</i>	Jakoby et al., 1999
pSP73	Ap ^R <i>E. coli</i> -Vektor für <i>in-vitro</i> -Transkription	Promega, Mannheim
pSP73 <i>glnD</i> _{C.d.}	pSP73 mit 0,9 kb-Fragment aus <i>glnD</i> von <i>C. diphtheriae</i>	diese Arbeit
pUC11-1.8	1,8 kb <i>Bam</i> HI-Fragment mit <i>amtR</i> ` <i>citE</i> in pUC18	Jakoby et al., 2000
pUC18, pUC19	Ap ^R , <i>lacZ</i> α	Viera & Messing, 1982
pUC <i>amtB</i>	pUC18 mit 2,4 kb <i>Bam</i> HI-Fragment mit <i>ftsY</i> <i>amtB glnK</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Jakoby, 1998
pUC <i>dppc</i>	pUC18 mit 3 kb <i>Bam</i> HI-Fragment chromosomaler DNA von <i>C. glutamicum</i> mit <i>ppc secG amt ocd</i>	Siewe et al., 1996
pZ8-1	<i>ptac</i> , Km ^R , <i>ori</i> pUC, <i>ori C. glutamicum</i> <i>C. glutamicum</i> -Expressionsvektor	Degussa, Bielefeld
pZ <i>amtB-glnK-glnD</i>	pZ8-1 mit <i>amtB-glnK-glnD</i> -Operon	diese Arbeit
pZ <i>amtB-glnKY51F-glnD</i>	pZ8-1 mit <i>amtB-glnKY51F-glnD</i> -Operon	diese Arbeit
pZ <i>glnA</i>	pZ8-1 mit <i>glnA</i> -Gen für <i>glnA</i> -Überexpression	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pZglnA2	pZ8-1 mit <i>glnA2</i> -Gen für <i>glnA2</i> -Überexpression	diese Arbeit
pZglnD	pZ8-1 mit <i>glnD</i> -Gen für <i>glnD</i> -Überexpression	diese Arbeit
pZglnK	pZ8-1 mit <i>glnK</i> -Gen für <i>glnK</i> -Überexpression	diese Arbeit
pZglnKY51F	pZ8-1 mit <i>glnKY51F</i> -Gen	diese Arbeit

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1.1 Nährmedien für *E. coli*

E. coli-Stämme wurden standardmäßig in LB-Medium (siehe Tabelle 3) kultiviert. Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt.

2.1.2 Nährmedien für *C. diphtheriae* und *C. glutamicum*

Als Vollmedium für *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* wurde BHI-Medium (Difco, Detroit, USA) verwendet. Für Agarplatten wurde dem Medium ebenfalls 15 g/l Bacto-Agar (Difco) zugesetzt. Als definiertes Minimalmedium wurde CgC- bzw. CgCoN-Medium (Keilhauer et al., 1993) eingesetzt, die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 3 angegeben.

2.1.3 Antibiotika

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker bei *E. coli* wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Carbenicillin 50 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml. Für *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* wurden folgende Antibiotikakonzentrationen verwendet: Chloramphenicol 30 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml. Zur Selektion auf Kanamycinresistenz nach Elektroporation wurden BHI-Agarplatten mit nur 10 µg/ml Kanamycin verwendet. Nach Bildung sichtbarer Kolonien wurden die Klone zur weiteren Kultivierung auf BHI-Agarplatten mit 25 µg/ml Kanamycin übergeimpft.

Tab. 3: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung (pro l)
LB	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl
CgC	42 g MOPS, 20 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g Harnstoff, 0,5 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g K ₂ HPO ₄ , pH (NaOH) = 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 10 ml 100 mM CaCl ₂ , 10 ml 1 M MgSO ₄ , 200 µg Biotin, 1 ml Spurensalze, 50 ml 50% (w/v) Glucose.
CgCoN	42 g MOPS, 0,5 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g K ₂ HPO ₄ , pH (NaOH) = 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben: 10 ml 100 mM CaCl ₂ , 10 ml 1 M MgSO ₄ , 200 µg Biotin, 1 ml Spurensalze, 50 ml 50% (w/v) Glucose.
Spurensalze	28,5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O, 16,5 g MnSO ₄ x H ₂ O, 6,4 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O, 764 mg CuSO ₄ x 5H ₂ O, 128 mg CoCl ₂ x 6H ₂ O, 44 mg NiCl ₂ x 6H ₂ O, 64 mg Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O, 48 mg H ₃ BO ₃ , 50 mg SrCl ₂ , 50 mg BaCl ₂ x 2H ₂ O, 28 mg KAl(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O, pH (H ₂ SO ₄) = 1. Sterilisation durch Filtration.

2.1.4 Kultivierungsbedingungen

E. coli- und *C. diphtheriae*-Stämme wurden bei 37°C, *C. glutamicum*-Stämme bei 30°C angezogen. Zur Untersuchung der Effekte von Stickstoff-Mangelbedingungen bei *C. glutamicum* wurde nach folgendem standardisiertem Animpfverfahren vorgegangen, um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten: 20 ml BHI-Medium wurden morgens mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft und unter Schütteln ca. 8 h inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann zum Animpfen von CgC-Medium verwendet in dem die Zellen dann über Nacht unter Schütteln inkubiert wurden. Dadurch wurde eine optimale Anpassung der Zellen an das Minimalmedium erzielt. Da für alle Untersuchungen Zellen in der exponentiellen Phase benötigt wurden, wurde mit dieser Übernachtskultur frisches CgC-Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 1 angeimpft und unter Schütteln bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ ca. 4-5) inkubiert. Zur Induktion von Stickstoffmangel wurden die Zellen dann abzentrifugiert, einmal in vorgewärmtem CgCoN-Medium gewaschen und dann in vorgewärmtem CgCoN-Medium resuspendiert. Zur Untersuchung der Effekte von Stickstoff-Mangelbedingungen bei *C. diphtheriae* wurde in der gleichen Weise vorgegangen, jedoch wurde das CgC-Medium durch BHI-Medium ersetzt.

3. Biochemische Techniken

3.1 Aufnahmemessungen

3.1.1 Bestimmung der Methylammoniumaufnahme

Zur Bestimmung der Methylammoniumaufnahme wurden die Zellen nach Übernachtskultur in CgC-Medium in frisches CgC-Medium auf eine OD_{600} von ca. 0,5 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von ca. 2 weiterkultiviert. Nach Zentrifugation (4000 xg, 30°C) wurde das Pellet einmal in vorgewärmtem CgCoN-Medium gewaschen und dann in CgCoN-Medium auf die gleiche OD_{600} wie in dem CgC-Medium resuspendiert. Nach 3 h Inkubation wurden 2 ml Zellen in ein Rührgefäß gegeben und im Wasserbad bei 30°C für 3 min vorgewärmt. Unter Rühren wurde dann die Aufnahme durch Zugabe von 21 μ l 14 C-markiertem 10 mM Methylammonium (200.000 Counts pro Ansatz) gestartet. Nach 15, 30, 45, 60, 75 und 90 s wurde jeweils eine Probe von 200 μ l entnommen und die Zellen wurden durch Absaugen auf Glasfaserfiltern in einer Mehrfachfiltrationsanlage und nachfolgendem zweimaligem Waschen mit je 2,5 ml 100 mM LiCl vom Medium getrennt. Die Filter wurden dann in Szintillationsröhrchen mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Scintillation Counter LS6500, Beckmann Coulter, München) bestimmt. Die Gesamtaktivität des Ansatzes wurde durch direktes Zählen von 200 μ l Reaktionsansatz bestimmt. Die Aufnahme wurde aus dem linearen Teil der Aufnahmekinetik bestimmt und in [nmol MA/min * mg TG] angegeben.

3.1.2 Bestimmung der Harnstoffaufnahme

Zur Bestimmung der Harnstoffaufnahme wurde genauso verfahren wie für die Methylammoniumaufnahme, jedoch wurden die Zellen in CgC-Medium bis zu einer OD_{600} von ca. 4 inkubiert. Nach 3 h Inkubation in CgCoN-Medium wurden jeweils 50 ml der Zellen in 500 ml Kolben gegeben und 14 C-markierter Harnstoff auf eine Konzentration von 20 mM ($1 \cdot 10^6$ "Counts" pro Ansatz) zugegeben. Sofort und nach 30, 60, 90, 120 und 150 min wurde jeweils eine Probe von 200 μ l entnommen und direkt in 3,8 ml Szintillationscocktail pipettiert. Die Radioaktivität wurde dann wiederum in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Harnstoffaufnahme wurde anhand der Abnahme der radioaktiven Markierung in den Überständen bestimmt.

3.2 Herstellung von Zellextrakten

Zellextrakte von *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* wurden durch Ultraschallaufschluß oder durch hochfrequentes Schütteln der Zellen in einer Schwingmühle hergestellt. Für den Ultraschallaufschluß wurden Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in ca. 700 µl des jeweiligen Aufschlußpuffers resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Der Aufschluß wurde dann durch 2 x 7 min Beschallung mit Ultraschall (Branson Sonifier, Branson Power Co., Danbury, USA) bei einem "output" Stufe 3 und einem "duty cycle" von 30 % unter Eiskühlung durchgeführt. Für den Aufschluß mit der Schwingmühle wurden Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in 700 µl eiskaltem Aufschlußpuffer resuspendiert und dann in 2 ml-Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2 – 0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluß erfolgte dann durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) für 2 x 30 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 min auf Eis gekühlt. Nach dem Zellaufschluß wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 4°C, 30 min) entfernt.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellextrakten

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in Zellextrakten von *E. coli*, *C. diphtheriae* und *C. glutamicum* wurde RotiNanoquant (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Herstellung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin verwendet.

3.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.4.1 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte nach dem Verfahren von Miller (1972). Dabei wird das farblose Substrat ortho-Nitrophenyl- β -D-galactosid (ONPG) von der β -Galactosidase zu gelbem ortho-Nitrophenol umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bei 420 nm bestimmt wird. Für die Messung wurden permeabilisierte Zellen eingesetzt. Zur Permeabilisierung wurden 10-15 ml Zellen mit einer OD₆₀₀ von ca. 5 durch Zentrifugation pelletiert, einmal in eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen, dann in 1,8 ml eiskaltem Testpuffer resuspendiert.

Hierauf wurden die Zellen in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und durch Zugabe von 200 µl 1%iger (w/v) Cethyltrimethylammoniumbromid-Lösung (CTAB) und vorsichtigem Mischen wurden die Zellen permeabilisiert. Von der Zellsuspension wurden verschiedene Volumina in Reaktionsgefäße pipettiert und mit Reaktionspuffer auf 800 µl ergänzt. Nach Präinkubation im Wasserbad bei 30 °C für 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung gestartet. Nach 10-15 min Inkubation bei 30°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt und die Zellen wurden durch 30 s Zentrifugation bei 13000 xg entfernt. Hierauf wurde die Extinktion des Überstandes photometrisch bei 420 nm gegen einen Blindwert, bei dem anstatt Zellsuspension Wasser verwendet wurde, bestimmt. Die β-Galactosidase-Aktivität wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$\beta\text{-Gal-Aktivität [U/mg Zellen]} = \frac{\Delta E \cdot V_T}{\varepsilon \cdot t \cdot M_Z \cdot d} \cdot \frac{\text{cm}^3}{\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^2 \text{min mg cm}}$$

ΔE : Extinktion bei 420 nm

V_T : Gesamtvolumen (hier 1,5 cm³)

ε : Extinktionskoeffizient (hier 4,5 µmol⁻¹ cm²)

t : Zeit [min]

M_Z : Masse Zellen [mg]. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht ca. 0,36 mg Zellen pro ml.

d : Schichtdicke der Küvette [hier 1 cm]

Phosphatpuffer:

0,1 M KH₂PO₄, pH (KOH) = 7,0.

Reaktionspuffer:

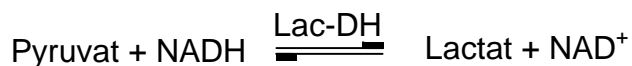
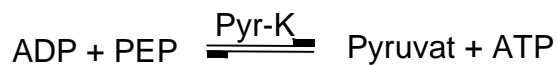
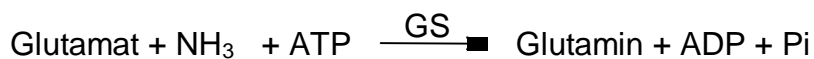
5 mM Tris, 5% (v/v) Glycerin, 10 mM KCl, pH (HCl) = 7,5.

ONPG-Lösung:

4 mg/ml ortho-Nitrophenyl-β-D-galactosid in Phosphatpuffer. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

3.4.2 Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität

Die Aktivität der Glutaminsynthetase in Zellextrakten von *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* wurde nach Wakisaka et al. (1990) bestimmt. Bei diesem Test werden nur die aktiven Untereinheiten der Glutaminsynthetase, d.h. die nicht durch Adenylylierung deaktivierten Untereinheiten, erfasst. Das Testverfahren beruht auf folgendem Prinzip (Pyr-K, Pyruvat-Kinase, Lac-DH, Lactatdehydrogenase, PEP, Phosphoenolpyruvat):



Gemessen wird die Abnahme von NADH bei 340 nm ($\epsilon = 6,3 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 1 U GS-Aktivität entspricht einem Umsatz von $1 \mu\text{mol NADH/min}$. Für den Zellaufschluss wurden 15 ml Zellsuspension mit einer OD_{600} von ca. 5 abzentrifugiert (4000 xg, 4°C), einmal mit eiskaltem Imidazolpuffer gewaschen und in ca. 700 μl Imidazolpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in vorgekühlte 2 ml-Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen pipettiert und durch Schütteln für 2 x 30 s im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) aufgeschlossen. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13000 xg konnte der zellfreie Überstand für die Messung verwendet werden. Für den Test wurde ein 10X konzentriertes Reagenziengemisch, bestehend aus den folgenden Komponenten, angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert:

- 100 μl NADH [15 mM]
- 100 μl Phosphoenolpyruvat [100 mM]
- 125 μl Pyruvatkinase (Roche Diagnostics)
- 18 μl Lactatdehydrogenase (Roche Diagnostics)
- 100 μl Ammoniumchlorid [10 mM]
- 4,56 ml Test-Puffer.

Test-Puffer:

100 mM Imidazol, 10 mM Na-Glutamat, 90 mM KCl, 1 mM MnCl₂, pH (HCl) = 7,0.

Imidazolpuffer:

100 mM Imidazol in Wasser. pH (HCl) = 7,0.

In eine Quarzküvette wurden dann 500 µl 10X Reagenziengemisch und 10-50 µl Zellrohextrakt pipettiert und mit Test-Puffer auf 990 µl ergänzt. Nach ca. 30-40 s wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl ATP-Lösung [100 mM] gestartet und die Abnahme der Absorption bei 340 nm (30°C) für 1 min im Photometer verfolgt, wobei alle 5-10 s die Messwerte gespeichert wurden. Die Glutaminsynthetase-Aktivität wurde aus der Steigung der Geraden (Auftragung Absorption gegen Zeit) und der eingesetzten Proteinmenge nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{GS-Aktivität [U/mg Protein]} = \frac{-dA}{6,3 \cdot 10^6 \cdot m_p} \frac{\text{mol}}{\text{min mg}}$$

dA: Steigung der Geraden (Auftragung Extinktion gegen Zeit)

m_p : Menge an Gesamtprotein [mg] das für den Test eingesetzt wurde.

3.4.3 Bestimmung der Urease-Aktivität

Die Urease-Aktivität von *C. glutamicum*-Stämmen wurde mit einem Indophenoltest bestimmt (Jahns et al., 1988). Dieser Test beruht auf dem colorimetrischen Nachweis von Ammonium. Dazu wurden Zellen aus einer Übernachtskultur in 25 ml frisches Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 1 angeimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ ca. 4-5) unter Schütteln inkubiert. Nach Entnahme von 15 ml der Kultur wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 xg, 4°C), einmal in Phosphatpuffer gewaschen und im gleichen Puffer auf eine OD₆₀₀ von ca. 200 resuspendiert. Die Zellen wurden dann durch Ultraschall aufgeschlossen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 4°C, 30 min) entfernt. 50 µl des zellfreien Überstandes oder Verdünnungen hiervon in Phosphatpuffer wurden in einem 15 ml Plastikröhrchen mit 900 µl Phosphatpuffer verdünnt. Die Messung wurde nach Präinkubation bei 30°C im Wasserbad durch Zugabe von 50 µl einer 200 mM Harnstofflösung gestartet. Nach 5 bis 20 min Inkubation bei 30°C wurde die

Reaktion durch Zugabe von 1 ml Lösung 1 und 1 ml Lösung 2 gestoppt. Die Suspension wurde 15 min auf 52°C erwärmt und anschließend mit 7 ml Wasser verdünnt. Die optische Dichte wurde gegen einen Blindwert, bei dem die Harnstofflösung nach Lösung 1 und 2 zugegeben wurde, bei 546 nm gemessen. Die Angabe der spezifischen Enzymaktivität erfolgte in $U \times mg \text{ Protein}^{-1}$ ($\mu\text{mol gebildetes Ammonium} \times \text{min}^{-1} \times mg \text{ Protein}^{-1}$). Für die Eichkurve wurde Ammoniumchlorid in einem Konzentrationsbereich von 0 – 1 mM eingesetzt. Zur Bestimmung der Urease-Aktivität nach Stickstoff-Hunger wurden die Zellen nach Erreichen der exponentiellen Phase einmal in CgCoN-Medium gewaschen, dann in CgCoN-Medium auf die gleiche OD_{600} resuspendiert und vor Bestimmung der Urease-Aktivität in diesem Medium 3 h inkubiert.

Phosphatpuffer:

50 mM KH_2PO_4 , pH (KOH) = 7,0.

Lösung 1:

5% (w/v) wassergesättigtes Phenol, 0,025% (w/v) Natriumnitroprussiat

Lösung 2:

2,5% (w/v) NaOH, 0,2% (w/v) Natriumhypochlorit

3.5 Native PAGE und Western-Blot

Zur Untersuchung der kovalenten Modifizierung des GlnK-Proteins durch Uridylreste wurden Zellextrakte aus *C. glutamicum*-Zellen, die in CgC-Medium angezogen bzw. in CgCoN-Medium gehungert wurden, präpariert und auf 10%ige nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gele (37,5% Acrylamid : 1% Bisacrylamid) aufgetragen (Goldberg, 1997). Als Elektrophorese-Puffer kam 1X konzentrierter Tris-Glycin-Puffer zum Einsatz. Die Elektrophorese wurde bei 50 mA durchgeführt.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Proteine aus dem Gel in einem "semi-dry-Blot" auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in 60%igem (v/v) Methanol inkubiert und dann in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde dann auf einen Stapel aus fünf in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer getränkten WHATMAN 3MM-

Papieren (Schleicher & Schüll, Dassel) in einer "semi-dry-blot"-Apparatur gelegt und darauf sofort das Proteingel gelegt. Zum Schluß wurde auf das Gel noch ein weiterer Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten WHATMANN 3MM-Papieren gelegt und der Proteintransfer auf die Membran bei 0,8 mA pro cm² Oberfläche für 1 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für 1 h in Waschpuffer mit 5% (w/v) Milchpulver blockiert und dann über Nacht bei 4 °C in dem gleichen Puffer mit einem Antikörper gegen das P_{II}-Protein von *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1994) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 min wurde wiederum Waschpuffer mit 5% Milchpulver auf die Membran gegeben und bei RT für 30 min inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte entweder über Chemolumineszenz oder über Präzipitation eines Farbstoffes auf der Membran. Für die Chemolumineszenz-Detektion wurde auf die blockierte Membran eine Lösung von Anti-Rabbit Peroxidase-Konjugat (Pierce, Rockford, USA) in Waschpuffer mit 5% Milchpulver (Verdünnung 1:10000) gegeben und 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit 0,03% (v/v) Tween 20 wurde die Membran mit Peroxidase-Luminol-Gemisch (SuperSignal[®] West Pico, Pierce) benetzt, 3 min bei RT inkubiert und dann in Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Signaldetektion erfolgte durch Belichten von Röntgenfilm. Im Falle der Detektion durch Farbstoff-Präzipitation wurde als zweiter Antikörper Anti-Rabbit Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma, Verdünnung 1:10000) verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde auf die Membran NBT/BCIP-Lösung (SIGMA FAST[™], Sigma) gegeben und ohne Schütteln bis zur gewünschten Signalstärke bei RT inkubiert.

Tris-Glycin-Puffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin in Wasser.

Transferpuffer:

10 mM CAPS, 1,5 M NaCl, 10% (v/v) Methanol, pH (NaOH) = 11

Waschpuffer:

50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH (HCl) = 7,4

4. Molekularbiologische Techniken

4.1 DNA-Techniken

4.1.1 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFX-Micro-Plasmid-Prep-Kit (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid wurde das Qiafilter Plasmid-Midi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

4.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* und *C. diphtheriae*

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte nach Eikmanns et al. (1994). *C. glutamicum*-Zellen wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen, abzentrifugiert und in 1 ml TE-Puffer mit 15 mg Lysozym in 15 ml Röhrchen resuspendiert. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden 200 µl 10%ige (w/v) SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Nach 2 min wurden 3 ml Lysis-Puffer und 125 µl Proteinase K (Roche Diagnostics) zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 2 ml gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und durch 20maliges vorsichtiges Invertieren des Röhrchens vermischt. Nach Zentrifugation (4000 xg, RT, 30 min) wurde der Überstand in 50 ml-Röhrchen überführt und mit eiskaltem Ethanol bis zum Rand aufgefüllt und vermischt. Die ausgefällte DNA wurde mehrmals in 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und dann in Wasser gelöst.

TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH (HCl) = 7,5

Lysis-Puffer:

10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH (HCl) = 8,2

4.1.3 Restriktion und Ligation von DNA und Agarose-Gelelektrophorese

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsenzymen von NEB (Schwalbach) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Restriktionsansätze wurden entweder mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder durch Agarose-Gelelektrophorese in TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) gereinigt. Aus den Agarose-Gelen wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mit Ready-to-go Ligationsansätzen von Pharmacia (Freiburg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion: PCR und RT-PCR

Zur DNA-Amplifizierung wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Routine-Amplifikationen von DNA-Fragmenten in einem Grössenbereich von 0,1-2 kb wurden mit RedTaq-Polymerase (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Größere DNA-Fragmente, insbesondere komplette Gene, wurden mit AccuTaq-Polymerase (Sigma) amplifiziert, die zusätzlich "proofreading"-Aktivität besitzt. In diesem Fall wurde die Extensionstemperatur auf 68°C erniedrigt. Die Primer wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Zur Synthese von Digoxigenin-markierten DNA-Fragmenten wurden Primer verwendet, die am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert waren. Für einen 100 µl Reaktionsansatz wurden zusammenpipettiert:

10 µl 10X PCR-Puffer
2 µl dNTP-Mix (10 mM jedes Deoxynucleotids)
je 1 µl Primer
3 µl RedTaq-Polymerase oder
1 µl AccuTaq-Polymerase
1 µl "template"
Wasser ad 100 µl.

Als "template" diente chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder eine 10 min bei 95°C gekochte Suspension von Zellen in Wasser. Die PCR wurde in Thermocyclern (Modell 9700, Perkin-Elmer, Weiterstadt oder Mastercycler[®] gradient, Eppendorff GmbH, Hamburg) durchgeführt. Das Standard-Amplifikationsprogramm umfaßte folgende Schritte:

2 min Initialdenaturierung bei 94°C dann 30 Cyclen (30 s 94°C, 30 s "annealing"-Temperatur der Primer, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments bei 72°C), anschließend 10 min bei 72°C, zum Schluß wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. RT-PCR-Reaktionen wurden mit dem OneStep RT-PCR-Kit von Qiagen durchgeführt. Als "template" wurde ca. 1 µg DNase-behandelte Gesamt-RNA (siehe 4.2.1) eingesetzt. Das Standard RT-PCR-Programm umfaßte folgende Schritte: 45 min bei 50°C (cDNA-Synthese) dann 15 min bei 95°C (Denaturierung der Reversen Transcriptase, Aktivierung der Taq-Polymerase), dann 30 Cyclen (30 s 95°C, 30 s "annealing"-Temperatur der Primer, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments bei 72°C), anschließend 10 min bei 72°C, zum Schluß wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

4.1.5 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten in *Sma*I-geschnittenen pUC18 erfolgte unter Verwendung des "SureClone Ligation Kits" von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Wenn nötig, wurden die Fragmente nach Plasmid-Amplifikation in *E. coli* aus pUC18 ausgeschnitten und in einen anderen Vektor subkloniert. Zur direkten gerichteten Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren wurden die Fragmente mit Primern amplifiziert an deren 5`-Ende die gewünschte Schnittstelle angefügt wurde und die folgendes Aussehen hatten:

5`-GCGCGC-Schnittstelle-Primersequenz-3`.

Die GC-Sequenz am 5`-Ende diente zum einen dazu, die Enden des Fragmentes fest zusammenzuhalten, zum anderen dazu, die Effizienz der Restriktion zu erhöhen, da Restriktionsenzyme dicht am Ende von DNA-Fragmenten normalerweise mit sehr geringer Effizienz schneiden. Das so an beiden Enden mit Schnittstellen versehene PCR-Produkt wurde dann für 2 h mit den gewünschten Restriktionsenzymen inkubiert, mit dem "QIAquick PCR-Purification Kit" (Qiagen, Hilden) gereinigt und dann direkt in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert.

4.1.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese erfolgte unter Verwendung des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg). Das zu mutagenisierende DNA-Fragment wurde in pUC18 kloniert und über PCR unter Verwendung zweier Primer in deren Sequenz die gewünschte Mutation eingebaut worden war, mit der "proofreading"-Polymerase Pfu amplifiziert. Anschließend wurde die "template"-DNA durch Verdau mit *DpnI*, einem Restriktionsenzym, das nur methylierte und hemimethylierte DNA als Substrat akzeptiert (Nelson & McClelland, 1992), abgebaut. Kompetente *E. coli* DH5 α *mcr* wurden nach dem Verdau mit der verbleibenden, mutierten DNA transformiert. In den Zellen wurden die Enden des Plasmids durch die Ligase verknüpft. Nach Plasmid-Präparation wurde das Vorhandensein der gewünschten Mutation durch Sequenzierung überprüft.

4.1.7 Gelretardationstests

Zum Nachweis der Bindung des AmtR-Proteins an die Promotorregionen stickstoff-regulierter Gene wurden Gelretardationstests eingesetzt. Hierbei wird ein DNA-Fragment mit der putativen Bindestelle in einem Bindungsansatz mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert und danach auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Bindet das Protein an das DNA-Fragment so zeigt das gebundene DNA-Fragment gegenüber der freien DNA ein verzögertes Laufverhalten im Gel. Für den Gelretardationstest wurden Fragmente der Promotorregionen über PCR amplifiziert und durch Verwendung Digoxigenin-markierter Primer am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert. Als Quelle für das AmtR-Protein dienten Zellextrakte aus *E. coli* DH5 α *mcr* pUC11-1.8, die wie folgt präpariert wurden: 250 ml LB-Medium mit Carbenicillin in einem 2 l-Kolben wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 α *mcr* pUC11-1.8 beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 xg, 4°C) pelletiert und in TEK-Puffer (2 ml pro Gramm Naßgewicht) resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einer "French Press" aufgebrochen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 4°C, 30 min) entfernt. Die zellfreien Überstände wurden mit dem gleichen Volumen TEK-Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert. Die Bindungsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

- 10 ng DIG-markiertes DNA-Fragment
- 5-30 µg Gesamtprotein (bezogen auf Zellrohextrakt)
- 2 µg Kalbsthymus-DNA (Sigma, Deisenhofen) als Kompetitor (Ultraschall-fragmentiert)

TEK-Puffer mit 150 µg/ml BSA (NEB, Schwalbach) ad 15 µl.

Die Komponenten wurden auf Parafilm in einer Petrischale auf Eis zusammenpipettiert und 15 min inkubiert. Dann wurde 1 µl Gelladepuffer zugegeben und die Ansätze wurden auf ein 4%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (Acrylamid : Bisacrylamid 48 : 1,5) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 12-15 mA durchgeführt, bis die Farbstoff-Front das untere Ende des Gels erreicht hatte, als Elektrophorese-Puffer kam 0,5X TBE-Puffer (Sambrook et al., 1989) zum Einsatz. Nach dem Gellauf wurde die DNA in einem Semi-dry-Blot auf eine Nylonmembran geblotet. Hierzu wurde die rückseitige Glasplatte entfernt und auf das Gel eine mit 0,5X TBE-Puffer angefeuchtete Nylonmembran (Biobond™ Nylon Membrane, Sigma, Deisenhofen) gelegt. Zum Aufnehmen der Flüssigkeit wurden auf die Membran vier in Gelgröße zugeschnittene WHATMANN 3MM Papiere (Schleicher & Schüll, Dassel), ein Schaumstoff-Kissen und zum Schluß eine Glasplatte gelegt. Der Aufbau wurde mit einer 1 kg schweren Glasflasche beschwert und für den Transfer für 45 min stehen gelassen. Danach wurde die Membran kurz in 10X SSC gewaschen, an der Luft getrocknet und durch zweimalige Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Energiedosis von 125 mJ/cm² in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg, Einstellung "preset 0") fixiert. Nach 30 min Blockierung der Membran in Waschpuffer mit 5% (w/v) Milchpulver wurde eine Lösung von Anti-DIG Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Verdünnung 1:10000) in Waschpuffer mit 5% Milchpulver zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 20 min wurde die Membran 3 min in Detektionspuffer inkubiert, mit CSPD-Lösung benetzt, in Klarsichtfolie eingeschweißt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte danach durch Belichten von Röntgenfilm.

TEK-Puffer:

10 mM Tris, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 7 mM 2-Mercaptoethanol, pH (HCl) = 8,0.

TEK-Glycerin:

TEK-Puffer mit 50% (v/v) Glycerin.

4%iges Acrylamid-Gel:

1,5 ml 5X TBE-Puffer, 1,25 ml Acrylamid-Lösung (48% Acrylamid : 1,5% Bisacrylamid), 12 µl TEMED, 50 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, ad 15 ml Wasser.

Gelladepuffer:

TEK-Puffer mit 15% (w/v) Ficoll 400 und 0,002% (w/v) Bromphenolblau.

Waschpuffer:

50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) = 7,5.

Detektionspuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH (HCl) = 9,5.

CSPD-Lösung:

1:100-Verdünnung von CSPD-Reagenz (Roche Diagnostics) in Detektionspuffer.

4.1.8 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde die Dideoxynucleotid-Terminationsmethode nach Sanger et al. (1977) eingesetzt. Die Detektion der Sequenzierungsprodukte erfolgte automatisch mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (ABI, Heidelberg) unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Primer. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Warrington, England) verwendet. Die Ansätze für die Sequenzierreaktion setzten sich wie folgt zusammen:

1 µg Plasmid-DNA

4 µl Ready Reaction Mix (aus dem Sequenzier-Kit)

2 µl Primer (10 pmol/µl)

ad 15 µl HPLC-gereinigtes Wasser

Die Komponenten wurden in einem 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert. Hierauf erfolgte die Sequenzierreaktion in einem Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm:

3 min 96°C (Denaturierung), dann 30 Cyclen (15 s 96°C → 15 s "annealing"-Temperatur des Primers → 4 min 60°C). Zum Schluß wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Zur Reinigung der Sequenzierprodukte wurde der Reaktionsansatz zusammen mit 80 µl Wasser in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl 3 M Na-Acetat (pH = 4,6) und 300 µl Ethanol versetzt und 30 min bei 13000 xg und 20°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl TSR-Reagenz (PE Biosystems) gelöst. Nach 2 min Denaturierung bei 90°C erfolgte die Auftrennung der Sequenzierprodukte und die Signaldetektion in einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer.

