

**GlnK-abhängige Signaltransduktion  
in *Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Julia Strösser**

aus Köln

**Köln, Oktober 2005**

**Berichterstatter:**

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Andreas Burkovski

Tag der Disputation: 08.12.2005



---

## **GlnK dependent signal transduction in *Corynebacterium glutamicum***

*Corynebacterium glutamicum* is a Gram-positive soil bacterium belonging phylogenetically to the group of mycolic acid-containing actinomycetes. Since its isolation as a L-glutamate-producing bacterium *C. glutamicum* is widely used in biotechnology for the production of amino acids, nucleotides and vitamins. An essential step in the production of amino acids and in the bacterial growth in general, is the assimilation of nitrogen. Depending on the amount and kind of the available nitrogen source certain enzymes and transport systems are synthesized respectively activated. To avoid the 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 study, the characterization of the GlnK dependent signal transduction in *C. glutamicum* was analyzed. First the central role of the P<sub>II</sub>-type protein GlnK in nitrogen regulation was investigated. Secondly the GlnK dependent signal transduction was characterized to understand the sensing mechanism in detail. The trimeric GlnK is adenylylated in response to nitrogen starvation. This process depends on the GlnD protein. In the modified form GlnK interacts with the global repressor of the nitrogen control AmtR. Consequently the expression of nitrogen regulated genes is induced. An improvement of the nitrogen status of the cell leads to deadenylylation of the protein through GlnD. While GlnK is present in the cytoplasm during nitrogen starvation, the protein is sequestered to the cytoplasmic membrane in response to an ammonium pulse. The binding of GlnK to the cytoplasmic membrane depends on the ammonium transport system AmtB, which is encoded in the same transcriptional unit as GlnK and GlnD, the *amtB-glnK-glnD* operon. The membrane-bound GlnK protein is stable, most likely to inactivate AmtB-dependent ammonium transport, while the majority of GlnK is degraded. Proteolysis in the transition period from nitrogen starvation to nitrogen-rich growth seems to be specific for GlnK. The proteolysis of GlnK is affected by three different proteases namely FtsH, the ClpCP and the ClpXP protease complex. The question how the primary sensor protein perceives the nitrogen status of the cell and transfers this signal to GlnD is still unknown. The investigation of the sensing mechanism indicates that in contrast to the situation in Enterobacteria ammonium instead of L-glutamine is a marker for the cellular nitrogen status. Additionally in this organism a GlnK independent signal pathway was shown in which the ATase discerns the nitrogen status and regulates the activity of the glutamine synthetase through adenylylation.

---

## **GlnK-abhängige Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum***

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* gehört phylogenetisch zu den Mycolsäure haltigen Actinomyceten und hat seit seiner Entdeckung in den fünfziger Jahren als natürlicher Glutamatproduzent eine große biotechnologische Bedeutung erlangt. Neben L-Glutamat und L-Lysin wird *C. glutamicum* zunehmend für fermentative Produktionsprozesse anderer Aminosäuren sowie für die Herstellung von Nukleotiden und Vitaminen genutzt. Stickstoff ist für *C. glutamicum* zur Biosynthese aller Aminosäuren von essenzieller Bedeutung. Um eine unnötige Verschwendung von Energie und Nährstoffreserven zu vermeiden, besitzt dieser Organismus Regulationsmechanismen, die die Aufnahme und Assimilation von Stickstoff unter verschiedenen Bedingungen sowohl auf der Aktivitätsebene als auch auf der Genexpressionsebene kontrollieren. Diese werden mit dem Begriff "Stickstoffkontrolle" bezeichnet.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der GlnK-abhängigen Signaltransduktion in *C. glutamicum*. Zum Einen wurde die zentrale Stellung des P<sub>II</sub>-Signaltransduktionsproteins GlnK innerhalb der Stickstoffregulation untersucht und bestätigt. Zum Anderen konnte die GlnK-abhängige Signaltransduktion im Hinblick auf die Signalaufnahme und Signalweiterleitung charakterisiert werden. So ließ sich zeigen, dass das GlnK-Protein in *C. glutamicum* als Trimer aktiv ist und als Antwort auf Stickstoffmangel von GlnD an allen drei Untereinheiten adenyliert wird. In der modifizierten Form interagiert GlnK mit dem globalen Repressor der Stickstoffkontrolle AmtR. Infolgedessen wird die Expression stickstoffregulierter Gene induziert. Verbessert sich die Stickstoffversorgung der Zelle, wird GlnK von GlnD demodifiziert und interagiert mit dem Ammoniumtransporter AmtB. Eine Verschiebung der Lokalisation von GlnK - vom Cytoplasma zur Membran - hat außerdem den Abbau des Proteins zur Folge, der von den Clp-Protease-Komplexen ClpCP und ClpXP sowie von der membranständigen Protease FtsH beeinflusst wird. Die Ergebnisse aus Experimenten zur Signalaufnahme und -weiterleitung lassen vermuten, dass der Marker des Stickstoffstatus nicht Glutamin sondern Ammonium ist. Die Frage, wie *C. glutamicum* den Stickstoffgehalt des Mediums wahrnimmt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Neben einer GlnK-abhängigen Signaltransduktion scheint es in *C. glutamicum* zusätzlich einen von GlnK unabhängigen Signalweg zu geben, in dem die ATase den Stickstoffstatus der Zelle wahrnimmt und die Glutaminsynthetase dementsprechend aktiviert bzw. deaktiviert.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> und die Stickstoffassimilation.....	1
1.2	Die Stickstoffregulation in Enterobakterien.....	4
1.3	Die Stickstoffkontrolle in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	8
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	13
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	14
2.1	Bakterienstämme und Plasmide .....	14
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	20
2.2.1	Nährmedien für <i>E. coli</i> .....	20
2.2.2	Nährmedien für <i>C. glutamicum</i> .....	20
2.2.3	Antibiotika .....	21
2.2.4	Kultivierungsbedingungen .....	21
2.3	Biochemische Techniken.....	22
2.3.1	Herstellung der Zellextrakt-, der Cytoplasma- und der Membranfraktion .....	22
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Amido Black Methode.....	23
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry .....	24
2.3.4	Nachweis der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand .....	24
2.3.5	Eindimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1-D-SDS-PAGE)....	25
2.3.6	Eindimensionale-native-Polyacrylamidgelelektrophorese (1-D-Nativ-PAGE).26	
2.3.7	Zweidimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D-PAGE) .....	26
2.3.8	Färbung mit Coomassie <i>Brilliant Blue</i> .....	27
2.3.9	Silberfärbung .....	28
2.3.10	Western Blot .....	28
2.3.11	Protein-Reinigung und Interaktionsstudien.....	30
2.3.11.1	Gewinnung des Fusionsproteins AmtR-MBP .....	30
2.3.11.2	Bestimmung der Amylase-Aktivität.....	31
2.3.11.3	Gewinnung der Fusionsproteine AmtR-HIS und GlnD-HIS .....	31
2.3.11.4	<i>Pull-Down</i> Experimente mit <i>C. glutamicum</i> -Zellextrakt .....	33
2.3.11.5	Isolierung des GlnK-Proteins mit <i>Magnetic Beads</i> .....	34
2.3.12	MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	34
2.3.13	Bestimmung der physiologischen Glutaminsynthetase-Aktivität.....	35
2.3.14	Bestimmung der unphysiologischen Glutaminsynthetase-Aktivität.....	36
2.4	Molekularbiologische Techniken.....	38
2.4.1	DNA-Techniken .....	38
2.4.1.1	Plasmid-Präparationen aus <i>E. coli</i> .....	38

2.4.1.2	Präparation chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i> .....	38
2.4.1.3	Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	38
2.4.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	39
2.4.1.5	Restriktion von DNA .....	39
2.4.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	39
2.4.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	40
2.4.1.8	Ortsgerichtete Mutagenese .....	42
2.4.1.9	Gelretardationsexperimente .....	43
2.4.1.10	Interaktionsstudien mit dem <i>Two-Hybrid</i> System .....	45
2.4.1.11	DNA-Sequenzierung.....	46
2.4.2	RNA-Techniken .....	47
2.4.2.1	Präparation von Gesamt-RNA und RNA-Gelelektrophorese.....	47
2.4.2.2	RNA-Hybridisierungen.....	48
2.4.2.3	Northern Blot Analysen.....	49
2.4.2.4	Wasch- und Detektionsschritte, RNA-Hybridisierungen und Northern Blot Analysen.....	50
2.4.2.5	Präparation von RNA-Sonden durch <i>in-vitro</i> -Transkription .....	51
2.4.2.6	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.....	52
2.4.2.7	RNase-freier DNase-Verdau .....	54
2.5	Techniken zur Manipulation von Zellen .....	54
2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	54
2.5.2	Herstellung kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	55
2.5.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	55
2.5.4	TSS-Transformation von <i>E. coli</i> BL21-Zellen.....	56
2.5.5	Elektroporation von kompetenten <i>C. glutamicum</i> -Zellen .....	56
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
3.1	Charakterisierung des GlnK-Proteins .....	57
3.1.1	Modifikation und Demodifikation von GlnK .....	57
3.1.2	Bifunktionelle Aktivität von GlnD .....	60
3.1.3	Trimerisierung des GlnK-Proteins.....	62
3.1.4	Lokalisierung von GlnK in der Zelle .....	64
3.1.4.1	Einfluss von AmtA und AmtB auf die Lokalisierung von GlnK.....	64
3.1.4.2	Charakterisierung der Membranbindung von GlnK .....	68
3.1.5	Expression und Überexpression von <i>amtB</i> , <i>glnK</i> und <i>glnD</i> .....	71
3.1.5.1	Expression des <i>amtB-glnK-glnD</i> -Operons.....	71
3.1.5.2	Überexpression von <i>amtB</i> , <i>glnK</i> und <i>glnD</i> .....	72
3.2	Proteolyse von GlnK nach einem Stickstoffpuls .....	79

3.2.1	Proteolyse als allgemeines Phänomen nach einem Stickstoffpuls .....	79
3.2.2	Einfluss von Clp und FtsH auf den GlnK-Abbau .....	80
3.2.3	Stickstoffkontrolle in den Protease-Mutanten und Expression der Protease-Gene im Wildtyp .....	84
3.2.4	GlnK-Isolierung aus den Protease-Deletionsmutanten .....	86
3.2.5	Lokalisierung von ClpP in der Zelle .....	87
3.3	Interaktionsstudien zu Proteinen der Stickstoffkontrolle .....	89
3.3.1	Untersuchungen von Interaktionen des Repressors AmtR mit anderen Proteinen .....	89
3.3.1.1	<i>Pull-Down</i> Experimente mit AmtR .....	89
3.3.1.2	Gelretardationsexperimente zum Nachweis des Repressor-DNA- Komplexes .....	95
3.3.2	Identifizierung von Interaktionspartnern des GlnD-Proteins .....	98
3.3.3	<i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien .....	102
3.4	Ortsgerichtete Mutagenese des <i>glnK</i> -Gens .....	103
3.5	Signalaufnahme und Signalweiterleitung .....	108
3.5.1	Sensoreigenschaften der Ammoniumtransporter AmtA und AmtB .....	108
3.5.1.1	Einfluss von AmtA und AmtB auf die De-/Adenylylierung von GlnK .....	108
3.5.1.2	Expressionsregulation unter Ammoniumlimitierung .....	110
3.5.2	Regulation der Stickstoffkontrolle bei Gabe verschiedener Stickstoffquellen .....	112
3.5.2.1	Wachstum auf unterschiedlichen Stickstoffquellen .....	113
3.5.2.2	Einfluss alternativer Stickstoffquellen auf die Expressionsregulation .....	114
3.5.2.3	GlnK-Modifikation nach Kultivierung unter verschiedenen Stickstoffquellen .....	116
3.5.3	Analyse der Mutanten LNGLNA2, LN $\Delta$ GLTBD, LN $\Delta$ GDH, LN $\Delta$ GS und LNGLNE .....	118
3.5.4	Regulation der Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) .....	121
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>124</b>
4.1	Charakterisierung des GlnK-Proteins .....	124
4.2	Expressionsregulation durch AmtR .....	129
4.3	Ortsgerichtete Mutagenese des <i>glnK</i> -Gens .....	131
4.4	Sensoreigenschaften von Amt-Proteinen .....	133
4.5	Einfluss möglicher Metabolite auf die Stickstoffkontrolle .....	134
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>138</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>139</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>151</b>

### Abkürzungen

1-D	Eindimensional
2-D	Zweidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy-1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan-4-yl)phenyl phosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>et al.</i>	”et alii“ (und andere)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight</i> Massenspektrometrie
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
NAD(P)H	Nicotinamidadeninukleotid (-2'-phosphat), reduziert
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PP <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Units

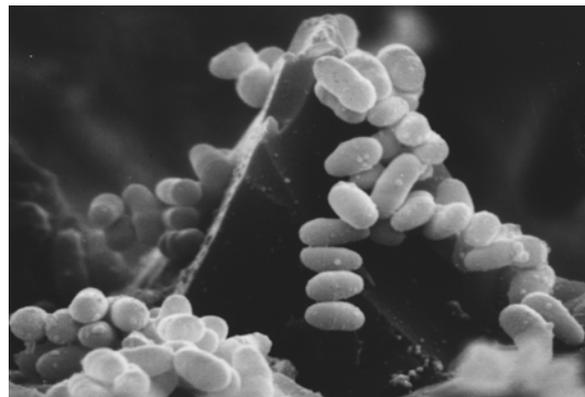
## I. Einleitung

### 1.1 *Corynebacterium glutamicum* und die Stickstoffassimilation

*Corynebacterium glutamicum* ist ein Gram-positives Bodenbakterium, das aufgrund des hohen G+C-Gehalts der DNA phylogenetisch zu den Mycolsäure haltigen Actinomyceten zählt (Stackebrandt *et al.*, 1997). Zu diesen gehören neben den *Nocardien* auch zahlreiche humanpathogene Vertreter wie z.B. *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Corynebacterium diphtheriae* (Pascual *et al.*, 1995). Namensgebend für die Gattung *Corynebacterium* ist deren keulenförmige (*“coryneforme“*) Gestalt. Es bildet unregelmäßige, nicht sporulierende, aerob wachsende Stäbchen von der Größe 0,7-1,0 µm x 1,0-3,0 µm aus (Abb. 1.1). Der für *C. glutamicum* typische Schnappmechanismus während der Zellteilung führt zur charakteristischen Ausbildung einer V-Form, wobei die Zellen vor der eigentlichen Teilung noch seitlich miteinander verbunden bleiben. Das Biotin-auxotrophe Bakterium *C. glutamicum* wurde 1957 aus einer

Bodenprobe im Zoo von Tokio in Japan als natürlicher Glutamatproduzent isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957; Abe *et al.*, 1967). Durch gezielte Stammoptimierung werden jährlich über eine Million Tonnen L-Glutamat und 550.000 Tonnen L-Lysin produziert (Gutmann *et al.*, 1992; Onishi *et al.*, 2002; Hermann, 2003). L-Glutamat wird in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt, während L-Lysin als Futtermittelzusatz benötigt wird und in der pharmazeutischen Industrie Verwendung findet. Außerdem

werden mit *C. glutamicum* andere industriell bedeutsame Verbindungen wie die Aminosäuren L-Alanin, L-Isoleucin und L-Prolin sowie einige Vitamine und Nukleotide fermentativ hergestellt (Leuchtenberger, 1996; Hermann, 2003). Aufgrund seiner biotechnologischen Bedeutung, Apathogenität, guten genetischen Zugänglichkeit und der bereits ausführlichen Charakterisierung des Zentralstoffwechsels ist *C. glutamicum* als Modellorganismus für Mycolsäure haltige Actinomyceten sehr gut geeignet. Die wachsende wirtschaftliche Bedeutung von *C. glutamicum* führte in den letzten Jahrzehnten zur intensiven Analyse des Kohlenstoff- und Aminosäure-Metabolismus. Viele der beteiligten Enzyme konnten bereits biochemisch charakterisiert werden. Erste weiterführende Arbeiten



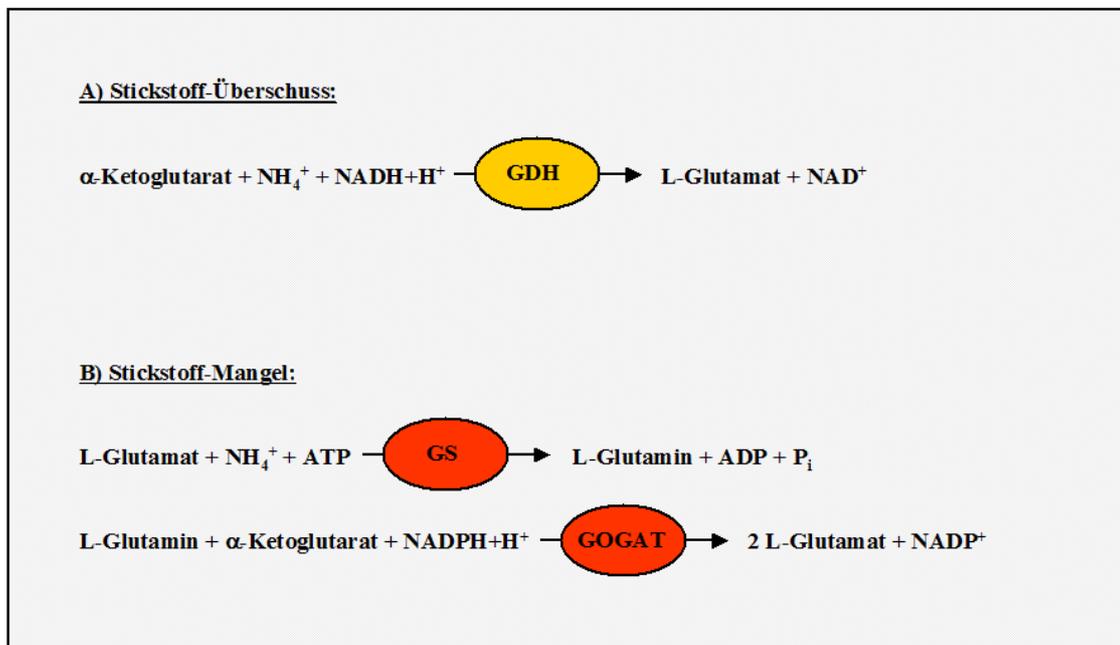
**Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum*-Zellen.** Die namensgebende keulenförmige Morphologie und die Ausbildung einer V-Form während der Zellteilung sind erkennbar (Quelle: Forschungszentrum Jülich).

zum Verständnis von Stoffwechselwegen begannen trotz der frühen Entdeckung jedoch erst Anfang der 1990er Jahre (Wohlleben *et al.*, 1993). Seitdem trägt die intensiv betriebene Erforschung der Metabolitenflüsse (Fluxom) zu einem immer genaueren Verständnis interagierender Stoffwechselwege bei (siehe bspw. Dominguez *et al.*, 1998; Tesch *et al.*, 1999; Kiefer *et al.*, 2004; Krömer *et al.*, 2004). In mehreren unabhängigen, industriell finanzierten Sequenzierungsprojekten gelang die vollständige Aufklärung der Genomsequenz von *C. glutamicum*. Durch ihre Veröffentlichung ([www.gib.genes.nig.ac.jp](http://www.gib.genes.nig.ac.jp) oder [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ist die Anwendung systematischer, global angelegter Techniken zur umfassenden Analyse von Transkriptom, Proteom und Metabolom wesentlich erleichtert worden.

Für das Wachstum und die Biosynthese von Aminosäuren und Nukleotiden etc. ist der Organismus auf eine ausreichende Aufnahme und Assimilation von Stickstoffverbindungen angewiesen. *C. glutamicum* kann eine Vielzahl von Stickstoffquellen nutzen, darunter Ammonium, Creatinin, Glutamat, Glutamin und Harnstoff. Diese Verbindungen liegen im Boden, dem natürlichen Habitat, durch Zersetzungsprozesse von tierischem und pflanzlichem Material vor. Wie Ammoniak kann auch Harnstoff ohne Beteiligung von speziellen Transportproteinen über die Membran diffundieren. Bei niedrigen Konzentrationen werden sie hingegen, wie Creatinin, Glutamat und Glutamin, über spezifische Transportsysteme aufgenommen. Je nach verfügbarer Stickstoffquelle werden die benötigten Transportsysteme und die für die nachfolgende Assimilation notwendigen Enzyme synthetisiert und/oder aktiviert.

Im Allgemeinen wird Ammonium von Bakterien bevorzugt aufgenommen und assimiliert (Merrick & Edwards, 1995a; Kleiner, 2000). Hierfür stehen den Bakterien zwei Wege zur Verfügung, deren Hauptkomponenten bereits früh biochemisch charakterisiert werden konnten (Tochikura *et al.*, 1984). Einerseits wird Ammonium bei hohen Konzentrationen in Form von Ammoniak, das mit Ammonium im Gleichgewicht steht, passiv über Diffusion in die Zelle aufgenommen und dort über oxidative Aminierung durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) unter Verbrauch von einem Reduktionsäquivalent  $\text{NADH} + \text{H}^+$  assimiliert (Abb. 1.2, Reaktion A, nach Tesch *et al.*, 1999). Es entsteht L-Glutamat, das weiterverwertet wird. Andererseits kann bei niedriger Ammoniumkonzentration nicht mehr ausreichend Ammoniak über die Zellmembran diffundieren. Ammonium wird abhängig vom Membranpotenzial aufgenommen, indem die beiden Aufnahmesysteme AmtA und AmtB synthetisiert bzw. aktiviert werden (Siewe *et al.*, 1996; Jakoby *et al.*, 1999; Meier-Wagner *et al.*, 2001). Unter diesen Bedingungen kann die niedrig-affine GDH ( $K_m \sim 1 \text{ mM}$ ) jedoch nicht genügend Ammonium zu L-Glutamat umsetzen. Alternativ wird Ammonium in einem zweiten anabolischen Weg durch die Glutaminsynthetase (GS) assimiliert. Bei guter Stickstoffversorgung unterliegt die GS einer Aktivitätsregulation durch posttranslationale Adenyly-

lierung eines spezifischen Tyrosylrests (Tyrosin 405) und übernimmt nur rund ein Drittel der Ammoniumassimilation (Tesch *et al.*, 1999). Ein Austausch des Aminosäurerests Tyrosin gegen ein Phenylalanin führt zu einem Verlust der Aktivitätsregulation (Jakoby *et al.*, 1999). Für die Regulation ist das bifunktionelle Enzym Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym (ATase) verantwortlich, indem es die GS bei hohen Ammoniumkonzentrationen adenylyliert und inaktiviert und bei niedrigen Konzentrationen deadenylyliert und aktiviert (Jakoby *et al.*, 1997). Die aktive GS besitzt eine hohe Substratsaffinität ( $K_m \sim 200 \mu\text{M}$ ) und überträgt Ammonium unter ATP-Verbrauch auf L-Glutamat, wobei L-Glutamin entsteht. L-Glutamin und  $\alpha$ -Ketoglutarat werden weiter mit der Glutamatsynthase (GOGAT), die sich aus der großen Untereinheit GltB und der kleinen Untereinheit GltD zusammensetzt, unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  zu L-Glutamat umgewandelt (Abb. 1.2, Reaktion B).

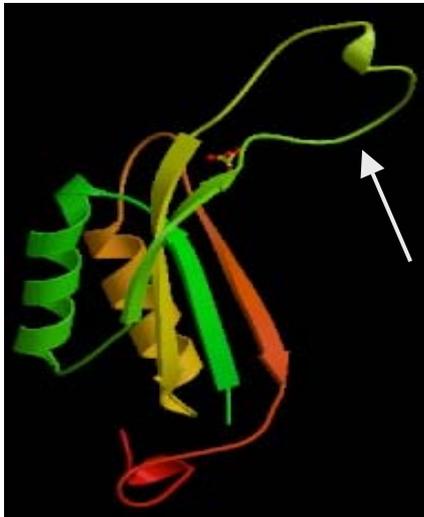


**Abb. 1.2: Stickstoffassimilation in *C. glutamicum*.** Unter guter Stickstoffversorgung wird Ammonium über die Glutamatdehydrogenase (GDH) assimiliert, während die Assimilation bei Stickstoffmangel für die Zelle energieaufwändig ist und von den Enzymen Glutaminsynthetase (GS) und Glutamatsynthase (GOGAT) katalysiert wird (nach Tesch *et al.*, 1999).

Der Weg über das GS/GOGAT-System ist für die Zelle eine energieaufwändige Reaktion, die pro Mol Ammonium ein Mol ATP verbraucht. Zusätzlich kann aufgenommenes Ammonium in Form von Ammoniak durch Rückdiffusion über die Zellmembran wieder verloren gehen. Dieser Vorgang stellt einen "futile cycle" dar, weil er zu einem Abbau des Protonenpotenzials über der Membran führt. Eine strikte Regulation der Ammoniumaufnahme und Ammoniumfixierung ist somit ein zentraler Anpassungsmechanismus an das sich ändernde Stickstoffangebot des Lebensraums und stellt einen Selektionsvorteil dar.

## 1.2 Die Stickstoffregulation in Enterobakterien

Die Regulation der Aufnahme und Assimilation von Ammonium in den Gram-negativen Enterobakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Klebsiella pneumoniae* gilt als das Paradigma der "Stickstoffkontrolle" (Überblick, Merrick & Edwards, 1995a). In diesen Organismen existiert ein globales Stickstoffregulationssystem (NtrB/NtrC, von **Nitrogen regulatory system**). Der Sensor, der das Signal wahrnimmt und weiterleitet, ist die Uridylyltransferase/deuridylylierendes Enzym (UTase/UR, kodiert von *glnD*). Die Aktivität dieses bifunktionellen Enzyms ändert sich je nach der in der Zelle vorhandenen Menge an L-Glutamin. Bei guter Stickstoffversorgung, das heißt bei einer hohen Konzentration von L-Glutamin wird die uridylylierende Aktivität des Enzyms inhibiert und die deuridylylierende Aktivität induziert (Abb. 1.4, nach Javelle *et al.*, 2004; Ninfa & Jiang, 2005). Bei Stickstoffmangel staut



**Abb. 1.3: Tertiärstruktur des P<sub>II</sub>-Proteins GlnK aus *E. coli*.** Jedes Monomer besitzt einen T-Loop (durch einen Pfeil markiert) mit dem spezifischen Tyrosylrest (Tyrosin 51), der von der UTase modifiziert werden kann (nach Arcondéguy *et al.*, 2001).