4.2 RNA-Techniken

Alle RNA-Arbeiten wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt und es wurden durchgehend Handschuhe getragen. Grundsätzlich wurden alle Geräte und Lösungen, wenn möglich, zur Eliminierung von RNase-Kontaminationen für 45 min bei 121°C autoklaviert.

4.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* und RNA-Gelelektrophorese

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* wurde das NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Zellen von *C. glutamicum* bzw. *C. diphtheriae* wurden über Nacht in Medium mit guter Stickstoff-Versorgung angezogen (*C. glutamicum* in CgC-Medium, *C. diphtheriae* in BHI-Medium) und mit dieser Über-Nacht-Kultur wurde frisches Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5-1,0 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 4-5 weiterinkubiert. Nach Erreichen dieser OD wurde eine Probe von 10-12 ml der Kultur in vorgekühlten 15 ml Rührchen abzentrifugiert (4000 xg, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde dann sofort in 700 µl RA1-Puffer resuspendiert und in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen pipettiert. Hierauf erfolgte der Zellaufschluß durch hochfrequentes Schütteln der Rührchen im

FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) für 2 x 30 s bei 6,5 m/s. Danach wurden die Röhren sofort für 2 min bei 13000 x g und 4°C für 2 min zentrifugiert, der Überstand wurde mit 525 µl Ethanol versetzt und mit dem NucleoSpin RNAII-Kit nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet, wobei die RNA während der Präparation routinemäßig mit DNase behandelt wurde, um Kontaminationen durch chromosomale DNA zu entfernen.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Präparation wurde eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden Agarose-Gel durchgeführt. Hierfür wurde 1 g Agarose in 74 ml Wasser gelöst, mit 10 ml 10X MOPS-Puffer versetzt und 16 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung zugegeben. Nach Erstarren des Gels wurden 5 µl der RNA mit 20 µl Gelladepuffer vermischt, 10 min auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt, als Puffer wurde 1X MOPS-Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet.

10X MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH (NaOH) = 7,0

Gelladepuffer:

250 µl 100% Formamid, deionisiert, 83 µl 37% Formaldehyd, 50 µl 10X MOPS-Puffer, 10 µl 2,5% Bromphenolblau, 50 µl 100% Glycerin, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml), ad 500 µl RNase-freies Wasser.

4.2.2 RNA-Hybridisierungen

Zur Untersuchung der Transkription von Stickstoff-kontrollierten Genen wurden Dot-Blots durchgeführt. Ca. 5 µg Gesamt-RNA pro Dot wurden in 10X SSC verdünnt und mittels einer Dot-Blot Apparatur (S & S Minifold I, Schleicher & Schüll, Dassel) unter langsamem Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBond™Nylon Membrane, Sigma, Deisenhofen) aufgetragen. Nach Trocknen der Membran wurde die RNA durch UV-Bestrahlung in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) fixiert (125 mJ/cm², Einstellung "preset 0"). Die Membran wurde dann 1 h bei 50°C in Hybridisierungslösung blockiert. Nach Erwärmen auf 68°C wurde die DIG-markierte RNA-Sonde zugegeben und bei dieser Temperatur die Hybridisierung über Nacht durchgeführt. Zur Entwicklung der Blots wurde die Membran zweimal in

Waschlösung 1 bei 20°C für je 15 min gewaschen, dann zweimal in Waschlösung 2 bei 68°C für je 25 min. Nach kurzem Waschen mit Waschpuffer bei 20°C wurde die Membran durch 30 min Inkubation bei 20°C in 20 ml 1X Blocking-Reagenz blockiert. Hierauf wurde Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics) (Verdünnung 1:10000) zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 20 min wurde die Membran für 3 min in Detektionspuffer inkubiert, mit CSPD-Lösung benetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nach 15 min Inkubation bei 37°C konnten die Signale durch Belichten von Röntgenfilm detektiert werden.

Hybridisierungslösung:

pro 100 ml: 50 ml Formamid, 20 ml 10X Blocking-Reagenz, 25 ml 20X SSC, 1 ml 10% (w/v) Na-Lauroylsarkosinat, 200 µl 10% (w/v) SDS, ad 100 ml Wasser.

20X SSC:

3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat, pH (HCl) = 7,0.

10X Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics) wurde in 100 ml Maleinsäurepuffer suspendiert und durch Erwärmen auf 60°C in der Mikrowelle unter Rühren gelöst. Bei Bedarf wurde die fertige Lösung in Maleinsäurepuffer weiter verdünnt.

Waschlösung 1:

2X SSC, 0,1% (w/v) SDS

Waschlösung 2:

0,2X SSC, 0,1% (w/v) SDS

Maleinsäurepuffer:

0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) = 7,5.

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3% (v/v) Tween 20.

Detektionspuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH (NaOH) = 9,0

CSPD-Lösung:

1:100-Verdünnung von CSPD-Reagenz (Roche Diagnostics) in Detektionspuffer.

4.2.3 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes Stickstoff-regulierter Gene wurde das 5`-3`-RACE-Kit von Roche Diagnostics nach Angaben des Herstellers verwendet. RACE ist eine Abkürzung für Rapid amplification of cDNA ends und funktioniert nach folgendem Prinzip: Ausgehend von einem für das gesuchte Gen spezifischen Primer und Gesamt-RNA als "template" wird mittels Reverser Transcriptase aus der mRNA cDNA synthetisiert. Durch Zugabe des Enzyms Terminale Transferase und eines sogenannten Anker-Oligonucleotids wird an das 3`-Ende der cDNA, das identisch mit dem 5`-Ende der gesuchten mRNA ist, ein Oligonucleotid ligiert, das unter anderem eine polyA-Sequenz enthält. Der Reaktionsansatz wird aufgereinigt und als "template" in einer normalen PCR-Reaktion eingesetzt, in der als Primer ein weiterer Gen-spezifischer Primer und ein zu dem Ankeroligonucleotid komplementärer Primer verwendet werden. Damit ist eine Amplifikation des 5`-Endes der gesuchten mRNA möglich. Der PCR-Ansatz wurde dann mittels Gelelektrophorese aufgereinigt und die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in den Vektor pUC18 kloniert. Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurden die Plasmide sequenziert. Anhand der bekannten Ankersequenz war eine einfache Identifizierung des Transkriptionsstarts möglich.

4.2.4 Präparation von RNA-Sonden durch *in-vitro*-Transkription

Zur spezifischen Detektion bestimmter mRNA-Spezies in Gesamt-RNA wurden Digoxigenin-markierte "antisense"-RNA-Sonden verwendet. Zur Präparation dieser Sonden wurde ein ca. 0,3 – 0,9 kb großes Fragment des entsprechenden Gens in die Vektoren pGEM3z, pGEM4z oder pSP73 (Promega, Mannheim) kloniert. Diese Vektoren enthalten beiderseits der "multiple cloning site" Promotoren der RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7. Die Plasmide wurden durch Schneiden mit geeigneten Restriktionsenzymen am 5`-Ende des Inserts linearisiert und dienten nach Reinigung mittels Gelelektrophorese als "template" in einem *in-vitro*-Transkriptionsansatz. Zur Markierung der entstehenden RNA-Sonden diente Digoxigenin-11-dUTP. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µg linearisiertes Plasmid in RNase-freiem Wasser
 - 2 µl DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)
 - 2 µl 10X Transcription Buffer (Roche Diagnostics)
 - 1 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas)
 - 2 µl SP6 oder T7 RNA-Polymerase (Roche Diagnostics)
- RNase-freies Wasser ad 20 µl.

Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde das Plasmid durch Zugabe von 1 µl DNase (Roche Diagnostics) und 25 min Inkubation bei 37°C entfernt. Hierauf wurde der Ansatz bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert. Zur Hybridisierung wurden 1-2 µl des Ansatzes verwendet.

4.3 Techniken zur Manipulation von Zellen

4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden nach Inoue et al. (1990) hergestellt. Dazu wurden *E. coli*-Zellen tagsüber in 20 ml LB-Medium angezogen und von dieser Vorkultur abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (Sambrook et al., 1989) in einem 2 l Kolben gegeben. Die Zellen wurden dann unter Schütteln über Nacht bei 20 °C angezogen. Hierauf wurden die Zellen nach 10 min Kühlung in Eis abzentrifugiert (4000 xg, 4 °C), in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM

KCl, 55 mM MnCl₂, pH (KOH) = 6,7) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendieren in 40 ml TB-Puffer wurden 1,4 ml DMSO zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Hierauf wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, 100 µl davon mit der Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und erneuter zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 900 µl SOC-Medium (Sambrook et al., 1989) zugegeben, die Zellen unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert und dann auf LB-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

Kompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl et al. (1989) hergestellt. Dazu wurden 200 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren (siehe unten) in einem 2 l Kolben mit einer *C. glutamicum*-Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 angeimpft und über Nacht bei 20 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 xg, 4 °C) und fünfmal in eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Zum Schluß wurden die Zellen in 1 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und 50 µl davon in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand (Biorad, München) mit der Plasmid-DNA vermischt. Hierauf wurden die Zellen in einem Gene-Pulser (Biorad) durch einen Elektropuls von 2,5 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Sofort nach dem Puls wurde 1 ml BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) zugegeben, der Inhalt der Küvette wurde in 15 ml Plastikröhrchen überführt, unter Schütteln bei 30°C für 1,5 – 2 h inkubiert und dann auf BHI-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

Kompetente Zellen von *C. diphtheriae* wurden wie folgt präpariert: 200 ml BHI-Medium mit 0,1% (v/v) Tween 80 in einem 2 l-Kolben wurden mit einer *C. diphtheriae*-Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,3 – 0,5 beimpft und über Nacht bei 20-22°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und dann fünfmal in eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen wie für *C. glutamicum* beschrieben. Zum Schluß wurden die Zellen ebenfalls in 1 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Die Transformation erfolgte wie für *C. glutamicum* beschrieben, jedoch wurde die Regeneration bei 37°C durchgeführt.

LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren:

pro l: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 4 g Isonicotinsäurehydrazid, 25 g Glycin, 1 ml Tween 80, Sterilisation durch Filtration.

4.3.2 Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten und von *lacZ*-Fusionsstämmen

Die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* erfolgte nach Schäfer et al. (1994). Für Insertionen wurde ein 500 – 1000 bp großes internes DNA-Fragment des entsprechenden Gens in pK18*mob* kloniert und dieses Konstrukt in die Zellen eingebracht. Der Vektor pK18*mob* kann von den Zellen nicht repliziert werden, und bleibt nur erhalten wenn eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination erfolgt. Dadurch wird das entsprechende Gen inaktiviert. Für Gendeletionen wurde der Vektor pK18*mobsacB* verwendet. Dieser Vektor trägt zwei Selektionsmarker: ein Kanamycin-Resistenzgen Kan^R und ein *sacB*-Gen, dessen Produkt für Zellen letal ist, die auf Saccharose-haltigem Medium wachsen. pK18*mobsacB* kann ebenfalls in der Zellen nicht repliziert werden. Zur Konstruktion der Deletion wurde ein Sequenzabschnitt von 500 – 1000 bp stromauf- und abwärts der gewünschten Deletionsstelle in pK18*mobsacB* kloniert und das Konstrukt in die Zellen eingebracht. In den Zellen erfolgt eine Integration in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination. Die entstandenen Kanamycin-resistenten Klone wurden über Nacht in LB-Medium ohne Antibiotikum inkubiert. Dadurch wird das Entstehen von Klonen ermöglicht, die den Vektoranteil in einer zweiten Rekombination verloren haben. Im Genom verbleibt entweder die markerfreie Deletion oder das native Gen wird wiederhergestellt. Nach Ausplattieren der Zellen auf BHI-Medium mit 10% Saccharose können nur die Zellen wachsen, die den Vektoranteil verloren haben. Da das *sacB*-Gen anfällig für Mutationen ist, wurden die Saccharose-resistenten Klone zur Bestätigung der Eliminierung des Vektoranteils auf BHI-Medium mit Kanamycin ausgestrichen. Klone, die Kanamycin-sensitiv waren, wurden über PCR auf Vorhandensein der Deletion getestet.

Zur Konstruktion von *lacZ*-Fusionen in *C. glutamicum* kam das gleiche Prinzip zur Anwendung wie zur Konstruktion der Deletionen. Ein Sequenzabschnitt von 500 bp stromauf- und abwärts des Startcodons des zu fusionierenden Gens wurde über PCR amplifiziert und in pUC18 kloniert. Über PCR wurden dann zwei geeignete

Schnittstellen stromabwärts des Startcodons so eingefügt, dass das Leseraster erhalten blieb, und das Konstrukt mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten. Hierauf wurde das *lacZ*-Gen, an das die gleichen Schnittstellen angefügt worden waren, ebenfalls mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem Plasmid ligiert. Die *lacZ*-Fusion wurde dann aus dem Plasmid ausgeschnitten und in pK18*mobsacB* ligiert. Mit diesem Konstrukt wurde dann die *lacZ*-Fusion im Genom von *C. glutamicum* konstruiert. Klone mit integriertem *lacZ*-Gen wurden ebenfalls über PCR identifiziert.

III. Ergebnisse

1. Regulation der Aufnahme von Stickstoffquellen

1.1 Expressionsregulation des *amt*-Gens

Ammonium wird unter Stickstoff-Mangelbedingungen über zwei spezifische Transportsysteme aufgenommen: Amt, das neben Ammonium auch Methylammonium zu transportieren vermag und von dem *amt*-Gen kodiert wird und AmtB (kodiert von *amtB*), das ausschließlich Ammonium transportieren kann (Meier-Wagner et al., 2001). Das *amt*-Gen war das erste Gen von *C. glutamicum*, für das mittels *amt-lacZ*-Fusionen eine Expressionsregulation in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung gezeigt wurde (Jakoby et al., 2000). Eine messbare β -Galactosidase-Aktivität war nur unter Stickstoff-Mangel feststellbar. Über das Screening einer *C. glutamicum*-Genbank in einem *E. coli*-Reportergerüst wurde ein spezifischer Repressor der *amt*-Transkription isoliert, der AmtR (kodiert von *amtR*) genannt wurde. Eine *amtR*-Deletionsmutante mit einer ins Genom integrierten *amt-lacZ*-Fusion zeigte eine deregulierte β -Galactosidase-Aktivität (Jakoby et al., 2000). Diese Ergebnisse bildeten den Ausgangspunkt für den Einstieg in die Untersuchung der Expressionsregulation in *C. glutamicum*.

Weitergehende Untersuchungen zur Expressionsregulation in *C. glutamicum* sollten über RNA-Hybridisierungen durchgeführt werden. Zur Bestimmung des Zeitfensters, innerhalb dessen eine Reaktion auf Stickstoff-Mangel erfolgt, wurde aus dem Wildtyp und der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 bei guter Stickstoff-Versorgung und 5, 10, 20, 30 und 45 min nach Einsetzen von Stickstoff-Mangel RNA isoliert und mit einer *amt*-RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 5A). Dabei zeigte sich, dass bereits 10 min nach Einsetzen von Stickstoff-Mangel ein starker Anstieg der *amt*-Transkription erfolgte, während unter guter Stickstoff-Versorgung kein Signal sichtbar war. Demgegenüber zeigte der Stamm MJ6-18 unter diesen Bedingungen eine völlig deregulierte *amt*-Transkription. Dies bestätigte die Ergebnisse der *amt-lacZ*-Fusionen. Das *amt*-Gen selber befindet sich in seiner chromosomalen Umgebung 761 bp stromabwärts des *ppc*-Gens, das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodiert. Zwischen dem 3'-Ende von *ppc* wurde zusätzlich ein ORF gefunden der hohe Ähnlichkeit zum *secG*-Gen aus *E. coli* aufweist, das für eine Komponente des Proteinsekretionsapparates

kodiert (Siewe et al., 1996). Unmittelbar stromabwärts von *amt* wurde ein ORF mit signifikanter Ähnlichkeit zu dem *ocd*-Gen aus *Sinorhizobium meliloti* gefunden. Stromabwärts von *ocd* befindet sich ein ORF, der hohe Ähnlichkeit zu *soxA* aus *Streptomyces spec.* aufweist, das für eine Sarcosin-Oxidase kodiert (Jakoby, 1998) (Abb. 5B). Auffällig ist die dichte Aufeinanderfolge der Gene *amt*, *ocd* und *soxA*, dies könnte ein Hinweis auf eine transkriptionelle Kopplung der Gene sein. Da die Ornithin-Cyclodeaminase den Abbau von Ornithin zu Prolin und Ammonium katalysiert, wäre eine gleichzeitige Expression von *amt* sinnvoll, um den Verlust von Ammonium zu vermeiden.

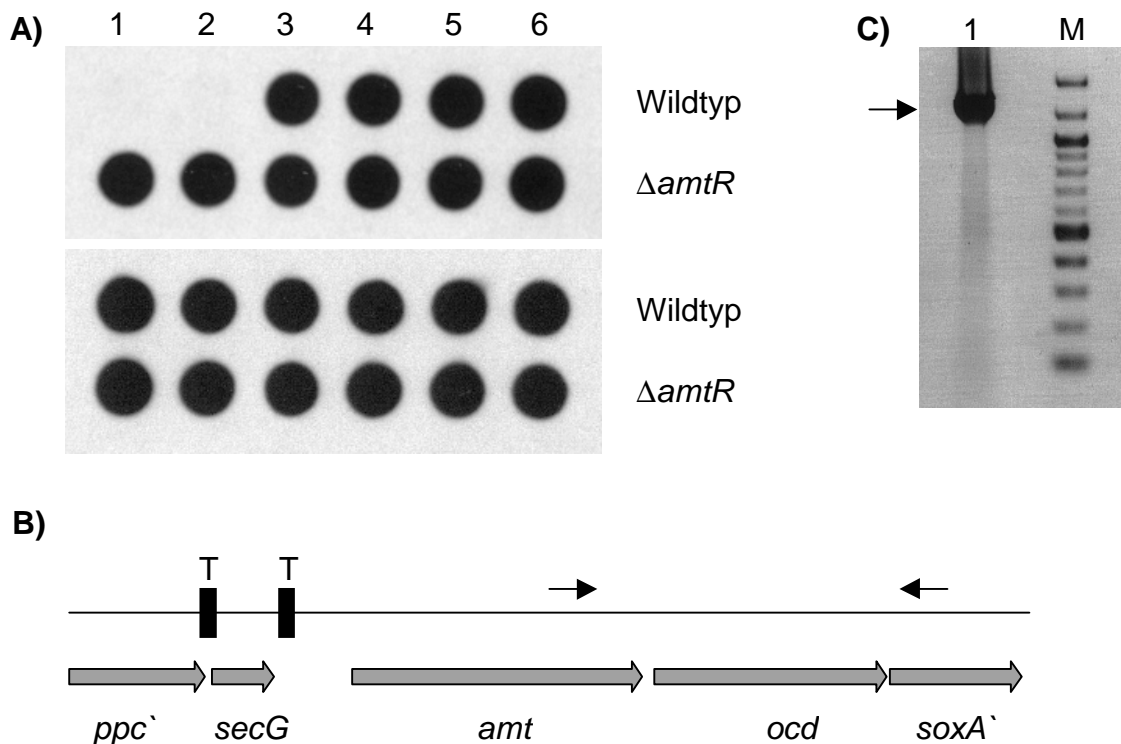


Abb. 5: **A)** Transkription des *amt*-Gens im Wildtyp und in der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18 bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. nach 5, 10, 20, 30 und 45 min Stickstoff-Mangel (2-6). Oben *amt*-Transkription, unten 16SrRNA-Transkription als Referenz. **B)** Chromosomale Umgebung des *amt*-Gens in *C. glutamicum*. Die Pfeile markieren die Positionen der für den Nachweis der Operonstruktur von *amt-ocd-soxA* benutzten Primer. T, Terminator. **C)** Nachweis der Operonstruktur von *amt-ocd-soxA* durch RT-PCR. 1: RNA aus Zellen nach 30 min Stickstoff-Mangel als "template", M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach). Das PCR-Produkt ist durch einen Pfeil markiert.

Die vermutete Operonstruktur von *amt*, *ocd* und *soxA* konnte durch RT-PCR bestätigt werden. Dazu wurde RNA aus Stickstoff-gehungerten *C. glutamicum*-Zellen isoliert und als "template" in einem RT-PCR-Ansatz eingesetzt, in dem Primer verwendet wurden, die im 3`-Ende von *amt* und im 5`-Ende von *soxA* lokalisiert waren. Dabei wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten (Abb. 5C).

Ungeklärt war nach den vorangegangenen Untersuchungen eine genaue Eingrenzung der Bindestelle von AmtR im *amt*-Promotor und die Isolierung des Bindemotivs. Hierzu wurden Gelretardationstests mit sukzessive kleineren Fragmenten des *amt*-Promotorbereiches durchgeführt. Damit konnte schließlich ein 100 bp großes Fragment isoliert werden, das von AmtR spezifisch gebunden wurde (Abb. 6B). Auffällig war das Auftreten mehrerer Banden bei geringen AmtR-Konzentrationen, die bei steigender Proteinmenge zu einer Bande verschmolzen. Dies ließ die Schlußfolgerung zu, dass AmtR-DNA-Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie gebildet wurden. Bei der Analyse der Sequenz des von AmtR gebundenen Fragmentes fiel das zweimalige Vorhandensein der Sequenz ATCTATAGN₄ATAG auf (bezeichnet als B1 bzw. B2, Abb. 6A). Daher wurde vermutet, dass dies die Bindestellen von AmtR im *amt*-Promotor sind. Zur Überprüfung wurden in den Gelretardationstests *amt*-Promotorfragmente eingesetzt, in denen jeweils eine der beiden oder beide Sequenzmotive deletiert worden waren. Fragmente, in denen jeweils eines der beiden Sequenzmotive deletiert worden war, zeigten noch AmtR-Bindung (Abb. 6C und 6D), wurden jedoch beide Sequenzmotive deletiert, war keine Bindung mehr feststellbar (nicht gezeigt). Dies belegt, dass die beiden Sequenzmotive B1 und B2 die Bindestellen von AmtR sind. Interessant erscheint außerdem, dass die Deletion jeweils nur einer der Bindestellen einen Effekt auf das in den Gelretardationstests beobachtete Bandenmuster hatte. Wurde B1 deletiert, zeigte sich nur eine DNA-Bande, während die Deletion von B2 zum Auftreten von 2 Banden führte.

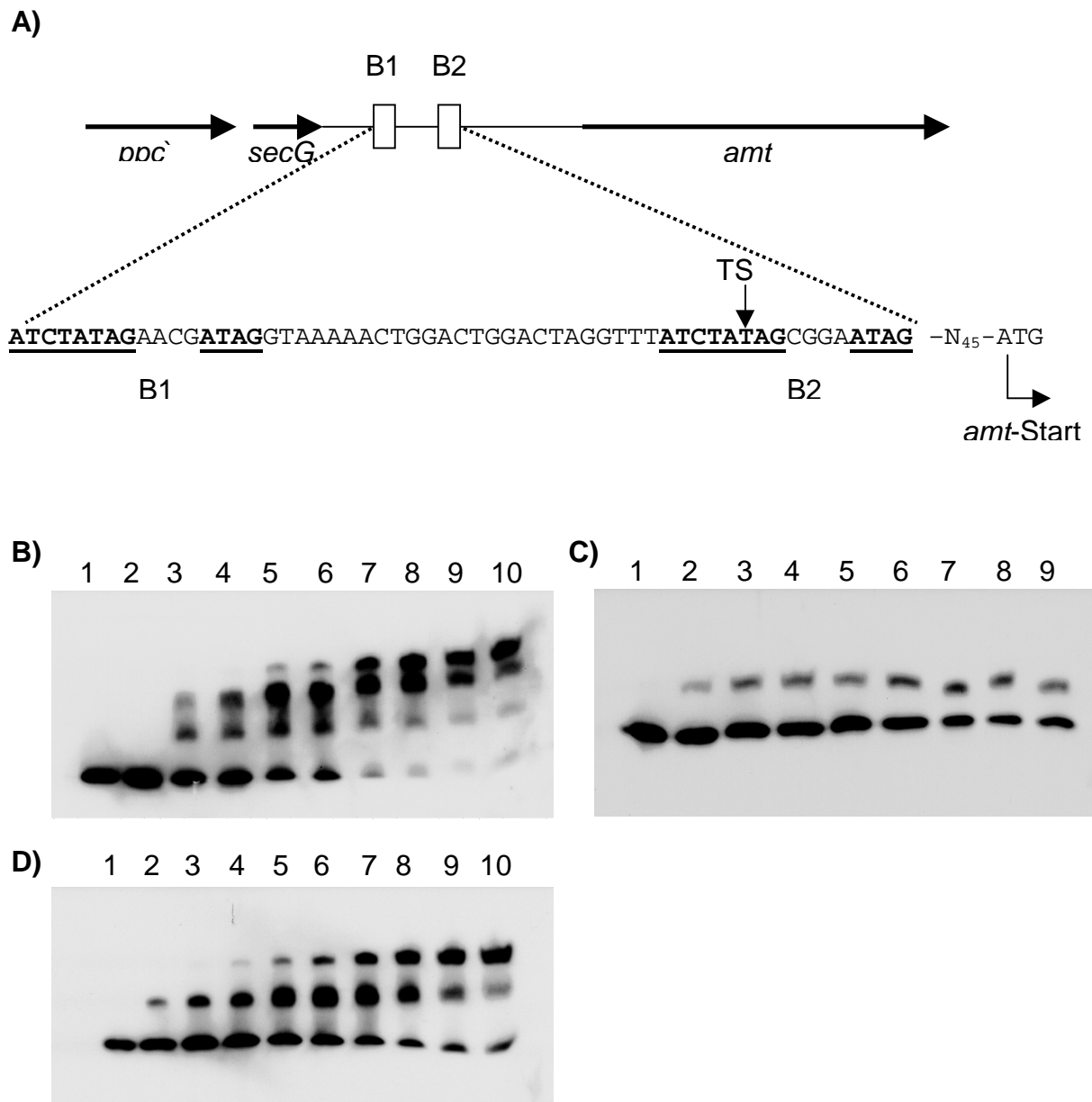


Abb. 6: **A)** Darstellung der AmtR-Bindestellen B1 und B2 im *amt*-Promotorbereich. Die Bindestellen B1 und B2 sind fett gedruckt und unterstrichen. TS, Transkriptionsstart. **B)** Gelretardationstest mit einem Fragment aus dem *amt*-Promotorbereich in dem die Bindestellen B1 und B2 enthalten sind. 1: 10 µg Protein aus *E. coli* pUC18 (Kontrolle), 2-10: 2-10 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR) in 1 µg-Schritten. **C)** Gelretardationstest mit einem Fragment aus dem *amt*-Promotorbereich in dem die Bindestelle B1 deletiert wurde. Proteinmengen wie in B). **D)** Gelretardationstest mit einem Fragment aus dem *amt*-Promotorbereich in dem die Bindestelle B2 deletiert wurde. Proteinmengen wie in B).

Um Aufschluß über die physiologischen Gründe für das Vorhandensein zweier AmtR-Bindestellen im *amt*-Promotor zu erhalten, wurde der Transkriptionsstartpunkt von *amt* mittels der 5`-RACE-Methode bestimmt und untersucht, welchen Effekt die Deletion der beiden AmtR-Bindestellen auf die *amt*-Transkription hatte. Der Transkriptionsstart sowohl bei guter Stickstoff-Versorgung als auch bei Stickstoff-Mangel wurde 56 Bp stromaufwärts des *amt*-Startcodons gefunden und befindet sich damit genau in der AmtR-Bindestelle B2 (Abb. 6A). In den *C. glutamicum*-Stämmen $\Delta 268/283$ bzw. $\Delta 304/320$, in denen die AmtR-Bindestelle B1 bzw. B2 im Chromosom deletiert worden war, war die *amt*-Transkription immer noch reguliert (nicht gezeigt). Dies belegt, dass beide AmtR-Bindestellen unter physiologischen Bedingungen von AmtR besetzt sind, wenn die Zellen unter Stickstoff-Überschuß wachsen. Wahrscheinlich ermöglicht dies eine besonders stringente Expressionskontrolle.

1.2 Expressionsregulation des *amtB*-Gens

Da das *amtB*-Gen ebenfalls für ein Ammoniumaufnahme-system kodiert, wurde untersucht, ob auch die Expression von *amtB* unter Stickstoff-Kontrolle steht. Das *amtB*-Gen befindet sich in seiner chromosomalen Umgebung stromaufwärts des *glnK*-Gens, das für ein P_{II}-ähnliches Protein (GlnK) kodiert und eines *glnD*-Gens, das für eine Uridylyltransferase (UTase) kodiert. Diese Anordnung der Gene *amtB*, *glnK*, *glnD* ist interessanterweise in den meisten Actinomyceten konserviert (Arcondéguy et al., 2001). Bei der Analyse der Promotorregion von *amtB* wurde ein Sequenzmotiv, ATCTATAGN₁ATAG, gefunden, das große Ähnlichkeit zu den AmtR-Bindestellen im *amt*-Promotor hatte. Daher wurde vermutet, dass die Expression von *amtB* ebenfalls unter AmtR-Kontrolle stehen könnte. Dies konnte mittels RNA-Hybridisierungen mit RNA, die aus Wildtyp-Zellen und Zellen der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 präpariert wurde, bestätigt werden (Abb. 7). Im Wildtyp war eine regulierte *amtB*-Transkription zu beobachten, eine Antwort auf Stickstoff-Mangel erfolgte im gleichen Zeitfenster wie im Falle der *amt*-Transkription. Demgegenüber erfolgte in dem Stamm MJ6-18 eine völlig deregulierte *amtB*-Transkription. Zusätzlich konnte über einen Gelretardationstest nachgewiesen werden, dass AmtR tatsächlich an das Sequenzmotiv ATCTATAGN₁ATAG bindet (Abb. 8B).

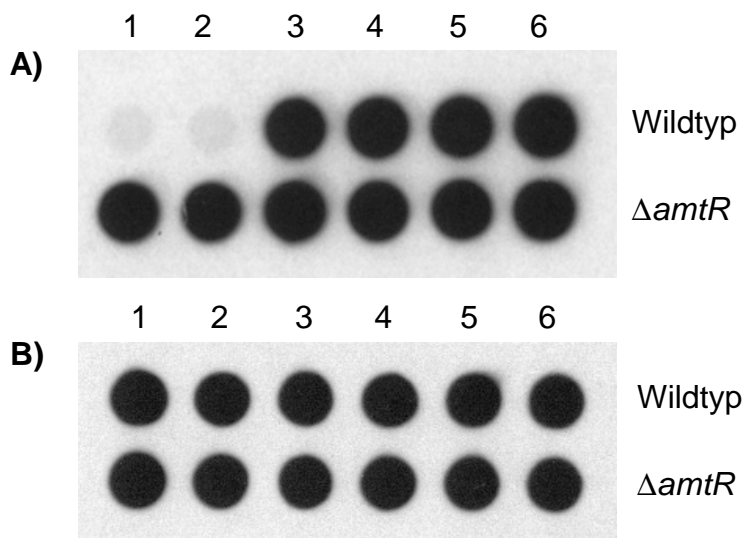


Abb. 7: Transkription des *amtB*-Gens im Wildtyp und in der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18. **A)** *amtB*-Transkription, **B)** 16SrRNA-Transkription als Referenz. 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-6: 5, 10, 20, 30, 45 min Stickstoff-Mangel.

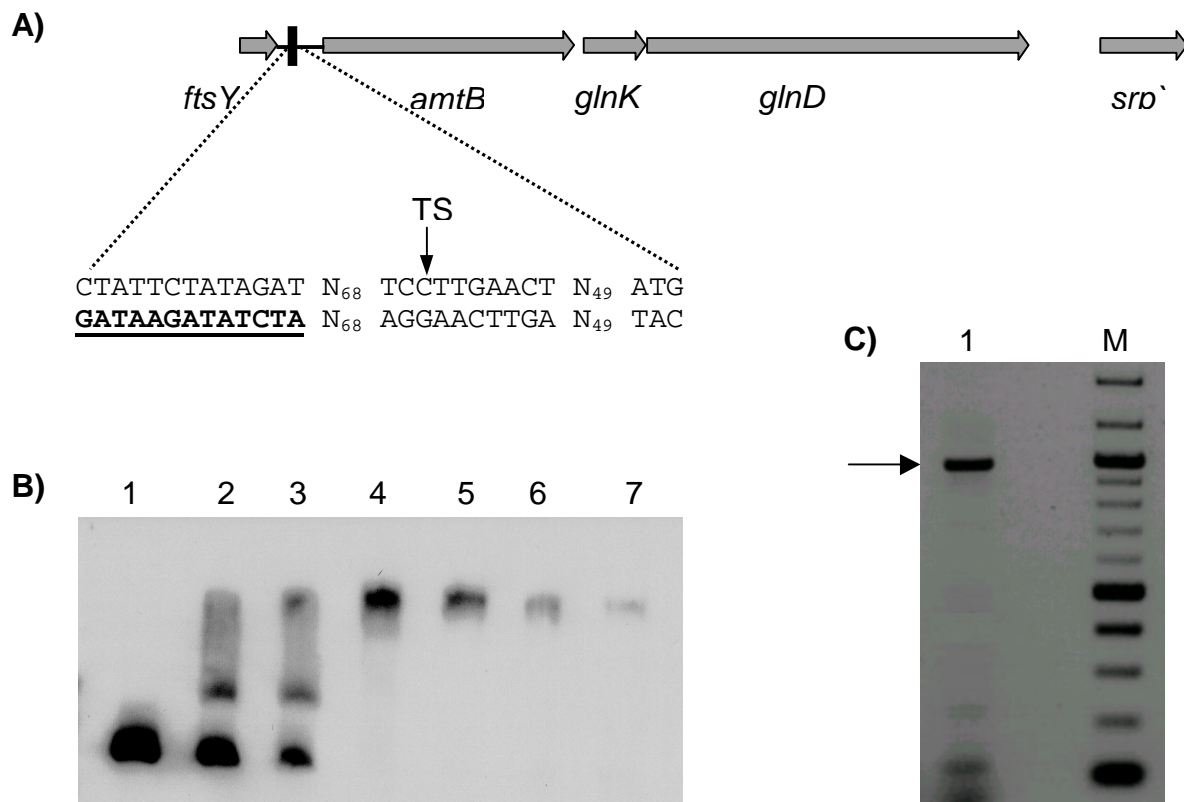


Abb. 8: **A)** Anordnung der Gene *amtB*, *glnK* und *glnD* im Genom von *C. glutamicum*. Das AmtR-Bindemotiv stromaufwärts von *amtB* ist fett gedruckt und unterstrichen. TS: Transkriptionsstart des Operons. **B)** Nachweis der Bindung von AmtR an das Sequenzmotiv ATCTATAGN₆₈ATAG im *amtB-glnK-glnD*-Promotor. 1: 10 µg Protein aus *E. coli* pUC18 (Kontrolle), 2-7: 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR). **C)** Nachweis der Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* durch RT-PCR. 1: RNA aus Stickstoff-gehungerten Wildtypzellen als "template". M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach). Das PCR-Produkt ist durch einen Pfeil markiert.

Die Transkriptionsstartbestimmung ergab einen Transkriptionsstart 57 Bp stromaufwärts des *amtB*-Startcodons, der sich damit 71 Bp stromabwärts der AmtR-Bindestelle befindet (Abb. 8A). Die dichte Abfolge der Gene *amtB-glnK-glnD* wies auf die Möglichkeit der Organisation in einem Operon hin, zudem waren bei der Sequenzierung stromabwärts von *glnD* keine auffälligen Terminatorstrukturen gefunden worden (Jakoby, 1998). Die mögliche Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* wurde in einem RT-PCR-Ansatz überprüft, in dem RNA aus Stickstoff-gehungerten Wildtypzellen als "template" und Primer eingesetzt wurden, die im 3'-Ende von *amtB*

und im 5`-Ende von *glnD* lokalisiert waren. Dabei wurde tatsächlich ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe erhalten, dies belegt die Operonstruktur der Gene *amtB-glnK-glnD* (Abb. 8C). Auf Grund der Regulation der *amtB*-Expression durch AmtR und der Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* war zu vermuten, dass auch die Expression der Gene *glnK* und *glnD* durch AmtR reguliert wird. RNA-Hybridisierungen bestätigten dies (Abb. 9). Zudem konnte mittels der 5`-RACE-Methode kein weiterer Transkriptionsstart stromabwärts des *amtB*-Stopcodons, d.h. zwischen *amtB*, *glnK* und *glnK*, *glnD*, gefunden werden (nicht gezeigt). Demnach existiert kein zusätzlicher Promotor. Auf das Problem der Regulation der *glnK*- und *glnD*-Expression durch AmtR wird in Abschnitt 4.3 weiter eingegangen.

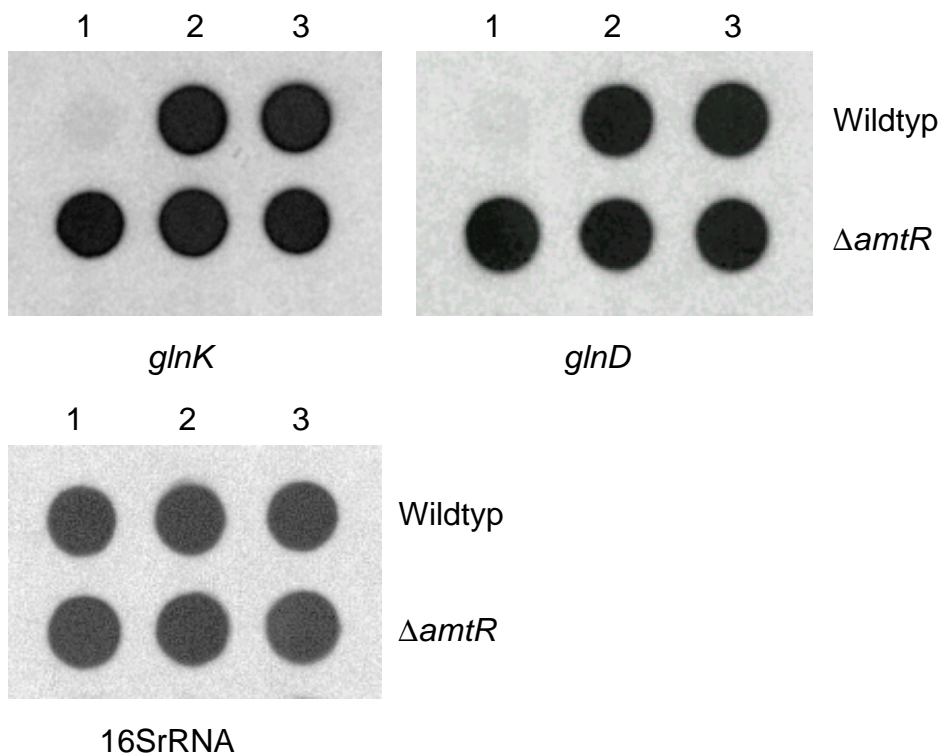


Abb. 9: Transkription des *glnK*- und *glnD*-Gens im Wildtyp und in der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18 bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. nach 15 und 30 min Stickstoff-Mangel (2, 3). 16SrRNA-Transkription als Referenz.

2. Regulation der Assimilation von Stickstoffquellen

C. glutamicum ist in der Lage, eine Reihe verschiedener Stickstoffquellen, darunter Ammonium, Glutamat, Glutamin und Harnstoff, zu verwerten. Während Glutamat und Glutamin Schlüsselkomponenten des Stickstoff-Metabolismus darstellen und direkt weiter verwertet werden können, müssen Ammonium und Harnstoff erst in diese umgewandelt werden. Ammonium wird bei geringen Konzentrationen über den GS/GOGAT-Weg assimiliert, während Harnstoff erst durch das Urease-Enzym zu Ammonium gespalten werden muß, das dann weiter über die GS/GOGAT assimiliert werden kann.

2.1 Regulation der *glnA*-Expression

Das für die Glutaminsynthetase von *C. glutamicum* kodierende *glnA*-Gen ist monocistronisch organisiert, bei der Sequenzierung des *glnA*-Gens wurde nach dem Stopcodon eine ausgeprägte palindromische Sequenz gefunden die große Ähnlichkeit zu Faktor-unabhängigen Terminatoren aufweist (Jakoby, 1997). Zur Überprüfung einer möglichen Expressionsregulation von *glnA* wurde RNA aus Wildtyp-Zellen bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. unter Stickstoff-Mangel präpariert, hierauf wurden RNA-Hybridisierungen mit einer *glnA*-Sonde durchgeführt. Dabei zeigte sich tatsächlich eine Zunahme der Transkription von *glnA* unter Stickstoff-Mangel um einen Faktor von mindestens 3, allerdings fiel der im Vergleich zu *amt* und *amtB* deutlich höhere Transkriptlevel bei guter Stickstoff-Versorgung auf (Abb. 10A). Die unterschiedliche *glnA*-Transkription wurde zusätzlich durch "Real-Time" RT-PCR-Messungen in einem Light-Cycler quantifiziert. Hierbei ergab sich ebenfalls eine Transkriptionssteigerung nach 10 min Stickstoff-Mangel um einen Faktor von 3 (M. Farwick, pers. Mitteilung). In einem unabhängigen Experiment wurde die β -Galactosidase-Aktivität in einem *glnA-lacZ*-Fusionsstamm (*GlnA-lacZ*) bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. nach 10 min Stickstoff-Mangel gemessen. Gegenüber guter Stickstoff-Versorgung steigerte sich die β -Galactosidase-Aktivität nach 10 min Stickstoff-Mangel jedoch nur um den Faktor 1,2 (Abb. 10B). Die Abweichung gegenüber den RNA-Hybridisierungen bzw. der RT-PCR ist dadurch zu erklären, dass bei der β -Galactosidase-Bestimmung Proteinmengen gemessen

werden, nicht jedoch mRNA-Mengen. Die vorhandene mRNA wird jedoch offensichtlich nicht quantitativ in Protein translatiert. Die Transkriptionsstartbestimmung mittels der 5'-RACE-Methode ergab einen Transkriptionsstartpunkt 109 Bp stromaufwärts des GTG-Startcodons von *glnA*. Dieser Transkriptionsstart war unabhängig von der Stickstoff-Versorgung der Zellen, d.h. *glnA* wird nur von einem Promotor aus transkribiert. Bei der Analyse der Promotorregion wurde ein Sequenzmotiv gefunden, das geringe Ähnlichkeit zu den schon von *amt* und *amtB* her bekannten AmtR-Bindemotiven zeigte (Abb. 11A). Dies legte die Vermutung nahe, dass auch die *glnA*-Expression durch AmtR reguliert wird. Tatsächlich bestätigten RNA-Hybridisierungen eine deregulierte *glnA*-Transkription in der *amtR*-Deletionsmutante (Abb. 10A). Ein Gelretardationstest mit einem Fragment aus der *glnA*-Promotorregion, das das putative Bindemotiv ATCTAT enthielt, bestätigte zudem eine Bindung von AmtR (Abb. 11B). Ein Kontrollfragment, in dem dieses Motiv deletiert worden war, zeigte dagegen keine AmtR-Bindung (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen, dass AmtR zusätzlich zu *amt* und *amtB-glnK-glnD* auch die Expression von *glnA* reguliert.

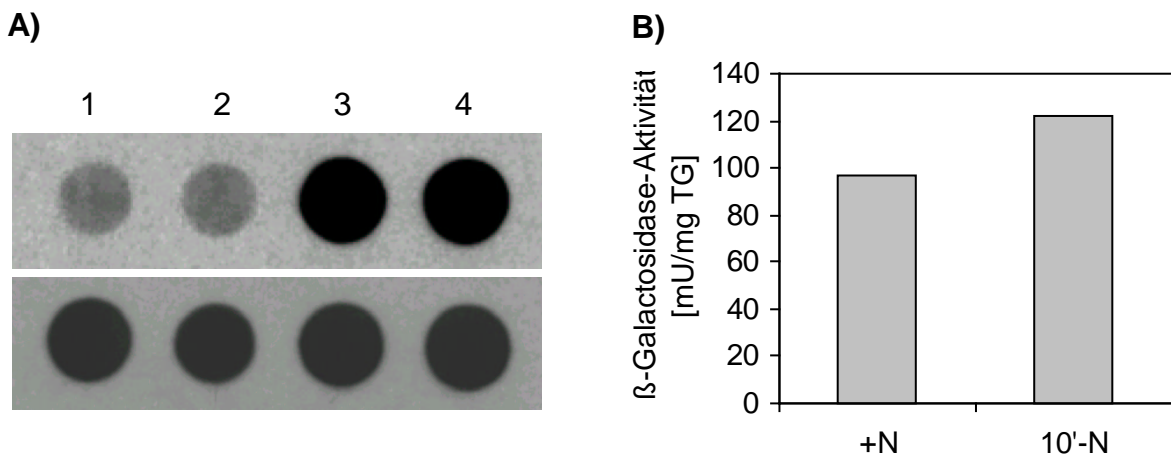


Abb. 10: **A)** *glnA*-Transkription im Wildtyp (oben) und in der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 (unten). 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-4: 5, 10 und 30 min Stickstoff-Mangel. **B)** β -Galactosidase-Aktivität im *glnA-lacZ*-Fusionsstamm GlnA-lacZ bei guter Stickstoff-Versorgung (+N) bzw. nach 10 min Stickstoff-Mangel (10'-N).

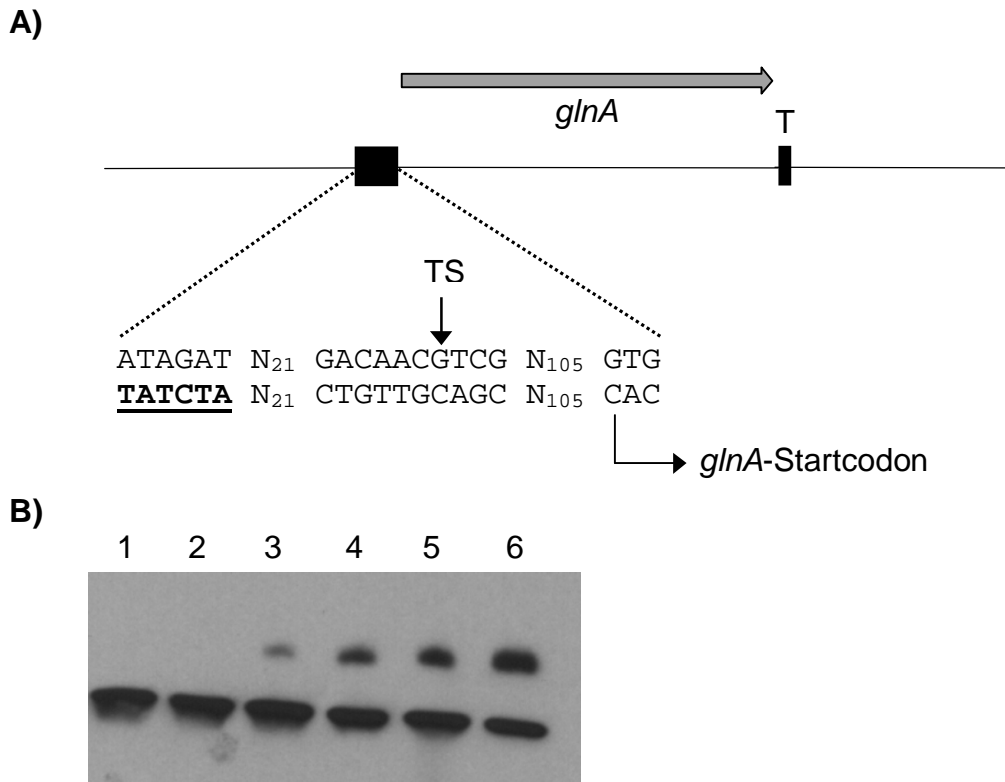


Abb. 11: A) Chromosomale Umgebung des *glnA*-Gens. Die AmtR-Bindestelle im *glnA*-Promotor ist fett gedruckt und unterstrichen. T: Terminatorstruktur, TS: Transkriptionsstart. **B)** Nachweis der Bindung von AmtR an das Sequenzmotiv ATCTAT im *glnA*-Promotor. 1: 25 µg Protein aus *E. coli* pUC18 (Kontrolle), 2-6: 5, 10, 15, 20, 25 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR).

2.2 Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität

Die Aktivität der Glutaminsynthetase wird in den meisten Bakterien in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung durch De-/Adenylylierung an einem spezifischen Tyrosylrest reguliert (Merrick & Edwards, 1995a). Diese De-/Adenylylierung wird von der Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym (ATase, kodiert von *glnE*) katalysiert. In *C. glutamicum* wurde ebenfalls eine Zunahme der Glutaminsynthetase-Aktivität unter Stickstoff-Mangel und eine Modifizierung des Enzyms unter Stickstoff-Überschuß nachgewiesen, diese Modifizierung konnte durch Schlangengift-Phosphodiesterase entfernt werden (Jakoby, 1997). Dies legte das Vorhandensein einer Adenylyltransferase nahe. Zur Isolierung des *glnE*-Gens wurde mit der

Sequenz des *glnE*-Gens aus *M. tuberculosis* mittels BLAST-Programmen im Genom von *C. glutamicum* nach ähnlichen Genen gesucht. Damit konnte ein offener Leserahmen gefunden werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 67% Identität zu der Adenylyltransferase aus *M. tuberculosis* zeigte. Dieses Gen wurde als *glnE* bezeichnet. Zur Bestätigung der Vermutung, dass das isolierte *glnE*-Gen für eine Adenylyltransferase kodiert und diese die Aktivität der Glutaminsynthetase reguliert, wurde eine *glnE*-Deletionsmutante konstruiert. In dieser Mutante (LNGLNE) und im Vergleich dazu im Wildtyp, wurde dann die Glutaminsynthetase-Aktivität bei guter Stickstoff-Versorgung, nach 3 h Stickstoff-Mangel und 30 min nach Zugabe von 100 mM Ammonium zu den Stickstoff-gehungerten Zellen bestimmt (Abb. 12A). Im Wildtyp zeigte sich unter Stickstoff-Mangel eine Aktivitätszunahme und ein Rückgang der Aktivität nach Gabe des Ammonium-Pulses, der auf der erneuten Adenylylierung der Glutaminsynthetase beruht. Demgegenüber zeigte der Stamm LNGLNE bei guter Stickstoff-Versorgung eine deutlich höhere Glutaminsynthetase-Aktivität als der Wildtyp, die unter Stickstoff-Mangel leicht zunahm. Nach Gabe des Ammonium-Pulses blieb die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp jedoch unverändert. Dieses Ergebnis bestätigte, dass das isolierte *glnE*-Gen tatsächlich für eine Adenylyltransferase kodiert und dass die Glutaminsynthetase-Aktivität in *C. glutamicum* wie in anderen Bakterien durch dieses Enzym modifiziert wird. Auf Grund der Beobachtung, dass die bisher untersuchten Gene des Stickstoff-Metabolismus von *C. glutamicum*, *amt*, *amtB*, *glnA*, *glnD* und *glnK*, in ihrer Expression reguliert werden, wurde untersucht, ob dies auch für *glnE* zutrifft. Auf Grund der geringen Transkription des Gens konnten keine RNA-Hybridisierungen durchgeführt werden, stattdessen wurde die Transkription mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurden sowohl unter guter Stickstoff-Versorgung als auch unter Stickstoff-Mangel gleiche Mengen an PCR-Produkt erhalten (Abb. 12B). Dies bestätigte, dass die Expression von *glnE* nicht reguliert wird, was im Hinblick auf die Funktion der Adenylyltransferase auch sinnvoll erscheint.

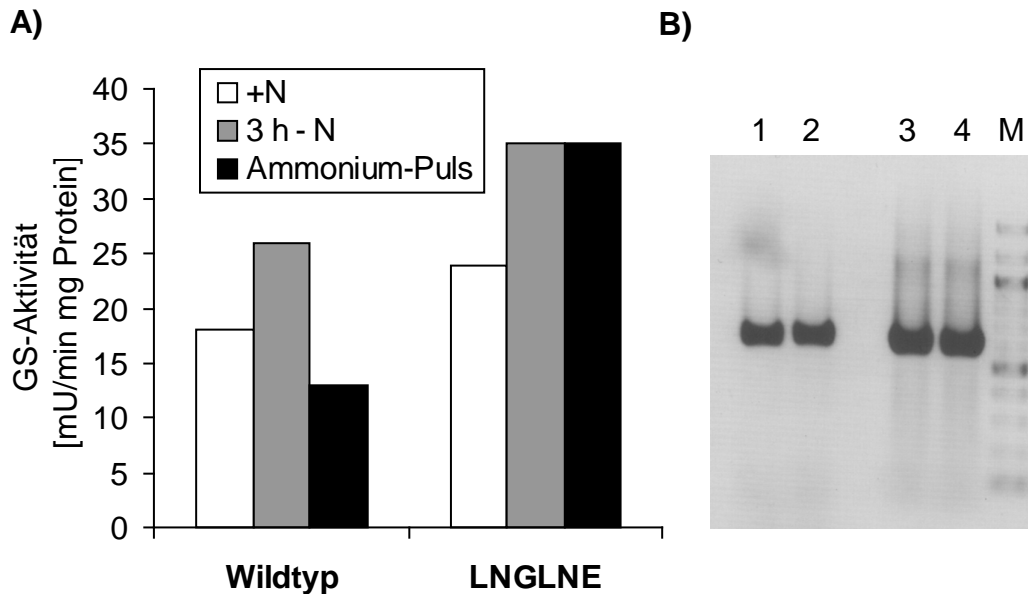


Abb. 12: **A)** Glutaminsynthetase-Aktivität im Wildtyp und in der *glnE*-Deletionsmutante LNLNE bei guter Stickstoff-Versorgung (+N), nach 3h Stickstoff-Mangel (3h-N) und 30 min nach Gabe eines 100 mM Ammoniumpulses zu den Stickstoff-gehungerten Zellen (Ammonium-Puls). **B)** Untersuchung der *glnE*-Transkription mittels RT-PCR. 1, 2: *glnE*-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. 30 min Stickstoff-Mangel (2). 3, 4: 16SrRNA-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung (3) bzw. nach 30 min Stickstoff-Mangel (4) (als Referenz). M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach).

2.3 Untersuchungen zur Funktion und Regulation des *glnA2*-Gens

Bakterielle Glutaminsynthetasen lassen sich auf Grund ihrer Aminosäuresequenz in die Subtypen GSI α und GSI β einteilen (Brown et al., 1994). Diese unterscheiden sich voneinander durch das Fehlen einer spezifischen 25-Aminosäuren-Sequenz in den GSI α -Proteinen. In einer Reihe von Bakterien, die eine Glutaminsynthetase I besitzen, darunter Vertreter der Gattung *Rhizobium* und *Streptomyces*, wurden zusätzlich Glutaminsynthetasen (kodiert von *glnII*) gefunden, deren Aminosäuresequenz größere Ähnlichkeit zu eukaryotischen Glutaminsynthetasen (bezeichnet als GSII) aufweist als zu bakteriellen Glutaminsynthetasen vom Typ I

(Brown et al., 1994). Diese Proteine wurden daher ebenfalls den Glutaminsynthetasen II zugeordnet. Im Gegensatz zu den Glutaminsynthetasen vom Typ I enthalten die GSII-Proteine kein Adenylierungsmotiv und werden auch nicht posttranslational modifiziert. In den meisten Fällen ist die Funktion der GSII in diesen Bakterien unklar, für *Streptomyces viridochromogenes* konnte jedoch gezeigt werden, dass das GSII-Protein Glutaminsynthetase-Aktivität aufweist, sein Anteil an der Gesamt-GS-Aktivität beträgt bis zu 30% (Hillemann et al., 1993). Erste Hinweise auf die Existenz einer zweiten Glutaminsynthetase in *C. glutamicum* wurden bei Southern-Blot-Experimenten während der Isolierung des *glnA*-Gens gefunden (Jakoby, 1997). Diese Hinweise konnten in dieser Arbeit bei der Isolierung des *glnE*-Gens bestätigt werden. Stromaufwärts des *glnE*-Gens wurde ein offener Leserahmen gefunden, der hohe Ähnlichkeit (65% Identität bezogen auf die abgeleitete Aminosäuresequenz) zum *glnII*-Gen von *M. tuberculosis* aufwies und als *glnA2* bezeichnet wurde (Abb. 13A). Die dichte Abfolge der Gene und das Fehlen von Terminatorstrukturen zwischen *glnA2* und *glnE* ließ auf die Organisation der beiden Gene in einem Operon schließen. Dies wurde in einem RT-PCR-Ansatz überprüft, in dem als "template" RNA eingesetzt wurde, die aus Wildtypzellen bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. unter Stickstoff-Mangel präpariert worden war. Die verwendeten Primer waren in *glnA2* und *glnE* lokalisiert. Dabei wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten, wodurch die vermutete Operonstruktur von *glnA2* und *glnE* bestätigt wurde (Abb. 13B). Die nahezu gleiche Menge an PCR-Produkt, die in diesem Experiment unter den beiden Bedingungen beobachtet wurde, zeigte dass eine Expressionsregulation von *glnA2* nicht stattfand. Dies wurde noch einmal in einem gesonderten RT-PCR-Ansatz, bei dem beide Primer in *glnA2* lokalisiert waren, überprüft. Dabei wurden wiederum sowohl unter guter Stickstoff-Versorgung als auch unter Stickstoff-Mangel gleiche Mengen an PCR-Produkt beobachtet (Abb. 13C). Dies bestätigte, dass die Expression von *glnA2* unter den getesteten Bedingungen nicht reguliert wird.

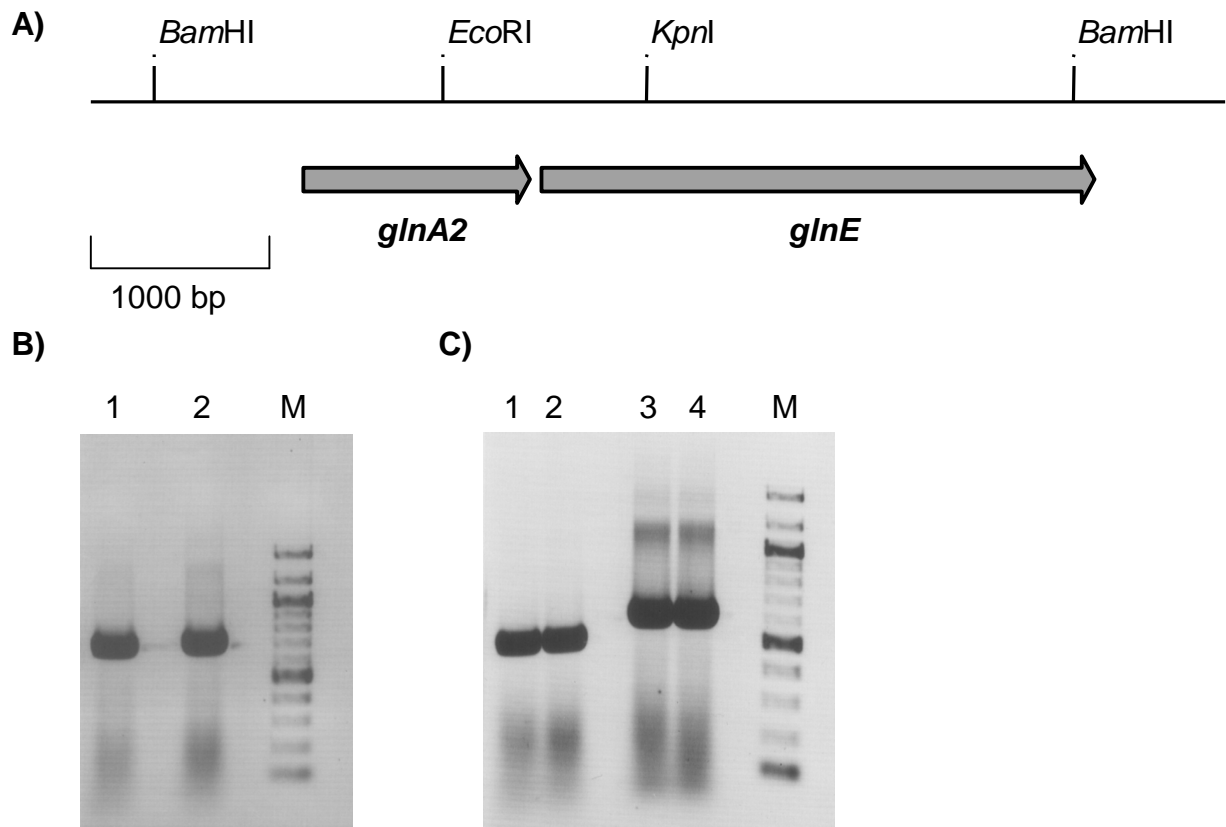


Abb. 13: **A)** Anordnung der Gene *glnA2* und *glnE* im Chromosom von *C. glutamicum*. **B)** Nachweis der Operonstruktur von *glnA2* und *glnE* durch RT-PCR. 1: RNA aus Zellen, die unter guter Stickstoff-Versorgung angezogen wurden, als "template", 2: RNA aus Zellen nach 30 min Stickstoff-Mangel als "template", M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach). **C)** Untersuchung der Transkription des *glnA2*-Gens bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. nach 30 min Stickstoff-Mangel (2) mittels RT-PCR. 3, 4: 16SrRNA-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung (3) bzw. nach 30 min Stickstoff-Mangel (4) als Referenz, M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach).

Das *glnA2*-Gen von *C. glutamicum* kodiert für ein Protein von 427 Aminosäuren (bezeichnet als GlnA2), welches demnach fast die gleiche Größe wie die Glutaminsynthetase I hat, jedoch nur 34% identische Aminosäuren im Vergleich zu diesem Protein besitzt. Auf Grund der Aminosäuresequenz ist das GlnA2-Protein von *C. glutamicum* in die α -Untergruppe der Glutaminsynthetasen I einzuordnen und nicht in die Gruppe der Glutaminsynthetasen II (Abb. 14).

```

GSI   VAFETPEEIVKFIKDENVFVDVRFDTLPGTEQHFSIPAASFDADTIEEGLAFDGS SIRG 60
GlnA2 -----VRLWFTDILGHLKSVVAPAELES-ALEEGIGFDGSAIEG 39
      * : ***: * : . :..*.::: :****:.****:*.

GSI   FTTIDESDMNLLPDLGTATLDPFRK--AKTLNVKFFVHDPFTR-EAFSRDPRNVARKAEQ 117
GlnA2 YARISEADTIARPDPSTFQVLPLEAGISKLQAARLFCDVTMPDGPFSFSDPRQVLRQVQ 99
      :: *.**:* ** .* : ** . : * . : : * . : . : . ****: * * : *

GSI   YLASTGIADTCNFGAEAEFYLFDSVRYSTEMNSGFYEVDTEEGWVNRGKETNLDGTPNLG 177
GlnA2 LAADEGLT--CMISPEIEFYLVQSLR--TN-----G----LPPVPTDN 134
      * . **:: * :..* *****.:*** * : * * * . * . .

                                     II
GSI   AKNRVKGGYFPVAPYDQTVDVRRDMVRNLAASGFALERFHHEVGGGQQEINRYRFNTMLHA 237
GlnA2 -----GGYFDQATFNEAPNFRRNAMVALEELGIPVEFSHHETAPGQQEIDLRHADALTM 188
      ***** *.:::: :.* : : * *.::* ***.. *****: * . *

                                     III
GSI   ADDIQTFKYIIKNTARLHGKAATFMFKPLAGDNGSGMHAHQSLWKDGKPLFHDESGYAGL 297
GlnA2 ADNIMTFRYIMKQVARDQGVGASFMKPFQEHAGSAMHTHMSLFEGDTNAFHDPDDSYML 248
      **:* **:***:*:.* ** : * .:*****: . **.***:* **::... *** .. *

                                     IV
GSI   SDIARYYIGGILHHAGAVLAFTNATLNSYHRLVPGFEAPINLVYSQRNRSAAVRIPITGS 357
GlnA2 SKTAKQFIAGILHHAPEFTAVTNQVWNSYKRIVYGNEAPTAATWGVSNRSALVRVPTYRL 308
      * . * : :.****** . *.* ** :***:*:* * *** . : . ***** **:*

                                     AMP
                                     VI
GSI   N-PKAKRIEFRAPDPGPNPYLGFAAMMMAGLDGIKNRIEPHAPVDKDLYELPPEE--AAS 414
GlnA2 NKEESRRVEVRLPDTACNPYLAFSVMLGAGLKGIKEGYELDEPAEDDISNLSFRERRAMG 368
      * : : : : * . * * . : * * . * . : : * * . * * : * . * . : : * . * * .

GSI   IPQAPTSLEASLKALQEDTDFLTESDVFTEDLIEAYIQYKYDNEISPVRLRPTPQEFELY 474
GlnA2 YNDLPSSLDQALRQMEKSE---LVADILGEHVFEFFLRNKWR-EWRDYQEQITPWELRNN 424
      : * : * : * : * : : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * .

GSI   FDC 477
GlnA2 LDY 427
      :*

```

Abb. 14: Alignment der Aminosäuresequenz der Glutaminsynthetase I und des GlnA2-Proteins von *C. glutamicum*. Grau unterlegte Sequenzen stellen einige der Regionen dar, die in den Glutaminsynthetasen vom Typ I hochkonserviert sind. II, Mn^{2+} -Bindung; III, Nucleotid-Bindung; IV, Bindung von Mn^{2+} und Glutamat; VI, Adenylylierungsstelle, der Tyrosylrest ist markiert. *, identische Aminosäuren; :, konservativer Austausch; ., unterschiedliche Aminosäuren. Bis auf das Adenylylierungsmotiv sind in GlnA2 alle für Glutaminsynthetasen vom Typ I typischen Regionen konserviert.