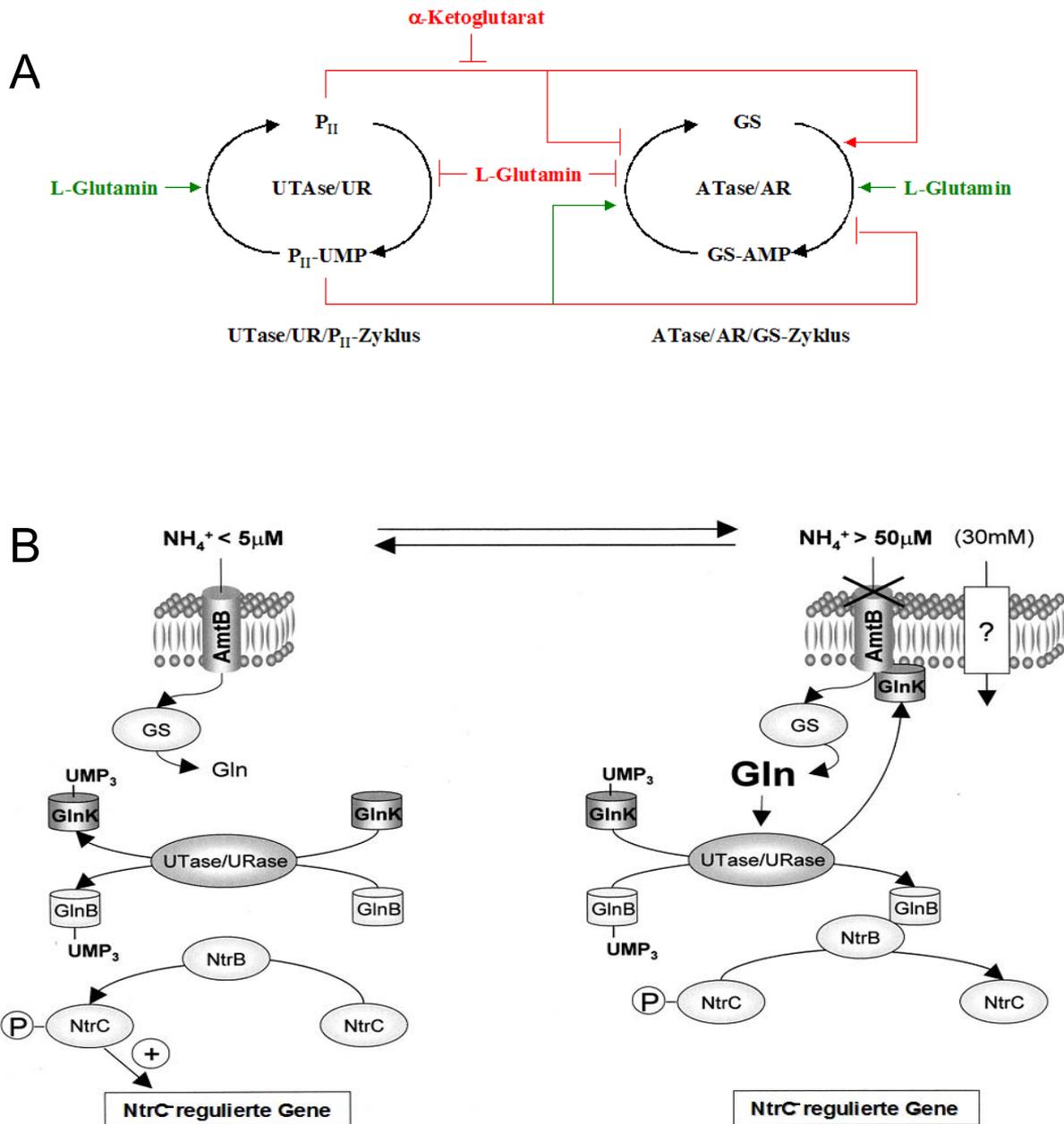
sich das Substrat  $\alpha$ -Ketoglutarat in der Zelle an, da die Affinität der Glutamatdehydrogenase (GDH, kodiert von *gdh*) nicht ausreicht, um die geringen Ammoniummengen zu Glutamat umzusetzen.  $\alpha$ -Ketoglutarat bindet an das als Trimer aktive Signaltransduktionsprotein P<sub>II</sub>, wodurch sich dessen Konformation ändert. Jede monomere Untereinheit des P<sub>II</sub>-Proteins ist 12 kDa groß und kann ein Molekül  $\alpha$ -Ketoglutarat sowie ein ATP binden. Die Bindung dieser beiden Effektormoleküle ist synergistisch und ermöglicht eine Interaktion des P<sub>II</sub>-Proteins mit der UTase. Das Enzym uridylyliert jede Untereinheit an einem spezifischen Tyrosylrest (Tyrosin 51), so dass ein P<sub>II</sub>-Protein drei UMP-Reste binden kann (Jiang *et al.*, 1998a; Ninfa & Atkinson, 2000). Die trimere Struktur von P<sub>II</sub>-Proteinen ist hochkonserviert. Jedes Monomer besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices und sechs  $\beta$ -Faltblättern, durch deren

Anordnung zueinander sich drei charakteristische Loop-Strukturen ausbilden (Abb. 1.3). Der B-Loop (Aminosäure 82-88) ist vermutlich die Bindestelle der Effektormoleküle  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP, der T-Loop (Aminosäure 37-55) bindet unterschiedliche Interaktionspartner des Proteins und der C-Loop (Aminosäure 101-105) sorgt für die Stabilisierung der gebundenen Effektormoleküle und Interaktionspartner. Durch die hohe Beweglichkeit des T-Loops ist dieser in der Lage, unterschiedliche Konformationen anzunehmen, um so verschiedene Interaktionspartner binden zu können. An der Konformationsänderung des T-Loops sind maßgeblich die beiden Effektormoleküle  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP beteiligt (Kamberov *et al.*, 1995).

P<sub>II</sub>-Proteine aktivieren andere Proteine, indem sie die Modulation der Aktivität und der Expression vieler Komponenten des Stickstoffmetabolismus durch Interaktionen steuern, eine Regulationsreaktion, die auch in Pflanzen gezeigt werden konnte (Hsieh *et al.*, 1998; Arcondéguy *et al.*, 2001). Eine Regulation des Stickstoffmetabolismus in *E. coli* erfolgt, indem die Aktivität der Glutaminsynthetase, die Expression des 2-Komponentensystems NtrB/NtrC und die vor kurzem veröffentlichte Interaktion zwischen dem P<sub>II</sub>-Protein GlnK und dem Ammoniumtransporter AmtB in Abhängigkeit des Stickstoffstatus der Zelle moduliert werden (Abb. 1.4, nach Javelle *et al.*, 2004; Ninfa & Jiang, 2005). In *E. coli* gibt es zwei Proteine, GlnK und GlnB (kodiert von *glnK* bzw. *glnB*), die beide zur P<sub>II</sub>-Proteinfamilie gehören. Sie sind homolog in ihrer Primärstruktur und ähneln sich auch in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur (Carr *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998). Als Antwort auf einen Stickstoffmangel werden sie durch Uridylylierung von der UTase reversibel kovalent modifiziert (Jaggi *et al.*, 1996; Atkinson & Ninfa, 1999).

Bei guter Stickstoffversorgung stimuliert die deuridylylierte Form von P<sub>II</sub> die Transferaseaktivität des bifunktionellen Enzyms Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym (ATase/AR, kodiert von *glnE*). Durch die Adenylylierung eines charakteristischen Tyrosylrests (Tyrosin 394) wird die Aktivität der Glutaminsynthetase (GS, kodiert von *glnA*) reduziert. Bei Stickstoffmangel stimuliert die uridylylierte Form von P<sub>II</sub> die deadenylylierende Aktivität der ATase, die die GS demodifiziert, indem sie die AMP-Reste von jedem spezifischen Tyrosylrest aller Untereinheiten der GS abspaltet. Die Aktivität der GS steigt sukzessiv mit der Deadenylylierung ihrer zwölf Untereinheiten an und sorgt schließlich für die Fixierung des aufgenommenen Ammoniums. Die intrazelluläre L-Glutaminkonzentration hat einen direkten Einfluss auf die Aktivität der beiden Enzyme UTase und ATase, während die intrazelluläre  $\alpha$ -Ketoglutaratkonzentration die Konformation und Aktivität des P<sub>II</sub>-Proteins bestimmt.

Die Transkriptionsregulation der Stickstoffkontrolle erfolgt über das 2-Komponentensystem NtrB/NtrC. Dabei ist die Histidin-Proteinkinase NtrB für die Reizerkennung und NtrC für die Auslösung der Antwort verantwortlich. Die Signalweiterleitung zwischen diesen Proteinen erfolgt über De-/Phosphorylierung von Histidyl- und Aspartyl-Resten. Die uridylylierte Form von P<sub>II</sub> stimuliert bei Stickstoffmangel die Phosphorylierung des Antwortregulators NtrC durch die Histidin-Proteinkinase NtrB. Das Aktivatorprotein NtrC bildet einen Komplex mit der RNA-Polymerase und induziert die Expression unter Stickstoffregulation stehender Gene. Bei guter Stickstoffversorgung blockiert die deuridylylierte Form von P<sub>II</sub> die Phosphorylierung von NtrC durch die Histidin-Proteinkinase NtrB und aktiviert stattdessen die Phosphataseaktivität von NtrC. Durch die Dephosphorylierung des Aktivatorproteins NtrC zerfällt der Komplex mit der RNA-Polymerase und die Transkription stickstoffregulierter Gene wird gestoppt (Überblick, Merrick & Edwards, 1995a; Jiang *et al.*, 1998a-c; Reitzer, 2003; Ninfa & Jiang, 2005).



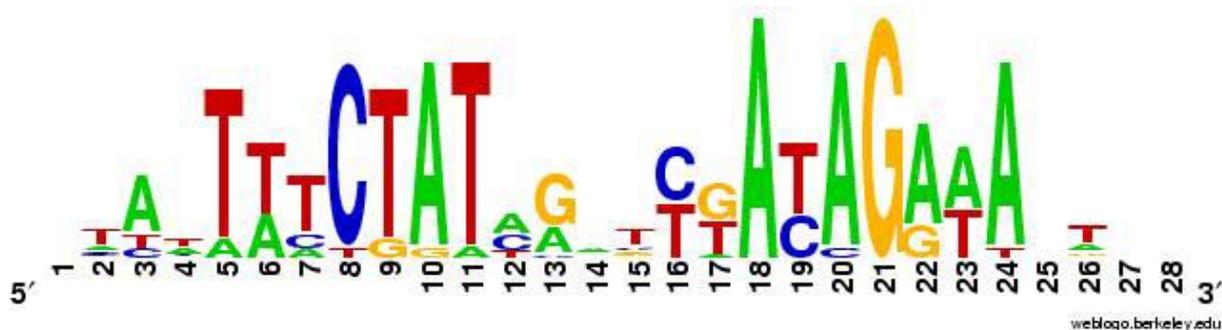
**Abb. 1.4: Modell der Stickstoffregulation in *E. coli*.** **A)** Die Uridylyltransferase/deuridylylierendes Enzym (UTase/UR) katalysiert die Modifikation der  $P_{II}$ -Proteine GlnK und GlnB. Die Aktivitätsregulation der Glutaminsynthetase (GS) läuft über ein  $P_{II}$ -Protein, indem dieses die Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym (ATase/AR) stimuliert, die Modifikation der GS durchzuführen. Die Metabolite  $\alpha$ -Ketoglutarat und L-Glutamin fungieren als Signal für den Stickstoffstatus der Zelle, indem sie den Uridylylierungsstatus des  $P_{II}$ -Proteins und den Adenylylierungsstatus der GS beeinflussen (nach Ninfa & Jiang, 2005). **B)** Bei einer Ammoniumkonzentration unter  $5 \mu M$  liegt GlnK im Cytoplasma in seiner vollständig uridylylierten Form vor und hat nur eine geringe Affinität zu AmtB. Der AmtB-Transporter ist aktiv und transportiert Ammonium aus dem Medium in die Zelle, welches von der GS sofort assimiliert wird. Das zweite  $P_{II}$ -Protein GlnB liegt ebenfalls in seiner modifizierten Form vor und stimuliert die Phosphorylierung des Aktivatorproteins NtrC durch NtrB, was zu einer Expression stickstoffregulierter Gene führt. Bei einer Ammoniumkonzentration über  $50 \mu M$  liegt GlnK im Cytoplasma in seiner trimeren, deuridylylierten Form vor und kann mit AmtB in der Membran interagieren. Diese Bindung reduziert die Aktivität des Transporters und Ammonium wird nicht länger in die Zelle transportiert. Unter diesen Bedingungen stimuliert die demodifizierte Form von GlnB die Phosphatase-Aktivität von NtrB und das unmodifizierte NtrC ist nicht mehr in der Lage, die Expression stickstoffregulierter Gene zu induzieren (nach Javelle *et al.*, 2004).

Neben den bereits beschriebenen Regulationsmechanismen konnte eine stickstoffabhängige Interaktion zwischen dem  $P_{II}$ -Protein GlnK und dem AmtB-Ammoniumtransporter gezeigt werden (Coutts *et al.*, 2002). Die Gene *glnK* und *amtB* sind zusammen in einem Operon organisiert, dessen Anordnung in den meisten Prokaryoten konserviert ist (Thomas *et al.*, 2000a). Operons sind Regulationseinheiten in Bakteriengenomen, die gemeinsam transkribiert werden. Die Gene eines Operons sind vermutlich zusammen entstanden und haben ihre Entwicklung durch Co-Evolution beeinflusst (Coutts *et al.*, 2002). Sie synthetisieren vorwiegend Proteine, die sehr wichtig für die Zelle sind und/oder untereinander interagieren (Dandekar *et al.*, 1998). Weder das *glnK*- noch das *amtB*-Gen sind für das Wachstum von *E. coli* notwendig (Atkinson & Ninfa, 1998; Soupene *et al.*, 1998), ihre trimere Quartärstruktur ermöglicht jedoch eine optimale Interaktion untereinander (Thomas *et al.*, 2000a).

So zeigt Abbildung 1.4B eine Interaktion zwischen dem GlnK-Protein und dem AmtB-Transporter. Bei einer Ammoniumkonzentration unter 5  $\mu\text{M}$  wird die uridylylierende Aktivität der UTase induziert, so dass das GlnK-Protein in der vollständig uridylylierten Form nicht mit der Membran interagieren kann. In Abwesenheit von GlnK steigt die Aktivität von AmtB und Ammonium wird aktiv in die Zelle transportiert. Über das uridylylierte  $P_{II}$ -Protein GlnB erfolgt eine Weiterleitung des Signals an das 2-Komponentensystem NtrB/NtrC. Bei einer Verbesserung der Stickstoffversorgung der Zelle wird das GlnK-Protein über einer Ammoniumkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  durch die UTase deuridylyliert. Die unmodifizierte Form interagiert mit dem Membranprotein AmtB und der cytoplasmatische Pool von GlnK nimmt ab. Die Bindung des deuridylylierten GlnK-Proteins reduziert die Aktivität des AmtB-Transporters, so dass Ammonium nicht länger aktiv in die Zelle transportiert wird. Unter diesen Bedingungen wird Ammonium entweder über ein alternatives Transportsystem aufgenommen, für das es bislang noch keinen Hinweis gibt, oder diffundiert in Form von Ammoniak in die Zelle. Für den Fall, dass die Ammoniumkonzentration im Medium hoch bleibt, erfolgt eine Repression stickstoffregulierter Gene durch die deuridylylierte Form des  $P_{II}$ -Proteins GlnB (Atkinson & Ninfa, 1999; Coutts *et al.*, 2002; Javelle *et al.*, 2004). Das integrale Membranprotein AmtB wirkt als Sensor der extrazellulären Ammoniumkonzentration. Ein Austausch von Aspartat an Position 182 zu Alanin führt zu einer reduzierten Transportaktivität. Die Ammoniumaufnahme und Signalweiterleitung funktioniert nicht mehr so effektiv, weshalb die Aminosäure 182 als Bindestelle für Ammonium diskutiert wird (Javelle *et al.*, 2004). Für eine Interaktion der Proteine GlnK und AmtB ist die im Cytoplasma lokalisierte C-terminale Domäne des Transporters essenziell (Coutts *et al.*, 2002). GlnK fungiert hier als negativer Regulator des AmtB-Transporters. Das zweite  $P_{II}$ -Protein GlnB besitzt nur eine sehr geringe Affinität zu AmtB. Es hat die Aufgabe den Stickstoffstatus an das 2-Komponentensystem NtrB/NtrC und die ATase weiterzuleiten (Coutts *et al.*, 2002).

### 1.3 Die Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium glutamicum*

Um eine Verschwendung von Energie und Ressourcen zu vermeiden, wird der Stickstoffmetabolismus auch in *C. glutamicum* auf Genexpressionsebene und Proteinaktivitätsebene strikt reguliert. Ein detailliertes Modell der "Stickstoffkontrolle" konnte bereits vorgestellt werden (Abb. 1.6, nach Silberbach, 2004). Die Regulation des Stickstoffmetabolismus auf Expressionsebene erfolgt durch ein spezifisches Repressorprotein, AmtR (kodiert von *amtR*), das bereits charakterisiert und isoliert wurde (Jakoby *et al.*, 2000). Der globale Repressor AmtR gehört zur TetR-/AcrR-Familie und ist vermutlich als Dimer aktiv. Er reprimiert bei guter Stickstoffversorgung die Expression von insgesamt 36 Genen (Überblick, Beckers *et al.*, 2005). Mit Hilfe der durch Gelretardationsexperimente bestätigten Bindemotive für AmtR wurde ein multiples *alignment* erstellt, anhand dessen die Konsensussequenz einer AmtR-Bindestelle ermittelt werden konnte. Die Höhe der Buchstaben ist ein Indiz für ihre Konservierung bzw. spiegelt den Informationsgehalt des entsprechenden Nucleotides wider. Wie die meisten Bindesequenzen ist auch das AmtR-Bindemotiv palindromisch aufgebaut (Abb. 1.5, nach Beckers *et al.*, 2005).



**Abb. 1.5: Graphische Darstellung der AmtR-Konsensussequenz.** Die Höhe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit der Basen an der jeweiligen Position wider (nach Beckers *et al.*, 2005).

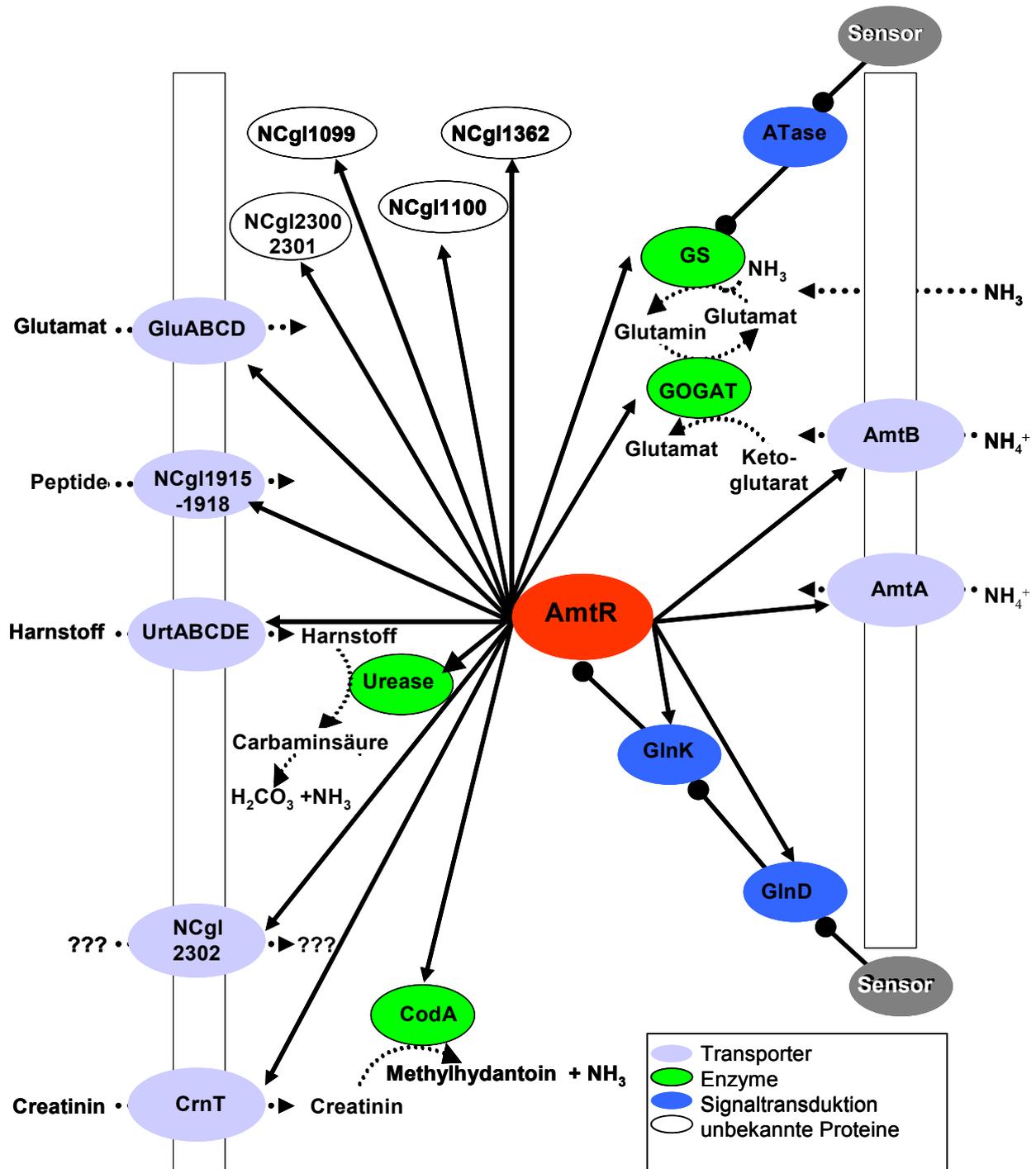
Funktionell sind die Genprodukte der meisten Komponenten, die unter AmtR-Regulation stehen, Transportproteine und Enzyme. 17 dieser Gene kodieren für Aufnahmesysteme alternativer Stickstoffquellen, so wird die Expression der Gene für die beiden Ammoniumtransporter AmtA (kodiert von *amtA*, Jakoby *et al.*, 2000) und AmtB (kodiert von *amtB*, Meier-Wagner *et al.*, 2001), für den Glutamattransporter (kodiert von *gluABCD*, Kronmeyer *et al.*, 1995), für den Harnstofftransporter (kodiert von *urtABCDE*, Beckers *et al.*, 2004), für die Creatininpermease (kodiert von *cmT*, Bendt *et al.*, 2004) und für ein putatives Oligopeptidaufnahmesystem (NCgl1915-1918, Beckers *et al.*, 2005) durch AmtR reguliert. Auch die Transkription des Gens für einen putativen Vanillatransporter (kodiert von *vanK*, Merckens *et al.*, 2005) wird bei Stickstoffmangel induziert. Es konnte jedoch bislang kein

AmtR-Bindemotiv stromaufwärts von *vanK* identifiziert werden. Glutamin kann über einen biochemisch charakterisierten, sekundären Transporter im Symport mit Na<sup>+</sup>-Ionen aufgenommen werden, über dessen Regulation zur Zeit keine Informationen vorliegen (Siewe *et al.*, 1995).

Der alleinige Transport dieser Substanzen in die Zelle reicht bei schlechter Stickstoffverfügbarkeit nicht aus, um die Stickstoffversorgung der Bakterien zu gewährleisten. Eine gleichzeitige Regulation der Gene für entsprechende assimilatorische Enzyme und der Gene der Signaltransduktionskaskade ist deshalb ebenfalls erforderlich. Daher stehen weitere 14 Gene ebenfalls unter AmtR-Kontrolle. Hierzu zählen die Gene der Glutamatdehydrogenase GDH (kodiert von *gdh*, Beckers *et al.*, 2005), der Glutaminsynthetase GS (kodiert von *glnA*, Nolden *et al.*, 2001a) und der Glutamatsynthase GOGAT (kodiert von *gltBD*, Beckers *et al.*, 2001) zur Glutamat- und Ammoniumassimilation, der Urease (kodiert von *ureABCEFGD*, Beckers *et al.*, 2004) zur Verwertung von Harnstoff durch Umsetzung in Kohlendioxid und Ammoniak, der Creatinindeaminase (kodiert von *codA*, Bendt *et al.*, 2004) zur Spaltung von Creatinin zu Methylhydantoin und Ammonium und der beiden Proteine der Signalweiterleitung, des P<sub>II</sub>-Signaltransduktionsproteins GlnK und der Transferase GlnD (kodiert von *glnK* bzw. *glnD*, Nolden *et al.*, 2001b). Die Aktivitätsregulation der GS verläuft wie in *E. coli* (vgl. Abb. 1.4) über das bifunktionelle Enzym Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym (ATase, kodiert von *glnE*), dessen Expression jedoch nicht unter AmtR-Regulation steht. Fünf weitere Gene, namentlich NCgl1099 (putative Hydrolase), NCgl1100 (nicht-ribosomales Peptidsynthetasemodul), NCgl1362 (CTP-Synthase, kodiert von *pyrG*), NCgl2300 (putative Oxygenaseuntereinheit der Vanillat-o-demethylase, kodiert von *vanA*) und NCgl2301 (putative Vanillat-o-demethylase, kodiert von *vanB*), konnten der Stickstoffkontrolle zugeordnet werden.

Viele der AmtR-regulierten Gene sind im Genom in *clustern* angeordnet. So ist die Anordnung der Gene *amtB*, *glnK* und *glnD* in einem Operon in den meisten Actinomyceten konserviert (Burkovski, 2003a,b) und konnte auch in *C. glutamicum* gezeigt werden (Jakoby *et al.*, 2000). Außerdem wurden Operonstrukturen für die folgenden Gene nachgewiesen: *amtA-ocd-soxA* (Beckers *et al.*, 2005), *gltBD* (Beckers *et al.*, 2001), *urtABCDE* (Beckers *et al.*, 2004), *ureABCEFGD* (Beckers *et al.*, 2004), *gluABCD* (Kronmeyer *et al.*, 1995), NCgl1915-1918 (Beckers *et al.*, 2005) und *vanABK* (Merkens *et al.*, 2005). Die unter der gemeinsamen Kontrolle des globalen Repressorproteins AmtR stehenden Gene, werden als AmtR-Regulon bezeichnet.

Für eine Regulation des Stickstoffmetabolismus auf Proteinaktivitätsebene ist die Anwesenheit des Signaltransduktionsproteins GlnK und der Transferase GlnD essenziell. In *glnD*- und *glnK*-Deletionsmutanten war bei Stickstoffmangel keine Transkriptionszunahme AmtR-kontrollierter Gene mehr detektierbar (Nolden *et al.*, 2001b).



**Abb. 1.6: Aktuelles Modell der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*.** Der globale Repressor AmtR reprimiert bei guter Stickstoffversorgung die Expression von insgesamt 36 Genen. Der Stickstoffstatus der Zelle wird mit Hilfe von einem oder mehreren noch unbekanntem Sensor(en) gemessen. Die Information wird entweder direkt oder über weitere Proteine an die Transferase GlnD oder die Adenylyltransferase (ATase) weitergeleitet. GlnD modifiziert unter Stickstoffmangel das Signaltransduktionsprotein GlnK, welches dann vermutlich mit AmtR interagiert und für eine Derepression stickstoffregulierter Gene sorgt. In Abhängigkeit der Stickstoffverfügbarkeit wird die Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) durch die ATase reguliert, indem sie die GS unter guter Stickstoffversorgung adenylyliert und bei Stickstoffmangel deadenylyliert. Die Regulation der ATase ist bisher noch unbekannt (nach Silberbach, 2004).

Expressionsregulation durch AmtR       Protein-Protein-Interaktion  
 Aufnahme, Assimilation oder Metabolisierung von Substraten

Eine Derepression AmtR-kontrollierter Gene erfolgt nur, wenn das GlnK-Protein bei Stickstoffmangel an Tyrosylrest 51 von GlnD modifiziert wird (Nolden *et al.*, 2001b). In der modifizierten Form ist GlnK vermutlich in der Lage, mit AmtR in Wechselwirkung zu treten und die Expression stickstoffregulierter Gene wird induziert. Ob es sich bei dieser Modifikation um eine Uridylylierung wie in *E. coli* (Jiang *et al.*, 1998a) oder eine Adenylylierung wie in *Streptomyces coelicolor* (Hesketh *et al.*, 2002) handelt, war zu Beginn dieser Arbeit unklar. Eine Mutante, die den Tyrosylrest an Position 51 gegen Phenylalanin ausgetauscht hatte, zeigte das gleiche Verhalten wie eine *glnK*-Deletionsmutante (Nolden *et al.*, 2001b). Wie *C. glutamicum* den Stickstoffgehalt des Mediums wahrnimmt und wie das Signal weitergeleitet wird, ist bisher nicht bekannt. Eine Isolierung der Transferase GlnD und des Signaltransduktionsproteins GlnK (Jakoby *et al.*, 1999) legten zunächst nahe, dass die Signalaufnahme und Signalweiterleitung ähnlich funktionieren wie in *E. coli*. GlnD steht jedoch in *C. glutamicum*, anders als in *E. coli*, in dem es konstitutiv und stickstoffunabhängig synthetisiert wird (Kim *et al.*, 1998), selbst unter AmtR-Kontrolle. Dies könnte für einen Sensor von Nachteil sein.