Da eine bereits konstruierte *glnA*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* keinerlei messbare Glutaminsynthetase-Aktivität mehr zeigte (Jakoby, 1997), schied die Möglichkeit aus, dass das GlnA2-Protein (zumindest *in-vitro*) ebenfalls Glutaminsynthetase-Aktivität besitzt. Dies wurde zusätzlich noch einmal in einem gesonderten *in-vivo*-Experiment untersucht. Dazu wurde das *glnA2*- bzw. das *glnA*-Gen in den Expressionsvektor pZ8-1 unter die Kontrolle eines starken *tac*-Promotors kloniert, und die so konstruierten Plasmide pZglnA bzw. pZglnA2 wurden in die *glnA*-Deletionsmutante MJ4-26 (Glutamin-auxotroph) eingebracht. Die so erhaltenen Stämme MJ4-26 pZglnA bzw. MJ4-26 pZglnA2 wurden auf CgC-, LB- und BHI-Medium mit bzw. ohne Glutamin ausgestrichen. Während der Stamm MJ4-26 pZglnA auf allen Nährböden gleichermaßen wuchs, unabhängig davon ob Glutamin zugesetzt wurde, also durch *glnA* komplementiert wurde, zeigte der Stamm MJ4-26 pZglnA2 nur auf Nährboden mit Glutamin Wachstum. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass das GlnA2-Protein auch unter physiologischen Bedingungen keine Glutaminsynthetase-Aktivität besitzt. Zur Absicherung dieses Ergebnisses müsste jedoch noch überprüft werden, ob das *glnA2*-Gen auch translatiert wird. Auf Grund der Organisation von *glnA2* und *glnE* in einem Operon und der fehlenden Expressionsregulation bestand jedoch auch die Möglichkeit, dass das GlnA2-Protein eine Rolle bei der Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität spielt. Daher wurde eine *glnA2*-Deletionsmutante konstruiert (LNGLNA2) und in dieser Mutante die Glutaminsynthetase-Aktivität bestimmt. Dabei zeigte sich jedoch keinerlei Unterschied in der Glutaminsynthetase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Basierend auf den vorliegenden Daten können daher noch keine Aussagen über die physiologische Bedeutung von GlnA2 gemacht werden.

2.4 Regulation der *gltBD*-Expression

Die Glutamatsynthase (GOGAT) von *C. glutamicum* besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit die von den Genen *gltB* bzw. *gltD* kodiert werden und ein Operon bilden (Beckers et al., 2001). Messungen der GOGAT-Aktivität in *C. glutamicum* zeigten eine mehr als 50fache Zunahme der GOGAT-Aktivität wenn die Zellen mit Glutamat als Stickstoff-Quelle anstelle von Ammonium wuchsen (Tochikura et al., 1984). Umgekehrt sank die GOGAT-Aktivität, wenn Ammonium zu einer Stickstoff-gehungerten Kultur zugesetzt wurde (Tesch et al., 1999). Diese Aktivitätsregulation der GOGAT ließ vermuten, dass die Expression des *gltBD*-Operons ähnlich wie *glnA* ebenfalls in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung reguliert werden könnte. Dies konnte durch RNA-Hybridisierungen bestätigt werden. Es zeigte sich eine starke Zunahme der Transkription unter Stickstoff-Mangel, im Gegensatz zur *glnA*-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung jedoch keine sichtbare Hintergrund-Transkription (Beckers et al., 2001) (Abb. 15A). Unabhängig davon wurde dies durch Messung der β -Galactosidase-Aktivität in einem *gltB-lacZ*-Fusionsstamm (*GltB-lacZ*) bestätigt. In diesem Stamm zeigte sich bei guter Stickstoff-Versorgung keinerlei Aktivität, erst unter Stickstoff-Mangel war eine starke Zunahme der Aktivität, die über mehrere Stunden weiter zunahm, zu beobachten (Abb. 15B). Überraschenderweise wurde bei der Analyse des Promotorbereiches von *gltBD* wie zuvor schon im Falle der Gene *amt*, *amtB*, *glnA*, *glnD* und *glnK* ein Sequenzmotiv, ATCTATAG, gefunden, das hohe Ähnlichkeit zu den bereits bekannten AmtR-Bindemotiven zeigte. Ein Gelretardationstest bestätigte, dass AmtR an dieses Sequenzmotiv bindet (Abb. 16B). Dies legte nahe, dass das AmtR-Protein auch die Expression von *gltB* und *gltD* reguliert. RNA-Hybridisierungen bestätigten tatsächlich eine vollkommen deregulierte *gltBD*-Transkription in der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 (Abb. 15A).

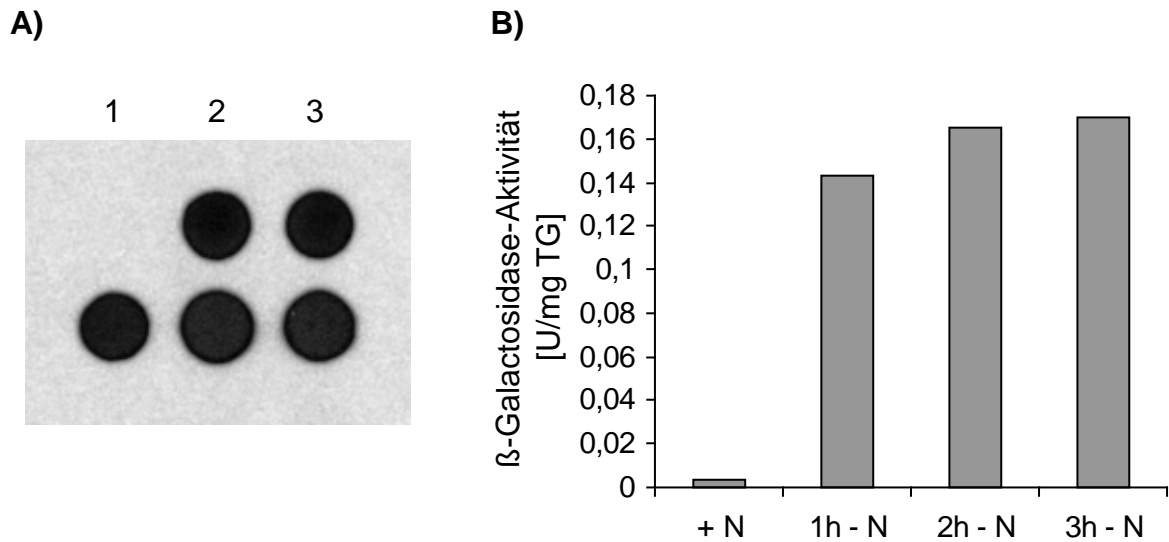


Abb. 15: **A)** Transkription des *gltBD*-Operons im Wildtyp (oben) und in der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 (unten). 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 bzw. 30 min Stickstoff-Mangel. **B)** β -Galactosidase-Aktivität im *gltB-lacZ*-Fusionsstamm *GltB-lacZ* bei guter Stickstoff-Versorgung (+N) bzw. nach 1, 2 und 3h Stickstoff-Mangel.

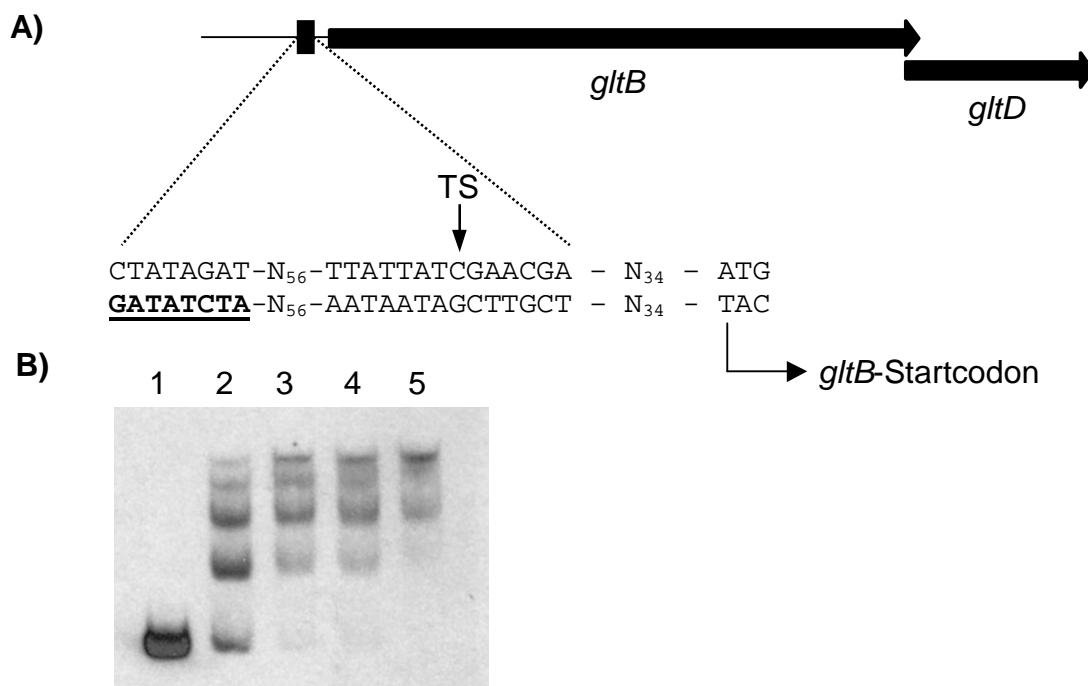


Abb. 16: **A)** Anordnung der Gene *gltB* und *gltD* im Genom von *C. glutamicum*. Die *AmtR*-Bindestelle ist unterstrichen und fett gedruckt. TS: Transkriptionsstart (Beckers et al., 2001). **B)** Gelretardationstest zum Nachweis der *AmtR*-Bindung an das Sequenzmotiv ATCTATAG. 1: 15 μ g Protein aus *E. coli* pUC18 (Kontrolle), 2-5: 3, 6, 12, 15 μ g Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält *AmtR*).

2.5 Regulation der *gdh*-Expression

Angesichts der Beobachtung, dass die meisten bisher untersuchten Gene des Stickstoff-Metabolismus, *amt*, *amtB*, *glnA*, *glnD*, *glnK* und *gltBD*, auf Expressionsebene in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung reguliert werden, wurde untersucht, ob dies auch für die Expression des für die Glutamatdehydrogenase kodierenden *gdh*-Gens zutrifft. Dazu wurden wiederum RNA-Hybridisierungen mit RNA die aus *C. glutamicum* unter guter Stickstoff-Versorgung bzw. unter Stickstoff-Mangel präpariert wurde, durchgeführt. Tatsächlich konnte dabei eine deutliche Zunahme der *gdh*-Transkription unter Stickstoff-Mangel nachgewiesen werden (Abb. 17). In diesem Fall konnte jedoch nicht, wie im Fall der Expressionsregulation der anderen Stickstoff-regulierten Gene, ein AmtR-Bindemotiv im Promotorbereich des *gdh*-Gens gefunden werden. Zudem zeigte sich in der *amtR*-Deletionsmutante kein nachweisbarer Unterschied der *gdh*-Transkription zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Demnach kann der Regulator AmtR in diesem Fall nicht verantwortlich für die Regulation der *gdh*-Transkription sein. Unklar bleibt demnach, wie die *gdh*-Expression reguliert wird. Interessant erscheint die Expressionsregulation des *gdh*-Gens unter den getesteten Bedingungen vor allem deshalb, weil Messungen der GDH-Aktivität in *C. glutamicum* bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. bei Stickstoff-Mangel zwar stets eine sehr hohe, jedoch keine Unterschiede in der Aktivität ergaben (Toshikura et al., 1984). Demnach wirkt sich die Zunahme der *gdh*-Transkription nicht in einer erhöhten GDH-Aktivität aus.

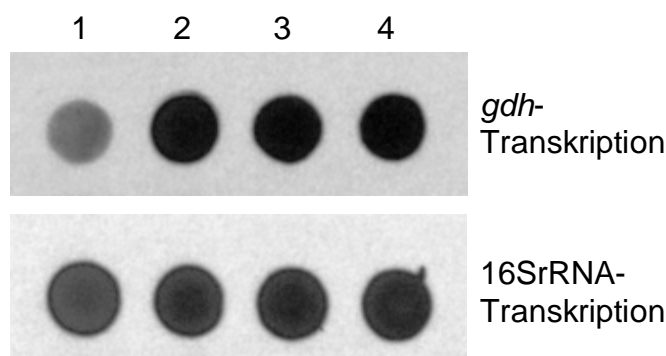


Abb. 17: Transkription des *gdh*-Gens in *C. glutamicum* bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. nach 15, 30 und 45 min Stickstoff-Mangel (2-4). 16SrRNA-Transkription als Referenz.

2.6 Untersuchungen zur Expressionsregulation der Urease-Gene

Harnstoff kann von *C. glutamicum* erst nach Spaltung zu Ammonium, die durch die Urease erfolgt, verwertet werden. Da die Urease von *C. glutamicum* nur intracellulär aktiv ist, muß Harnstoff zur Verwertung in die Zelle gelangen. Dies geschieht bei hohen Harnstoff-Konzentrationen durch Diffusion, bei geringen Konzentrationen (< 50 mM) wird Harnstoff über ein spezifisches Transportsystem aufgenommen (Siewe et al, 1998). Die Urease-Aktivität ist in *C. glutamicum* unabhängig von der Stickstoff-Versorgung stets vorhanden, jedoch wurde eine eindeutige Aktivitätszunahme unter Stickstoff-Mangel gemessen (Siewe et al., 1998). Daher wurde untersucht, ob sich unter Stickstoff-Mangel ebenfalls eine verstärkte Gentranskription zeigte. Die Urease von *C. glutamicum* ist aus drei Strukturuntereinheiten und 4 akzessorischen Untereinheiten aufgebaut, die durch die Gene *ureABCEFGD* kodiert werden (Abb. 18A). Die dichte Abfolge der Gene ließ auf die Organisation in einem Operon schließen. Um dies zu überprüfen, wurde eine RT-PCR-Reaktion unter Verwendung von Primern, die in *ureA* und in *ureD* lokalisiert waren, durchgeführt. Es wurde jedoch kein PCR-Produkt erhalten. Auch eine weitere RT-PCR-Reaktion unter Verwendung von Primern, die in *ureE* und *ureD* lokalisiert waren, war nicht erfolgreich. Erst bei Lokalisierung der Primer in *ureA* und *ureC* wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe beobachtet (Abb. 18B). Offensichtlich werden nur die für die Strukturuntereinheiten kodierenden Gene *ureA*, *ure B* und *ureC* in einem Operon transkribiert, nicht jedoch die für die akzessorischen Untereinheiten kodierenden Gene *ureE*, *ureF*, *ureG* und *ureD*.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine mögliche Expressionsregulation der Urease-Gene in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung untersucht. Auf Grund der äußerst geringen Transkription der Gene wurde mit RNA-Hybridisierungen kein Signal erhalten, daher wurden ebenfalls RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt, bei denen Primer die in *ureA* lokalisiert waren, verwendet wurden. Es konnte jedoch keinerlei Unterschied in der Transkription von *ureA* nachgewiesen werden (Abb. 18C). Demnach erfolgt in *C. glutamicum* wahrscheinlich keine Expressionsregulation der Urease-Gene, zumindest nicht unter den untersuchten Bedingungen.

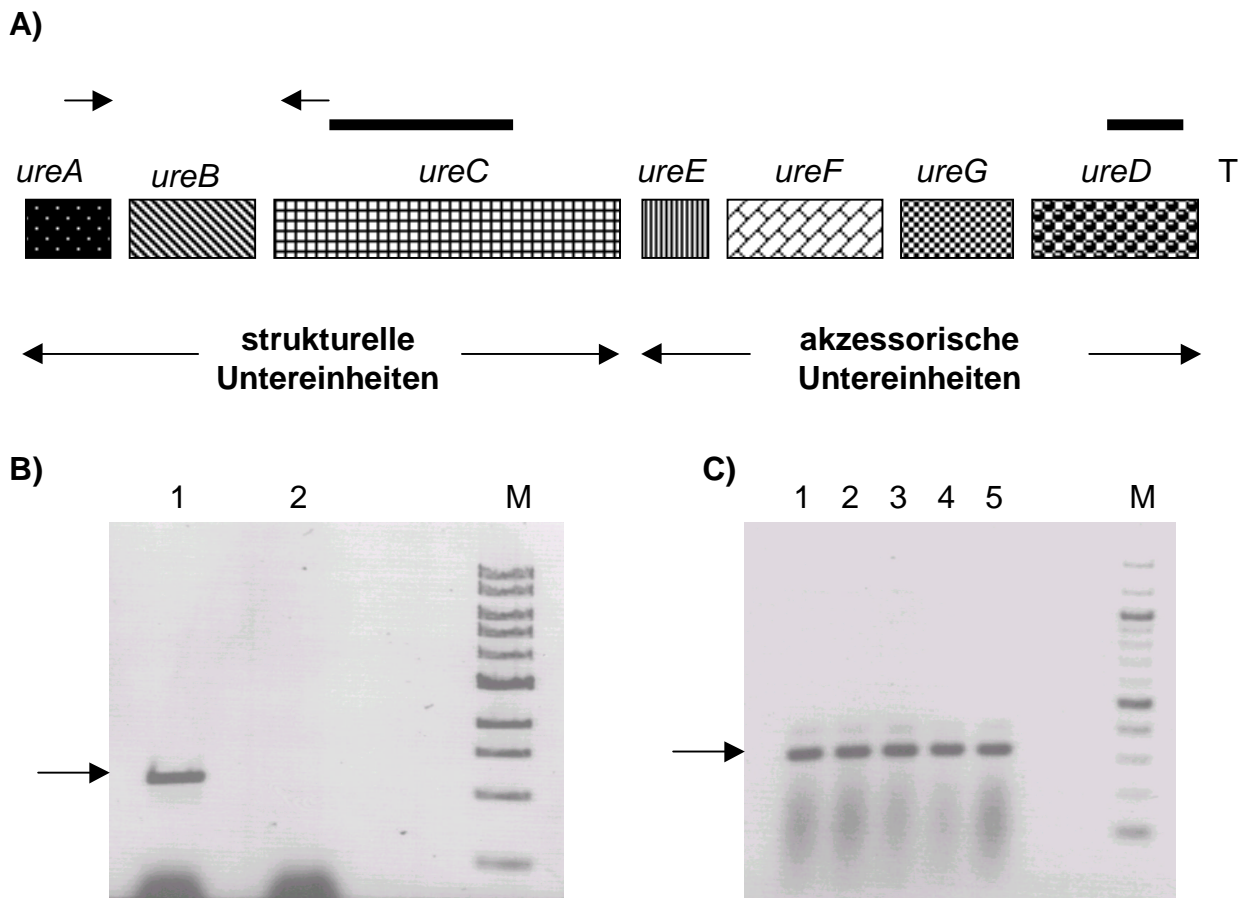


Abb. 18: **A)** Anordnung der Gene *ureABCEFGD* im Genom von *C. glutamicum*. Die Pfeile markieren die Position der Primer zum Nachweis der Operonstruktur von *ureABC*. Die Balken zeigen die Größen der DNA-Fragmente an, die zur Insertionsmutagenese von *ureC* und *ureD* benutzt wurden. T, Terminatorstruktur. **B)** Nachweis der Operonstruktur von *ureABC* durch RT-PCR. 1: RNA aus Wildtypzellen, die 15 min Stickstoff-gehungert wurden als "template". 2: Test auf DNA-Kontamination. M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach). Der Pfeil markiert das PCR-Produkt. **C)** Transkription des *ureABC*-Operons bei guter Stickstoff-Versorgung (1), nach 15, 30 und 45 min Stickstoff-Mangel (2-4) und in Minimalmedium mit Harnstoff als einzige Stickstoff-Quelle (5). M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach). Der Pfeil markiert das PCR-Produkt.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß der Urease-Inaktivierung auf die Harnstoff-Aufnahme untersucht. Auf Grund der Beobachtung, daß die Inaktivierung der Glutaminsynthetase zu einem vollständigen Verlust der (Methyl)ammonium-Aufnahme in *C. glutamicum* führte, ein Effekt, der wahrscheinlich auf einer Interaktion der Glutaminsynthetase mit dem Ammonium-Aufnahmesystem Amt beruht (Jakoby, 1998), wurde vermutet, dass die Urease-Inaktivierung einen ähnlichen Effekt auf die Harnstoff-Aufnahme haben könnte. Zur Insertionsmutagenese wurde ein internes Fragment aus *ureC* bzw. *ureD* über PCR amplifiziert und in den Vektor pK18*mob* kloniert. Die erhaltenen Plasmide pK18*ureC* bzw. pK18*ureD* wurden dann in *C. glutamicum* eingebracht. Die so erzeugten Mutanten UR4 bzw. UR-GB zeigten einen vollständigen Verlust der Urease-Aktivität. Bei der Messung der Harnstoff-Aufnahme zeigte sich bei der Insertionsmutante UR4 im Gegensatz zum Wildtyp tatsächlich weder eine Abnahme der externen Harnstoffkonzentration noch eine zellinterne Akkumulation von Harnstoff (Abb. 19). Das gleiche Verhalten zeigte die *ureD*-Insertionsmutante UR-GB (nicht gezeigt). Von den Insertionsmutanten wurde also kein Harnstoff aufgenommen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass für ein funktionelles Harnstoff-Aufnahmesystem eine Interaktion von Urease und dem Aufnahmesystem notwendig ist.

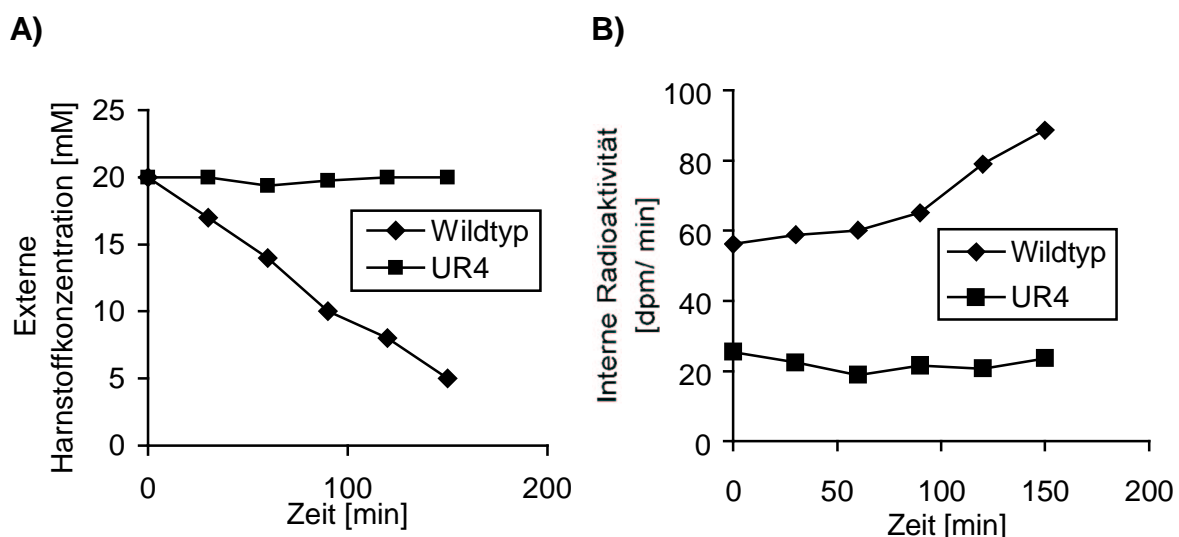


Abb. 19: **A)** Aufnahme von Harnstoff aus dem Medium durch den Wildtyp und die *ureC*-Insertionsmutante UR4. **B)** Zellinterne Akkumulation von Harnstoff durch den Wildtyp und die *ureC*-Insertionsmutante UR4. Dargestellt ist die Akkumulation von Radioaktivität.

3. AmtR, ein globaler Regulator der Stickstoff-Kontrolle

3.1 Isolierung weiterer AmtR-kontrollierter Gene

Die durchgeführten Untersuchungen zur Expressionsregulation von Genen des Stickstoff-Metabolismus in *C. glutamicum* haben gezeigt, dass die Gene *amt*, *amtB-glnK-glnD*, *gdh*, *glnA* und *gltBD* unter Stickstoff-Mangel verstärkt transkribiert werden. Lediglich für die Gene *glnA2*, *glnE* und *ureABCEFGD* konnte keine Expressionsregulation beobachtet werden. Da bis auf das *gdh*-Gen die Expression aller Stickstoff-regulierten Gene durch das AmtR-Protein reguliert wird, ist AmtR offensichtlich ein globaler Regulator der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum*. Daher bestand die Möglichkeit, dass noch weitere, bis jetzt noch unbekannte Gene ebenfalls unter AmtR-Kontrolle stehen könnten. Da alle bekannten von AmtR regulierten Gene im Promotorbereich ein charakteristisches Bindemotiv aufweisen, wurde dies als Hilfsmittel bei der Suche eingesetzt. Unter Verwendung von FASTA-basierten Algorithmen wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Bielefeld im Genom von *C. glutamicum* nach Genen gesucht, die in ihrem Promotorbereich ein Sequenzmotiv mit Ähnlichkeit zu den von *amt*, *amtB-glnK-glnD* und *gltBD* her bekannten Motiven ATCTATAGN₄ATAG, ATCTATAGN₁ATAG bzw. ATCTATAG aufwiesen. Auf diese Weise konnten tatsächlich zwei Gene mit dem Sequenzmotiv ATCTATAG im Promotorbereich isoliert werden, die als *cg1j9_002* bzw. *cg2b21_075* bezeichnet wurden (Abb. 20). Interessant ist, dass im Promotorbereich von *cg2b21_075* das Sequenzmotiv ATCTATAG, ähnlich wie bei *amt*, zweimal vorhanden ist. Um die vermutete Regulation dieser Gene durch AmtR nachzuweisen, wurde die Transkription dieser Gene im Wildtyp und in der *amtR*-Deletionsmutante bei guter Stickstoff-Versorgung und unter Stickstoff-Mangel mittels RNA-Hybridisierungen verglichen. Tatsächlich zeigte sich im Wildtyp eine regulierte Transkription, während in der *amtR*-Deletionsmutante eine vollständig deregulierte Transkription zu beobachten war (Abb. 21). Zusätzlich konnte durch Gelretardationstests, in denen ein Fragment aus der Promotorregion von *cg1j9_002* bzw. *cg2b21_075* eingesetzt wurde, eindeutig eine Bindung von AmtR nachgewiesen werden (Abb. 22). Demnach unterliegt die Expression der beiden isolierten Gene tatsächlich ebenfalls der Kontrolle durch AmtR.

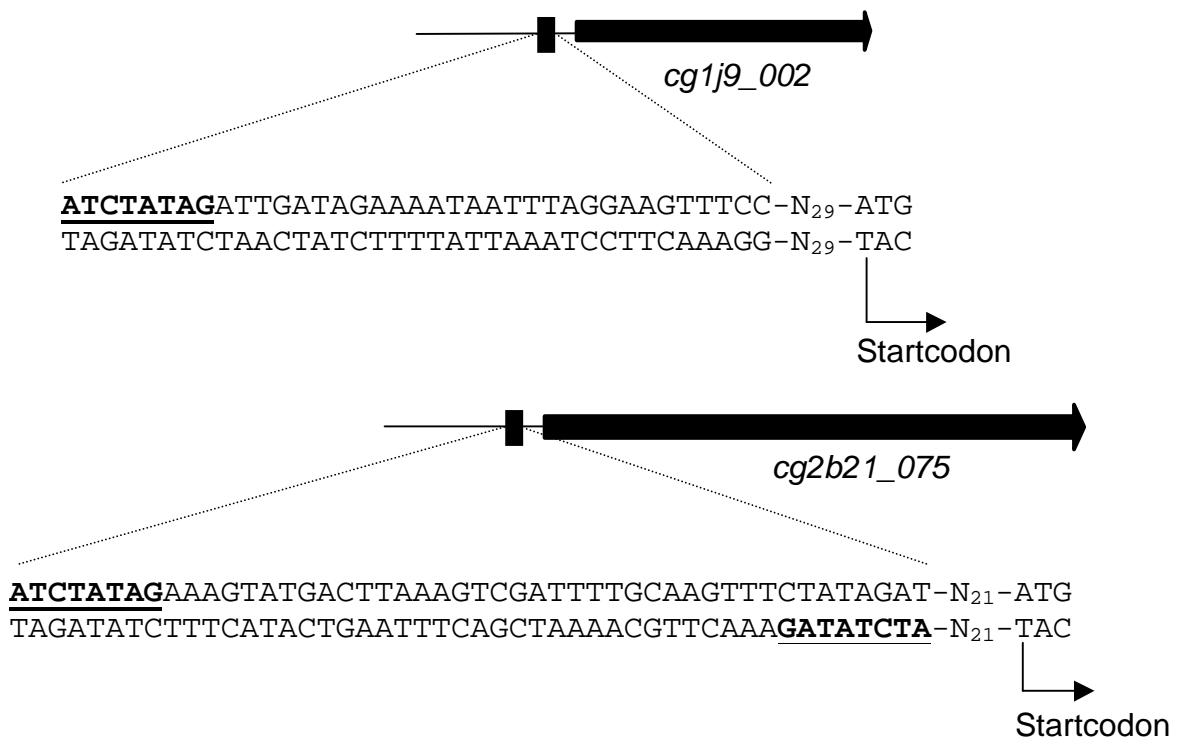


Abb. 20: Darstellung des Promotorbereiches der Gene *cg1j9_002* und *cg2b21_075*. Die AmtR-Bindemotive sind fett gedruckt und unterstrichen.