In *E. coli* fungiert nicht nur die Uridylyltransferase als Sensor, es scheint auch der Ammoniumtransporter AmtB an einer Signalaufnahme und Signalweiterleitung beteiligt zu sein (siehe Kapitel 1.2). Ein "Ammonium-Sensing" von Amt-Proteinen wird auch in anderen Organismen diskutiert. In *Saccharomyces cerevisiae* (Lorenz & Heitman, 1998) und *Rhodobacter capsulatus* (Yakunin & Hallenbeck, 2000) sind Amt-Proteine an einer Sensorfunktion beteiligt, indem sie das Ammonium im Medium wahrnehmen, binden und in die Zelle transportieren. Amt-Proteine sind hoch-affine Ammoniumtransporter, die in den unterschiedlichsten Lebewesen konserviert sind. So sind Amt-Transporter in Bakterien, Archae, Pilzen, Pflanzen, Tieren und als Rhesusproteine selbst beim Menschen zu finden (Saier, 1999; Howitt & Udvardi, 2000; Marini *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000b). Alle Amt-Proteine sind integrale Membranproteine, die eine ähnliche Topologie besitzen. Sie bestehen aus 400 bis 450 Aminosäuren, die 11 Transmembranhelices mit einer extrazellulären N-terminalen Domäne und einer C-terminalen Domäne im Cytoplasma bilden (Marini & André, 2000; Thomas *et al.*, 2000b).

In *C. glutamicum* wurden im Gegensatz zu *E. coli*, das nur einen Transporter besitzt, zwei spezifische Ammoniumaufnahmesysteme isoliert: AmtA und AmtB. Die Aufnahme von Ammonium durch das hoch-affine AmtA-System erfolgt in Abhängigkeit vom Membranpotenzial in einem Uniport-Mechanismus (Siewe *et al.*, 1996). Das AmtB-System transportiert ebenfalls in Abhängigkeit des Membranpotenzials Ammonium oder Ammoniak (B. Walter, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung), wobei Experimente zur Energetik des Aufnahmesystems und zur transportierten Substratform noch ausstehen. Bisherige Experimente haben gezeigt, dass die von AmtA transportierte Substratform Ammonium ist

und nicht Ammoniak (Meier-Wagner *et al.*, 2001), wie dies z.B. für das MEP2-Protein aus *S. cerevisiae* (Soupene *et al.*, 1998) oder seit kurzem für den AmtB-Transporter aus *E. coli* (Khademi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004) diskutiert wird. Die Amt-Proteine erleichtern hier nur den Konzentrationsausgleich von Ammoniak über die Membran, wirken also als Facilitatoren. Die aktivierte Glutaminsynthetase (GS) übernimmt in diesem Fall eine Zugwirkung, indem sie den aufgenommenen Ammoniak sofort weiterassimiliert. Um trotzdem einen "futile cycle", die Rückdiffusion von aufgenommenem Substrat in Form von membranpermeablem Ammoniak zu verhindern, ist es sinnvoll, neben der Aktivität der GS zusätzlich die Aktivität der Transporter AmtA und AmtB zu regulieren. Hierfür könnte entweder, wie in *E. coli*, das GlnK-Protein verantwortlich sein oder der Metabolit L-Glutamin könnte einen inhibitorischen Effekt auf die Aufnahme von Ammonium über eine negative Regulation der Transportaktivität ausüben (Kleiner & Castorph, 1982; Jayakumar *et al.*, 1986; Kleiner, 2000). Die Regulation in Abhängigkeit von L-Glutamin erscheint besonders sinnvoll, da die zellinterne L-Glutaminkonzentration in den meisten Bakterien ein direktes Maß für die Stickstoffversorgung der Zelle ist (Merrick & Edwards, 1995a). In *C. glutamicum* konnte bislang kein direkter Einfluss von L-Glutamin auf die Aktivität der Ammoniumtransporter beobachtet werden. Vielmehr scheint für die Regulation der AmtA-Aktivität die GS selbst essenziell zu sein. Eine Deletion des *glnA*-Gens führte zum vollständigen Verlust der Glutaminsynthetase-Aktivität und zu einer Glutamin-Auxotrophie des entsprechenden Stammes. Auch zeigte eine *glnA*-Deletionsmutante keine (Methyl-) Ammoniumaufnahme mehr, was für eine Interaktion der beiden Proteine sprechen würde, so dass eine aktive GS das AmtA-System induzieren könnte (Jakoby *et al.*, 1997). Eine Regulation der Aktivität des AmtB-Systems ist in *C. glutamicum* bislang nicht untersucht worden; ein ähnlicher Mechanismus wie in *E. coli* (siehe Kapitel 1.2) wäre jedoch aufgrund der Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* denkbar. Die Transporter könnten somit über direkte Interaktionen mit dem Glutaminsynthetase-Protein oder dem GlnK-Protein inhibiert oder aktiviert werden.

Für andere Mikroorganismen wurde eine Sensorik des Stickstoffstatus über interne stickstoffhaltige Metabolite beschrieben (Ikeda *et al.*, 1996; Schmitz, 2000). In *E. coli* konnte neben einer Regulation über Protein-Protein-Interaktionen eine essenzielle Rolle von  $\alpha$ -Ketoglutarat und L-Glutamin nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.2). Eine Quantifizierung interner Metabolite in *C. glutamicum* zeigte bei guter Stickstoffversorgung hohe L-Glutamatpools und L-Glutaminpools sowie niedrige  $\alpha$ -Ketoglutaratpools. Bei Stickstoffmangel blieben der L-Glutamatpool und der  $\alpha$ -Ketoglutaratpool gleich, während der L-Glutaminpool sank (T. Müller, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung). Auch hier könnte demnach eine hohe Konzentration an L-Glutamin in der Zelle ein Signal auslösen, das zu einer Demodifizierung des GlnK-Proteins, zu einer Repression stickstoffregulierter Gene

durch das AmtR-Protein und zu einer Modifikation und Inhibition der Glutaminsynthetase (GS) führt. Ungeklärt ist bislang, welche Rolle Ammonium für die Signalwahrnehmung und Signalweiterleitung spielt. Bei guter Stickstoffversorgung wird Ammonium in der Zelle akkumuliert, während Stickstoffmangel zu einem Abfall der Ammoniumkonzentration führt, so dass Ammonium die Voraussetzungen eines Stickstoffmarkers in *C. glutamicum* erfüllen würde.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit gliederte sich in drei Komplexe. Primärziel war eine umfassende biochemische und molekularbiologische Charakterisierung des zentralen P<sub>II</sub>-Signaltransduktionsproteins GlnK und die Aufklärung seiner Bedeutung für die Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*. Das GlnK-Protein wird unter Stickstoffmangel verstärkt exprimiert und zusätzlich modifiziert. Nach einem Stickstoffpuls wird die Expression von *glnK* reprimiert und das Protein demodifiziert. So wurde vor Beginn dieser Arbeit eine Modifikation des GlnK-Proteins durch GlnD vermutet, für die es jedoch zu diesem Zeitpunkt keinen experimentellen Beweis gab. Neben einer Untersuchung der bifunktionellen Aktivität von GlnD sollte die stickstoffabhängige Modifikation, Trimerisierung und Lokalisierung des GlnK-Proteins innerhalb der Signalkaskade aufgezeigt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Durchführung von Interaktionsstudien zwischen verschiedenen Komponenten des Stickstoffmetabolismus, um das komplexe Netzwerk der Stickstoffkontrolle zu charakterisieren und in seinen Zusammenhängen darzustellen. Zur Analyse der Interaktionen kamen hauptsächlich zwei Methoden zur Anwendung, die *Pull-Down* Methode und die *Two-Hybrid Assays*.

Schließlich wurde im letzten Teil der Arbeit die Sensorik des Stickstoffstatus in *C. glutamicum* untersucht, indem eine in anderen Organismen viel diskutierte Sensorfunktion der Amt-Proteine sowie eine Markerfunktion von internen stickstoffhaltigen Metaboliten analysiert wurde.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt; Tabelle 2.2 listet die eingesetzten Plasmide auf.

**Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme.** In der Tabelle sind die Marker und Eigenschaften der eingesetzten Stämme aufgeführt (Ap<sup>R</sup>, Resistenz gegen Ampicillin; Cm<sup>R</sup>, Resistenz gegen Chloramphenicol; Km<sup>R</sup>, Resistenz gegen Kanamycin; Nx<sup>R</sup>, Resistenz gegen Nalidixinsäure; Sm<sup>R</sup>, Resistenz gegen Streptomycin; Tc<sup>R</sup>, Resistenz gegen Tetracyclin).

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
<b><i>E. coli</i></b>		
BL21	<i>F ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
DH5 $\alpha$ <i>mcr</i>	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> <i><math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169 <math>\phi</math>80<math>\Delta</math>lacZ <math>\Delta</math>M15<i>mcrA</i></i> <i><math>\Delta</math>(<i>mmr hsdRMS mcrBC</i>)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM109	<i>F traD36 lacI<sup>f</sup> <math>\Delta</math>(lacZ)M15 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> / e14<sup>+</sup> (McrA)</i> <i><math>\Delta</math>(lac-proAB) thi gyrA96 (Nx<sup>R</sup>) endA1 hsdR17</i> <i>(r<sub>km</sub><sup>-</sup>) relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM110	<i>F traD36 lacI<sup>f</sup> <math>\Delta</math>(lacZ)M15 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> / rpsL (Sm<sup>R</sup>)</i> <i>thr leu thi lacY galK galT ara fhuA dam dcm</i> <i>glnV44 <math>\Delta</math>(lac-proAB)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<b><i>C. glutamicum</i></b>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
ATCC 13032 $\Delta$ <i>clpC</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>clpC</i>	Engels <i>et al.</i> , 2004
ATCC 13032 $\Delta$ <i>clpX</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>clpX</i>	Strösser <i>et al.</i> , 2004
ATCC 13032 $\Delta$ <i>ftsH</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>ftsH</i>	Strösser <i>et al.</i> , 2004
ATCC 13032 ptet- <i>clpP</i> -cJC1-pgap-tetR	konditionale Mutante von ATCC 13032 <i>clpP</i> , induzierbar durch Anhydrotetracyclin, Km <sup>R</sup>	Strösser <i>et al.</i> , 2004
LN-1.1	ATCC 13032 $\Delta$ <i>amtB</i> , <i>glnK</i> - und <i>glnD</i> -Expression nicht beeinträchtigt	Meier-Wagner <i>et al.</i> , 2001
LN-D	ATCC 13032 $\Delta$ <i>glnD</i> , <i>amtB</i> - und <i>glnK</i> -Expression nicht beeinträchtigt	Nolden <i>et al.</i> , 2001b

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
LNΔGDH	ATCC 13032 $\Delta gdh$	Konstruktion L. Nolden, Universität zu Köln
LNGLNA2	ATCC 13032 $\Delta glnA2$	Nolden <i>et al.</i> , 2001a
LNGLNE	ATCC 13032 $\Delta glnE$	Nolden <i>et al.</i> , 2001a
LNΔGLTBD	ATCC 13032 $\Delta gltB \Delta gltD$	Konstruktion L. Nolden, Universität zu Köln
LNΔGS	ATCC 13032 $\Delta glnA$ , Glutamin-auxotroph	Konstruktion L. Nolden, Universität zu Köln
MJ6-18	ATCC 13032 $\Delta amtR$	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
MJ2-38	ATCC 13032 $\Delta amtA$	Meier-Wagner <i>et al.</i> , 2001
NR-1	ATCC 13032 $\Delta glnK$ , <i>amtB</i> - und <i>glnD</i> -Expression nicht beeinträchtigt	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
JS-1	ATCC 13032 $\Delta amtA \Delta amtB$ , <i>glnK</i> - und <i>glnD</i> -Expression nicht beeinträchtigt	Strösser <i>et al.</i> , 2004
RES167	Restriktionsdefiziente Mutante von ATCC13032 $\Delta(cgII M-cgII R-cgII R)$	Tauch <i>et al.</i> , 2002

**Tab. 2.2: Eingesetzte Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften** (Ap<sup>R</sup>, Resistenz gegen Ampicillin; Cm<sup>R</sup>, Resistenz gegen Chloramphenicol; Km<sup>R</sup>, Resistenz gegen Kanamycin; Nx<sup>R</sup>, Resistenz gegen Nalidixinsäure; Sm<sup>R</sup>, Resistenz gegen Streptomycin; Tc<sup>R</sup>, Resistenz gegen Tetracyclin). Die Konstruktion der Plasmide ist im Anhang beschrieben.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBT	<i>lac</i> -UV5 P, Cm <sup>R</sup> , p15A ori, $\lambda$ cl <i>E. coli</i> -Vektor für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien	Stratagene, La Jolla, USA
pBT-LGF2	Kontrollplasmid mit der Dimerisierungsdomäne des Gal4 Transkriptionsaktivator-Proteins für Interaktionsstudien mit dem Gal11 Protein	Stratagene, La Jolla, USA
pBTamtR	pBT mit dem <i>amtR</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pTRG	diese Arbeit
pBTglnA	pBT mit dem <i>glnA</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pTRG	diese Arbeit
pBTglnD	pBT mit dem <i>glnD</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pTRG	diese Arbeit
pBTglnE	pBT mit dem <i>glnE</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pTRG	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBTglnK	pBT mit dem <i>glnK</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pTRG	diese Arbeit
pBTgltD	pBT mit dem <i>gltD</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pTRG	diese Arbeit
pEKEX2	<i>ptac</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Km <sup>R</sup> , <i>ori C. g.</i> , <i>ori E. c.</i> <i>C. glutamicum</i> -Expressionsvektor	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEX2amtB-glnK	pEKEX2 mit den <i>amtB-glnK</i> -Genen für eine Überexpression von <i>amtB-glnK</i>	diese Arbeit
pEKEX2amtB-glnKY51F	pEKEX2 mit den <i>amtB-glnKY51F</i> -Genen für eine Überexpression von <i>amtB-glnKY51F</i> mit der Punktmutation Y51F in <i>glnK</i>	diese Arbeit
pEKEX2amtB-glnK-glnD	pEKEX2 mit dem <i>amtB-glnK-glnD</i> -Operon für eine Überexpression von <i>amtB-glnK-glnD</i>	diese Arbeit
pEKEX2amtB-glnKY51F-glnD	pEKEX2 mit dem <i>amtB-glnKY51F-glnD</i> -Operon für eine Überexpression von <i>amtB-glnKY51F-glnD</i> mit der Punktmutation Y51F in <i>glnK</i>	diese Arbeit
pEKEX2glnD	pEKEX2 mit dem <i>glnD</i> -Gen für eine Überexpression von <i>glnD</i>	diese Arbeit
pEKEX2glnK	pEKEX2 mit dem <i>glnK</i> -Gen für eine Überexpression von <i>glnK</i>	diese Arbeit
pEKEX2glnK-glnD	pEKEX2 mit den <i>glnK-glnD</i> -Genen für eine Überexpression von <i>glnK-glnD</i>	diese Arbeit
pEKEX2glnKA49P	pEKEX2 mit <i>glnKA49P</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation A49P	diese Arbeit
pEKEX2glnKD54N	pEKEX2 mit <i>glnKD54N</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation D54N	diese Arbeit
pEKEX2glnKD88N	pEKEX2 mit <i>glnKD88N</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation D88N	diese Arbeit
pEKEX2glnKE50Q	pEKEX2 mit <i>glnKE50Q</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation E50Q	diese Arbeit
pEKEX2glnKG35A	pEKEX2 mit <i>glnKG35A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation G35A	diese Arbeit
pEKEX2glnKG37A	pEKEX2 mit <i>glnKG37A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation G37A	diese Arbeit
pEKEX2glnKG41A	pEKEX2 mit <i>glnKG41A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation G41A	diese Arbeit
pEKEX2glnKG84A	pEKEX2 mit <i>glnKG84A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation G84A	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEKEX2glnKG87A	pEKEX2 mit <i>glnKG87A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation G87A	diese Arbeit
pEKEX2glnKG89A	pEKEX2 mit <i>glnKG89A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation G89A	diese Arbeit
pEKEX2glnKI7V	pEKEX2 mit <i>glnKI7V</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation I7V	diese Arbeit
pEKEX2glnKI64V	pEKEX2 mit <i>glnKI64V</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation I64V	diese Arbeit
pEKEX2glnKK40N	pEKEX2 mit <i>glnKK40N</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation K40N	diese Arbeit
pEKEX2glnKK90R	pEKEX2 mit <i>glnKK90R</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation K90R	diese Arbeit
pEKEX2glnKQ39E	pEKEX2 mit <i>glnKQ39E</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation Q39E	diese Arbeit
pEKEX2glnKR101K	pEKEX2 mit <i>glnKR101K</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation R101K	diese Arbeit
pEKEX2glnKR103K	pEKEX2 mit <i>glnKR103K</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation R103K	diese Arbeit
pEKEX2glnKT29M	pEKEX2 mit <i>glnKT29M</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation T29M	diese Arbeit
pEKEX2glnKT43A	pEKEX2 mit <i>glnKT43A</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation T43A	diese Arbeit
pEKEX2glnKT83N	pEKEX2 mit <i>glnKT83N</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation T83N	diese Arbeit
pEKEX2glnKV53G	pEKEX2 mit <i>glnKV53G</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation V53G	diese Arbeit
pEKEX2glnKV102I	pEKEX2 mit <i>glnKV102I</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation V102I	diese Arbeit
pEKEX2glnKY46F	pEKEX2 mit <i>glnKY46F</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation Y46F	diese Arbeit
pEKEX2glnKY51F	pEKEX2 mit <i>glnKY51F</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation Y51F	diese Arbeit
pGEM3z	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , SP6-Promotor, T7-Promotor <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	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
pGEM3zamtA	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus dem <i>amtA</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	Jakoby <i>et al.</i> , 2000

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEM3zamtB2	pGEM3z mit 0,6 kb Fragment aus dem <i>amtB</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zclpC	pGEM3z mit 0,6 kb-Fragment aus dem <i>clpC</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zclpX	pGEM3z mit 0,6 kb-Fragment aus dem <i>clpX</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zclpP	pGEM3z mit 0,6 kb-Fragment aus dem <i>clpP</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zftsH	pGEM3z mit 0,6 kb-Fragment aus dem <i>ftsH</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3zglnA	pGEM3z mit 0,6 kb-Fragment aus dem <i>glnA</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
pGEM3zglnD	pGEM3z mit 0,7 kb-Fragment aus dem <i>glnD</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
pGEM3zglnK	pGEM3z mit 0,3 kb-Fragment aus dem <i>glnK</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
pGEM3zgltB	pGEM3z mit 0,8 kb-Fragment aus dem <i>gltB</i> -Gen. 3'-Ende zeigt zum T7-Promotor	Beckers <i>et al.</i> , 2001
pMAL-c2X	<i>ptac</i> , Ap <sup>R</sup> , pBR322 ori, M13 ori, <i>malE</i> , <i>lacI<sup>f</sup></i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , <i>E. coli</i> -Vektor für Proteinreinigung	Guan <i>et al.</i> , 1987
pMAL-c2amtR	pMAL-c2 mit <i>amtR</i> -Gen zur Überexpression von <i>amtR</i> N-terminal fusioniert mit dem Maltose-Bindeprotein	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
pTRG	<i>lpp</i> P, <i>lac-UV5</i> P, Tc <sup>R</sup> , ColE1 ori, RNAP $\alpha$ <i>E. coli</i> -Vektor für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien	Stratagene, La Jolla, USA
pTRG-Gal11	Kontrollplasmid mit einer mutierten Form des Gal11 Protein für Interaktionsstudien mit der Dimerisierungsdomäne des Gal4 Proteins	Stratagene, La Jolla, USA
pTRGamtR	pTRG mit dem <i>amtR</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinalem pBT	diese Arbeit
pTRGgdh	pTRG mit dem <i>gdh</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinalem pBT	diese Arbeit
pTRGglnA	pTRG mit dem <i>glnA</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinalem pBT	diese Arbeit
pTRGglnD	pTRG mit dem <i>glnD</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinalem pBT	diese Arbeit
pTRGglnE	pTRG mit dem <i>glnE</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinalem pBT	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pTRGglnK	pTRG mit dem <i>glnK</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pBT	diese Arbeit
pTRGglnK-glnD	pTRG mit den <i>glnK-glnD</i> -Genen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pBT	diese Arbeit
pTRGgltB	pTRG mit dem <i>gltB</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pBT	diese Arbeit
pTRGgltD	pTRG mit dem <i>gltD</i> -Gen für <i>Two-Hybrid</i> Interaktionsstudien mit rekombinantem pBT	diese Arbeit
pQE60	<i>ptac</i> , Ap <sup>R</sup> , ori ColE1, 6x His <i>E. coli</i> -Vektor für Proteinreinigung	Qiagen, Hilden
pQE60amtR	pQE60 mit dem <i>amtR</i> -Gen für eine Überexpression von <i>amtR</i> fusioniert mit 6 Histidinresten	diese Arbeit
pQE60glnD	pQE60 mit dem <i>glnD</i> -Gen für eine Überexpression von <i>glnD</i> fusioniert mit 6 Histidinresten	diese Arbeit
pZ8-1	<i>ptac</i> , Km <sup>R</sup> , ori pUC, ori <i>C. g.</i> <i>C. glutamicum</i> -Expressionsvektor	Degussa, Bielefeld
pZamtB-glnK	pZ8-1 mit den <i>amtB-glnK</i> -Genen für eine Überexpression von <i>amtB-glnK</i>	diese Arbeit
pZamtB-glnKY51F	pZ8-1 mit den <i>amtB-glnKY51F</i> -Genen für eine Überexpression von <i>amtB-glnKY51F</i> mit der Punktmutation Y51F in <i>glnK</i>	diese Arbeit
pZamtB-glnK-glnD	pZ8-1 mit dem <i>amtB-glnK-glnD</i> -Operon für eine Überexpression von <i>amtB-glnK-glnD</i>	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
pZamtB-glnK-glnD'	pZ8-1 mit dem <i>amtB-glnK-glnD'</i> -Operon für eine Überexpression von <i>amtB-glnK</i> und eines C-terminal um 1 kb verkürzten <i>glnD</i> -Gens	diese Arbeit
pZamtB-glnKY51F-glnD	pZ8-1 mit dem <i>amtB-glnKY51F-glnD</i> -Operon für eine Überexpression von <i>amtB-glnKY51F-glnD</i> mit der Punktmutation Y51F in <i>glnK</i>	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
pZglnD	pZ8-1 mit dem <i>glnD</i> -Gen für eine Überexpression von <i>glnD</i>	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
pZglnD'	pZ8-1 mit dem <i>glnD'</i> -Gen für eine Überexpression eines C-terminal um 1 kb verkürzten <i>glnD</i> -Gens	diese Arbeit
pZglnK	pZ8-1 mit dem <i>glnK</i> -Gen für eine Überexpression von <i>glnK</i>	Nolden <i>et al.</i> , 2001b
pZglnKY51F	pZ8-1 mit <i>glnKY51F</i> für eine Überexpression von <i>glnK</i> mit der Punktmutation Y51F	Nolden <i>et al.</i> , 2001b

## 2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1 Nährmedien für *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden standardmäßig in LB(Luria Bertani)-Medium kultiviert (siehe Tab. 2.3). Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt.

### 2.2.2 Nährmedien für *C. glutamicum*

Zur Anzucht von *C. glutamicum*-Stämmen kam als Vollmedium BHI(Brain-Heart-Infusion)-Medium 37g/l (Difco, Detroit, USA) zur Anwendung. Für die Herstellung der Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt. In LB(Luria Bertani)-Medium (siehe Tab. 2.3) wurden *C. glutamicum*-Stämme für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen kultiviert. Als definiertes Minimalmedium wurde CgC-Medium bzw. CgCoN-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993) eingesetzt. Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 2.3 angegeben.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung (pro l)
LB	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl. Sterilisation durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min.
CgC	42 g MOPS, 20 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 g Harnstoff, 0,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH (NaOH) = 7,0. Nach dem Autoklavieren bei 121°C für 20 min wurde zugegeben: 10 ml 100 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> , 200 µg Biotin, 1 ml Spurensalze, 50 ml 50% Glukose.
CgCoN	42 g MOPS, 0,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH (NaOH) = 7,0. Nach dem Autoklavieren bei 121°C für 20 min wurde zugegeben: 10 ml 100 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> , 200 µg Biotin, 1 ml Spurensalze, 50 ml 50% Glukose.
Spurensalze	28,5 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 16,5 g MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 6,4 g ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 764 mg CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O, 128 mg CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O, 44 mg NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O, 64 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 48 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 50 mg SrCl <sub>2</sub> , 50 mg BaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 28 mg KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12H <sub>2</sub> O, pH (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 1. Sterilisation durch Filtration.

### 2.2.3 Antibiotika

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker für *E. coli*-Stämme wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Carbenicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 25 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Streptomycin 25 µg/ml und Tetracyclin 12,5 µg/ml. Für *C. glutamicum*-Stämme kam als Antibiotikum nur Kanamycin 25 µg/ml zum Einsatz. Es wurden Stammlösungen in 1000-fach höherer Konzentration für Carbenicillin, Kanamycin und Streptomycin in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> bzw. für Chloramphenicol und Tetracyclin in 70% Ethanol hergestellt, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 2.2.4 Kultivierungsbedingungen

*E. coli*-Stämme wurden bei 37°C und *C. glutamicum*-Stämme bei 30°C als Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen angesetzt und auf dem Schütteltisch bei 135 bzw. 125 rpm angezogen. Das Zellwachstum konnte durch die Messung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) ermittelt werden. Eine OD<sub>600</sub> von 1 entspricht einer Bakterienkultur von etwa 10<sup>9</sup> Zellen pro ml.

Zur Präparation chemischkompetenter *E. coli*- und elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde eine 5 ml Vorkultur in Reagenzgläsern in LB- bzw. in LB-Medium mit 2% Glukose (siehe Tab. 2.3) hergestellt und weiter nach Punkt 2.5.1 für *E. coli* und 2.5.2 für *C. glutamicum* vorgegangen. Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte wie unter Punkt 2.4.1.1 beschrieben, nachdem die *E. coli*-Zellen zuvor in 5 ml LB-Medium in Reagenzgläsern vorkultiviert wurden.

Für die Überexpression von Proteinen wurden *E. coli*-Zellen über Nacht in Reagenzgläsern in 5 ml LB-Medium vorkultiviert. Morgens wurden 500 ml LB-Medium mit der Übernachtskultur auf OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bis OD<sub>600</sub> von 0,6 unter Schütteln inkubiert. Die Expression des gewünschten Proteins erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG für 3 bis 5 Stunden. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet und wie unter Punkt 2.3.11 beschrieben aufgearbeitet.

Zur Untersuchung der Effekte von Stickstoffmangelbedingungen auf *C. glutamicum*-Stämme wurde nach folgendem standardisiertem Animpfverfahren vorgegangen, um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten: 20 ml BHI-Medium (siehe Punkt 2.2.1) wurden morgens mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft und unter Schütteln ca. 8 Stunden inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann zum Animpfen von 100 ml CgC-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingesetzt und das CgC-Medium über Nacht unter Schütteln inkubiert, wodurch eine optimale Anpassung der Zellen an das Minimalmedium erzielt wurde. Da für alle Untersuchungen Zellen in der exponentiellen Phase benötigt wurden, wurde mit dieser Übernachtskultur frisches CgC-Medium (100-500 ml) auf eine OD<sub>600</sub> von 1 angeimpft

und unter Schütteln bis zum Erreichen der exponentiellen Phase ( $OD_{600}$  von 4-5) inkubiert. Zur Induktion von Stämmen mit dem pEKEX2-Plasmid wurden die Zellen unter Schütteln bis  $OD_{600}$  von 3 inkubiert und dann mit 500  $\mu$ M IPTG für 1,5 Stunden induziert. Es wurde eine Probe aus CgC-Medium mit einer  $OD_{600}$  von 4 bis 5 bzw. nach Induktion mit IPTG für 1,5 Stunden entnommen. Zur Induktion von Stickstoffmangel wurden die Zellen abzentrifugiert (4.000 xg, 10 min, 30°C), einmal in vorgewärmtem CgCoN-Medium (100-500 ml) gewaschen (4.000 xg, 10 min, 30°C) und anschließend in vorgewärmtem CgCoN-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für 1,5 Stunden unter Schütteln inkubiert und eine weitere Probe wurde gezogen. Dann wurde den Zellen ein Stickstoffpuls (100  $\mu$ M bis 100 mM  $(NH_4)_2SO_4$  je nach Versuchsaufbau) gegeben und nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die weitere Aufarbeitung ist unter Punkt 2.3 bzw. 2.4 beschrieben.

## 2.3 Biochemische Techniken

### 2.3.1 Herstellung der Zellextrakt-, der Cytoplasma- und der Membranfraktion

Die *C. glutamicum*-Zellen (25 ml) für die Proteinpräparationen (Kultivierung siehe Punkt 2.2.4) wurden nach Inkubation bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls geerntet (4.000 xg, 6 min, 4°C). Bis zur weiteren Aufarbeitung konnten die Pellets bei -20°C gelagert werden. Jedes Pellet wurde dann in 700  $\mu$ l 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 resuspendiert. Die Suspension wurde in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) für 4 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 xg, 4°C, 25 min) sedimentiert. Der Überstand, die Zellextraktfraktion, wurde entweder abpipettiert und bei -20°C weitergelagert oder es wurde von dem Überstand eine 200  $\mu$ l Probe als Zellextraktfraktion entnommen und der Rest des Überstandes durch Ultrazentrifugation in die Cytoplasma- und die Membranfraktion getrennt (150.000 xg, 20 min, 4°C). Vom Überstand, der Cytoplasmafraktion, wurde eine 200  $\mu$ l Probe entnommen, die Membranpellets wurden in 1 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 resuspendiert und dreimal gewaschen (150.000 xg, 20 min, 4°C). Zum Schluss wurde die Membranfraktion in 200  $\mu$ l 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 resuspendiert und wie die Zellextrakt- und die Cytoplasmafraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Amido Black Methode

Zur Bestimmung der Proteinmengen im Zellextrakt, im Cytoplasma und in der Membranfraktion von *C. glutamicum* kam die Amido Black Methode zur Anwendung (Schaffner & Weissmann, 1973). Zur Herstellung der Eichgeraden wurden 0, 10, 25, 50, 100 und 150 µg Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Für die Proteinbestimmung wurden alle Proben 1:50 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt. Zu 225 µl verdünnter Probe wurden 30 µl Lösung 1 und 50 µl Lösung 2 zugegeben, die Ansätze gemischt und die Proben für 2 Minuten inkubiert. Das Filterpapier (HA-Filter, Millipore, Porengröße 0,45 µm) wurde in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und auf das Millipore-Filterssystem gelegt. Die Proben wurden auf vorher markierte Punkte pipettiert und die Probenspots mit je 200 µl Lösung 3 nachgespült. Danach wurde der gesamte Filter mit 2 ml derselben Lösung gewaschen, für 10 Minuten in Amido Black Lösung gefärbt, für 45 Sekunden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gespült und dreimal für 3 Minuten mit Lösung 4 gewaschen. Zuletzt wurde der Filter für 3 Minuten mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gespült und anschließend getrocknet. Die gefärbten Spots wurden ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Nach Zugabe von 1 ml Lösung 5 wurden die Spots für 10 Minuten inkubiert und regelmäßig gemischt. Die optische Dichte wurde bei 630 nm gemessen und die Konzentration jeder Probe anhand der BSA-Eichgeraden bestimmt.

#### Lösung 1:

1 M Tris, 2% SDS, pH (HCl) = 7,4

#### Lösung 2:

90 % TCA

#### Lösung 3:

6 % TCA

#### Lösung 4:

90% Methanol, 2% Essigsäure

#### Lösung 5:

25 mM NaOH, 50 µM EDTA, 50% Ethanol

#### Amido Black Lösung:

0,25% Amido Black, 45% Methanol, 10% Essigsäure

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinkonzentrationen von Zellextrakten aus *E. coli* oder von Fraktionen aus Proteinreinigungen und *Pull-Down* Experimenten wurden mit der Methode nach Lowry (modifiziert nach Dulley & Grieve, 1975) bestimmt. Für die Eichgerade wurden 2, 4, 12, 16 und 20 µg Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Die Proteinproben wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 1:10 und 1:50 verdünnt. Zu 100 µl verdünnter Probe wurden 20 µl 100 mM SDS pipettiert. Das Färbereagenz wurde jeweils frisch angesetzt, 1 ml Färbereagenz zur Probenlösung gegeben, gemischt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Zu jeder Probe wurden dann 100 µl Folinreagenz (Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, unverdünnt) pipettiert, sofort gut gemischt und die Proben für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 650 nm bestimmt und die Konzentrationen mit Hilfe der BSA-Eichgeraden ermittelt.

#### Färbereagenz:

100 ml Lösung A (2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,4 g NaOH/100 ml)  
+ 2 ml Lösung B (2% Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-Tartrat)  
+ 2 ml Lösung C (1% CuSO<sub>4</sub>)

### 2.3.4 Nachweis der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand

Die Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum*-Stämmen wurde mit einem colorimetrischen Nachweisverfahren bestimmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Nach Inkubation in CgCoN-Medium für 1,5 Stunden und einem Stickstoffpuls von 100 µM bis 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden im Abstand von einer Minute 1 ml Proben entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert (13.000 xg, 1 min, 4°C) und der Überstand wurde für den Ammoniumnachweis-Test eingesetzt. 500 µl Kulturüberstand wurden mit 250 µl Lösung 1 versetzt und gemischt. Nach Zugabe von 250 µl Lösung 2 und erneutem Mischen wurden die Proben für 45 Minuten im Dunkeln gelagert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 635 nm bestimmt und die Konzentration mittels einer Ammoniumsulfat-Eichgeraden berechnet. Für die Eichgerade wurden 0, 25, 50, 75 und 100 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingesetzt.

#### Lösung 1:

15 g wassergesättigtes Phenol, 0,015 g Natriumnitroprussid wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, auf 500 ml aufgefüllt und lichtgeschützt gelagert.

#### Lösung 2:

2 ml 13% NaClO, 10 g NaOH wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und auf 500 ml aufgefüllt.

### 2.3.5 Eindimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1-D-SDS-PAGE)

Zur Untersuchung der Lokalisierung, Modifikation und Interaktion des GlnK-Proteins, der Glutaminsynthetase (GS) und anderer Proteine des Stickstoffmetabolismus wurden der Zellextrakt, das Cytoplasma und die Membranfraktion von *C. glutamicum*-Zellen präpariert und auf 10-12%-ige denaturierende Polyacrylamid-Gele (1-D-SDS-PAGE) aufgetragen (Schägger & von Jagow, 1987). Die Gele enthielten Harnstoff und SDS, durch die die Proteine denaturiert wurden. Für die Zellextrakt-, die Cytoplasma- sowie die Membranfraktion wurden pro Fraktion 25 µg Proteinextrakt in denaturierendem 1X Gelladepuffer verdünnt, für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und zusammen mit einem Protein-Marker aufgetragen (Prestained Protein Marker Broad Range, 10-180 kDa, MBI Fermentas, Wilna). Als Laufpuffer wurde Kathoden- und Anodenpuffer eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 50 V gestartet und die Spannung auf 120 V erhöht, sobald die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten.

#### Für ein 10%-iges Trenngel wurden benötigt:

6,1 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (48%/1,5%)

10 ml Gelpuffer

10,8 g Harnstoff

6 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

#### Für ein Sammelgel wurden benötigt:

1 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (48%/1,5%)

3,1 ml Gelpuffer

8 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Jeweils unmittelbar vor dem Gießen wurden 100 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 10 µl TEMED zum Trenngel und Sammelgel pipettiert. Als *overlay solution* für die Trenngele wurde H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verwendet.

#### Kathodenpuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS

#### Anodenpuffer:

0,2 M Tris, pH (HCl) = 8,9

#### Gelpuffer:

3 M Tris, 1 M HCl, 0,3% SDS

Gelladepuffer (1X):

4% SDS, 12% (w/v) Glycerin, 50 mM Tris, 2% Mercaptoethanol, 0,01% Servablau G, pH (HCl) = 6,8

**2.3.6 Eindimensionale-native-Polyacrylamidgelelektrophorese (1-D-Nativ-PAGE)**

Zur Untersuchung der trimeren Struktur des GlnK-Proteins oder der Dimerisierung des AmtR-Proteins wurden Proteinextrakte aus *E. coli*-Zellen bzw. *C. glutamicum*-Zellen präpariert und auf nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gele (1-D-Nativ-PAGE) aufgetragen. Die native Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um Proteinkomplexe zu detektieren. Als Gelsystem wurde die Methode nach Laemmli (1970) gewählt. Für die Elektrophorese wurden 10%-ige Tris-Glycin-Fertiggele verwendet (Anamed, Darmstadt) und von der Zellextrakt-, der Cytoplasma- sowie der Membranfraktion 25 µg Proteinextrakt in 1X Probenpuffer verdünnt und aufgetragen. Als Elektrophorese-Puffer kam 1X konzentrierter Tris-Glycin-Puffer zum Einsatz. Die Elektrophorese wurde bei 15 mA pro Gel gestartet und die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht, sobald die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten.

Elektrodenpuffer (4X):

25 mM Tris, 192 mM Glycin

Probenpuffer (4X):

10% (w/v) Glycerin, 125 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,01% Bromphenolblau, pH (HCl) = 6,8

**2.3.7 Zweidimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D-PAGE)**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE) ermöglicht die Trennung komplexer Proteingemische durch die sequenzielle Anwendung zweier unabhängiger Methoden. In der ersten Dimension werden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung in einem pH-Gradienten-Gel nach ihrem spezifischen isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die zweite Dimension ermöglicht durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die zusätzliche Trennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes.

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 18 cm IPG-Streifen des pH-Bereichs 4 bis 7 (*Immobiline®DryStrips*, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. 100 µg Protein wurden direkt in 350 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen und in die sorgfältig gereinigte Kammer pipettiert. Nach Entfernen der Schutzfolie wurde der *DryStrip* mit der Gelseite zuunterst auf die Lösung gelegt, ohne dass Flüssigkeit auf die Rückseite des Strips gelangte und die Kammer anschließend mit einem Deckel abgedeckt. Die Fokussierung erfolgte bei 20°C in einem *IPGphor™ Isoelectric Focussing System* (Amersham Biosciences, Freiburg)

nach folgendem Programm: 6 h 30 V, 6 h 60 V, 1 h 500 V, 1 h 1.000 V, 1 h 8.000 V, 9 h 8.000 V, so dass 68.000 Vh erreicht wurden.

Vor dem Einsatz in die zweite Dimension mussten die fokussierten Streifen zur Reduktion der Proteine 15 Minuten in Äquibrierlösung mit 1% DTT inkubiert werden. Um überschüssiges DTT zu entfernen und die reduzierten Cysteinreste durch Alkylierung zu stabilisieren, wurden die IPG-Streifen anschließend 15 Minuten in Äquibrierlösung mit 4% Iodacetamid geschüttelt, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ab gespült, kurz auf angefeuchteten Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet und auf die vorbereiteten Gele (*ExcelGel Gradient XL 12-14*, Amersham Biosciences) gelegt. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der zweiten Dimension lief zunächst eine Stunde bei 20 mA und nach Entfernung des IPG-Streifens aus dem System für weitere 2,5 Stunden bei 40 mA. Nach der Elektrophorese wurden die 2-D-Gele mit Coomassie *Brilliant Blue* (siehe Punkt 2.3.8) gefärbt.

#### Rehydratisierungslösung:

6 M Harnstoff (*plus one*-Qualität), 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 0,5% Pharmalyte 3-10, 0,25% Bromphenolblau. Die Lösung wurde in 1 ml Portionen aliquotiert und konnte bei -20°C mindestens 3 Monate aufbewahrt werden. Vor Gebrauch wurden 0,4% DTT dazugegeben.

#### Äquibrierlösung:

50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% (w/v) Glycerin, 2% SDS, pH (HCl) = 6,8

### **2.3.8 Färbung mit Coomassie *Brilliant Blue***

Auf ein- und zweidimensionalen SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5 und 2.3.7) aufgetrennte Proteine wurden nach der Gelelektrophorese mit Coomassie *Brilliant Blue* nach Sambrook *et al.* (1989) sichtbar gemacht. Zunächst wurden die Gele eine Stunde in Fixierlösung und anschließend eine Stunde in Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte über Nacht in 10% Essigsäure. Zur Lagerung wurden die Gele in Folie mit 10% (w/v) Glycerin eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

#### Fixierlösung:

45% Methanol, 10% Essigsäure

#### Färbelösung:

45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,2% Coomassie *Brilliant Blue* G-250

### 2.3.9 Silberfärbung

Die Silberfärbung von eindimensionalen SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5) erfolgte nach Blum *et al.* (1987). Hierfür wurden die Gele eine Stunde in Fixierlösung inkubiert, anschließend dreimal 20 Minuten in 50% Ethanol gewaschen und nach einer einminütigen Vorbehandlung dreimal in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  für 20 Sekunden gespült. Dann wurden die Gele für 20 Minuten gefärbt. Erneutes zweimaliges Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  für je 20 Sekunden ermöglichte die Entwicklung der Gele. Nach Erreichen des gewünschten Färbegrades wurde die Entwicklung mit Stopplösung abgestoppt. Zur Lagerung wurden die Gele in Folie mit 10% (w/v) Glycerin eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

#### Fixierlösung:

50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,5 ml/l Formaldehyd

#### Vorbehandeln:

0,2 g/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### Färbelösung:

2 g/l  $\text{AgNO}_3$ , 0,75 ml/l Formaldehyd

#### Entwickler:

60 g/l  $\text{NaCO}_3$ , 0,5 ml/l Formaldehyd

#### Stopplösung:

50% Methanol, 12% Essigsäure

### 2.3.10 Western Blot

Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurde ein Antikörpernachweis durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese aus den 1-D-SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5) sowie 1-D-Nativ-Gelen (siehe Punkt 2.3.6) in einem "semi-dry-Blot" auf eine PVDF-Membran (Millipore Immobilon P, Roth, Karlsruhe) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in 60%-igem Methanol inkubiert und in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde anschließend auf einen Stapel aus fünf in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer getränkten Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine "semi-dry-Blot"-Apparatur gelegt. Auf die Membran wurde dann sofort luftblasenfrei das Proteingel gegeben. Zum Schluss wurde auf das Gel noch ein weiterer Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Filter-Papieren gelegt und der Proteintransfer auf die Membran bei 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche für eine Stunde durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran

zunächst für eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt und dann für eine weitere Stunde in dem gleichen Puffer mit dem ersten Antikörper (AmtR-, ATPase-, ClpP1-, Enolase-, GlnK- oder Glutaminsynthetase-Antiserum) in einer Verdünnung von 1:10.000 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 Minuten wurde die Membran für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt. Als zweiter Antikörper wurde Anti-Kaninchen IgG (für ClpP1-, Enolase- und GlnK-Antiserum), Anti-Meerschweinchen IgG (für AmtR- und Glutaminsynthetase-Antiserum) oder Anti-Maus IgG (für ATPase-Antiserum) Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma, Steinheim) verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte über Präzipitation eines Farbstoffs auf der Membran. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 Minuten wurden 66 µl NBT-Stammlösung (NBT-Pulver, Roth, Karlsruhe) und 33 µl BCIP-Stammlösung (BCIP-Pulver, Roth, Karlsruhe) in 10 ml Inkubationspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bis zur gewünschten Signalstärke im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  abgestoppt. Zuletzt wurde die Membran auf Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet.

Transferpuffer:

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

Waschpuffer:

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

Blockierungspuffer:

1X Waschpuffer mit 5% Milchpulver

NBT-Stammlösung:

0,5 g p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) wurden in 10 ml 70% Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

BCIP-Stammlösung:

0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) wurden in 10 ml 100% Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  lichtgeschützt gelagert.

Inkubationspuffer:

100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM Tris, pH (NaOH) = 9,5

### 2.3.11 Protein-Reinigung und Interaktionsstudien

#### 2.3.11.1 Gewinnung des Fusionsproteins AmtR-MBP

Zur Reinigung von AmtR aus *C. glutamicum*-Zellen wurde das pMAL Protein Fusion and Purification System (pMAL™ Protein Fusion and Purification System, NEB, Frankfurt/Main) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Klonierung von pMAL-c2amtR erfolgte wie unter Punkt 2.4.1 beschrieben. Der *E. coli*-Stamm BL21 wurde mit dem Plasmid pMAL-c2amtR über die TSS-Methode (siehe Punkt 2.5.4) transformiert. Das *amtR*-Gen wurde *in-frame* stromabwärts des *maltE*-Gens, das für ein Maltose-Bindeprotein kodiert, kloniert, so dass ein Fusionsprotein (AmtR-MBP) synthetisiert wurde. Das AmtR-MBP konnte dann über das Maltose-Bindeprotein an eine Amylose-Säule binden. Eine Elution des Fusionsproteins erfolgte durch eine Zugabe von Maltose, da das Maltose-Bindeprotein eine höhere Affinität zu Maltose hat, als zu Amylose. Gespalten werden konnte die Bindung zwischen AmtR und dem Maltose-Bindeprotein durch eine spezifische Protease, in diesem Fall den Faktor Xa. Für die Reinigung von AmtR-MBP wurde dieses in *E. coli* pMAL-c2amtR heterolog synthetisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Nach der Induktion der Expression von AmtR-MBP durch 1 mM IPTG wurden die Zellen (2 x 250 ml) geerntet (4.000 xg, 15 min, 4°C) und die Pellets bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Präparation des Gesamtzellextraktes aus *E. coli* pMAL-c2amtR wurde das Zellmaterial 30 Minuten auf Eis aufgetaut, jedes Pellet in 12,5 ml Säulenpuffer resuspendiert und mit 600 µl Protease-Inhibitor *Complete* (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Die Suspension wurde in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) für 3 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (20.000 xg, 15 min, 4°C), der Überstand filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die native Aufreinigung von AmtR-MBP erfolgte über Amylose-Resin (pMAL™ Protein Fusion and Purification System, NEB, Frankfurt/Main). Vor Gebrauch wurde das Säulenmaterial einmal mit dem 10-fachen Säulenvolumen Säulenpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit dem filtrierten *E. coli*-Zellextrakt pMAL-c2amtR beladen und der Durchfluss zwecks späterer Analysen bei -20°C eingefroren. Die Bindungskapazität der Amylose-Säule lag nach Herstellerangaben bei 30 bis 45 mg/10 ml Säulenmaterial, so dass für den Auftrag von *E. coli*-Zellextrakt pMAL-c2amtR eine Konzentration von 4,5 mg/ml Säulenmaterial nicht überschritten wurde. Nach dem Auftrag wurde das Säulenmaterial erneut mit dem 10-fachen Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen, um unspezifische Proteine von der Säule zu entfernen. Die Waschfraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt, um die Effizienz der Wasch-

prozedur zu überprüfen. Anschließend wurde das gereinigte AmtR-MBP aus dem *E. coli*-Zellextrakt, das an die Amylose-Resin gebunden hatte, entweder mit dem 10-fachen Volumen an Säulenpuffer, dem 20 mM Maltose zugesetzt wurde, eluiert oder das Säulenmaterial mit gebundenem AmtR-MBP wurde für *Pull-Down* Experimente mit *C. glutamicum*-Zellextrakt (siehe Punkt 2.3.11.4) weiterverwendet. Nach der Elution wurde das Säulenmaterial regeneriert, indem die Amylose-Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und anschließend mit dem 10-fachen Säulenvolumen 30% Ethanol gespült wurde. Das Säulenmaterial konnte ohne einen Verlust der Bindungskapazität drei- bis fünfmal wiederverwendet werden. Alle gesammelten Fraktionen wurden auf eindimensionalen SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5) aufgetrennt und durch eine Coomassie- (siehe Punkt 2.3.8) oder Silberfärbung (siehe Punkt 2.3.9) analysiert. Elutionsfraktionen, welche nur das gereinigte AmtR-MBP-Protein enthielten, wurden mit *Centriplus YM-3*-Konzentratoren (Millipore, Bedford, USA) nach Herstellerangaben bei 4°C konzentriert. Zur Überprüfung des gereinigten Proteins wurde eine Probe auf einem eindimensionalen SDS-Gel (siehe Punkt 2.3.5) aufgetrennt, das Gel mit Coomassie *Brilliant Blue* (siehe Punkt 2.3.8) gefärbt und die Proteinbanden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe Punkt 2.3.12) analysiert.

#### Säulenpuffer:

200 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH (HCl) = 7,4

#### **2.3.11.2 Bestimmung der Amylase-Aktivität**

Amylose-Resin setzt sich aus einzelnen Glukose-Bausteinen zusammen. Amylasen zerstören eine Amylose-Säule, indem sie die Amylose-Resin zu Glukoseeinheiten spalten. Um zu überprüfen, ob im *E. coli*- oder *C. glutamicum*-Zellextrakt Amylasen zu finden waren, wurde ein Test nach Rick & Stegbauer (1974) durchgeführt, in dem mit Hilfe von Dinitrosalicylsäure reduzierende Zucker wie Glukose detektiert werden konnten. Der Test erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **2.3.11.3 Gewinnung der Fusionsproteine AmtR-HIS und GlnD-HIS**

Für Interaktionsstudien über die *Pull-Down* Methode wurden die *C. glutamicum*-Proteine AmtR und GlnD mit einem 6xHIS-*tag* versehen und heterolog in *E. coli* pQE60 synthetisiert. Hierfür kam das Nickel-NTA-System (Qiagen, Hilden) zum Einsatz. Das *amtR*- bzw. *glnD*-Gen wurde stromaufwärts von sechs Histidinresten in den Vektor pQE60 kloniert. Die Plasmide pQE60amtR bzw. pQE60glnD wurden wie unter Punkt 2.4.1 beschrieben konstruiert und der *E. coli*-Stamm JM109 mit diesem transformiert (siehe Punkt 2.5.1). Das Fusionsprotein war in der Lage, über sechs Histidinreste an Nickel-Sepharose zu binden. Eine Elution erfolgte durch Imidazol, das eine höhere Affinität zu Nickel-Ionen besitzt als

Histidin. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Nach der Induktion der Expression von AmtR-HIS bzw. GlnD-HIS durch 1 mM IPTG wurden die Zellen (2 x 250 ml) geerntet (4.000 xg, 15 min, 4°C) und die Pellets bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Präparation des Gesamtzellextraktes aus *E. coli* pQE60amtR bzw. pQE60glnD wurde das Zellmaterial 30 Minuten auf Eis aufgetaut, jedes Pellet in 12,5 ml *His-tag*-Basispuffer resuspendiert und mit 600 µl Protease-Inhibitor *Complete* (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Die Suspension wurde in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSCIENCE, Heidelberg) für 3 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (20.000 xg, 15 min, 4°C), der Überstand filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die native Aufreinigung von AmtR-HIS und GlnD-HIS erfolgte über Nickel-NTA-Resin (Ni-NTA-Sepharose™, Amersham Biosciences, Freiburg). Vor Gebrauch wurde das Säulenmaterial mit dem 10-fachen Säulenvolumen *His-tag*-Basispuffer äquilibriert. Die Säule wurde mit dem filtrierten *E. coli*-Zellextrakt pQE60amtR bzw. pQE60glnD beladen und der Durchfluss zwecks späterer Analysen bei -20°C eingefroren. Die Bindungskapazität der Nickel-NTA-Sepharose lag nach Angaben des Herstellers bei 30 mg/10 ml Säulenmaterial. Alle unspezifisch gebundenen Proteine aus dem *E. coli*-Zellextrakt wurden mit dem 10-fachen Säulenvolumen *His-tag*-Basispuffer mit 40 mM Imidazol entfernt. Die Waschfraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt, um die Effizienz der Waschprozedur zu überprüfen. Dann folgte entweder eine Elution des gereinigten Proteins mit dem 10-fachen Säulenvolumen *His-tag*-Basispuffer mit 500 mM Imidazol oder das Säulenmaterial mit dem gesättigten AmtR-HIS oder GlnD-HIS wurde für *Pull-Down* Experimente mit *C. glutamicum*-Zellextrakt weiterverwendet. Nach der Elution wurde das Säulenmaterial regeneriert, indem die Nickel-NTA-Sepharose mit dem 10-fachen Säulenvolumen Säulenpuffer pH 5, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und zuletzt mit 30% Ethanol gespült wurde. Das Säulenmaterial konnte fünfmal wiederverwendet werden. Alle Fraktionen wurden auf eindimensionalen SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5) aufgetrennt und durch eine Coomassie- (siehe Punkt 2.3.8) oder Silberfärbung (siehe Punkt 2.3.9) analysiert. Elutionsfraktionen, welche nur das gereinigte Protein enthielten, wurden mit *Centriplus YM-3*-Konzentratoren (Millipore, Bedford, USA) nach Angaben des Herstellers bei 4°C konzentriert, auf eindimensionalen SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5) aufgetrennt, die Gele mit Coomassie *Brilliant Blue* (siehe Punkt 2.3.8) gefärbt und die Proteinbanden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe Punkt 2.3.12) identifiziert.

#### *His-tag*-Basispuffer:

300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol, pH (NaOH) = 8,0

#### 2.3.11.4 Pull-Down Experimente mit *C. glutamicum*-Zellextrakt

Interaktionen zwischen Komponenten der Stickstoffkontrolle wurden über *Pull-Down* Experimente untersucht. Das AmtR-Protein bzw. das GlnD-Protein wurden an eine Amylose-Säule oder Nickel-NTA-Säule (siehe Punkt 2.3.11.1 bzw. 2.3.11.3) gebunden, indem das betreffende Protein heterolog in *E. coli* pMAL-c2amtR, pQE60amtR bzw. pQE60glnD exprimiert und dann über eine Affinitätschromatographie an die Säule gekoppelt wurde. Um die *Pull-Down* Experimente zu starten, wurden verschiedene Zellextraktfraktionen von *C. glutamicum* auf die Säule gegeben. Hierfür wurden die Zellen (2 x 250 ml) kultiviert (siehe Punkt 2.2.4) und nach Inkubation bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls geerntet (4.000 xg, 15 min, 4°C). Bis zur weiteren Aufarbeitung konnten die Pellets bei -20°C gelagert werden. Zur Präparation von Gesamtzellextrakt wurde jedes Pellet für 15 min auf Eis aufgetaut und in 12,5 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) für 4 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 xg, 4°C, 25 min) sedimentiert, der Überstand wurde filtriert und die Zellextraktfraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die *Pull-Down* Analysen wurde die Säule, die bereits gereinigtes Protein aus *E. coli*-Zellextrakt gebunden hatte, mit dem *C. glutamicum*-Zellextrakt beladen und der Durchfluss zwecks späterer Analysen bei -20°C aufbewahrt. Der Auftrag von *C. glutamicum*-Zellextrakt erfolgte in einer Konzentration von 1 mg/ml Säulenmaterial, um Interaktionspartner aus dem Zellextrakt zu binden. Die Säule wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen gewaschen und die Waschfraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt. Alle Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt an das Protein auf der Säule gebunden hatten, wurden dann mit dem 10-fachen Säulenvolumen Säulenpuffer für die Amylose-Säule mit 20 mM Maltose (siehe Punkt 2.3.11.1) oder *His-tag*-Basispuffer für die Nickel-NTA-Säule mit 500 mM Imidazol (siehe Punkt 2.3.11.3) mit dem gekoppelten Protein co-eluiert. Alle Fraktionen wurden auf eindimensionalen SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.5) aufgetrennt und durch eine Coomassie- (siehe Punkt 2.3.8) oder Silberfärbung (siehe Punkt 2.3.9) analysiert. Die nach einer Coomassie-Färbung sichtbaren Proteine aus den Elutionsfraktionen wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe Punkt 2.3.12) identifiziert.

#### PBS-Puffer:

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt und die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt.