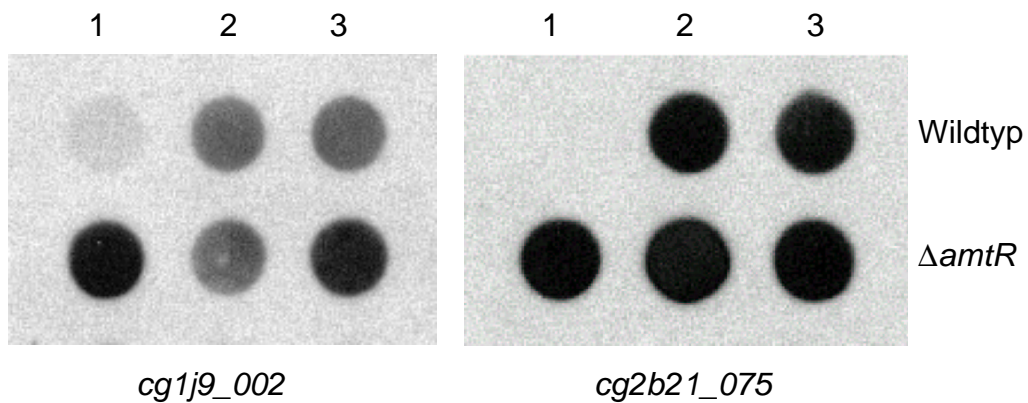


Abb. 21: Transkription der Gene *cg1j9_002* und *cg2b21_075* im Wildtyp und in der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. nach 15 und 30 min Stickstoff-Mangel (2-3).

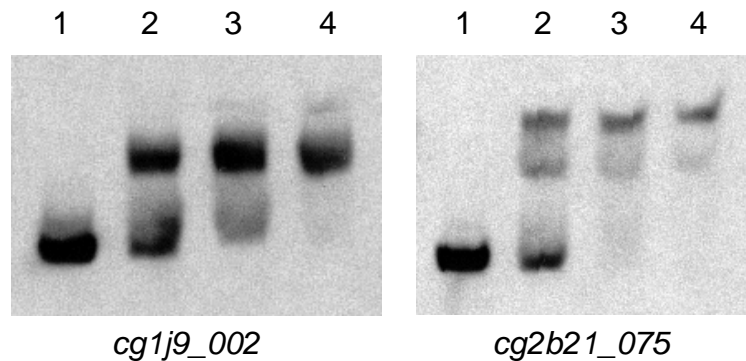


Abb. 22: Gelretardationstest zum Nachweis der AmtR-Bindung an die Sequenzmotive ATCTATAG im Promotorbereich der Gene *cg1j9_002* bzw. *cg2b21_075*. 1: 12 µg Protein aus *E. coli* pUC18 (als Kontrolle), 2-4: 3, 6, 12 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR).

Um Hinweise auf die physiologische Bedeutung der beiden Gene in *C. glutamicum* zu erhalten, wurde mittels BLAST-Programmen in Proteindatenbanken nach ähnlichen Proteinen gesucht. Im Falle des Gens *cg1j9_002* ergaben die Datenbankabfragen keine Hinweise auf eine mögliche Funktion, da keine Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit gefunden wurden. Das von *cg2b21_075* abgeleitete Protein zeigte jedoch signifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen bakteriellen Transportproteinen, mit dem Programm TMHMM2.0 (Vorhersage von Transmembranhelices, Sonnhammer et al., 1998) wurden für das abgeleitete Protein 14 Transmembranhelices vorhergesagt. Wahrscheinlich kodiert *cg2b21_075* daher für ein Membranprotein in *C. glutamicum*, das vielleicht den Transport eines stickstoffhaltigen Substrates, z.B. eine Aminosäure, ermöglicht.

Um festzustellen, welches Substrat das von *cg2b21_075* kodierte putative Membranprotein transportiert, wurde eine Insertionsmutante konstruiert. Dazu wurde ein internes Fragment aus *cg2b21_075* in pK18*mob* kloniert und das so erhaltene Konstrukt pK18*cg2b21* in *C. glutamicum*-Wildtypzellen eingebracht. Die erhaltenen Mutanten (ATCC*cg2b21*Ins) wurden im Vergleich zum Wildtyp auf Wachstumsdefekte in Minimalmedien mit jeweils 5 mM Allantoin, Ammonium, Arginin, Glutamin, Harnstoff und Ornithin als einzige Stickstoff-Quelle getestet. Dabei zeigte sich jedoch keinerlei Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Daher können noch keine Aussagen zur Funktion der beiden isolierten AmtR-regulierten Gene gemacht werden.

3.2 Untersuchungen zu einer möglichen Autoregulation der *amtR*-Expression

In *B. subtilis* unterliegt die Expression des *glnRA*-Operons einer teilweisen Autoregulation durch das *glnR*-Genprodukt (Brown & Sonenshein, 1996). Daher wurde untersucht ob auch die *amtR*-Expression in *C. glutamicum* einer Autoregulation in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung unterliegen könnte. RNA-Hybridisierungen ergaben jedoch keinen erkennbaren Unterschied in der *amtR*-Transkription unter guter Stickstoff-Versorgung bzw. unter Stickstoff-Mangel (Abb. 23A). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass bei der Analyse der *amtR*-Promotorregion ein Sequenzmotiv, ATCGAT, gefunden wurde, das Ähnlichkeit zu dem AmtR-Bindemotiv, ATCTAT, im *glnA*-Promotor aufweist (Abb. 23B). Ein Gelretardationstest zeigte jedoch keine Bindung von AmtR an dieses Sequenzmotiv (Abb. 23C). Offensichtlich verhindert ein einzelner Basenaustausch, G anstelle T, eine Bindung von AmtR. Die Ergebnisse zeigen, dass die *amtR*-Expression in *C. glutamicum* eindeutig nicht der Stickstoff-Kontrolle und auch keiner Autoregulation durch das eigene Genprodukt unterliegt.

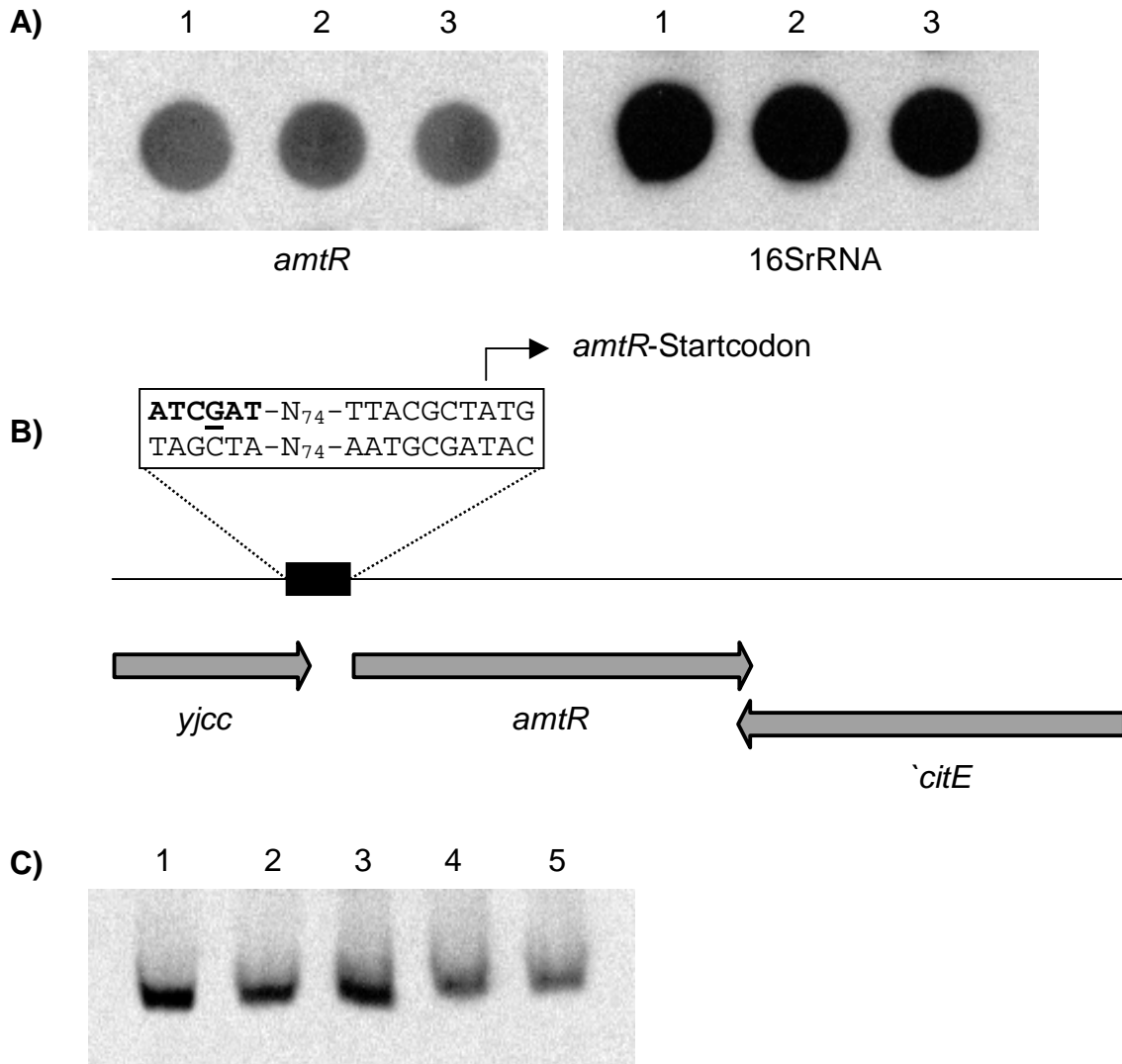


Abb. 23: **A)** *amtR*-Transkription im Wildtyp, 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 und 30 min Stickstoff-Mangel. **B)** Chromosomale Umgebung des *amtR*-Gens. *citE*['], Gen für die Citrat-Lyase, *yjcc*, ORF mit Ähnlichkeit zu *yjcc* aus *E. coli*. Das Sequenzmotiv ATCGAT stromaufwärts von *amtR* ist fett gedruckt. Die gegenüber dem Sequenzmotiv im *glnA*-Promotor (ATCTAT) abweichende Base ist unterstrichen. **C)** Gelretardationstest zur Untersuchung der AmtR-Bindung an das Sequenzmotiv ATCGATAC. 1: 15 µg Protein aus *E. coli* pUC18 (Kontrolle), 2-5: 3, 6, 12, 15 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR-Protein).

4. Untersuchungen zur Signaltransduktion im Stickstoff-Metabolismus von *C. glutamicum*

4.1 Einfluß der Deletion von *glnD* und *glnK* auf die Genexpression in *C. glutamicum*

Ähnlich wie in Enterobakterien und einer Reihe von Gram-positiven Bakterien wurde auch in *C. glutamicum* ein *glnD*-Gen, das für eine Uridylyltransferase (UTase) kodiert, und ein *glnK*-Gen, das für ein P_{II}-ähnliches Protein (GlnK) kodiert, isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass das GlnK-Protein wie in *E. coli* unter Stickstoff-Mangel uridylyliert wird, eine Inaktivierung von *glnD* und *glnK* durch Insertionsmutagenese hatte einen Verlust der (Methyl)ammonium-Aufnahme zur Folge (Jakoby, 1998).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die UTase in *C. glutamicum* wie in *E. coli* die Funktion eines Sensors des Stickstoff-Status übernimmt und GlnK die Rolle von P_{II} als Signaltransduktionsprotein ausübt. Um dies zu überprüfen, wurden *glnD*- und *glnK*-Deletionsmutanten konstruiert. In diesen Mutanten, LN-D bzw. NR-1, wurde die Transkription Stickstoff-kontrollierter Gene analysiert. RNA-Hybridisierungen zeigten, dass die Deletionsmutanten nicht mehr auf Stickstoff-Mangel reagieren konnten, d.h. es war keine Transkriptionszunahme AmtR-kontrollierter Gene mehr feststellbar (Abb. 24). Ebenso war ein völliger Verlust der (Methyl)ammoniumaufnahme zu beobachten (Abb. 25). Die Deletion von *glnD* führte zudem zu einem Verlust der Uridylylierung von GlnK (nicht gezeigt). Wegen der Organisation von *amtB-glnK-glnD* in einem Operon (siehe Abschnitt 1.2) wurde ebenfalls das *amtB*-Gen deletiert, um auszuschließen, dass AmtB an der Stickstoff-Kontrolle beteiligt sein könnte. Der *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 zeigte jedoch bezüglich der Kontrolle der Genexpression und der (Methyl)ammoniumaufnahme keinerlei Unterschied zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Um die Möglichkeit eines polaren Effektes bei der Deletion von *glnD* bzw. *glnK* auszuschließen wurde versucht, die Deletionsmutanten LN-D bzw. NR-1 zu komplementieren. Dazu wurde das *glnK*- bzw. *glnD*-Gen in den Vektor pZ8-1 unter die Kontrolle eines starken *tac*-Promotors kloniert und die so erhaltenen Konstrukte pZglnK bzw. pZglnD wurden in die Deletionsmutanten eingebracht. In den so erzeugten Stämmen LN-D pZglnD bzw. NR-1 pZglnK konnte die Kontrolle der Genexpression (Abb. 26) und die (Methyl)ammoniumaufnahme wiederhergestellt werden (Abb. 25). Überraschend war

die Beobachtung einer leichten Deregelung der *amt*- bzw. *amtB*-Transkription im Stamm LN-D pZglnD. Hierauf wird in Abschnitt 4.3 weiter eingegangen. Mit der erfolgreichen Komplementation war sichergestellt, dass die in den Deletionsmutanten beobachteten Effekte nur auf die Deletion von *glnD* bzw. *glnK* zurückzuführen waren. Die beschriebenen Experimente zeigen, dass sowohl das GlnK-Protein als auch die Uridyltransferase essentiell für die Reaktion auf veränderte Stickstoff-Versorgung sind, d.h. ohne GlnK und UTase erfolgt keine Expression AmtR-kontrollierter Gene unter Stickstoff-Mangel.

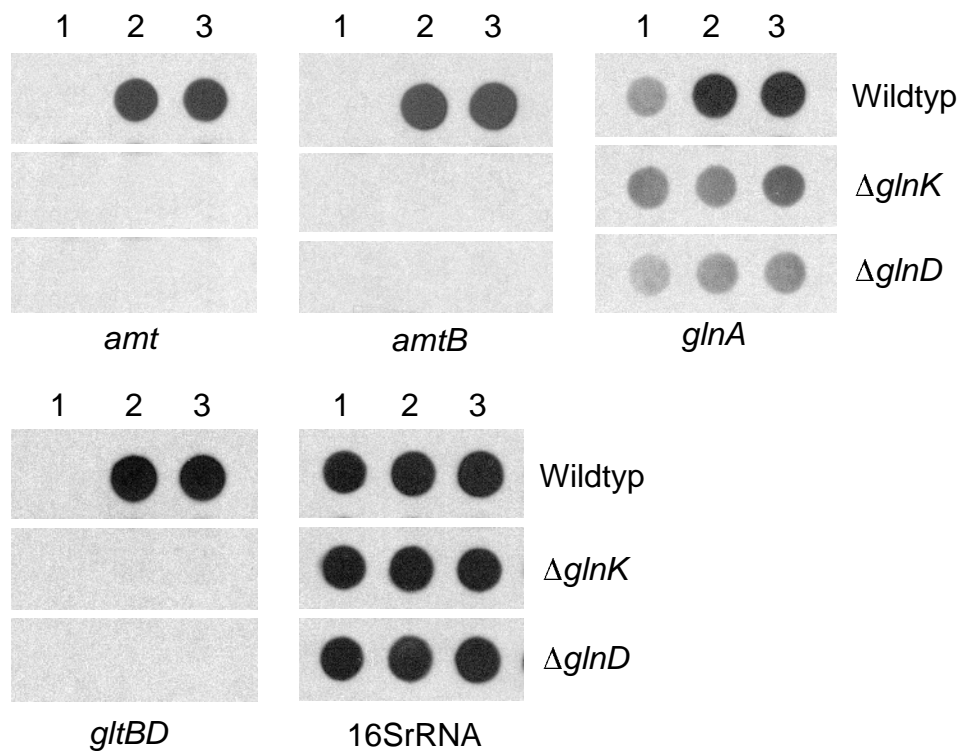


Abb. 24: Einfluß der Deletion von *glnD* und *glnK* auf die Transkription Stickstoff-kontrollierter Gene (*amt*, *amtB*, *glnA*, *gltBD*) in *C. glutamicum*. 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 bzw. 30 min Stickstoff-Mangel. 16SrRNA-Transkription dient als Referenz.

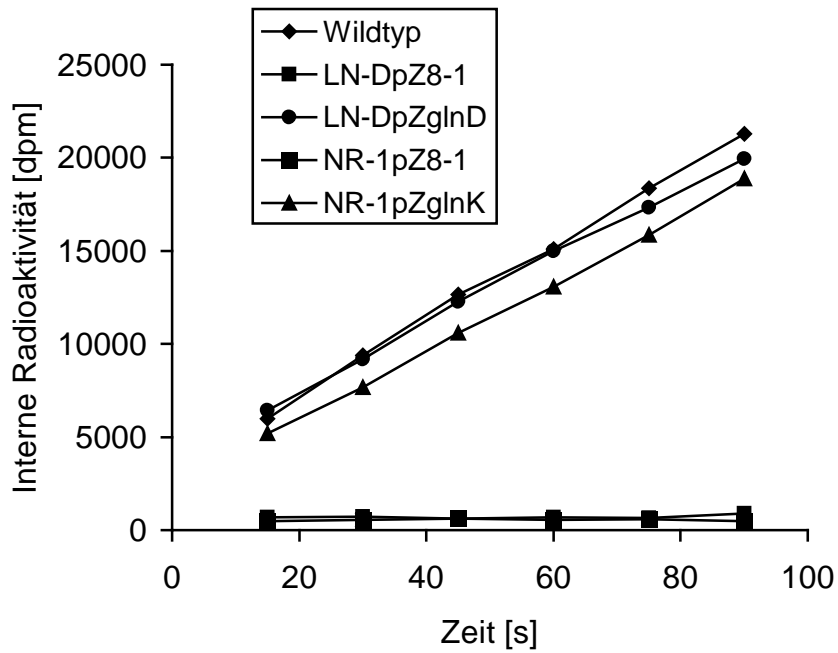


Abb. 25: (Methyl)ammonium-Aufnahme von Stickstoff-gehungerten Zellen des Wildtyps, der Deletionsmutanten LN-D bzw. NR-1 und der Komplementationsstämme LN-D pZglnD bzw. NR-1 pZglnK.

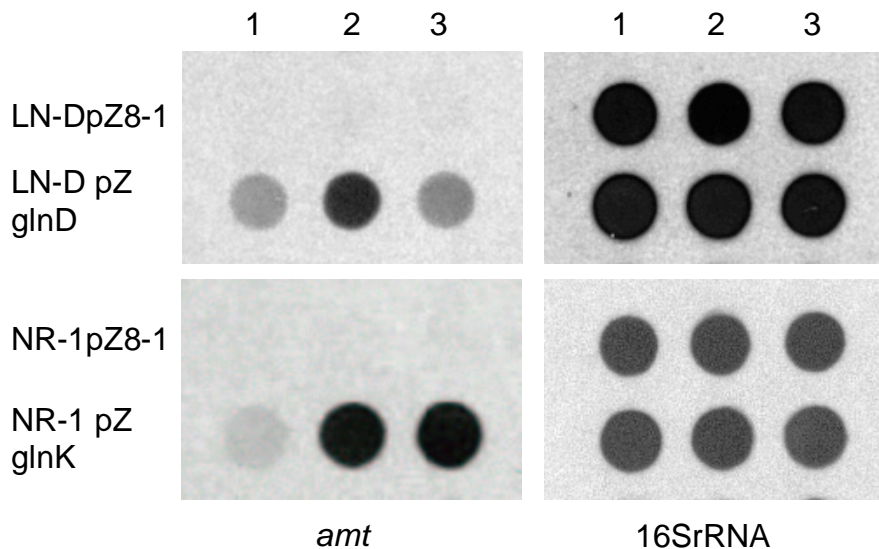


Abb. 26: *amt*-Transkription in den Deletionsmutanten LN-D pZ8-1 (*glnD*-Deletion), LN-D pZglnD (*glnD*-Deletion, komplementiert mit *glnD*), NR-1 pZ8-1 (*glnK*-Deletion) und NR-1 pZglnK (*glnK*-Deletion, komplementiert mit *glnK*). 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 bzw. 30 min Stickstoff-Mangel. 16SrRNA-Transkription als Referenz.

4.2 Bedeutung der Uridylylierung von GlnK für die Genexpression

In *E. coli* sind das P_{II}-Protein und das kürzlich entdeckte P_{II}-Paralog GlnK wichtig für die Signaltransduktion des von der Uridylyltransferase wahrgenommenen Stickstoff-Status, wobei das Fehlen eines der beiden Proteine durch das andere kompensiert werden kann (Atkinson & Ninfa, 1998). Beide Proteine werden unter Stickstoff-Mangel uridylyliert. Als Stelle der Uridylylierung wurde der Tyrosylrest 51 identifiziert, der sich im sogenannten T-Loop befindet (Abb. 27). *In-vitro*-Studien mit durch Mutation verändertem GlnK- und P_{II}-Protein haben gezeigt, dass der T-Loop und besonders der Tyrosylrest 51 essentiell für die Interaktion von GlnK bzw. P_{II} mit seinen Zielmolekülen sind (Jiang et al., 1997; Atkinson & Ninfa, 1999). Da auch das GlnK-Protein von *C. glutamicum* unter Stickstoff-Mangel uridylyliert wird und die Deletion von *glnK* zum Verlust der Expression AmtR-kontrollierter Gene führt, wurde vermutet, dass die uridylylierte Form von GlnK mit AmtR interagiert und dies zu einer Derepression der AmtR-kontrollierten Gene führt. Um dies zu überprüfen, wurde ein GlnK-Protein konstruiert, das nicht mehr uridylyliert werden konnte. Hierfür wurde der in GlnK ebenfalls konservierte Tyrosylrest 51 durch ortsgerichtete Mutagenese des *glnK*-Gens gegen Phenylalanin ausgetauscht. Das so veränderte *glnK*-Gen (*glnKY51F*) wurde in den Vektor pZ8-1 unter die Kontrolle des *tac*-Promotors kloniert und das so erhaltene Plasmid pZglnKY51F in den *glnK*-Deletionsstamm NR-1 eingebracht. In dem Stamm NR-1 pZglnKY51F konnte keine Uridylylierung von GlnK mehr beobachtet werden (Abb. 28A), auf Expressionsebene zeigten sich die gleichen Effekte wie bei Deletion von *glnK*, d.h. die Zellen zeigten unter Stickstoff-Mangel keine Expression AmtR-kontrollierter Gene (Abb. 28B). Dies zeigt, dass die Uridylylierung von GlnK notwendig für die Derepression AmtR-kontrollierter Gene unter Stickstoff-Mangel ist.

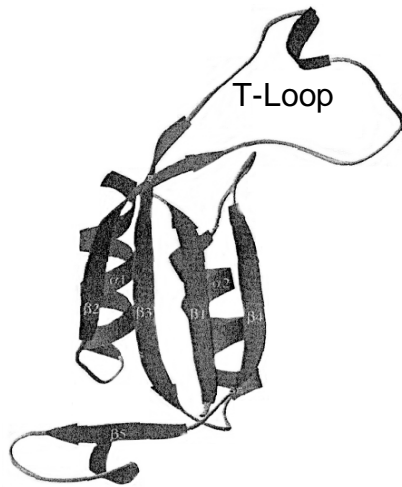


Abb. 27: Struktur des GlnK-Proteins von *E. coli*. Der T-Loop, der die Uridylierungsstelle enthält (Tyr-51), ist gekennzeichnet (aus Xu et al., 1998).

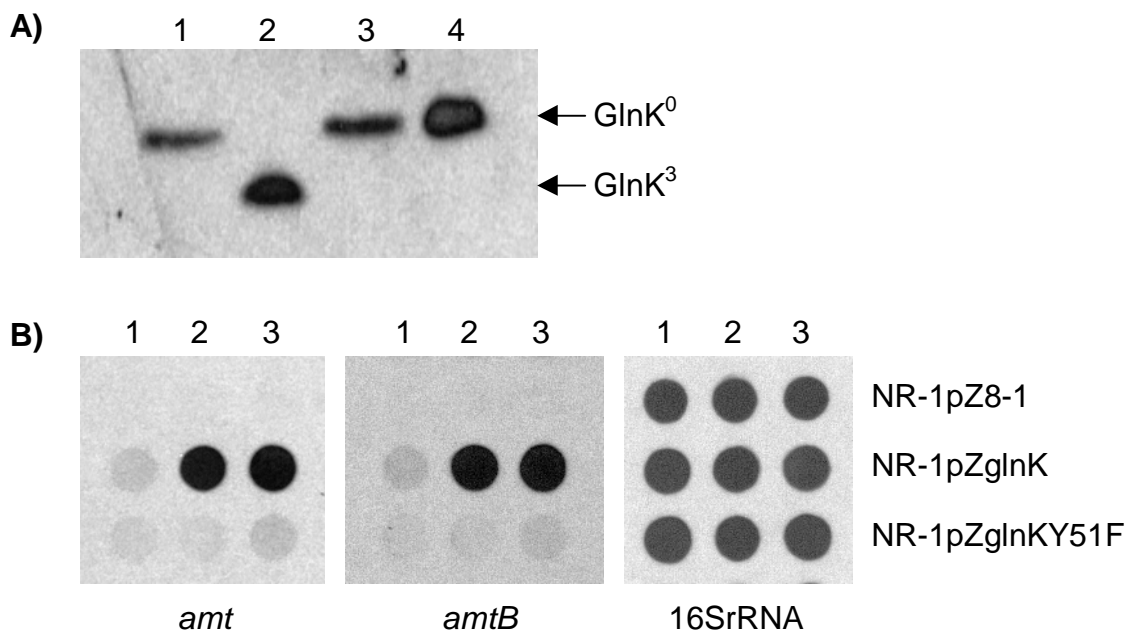


Abb. 28: **A)** Einfluß der GlnK-Mutation Y51→F auf die Uridylierung. 1, 2: je 50 µg Protein aus NR-1pZglnK, 3, 4: je 50 µg Protein aus NR-1pZglnKY51F. 1, 3: gute Stickstoff-Versorgung, 2, 4: 3 h Stickstoff-Mangel. GlnK⁰, nicht-uridyliertes GlnK, GlnK³, uridyliertes GlnK. **B)** Einfluß der GlnK-Mutation Y51→F auf die Transkription AmtR-kontrollierter Gene am Beispiel der Gene *amt* und *amtB*. 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 bzw. 30 min Stickstoff-Mangel. 16SrRNA-Transkription als Referenz. Zum Vergleich wurde auch die Transkription in den Stämmen NR-1 pZ8-1 und NR-1 pZglnK untersucht.

4.3 Einfluß der Überexpression von *glnD* und *glnK* auf die Genexpression

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß GlnK und die Uridylyltransferase in *C. glutamicum* essentiell für die Derepression AmtR-kontrollierter Gene unter Stickstoff-Mangel sind. Dies unterstützte die Vermutung, dass die Uridylyltransferase wie in Enterobakterien den Sensor des Stickstoff-Status darstellt und das Signal an GlnK weiterleitet. Überraschend war jedoch die schon in Abschnitt 1.2 erwähnte Beobachtung, dass die Expression der Gene *glnD* und *glnK* ebenfalls durch AmtR reguliert wird (siehe Abb. 9). In der Tat konnte auch nachgewiesen werden, dass bei Deletion von *glnD* keine *glnK*-Expression bzw. bei Deletion von *glnK* keine Expression von *glnD* unter Stickstoff-Mangel mehr erfolgt (nicht gezeigt). Um dies in Einklang mit der Sensorfunktion der Uridylyltransferase zu bringen, wurde vermutet, dass eine Art Autoregulationsmechanismus existiert. Unter guter Stickstoff-Versorgung könnte ein Basislevel von Uridylyltransferase und GlnK-Protein vorhanden sein, da bei Genen, die durch Repression reguliert werden, selbst unter reprimierenden Bedingungen stets eine Hintergrund-Expression erfolgt. Der daher selbst bei guter Stickstoff-Versorgung vorhandene Basislevel an Uridylyltransferase könnte als Sensor wirken, und bei Eintreten von Stickstoff-Mangel ebenfalls vorhandenes GlnK-Protein uridylylieren. Uridylyliertes GlnK könnte dann mit AmtR wechselwirken und die Repression der *glnK*- und *glnD*-Expression aufheben. Dadurch käme es zu einer sich selbst verstärkenden Signalkaskade, die dann zur Derepression auch anderer AmtR-kontrollierter Gene führen würde. Dieses Modell setzte jedoch den Nachweis eines Basislevels von *glnD* und *glnK*-mRNA voraus. Tatsächlich konnte über RT-PCR-Reaktionen mit RNA aus Wildtypzellen als "template", die bei guter Stickstoff-Versorgung angezogen wurden, ein Basislevel an *glnD*- und *glnK*-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 29).

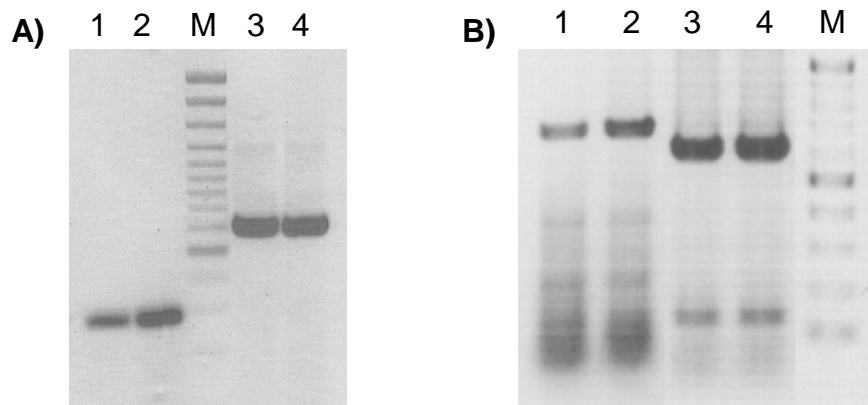


Abb. 29: RT-PCR-Nachweis eines Basislevels von *glnD*- und *glnK*-mRNA bei guter Stickstoff-Versorgung. **A)** 1, 2: *glnK*-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. 30 min Stickstoff-Mangel; 3, 4: 16SrRNA-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. 30 min Stickstoff-Mangel als Referenz; M: 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach), hervorgehobene Banden 500 bzw. 1000 bp. **B)** 1, 2: *glnD*-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. 30 min Stickstoff-Mangel; 3, 4: 16SrRNA-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. 30 min Stickstoff-Mangel als Referenz; M: 100 bp-Leiter wie bei A).