### 2.3.11.5 Isolierung des GlnK-Proteins mit *Magnetic Beads*

Das GlnK-Protein ist ein Trimer und wird bei schlechter Stickstoffversorgung an jeder Untereinheit modifiziert. Um zu klären, ob es sich bei dieser Modifikation um eine Adenylylierung oder Uridylylierung handelt, wurde das Protein über Protein A-gekoppelte *Magnetic Beads* (Dynabeads<sup>®</sup> Protein A, Dynal Biotech GmbH, Hamburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Protein A ist ein 40 kDa großes Zellwandprotein mit vier Bindestellen für die konstanten Regionen eines Ig-Antikörpers. Für diesen Versuch wurde ein synthetisch hergestelltes 32 kDa großes Protein A eingesetzt, das in der Lage ist, bei einem Einsatz von 100 µl Protein A-gekoppelten *Magnetic Beads*, 25 µg IgG von einer 100 µg IgG/ml Probe zu isolieren. Protein A-gekoppelte *Magnetic Beads* wurden mit einem GlnK-Antikörper (100 µg/ml), isoliert aus Kaninchen, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper konnte dann mit Hilfe von Van-der-Waals-Bindungen über Protein A an die *Magnetic Beads* binden. Unspezifische Proteine wurden mit 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 von den *Magnetic Beads* entfernt. Um das GlnK-Protein in der modifizierten sowie unmodifizierten Form isolieren zu können, wurden die *C. glutamicum*-Zellen unter verschiedenen Stickstoffbedingungen kultiviert (siehe Punkt 2.2.4) und die Zellextrakte (siehe Punkt 2.3.1) präpariert. GlnK wurde aus dem Zellextrakt von *C. glutamicum* isoliert, indem die mit GlnK-Antikörper gesättigten *Magnetic Beads* mit 2 mg/ml Zellextrakt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Unspezifische Proteine wurden mit PBS-Puffer entfernt und der GlnK-Antikörper, das GlnK-Protein, sowie mögliche Interaktionspartner von GlnK mit 100 mM Glycin-HCl pH 2,7 eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem zweidimensionalen SDS-Gel (siehe Punkt 2.3.7) aufgetrennt, das Gel mit Coomassie *Brilliant Blue* (siehe Punkt 2.3.8) gefärbt und die Spots, die nicht zu den Antikörperketten gehörten, wurden ausgeschnitten und über MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe Punkt 2.3.12) identifiziert.

#### PBS-Puffer:

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt und die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt.

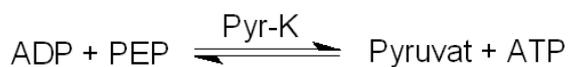
### 2.3.12 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Proteinspots wurden zur Aufnahme eines Peptidmassenspektrums mit *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight*-(MALDI-TOF-)Massenspektrometrie aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten und einem tryptischen oder einem chymotryptischen Verdau unterzogen. Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung von Proteinen über die Massenanalyse des aus dem *in gel*-Verdau resultierenden Peptidgemisches. Die Analysen wurden vom Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin

(ZMMK), Universität zu Köln, durchgeführt. Die monoisotopischen Massen eines Peptid-Fingerprints wurden für eine vergleichende Datenbanksuche mit der *GPMAW Software* (Version 6.0, Lighthouse Data, Odense, DK) verwendet. Bezugspunkt war hierbei das virtuelle, computergestützt tryptisch oder chymotryptisch verdaute Proteom von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Kalinowski *et al.*, 2003). Proteine wurden als identifiziert eingestuft, wenn vier oder mehr Peptide der betreffenden Sequenz detektierbar waren und durch sie mindestens 30% der Aminosäuresequenz abgedeckt war.

### 2.3.13 Bestimmung der physiologischen Glutaminsynthetase-Aktivität

Die physiologische Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) in Zellextrakten von *C. glutamicum* wurde nach Wakisaka *et al.* (1990) bestimmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Bei diesem Test wurden nur die aktiven Untereinheiten der GS, d.h. die nicht durch Adenylylierung deaktivierten Untereinheiten, erfasst. Das Testverfahren beruhte auf folgendem Prinzip (Pyr-K, Pyruvat-Kinase, Lac-DH, Lactatdehydrogenase, PEP, Phosphoenolpyruvat):



Gemessen wurde die Abnahme von NADH bei einer Absorption von 340 nm ( $\epsilon = 6,3 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); 1 U GS-Aktivität entsprach einem Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  NADH/min. Für den Zellaufschluss wurden die *C. glutamicum*-Zellen nach Inkubation bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls geerntet, indem 20 ml Zellkultur abzentrifugiert (4.000 xg, 5 min, 4°C), einmal mit eiskaltem Imidazolpuffer gewaschen (4.000 xg, 5 min, 4°C) und in 700  $\mu\text{l}$  Imidazolpuffer resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde dann in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) pipettiert und durch hochfrequentes Schütteln für 4 x 30 Sekunden bei 6,5 Meter pro Sekunde im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) aufgeschlossen. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (13.000 xg, 4°C, 30 min) konnte der zellfreie Überstand für die Messung verwendet werden. Für den physiologischen Glutaminsynthetase-Test wurde ein 10X konzentriertes Reagenziengemisch angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Für das 10X Reagenziengemisch wurden die folgenden Komponenten zusammenpipettiert:

- 100 µl NADH [15 mM]
- 100 µl Phosphoenolpyruvat [100 mM]
- 125 µl Pyruvatkinase [200 U/mg] (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 18 µl Lactatdehydrogenase [550 U/mg] (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 100 µl Ammoniumchlorid [10 mM]
- 4,56 ml Test-Puffer

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

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

dA: Steigung der Geraden (Auftragung Extinktion gegen Zeit)

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

#### Test-Puffer:

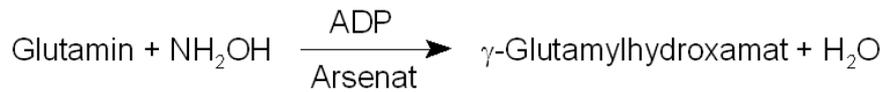
100 mM Imidazol, 10 mM Na-Glutamat, 90 mM KCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, pH (HCl) = 7,0

#### Imidazolpuffer:

100 mM Imidazol, pH (HCl) = 7,0

### **2.3.14 Bestimmung der unphysiologischen Glutaminsynthetase-Aktivität**

Neben ihrer physiologischen Aktivität kann die Glutaminsynthetase (GS) bei der Anwesenheit von ADP und Arsenat auch die charakteristische Transferreaktion von Glutamin und Hydroxylamin zu  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat katalysieren. Das entstandene  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat bildete mit Fe<sup>3+</sup>-Ionen einen bräunlichen Farbkomplex, der photometrisch nachgewiesen werden kann. Die physiologische Reaktion des Enzyms (siehe Punkt 2.3.13) ist dabei vollständig inhibiert.



Für den Test nach Shapiro & Stadtman (1970) wurden die *C. glutamicum*-Zellen wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben kultiviert. 20 ml Zellkultur wurden nach Inkubation bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls geerntet (4.000 xg, 5 min, 4°C), einmal mit Aufschlusspuffer gewaschen (4.000 xg, 5 min, 4°C) und in 700 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) durch hochfrequentes Schütteln für 4 x 30 Sekunden bei 6,5 Meter pro Sekunde im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) aufgeschlossen. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Zentrifugation (13.000 xg, 4°C, 30 min) konnte der zellfreie Überstand für die Messung verwendet werden. Für einen Ansatz wurden 380 µl Testpuffer, 20 µl ADP-Lösung [8 mM] und 10 bis 50 µl Zellrohextrakt zusammenpipettiert und für 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 20 µl Hydroxylamin-Lösung [360 mM]. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stop-Lösung beendet. Pro Verdünnung des Rohextraktes wurde ein Ansatz als 0-Wert mitgeführt, bei dem statt Hydroxylamin  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  zugegeben wurde. Mit diesem Ansatz wurde das Photometer kalibriert. Die Messung des Eisen- $\gamma$ -Glutamylhydroxamat-Komplexes erfolgte bei einer Absorption von 540 nm. Die Menge des gebildeten  $\gamma$ -Glutamylhydroxamates konnte anhand einer Eichreihe von Konzentrationen zwischen 0 und 3 mM  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat ermittelt werden.

Aufschlusspuffer:

2,5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 20 mM Imidazol pH (HCl) = 7,2

Testpuffer:

20 mM Glutamin, 25 mM  $\text{KHAsO}_4$ , 0,27 mM  $\text{MnCl}_2$ , 135 mM Imidazol pH (HCl) = 7,2

Stop-Lösung:

11 g  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 4 g TCA, 4,2 ml 37% HCl wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst und auf 200 ml aufgefüllt.

## 2.4 Molekularbiologische Techniken

### 2.4.1 DNA-Techniken

#### 2.4.1.1 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*

Die Vorkultivierung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt.

#### 2.4.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion. *C. glutamicum*-Zellen wurden über Nacht in 5 ml BHI-Medium (siehe Punkt 2.2.1) angezogen. Morgens wurden die Zellen abzentrifugiert (4.000 xg, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Es wurden 200 µl Phenol zugegeben, der Ansatz gut gemischt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Vor der Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz zunächst für 2 Minuten auf Eis gekühlt, um ein Verdampfen des Lösungsmittels zu verhindern. Dann wurde der Ansatz gemischt und zentrifugiert (13.000 xg, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase verworfen. Zum Ansatz wurden erneut 200 µl Chloroform pipettiert und dieser zentrifugiert (13.000 xg, 5 min, 4°C). Der Überstand mit der gelösten DNA wurde von der organischen Phase getrennt, die DNA 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für eine PCR-Reaktion (siehe Punkt 2.4.1.7) wurde 1 µl chromosomale DNA als "template" in einem 20 µl Ansatz eingesetzt.

#### 2.4.1.3 Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Trennung von Proteinen aus DNA-Lösungen oder die Aufkonzentrierung von gereinigter DNA erfolgte durch Fällung mit Hilfe eines Ethanol-Essigsäure-Gemisches. Dafür wurde dem Nukleinsäureansatz 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,3 und das 3-fache Volumen 100% Ethanol zugesetzt. Nach Inkubation für mindestens eine Stunde bei -20°C wurde die präzipitierte Nukleinsäure zentrifugiert (13.000 xg, 30 min, 4°C), das Pellet zweimal mit 70% Ethanol (13.000 xg, 5 min, 4°C) gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Sediment in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder TE-Puffer aufgenommen.

#### TE-Puffer:

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

#### 2.4.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Größenauftrennung und Qualitäts- sowie Quantitätsbestimmungen von Nukleinsäuren kamen Agarose-Gele mit einer Konzentration von 0,8 bis 2% in 1X TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) zum Einsatz. Die jeweiligen Proben wurden mit 6X Ladepuffer (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und als Referenz zusätzlich ein DNA-Marker aufgetragen (Lambda-DNA/Eco911 (*Bst*(II)-geschnitten), MBI Fermentas, Wilna). Die Gele wurden mit einer Spannung von bis zu 10 V/cm Gellänge aufgetrennt. Die Färbung der Nukleinsäure erfolgte in einem Ethidiumbromidbad und konnte durch einen Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und die Detektion der DNA-Banden erfolgt durch Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ).

##### TAE-Puffer 50X:

242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt und die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt.

##### Ladepuffer 6X:

0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% (w/v) Glycerin

#### 2.4.1.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsenzymen von NEB (Frankfurt/Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden entweder mit dem NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) direkt oder durch Agarose-Gelelektrophorese in TAE-Puffer (siehe Punkt 2.4.1.4) gereinigt. Aus den Agarose-Gelen wurden die interessierenden DNA-Banden nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell unter UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) ausgeschnitten und die DNA wurde unter Verwendung des NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

#### 2.4.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Ready-to-go Ligationsansätzen von Amersham Biosciences (Freiburg) bzw. dem Rapid-DNA-Ligation Kit (MBI Fermentas, Wilna) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Anzahl der Kolonien pro Platte zu maximieren, wurden die Ansätze so gewählt, dass das Insert-Fragment in dreifach höherer Konzentration eingesetzt wurde als das Vektor-Fragment. Für eine Transformation von 200  $\mu\text{l}$  chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz eingesetzt.

### 2.4.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in-vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) eingesetzt. Dazu wurden jeweils zwei Primer (forward, reverse) benutzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung über eine DNA-Polymerase ermöglichte die Synthese des gewünschten DNA-Fragmentes. Die Primer wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) und Operon (Köln) bezogen und in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf eine Konzentration von 100 pmol/ $\mu\text{l}$  gelöst. Routine-Amplifikationen von DNA-Fragmenten in einem Größenbereich von 0,1 bis 2 kb wurden mit der *Taq*-Polymerase aus dem Master-Mix Kit (Qiagen, Hilden) vervielfältigt. Größere DNA-Fragmente, insbesondere vollständige Gene, wurden mit der Phusion-Polymerase aus dem High-Fidelity-PCR Kit (NEB, Frankfurt/Main) amplifiziert, die zusätzlich "proofreading"-Aktivität besitzt. Die "Annealing"-Temperatur wurde auf die beiden Primer (forward, reverse) abgestimmt. Für Guanin und Cytosin mussten 4°C für die Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgebracht werden, für Adenin und Thymin lediglich 2°C. Als "template" diente chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder eine 10 Minuten bei 95°C gekochte Suspension von Zellen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ . Die PCR-Reaktion wurde in Thermocyclern Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) oder in Gene Amp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, USA) durchgeführt.

Ein 20  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz mit der *Taq*-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

10  $\mu\text{l}$  Master-Mix (Qiagen, Hilden)  
1  $\mu\text{l}$  Primer forward [10  $\mu\text{M}$ ]  
1  $\mu\text{l}$  Primer reverse [10  $\mu\text{M}$ ]  
1  $\mu\text{l}$  "template"  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  ad 20  $\mu\text{l}$

Zur Amplifikation wurde das "template" zunächst 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation des Fragmentes durch eine Wiederholung der folgenden Schritte: Jeder Zyklus begann mit einer kurzen Denaturierungsphase bei 95°C für 30 Sekunden. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der beiden Primersequenzen (forward, reverse) an die komplementären Sequenzen des DNA-Fragmentes, indem die Temperatur für 30 Sekunden auf die "Annealing"-Temperatur erniedrigt wurde. Es erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 72°C für eine Minute pro kb zu synthetisierendes DNA-Fragment. Durch die Polymerase wurde das Fragment synthetisiert bis ein vollständiger Doppelstrang gebildet war ("Extension"). Die letzten drei Schritte wurden wiederholt und das DNA-Fragment in 30 Temperaturzyklen amplifiziert. Zuletzt wurde die Temperatur auf 72°C

für 10 Minuten gehalten und die Synthese beendet. Bis zur Entnahme des fertigen PCR Produkts konnte dieses bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden, um die Entstehung von Einzelsträngen zu vermeiden. Zur Analyse der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurden die PCR-Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die Elektrophorese in TAE-Puffer (siehe Punkt 2.4.2.4) durchgeführt.

Für einen 20 µl PCR-Ansatz mit der Phusion-Polymerase wurde folgendes pipettiert:

- 4 µl 5X Phusion-HF-Puffer (NEB, Frankfurt/Main)
- 0,4 µl dNTPs [10 mM]
- 0,2 µl Phusion-DNA-Polymerase [2 U/µl] (NEB, Frankfurt/Main)
- 1 µl Primer forward [1 µM]
- 1 µl Primer reverse [1 µM]
- 1 µl "template"
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 20 µl

Für den Ansatz mit der Phusion-Polymerase wurde das "template" zunächst für 30 Sekunden bei 98°C denaturiert. Das DNA-Fragment wurde wie folgt amplifiziert: Der Denaturierungsphase bei 98°C für 8 Sekunden folgte die Hybridisierung der beiden Primersequenzen (forward, reverse) bei 63°C für 20 Sekunden. Durch eine Temperaturerhöhung auf 72°C für 30 Sekunden pro kb wurde das Fragment synthetisiert. Die Wiederholung der letzten drei Schritte führte zu einer Amplifikation des DNA-Fragmentes in 30 Temperaturzyklen. Die übrigen Schritte erfolgten wie für die PCR-Reaktion mit der *Taq*-Polymerase beschrieben.

Ein 50 µl PCR-Ansatz mit der *PfuTurbo*-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl 10X Cloned *PfuTurbo*-DNA-Polymerase Reaktionspuffer  
(Stratagene, La Jolla, USA)
- 1,2 µl dNTPs [10 mM]
- 1 µl *PfuTurbo*-DNA-Polymerase [2,5 U/µl]  
(Stratagene, La Jolla, USA)
- 2,5 µl Primer forward [10 µM]
- 2,5 µl Primer reverse [10 µM]
- 1 µl "template"
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 50 µl

Die PCR-Reaktion für die ortsgerichtete Mutagenese des *GlnK*-Proteins wurde mit der *PfuTurbo*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt, die wie die Phusion-Polymerase "proofreading"-Aktivität besitzt. Unter Verwendung zweier Primer, in deren Sequenz die gewünschte Mutation eingebaut worden war, wurde das vollständige Plasmid pEKEX2*glnK* amplifiziert. Für den Ansatz mit der *PfuTurbo*-Polymerase wurde das "template" zunächst für 30 Sekunden bei 95°C denaturiert. Das vollständige Plasmid pEKEX2*glnK* wurde wie folgt amplifiziert: Der Denaturierungsphase bei 95°C für 30 Sekunden folgte die Hybridisierung der beiden Primersequenzen (forward, reverse) mit der gewünschten Mutation bei 55°C für eine Minute. Eine Temperaturerhöhung auf 68°C für 12 Minuten hatte die Synthese des Plasmids zur Folge. Durch die Wiederholung der letzten drei Schritte konnte das vollständige Plasmid in 18 Temperaturzyklen amplifiziert werden. Zuletzt wurde die Temperatur auf 68°C für 7 Minuten gehalten, die PCR so beendet und die Temperatur auf 4°C abgekühlt. Das fertige PCR-Produkt wurde direkt weiterverwendet (siehe Punkt 2.4.1.8).

#### 2.4.1.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde durchgeführt, um im *glnK*-Gen bestimmte Aminosäuren auszutauschen, die für eine Interaktion, Modifikation oder für die Struktur selbst wichtig sind. Hierfür wurde das zu mutagenisierende DNA-Fragment, das *glnK*-Gen, in den Vektor pEKEX2 kloniert und die Richtigkeit der Basensequenz durch Sequenzierung bestätigt. Eine Amplifikation des vollständigen Plasmids pEKEX2*glnK* erfolgte über eine PCR-Reaktion mit der "proofreading"-Polymerase *PfuTurbo* (Stratagene, La Jolla, USA) unter Verwendung zweier Primer, in deren Sequenz die gewünschte Mutation eingebaut worden war (siehe Punkt 2.4.1.7). Anschließend wurde die "template"-DNA (pEKEX2*glnK*) durch Restriktion mit *DpnI*, einem Restriktionsenzym, das nur methylierte und hemimethylierte DNA als Substrat akzeptiert (Nelson & McClelland, 1992), bei 37°C in einer Stunde abgebaut. Die verbleibende nichtmethylierte DNA enthielt im *sense* sowie *antisense* Strang die gewünschte Mutation. Mit 2 µl dieses Ansatzes wurden dann 200 µl chemisch kompetente *E. coli* DH5α*mcr* transformiert (siehe Punkt 2.5.1 und 2.5.3) und die nach der PCR-Reaktion noch offenen Enden des Plasmids von einer zelleigenen Ligase verknüpft. Nach einer Plasmid-Präparation (siehe Punkt 2.4.1.1) wurde das Vorhandensein der gewünschten Mutation durch Sequenzierung (siehe Punkt 2.4.1.11) überprüft. Das mutierte *glnK*-Gen wurde aus dem über PCR mitamplifizierten Vektor pEKEX2 herausgeschnitten und in den Originalvektor pEKEX2 kloniert, um die Richtigkeit der Vektorsequenz zu gewährleisten und eine vollständige Sequenzierung des über PCR amplifizierten Vektors zu umgehen.

### 2.4.1.9 Gelretardationsexperimente

Zum Nachweis der Bindung des AmtR-Proteins an die Promotorregionen stickstoffregulierter Gene wurden Gelretardationsexperimente eingesetzt. Hierbei wurde ein DNA-Fragment mit der putativen AmtR-Bindestelle in einem Bindungsansatz mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert und danach auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Hatte das Protein an das DNA-Fragment gebunden, so zeigte der Protein-DNA-Komplex gegenüber der freien DNA ein verzögertes Laufverhalten im Gel. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in denen bestimmte Mengen von *C. glutamicum* Zellextrakten, Elutionsfraktionen aus *Pull-Down* Experimenten oder Substanzen in steigender Molarität zu dem DNA-Protein-Ansatz zugegeben wurden. Diese Proteine oder Metabolite sollten für eine Auflösung des Komplexes zwischen DNA und Protein sorgen. Die freie DNA zeigte in diesem Fall ein schnelleres Laufverhalten als das gebundene DNA-Fragment und kann so von dem DNA-Protein-Komplex unterschieden werden. Für die eingesetzte DNA wurde jeweils ein Bereich von 150 bis 200 bp aus der Promotorregion (siehe Tab. 2.4) über PCR amplifiziert (siehe Punkt 2.4.1.7), über ein Agarose-Gel gereinigt (siehe Punkt 2.4.1.4) und anschließend durch Verwendung des DIG Gel Shift Kit, 2<sup>nd</sup> Generation (Roche Diagnostics, Mannheim) am 5`-Ende mit Digoxigenin (DIG) nach Angaben des Herstellers markiert.

**Tab. 2.4: Übersicht über die Größe der untersuchten Bindesequenzen.**

Promotorregion	Größe der Fragmente	Primer (5´-3´)
<i>amtB</i>	173 bp	5´-ccttttgggattgacacc-3´ 5´-ttgcctgggtaccacc-3´
<i>gltB</i>	197 bp	5´-ggtggataggcgaacatc-3´ 5´-ccttgtggttcatgcgg-3´

Die Bestimmung der Konzentration der DNA erfolgte mit Hilfe der Extinktion bei 260 und 280 nm im Photometer. Für die Labeling-Reaktion wurden 100 ng gereinigtes PCR-Fragment eingesetzt und die Effizienz der DIG-Markierung überprüft, indem die Signalstärken (Detektion siehe unten) mit einer Kontroll-DNA (Kontroll-Oligonukleotid, doppelsträngig, 39mer, unmarkiert, Roche Diagnostics, Mannheim) verglichen wurden. Die Konzentration sollte bei 4 ng/µl liegen. Für die Gel-Shift Reaktionen wurde das markierte DNA-Fragment 1:10 in TEN-Puffer verdünnt. Das AmtR-Protein wurde über eine Affinitätschromatographie mit Hilfe eines 6xHIS-*tag* in nativer Form isoliert (siehe Punkt 2.3.11.3). Die Zellextrakte wurden wie für eine Proteinpräparation hergestellt (siehe Punkt 2.3.1), die Elutionsfraktionen aus den *Pull-Down* Experimenten übernommen (siehe Punkt 2.3.11.4) und die möglichen Metabolite in einer Konzentration von 10 bis 100 mM eingesetzt.

Ein 10 µl Ansatz mit dem DIG Gel Shift Kit setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl     Bindepuffer 5X (Roche Diagnostics, Mannheim)  
1 µl     DIG-markiertes DNA-Fragment [0,4 ng/µl]  
5-50 ng aufgereinigtes AmtR-HIS  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 10 µl

Zu dem DNA-Protein-Komplex wurden dann entweder 25 bis 100 µg des Zellextraktes oder der Elutionsfraktion gegeben oder es wurden Substanzen in steigender Molarität (10-100 mM) zugesetzt. Anschließend wurde jeder Ansatz auf ein Volumen von 10 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ergänzt. Es erfolgte eine Inkubation der Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Elektrophorese wurden 6%-ige Tris-Borat-Fertiggele verwendet (Anamed, Darmstadt). Als Laufpuffer kam 0,5X TBE-Puffer zum Einsatz (Sambrook *et al.*, 1989). Vor dem Auftrag wurde den Ansätzen je 2,5 µl Gelladepuffer mit Bromphenolblau (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben, die Proben auf das nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt bis der Bromphenolblau-Marker den unteren Gelrand erreicht hatte. Für den Transfer wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Nylon Membranes positively charged, Roche Diagnostics, Mannheim), die vor Gebrauch zum Äquilibrieren in 0,5X TBE-Puffer getränkt wurde, auf einen Stapel aus drei in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in 0,5X TBE-Puffer getränkten Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine "semi-dry-Blot"-Apparatur gelegt. Auf die Membran wurde dann sofort luftblasenfrei das DNA-Proteingel gegeben. Zum Schluss wurde auf das Gel noch ein weiterer Stapel aus drei in 0,5X TBE-Puffer getränkten Filter-Papieren gelegt und der Transfer auf die Membran bei 300 mA und 30 V für eine Stunde durchgeführt. Danach wurde die Membran auf einem mit 2X SSC befeuchteten Filter-Papier für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und durch zweimalige Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Energiedosis von 125 mJ/cm<sup>2</sup> in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg, Einstellung "preset 0") fixiert. Die Blockierung der Membran erfolgte 30 Minuten in 1X Blocking-Reagenz. Anschließend wurde dem Blocking-Reagenz Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubationszeit folgten zwei Waschgänge in Waschpuffer für jeweils 15 Minuten. Zur Detektion wurde die Membran zunächst für 3 Minuten in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend mit CSPD-Lösung benetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nachdem die Membran für 15 Minuten bei 37°C inkubiert worden war, erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Fuji *luminescent image analyzer* LAS 100 (Raytest, Straubenhardt). Für die Auswertung der Signale wurde die Software AIDA 2.11 (Raytest, Straubenhardt) benutzt.

TEN-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH (HCl) = 8,0

TBE-Puffer 5X:

54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt und die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt.

20X SSC:

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

10X Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden in 100 ml Maleinsäurepuffer suspendiert und durch Erwärmen auf 60°C gelöst. Nach dem Autoklavieren für 20 Minuten bei 121°C wurde die fertige Lösung bei Bedarf in Maleinsäurepuffer weiter verdünnt.

Maleinsäurepuffer:

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

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3% 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, Mannheim) in Detektionspuffer.

**2.4.1.10 Interaktionsstudien mit dem *Two-Hybrid* System**

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen unterschiedlichen Komponenten der Stickstoffkontrolle wurde das BacterioMatch II *Two-Hybrid* System gewählt (*BacterioMatch*<sup>®</sup> II *Two-Hybrid* System Vector Kit, Stratagene, La Jolla, USA) und nach Angaben des Herstellers angewendet. Dieses *E. coli*-System ist in der Lage, Protein-Protein Interaktionen zu detektieren, indem die Transkription bestimmter Gene aktiviert wird. Ein Gen, das für einen der beiden möglichen Interaktionspartner (Köder oder *bait*) kodiert, wurde so in den Vektor pBT stromabwärts des Gens für das Bacteriophage  $\lambda$ cl Repressor-Protein ( $\lambda$ cl, 237 Aminosäuren) kloniert, dass es *in-frame* mit diesem zusammen abgelesen wurde. Das Repressor-Protein besteht aus einer aminoterminalen DNA-Bindedomäne und einer

carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne. Das Gen für den anderen möglichen Interaktionspartner (Ziel oder *target*) wurde in den Vektor pTRG stromaufwärts des Gens, das für die  $\alpha$ -Untereinheit einer RNA-Polymerase (RNAP $\alpha$ , 248 Aminosäuren) kodiert, *in-frame* kloniert, so dass auch diese beiden Gene gemeinsam abgelesen wurden und ein Fusionsprotein entstand. Beide rekombinanten Vektoren wurden in einem Reporterstamm (*BacterioMatch*<sup>®</sup> II Screening Reporter Competent Cells, Stratagene, La Jolla, USA) co-exprimiert. Wenn nun die beiden ausgewählten Proteine (*bait* und *target*) miteinander interagierten, wurde die Bindung der RNA-Polymerase  $\alpha$  auf dem Promotorbereich der DNA durch die Bindung des  $\lambda$ cl Repressor-Proteins stabilisiert und die Transkription des *HIS3* Reportergens aktiviert. Zusätzlich wurde noch ein zweites Gen, *aadA*, transkribiert, das für eine Resistenz gegen Streptomycin kodiert, und so eine einfache Selektion bei einer Interaktion der ausgewählten Proteine ermöglichte.

Die Gene, die für mögliche Interaktionspartner kodieren, wurden über PCR (siehe Punkt 2.4.1.7) amplifiziert und mit Hilfe der Multiple Cloning Site von pBT sowie pTRG *in-frame* nach Angaben des Herstellers in die entsprechenden Vektoren ligiert (siehe Punkt 2.4.1.4 und 2.4.1.5). Die Transformation erfolgte in *E. coli* JM110 (siehe Punkt 2.5.1 und 2.5.3). Nach einer Plasmid-Präparation (siehe Punkt 2.4.1.1) wurde die Richtigkeit des rekombinanten Vektors durch Sequenzierung (2.4.1.11) überprüft. Für die abschließende Co-Transformation wurden 50 ng des rekombinanten pBT-Vektors und des rekombinanten pTRG-Vektors eingesetzt und die Co-Transformation in den Reporterstamm nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmidkonzentration wurde mit Hilfe der Extinktion bei 260 und 280 nm im Photometer ermittelt. Die Effizienz der Transformation des Reporterstammes wurde durch die beiden Kontrollplasmide pBT-LGF2 und pTRG-GAL11P überprüft, welche die Gene des Gal4- und Gal11-Proteins exprimierten, die untereinander eine deutliche Interaktion zeigten. Um auszuschließen, dass die rekombinanten Vektoren bereits mit dem Leervektor pBT oder pTRG eine Interaktion zeigten, wurden alle rekombinanten Plasmide zusätzlich mit den entsprechenden Leervektoren co-transformiert. Die Auswertung der Tests erfolgte nach Angaben des Herstellers, indem die Anzahl der Kolonien auf nicht-selektivem Medium in Verhältnis zur Anzahl der Kolonien auf selektivem Medium gesetzt wurde (*BacterioMatch*<sup>®</sup> II *Two-Hybrid* System Vector Kit, Stratagene, La Jolla, USA).

#### 2.4.1.11 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 5  $\mu$ l Probe mit 1  $\mu$ l Primer (10  $\mu$ M) verdünnt und ins Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin (ZMMK), Universität zu Köln, gegeben. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit den Programmen Sci Ed Central for Windows 95 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) und Chromas Lite Version 2.0 (Technelysium, Tewantin, Australien) ausgewertet.

## 2.4.2 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 40 Minuten bei 121°C autoklaviert.

### 2.4.2.1 Präparation von Gesamt-RNA und RNA-Gelelektrophorese

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*-Stämmen wurde das NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt. Die Zellanzucht für die RNA-Präparationen erfolgte wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Nach Kultivierung unter guter Stickstoffversorgung, sowie bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls wurden je 1 ml Proben entnommen und abzentrifugiert (13.000 xg, 30 s, 4°C). Die Zellen wurden vom Überstand getrennt und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurden die Pellets in 350 µl RA1-Puffer mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol (NucleoSpin RNAII-Kit, Macherey-Nagel, Düren) resuspendiert und in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2-0,3 mm) pipettiert. Hierauf erfolgte der Zellaufschluss durch hochfrequentes Schütteln der Röhrchen im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) für 2 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurde die Zellsuspension für 3 Minuten auf Eis inkubiert und die Proben danach durch Zentrifugation (13.000 xg, 2 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde mit 350 µl 100% Ethanol versetzt, gut gemischt und auf die Säulen des NucleoSpin RNAII-Kits gegeben. Weitere Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers, wobei die RNA während der Präparation routinemäßig mit DNase behandelt wurde, um Kontaminationen durch chromosomale DNA zu entfernen. Die Elution erfolgte in 80 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der RNA-Proben wurde im Photometer gemessen und die Qualität über eine denaturierende Gelelektrophorese kontrolliert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine 1:50 Verdünnung der RNA-Probe in einer UV-Küvette bei 260 sowie 280 nm vermessen und die Konzentration in mg/ml berechnet. Für die Gelelektrophorese wurden 5 µl der RNA-Probe mit 20 µl Gelladepuffer vermischt, 10 Minuten bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1X MOPS-Puffer. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von bis zu 10 V/cm durchgeführt. Die Detektion erfolgte wie bei einem DNA-Agarose-Gel, da das Ethidiumbromid als Bestandteil des Gelladepuffers auch in die RNA interkalierte. Bei erfolgreicher RNA-Präparation waren auf dem Gel für jede Probe zwei charakteristische Banden sichtbar, eine für die 16SrRNA und eine für die 23SrRNA, die durch einen Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht und dokumentiert werden konnten.

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 % (w/v) Glycerin, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) wurden mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt.

Formaldehyd-Agarose-Gel:

0,9 g Agarose, 10 ml 10X MOPS-Puffer, 16 ml 37% Formaldehyd wurden RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt.

**2.4.2.2 RNA-Hybridisierungen**

Eine Untersuchung der Veränderung des Expressionsmusters verschiedener Gene erfolgte über RNA-Hybridisierungen (Dot Blots). Pro Dot wurden jeweils gleiche RNA-Mengen aufgetragen. 2,5 µg Gesamt-RNA wurden in 100 µl Bromphenolblau-markiertem 10X SSC verdünnt. Die positiv geladene Nylonmembran (Nylon Membranes positively charged, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde vor Gebrauch zum Äquilibrieren in 10X SSC getränkt und die Dot-Blot Apparatur (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) gründlich mit deionisiertem RNase-freiem H<sub>2</sub>O gewaschen. Auf die Siebplatte der Apparatur wurde zuerst ein mit 10X SSC befeuchtetes Filter-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt und darauf luftblasenfrei die feuchte Membran gegeben. Der Zusammenbau der Apparatur erfolgte, indem die Absaugplatte auf die Nylonmembran gespannt wurde. Durch Anlegen eines Vakuums an die Apparatur wurden durch alle zu benutzenden Löcher 400 µl 10X SSC bei 100 mbar gesaugt. Danach wurden die verdünnten RNA-Proben aufgetragen und bei 15 mbar langsam auf die Membran transferiert. Zum Trocknen der Membran wurde die Pumpleistung noch für einige Minuten auf 100 mbar erhöht, bevor die RNA durch UV-Bestrahlung im Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) zweimal fixiert wurde (125 mJ/cm<sup>2</sup>, Einstellung "preset 0"). Die Hybridisierung der Membran erfolgte in einem Hybridisierungsröhrchen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei 50°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Danach wurde die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde in derselben Lösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 68°C hybridisiert. Die Lösungen, die für die RNA-Hybridisierungen benötigt wurden, sind unter Punkt 2.4.2.4 aufgelistet.

### 2.4.2.3 Northern Blot Analysen

Durch Northern Blot Analysen wurden verschiedene mRNA-Spezies nach einer Größentrennung mit spezifischen Sonden detektiert. Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte über eine 1%-ige Agarose-Gelelektrophorese in einem Phosphatpuffer-System. Als erstes wurden die RNA-Proben mit deionisiertem Glyoxal denaturiert. Hierfür wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 4 µl 40% Glyoxal, 10 µl 100% DMSO und 2 µl 10X Phosphatpuffer gemischt und eine Stunde bei 50°C inkubiert. Als RNA-Größenmarker wurde eine High-Range-RNA-Ladder (RNA Ladder High Range, 200-6000 bp, MBI Fermentas, Wilna) eingesetzt, die analog den RNA-Proben glyoxyliert wurde. Nach der Denaturierung wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit 5 µl Auftragspuffer versetzt. Nach Auftragen der denaturierten Proben erfolgte die Gelelektrophorese mit einer Spannung von 3 bis 5 V/cm. Der pH-Wert des Laufpuffers wurde durch Umdrehen des Gels und Umpolen der Gelkammer, jeweils nach 30 Minuten, konstant gehalten. Nachdem die Bromphenolblau-Bande das untere Drittel des Gels erreicht hatte, wurde die Gelelektrophorese gestoppt und das Gel 10 Minuten in 10X SSC äquilibriert. Anschließend wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nylon Membranes positively charged, Roche Diagnostics, Mannheim), die zuvor für jeweils 10 Minuten in RNase-freiem H<sub>2</sub>O und 10X SSC inkubiert worden war, in die Vaku-Blot-Apparatur (LKB VakuGene XL, Amersham Pharmacia, Freiburg) gelegt. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte bei 50 mbar über einen Zeitraum von 2 Stunden, wobei das Gel ständig mit 10X SSC bedeckt wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran für 10 Minuten auf Filter-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet und dann zweimal im UV-Crosslinker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) fixiert (125 mJ/cm<sup>2</sup>, Einstellung "preset 0"). Jetzt wurden die ribosomalen RNA-Banden und der Größenmarker über eine Methylenblaufärbung sichtbar gemacht. Es folgten die Inkubation der Membran für 2 Minuten in Färbelösung und die Entfärbung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Die angefärbten Banden wurden fotografiert.

Für die folgende Sonden-Hybridisierung musste die RNA zuerst deglyoxyliert werden. Die Membran wurde dafür in ein Hybridisierungsröhrchen mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0 gegeben und für 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Dann wurde sie zweimal mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O gewaschen und für eine Stunde bei 50°C im Hybridisierungsofen in Prähybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Zuletzt wurde die Sonde in der Lösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 68°C hybridisiert. Die Lösungen, die in Northern Blot Analysen eingesetzt wurden, sind unter Punkt 2.4.2.4 aufgeführt.

#### 2.4.2.4 Wasch- und Detektionsschritte, RNA-Hybridisierungen und Northern Blot Analysen

Nach der Hybridisierung der anti-sense-Sonde mit der RNA wurde die Membran (Nylon Membranes positively charged, Roche Diagnostics, Mannheim) zur Entwicklung der Blots zweimal in Waschlösung 1 bei Raumtemperatur für je 15 Minuten gewaschen und dann in Waschlösung 2 zweimal bei 68°C für je 25 min inkubiert. Nach Waschen mit Waschpuffer für 5 Minuten erfolgte eine Inkubation der Membran für 35 Minuten bei Raumtemperatur in 1X Blocking-Reagenz. Hierauf wurde Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 gegeben und weitere 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper-Konjugat wurde dreimal in Waschpuffer für je 20 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 Minuten in Detektionspuffer äquilibriert. Zum Nachweis der Hybridisierung wurde die Membran mit CSPD-Lösung benetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C konnten die Signale mit Hilfe eines Fuji *luminescent image analyzer* LAS 100 (Raytest, Straubenhardt) detektiert werden. Für die Auswertung der Signale wurde die Software AIDA 2.11 (Raytest, Straubenhardt) benutzt.

##### Prähybridisierungslösung:

50 ml Formamid, 20 ml 10X Blocking-Reagenz, 25 ml 20X SSC, 1 ml 10% Na-Lauroyl-sarkosinat, 200 µl 10% SDS wurden in RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt.

##### 20X SSC:

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

##### 10X Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden in 100 ml Maleinsäurepuffer suspendiert und durch Erwärmen auf 60°C unter Rühren gelöst. Nach dem Autoklavieren wurde die fertige Lösung bei Bedarf in Maleinsäurepuffer weiter verdünnt.

##### Waschlösung 1:

2X SSC, 0,1% SDS

##### Waschlösung 2:

0,2X SSC, 0,1% SDS

##### Maleinsäurepuffer:

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

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3% 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, Mannheim) in Detektionspuffer.

10X Elektrophoresepuffer:

Lösung A: 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Lösung B: 0,2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

255 ml Lösung A wurden mit 245 ml Lösung B gemischt und auf einen Liter mit RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Der pH-Wert sollte bei 6,8 liegen.

Auftragspuffer:

50% (w/v) Glycerin, 0,05% Bromphenolblau in 1X Phosphatpuffer

Methylenblau-Färbelösung:

0,5 M Na-Acetat, 5% Essigsäure, 0,04% Methylenblau

Glyoxal-Deionisierung:

Ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde zu einem Drittel mit AG 501-x8 Resin (Biorad, München) gefüllt und mit Glyoxal aufgefüllt. Nach 3-minütiger Inkubation wurde das Glyoxal in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit AG 501-x8 Resin überführt und wiederum 3 Minuten inkubiert. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis der pH-Wert des Glyoxals bei 5 lag. Das Glyoxal wurde dann in 20  $\mu\text{l}$  Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

**2.4.2.5 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 0,3 bis 1,0 kb großes Fragment des entsprechenden Gens in den Vektor pGEM3z kloniert (Promega, Mannheim). Dieser Vektor enthält beiderseits der "multiple-cloning-site" Promotoren der RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7. Für die *in-vitro*-Transkription wurde das pGEM3z-Plasmid mit dem *insert* für die Sondenherstellung am entgegengesetzten Ende der "multiple-cloning-site" des zu benutzenden Promotors (stromabwärts vom 3'-Ende des

*inserts*) mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert (siehe Punkt 2.4.1.5) und diente nach einer Reinigung über Agarose-Gelelektrophorese (siehe Punkt 2.4.1.4) als "template" in einem *in-vitro*-Transkriptionsansatz. Zur Markierung der entstehenden RNA-Sonden wurde Digoxigenin-11-dUTP eingesetzt.

Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µg linearisiertes Plasmid in RNase-freiem H<sub>2</sub>O
- 2 µl 10X DIG-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 2 µl 10X RNA-Polymerase-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 2 µl SP6- oder T7-RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNase-freies H<sub>2</sub>O ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt, kurz anzentrifugiert und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase (Roche Diagnostics, Mannheim) und weiteren 25 Minuten Inkubation bei 37°C abgebaut. Die fertige RNA-Sonde wurde bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Hybridisierung wurden 2 µl Sonde in 15 ml Prähybridisierungslösung eingesetzt.

Der Nachweis der RNA-Sonden erfolgte über eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden Agarose-Gel analog Punkt 2.4.2.1. 5 µl der RNA-Sonden wurden mit 20 µl Gelladepuffer gemischt, 10 Minuten bei 70°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als RNA-Marker diente eine Low-Range-RNA-Ladder (RNA Ladder Low Range, 100-1000 bp, MBI Fermentas, Wilna), die analog zu den RNA Proben behandelt wurde.

#### **2.4.2.6 Quantitative *real-time* RT-PCR**

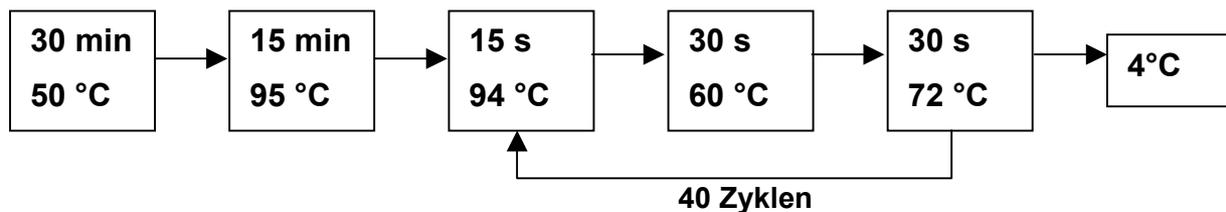
Die *real-time* RT-PCR Experimente wurden im *ICycler* (Biorad, München) durchgeführt. Es wurde die relative Veränderung spezifischer mRNAs in den Zellen ermittelt, indem zunächst in einer Reverse-Transkriptase-Reaktion die RNA in cDNA umgewandelt wurde und die Produktzunahme in einer anschließenden PCR durch eine fluorimetrische Echtzeitbestimmung erfasst wurde. Als "template" wurden 100 ng DNA-freie Gesamt-RNA (siehe Punkt 2.4.2.1) eingesetzt. Die Detektion des entstehenden DNA-Produktes geschah mit Hilfe des interkalierenden Fluorophoren „SYBR Green 1“, der sich nur in doppelsträngige DNA einlagert und unter diesen Umständen eine erhöhte Fluoreszenz aufweist. Für die *real-time* PCR wurde das QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR KIT (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Primer wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) und Operon (Köln) bezogen und in RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Die

Größe der amplifizierten DNA-Fragmente betrug jeweils 100 bp, da nur so eine gleichbleibende Effizienz der Polymerase gewährleistet werden konnte.

Für einen 20  $\mu$ l *real-time* RT-PCR-Reaktionsansatz wurde folgendes zusammen pipettiert:

- 10  $\mu$ l 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Hilden)
- 1  $\mu$ l Primer forward [1  $\mu$ M]
- 1  $\mu$ l Primer reverse [1  $\mu$ M]
- 0,2  $\mu$ l QuantiTect RT Mix (Qiagen, Hilden)
- 100 ng "template" Gesamt-RNA
- RNase-freies H<sub>2</sub>O ad 20  $\mu$ l

Die *real-time* PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:



Im ersten Schritt erfolgte die Übersetzung der mRNA in cDNA bei 50°C, dann folgte eine Denaturierung des DNA/RNA Hybrids bei 95°C, bevor die cDNA in 40 Zyklen amplifiziert wurde. Nach jedem Zyklus wurde die Zunahme des PCR-Produktes anhand des Anstiegs der Fluoreszenz gemessen, der durch die Einlagerung des SYBR Green Farbstoffes in die DNA detektierbar war. Am Ende der *real-time* PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität und die Reinheit des erhaltenen Produktes zu prüfen. Alle Proben wurden jeweils als Dreifachbestimmungen vermessen. Die Qualität der Läufe wurde über PCR und *no template*-Kontrollen gewährleistet. Zur Auswertung der einzelnen Läufe wurde der Bereich der linear-logarithmischen Produktbildung bestimmt, bei der das Signal aus der Hintergrundfluoreszenz hervortrat ( $C_t$ -Wert). Für eine spätere Normalisierung der erhaltenen Daten auf das Referenzgen mussten die PCR-Effizienzen für alle Produkte ermittelt werden. Hierfür wurde für jedes Primerpaar eine DNA-Verdünnungsreihe über vier dekadische Potenzen (1-1000 ng DNA) aufgestellt und anschließend als Dreifachbestimmung vermessen.

#### 2.4.2.7 RNase-freier DNase-Verdau

Um RNA-Proben für *real-time* PCR oder Northern-Blot Analysen von DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde ein RNase-freier-DNase-Verdau mit der TURBO-DNase (Ambion, Austin, USA) durchgeführt. Hierfür wurde die RNA-Probe nach der Präparation mit dem NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) in 100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurden 10 µl 10X TURBO DNase-Puffer und 1 µl TURBO-DNase (2 Units/µl) zur isolierten RNA-Probe gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine zweite Aufreinigung der RNA mit dem NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt, um die störenden Proteine zu beseitigen.

### 2.5 Techniken zur Manipulation von Zellen

#### 2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Zunächst wurden *E. coli*-Zellen tagsüber in 20 ml LB-Medium (siehe Tab. 2.3) kultiviert; von dieser Vorkultur wurden abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) in einen 2 l Schüttelkolben gegeben und die Zellen unter Schütteln über Nacht bei 22°C angezogen. Morgens, als die Zellen ungefähr eine optische Dichte von 0,6 hatten, wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4.000 xg, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4.000 xg, 10 min, 4°C) und in 6,4 ml TB-Puffer resuspendiert. Langsam wurden 0,4 ml 100% DMSO zugegeben, die Zellen in 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### TB-Puffer:

10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH (KOH) = 6,7

#### SOB-Medium:

5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,125 g NaCl, 625 µl 1 M KCl wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 250 ml aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren für 20 Minuten bei 121°C wurden 1,25 ml steriles 2 M MgCl<sub>2</sub> zugegeben.

### 2.5.2 Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl *et al.* (1989) hergestellt. Die Zellen wurden tagsüber in 5 ml LB-Medium (siehe Tab. 2.3) mit 2% Glukose vorkultiviert. Aus dieser Vorkultur wurden abends 200 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren in einem 2 l Schüttelkolben auf eine optische Dichte von 0,2 bis 0,3 angeimpft. Die Zellen wurden dann unter Schütteln (200 rpm) über Nacht bei 22°C angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach 10-minütiger Kühlung auf Eis abzentrifugiert (4.000 xg, 5 min, 4°C) und in 80 ml 10%-igem (v/v) sterilem, eiskaltem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (4.000 xg, 5 min, 4°C) und die Waschprozedur in 10%-igem (v/v) sterilem, eiskaltem Glycerin viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellpellets in 1 ml 10%-igem (v/v) sterilem, eiskaltem Glycerin resuspendiert, in 100 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

#### LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren:

2 g Trypton, 1 g Hefeextrakt, 1 g NaCl, 5 g Glycin, 0,8 g Isonicotinsäurehydrazid, 200 µl Tween 80 wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 200 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

### 2.5.3 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des Hitzeschockverfahrens. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zu 200 µl Zellen 1 µl Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben, der Ansatz gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 35 Sekunden. Die Zellen wurden erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert und danach zur Regeneration nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) für eine Stunde bei 37°C und 135 rpm geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 xg, 30 s, 37°C) das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf eine Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum auf LB-Agar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte einen Tag bei 37°C.

#### SOC-Medium:

5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,125 g NaCl, 0,9 g Glukose, 625 µl 1 M KCl, 1,25 ml steriles 2 M MgCl<sub>2</sub> wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 250 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

#### 2.5.4 TSS-Transformation von *E. coli* BL21-Zellen

Eine Überexpression des Fusionsproteins AmtR-MBP erfolgte in *E. coli* BL21-Zellen, die mit dem pMALc2amtR-Plasmid über die TSS-Methode nach Chung *et al.* (1989) transformiert wurden. Die Zellen wurden morgens in 5 ml LB-Medium (siehe Tab. 2.3) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden 1,5 ml Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13.000 xg, 1 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl TSS-Lösung resuspendiert. Für den Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2 µl Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium, wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 135 rpm zur Regeneration geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 xg, 30 s, 37°C), das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte einen Tag bei 37°C.

##### TSS-Lösung:

10 g Polyethylenglykol, 5 ml 100% DMSO, 5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>, 50 ml 2X LB-Medium wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

#### 2.5.5 Elektroporation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen von *C. glutamicum* auf Eis aufgetaut und 50 µl der Zellen in eisgekühlte, sterile Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (Preqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) pipettiert. Es wurden 2 µl Plasmid-DNA zugegeben und die Ansätze vorsichtig gemischt. Unter Einsatz von Hochspannungspulsen wurden die Zellen im BIORAD Gene-Pulser (BIORAD GmbH, München) bei 2,5 kV Spannung, 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Die Zeitkonstanten lagen bei optimaler Durchführung im Bereich von 12 ms. Sofort nach dem Elektroschock wurde 1 ml BHIS-Medium zugegeben, die Zellen wurden gründlich resuspendiert, die Zellsuspension wurde in sterile Kulturröhrchen überführt und zur Regeneration im Rundschüttler (125 rpm) bei 30°C für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 xg, 30 s, 30°C), das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf BHI-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte 1 bis 2 Tage bei 30°C.

##### BHIS-Medium:

1,8 g BHI-Medium und 4,55 g D-Sorbitol wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 50 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

### III. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des GlnK-Proteins

P<sub>II</sub>-Signaltransduktionsproteine sind trimere Proteine, die eine zentrale Rolle in der Stickstoffregulation spielen. Diese Proteine ändern ihre Funktion und Interaktion mit anderen Proteinen in Antwort auf den intrazellulären Stickstoffstatus durch Modifikation bzw. Demodifikation. In *C. glutamicum* ist die Expression des *glnK*-Gens, das für das P<sub>II</sub>-Protein GlnK kodiert, unter guter Stickstoffversorgung durch den Repressor AmtR reprimiert. Als Antwort auf Stickstoffmangel wird die Transkription von *glnK* induziert und das GlnK-Protein von einer Transferase modifiziert. Nach einem Stickstoffpuls erfolgt eine Demodifikation von GlnK und die Expression stickstoffregulierter Gene, zu denen das *glnK*-Gen zählt, wird reprimiert. Die Analyse einer Modifikation, Trimerisierung und Lokalisierung des GlnK-Proteins sowie einer Expression des *glnK*-Gens standen im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen.

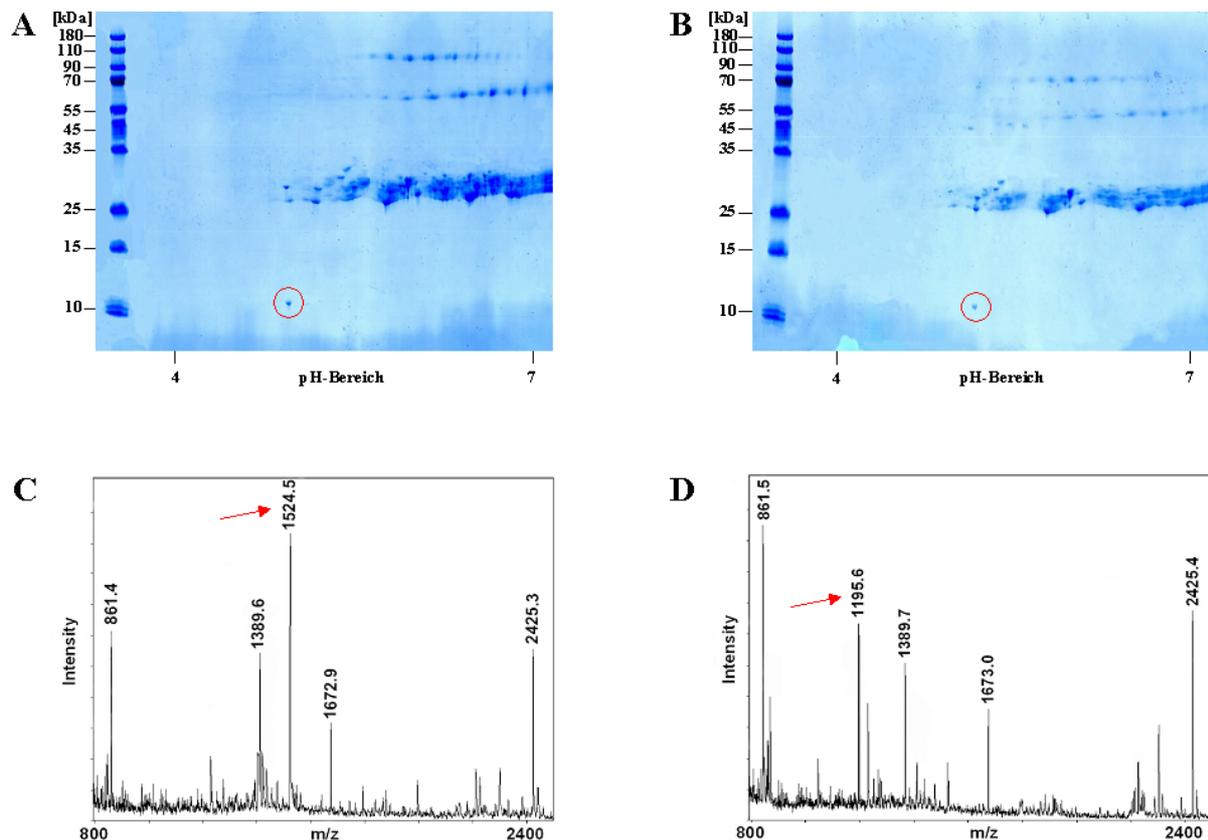
##### 3.1.1 Modifikation und Demodifikation von GlnK

In *C. glutamicum* wird das GlnK-Protein wie in den meisten Bakterien in Abhängigkeit vom Stickstoffstatus der Zelle am Tyrosylrest 51 modifiziert. Ob es sich dabei wie in *E. coli* um eine Uridylylierung handelt (Jaggi *et al.*, 1996; Atkinson & Ninfa, 1999) oder es wie für *S. coelicolor* veröffentlicht zu einer Adenylylierung kommt (Hesketh *et al.*, 2002), war zu Beginn dieser Arbeit unklar. In *S. coelicolor* wurde nach einem Stickstoffpuls zusätzlich zur Deadenylylierung auch eine Abspaltung von drei Aminosäuren an der N-terminalen Domäne festgestellt (Hesketh *et al.*, 2002).

Um eine Modifikation von GlnK in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde das Protein mit Hilfe von Protein A-gekoppelten *Magnetic Beads* aus dem Zellextrakt des Wildtyps ATCC 13032 isoliert. Als Kultivierungsbedingungen wurden einerseits Stickstoffmangel gewählt, unter denen GlnK modifiziert, adenylyliert oder uridylyliert, vorliegt und andererseits wurde den Zellen nach einer Stickstoffmangelperiode ein Stickstoffpuls von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 10 Minuten gegeben. Unter dieser Bedingung wird das Protein demodifiziert und könnte zusätzlich wie in *S. coelicolor* proteolytisch modifiziert werden. Die Eluate wurden auf 2-D-Gelen aufgetrennt und diese mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt.