Um das Autoregulationsmodell mit Uridylyltransferase als Sensor des Stickstoff-Status zu untermauern, wurde in weiteren Experimenten das *glnD*- und das *glnK*-Gen im Wildtyp überexprimiert und der Einfluß der Überexpression auf die Transkription AmtR-kontrollierter Gene untersucht. Falls Uridylyltransferase tatsächlich der Sensor des Stickstoff-Status ist und GlnK als Signaltransduktionsprotein nur in der uridylylierten Form mit AmtR wechselwirken kann, sollte die Überexpression bei guter Stickstoff-Versorgung keinen Effekt auf die Expression AmtR-kontrollierter Gene haben. Zur Überexpression von *glnD* und *glnK* wurden die Plasmide pZglnD und pZglnK in den Wildtyp eingebracht, und in den so erzeugten Stämmen ATCC 13032 pZglnD bzw. ATCC 13032 pZglnK wurde mittels RNA-Hybridisierungen die Transkription von *amt* und *amtB* untersucht. Überraschenderweise zeigte sich jedoch bei Überexpression von *glnD* bereits bei guter Stickstoff-Versorgung eine deutlich nachweisbare *amt*- bzw. *amtB*-Transkription, während die Überexpression von *glnK* keinen Effekt zeigte. Noch stärker wurde die nachweisbare *amt*- bzw. *amtB*-Transkription wenn *glnD* und *glnK*

zusammen überexprimiert wurden. Dazu wurde das gesamte *amtB-glnK-glnD*-Operon in pZ8-1 kloniert und das Konstrukt pZamtB-glnK-glnD in den Wildtyp eingebracht. In dem Stamm ATCC 13032 pZamtB-glnK-glnD konnte eine völlig deregulierte *amt*- bzw. *amtB*-Transkription bereits bei guter Stickstoff-Versorgung beobachtet werden (Abb. 30). Um Artefakte in den RNA-Hybridisierungen auszuschließen, und den Grad der Derepression exakter zu quantifizieren wurde ein *amt-lacZ*-Fusionsstamm konstruiert. In diesen Stamm (Amt-lacZ) wurden die gleichen Plasmide eingebracht, und die β -Galactosidase-Aktivität wurde bestimmt (Abb. 31). Tatsächlich zeigte der Stamm Amt-lacZ pZglnD bei guter Stickstoff-Versorgung gegenüber dem Wildtypstamm Amt-lacZ pZ8-1 eine um den Faktor 10 höhere β -Galactosidase-Aktivität, bei dem Stamm Amt-lacZ pZamtB-glnK-glnD war die β -Galactosidase-Aktivität um den Faktor 35 höher.

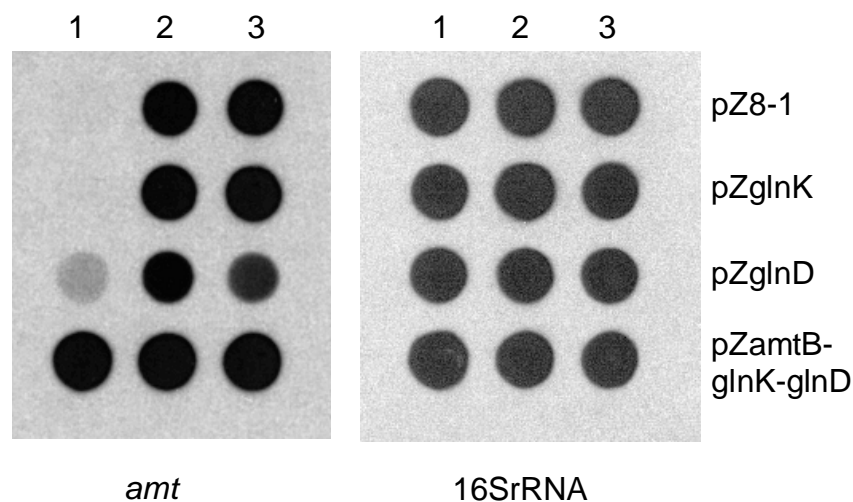


Abb. 30: Einfluß der Überexpression von *glnK*, *glnD* und *amtB-glnK-glnD* im Wildtyp auf die Transkriptionskontrolle AmtR-regulierter Gene am Beispiel der *amt*-Transkription. 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 bzw. 30 min Stickstoff-Mangel. 16SrRNA-Transkription als Referenz.

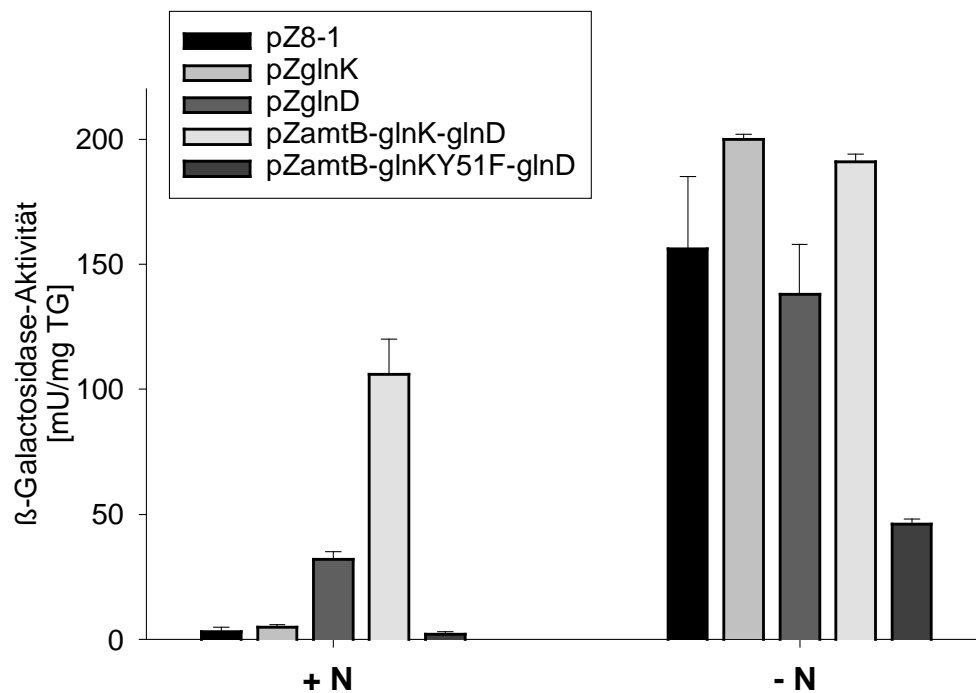


Abb. 31: Einfluß der Überexpression von *glnK*, *glnD*, *amtB-glnK-glnD* und *amtB-glnKY51F-glnD* auf die β -Galactosidase-Aktivität im *amt-lacZ*-Fusionsstamm *Amt-lacZ* bei guter Stickstoff-Versorgung (+N) bzw. unter Stickstoff-Mangel (-N).

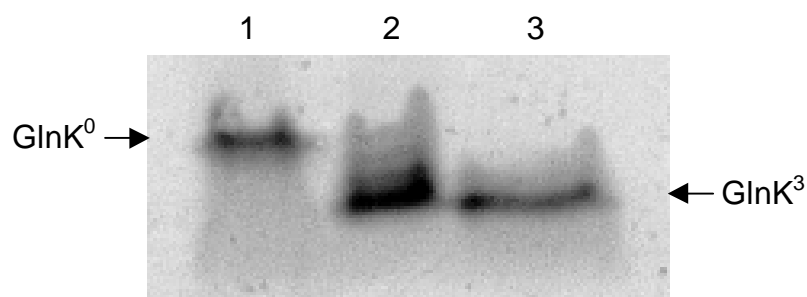


Abb. 32: Einfluß der Überexpression von *glnD* auf die GlnK-Uridylylierung bei guter Stickstoff-Versorgung (1) bzw. nach 1 h (2) und nach 3 h Stickstoff-Mangel (3). Pro Spur wurden 50 μ g Protein aus dem *glnD*-Überexpressionsstamm ATCC 13032 pZglnD aufgetragen. GlnK⁰: nicht uridyliertes GlnK, GlnK³: uridyliertes GlnK (3 UMP-Reste).

In weiteren Experimenten wurde das *glnK*-Gen im *glnD*-Deletionsstamm LN-D bzw. das *glnD*-Gen im *glnK*-Deletionsstamm NR-1 überexprimiert. Dabei zeigte sich jedoch kein Effekt, d.h. in den Stämmen LN-D pZglnK bzw. NR-1 pZglnD konnte eine *amt*- bzw. *amtB*-Transkription weder bei guter Stickstoff-Versorgung noch unter Stickstoff-Mangel nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wegen der Beobachtung, dass die Anwesenheit von GlnK essentiell für die Derepression AmtR-kontrollierter Gene ist, und dass die Mutagenese der GlnK-Uridylylierungsstelle (Tyrosin-51 zu Phenylalanin) ebenfalls zu einem Verlust der Expression AmtR-kontrollierter Gene führt, wurde überprüft, ob die Überexpression von *glnD* auch zu einer Uridylylierung von GlnK bereits bei guter Stickstoff-Versorgung führt. Dazu wurde Zellextrakt aus dem *glnD*-Überexpressionsstamm ATCC 13032 pZglnD bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. nach 1 h und nach 3 h Stickstoff-Mangel präpariert, und ein Western-Blot durchgeführt. Überraschenderweise war bei guter Stickstoff-Versorgung keine Uridylylierung von GlnK nachweisbar, erst bei Stickstoff-Mangel konnte eine Uridylylierung beobachtet werden (Abb. 32). In einem weiteren Experiment wurde in dem Plasmid pZamtB-glnK-glnD die schon erwähnte Mutation Y51F in *glnK* eingeführt. Das so konstruierte Plasmid pZamtB-glnKY51F-glnD wurde dann in den *amt-lacZ*-Fusionsstamm Amt-lacZ transformiert und in dem so erzeugten Stamm Amt-lacZ pZamtB-glnKY51F-glnD die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Dabei konnte keine Deregulation der β -Galactosidase-Aktivität beobachtet werden, d.h. die Anwesenheit von nicht-uridylylierbarem GlnK-Protein führt bei gleichzeitiger Überexpression von *glnD* zu keiner Deregulation. Allerdings erreichte die unter Stickstoff-Mangel beobachtete β -Galactosidase-Aktivität nur einen Bruchteil der Aktivität in den anderen *amt-lacZ*-Fusionsstämmen (siehe Abb. 31). Eine eindeutige Erklärung für dieses Verhalten kann nicht gegeben werden, möglicherweise konkurriert das plasmidkodierte mutierte GlnK-Protein mit dem chromosomal kodierten Wildtyp-GlnK um die Uridylyltransferase.

Zusammengefaßt lassen sich die Versuchsergebnisse so interpretieren: 1.) Die Überexpression von *glnD*, nicht jedoch von *glnK*, im Wildtyp führt bereits bei guter Stickstoff-Versorgung zu einer Deregulation AmtR-kontrollierter Gene. 2.) Die Anwesenheit von GlnK ist jedoch nach wie vor essentiell, da die Überexpression von *glnD* im *glnK*-Deletionsstamm NR-1 keinen Effekt zeigte. 3.) Auch das Verhältnis von GlnK und UTase scheint wichtig für das Ausmaß der Deregulation zu sein, da die gleichzeitige Überexpression von *glnD* und *glnK* eine deutlich stärkere Deregulation

zur Folge hatte als die Überexpression von *glnD* alleine. 4.) Überraschenderweise führt die Überexpression von *glnD* bei guter Stickstoff-Versorgung nicht zu einer nachweisbaren Uridylierung von GlnK, obwohl unter diesen Bedingungen eine Expression AmtR-kontrollierter Gene zu beobachten ist. Unter diesen Bedingungen bei *glnD*-Überexpression ist die Anwesenheit von uridyliertem GlnK für die Derepression AmtR-kontrollierter Gene offenbar nicht notwendig. Insgesamt muss jedoch auf Grund der Regulation der *glnD*-Expression durch AmtR und auf Grund der Effekte die bei Überexpression von *glnD* beobachtet wurden, der Schluss gezogen werden, dass die Uridyltransferase in *C. glutamicum*, anders als in *E. coli*, nicht der Sensor des Stickstoff-Status sein kann. Eine Beeinflussung der Signalkaskade durch die Überexpression eines Sensors würde biologisch keinen Sinn machen.

5. *C. glutamicum* als Modellorganismus für Mycolsäure-haltige Actinomyceten

C. glutamicum gehört phylogenetisch zu den Mycolsäure-haltigen Actinomyceten. Unter diesen befinden sich zahlreiche wichtige humanpathogene Arten wie *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *C. diphtheriae*. Da diese pathogenen Vertreter nur unter Vorsichtsmaßnahmen zu handhaben sind bzw. wie auch andere Vertreter der Mycolsäure-haltigen Actinomyceten genetisch schwer zugänglich sind, ist es von Interesse, molekularbiologische und biochemische Fragestellungen an einem leichter handhabbaren, ungefährlichen Modellorganismus zu untersuchen. Daher wurde untersucht, ob sich die für die Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum* erhaltenen Daten auf andere Mycolsäure-haltige Actinomyceten übertragen lassen. Als Beispiel wurde *C. diphtheriae* ausgewählt.

5.1 Genetische Organisation des Stickstoff-Metabolismus von *C. diphtheriae*

Als Einstieg in die Untersuchung der Kontrolle des Stickstoff-Metabolismus von *C. diphtheriae* wurde zunächst untersucht, welche von *C. glutamicum* her bekannten Gene in *C. diphtheriae* vorhanden sind, bzw. welche Ähnlichkeiten diese bzw. deren abgeleitete Aminosäuresequenzen zu denen von *C. diphtheriae* zeigen. Dazu wurden BLAST-Homologiesuchen in der Genomsequenz von *C. diphtheriae* (Sanger Centre, <http://www.sanger.ac.uk>) durchgeführt. Insgesamt zeigte sich eine sehr weitgehende Übereinstimmung der genetischen Organisation beider Organismen. Fast alle Gene des Stickstoff-Metabolismus von *C. glutamicum* waren auch in *C. diphtheriae* konserviert, zudem war die Anordnung der Gene *amtB-glnK-glnD* bzw. *glnA2-glnE* im Genom identisch (Tab. 4 und Abb. 33). Nur für das *amt*-Gen und das *gltBD*-Operon konnten keine Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit in *C. diphtheriae* gefunden werden. Für das putative *amtB*-Gen in *C. diphtheriae* wurde allerdings kein durchgehender Leserahmen gefunden, sondern zwei Leserahmen, die daher als *amtB1* und *amtB2* bezeichnet wurden. Eine Erklärung ist möglicherweise, dass während dem Sequenzierprozeß ein DNA-Abschnitt zwischen den beiden Leserahmen nicht mitsequenziert wurde oder Sequenzierfehler eingetreten sind, die zu einem "frame-shift" führen, so dass kein durchgehender Leserahmen gefunden werden kann. Besonders interessant erscheint, dass bei dem "Screening" des *C.*

diphtheriae-Genoms ein Protein mit signifikanter Ähnlichkeit zu AmtR von *C. glutamicum* gefunden wurde. Daher bestand die Möglichkeit, dass in *C. diphtheriae* ebenfalls ein globaler Regulator ähnlich AmtR existieren könnte.

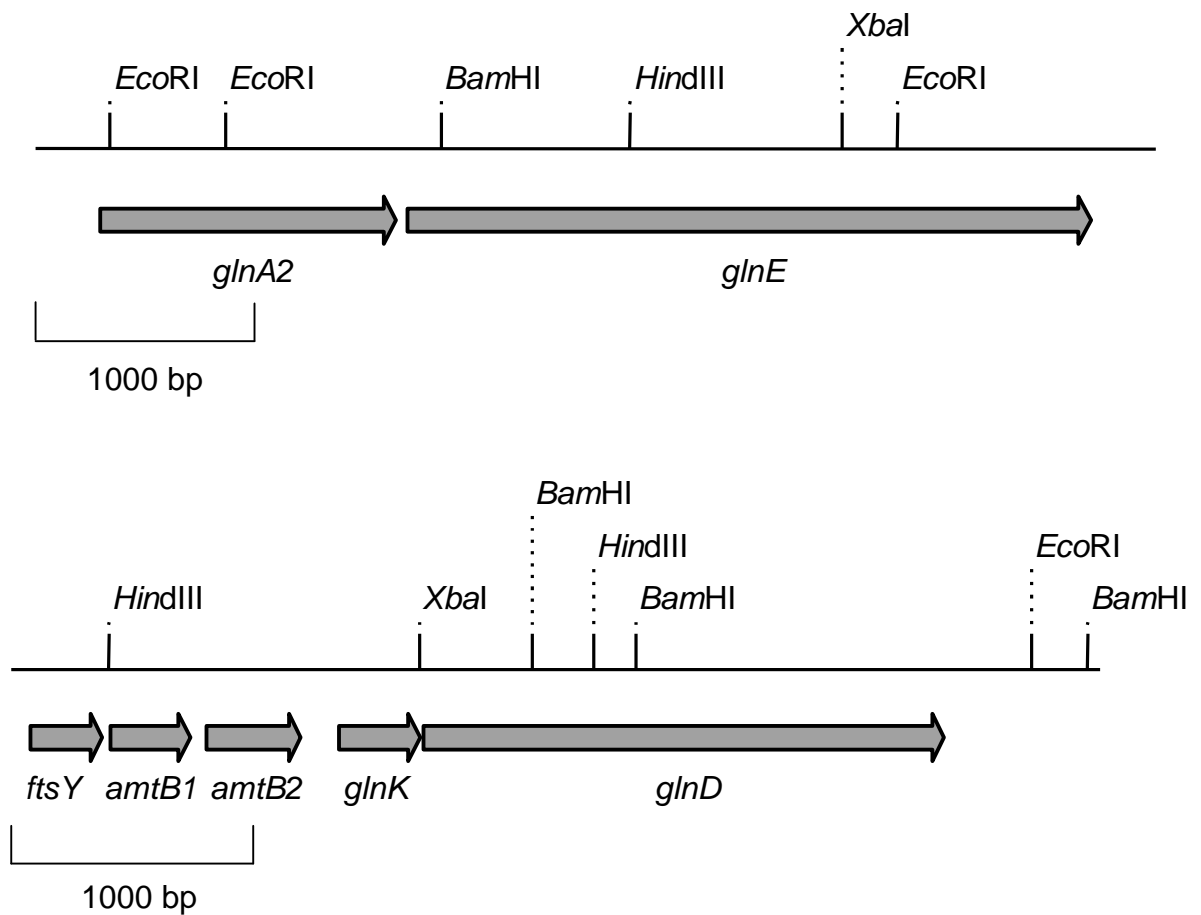


Abb.33: Anordnung der Gene *glnA2-glnE* und *amtB1-amtB2-glnK-glnD* im Genom von *C. diphtheriae*.

Tab. 4: *C. glutamicum*-Gene bzw. -Proteine und ihre Ähnlichkeit zu *C. diphtheriae*

<i>C. glutamicum</i> - Gen bzw. -Protein	Ähnlichkeit zu <i>C. diphtheriae</i> bezogen auf Nucleotidsequenz	Ähnlichkeit zu <i>C. diphtheriae</i> bezogen auf Aminosäuresequenz
<i>amt</i> (Amt)	-	-
<i>amtB</i> (AmtB)	60% <i>amtB1</i> 62% <i>amtB2</i>	48% AmtB1 50% AmtB2
<i>amtR</i> (AmtR)	69%	70%
<i>gdh</i> (GDH)	76%	73%
<i>glnA</i> (GS)	79%	79%
<i>glnA2</i> (GlnA2)	70%	78%
<i>glnE</i> (ATase)	67%	63%
<i>glnD</i> (UTase)	62%	47%
<i>glnK</i> (GlnK)	74%	73%
<i>gltBD</i> (GOGAT)	-	-

5.2 Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität in *C. diphtheriae*

In *C. glutamicum* wird die Glutaminsynthetase-Aktivität in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung durch Adenylierung bzw. Deadenylierung reguliert. Da in *C. diphtheriae* ein Gen mit hoher Ähnlichkeit zu dem *glnE*-Gen von *C. glutamicum* gefunden wurde (siehe Tab. 4) und die Glutaminsynthetase ebenfalls ein Adenylierungsmotiv aufweist, wurde untersucht, ob die Glutaminsynthetase-Aktivität auch in *C. diphtheriae* reguliert wird. Dazu wurden *C. diphtheriae* und *C. glutamicum* in BHI-Medium (wegen des schlechten Wachstums von *C. diphtheriae* in CgC-Medium) angezogen und in diesen Zellen bzw. nach Stickstoff-Hungern in CgCoN-Medium die Glutaminsynthetase-Aktivität bestimmt. Die gemessenen Glutaminsynthetase-Aktivitäten in BHI-Medium bzw. nach Stickstoff-Hungern waren in *C. diphtheriae* vergleichbar hoch wie die von *C. glutamicum*, ebenso konnte ein Anstieg der Glutaminsynthetase-Aktivität nach Stickstoff-Hungern nachgewiesen werden (Abb. 34). Im Gegensatz zu *C. glutamicum* zeigte sich in *C. diphtheriae* jedoch keine Abnahme der Glutaminsynthetase-Aktivität nach Gabe eines Ammonimpulses zu den Stickstoff-gehungerten Zellen (nicht gezeigt).

Möglicherweise beruht dies darauf, dass Ammonium unter diesen Bedingungen von den Zellen nur schlecht aufgenommen wurde.

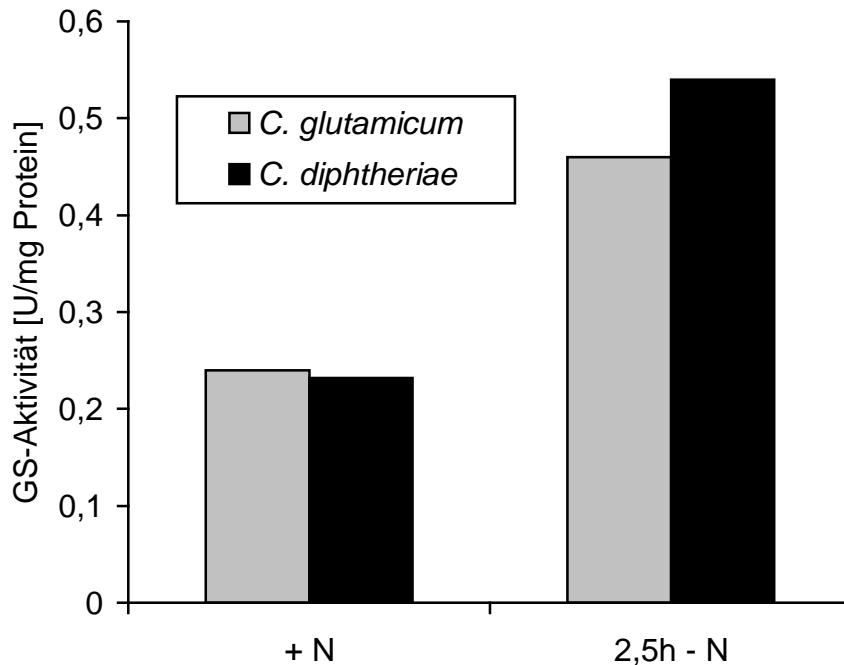


Abb. 34: Glutaminsynthetase-Aktivitäten in *C. glutamicum* und *C. diphtheriae* bei guter Stickstoff-Versorgung (+ N) und nach 2,5 h Stickstoff-Mangel (2,5h – N).

5.3 Nachweis der Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* und *glnA2-glnE* in *C. diphtheriae*

In *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass die Gene *amtB-glnK-glnD* bzw. *glnA2-glnE* ein Operon bilden, dieselbe Anordnung war auch in *C. diphtheriae* konserviert. Daher wurde vermutet, dass diese Gene auch in *C. diphtheriae* in einem Operon organisiert sein könnten. Dies wurde mittels RT-PCR-Reaktionen untersucht, in denen RNA aus Stickstoff-gehungerten *C. diphtheriae*-Zellen und Primer eingesetzt wurden, die in *amtB1* und *glnD* bzw. in *glnA2* und *glnE* lokalisiert waren. Tatsächlich konnten in beiden Fällen PCR-Produkte der erwarteten Größe erhalten werden (Abb. 35A, B), eine Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase zur Überprüfung auf DNA-Kontamination verlief negativ (nicht gezeigt). Damit konnte die Konservierung der Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* und *glnA2-glnE* auch in *C. diphtheriae* bestätigt werden.

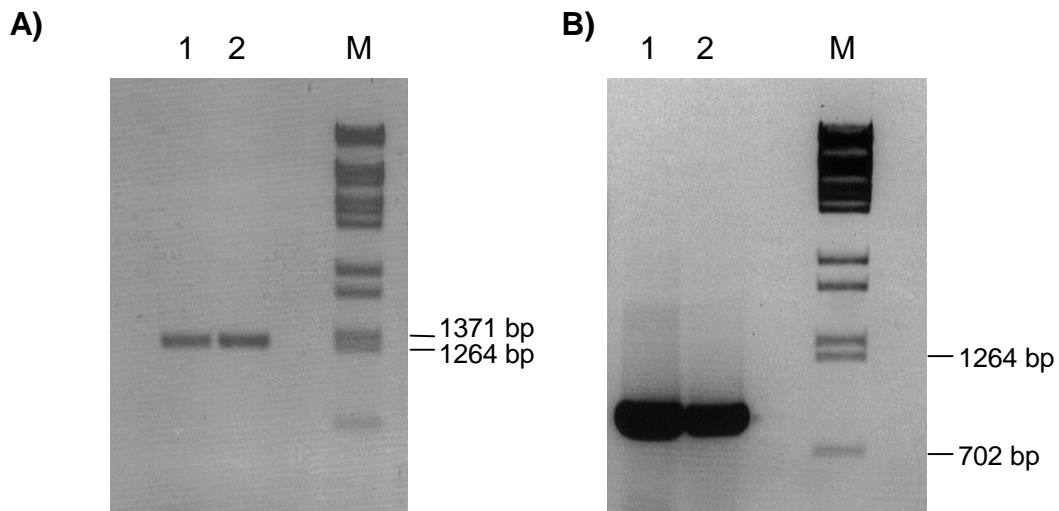


Abb. 35: Nachweis der Operonstruktur der Gene *amtB-glnK-glnD* (A) und *glnA2-glnE* (B) in *C. diphtheriae* über RT-PCR. 1: RNA aus Zellen bei guter Stickstoff-Versorgung, 2: RNA aus Zellen nach 30 min Stickstoff-Mangel als "template".

5.4 Untersuchung der Expressionsregulation in *C. diphtheriae*

Auf Grund der Expressionsregulation vieler Gene in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung wurde untersucht, ob eine solche Expressionsregulation auch in *C. diphtheriae* konserviert ist. Dazu wurden RNA-Hybridisierungen mit RNA durchgeführt die aus *C. diphtheriae*-Zellen präpariert worden war, die in BHI-Medium (gute Stickstoff-Versorgung) angezogen bzw. 15 und 30 min in CgCoN-Medium Stickstoff-gehungert worden waren. Hybridisiert wurde mit RNA-Sonden die komplementär zu den Genen *amtB1*, *amtB2*, *amtR*, *gdh*, *glnA*, *glnD* und *glnK* waren. Als Referenz wurde wiederum die Transkription des 16SrRNA-Gens gewählt. Für die *amtB*-Gene konnte jedoch kein Signal erhalten werden. Möglicherweise ist dies auf Sequenzierfehler im Bereich von *amtB* zurückzuführen, wodurch die Bindung der *amtB*-Sonden beeinträchtigt wurde. Bezüglich der Transkription des *glnD*-Gens konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob eine Transkriptionsregulation präsent war, da das Hybridisierungssignal des *glnD*-Gens unter Stickstoff-Mangel überraschenderweise schnell verschwand, dies ist wahrscheinlich auf schnellen Abbau der mRNA zurückzuführen. Im Falle der Transkription des *glnK*-Gens war die unter Stickstoff-Mangel beobachtete Zunahme des Hybridisierungssignals sehr gering, so dass unsicher ist, ob hier eine

Expressionsregulation vorliegt. Dagegen zeigten sich bei der Transkription der Gene *amtR*, *gdh* und *glnA* Übereinstimmungen zum Regulationsverhalten in *C. glutamicum*. Das *amtR*-Gen wird unabhängig von der Stickstoff-Versorgung konstitutiv transkribiert, während im Fall des *gdh*- und *glnA*-Gens eine eindeutige Zunahme der Transkription unter Stickstoff-Mangel zu beobachten war (Beckers, 2001; Abb. 36).

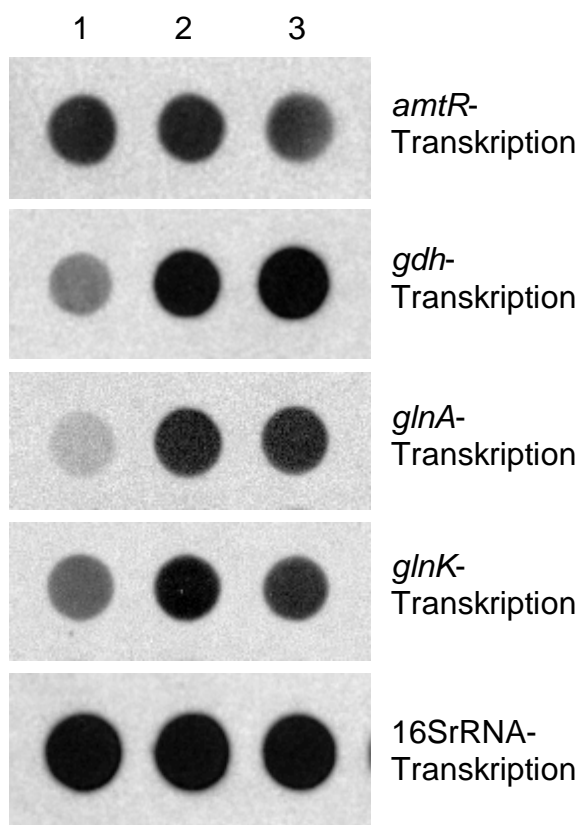


Abb. 36: Transkription der Gene *amtR*, *gdh*, *glnA* und *glnK* in *C. diphtheriae* bei unterschiedlicher Stickstoff-Versorgung. 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 und 30 min Stickstoff-Mangel. 16SrRNA-Transkription als Referenz (Beckers, 2001).

Interessant erscheint besonders, dass im Promotorbereich des *glnA*-Gens das gleiche Sequenzmotiv (ATCTAT) gefunden werden konnte wie das AmtR-Bindemotiv im *glnA*-Promotorbereich von *C. glutamicum*. Dagegen konnte ein solches Sequenzmotiv im Promotorbereich des *gdh*-Gens, des *amtB-glnK-glnD*-Operons und des *glnA2-glnE*-Operons nicht gefunden werden. Daher ist anzunehmen, dass das AmtR-ähnliche Protein in *C. diphtheriae* die gleiche DNA-Erkennungssequenz besitzt wie das AmtR-Protein in *C. glutamicum*. Um zu überprüfen, ob die Transkription des *glnA*-Gens von diesem AmtR-ähnlichen Protein reguliert wird, wurde eine *amtR*-Insertionsmutante konstruiert. Dazu wurde ein 0,5 kb großes internes Fragment des *amtR*-Gens in *pK18mob* kloniert und das so konstruierte Plasmid *pK18amtR_{C.d.}* in *C. diphtheriae* eingebracht. Aus den erhaltenen Insertionsmutanten LN_{C.d.}-AmtR wurde dann wiederum RNA bei guter Stickstoff-Versorgung und unter Stickstoff-Mangel präpariert und mittels RNA-Hybridisierungen die Transkription des *glnA*-Gens analysiert. Tatsächlich konnte in der Insertionsmutante LN_{C.d.}-AmtR eine eindeutige Deregulation beobachtet werden (Abb. 37). Dies belegt, dass das AmtR-ähnliche Protein in *C. diphtheriae* die Transkription des *glnA*-Gens reguliert, dass also der gleiche Regulationsmechanismus wie in *C. glutamicum* existiert.

Um die Anwesenheit eines übergeordneten Regulationssystems in *C. diphtheriae* ähnlich dem in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde eine Insertionsmutante des *glnD*-Gens konstruiert. Auf Grund der Beobachtungen in *C. glutamicum* war zu erwarten, dass die Uridyltransferase in *C. diphtheriae* ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion haben könnte. Die Inaktivierung der Uridyltransferase sollte daher wie in *C. glutamicum* zu einem Verlust der Reaktion auf Stickstoff-Mangel führen. Zur Konstruktion der Insertionsmutante wurde ein 0,9 kb großes internes Fragment des *glnD*-Gens in *pK18mob* kloniert und das so erhaltene Konstrukt *pK18glnD_{C.d.}* in *C. diphtheriae* eingebracht. In den so erhaltenen Insertionsmutanten LN_{C.d.}-GlnD wurde wiederum die *glnA*-Transkription bei guter Stickstoff-Versorgung bzw. Stickstoff-Mangel untersucht. Dabei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass in den Insertionsmutanten keine Reaktion auf Stickstoff-Mangel mehr erfolgte, d.h. es war keine Zunahme der *glnA*-Transkription zu beobachten (Abb. 37). Dies zeigt, dass die Uridyltransferase in *C. diphtheriae*, ähnlich wie in *C. glutamicum*, ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion hat.