Nach einer Isolierung von GlnK aus dem Zellextrakt des Wildtyps unter Stickstoffmangel sowie nach einem Stickstoffpuls konnten auf den gefärbten 2-D-Gelen mehrere Spots detektiert werden (Abb. 3.1A/B). Eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht zeigte neben den schweren Ketten, auf einer Höhe von 55 kDa, und den leichten Ketten der Antikörper, auf einer Höhe von 25 kDa, die mit GlnK co-eluiert wurden, jeweils noch einen Spot, der eine

Größe von 12 kDa hatte. In der isoelektrischen Fokussierung (pI) kam es durch die Abspaltung eines UMP- oder AMP-Restes nach einem Stickstoffpuls zu einer Verschiebung des pI des isolierten GlnK-Proteins von 4,8 zu 5,0. Die beiden Spots, die das isolierte GlnK-Protein repräsentieren könnten, wurden aus dem 2-D-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert.



**Abb. 3.1: Modifikation des GlnK-Proteins nach einem Stickstoffpuls.** **A)** Das GlnK-Protein wurde aus dem Zellextrakt des Wildtyps ATCC 13032 von Zellen, die unter Stickstoffmangel kultiviert wurden, isoliert. Nach einer Elution wurden die Proteine auf einem 2-D-Gel aufgetrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt (Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna). **B)** Das GlnK-Protein wurde aus Wildtyp-Zellen, die unter Stickstoffmangel kultiviert und dann mit 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  für 10 min gepulst wurden, isoliert (zur Erklärung siehe A). **C/D)** Die markierten Spots (siehe A/B) wurden aus dem 2-D-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und über MALDI-TOF-MS identifiziert. Die MALDI-Spektren zeigen u.a. das durch einen Pfeil markierte modifizierte (siehe A) bzw. unmodifizierte (siehe B) Peptid.

Der theoretische Trypsin-Verdau des GlnK-Proteins ergibt sechs über MALDI-TOF-MS detektierbare Peptidfragmente (Abb. 3.2). In den MALDI-Spektren (Abb. 3.1C/D) fanden sich diese Peptide mit einer Ausnahme wieder. Eine Modifikation des GlnK-Proteins bei Stickstoffmangel erfolgt an Position 51, einem Tyrosylrest. Das Peptidfragment mit dem charakteristischen Tyrosylrest hat eine Größe von 1195,6 Da und sollte unter

Stickstoffmangel um einen UMP-Rest (306 Da) oder AMP-Rest (329 Da) größer sein. So würde man unter diesen Bedingungen statt einem Peak bei 1195,6 Da einen Peak bei 1501,6 Da im Falle einer Uridylylierung und bei 1524,6 Da im Falle einer Adenylylierung erwarten. Aus Abbildung 3.1C wird deutlich, dass es sich bei der Modifizierung eindeutig um eine Adenylylierung handelt, da im MALDI-Spektrum ein Peak bei 1524,5 Da zu finden war. Nach einem Stickstoffpuls wird GlnK deadenylyliert, so dass wie Abbildung 3.1D zeigt nur ein Peak bei 1195,6 Da detektiert werden konnte.

GlnK-Sequenz	[Da]
MK	278.15
LITAIKPFLLTDIK	1673.03
DALEQAGVQGMTVTETQGFGQK	2423.15
GHTEVYR	861.42
GAEYAVDFVPK	1195.60
VK	246.18
IEVIISDAQAEVINIVETAR	2425.32
TGK	305.18
VGDGK	475.25
VWMTNIEELVR	1389.72
VR	274.19
TGER	462.23
GAAAL	460.24

**Trypsinverdau**

**Abb. 3.2: Theoretischer Trypsinverdau von GlnK.** Die über MALDI-TOF-MS detektierbaren Peptide sind in fett abgebildet, die anderen Peptide, die nicht nachweisbar sind, sind grau dargestellt.

der Nachweisgrenze für Peptidfragmente mittels MALDI-TOF-MS aber nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die Proteine alternativ mit Chymotrypsin verdaut. Hier ergibt der theoretische Verdau von GlnK fünf detektierbare Peptide (Abb. 3.3). Das erste Peptid mit einer Größe von 1260,7 Da müsste bei einer Abspaltung von einer bis fünf Aminosäuren an der N-terminalen Domäne nach einem Stickstoffpuls entsprechend kleiner sein. Es konnte jedoch nur das vollständige Peptid nachgewiesen werden. Da auch eine proteolytische Modifikation an der C-terminalen Domäne denkbar wäre, wurde ebenfalls nach einem verkürzten letzten Peptid gesucht. Das letzte

Wird GlnK zusätzlich wie in *S. coelicolor* proteolytisch modifiziert z.B. durch eine Abspaltung von einer bis fünf Aminosäuren der N-terminalen Domäne sollte dies ebenfalls aus den MALDI-Spektren ersichtlich sein. Trypsin schneidet *C. glutamicum* GlnK bereits nach den ersten beiden Aminosäuren der N-terminalen Domäne. Dieses ca. 300 Da große Fragment ist nicht über MALDI-TOF-MS nachweisbar. Demnach müsste das erste detektierbare Peptidfragment mit einer Größe von 1673,03 Da nach einem Stickstoffpuls um eine bis drei Aminosäuren kleiner sein. Im MALDI-Spektrum wurde allerdings nur das vollständige Peptid mit einer Größe von 1673,0 Da (Abb. 3.1D) detektiert. Eine Abspaltung der ersten beiden Aminosäuren konnte durch einen tryptischen Verdau aufgrund

GlnK-Sequenz	[Da]
MKLITAIKPF	1260.77
TLTDIKDALEQAGVQGMTVTETQGF	2653.30
GQQKGHTEVY	1146.55
RGAEY	595.28
GAEY	451.21
AVDFVPKVKIEVIISDAQAEVINIVETARTGKVGDKVW	4004.24
MTNIEELVRVRTGERGAAAL	2244.17

**Chymotrypsinverdau**

**Abb. 3.3 Theoretischer Chymotrypsinverdau von GlnK.** Die über MALDI-TOF-MS detektierbaren Peptide sind in fett abgebildet, die anderen Peptide, die nicht nachweisbar sind, sind grau dargestellt.

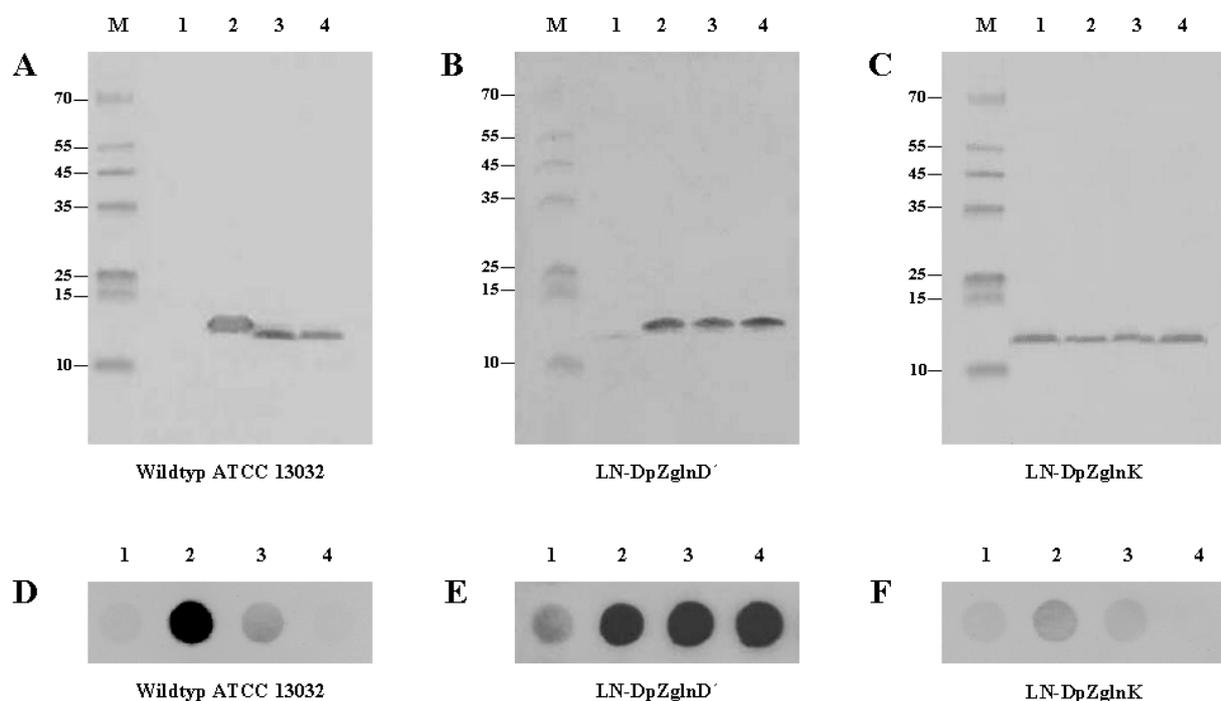
Peptid hat eine Größe von 2244,17 Da. Auch dieses konnte nur vollständig detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass das GlnK-Protein in *C. glutamicum* unter Stickstoffmangel adenyliert und nach einem Stickstoffpuls wieder demodifiziert wird; eine zusätzliche proteolytische Modifikation nach einem Stickstoffpuls wie in *S. coelicolor* konnte nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Bifunktionelle Aktivität von GlnD

In *E. coli* modifiziert die Uridylyltransferase GlnD nicht nur die P<sub>II</sub>-Proteine GlnK und GlnB, sondern ist auch für deren Demodifikation verantwortlich (Jiang *et al.*, 1998a). So führte eine Verkürzung des *glnD*-Gens um ca. 1000 bp zu einer Uridylylierung der P<sub>II</sub>-Proteine bei Stickstoffmangel, jedoch zu keiner nachweisbaren Deuridylylierung nach einem Stickstoffpuls. Bisherige Experimente deuten darauf hin, dass die Transferase GlnD auch in *C. glutamicum* für eine Adenylylierung von GlnK unter Stickstoffmangel und eine Demodifizierung nach einem Stickstoffpuls verantwortlich ist. Ein experimenteller Beweis fehlte allerdings. Um eine bifunktionelle Aktivität des GlnD-Proteins nachzuweisen, wurde einerseits das 2246 bp lange *glnD*-Gen um ca. 1000 bp am 3'-Ende verkürzt und in den Überexpressionsvektor pZ8-1 kloniert (pZglnD'). Der *glnD*-Deletionsstamm LN-D wurde mit dem Plasmid pZglnD' transformiert, um zu analysieren, ob das C-terminal verkürzte GlnD-Protein wie in *E. coli* noch in der Lage ist, GlnK zu modifizieren, nicht aber zu demodifizieren. Andererseits wurde der Deletionsstamm LN-D mit dem Plasmid pZglnK zur Überexpression von *glnK* transformiert, um zu überprüfen, ob GlnK in Abwesenheit von GlnD noch modifiziert wird.

Vom Wildtyp ATCC 13032 und von den Stämmen LN-DpZglnD' und LN-DpZglnK wurden Proteinpräparationen unter verschiedenen Stickstoffbedingungen durchgeführt, die Zellextrakte präpariert und die Proben auf denaturierenden Gelen aufgetrennt. Ein Western Blot Experiment zeigte für den Zellextrakt des Wildtyps das in Abbildung 3.4A gezeigte Proteinmuster: unter guter Stickstoffversorgung war kein GlnK nachweisbar, da die Expression stickstoffregulierter Gene wie *glnK* durch AmtR reprimiert wird. Nach Inkubation in Stickstoffmangel wird *glnK* exprimiert und es konnte die adenylierte Form von GlnK detektiert werden. Nach einem Stickstoffpuls von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Protein wieder deadenyliert. Das demodifizierte GlnK-Protein zeigte in einem denaturierenden Gelsystem aufgrund des kleineren Molekulargewichtes ein schnelleres Laufverhalten als die adenylierte Form von GlnK. Für einen Antikörpernachweis von GlnK konnte für den Zellextrakt der Mutante LN-DpZglnD' (Abb. 3.4B) bei guter Stickstoffversorgung kein GlnK-Protein und bei Stickstoffmangel sowie nach einem Stickstoffpuls nur die modifizierte, adenylierte Form von GlnK nachgewiesen werden, dessen Menge konstant blieb. Das

GlnK-Protein wurde nach einem Stickstoffpuls in der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr deadenyliert. Im Zellextrakt des Stammes LN-DpZglnK (Abb. 3.4C) zeigte sich unter allen Bedingungen nur die deadenylierte Form des GlnK-Proteins. In Abwesenheit von GlnD fand keine Adenylylierung von GlnK mehr statt. Das *C. glutamicum* GlnK-Protein wird also unter Stickstoffmangel von der Transferase GlnD adenyliert und nach einem Stickstoffpuls von dieser auch wieder deadenyliert. Ein verkürztes *glnD*'-Genprodukt ist in der Lage, GlnK zu adenylieren, kann das Protein jedoch nicht mehr deadenylieren. Fehlt das GlnD-Protein vollständig, findet keine Adenylylierung von GlnK mehr statt. Die bifunktionelle Funktion von GlnD konnte somit in *C. glutamicum* bestätigt werden.



**Abb. 3.4: Bifunktionelle Aktivität des GlnD-Proteins.** A-C) Zum Nachweis von GlnK im Zellextrakt des Wildtyps ATCC 13032 (A), der LN-DpZglnD' (B) und der LN-DpZglnK-Mutante (C) bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 10 min (3-4) wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna). D-F) Zum Nachweis der Expression stickstoffregulierter Gene im Wildtyp ATCC 13032 (D), in der LN-DpZglnD' (E) und in der LN-DpZglnK-Mutante (F) wurde die RNA aus Zellen isoliert, die bei guter Stickstoffversorgung (1), nach Inkubation von 1,5 h in Stickstoffmangel (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 10 min (3-4) kultiviert worden waren. Die RNA-Hybridisierungen erfolgten mit einer *glnB*-Sonde.

Um die Funktionalität des GlnK-Proteins in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu überprüfen, wurden native Gele sowie RNA-Hybridisierungen durchgeführt. In den nativen Gelen war in allen Stämmen die trimere Form von GlnK nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Im Wildtyp konnte GlnK unter Stickstoffmangel in der vollständig adenylierten Form und nach einem Stickstoffpuls in der vollständig demodifizierten Form detektiert werden, während im Stamm LN-DpZglnD' nur die adenylierte Form von GlnK und im Stamm LN-DpZglnK nur die demodifizierte Form nachweisbar waren. Diese Ergebnisse bestätigten die Experimente für denaturierende Gele.

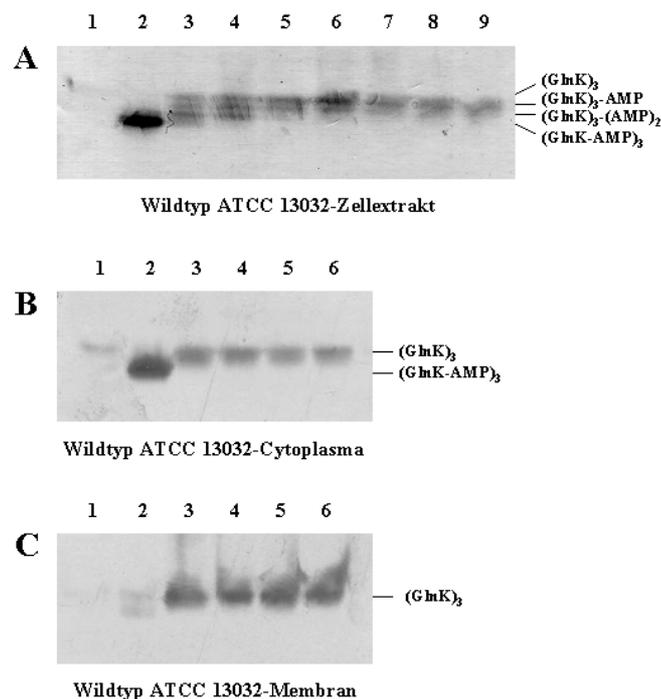
Unter guter Stickstoffversorgung wird die Expression stickstoffregulierter Gene durch den globalen Repressor AmtR reprimiert. Eine Derepression AmtR-kontrollierter Gene unter Stickstoffmangel erfolgt nur bei Anwesenheit von GlnD und GlnK (Nolden *et al.*, 2001b). In den folgenden RNA-Hybridisierungen wurde die Stickstoffregulation auf Genexpressions-ebene in Abhängigkeit dieser beiden Proteine untersucht. Hierfür wurde die RNA unter verschiedenen Stickstoffbedingungen isoliert und mit einer *gltB*-Sonde hybridisiert. Der Wildtyp (Abb. 3.4D) zeigte bei guter Stickstoffversorgung kein Signal, unter Stickstoffmangel konnte eine erhöhte Transkription des AmtR-regulierten Gens *gltB* festgestellt werden und nach einem Stickstoffpuls wurde die Expression wieder reprimiert. In RNA-Hybridisierungen für den Deletionsstamm LN-DpZglnD' (Abb. 3.4E) konnte bei guter Stickstoffversorgung kein Signal beobachtet werden, während nach Einleiten eines Stickstoffmangels eine deutliche Transkriptmenge nachgewiesen wurde. Eine erneute Repression der Expression AmtR-kontrollierter Gene nach einem Stickstoffpuls konnte nicht detektiert werden, da das C-terminal verkürzte GlnD-Protein nicht mehr in der Lage war, GlnK zu demodifizieren. Der Stamm LN-DpZglnK (Abb. 3.4F) zeigte nur eine sehr schwache Expression des stickstoffregulierten Gens *gltB* unter den gewählten Bedingungen. Eine Derepression ist hier nicht feststellbar, da für diese das adenylierte GlnK-Protein und die Transferase GlnD essenziell sind.

### 3.1.3 Trimerisierung des GlnK-Proteins

Das GlnK-Protein ist als Trimer aktiv und besteht aus drei identischen Untereinheiten, von denen jede am Tyrosylrest 51 durch die Transferase GlnD adenyliert werden kann. Ob GlnK vorwiegend in der vollständig adenylierten oder vollständig deadenylierten Form in der Zelle vorliegt oder eine schrittweise Modifizierung bzw. Demodifizierung zu beobachten ist, zeigte eine Trennung der Proteinextrakte auf nativen Gelen. Ein vollständig adenyliertes GlnK-Trimer zeigt im Gel ein schnelleres Laufverhalten aufgrund der sechs Ladungen der AMP-Reste als ein vollständig unmodifizierter Proteinkomplex.

Wildtyp-Zellen ATCC 13032 wurden unter verschiedenen Stickstoffbedingungen kultiviert und die Zellextrakte präpariert. Ein Antikörpernachweis für GlnK zeigte für den Zellextrakt des Wildtyps bei guter Stickstoffversorgung kein Signal, bei Stickstoffmangel lag GlnK vollständig adenyliert vor und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konnten

nach einer Minute alle Adenylylierungszustände von GlnK detektiert werden. So führte ein Stickstoffpuls zu einer schrittweisen Deadenylylierung und das trimere GlnK lag an drei, zwei, einer und keiner Untereinheit adenylyliert vor (Abb. 3.5A). Nach einem Stickstoffpuls von 20 Minuten war nur noch eine Bande sichtbar, bei der es sich um das trimere GlnK-Protein ohne AMP-Rest handelte. Außerdem konnte ein deutlicher Rückgang der Proteinmenge nach einem Stickstoffpuls beobachtet werden, der auf eine Proteolyse von GlnK hindeutete (vgl. Punkt 3.2).



**Abb. 3.5: Trimerisierung und Lokalisierung des GlnK-Proteins in der Zelle.** **A)** Zum Nachweis des trimeren GlnK-Proteins im Zellextrakt des Wildtyps ATCC 13032 unter guter Stickstoffversorgung (1), bei Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 20 min (3-9) wurden Western Blot Experimente mit nativen 1-D-Gelen durchgeführt. **B/C)** Eine Trimerisierung von GlnK im Cytoplasma (**B**) und in der Membranfraktion (**C**) des Wildtyps unter guter Stickstoffversorgung (1), bei Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 2, 5, 10 und 20 min (3-6) zeigten Western Blots mit nativen 1-D-Gelen.

Die Zellextraktfraktion besteht neben der Cytoplasmafraktion aus Membranproteinen. Um zu zeigen, ob GlnK als cytoplasmatisches Protein nur im Cytoplasma zu finden ist, oder auch in der Lage ist, mit einem Membranprotein zu interagieren, wie dies für *E. coli* berichtet wurde (Coutts *et al.*, 2002), wurden die Cytoplasma- und die Membranfraktion präpariert und auf nativen Gelen aufgetrennt. Ein Antikörpernachweis von GlnK zeigte für die Cytoplasmafraktion des Wildtyps (Abb. 3.5B) das gleiche Proteinmuster wie für den Zellextrakt: bei guter Stickstoffversorgung war kein Protein, bei Stickstoffmangel adenylyliertes GlnK und nach einem Stickstoffpuls die deadenylylierte Form nachweisbar. In der Membranfraktion konnte

unter guter Stickstoffversorgung sowie bei Stickstoffmangel kein GlnK detektiert werden (Abb. 3.5C). Nach einem Stickstoffpuls interagierte GlnK vermutlich mit einem Protein in der Membran, da das demodifizierte GlnK-Protein in der Membranfraktion zu finden war. Eine Interaktion zwischen GlnK und einem Membranprotein ist offensichtlich erst möglich, wenn das Protein nach einem Stickstoffpuls vollständig demodifiziert vorliegt (vgl. Punkt 3.1.4). In *C. glutamicum*-Zellen konnte das trimere GlnK-Protein in allen Adenylylierungsstadien nachgewiesen werden. Eine mögliche Proteolyse (vgl. Punkt 3.2) und eine Membranbindung (vgl. Punkt 3.1.4) von GlnK wurden im Folgenden untersucht.

### 3.1.4 Lokalisierung von GlnK in der Zelle

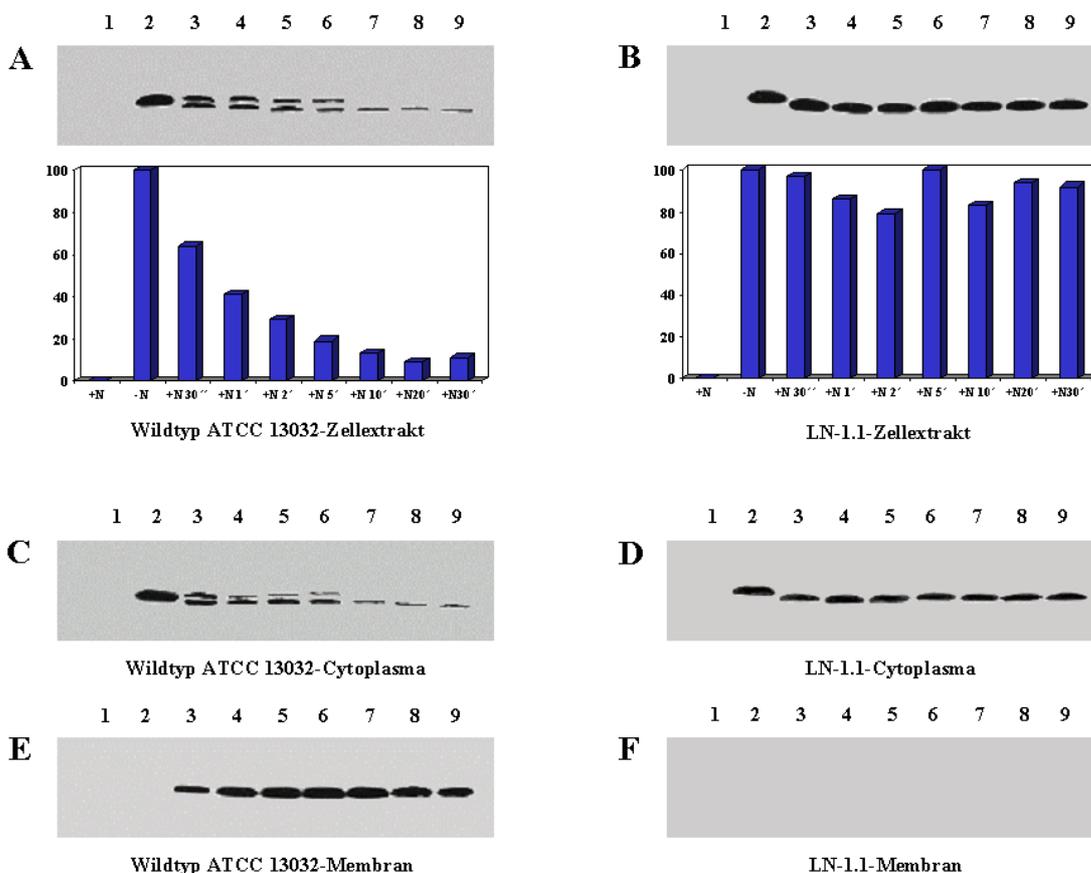
Das GlnK-Protein unterliegt in der Zelle mehreren Regulationsmechanismen: unter Stickstoffmangel wird es synthetisiert und adenylyliert und nach einem Stickstoffpuls erfolgt eine Deadenylylierung. Außerdem nimmt die Gesamtproteinmenge nach einem Stickstoffpuls sehr stark ab (vgl. Punkt 3.2) und das Protein ist in der Membranfraktion nachweisbar. Eine Lokalisierung des GlnK-Proteins und eine Charakterisierung der Membranbindung von GlnK standen im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen.

#### 3.1.4.1 Einfluss von AmtA und AmtB auf die Lokalisierung von GlnK

Da in *E. coli* eine Interaktion zwischen GlnK und dem AmtB-Transporter gezeigt werden konnte (Coutts *et al.*, 2002), wurde nicht nur eine Lokalisierung des GlnK-Proteins im Wildtyp ATCC 13032 analysiert, sondern auch in den Einzeldelentionsmutanten MJ2-38 ( $\Delta amtA$ ), LN-1.1 ( $\Delta amtB$ ) und der Doppeldelentionsmutante JS-1 ( $\Delta amtA \Delta amtB$ ) der Ammoniumtransporter AmtA und AmtB. Die Zellen wurden unter verschiedenen Stickstoffbedingungen kultiviert und die Zellextrakt-, die Cytoplasma- und die Membranfraktion der genannten Stämme präpariert. Die Proben wurden auf denaturierenden Gelen aufgetrennt und es wurde ein Antikörpernachweis von GlnK durchgeführt.

Für den Wildtyp (Abb. 3.6A) sowie die *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 (Abb. 3.6B) zeigte sich im Zellextrakt bei guter Stickstoffversorgung kein Signal, bei Stickstoffmangel war für beide Stämme die adenylylierte Form von GlnK detektierbar und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(NH_4)_2SO_4$  unterschieden sich die Proteinmuster. Nach einem einminütigen Stickstoffpuls waren im Wildtyp zwei Signale zu erkennen. Die obere Bande lag auf derselben Höhe wie die für Stickstoffmangel detektierte Bande und stellte die adenylylierte Form des Proteins dar. Die untere Bande zeigte die deadenylylierte Form von GlnK. Die Signale für die demodifizierte Form blieben nach Erhöhung der Inkubationszeit für den Stickstoffpuls erst konstant und wurden dann schwächer. Dagegen nahmen die Signale für die adenylylierte Form viel schneller ab und waren bereits nach 8 Minuten nicht mehr

nachweisbar. In der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 fand man lediglich ein Signal nach einem Stickstoffpuls, das über einen Zeitraum von 20 Minuten konstant blieb. Hierbei handelte es sich um die deadenylierte Form von GlnK. Die Western Blot Experimente zeigten für die beiden Stämme nach einem Stickstoffpuls zwei deutliche Unterschiede: Im Wildtyp fand eine Deadenylierung des Proteins innerhalb von 6 Minuten statt, während die Demodifizierung in der *amtB*-Mutante LN-1.1 nach einer Minute bereits vollständig abgeschlossen war. Außerdem reduzierte sich die Proteinmenge im Wildtyp drastisch, während die Proteinmenge im *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 über einen Zeitraum von 20 Minuten konstant blieb.



**Abb. 3.6: Proteolyse und Membranbindung des GlnK-Proteins nach einem Stickstoffpuls.** Zum Nachweis von GlnK im Zellextrakt (A/B), im Cytoplasma (C/D) und in der Membranfraktion (E/F) des Wildtyps ATCC 13032 (A/C/E) und der *amtB*-Mutante LN-1.1 (B/D/F) bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 20 min (3-9) wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Quantifizierung der Signale in der Zellextraktfraktion erfolgte, indem das Signal bei Stickstoffmangel als 100% gesetzt wurde.