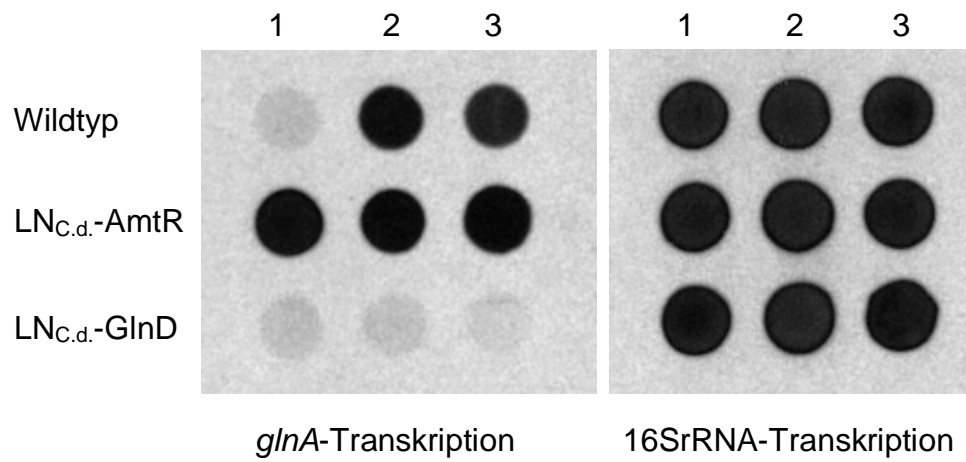


Abb. 37: Einfluß der Insertionsmutagenese des *amtR*- und des *glnD*-Gens in *C. diphtheriae* auf die *glnA*-Transkription. 1: gute Stickstoff-Versorgung, 2-3: 15 und 30 min Stickstoff-Mangel. 16SrRNA-Transkription als Referenz.

IV. Diskussion

1. AmtR, ein globaler Regulator der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum*

Zur schnellen und zielgerichteten Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen ist es für Bakterien sinnvoll, die Expression von Genen, deren Genprodukte in einer bestimmten Situation benötigt werden, gemeinsam zu regulieren. Solche Gruppen gemeinsam regulierter Gene werden als Regulons bezeichnet. In *C. glutamicum* wird die Expression Stickstoff-regulierter Gene durch das AmtR-Protein nach einem Repressionsmechanismus global reguliert. AmtR wurde zuerst als Regulator der *amt*-Expression isoliert (Jakoby et al., 2000), weitere Untersuchungen der Genexpression in der *amtR*-Deletionsmutante MJ6-18 zeigten dann, dass AmtR auch die Expression des *amtB-glnK-glnD*-Operons, des *glnA*-Gens und des *gltBD*-Operons reguliert. Durch Gelretardationstests konnte im Promotorbereich der AmtR-kontrollierten Gene ein charakteristisches Bindemotiv isoliert werden, das jedoch von Gen zu Gen gewisse Sequenzunterschiede zeigte (Tab. 5). Über die Suche nach Genen mit diesem typischen Bindemotiv im gesamten *C. glutamicum*-Genom mittels FASTA-basierter Algorithmen konnten zwei weitere AmtR-regulierte Gene isoliert werden (*cg1j9_002* und *cg2b21_075*), denen allerdings bis jetzt keine Funktion zugeordnet werden konnte.

Da diese Suchstrategie erfolgreich war, erscheint es realistisch, über verbesserte Algorithmen noch weitere Gene isolieren zu können, die von AmtR reguliert werden. Alternativ könnte die Isolierung solcher Gene auch durch den Vergleich der Gentranskription im Wildtyp und in der *amtR*-Deletionsmutante bei unterschiedlicher Stickstoff-Versorgung mittels cDNA-Arrays erfolgen. Insgesamt konnte bisher für acht Gene eine Regulation durch AmtR nachgewiesen werden (Abb. 38).

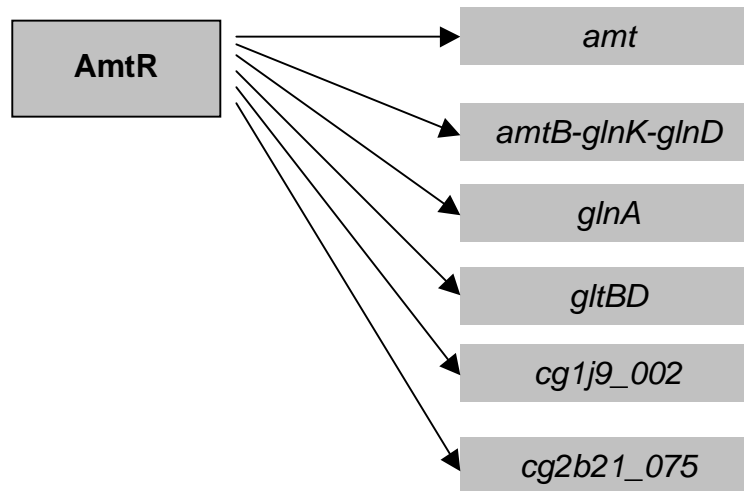


Abb. 38: Zusammenstellung aller bisher isolierten AmtR-regulierten Gene in *C. glutamicum*.

Der Vergleich der AmtR-Bindemotive in den Promotorregionen der einzelnen Gene untereinander und der Transkriptionsrepression bei guter Stickstoff-Versorgung zeigte interessante Unterschiede (Tab. 5). Am schlechtesten konserviert ist das AmtR-Bindemotiv im Promotorbereich des *glnA*-Gens, wo nur das stark verkürzte Motiv ATCTAT präsent ist. Im Gegensatz zu den anderen AmtR-regulierten Genen zeigte sich im Falle des *glnA*-Gens bei guter Stickstoff-Versorgung eine deutlich nachweisbare Transkription, d.h. die Transkriptionsrepression von *glnA* ist deutlich schwächer als die der anderen Gene. Daraus könnte der Schluß gezogen werden, dass eine gewisse Korrelation zwischen der Art des AmtR-Bindemotivs und der Stringenz der Repression besteht. Dadurch wäre gewährleistet, dass die Expression von Genen, deren Produkte auch bei guter Stickstoff-Versorgung essentiell sind, wie z.B. die Glutaminsynthetase, auch unter reprimierenden Bedingungen noch ausreichend ist. Durch das Vorhandensein eines Bindemotivs wie im *amt*-Promotor (zweimal ATCTATAGN₄ATAG) wird wahrscheinlich eine besonders starke Repression erzielt, somit kann die unnötige Expression von Genen, deren Produkte bei guter Stickstoff-Versorgung nicht notwendig sind, wie z.B. Transportproteine, weitgehend verhindert werden. Um eine solche Korrelation nachzuweisen sind quantitative Bestimmungen der Transkriptionsrepression der jeweiligen Gene bei guter Stickstoff-Versorgung notwendig. Hierfür sind jedoch RNA-Hybridisierungen und Bestimmungen der β -Galactosidase-Aktivität an Promotor-*lacZ*-Fusionsstämmen nicht empfindlich genug. Stattdessen könnten für diesen Zweck Luciferase-Assays

an Promotor-*luc*-Fusionsstämmen durchgeführt werden, die eine sehr hohe Empfindlichkeit besitzen. Alternativ könnte auch eine quantitative parallele Bestimmung der mRNA-Menge der einzelnen Gene im Wildtyp bei guter Stickstoff-Versorgung durch "Real-Time"-PCR in einem Light-Cycler erfolgen.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch, dass im Promotorbereich des *amtR*-Gens selbst ein Sequenzmotiv gefunden wurde, das Ähnlichkeit zu dem AmtR-Motiv im *glnA*-Promotor hatte, allerdings zeigte dieses Motiv einen einzelnen Basenaustausch verglichen mit dem AmtR-Bindemotiv im *glnA*-Promotor (ATCGAT im *amtR*-Promotor, ATCIAT im *glnA*-Promotor). Wie RNA-Hybridisierungen und Gelretardationstests zeigten, erfolgt die *amtR*-Transkription konstitutiv und AmtR zeigt auch keine Bindung an den *amtR*-Promotorbereich. Offensichtlich verhindert dieser einzelne Basenaustausch eine Bindung von AmtR an dieses Sequenzmotiv. Möglicherweise existierte für die Transkription des *amtR*-Gens einmal eine Art Autoregulation durch das eigene Genprodukt ähnlich dem *glnR*-Gen in *B. subtilis* (Brown & Sonenshein, 1996). Durch Mutation des Sequenzmotivs während der Evolution könnte diese Autoregulation verloren gegangen sein und hat sich offensichtlich nicht nachteilig ausgewirkt, so dass sie erhalten blieb.

Tab. 5: Vergleich der AmtR-Bindemotive im Promotorbereich der Gene *amt*, *amtB-glnK-glnD*, *amtR*, *cg1j9_002*, *cg2b21_075*, *glnA* und *gltBD*.

AmtR-kontrolliertes Gen bzw. Operon	Sequenz des AmtR-Bindemotivs im Promotorbereich des regulierten Gens
<i>amt</i>	ATCTATAGN ₄ ATAG N ₂₀ ATCTATAGN ₄ ATAG
<i>amtB-glnK-glnD</i>	ATCTATAG N ₁ ATAG
<i>amtR</i>	ATC <u>G</u> AT
<i>cg1j9_002</i>	ATCTATAG
<i>cg2b21_075</i>	ATCTATAG N ₃₂ ATCTATAG
<i>glnA</i>	ATCTAT
<i>gltBD</i>	ATCTATAG

2. Untersuchungen zur Signaltransduktion im Stickstoff-Metabolismus von *C. glutamicum*

C. glutamicum reagiert auf Stickstoff-Mangel auf Expressionsebene mit der verstärkten Transkription zahlreicher Gene (*amt*, *amtB*, *glnA*, *glnD*, *glnK* und *gltBD*), bei guter Stickstoff-Versorgung wird deren Transkription durch den globalen Regulator AmtR reprimiert. Ein wichtiges Problem der Expressionskontrolle ist jedoch, wie eine Veränderung der Stickstoff-Versorgung wahrgenommen wird und wie dieses Signal dann an AmtR übertragen wird, so dass unter Stickstoff-Mangel eine Derepression AmtR-kontrollierter Gene erfolgen kann. In Enterobakterien erfolgt die Wahrnehmung einer Veränderung in der Stickstoff-Versorgung durch den Sensor Uridylyltransferase. Stickstoff-Mangel äußert sich in einem Abfall der Glutaminkonzentration, der von der Uridylyltransferase wahrgenommen wird. Über Uridylylierung des Signaltransduktionsproteins P_{II} und eine Weiterleitung des Signals an das NtrB/NtrC-System erfolgt dann eine Aktivierung der Gentranskription. Die Isolierung einer Uridylyltransferase, eines P_{II}-ähnlichen Proteins (GlnK) sowie der Nachweis der Uridylylierung von GlnK unter Stickstoff-Mangel (Jakoby, 1998) legten zunächst nahe, dass die Signalaufnahme und die Signalweiterleitung in *C. glutamicum* (obwohl kein NtrB/NtrC-System existiert) ähnlich zu der in Enterobakterien ist. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch gravierende Unterschiede. Während in *E. coli* zwei P_{II}-ähnliche Proteine existieren, von denen jedes das Fehlen des anderen kompensieren kann (Atkinson & Ninfa, 1998), ist in *C. glutamicum* nur ein P_{II}-ähnliches Protein, GlnK, vorhanden. Im Gegensatz zu den Enterobakterien ist GlnK in *C. glutamicum* essentiell für die zelluläre Antwort auf Stickstoff-Mangel. Da die Expression des *glnK*-Gens bei guter Stickstoff-Versorgung durch AmtR reprimiert wird, ist der Level an Signaltransduktionsprotein unter diesen Bedingungen extrem gering. Dieses Regulationsverhalten stellt einen deutlichen Unterschied zu *E. coli* dar, wo die Expression des *glnB*-Gens konstitutiv erfolgt und nur die Expression des *glnK*-Gens unter Stickstoff-Mangel aktiviert wird. Interessanterweise wird auch die Expression des *glnD*-Gens in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung durch AmtR reguliert. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der konstitutiven, Stickstoff-unabhängigen Expression des *glnD*-Gens in *E. coli* (Kim et al., 1998) und *K. pneumoniae* (Merrick & Edwards, 1995b). Dieser Nachweis der *glnD*-Expressionsregulation war ein erster

Hinweis, dass die Uridylyltransferase in *C. glutamicum*, im Gegensatz zu den Enterobakterien, nicht der primäre Sensor des zellulären Stickstoff-Status sein kann. Unterstützt wurde dies weiterhin durch die Beobachtung, dass die Überexpression von *glnD* zu einer deutlichen Deregulation der Expression AmtR-kontrollierter Gene bereits bei guter Stickstoff-Versorgung führte. Da dies nicht in Einklang mit einer Sensorfunktion der Uridylyltransferase zu bringen ist, muss in *C. glutamicum* die Wahrnehmung des Stickstoff-Status anders erfolgen als in den Enterobakterien. Auf Grund der vorliegenden Daten ist die Existenz mindestens eines oder mehrerer, bis jetzt noch unbekannter, Sensorproteine anzunehmen, die das Stickstoff-Signal über die Uridylyltransferase an GlnK weiterleiten. Diese Kaskade reguliert dann über den globalen Repressor AmtR die Expression zahlreicher Gene in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung. Ein basierend auf diesen Ergebnissen erstelltes Modell der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum* zeigt Abbildung 39.

Unklar ist die eigentliche Funktion der Uridylylierung von GlnK. Zwar führt die Mutation der Uridylylierungsstelle im T-Loop von GlnK zum Verlust der Expression AmtR-kontrollierter Gene, andererseits führt die Überexpression von *glnD* bei guter Stickstoff-Versorgung, obwohl unter diesen Bedingungen eine Deregulation AmtR-kontrollierter Gene zu beobachten ist, nicht zu einer nachweisbaren Uridylylierung von GlnK. Demnach scheint die Uridylylierung von GlnK zumindest bei *glnD*-Überexpression nicht essentiell für die Signaltransduktion auf AmtR zu sein. Die Anwesenheit von GlnK ist für den Überexpressionseffekt dennoch notwendig, da die Überexpression von *glnD* im *glnK*-Deletionsstamm keinen Effekt hatte. Dies zeigt ebenfalls, dass die Signalkaskade über die UTase und GlnK auf AmtR verlaufen muss.

Unabhängig von den Beobachtungen auf Expressionsebene ist auch die Änderung der zellulären Aminosäurepools in *C. glutamicum* nach Eintreten von Stickstoff-Mangel ein Hinweis auf die Existenz eines anderen Mechanismus der Wahrnehmung des Stickstoff-Status. Bis zu 200 mM an intrazellulärem Glutamat und bis zu 50 mM an intrazellulärem Glutamin wurden in *C. glutamicum*-Zellen, die in Minimalmedium angezogen worden waren, bestimmt. Diese hohen Aminosäurepools werden jedoch nur nach und nach innerhalb von mehreren Stunden Stickstoff-Mangel abgebaut. Auch die Zugabe von Glutamin zu Stickstoff-gehungerten *C. glutamicum*-Zellen änderte nicht den intrazellulären Aminosäurepool, stattdessen wurde das zugegebene Glutamin rasch metabolisiert (Jakoby, 1998). Im Gegensatz dazu erfolgt

eine Antwort der Zelle auf Stickstoff-Mangel auf Expressionsebene, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, innerhalb weniger Minuten. Dies zeigt, daß die intrazellulären Pools an Glutamat und Glutamin nicht den Stickstoff-Status der Zelle widerspiegeln. Im Gegensatz dazu konnte für *S. typhimurium* (Ikeda et al., 1996) und *K. pneumoniae* (Schmitz, 2000) gezeigt werden, dass extrazelluläre Stickstoff-Limitation zu einem Abfall der intrazellulären Glutaminkonzentration um einen Faktor von sechs oder mehr führte. Auch für *B. subtilis* wird die Wahrnehmung von Stickstoff-Mangel über den Abfall der intrazellulären Glutaminkonzentration diskutiert (Hu et al., 1999).

Wie direkte Messungen zeigten, erfolgt jedoch ein Abfall der intrazellulären Ammoniumkonzentration in *C. glutamicum* nach Eintreten von Stickstoff-Mangel im gleichen Zeitfenster wie die Antwort auf Expressionsebene (Daten nicht gezeigt). Demnach könnte die intrazelluläre Ammoniumkonzentration ein Marker für den Stickstoff-Status der Zelle sein. Interessant erscheint in dieser Hinsicht auch die Frage, ob die Stickstoff-Limitation von der Zelle durch einen internen Sensor wahrgenommen wird oder ob z.B. Chemorezeptoren existieren, die direkt die extrazelluläre Konzentration an verfügbarem Stickstoff messen und das Signal intrazellulär weiterleiten. Im Falle der extrazellulären Wahrnehmung durch Chemorezeptoren bestände jedoch das Problem, dass *C. glutamicum* eine große Anzahl von Stickstoffquellen zu verwerten vermag. Demnach müsste für jede Stickstoffquelle ein eigener Rezeptor existieren. Eine Möglichkeit, den oder die intra- oder extrazellulären Sensor(en) des Stickstoff-Status zu identifizieren, wäre die ungerichtete Mutagenese eines *C. glutamicum*-Reporterstamms. Hierfür könnte z.B. der *amt-lacZ*-Fusionsstamm von *C. glutamicum* eingesetzt werden. Wie schon erwähnt, erfolgt in diesem Stamm eine Expression des *lacZ*-Reportergens erst unter Stickstoff-Mangel. Zellen dieses Stamms färben sich daher auf Stickstoff-freiem Minimalmedium mit X-Gal als Substrat der β -Galactosidase blau. Durch Transposonmutagenese dieses Stamms und nachfolgendes Screening auf Mutanten, die auf Stickstoff-freiem Medium mit X-Gal keine Blaufärbung mehr zeigen, könnten solche Mutanten identifiziert werden, die einen Defekt in der Signalkaskade aufweisen. Das dafür verantwortliche Gen könnte dann einfach durch Sequenzierung des Transposon-Insertionsortes identifiziert werden.

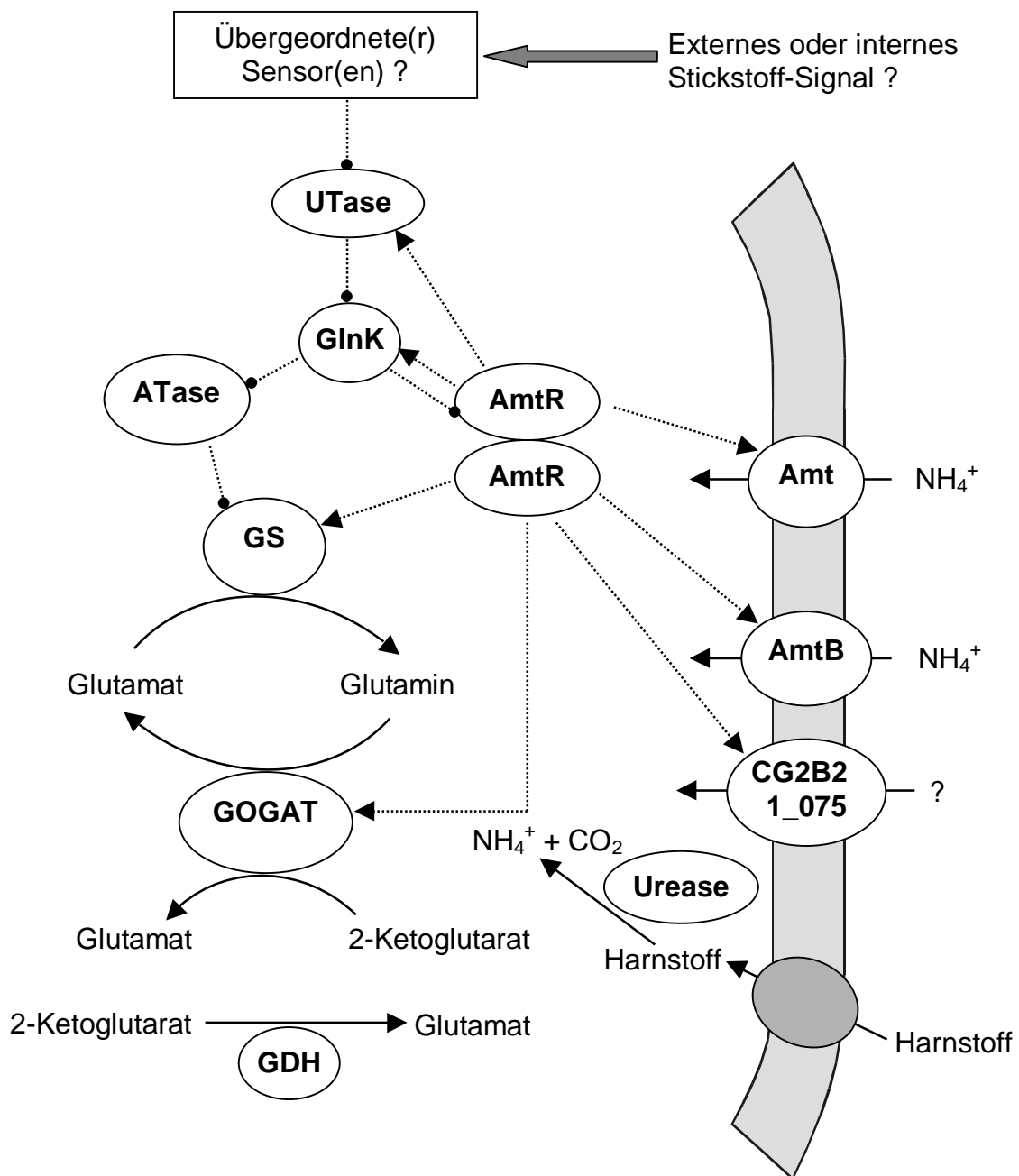


Abb. 39: Modell der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum* auf Expressionsebene. Das AmtR-Protein reguliert global die Expression Stickstoff-kontrollierter Gene. Der Stickstoff-Status wird wahrscheinlich von einem oder mehreren übergeordneten Sensor(en) wahrgenommen und über die UTase an GlnK weitergeleitet. GlnK interagiert dann wahrscheinlich mit AmtR. Unter Stickstoff-Mangel führt dies zu einer Derepression AmtR-regulierter Gene. GlnK modifiziert zudem die Aktivität der ATase, die wiederum die Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) reguliert. GDH, Glutamatdehydrogenase; GOGAT, Glutamatsynthase; CG2B21_075, Membranprotein unbekannter Funktion.

.....> Expressionsregulation • vermutliche Protein-Protein-Interaktionen in der Signalkaskade

3. *C. glutamicum* als Modellorganismus für Mycolsäure-haltige Actinomyceten

C. glutamicum gehört phylogenetisch zu den Mycolsäure-haltigen Actinomyceten. Unter diesen finden sich zahlreiche humanpathogene Vertreter wie z.B. *M. leprae*, *M. tuberculosis* und *C. diphtheriae*. Da diese Organismen auf Grund ihrer Pathogenität nur unter Vorsichtsmaßnahmen zu handhaben sind und häufig, wie es sich zum Beispiel an Mycobakterien gezeigt hat, genetisch schwer zugänglich sind, ist es sinnvoll, molekularbiologische und biochemische Fragestellungen zunächst an ungefährlichen und leichter zu handhabenden Modellorganismen zu untersuchen. Das Lehrbuchbeispiel für Gram-positive Bakterien, *B. subtilis*, ist hierfür jedoch nur bedingt geeignet, da dieser mit den Mycolsäure-haltigen Actinomyceten nur entfernt verwandt ist. Dies äußert sich auch in einem abweichenden stoffwechselphysiologischen Verhalten und anderen Regulationsmechanismen. So wird z.B. die Glutaminsynthetase in *B. subtilis* nicht in ihrer Aktivität reguliert, ein P_{II}-ähnliches Protein wird nicht uridylyliert und dieses besitzt auch keine Signaltransduktionsfunktion wie in den Enterobakterien (Deuel & Stadtman, 1970; Wray et al., 1994). Prinzipiell ist *C. glutamicum* gut als Modellorganismus geeignet, da es nicht pathogen, genetisch gut zugänglich und sein Zentralstoffwechsel sehr gut charakterisiert ist. Zudem ist sein Genom mittlerweile vollständig sequenziert. Daher wurde in dieser Arbeit die Übertragbarkeit der für die Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum* gewonnenen Ergebnisse auf einen Vertreter der Mycolsäure-haltigen Actinomyceten, *C. diphtheriae*, überprüft.

Schon bei der Analyse der genetischen Organisation zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung. Fast alle Gene der Stickstoff-Kontrolle in *C. glutamicum*, auch deren Anordnung im Genom, waren in *C. diphtheriae* konserviert. Auf Aktivitätsebene der Stickstoff-Kontrolle zeigte sich am Beispiel der Glutaminsynthetase, deren Aktivität wie in *C. glutamicum* unter Stickstoff-Mangel anstieg, ein ähnliches Regulationsverhalten. Auf Expressionsebene konnte nachgewiesen werden, dass die Gene *amtB-glnK-glnD* und *glnA2-glnE* wie in *C. glutamicum* ein Operon bilden. Ähnlich wie in *C. glutamicum* war auch für die Gene *gdh* und *glnA* in *C. diphtheriae* eine Transkriptionszunahme unter Stickstoff-Mangel zu beobachten, ebenso erfolgte die Transkription des *amtR*-Gens konstitutiv. Demgegenüber ist die Transkriptionsrepression des *amtB-glnK-glnD*-Operons deutlich schwächer als in *C.*

glutamicum. Zumindest für das *glnA*-Gen konnte jedoch gezeigt werden, dass dessen Transkription unter Kontrolle eines AmtR-ähnlichen Proteins steht, im Promotorbereich von *glnA* ist wahrscheinlich auch das gleiche Bindemotiv ATCTAT konserviert wie bei *glnA* von *C. glutamicum*. Zur Überprüfung müsste in einem Gelretardationstest untersucht werden, ob das AmtR-ähnliche Protein von *C. diphtheriae* tatsächlich an dieses Sequenzmotiv im *glnA*-Promotor bindet. Auch die übergeordnete Kontrolle des Stickstoff-Metabolismus scheint sehr ähnlich zu der in *C. glutamicum* zu sein: die Inaktivierung der Uridylyltransferase durch Insertionsmutagenese hatte wie in *C. glutamicum* den Verlust der zellulären Reaktion auf Stickstoff-Mangel zur Folge, wie am Beispiel der Transkription des *glnA*-Gens gezeigt werden konnte. Insgesamt lassen sich die für *C. glutamicum* gewonnenen Ergebnisse weitgehend auf *C. diphtheriae* übertragen, demnach kann *C. glutamicum* sinnvoll als Modellorganismus zumindest für andere Corynebakterien genutzt werden.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Mechanismen der Signaltransduktion im Stickstoff-Kontrollsystem von *C. glutamicum* untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der Expressionsregulation und der Signaltransduktion. Abschließend wurde die Übertragbarkeit der für *C. glutamicum* erhaltenen Ergebnisse auf andere Mycolsäure-haltige Actinomyceten überprüft.

1.) Die Expression einer Vielzahl von Genen des Stickstoff-Metabolismus in *C. glutamicum* wird in Abhängigkeit von der Stickstoff-Versorgung reguliert. Verantwortlich für diese Regulation ist das AmtR-Protein, das zuvor als Regulator der *amt*-Expression isoliert worden war. AmtR reguliert neben der Expression des *amt*-Gens auch die Expression der Gene *amtB*, *glnA*, *glnD*, *glnK*, *gltB* und *gltD*. Die Bindung von AmtR an ein charakteristisches Sequenzmotiv, das mit gewissen Sequenzabweichungen in der Promotorregion aller AmtR-kontrollierter Gene konserviert ist, konnte nachgewiesen werden. Über die genomweite Suche nach Genen mit dem AmtR-Bindemotiv im Promotorbereich mittels FASTA-basierter Algorithmen konnten zusätzlich zwei weitere AmtR-kontrollierte Gene isoliert werden. Die große Zahl der durch AmtR regulierten Gene zeigt, dass es sich bei AmtR um einen globalen Regulator des Stickstoff-Metabolismus in *C. glutamicum* handelt.

2.) Es konnte nachgewiesen werden, dass der Mechanismus der Signaltransduktion des Stickstoff-Status in *C. glutamicum*, trotz einiger Ähnlichkeiten, deutlich anders funktioniert als in den Enterobakterien. Zwar ist das Vorhandensein der Uridyltransferase und des P_{II}-ähnlichen GlnK-Proteins für die Signaltransduktion essentiell, im Gegensatz zu ihrer Funktion in den Enterobakterien kann die Uridyltransferase in *C. glutamicum* jedoch nicht als der eigentliche Sensor des Stickstoff-Status angesehen werden, da die Expression des *glnD*-Gens selbst unter AmtR-Kontrolle steht und die Überexpression von *glnD* zu Effekten führt, die nicht in Einklang mit der Sensorfunktion zu bringen sind. Vielmehr ist die Existenz mindestens eines weiteren übergeordneten Regulators und damit eines neuen Sensormechanismus zu fordern. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte ein detailliertes Modell der Regulation des Stickstoff-Metabolismus in *C. glutamicum* erstellt werden.

3.) Die Mechanismen der Regulation des Stickstoff-Metabolismus in *C. glutamicum* sind, wie am Beispiel von *C. diphtheriae* gezeigt werden konnte, wahrscheinlich auch in anderen Mycolsäure-haltigen Actinomyceten konserviert. *C. glutamicum* kann demnach sinnvoll als Modellorganismus zumindest für andere Corynebakterien genutzt werden.

VI. Literaturverzeichnis

Abe, S., Takayama, K., Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **13**, 279-301.

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

Atkinson, M.R. & Ninfa, A.J. (1998). Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **29**, 431-447.

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

Beckers, G. (2001). Stickstoffkontrolle in Corynebakterien. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Beckers, G., Nolden, L. & Burkovski, A. (2001). Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology*, **147**, 2961-2170.

Brown, J.R., Masuchi, Y., Robb, F.T. & Doolittle, W.F. (1994). Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. *J. Mol. Evol.* **38**, 566-576.

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

Chun, J., Kang, S.-O., Hah, Y.C. & Goodfellow, M. (1996). Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J. Indust. Microbiol.* **17**, 205-213.

Deuel, T.F. & Stadtman, E.R. (1970). Some kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *Nature* **323**, 304-309.

- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtkke, K.-U., Sahm, H. (1994).** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**, 1817-1828.
- Fisher, S.H. (1999).** Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence !. *Mol. Microbiol.* **32**, 223-232.
- Forchhammer, K. & Tandeau de Marsac, N. (1994).** The P_{II} protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.* **176**, 84-91.
- Goldberg, D.P. (1997).** Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. pp. 187-202. In Creighton, T. E. (ed.), *Protein structure- a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. USA* **87**, 4645-4649.
- Hillemann, D., Dammann, T., Hillemann, A. & Wohlleben, W. (1993).** Genetic and biochemical characterization of the two glutamine synthetases GSI and GSII of the phosphinotricyl-alanyl-alanine producer, *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1773-1783.
- Hu, P., Leighton, T., Ishkhanova, G. & Kustu, S. (1999).** Sensing of nitrogen limitation by *Bacillus subtilis*: comparison to enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **181**, 5042-5050.
- Ikeda, T.P., Shauger, A.E. & Kustu, S. (1996).** *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. *J. Mol. Biol.* **259**, 589-607.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Jaggi, R., Ybarlucca, W., Cheah, E., Carr, P.D., Edwards, K.J., Ollis, D.L., Vasudevan, S.G. (1996). The role of the signal transducing protein P_{II} from *Escherichia coli*. FEBS Lett. **391**, 223-228.

Jahns, T., Zobel, A., Kleiner, D. & Kaltwasser, H. (1988). Evidence for carrier-mediated, energy dependent uptake of urea in some bacteria. Arch. Microbiol. **149**, 377-383.

Jakoby, M. (1998). Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Jakoby, M., Ngouoto-Nkili, C.E. & Burkovski, A. (1999). Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. Biotechnol. Tech. **13**, 437-441.

Jakoby, M., Nolden, L., Meier-Wagner, J., Krämer, R. & Burkovski, A. (2000). AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. **37**, 964-977.

Jakoby, M., Tesch, M., Sahm, H., Krämer, R. & Burkovski, A. (1997). Isolation of the *Corynebacterium glutamicum glnA* gene encoding glutamine synthetase I. FEMS Microbiol. Lett. **154**, 81-88.

Jiang, P., Zucker, P., Atkinson, M.R., Kamberov, E.S., Tirasophon, W., Chandran, P., Schefke, B.R. & Ninfa, A.J. (1997). Structure/Function analysis of the P_{II} signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. J. Bacteriol. **179**, 4342-4353.

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

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

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

Kane, J.F., Wakin, J., Fischer, R.S. (1981). Regulation of glutamate dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **148**, 1002-1005.

Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**, 5595-5603.

Kim, I.-H., Kwak, S.J., Kang, J., & Park, S.C. (1998). Transcriptional control of the *glnD* gene is not dependent on nitrogen availability in *Escherichia coli*. *Mol. Cells* **8**, 483-490.

Leuchtenberger, W. (1996). Amino acids- technical production and use. pp. 455-502. In: Rehm, H. J. & Reed, G. (eds.). *Products of primary metabolism*. Biotechnology, Vol. 6, VCH verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Liebl, W., Bayerl, A., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**, 299-304.

Meier-Wagner, J., Nolden L., Jakoby, M., Siewe, R., Krämer, R. & Burkovski, A. (2001). Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: Role of Amt and AmtB. *Microbiology* **147**, 135-143.

Merrick, M.J. & Edwards, R.A. (1995a). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 604-622.

Merrick, M.J. & Edwards, R.A. (1995b). The role of uridylyltransferase in the control of *Klebsiella pneumoniae nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 189-198.

Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Munk, K. (2000). Mikrobiologie. 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Nelson, M. & McClelland, M. (1992). Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combination for megabase mapping chromosomes. *Methods Enzymol.* **216**, 279-303.

Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A.E., Navarro Giminez, M. & Collins, M.D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. System. Bacteriol.* **45**, 724-728.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanger, F., Nicklen, C. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.

Schmitz, R.A. (2000). Internal glutamine and glutamate pools in *Klebsiella pneumoniae* grown under different conditions of nitrogen availability. *Current Microbiol.* **41**, 357-362.

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

Siewe, R.M., Weil, B., Burkovski, A. Eikmanns, B.J., Eikmanns, M., Krämer, R. (1996). Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. J. Biol. Chem. **271**, 5398-5403.

Siewe, R.M., Weil, B., Burkovski, A., Eggeling, L., Krämer, R. & Jahns, T. (1998). Urea uptake and urease activity in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. **169**, 411-416.

Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G. & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182. Ed. Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D. & Sensen, C., Menlo Park, CA: AAAI Press.

Strauch, M.A., Aronson, A.I., Brown, S.W., Schreier, H.J., Sonenshein, A.L. (1988). Sequence of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene region. Gene **30**, 257-265.

Tesch, M., de Graaf, A. A. & Sahm, H. (1999). *In-vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by ¹⁵N nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol. **65**, 1099-1109.

Tochikura, T., Sung, H.-C., Tachiki, T. & Kumagai, H. (1984). Occurrence of glutamate synthase in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **48**, 2149-2150.

Viera, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. Gene **19**, 259-268.

Wakisaka, S., Tachiki, T., Tochikura, T. (1990). Properties of *Brevibacterium flavum* glutamine synthetase in an "*in vivo-like*" system. J. Ferm. Bioeng. **70**, 182-184.

Wray, L.V., Atkinson, M.R., Fisher, S.H. (1994). The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli glnB*-encoded P_{II} protein. *J. Bacteriol.* **176**, 108-114.

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

Xu, Y., Cheah, E., Carr, P.D., Heeswijk, W.C., Westerhoff, H.V., Vasudevan, S.G. & Ollis, D.L. (1998). GlnK, a P_{II}-homologue: Structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J. Mol. Biol.* **282**, 149-165.

Yanisch-Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

VII. Anhang

1. Plasmidkonstruktionen

Im folgenden sind die Konstruktionen der in Tabelle 2 aufgelisteten Plasmide aufgeführt. Die Bezeichnungen der Plasmide sind in Klammern gesetzt. Wenn nicht anders angegeben, diente für die PCR-Amplifikation chromosomale DNA von *C. glutamicum* bzw. von *C. diphtheriae* als "template".

pGEM3z16SrRNA:

Mit den Primern 5`-TGG TGA CGG TAC CTG GAG AA-3` und 5`-ACG ACA CGA GCT GAC GAC AA-3` wurde über PCR ein 0,5 kb-Fragment aus dem 16SrRNA-Gen amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3z16SrRNA). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3zamt:

Mit den Primern 5`-TGG AAG ATG ACG GCA CCG GA-3` und 5`-GGT TTT CCG CTG AAC ACA CG-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *amt*-Gen über PCR amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zamt). Durch Sequenzierung wurde die Orientierung des Inserts überprüft. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3zamtB:

Mit den Primern 5`-TGG AGC ATT GGG CGT CGT TA-3` und 5`-AGC ATC GCA GCT GCG GTT-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *amtB*-Gen amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zamtB). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3zamtR:

Mit den Primern 5`-ATC GCT GAT GCC GTG GGA A-3` und 5`-AGG GAG GCG TCG GCA AGC AT-3` wurde über PCR ein 0,5 kb-Fragment aus dem *amtR*-Gen amplifiziert und in *SmaI*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3zamtR_{c.d.}:

Über PCR wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *amtR*-Gen von *C. diphtheriae* amplifiziert wobei die Primer 5`-CGC GCG **CTG CAG** CGC ACC TAC GAC GGC GA-3` und 5`-CGC GCG **GGA TCC** CGC CGA CGC AGT AGG AA-3` verwendet wurden. Das PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI/*Pst*I geschnitten und in *Bam*HI/*Pst*I-geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor ligiert. Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3zgdh_{c.d.}:

Über PCR wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *gdh*-Gen von *C. diphtheriae* amplifiziert wobei die Primer 5`-CGC GCG **GGA TCC** GGT GTA CTT CAC TGC TGA GA-3` und 5`-CGC GCG **CTG CAG** GCG TTC TGC TGC ATC TCC A-3` verwendet wurden. Das PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI/*Pst*I geschnitten und in *Bam*HI/*Pst*I-geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor ligiert. Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM4zgdh:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **TCT AGA** GTG CGA GCC TGA GCG TCA GC-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** GGA GCT TAG CCA CGT CAA CG-3` wurde ein 0,7 kb-Fragment aus dem *gdh*-Gen über PCR amplifiziert, mit *Eco*RI und *Xba*I geschnitten und in *Eco*RI/*Xba*I-geschnittenen und dephosphorylierten pGEM4z-Vektor kloniert (pGEM4zgdh).

pGEM3zglnA:

Mit den Primern 5`-GGC ACG CAA GGC AGA GCA GTA-3` und 5`-ACG GTG GTA GGA GTT CAG GGT-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *glnA*-Gen über PCR amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zglnA). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3zglnA_{C.d.}:

Über PCR wurde mit den Primern 5`-CGC GCG **GGA TCC** CGA GCG GTT ACG CTG GGA-3` und 5`-CGC GCG **CTG CAG** CAC TCA CCT TGC GCG ACG-3` ein 0,4 kb-Fragment aus dem *glnA*-Gen von *C. diphtheriae* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI/*Pst*I geschnitten und in *Bam*HI/*Pst*I-geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor ligiert. Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3zglnD:

Mit den Primern 5`-GCT GCG CGA TTT CGA ACT GAT-3` und 5`-GCA ACA GTG TTC AGA CTA TGT T-3` wurde über PCR ein 0,6 kb-Fragment aus dem *glnD*-Gen amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zglnD). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3zglnK:

Mit den Primern 5`-TCA CCG CAA TTG TCA AGC CGT-3` und 5`-GCT CTT CGA TGT TAG TCA TCC A-3` wurde ein 0,3 kb-Fragment aus dem *glnK*-Gen über PCR amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zglnK). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM4zglnK_{C.d.}:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **AAG CTT** ATG AAG CTG GTG ACG GCT ATC-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** GGT GCG CAC ACG GAT CAA GTC-3` wurde ein 0,3 kb-Fragment aus dem *glnK*-Gen von *C. diphtheriae* amplifiziert, mit *Eco*RI/*Hind*III geschnitten und in *Eco*RI/*Hind*III-geschnittenen und dephosphorylierten pGEM4z-

Vektor kloniert (pGEM4zglN_{K_{C.d.}}). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3zglB:

Mit den Primern 5`-GAA GAT CTT GAC CGT G-3` und 5`-GCG AAT CCA CTC ACC ATA TG-3` wurde ein 0,8 kb-Fragment aus dem *glbB*-Gen über PCR amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zglB). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pK18Δ268/283:

Mit den Primern 5`-GTC GAC CTG TTG TCT CCC CA-3` und 5`-TCC GGT GCC GTC ATC TTC CA-3` wurde über PCR ein 0,6 kb-Fragment, das den Bereich 300 bp stromauf- und abwärts des *amt*-Startcodons umfaßte, amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pUC18 kloniert (pUCpamt). Mit diesem Plasmid als "template" wurde ebenfalls über PCR mit den Primern 5`-TTC TGT TTT TAT AAC GAA GG-3` und 5`-GTA AAA ACT GGA CTA GGT TT-3` die AmtR-Bindestelle B1 deletiert. Das PCR-Produkt wurde religiert (pUCΔ268/283) und das Insert mit der Deletion mit *Eco*RI/*Bam*HI ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* kloniert (pK18Δ268/283).

pK18Δ304/320:

Ausgehend von Plasmid pUCpamt (siehe unter pK18Δ268/283) als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-AAA CCT AGT CCA GTT TTT AC-3` und 5`-AAA TAC TCC GCT CGA CAG CA-3` die AmtR-Bindestelle B2 deletiert. Das PCR-Produkt wurde religiert (pUCΔ304/320) und das Insert mit der Deletion mit *Eco*RI/*Bam*HI ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* kloniert (pK18Δ304/320).

pK18ΔamtB:

Aus Plasmid pUCamtB wurde durch *Eco*RV/*Bsm*I-Restriktion ein 0,9 kb-Fragment aus *amtB* ausgeschnitten. Das Restplasmid wurde mit Mungobohnen-Nuclease (NEB, Schwalbach) behandelt, um überhängende Enden zu entfernen und dann religiert (pUCΔamtB). Aus pUCΔamtB wurde das Insert mit der Deletion in *amtB*

durch Restriktion mit *Bam*HI ausgeschnitten und in *Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB*-Vektor ligiert (pK18Δ*amtB*).

pK18amt-lacZ:

Zur Konstruktion von pK18amt-lacZ wurde zunächst das *lacZ*-Gen über PCR mit den Primern 5`-GCG CGC **TCT AGA** ATG ACC GGA TCC GGA GCT TG-3` und 5`-GCG CGC **CTC GAG** TTA CGC GAA TAC GGG CAG AC-3` amplifiziert, wobei Plasmid pLacZi als "template" diente. Über die Primer wurde an das 5`-Ende eine *Xba*I- und an das 3`-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt. Mit Plasmid pUCdppc als "template" wurde über PCR 6 bp stromabwärts des *amt*-Startcodons mit den Primern 5`-**ACT AGT** GTC CAT GTT AAA GGC CTT TCA GC-3` und 5`-**CTC GAG** CCC TCA GAT CTA GCC TGG ATT CTC-3` eine *Spe*I- und eine *Xho*I-Schnittstelle eingeführt. Nach Religation (pUCamt*Spe*I*Xho*I) wurde das Plasmid mit *Spe*I/*Xho*I geschnitten, dephosphoryliert und mit dem mit *Xba*I/*Xho*I geschnittenen *lacZ*-Gen ligiert (pUCamt-lacZ). Aus diesem Konstrukt wurde die *amt-lacZ*-Fusion mit *Eco*RI/*Xba*I ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Xba*I geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18amt-lacZ).

pK18amtR_{C.d.}:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** CGT GAG GAA ATC CTT GAT GCC TCA G-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** GCT AGA ACG GGA AGT TCA TCA TCG-3` wurde über PCR ein 0,5 kb-Fragment aus dem *amtR*-Gen von *C. diphtheriae* amplifiziert, mit *Bam*HI/*Xba*I geschnitten und in *Bam*HI/*Xba*I-geschnittenen, dephosphorylierten pK18*mob* ligiert (pK18amtR_{C.d.})

pK18cg2b21Ins:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TGA AGT TGG TGA TGG TCG C-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** GAT GTC TTT GGC CGA GTA CG-3` wurde über PCR ein 0,6 kb-Fragment aus ORF *cg2b21_075* amplifiziert, mit *Eco*RI/*Bam*HI geschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mob* ligiert (pK18cg2b21Ins).

pK18ΔglnA2:

Zur Konstruktion von pK18ΔglnA2 wurde ein 3,4 kb-Fragment, das das *glnA2*-Gen und seine flankierenden Regionen enthielt, über PCR mit den Primern 5`-TCT GGG CGA AGT GCT GCA T-3` und 5`-GTT CTC TAG GAC AGG AAC GA-3` amplifiziert, mit *KpnI* und *BamHI* geschnitten und das resultierende 2,8 kb-Fragment in *KpnI/BamHI*-geschnittenen und dephosphorylierten pUC19-Vektor ligiert (pUCglnA2). Über PCR mit pUCglnA2 als "template" wurde in *glnA2* mit den Primern 5`-AGC AGC CTT GAT CAG GCA CT-3` und 5`-GCG CTG AGT ACA AAT TCC TGT-3` eine 1,3 kb Deletion eingeführt. Das PCR-Produkt wurde religiert (pUCΔglnA2) und aus diesem Plasmid das Insert mit *EcoRI/BamHI* ausgeschnitten und in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18ΔglnA2).

pK18glnA-lacZ:

Über PCR wurde ein 1 kb-Fragment das die Region 500 bp stromauf- und abwärts des *glnA*-Startcodons umfasste, mit den Primern 5`-**GAA TTC** ACG TTC CTC TGC ATC CAC ACG-3` und 5`-**GCA TGC** ACG CTC AAG AGC GAA GCC-3` amplifiziert und in pUC18 (*SmaI*-geschnitten) ligiert (pUCglnA). Mit diesem Plasmid als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-**TCT AGA** GGT TTC AAA CGC CAC GGT-3` und 5`-**CTC GAG** CCG GAA GAA ATT GTC AAG TTC-3` 3 bp stromabwärts des *glnA*-Startcodons eine *XbaI* und eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Nach Religation des Plasmids (pUCglnAXbaIXhoI) wurde das Plasmid mit *XbaI/XhoI* geschnitten, dephosphoryliert und mit dem mit *XbaI/XhoI*-geschnittenen *lacZ*-Gen (siehe unter pK18amt-lacZ) ligiert (pUCglnA-lacZ). Aus diesem Plasmid wurde das Insert mit der *glnA-lacZ*-Fusion mit *EcoRI/SphI* ausgeschnitten und in mit *EcoRI/SphI*-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18glnA-lacZ).

pK18glnD_{C.d.}:

Über PCR wurde mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** AGC AGA TCA AGA GTC AAC AGG TC-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** GCT ACG AGA TAT TGA GCT GAT CAG-3` ein 0,9 kb-Fragment aus dem *glnD*-Gen von *C. diphtheriae* amplifiziert, mit *EcoRI/XbaI* geschnitten und in *EcoRI/XbaI*-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mob* ligiert (pK18glnD_{C.d.}).

pK18ΔglnD:

Zur Konstruktion von Plasmid pK18ΔglnD wurde ein 0,8 kb Fragment der Region stromaufwärts des *glnD*-Startcodons über PCR mit den Primern **GAA TTC CGT CGC CGG TCT GGT CGC AA-3'** und **5'-GGT ACC TTA AAG GGC TGC TTC GCC-3'** amplifiziert. Über die Primer wurde am 5'-Ende eine *EcoRI*, am 3'-Ende eine *KpnI*-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurde in *SmaI*-geschnittenen pUC18 ligiert (pUCΔglnD1). Aus der Region stromabwärts des *glnD*-Stopcodons wurde ebenfalls ein 0,8 kb Fragment mit den Primern **5'-GGT ACC GGC AAC CGG CTA ACA TGT AGG-3'** und **5'-AAG CTT GGA CAA CAC CGG TGA AGT CG-3'** amplifiziert wobei über die Primer eine *KpnI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle angefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls in *SmaI*-geschnittenen pUC18 ligiert (pUCΔglnD2). Aus pUCΔglnD2 wurde das Insert mit *KpnI* und *HindIII* ausgeschnitten und in *KpnI/HindIII*-geschnittenen und dephosphorylierten pUCΔglnD1 ligiert (pUCΔglnD12). Aus pUCΔglnD12 wurde das Insert mit *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18ΔglnD).

pK18ΔglnE:

Über PCR wurde ein 4,5 kb-Fragment, das das *glnE*-Gen und seine flankierenden Regionen enthielt, mit den Primern **5'-TGC CCA CTG ACA ACG GCG GAT-3'** und **5'-TCC TCT GCA CAT GCA CGA GCT-3'** amplifiziert, mit *EcoRI/BamHI* geschnitten und das resultierende 3,5 kb-Fragment in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen und dephosphorylierten pUC19 ligiert (pUCglnE). Mit diesem Plasmid als "Template" wurde über PCR mit den Primern **5'-TGG GTC TCT GAC AAA GCC AAC GA-3'** und **5'-ATG CGG TCG AGG CTT GCG A-3'** eine 2,3 kb Deletion in *glnE* eingeführt. Das PCR-Produkt wurde religiert (pUCΔglnE) und aus diesem Plasmid das Insert mit der Deletion durch Restriktion mit *EcoRI/BamHI* ausgeschnitten und in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18ΔglnE).

pK18ΔglnK:

Zur Konstruktion von pK18ΔglnK wurde ein 0,7 kb-Fragment aus der Region stromaufwärts des *glnK*-Startcodons über PCR mit den Primern 5`-**GGT ACC** CGT TGT TCA CAT TTC GGC GG-3' und 5`-**GGA TCC** CAT TGC GAA TAA TGT CAG AG-3' amplifiziert. Über die Primer wurde am 5`-Ende eine *KpnI* und am 3`-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurde in *Sma*I-geschnittenen pUC18 ligiert (pUCΔglnK1). Aus der Region stromabwärts des *glnK*-Stopcodons wurde ebenfalls ein 0,7 kb Fragment über PCR mit den Primern 5`-**GGA TCC** AAC TTA TGA ATA ATC CAG CC-3' und 5`-**TCT AGA** AAA CCT GTG CGA CGT GG-3' amplifiziert, wobei am 5`-Ende eine *Bam*HI- und am 3`-Ende eine *Xba*I-Schnittstelle angefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls in *Sma*I-geschnittenen pUC18 ligiert (pUCΔglnK2). Aus pUCΔglnK2 wurde das Insert mit *Bam*HI/*Xba*I ausgeschnitten und in *Bam*HI/*Xba*I-geschnittenen pUCΔglnK1 ligiert (pUCΔglnK12). Aus pUCΔglnK12 wurde das Insert mit *Kpn*I und *Xba*I ausgeschnitten und in *Kpn*I/*Xba*I-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18ΔglnK).

pK18gltB-lacZ:

Über PCR wurde mit den Primern 5`-**GGA TCC** CCG GAA TCG TCT TTC AGG ATC-3` und 5`-**GCA TGC** AGC AAT GGC CGA CTC CAG GC-3` ein 1 kb Fragment das 500 bp stromauf- und abwärts des *gltB*-Startcodons umfasste, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in *Sma*I-geschnittenen pUC18 ligiert (pUCgltB). Mit diesem Plasmid als "template" wurde über PCR 6 bp stromabwärts des *gltB*-Startcodons eine *Xba*I- und eine *Xho*I-Schnittstelle über die Primer 5`-**TCT AGA** TGG TTT CAT GCG GGA TAC CTC-3` und 5`-**CTC GAG** CAA GGA CTC TAC AAC CCT GC-3` eingeführt. Nach Religation des Plasmids (pUCgltBXbaIXhoI) wurde das Plasmid mit *Xba*I/*Xho*I geschnitten, dephosphoryliert und mit dem mit *Xba*I/*Xho*I-geschnittenen *lacZ*-Gen (siehe unter pK18amt-lacZ) ligiert. Aus dem so konstruierten Plasmid pUCgltB-lacZ wurde die *gltB-lacZ*-Fusion mit *Eco*RI/*Sph*I ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Sph*I-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mobsacB* ligiert (pK18gltB-lacZ).

pK18ureC:

Mit den Primern 5`-AAC CTG CTC AGC CAG CG-3` und 5`-CAC GTG CAC TTC TTG GG-3` wurde über PCR ein 0,3 kb-Fragment aus *ureC* amplifiziert und in *Sma*I-geschnittenen pUC18 kloniert (pUCureC). Aus diesem Plasmid wurde das *ureC*-Fragment mit *Eco*RI/*Bam*HI ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mob* ligiert (pK18ureC).

pK18ureD:

Mit den Primern 5`-CAC ACT ACT TGG ATG ATT CC-3` und 5`-CTC AGT GCG GTT GCT CAG-3` wurde über PCR ein 0,5 kb-Fragment aus *ureD* amplifiziert und in pUC18 kloniert (pUCureD). Aus diesem Plasmid wurde das *ureD*-Fragment mit *Eco*RI/*Bam*HI ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pK18*mob* ligiert (pK18ureD).

pSP73glnD_{C.d.}:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **TCT AGA** GCT ACG AGA TAT TGA GCT GAT CAG-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** AGC AGA TCA AGA GTC AAC AGG TC-3` wurde über PCR ein 0,9 kb-Fragment aus *glnD* von *C. diphtheriae* amplifiziert, mit *Eco*RI/*Xba*I geschnitten und in *Eco*RI/*Xba*I-geschnittenen und dephosphorylierten pSP73-Vektor kloniert (pSP73glnD_{C.d.}). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pZamtB-glnK-glnD:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** AGG CAC TCC TTG AAC TCA TG-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** GAT GAC GGT CGG TGG GTT TTT GGC-3` wurde das gesamte *amtB-glnK-glnD*-Operon über PCR amplifiziert, mit *Eco*RI/*Bam*HI geschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZamtB-glnK-glnD).

pZamtB-glnKY51F-glnD:

Aus pZamtB-glnK-glnD wurde das *amtB-glnK-glnD*-Operon mit *Eco*RI/*Bam*HI ausgeschnitten und in *Eco*RI/*Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pMJ1-Vektor ligiert (pMJ1amtB-glnK-glnD). Aus diesem Plasmid wurde durch Restriktion mit *Xho*I/*Bsa*I ein 170 bp-Fragment aus *glnK* entfernt und das Restplasmid

dephosphoryliert. Ebenfalls mit *XhoI/BsaI* wurde aus dem Plasmid pUCglnKY51F ein 170 bp-Fragment aus *glnK* das die Mutation Y51F enthielt, ausgeschnitten und mit dem mit *XhoI/BsaI*-geschnittenen und dephosphorylierten pMJ1amtB-glnKglnD ligiert (pMJ1amtB-glnKY51F-glnD). Aus diesem Plasmid wurde das *amtB-glnKY51F-glnD*-Operon durch Partialverdau mit *EcoRI/BamHI* ausgeschnitten und in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZamtB-glnKY51F-glnD).

pZglnA:

Mit den Primern 5`-**GAA TTC** GTG GCG TTT GAA ACC CCG GA-3` und 5`-**CTC GAG** TTA GCA GTC GAA GTA CAA TTC G-3` wurde das komplette *glnA*-Gen über PCR amplifiziert und in *SmaI*-geschnittenen und dephosphorylierten pUC19-Vektor ligiert (pUCglnA). Aus diesem Plasmid wurde das *glnA*-Gen durch Partialverdau mit *EcoRI/XhoI* isoliert und in *EcoRI/SalI*-geschnittenen, dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZglnA).

pZglnA2:

Mit den Primern 5`-**GAA TTC** GTG GCA AAT GCG CCA GTC GA-3` und 5`-**CTC GAG** CTA GTA ATC AAG ATT GTT TCG GA-3` wurde das komplette *glnA2*-Gen amplifiziert und in *SmaI*-geschnittenen und dephosphorylierten pUC19-Vektor ligiert (pUCglnA2). Aus diesem Plasmid wurde das *glnA2*-Gen durch Partialverdau mit *EcoRI/XhoI* isoliert und in *EcoRI/SalI*-geschnittenen, dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZglnA2).

pZglnD:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** ATG AAT AAT CCA GCC CAG CTG-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** TCA GCT ACC TGC CAA CGA CCT-3` wurde das komplette *glnD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/BamHI* geschnitten und in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZglnD).

pZglnK:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT GT-3` und 5`-GCG CGC **GTC GAC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3` wurde das komplette *glnK*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/SalI* geschnitten und in *EcoRI/SalI*-geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZglnK).

pZglnKY51F:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT GT-3` und 5`-GCG CGC **GTC GAC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3` wurde das komplette *glnK*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI/SalI* geschnitten und in *EcoRI/SalI*-geschnittenen und dephosphorylierten pUC19-Vektor ligiert (pUC19glnK). Mit diesem Plasmid als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-TGG TGC TGA ATT CGC TGT CGA-3` und 5`-CGG TAC ACC TCG GTG TGG C-3` die Mutation Y51F in *glnK* eingeführt. Das PCR-Produkt wurde religiert (pUCglnKY51F) und das mutierte *glnK*-Gen durch Partialverdau mit *EcoRI/SalI* ausgeschnitten und in *EcoRI/SalI*-geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZglnKY51F).

2. Stammkonstruktionen**Δ268/283:**

Der ATCC 13032-Stamm mit chromosomaler Deletion der AmtR-Bindestelle B1 im *amt*-Promotor wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18Δ268/283 und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit Deletion der Bindestelle B1 im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

Δ304/320:

Der ATCC 13032-Stamm mit chromosomaler Deletion der AmtR-Bindestelle B2 im *amt*-Promotor wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18Δ304/320 und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit Deletion der Bindestelle B2 im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

Amt-lacZ:

Der *amt-lacZ*-Fusionsstamm Amt-lacZ wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18amt-lacZ und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *amt-lacZ*-Fusion im Chromosom wurden durch PCR identifiziert.

ATCCcg2b21Ins:

Der Stamm ATCCcg2b21Ins mit Insertion in ORF *cg2b21_075* wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18cg2b21Ins konstruiert.

GlnA-lacZ:

Der *glnA-lacZ*-Fusionsstamm GlnA-lacZ wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18glnA-lacZ und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *glnA-lacZ*-Fusion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

GltB-lacZ:

Der *gltB-lacZ*-Fusionsstamm GltB-lacZ wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18gltB-lacZ und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *gltB-lacZ*-Fusion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

LN-1.1:

Der *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18 Δ amtB und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *amtB*-Deletion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

LN_{C,d}-AmtR:

Die *amtR*-Insertionsmutante von *C. diphtheriae* LN_{C,d}-AmtR wurde durch Elektroporation von *C. diphtheriae* mit Plasmid pK18amtR_{C,d} konstruiert.

LN-D:

Der *glnD*-Deletionsstamm LN-D wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18 Δ glnD und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *glnD*-Deletion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

LNGLNA2:

Der *glnA2*-Deletionsstamm LNGLNA2 wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18 Δ *glnA2* und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *glnA2*-Deletion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

LN_{C.d.}-GlnD:

Die *glnD*-Insertionsmutante von *C. diphtheriae*, LN_{C.d.}-GlnD, wurde durch Elektroporation von *C. diphtheriae* mit Plasmid pK18*glnD*_{C.d.} konstruiert.

LNGLNE:

Der *glnE*-Deletionsstamm LNGLNE wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18 Δ *glnE* und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *glnE*-Deletion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

NR-1:

Der *glnK*-Deletionsstamm NR-1 wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18 Δ *glnK* und nachfolgende Selektion auf Rekombinanten nach den Methoden von Schäfer et al. (1994) konstruiert. Klone mit *glnK*-Deletion im Chromosom wurden über PCR identifiziert.

UR4:

Die *ureC*-Insertionsmutante UR4 wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18*ureC* konstruiert.

UR-GB:

Die *ureD*-Insertionsmutante UR-GB wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pK18*ureD* konstruiert.

Lebenslauf

- 20.07.1974 geboren in Bonn
- August 1981-Juli 1985 Besuch der Grundschule in Bad-Münstereifel-Houwerath
- August 1985-Mai 1994 Besuch des Vinzenz-Pallotti-Gymnasiums in Rheinbach bei Bonn
- Oktober 1994-April 1999 Chemiestudium in Bonn und Köln. Abschluß mit dem akademischen Grad "Diplom-Chemiker"
- November 1998-April 1999 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer.
Thema: "Funktion und Regulation von Aufnahmesystemen für stickstoffhaltige Substrate bei *Corynebacterium glutamicum*"
- Mai 1999-November 2001 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer.
Thema: "Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*"

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Beckers, G., Nolden, L. & Burkovski, A. (2001). Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology*, **147**, 2961-2170.

Jakoby, M., Nolden, L., Meier-Wagner, J., Krämer, R. & Burkovski, A. (2000). AmtR, a global repressor in the nitrogen control system of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **37**, 964-977.

Meier-Wagner, J., Nolden, L., Jakoby, M., Siewe, R.M., Krämer, R. & Burkovski, A. (2001). Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: Role of Amt and AmtB. *Microbiology* **147**, 135-143.

Nolden, L., Beckers, G., Möckel, B., Pfefferle, W., Nampoothiri, K.M., Krämer, R. & Burkovski, A. (2000). Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organisation of corresponding genes and investigation of activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 305-310.

Nolden, L., Ngouoto-Nkili, C.E., Bendt, A. K., Krämer, R. & Burkovski, A. (2001). Sensing of nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: The role of *glnK* and *glnD*. Mol. Microbiol., im Druck.

Nolden, L., Farwick, M., Krämer, R. & Burkovski, A. (2001). Glutamine synthetases in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. FEMS Microbiol. Lett. **201**, 91-98.

Nolden, L., Beckers, G. & Burkovski, A. (2001). Nitrogen assimilation in *Corynebacterium diphtheriae*: pathways and regulatory cascades. FEMS Microbiol. Lett., eingereicht.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Datum: 25.09.2001

Unterschrift: Lars Nolden

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer möchte ich mich herzlich für das interessante Arbeitsthema und die freundliche Unterstützung während der Arbeit bedanken und dafür, dass er immer Zeit für eine Diskussion hatte.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Andreas Burkovski für die ausgezeichnete und engagierte Betreuung während der Arbeit, dafür, dass er bei irgendwelchen Problemen immer Zeit für Diskussionen hatte und nicht zuletzt für unzählige Ratschläge und Tipps, bedanken.

Meinen lieben Kollegen aus der Stickstoff-Gruppe, Anne, Carole, Daniela, Frank, Gabi, Gregor, Jana, Pilar und Suna, sowie allen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe danke ich sehr für das gute Arbeitsklima, das viel dazu beigetragen hat, dass mir die Arbeit Spaß gemacht hat, sowie für die stete Hilfsbereitschaft.

Zum Schluß möchte ich mich auch sehr bei meinen Eltern für die Unterstützung während dieser Arbeit bedanken und dafür, dass sie mir letztendlich das Studium ermöglicht haben.