Im Zellextrakt des Wildtyps kommt es nach einem Stickstoffpuls offensichtlich zu einer Proteolyse des Proteins, während in den Zellen der *amtB*-Mutante LN-1.1, in der das Gen für das Ammoniumaufnahme-system AmtB deletiert ist, das Signal für den Abbau fehlt. Dies wird

durch die Quantifizierung der erhaltenen Signale aus den Western Blot Experimenten noch einmal verdeutlicht. Die Intensität des Signals unter Stickstoffmangel wurde als 100% gesetzt und die Signalstärken der anderen Bedingungen dementsprechend berechnet. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung aus unabhängigen Western Blot Experimenten durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die Signalstärke reduzierte sich im Wildtyp nach einem Stickstoffpuls innerhalb von 20 Minuten auf 10%, während sie in der *amtB*-Mutante LN-1.1 konstant blieb (Abb. 3.6A/B).

Proteinpräparationen für die *amtA*-Mutante MJ2-38 und die Doppelmutante JS-1 wurden analog den bereits beschriebenen Experimenten durchgeführt. Die *amtA*-Deletionsmutante MJ2-38 zeigte das gleiche Proteinpuster wie für den Wildtyp beobachtet werden konnte, während für den Doppeldeletionsstamm JS-1 ein übereinstimmendes Modifikationsmuster von GlnK mit dem *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Die Effekte in der Doppelmutante JS-1 waren somit auf eine Deletion von *amtB* zurückzuführen. Das Fehlen des AmtA-Transporters hatte keinen Einfluss auf das stickstoffabhängige Modifizierungsschema von GlnK sowie eine mögliche Proteolyse dieses Proteins.

Die Western Blot Experimente wurden für die Cytoplasmafraktionen des Wildtyps und der Mutante LN-1.1 entsprechend den Experimenten für die Zellextraktfraktion durchgeführt. Für den Wildtyp (Abb. 3.6C) und den *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 (Abb. 3.6D) waren die Signale im Cytoplasma identisch zu denen des Zellextraktes. Dies zeigte, dass GlnK im Zellextrakt sowie im Cytoplasma des Wildtyps einem Gesamtabbau unterliegt. Proteinabbau als Regulationsmechanismus ist ungewöhnlich für *C. glutamicum*, da dieser Organismus generell als wenig proteolytisch aktiv gilt (Nakashima *et al.*, 2005). In der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 wird das Protein möglicherweise vor einem Abbau geschützt. Das Proteinpuster für das Cytoplasma der *amtA*-Deletionsmutante MJ2-38 deckte sich mit dem des Wildtyps und das Proteinpuster für das Cytoplasma der Doppelmutante JS-1 stimmte mit dem der *amtB*-Mutante LN-1.1 überein (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigten nochmals eindeutig, dass der Effekt in der Doppelmutante auf die Deletion von *amtB* zurückzuführen war. Das GlnK-Protein unterliegt einem Abbau, an dem der AmtB-Transporter zumindest indirekt beteiligt sein muss. Außerdem scheint AmtB zusätzlich für die Deadenylierung von GlnK nach einem Stickstoffpuls von Bedeutung zu sein, da das Protein bei einem Fehlen von AmtB schneller deadenyliert wird. Der AmtA-Transporter hat auf diese beobachteten Phänomene keinen Einfluss.

In *E. coli* führt eine Interaktion zwischen GlnK und dem Ammoniumtransporter AmtB dazu, dass die Transportaktivität von AmtB nach einem Stickstoffpuls reduziert wird (Coutts *et al.*, 2002). Auch in *C. glutamicum* ist *glnK* zusammen mit *amtB* in einem Operon organisiert, was

eine Interaktion der beiden Proteine wahrscheinlich macht. *C. glutamicum* besitzt im Gegensatz zu *E. coli* jedoch zwei Ammoniumaufnahmesysteme, mit denen GlnK interagieren und so für eine Abschaltung der Transporter bei guter Stickstoffversorgung sorgen könnte. Für den Nachweis einer Interaktion des GlnK-Proteins mit einem Ammoniumaufnahmesystem wurde die Membranfraktion vom Wildtyp ATCC 13032 und der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 analysiert. Ein Antikörperrnachweis von GlnK zeigte, dass bei guter Stickstoffversorgung und bei Stickstoffmangel weder für den Wildtyp (Abb. 3.6E) noch für den *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 (Abb. 3.6F) GlnK in der Membranfraktion nachweisbar war. Nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konnte bereits nach einer Minute für den Wildtyp ein Signal detektiert werden, das nach 2 Minuten noch deutlicher war und dann über einen Zeitraum von 20 Minuten konstant blieb. In der *amtB*-Mutante LN-1.1 waren nach einem Stickstoffpuls keine Signale nachweisbar. GlnK ist bei Abwesenheit des AmtB-Transporters nicht in der Lage, an die Membran zu binden. Diese Ergebnisse deuten stark auf eine direkte Interaktion von GlnK und dem AmtB-Ammoniumaufnahmesystem hin. Ob auch der Ammoniumtransporter AmtA in der Lage ist, mit GlnK zu interagieren, wurde untersucht, indem ein Antikörperrnachweis in der *amtA*-Deletionsmutante MJ2-38 und der Doppelmutante JS-1 durchgeführt wurde. Das Proteinmuster für die Membranfraktion des *amtA*-Deletionsstammes MJ2-38 entsprach dem des Wildtyps und das Proteinmuster der Doppelmutante JS-1 stimmte mit dem des *amtB*-Deletionsstammes LN-1.1 überein (Daten nicht gezeigt). Eine fehlende Membranbindung in der Doppelmutante ist somit auf die Deletion von *amtB* und nicht auf *amtA* zurückzuführen. Eine Interaktion des AmtA-Transporters mit GlnK konnte nicht gezeigt werden.

Es wäre jedoch denkbar, dass andere Proteine das AmtA-System über eine Interaktion regulieren. Da eine *glnA*-Deletionsmutante keine (Methyl-)Ammoniumaufnahme mehr zeigte (Jakoby *et al.*, 1997), wird eine Interaktion der Glutaminsynthetase (GS) mit dem AmtA-Transporter diskutiert, für die es bisher jedoch keine konkreten Hinweise gibt. Diese Vermutungen bildeten den Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur Regulation der AmtA-Aktivität durch das GS-Protein. Die Zellextrakt-, die Cytoplasma- und die Membranfraktion des Wildtyps ATCC 13032 sowie der Transporter-Mutanten MJ2-38, LN-1.1 und JS-1 wurden präpariert und ein Antikörperrnachweis für das GS-Protein durchgeführt. Für alle Stämme konnte das Protein in den untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Zellextrakt- und der Cytoplasmafraktion zeigte sich eine Regulation, da das Protein bei Stickstoffmangel verstärkt synthetisiert wurde. Nach einem Stickstoffpuls blieb die Menge des Proteins konstant. Die Signale in der Membranfraktion waren für die gewählten Bedingungen gleich, aber sehr schwach. Ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den einzelnen Mutanten konnte nicht gezeigt werden. Das GS-Protein ist somit zwar in der Membranfraktion nachweisbar, eine Interaktion mit einem Ammoniumtransporter konnte aber

nicht belegt werden, da die Doppelmutante JS-1, in der die Gene für beide Ammoniumtransporter deletiert waren, gleich starke Signale wie der Wildtyp zeigte. Daher scheint die Glutaminsynthetase entweder mit einem anderen Protein in der Membran zu interagieren oder mit der Membran selbst in Wechselwirkung zu treten. Welche Funktion diese Membranbindung haben könnte, konnte bisher nicht geklärt werden, eine regulatorische Funktion ist aber unwahrscheinlich.

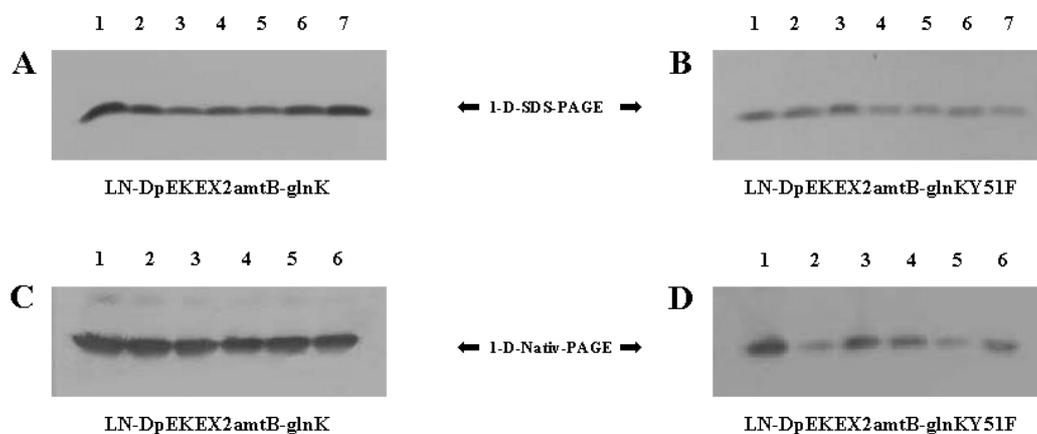
#### 3.1.4.2 Charakterisierung der Membranbindung von GlnK

Da das GlnK-Protein in der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 nach einem Stickstoffpuls schneller deadenyliert wird als im Wildtyp, wurde zunächst spekuliert, dass das GlnD-Protein für eine Interaktion der Proteine GlnK und AmtB wichtig ist. Außerdem wurde GlnK in der Membranfraktion unmodifiziert nachgewiesen, so dass die Deadenylierung für eine Bindung an AmtB essenziell sein könnte. Ob für eine Interaktion von AmtB und GlnK die Transferase GlnD notwendig ist, zeigten Western Blot Experimente in den *glnD*-Deletionsstämmen LN-DpEKEX2amtB-glnK und LN-DpEKEX2amtB-glnKY51F. Die Induktion der Expression der Plasmid-kodierten Gene des pEKEX2-Vektorsystems erfolgte mit IPTG und war somit stickstoffunabhängig. Von den beiden *glnD*-Mutanten LN-DpEKEX2amtB-glnK und LN-DpEKEX2amtB-glnKY51F wurden Proteinpräparationen durchgeführt und das Cytoplasma sowie die Membranfraktion unter verschiedenen Stickstoffbedingungen präpariert. Die Cytoplasmafraktion diente in diesem Experiment als Kontrolle der synthetisierten GlnK-Mengen.

Ein Antikörpernachweis für GlnK zeigte für das Cytoplasma (Daten nicht gezeigt) und die Membranfraktion (Abb. 3.7A) der Mutante LN-DpEKEX2amtB-glnK unter guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nur eine Bande, die deadenylierte Form von GlnK. Eine Interaktion von GlnK und AmtB war auch in Abwesenheit von GlnD möglich. In der Mutante LN-DpEKEX2amtB-glnKY51F wurde unter allen gewählten Bedingungen ein vergleichbares Proteinmuster nachgewiesen. Die Signale in der Cytoplasma- (Daten nicht gezeigt) und der Membranfraktion (Abb. 3.7B) waren jedoch schwächer. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass GlnKY51F durch den Austausch an Position 51 nicht mehr so gut trimerisieren konnte oder möglicherweise posttranslational als falsch erkannt und abgebaut wurde. Da die Signale in der Cytoplasmafraktion ebenfalls schwächer waren, hatte der Aminosäureaustausch keinen Effekt auf die Membranbindung von GlnK an AmtB.

Ob das GlnK-Protein vorwiegend als Trimer mit AmtB interagiert oder auch als Dimer oder Monomer mit AmtB in Wechselwirkung treten kann, wurde mit den folgenden nativen Gelen analysiert. Ein Antikörpernachweis von GlnK zeigte für die LN-DpEKEX2amtB-glnK-Mutante das folgende Proteinmuster: Das trimere GlnK war unter allen Bedingungen im Cytoplasma

(Daten nicht gezeigt) sowie in der Membranfraktion (Abb. 3.7C) nachweisbar. Somit konnte einerseits nochmals eine von GlnD unabhängige Interaktion zwischen GlnK und AmtB bestätigt werden und andererseits wurde deutlich, dass GlnK nur als Trimer mit AmtB interagiert. Die Ergebnisse für den Stamm LN-DpEKEX2amtB-glnKY51F (Abb. 3.7D) entsprachen denen der LN-DpEKEX2amtB-glnK-Mutante, so dass das an Position 51 modifizierte trimere GlnK-Protein noch in der Lage ist, mit AmtB zu interagieren. Die Signale für das mutierte GlnK-Protein waren auch hier schwächer. GlnK interagiert unabhängig von GlnD als Trimer mit AmtB. Ein Austausch an Position 51 hat weder einen Einfluss auf eine Trimerisierung des Proteins noch auf eine Interaktion mit AmtB.

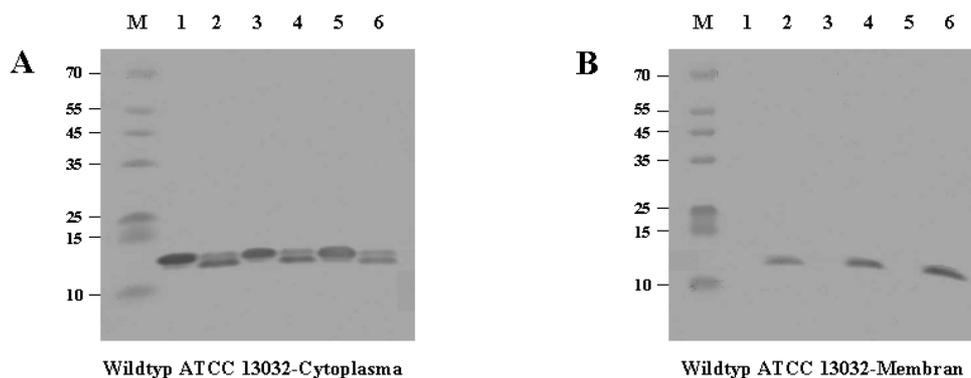


**Abb. 3.7: Einfluss von GlnD auf die Membranbindung von GlnK.** **A/B)** Zum Nachweis von GlnK in der Membranfraktion der LN-DpEKEX2amtB-glnK- (**A**) und der LN-DpEKEX2amtB-glnKY51F-Mutante (**B**) bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 1, 2, 5, 10 und 20 min (3-7) wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. **C/D)** Es wurden Western Blot Experimente mit nativen 1-D-Gelen zum Nachweis des trimeren GlnK-Proteins in der Membranfraktion der LN-DpEKEX2amtB-glnK- (**C**) und der LN-DpEKEX2amtB-glnKY51F-Mutante (**D**) bei guter Stickstoffversorgung (1), bei Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 2, 5, 10 und 20 min (3-6) durchgeführt.

In *S. coelicolor* wird das GlnK-Protein nach einem Stickstoffpuls proteolytisch modifiziert, indem drei Aminosäuren der N-terminalen Domäne abgespalten werden (Hesketh *et al.*, 2002). In *C. glutamicum* konnte durch eine Isolierung des GlnK-Proteins aus Zellen, die mit Stickstoff gepulst wurden, keine derartige Modifikation nachgewiesen werden. Allerdings wurde das Protein aus der Zellextraktfraktion isoliert, die auch die Cytoplasmafraktion enthielt. GlnK ist nach einem Stickstoffpuls jedoch vorwiegend an der Membran detektierbar. Um eine proteolytische Modifikation des mit AmtB interagierenden GlnK-Proteins auszuschließen, wurde GlnK aus der Membranfraktion von Wildtyp-Zellen ATCC 13032 mit Protein A-gekoppelten *Magnetic Beads* isoliert. Die Zellen wurden unter Stickstoffmangel kultiviert und anschließend für 10 Minuten mit 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gepulst. Die Elutions-

fraktion wurde auf einem 2-D-Gel aufgetrennt, das Gel mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt (Daten nicht gezeigt) und der Spot, der vermutlich das isolierte GlnK-Protein darstellte, über MALDI-TOF-MS analysiert. Ein Chymotrypsinverdau zeigte, dass das GlnK-Protein in der deadenylierten Form vorlag und weder an der N-terminalen noch an der C-terminalen Domäne prozessiert war. Hinweise auf andere Modifizierungen, z.B. Phosphorylierung oder Methylierung, ergaben sich ebenfalls nicht (Daten nicht gezeigt). Das Protein interagiert in der demodifizierten Form mit dem Ammoniumtransporter AmtB.

Um welche Bindungsart es sich bei einer Interaktion von GlnK und AmtB handelt, zeigte das folgende Experiment. So könnte die Interaktion mit dem AmtB-Transporter einerseits irreversibel sein, da das GlnK-Protein nach einer Bindung an AmtB proteolytisch gespalten wird. Andererseits könnte GlnK reversibel an AmtB binden und bei einsetzendem Stickstoffmangel wieder im Cytoplasma nachweisbar sein. Wildtyp-Zellen ATCC 13032 wurden bei guter Stickstoffversorgung bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Vor der weiteren Behandlung wurde den Zellen das Antibiotikum Chloramphenicol in einer Konzentration von 30 µg/ml zugesetzt, um eine Neusynthese der Proteine zu unterbinden. So konnte immer der gleiche GlnK-Pool untersucht werden. Für den eigentlichen Versuch wurden die Zellen zuerst für 10 Minuten unter Stickstoffmangel inkubiert (Probe 1) und danach für 5 Minuten mit 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gepulst (Probe 2). Die Zellen wurden geerntet und der Vorgang wurde zweimal wiederholt (Probe 3,4 und 5,6). Die Cytoplasma- und die Membranfraktion wurden präpariert und ein Antikörpernachweis von GlnK durchgeführt.



**Abb. 3.8: Reversibilität der Membranbindung zwischen GlnK und AmtB.** Es wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt zum Nachweis von GlnK im Cytoplasma (**A**) und in der Membranfraktion (**B**) des Wildtyps ATCC 13032 unter Stickstoffmangel (1/3/5) und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2/4/6). Die Zellen wurden für 10 min bei Stickstoffmangel inkubiert und dann für 5 min mit 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gepulst. Die Zellen wurden geerntet und der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Jedes Mal wurde eine Probe bei Stickstoffmangel und eine Probe nach einem Stickstoffpuls entnommen (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

Western Blot Experimente für das Cytoplasma (Abb. 3.8A) zeigten, dass GlnK aus Zellen, die unter Stickstoffmangel kultiviert wurden, ausschließlich in der adenylierten Form detektierbar war, während nach einem Stickstoffpuls beide GlnK-Formen nachgewiesen werden konnten. In der Membranfraktion (Abb. 3.8B) war nach einem Stickstoffpuls nur die deadenylierte Form von GlnK vorhanden. Das GlnK-Protein wird nach einem Stickstoffpuls deadenyliert und ist in der Lage, an AmtB zu binden. Bei einsetzendem Stickstoffmangel löst es sich wieder von seinem Interaktionspartner AmtB und wird unter diesen Bedingungen im Cytoplasma adenyliert. Die Bindung zwischen GlnK und AmtB ist reversibel.

### 3.1.5 Expression und Überexpression von *amtB*, *glnK* und *glnD*

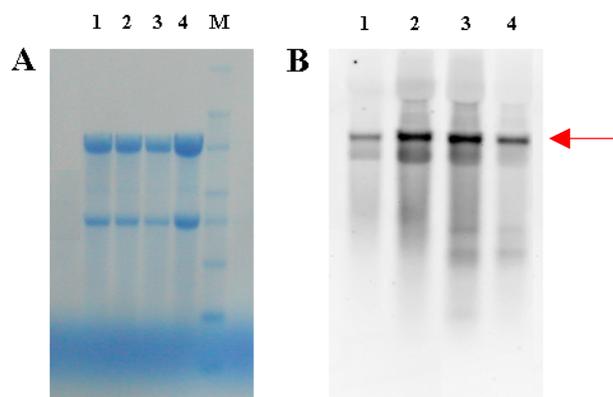
Die in den vorigen Kapiteln behandelten Proteine AmtB, GlnK und GlnD übernehmen insbesondere unter Stickstoffmangel wichtige Funktionen in der Zelle, indem sie an einer Regulation auf Expressionsebene und Aktivitätsebene beteiligt sind. Die Gene dieser drei Proteine sind zusammen in einem Operon organisiert, dessen Anordnung in den meisten Actinomyceten konserviert ist (Burkovski, 2003a). Bei Stickstoffmangel wird die Expression des *amtB-glnK-glnD*-Operons induziert. Der Schwerpunkt der folgenden Analysen lag auf einer Überexpression von *amtB*, *glnK* und/oder *glnD* zur Charakterisierung dieses Operons und dessen Einfluss auf die Regulation auf Expressionsebene und Aktivitätsebene.

#### 3.1.5.1 Expression des *amtB-glnK-glnD*-Operons

Um zunächst zu prüfen, ob das *amtB-glnK-glnD*-Operon nur ein gemeinsames Transkript bildet oder die Gene auch unabhängig voneinander exprimiert werden, wurden Northern Blot Experimente durchgeführt. So gibt es verschiedene Erklärungen für unterschiedlich lange mRNAs von Genen eines Operons: (1) Die Gene werden nicht zusammen abgelesen, da es zu einem Abbruch der Transkription nach dem ersten oder zweiten Gen kommt, (2) es gibt einen zweiten Transkriptionsstartpunkt, der vor dem zweiten oder dritten Gen des Operons liegt, oder (3) die mRNA wird nach der Transkription gespalten. Die entstandenen Transkripte könnten dann unterschiedliche Halbwertszeiten haben.

Das *amtB-glnK-glnD*-Operon in *C. glutamicum* unterliegt der Stickstoffregulation durch AmtR. So könnten z.B. unterschiedliche Stickstoffbedingungen einen Einfluss auf die Expression und die Stabilität der mRNA haben. Hierdurch würde gewährleistet, dass Komponenten, die verstärkt benötigt werden, in größeren Mengen synthetisiert werden. Eine Analyse der Transkriptlänge der gebildeten mRNA erfolgte mit Northern Blot Experimenten. Der Wildtyp ATCC 13032 wurde unter guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kultiviert, die RNA isoliert und mit einer *amtB*-, *glnK*- und *glnD*-Sonde hybridisiert.

Abbildung 3.9 zeigt RNA-Hybridisierungen mit einer *glnK*-Sonde. Unter allen Bedingungen konnte ein Transkript detektiert werden, das mit ungefähr 3800 bp der Größe des gesamten Operons *amtB-glnK-glnD* entsprach. Der Northern Blot zeigte außerdem eine Regulation der Transkription des *amtB-glnK-glnD*-Operons: bei guter Stickstoffversorgung war eine schwache Expression des Operons nachweisbar, bei Stickstoffmangel wurde die Transkription induziert und nach einem Stickstoffpuls kam es zu einer Repression der Expression. Das gleiche Expressionsmuster konnte auch für die anderen beiden Sonden gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Das *amtB-glnK-glnD*-Operon unterliegt in *C. glutamicum* der Stickstoffregulation und es wird unter allen Bedingungen nur ein gemeinsames Transkript gebildet.

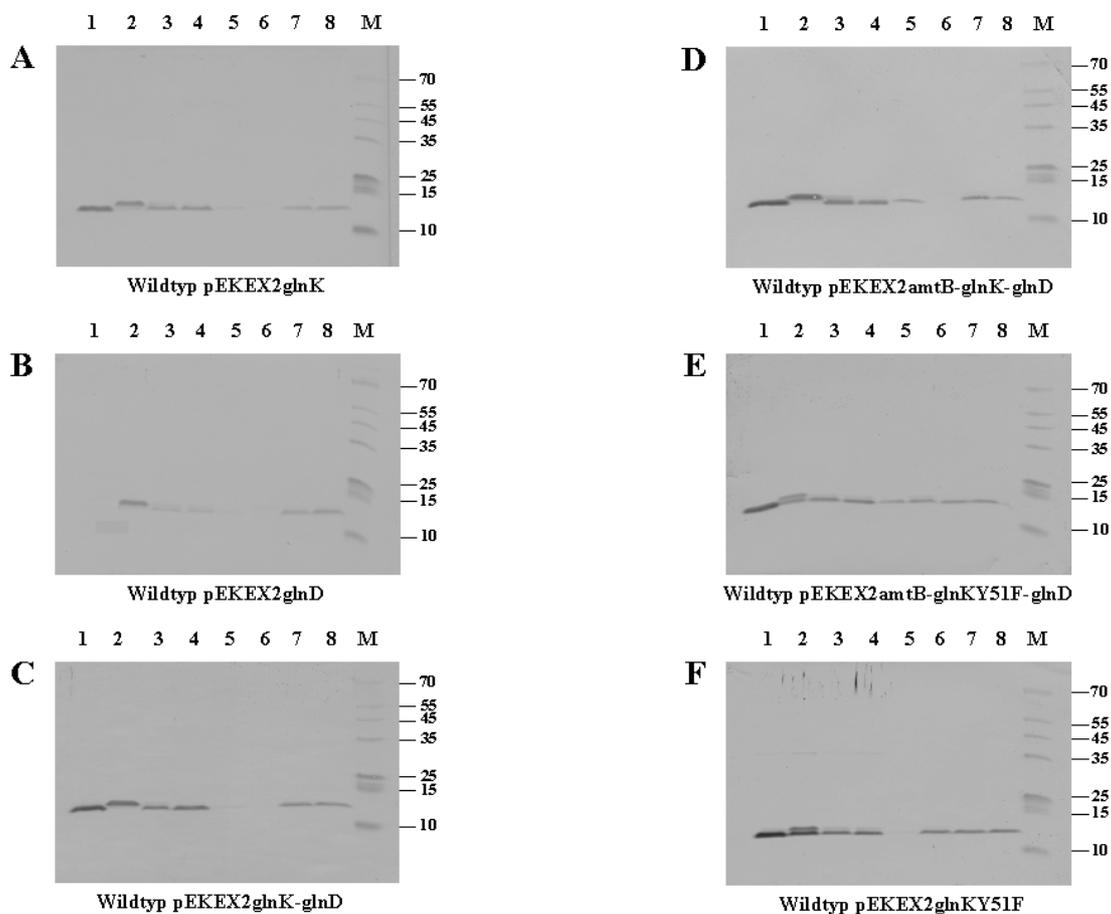


**Abb. 3.9: Northern Blot Experimente zur Analyse der Expression des *amtB-glnK-glnD*-Operons unter verschiedenen Stickstoffbedingungen.** Die RNA-Proben wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Marker sowie die 23SrRNA und 16SrRNA wurden mit einer Methylenblaufärbung (A) sichtbar gemacht. Die RNA wurde isoliert aus Zellen, die bei guter Stickstoffversorgung (1), nach Inkubation in Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 10 min (3/4) kultiviert wurden (M = High Range RNA Ladder: 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 und 200 bp, MBI Fermentas, Wilna). Zum Nachweis der Transkription des *amtB-glnK-glnD*-Operons im Wildtyp wurde die RNA mit einer *glnK*-Sonde (B) hybridisiert. Der durch eine Antikörperdetektion sichtbaren Bande (durch einen Pfeil markiert) konnte mit Hilfe des Methylenblau-gefärbten Markers die ungefähre Größe zugeordnet werden.

### 3.1.5.2 Überexpression von *amtB*, *glnK* und *glnD*

Gegenstand der folgenden Experimente war der Einfluss einer Überexpression von *amtB*, *glnK* und/oder *glnD* auf die Expressionsregulation und Aktivitätsregulation. Hierfür wurden Western Blot Experimente und RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Der Wildtyp ATCC 13032 oder ein *glnK*- bzw. *glnD*-Deletionsstamm (NR-1 oder LN-D) wurde mit den Plasmiden pEKEX2*glnK*, pEKEX2*glnD*, pEKEX2*glnK-glnD*, pEKEX2*amtB-glnK-glnD*, pEKEX2*amtB-glnKY51F-glnD* und pEKEX2*glnKY51F* transformiert und die Zellen wurden bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kultiviert.

Für einen Antikörpernachweis von GlnK wurde die Cytoplasma- und die Membranfraktion präpariert. Die Komplementationen einer *glnK*-Deletion im Stamm NR-1pEKEX2glnK und einer *glnD*-Deletion in der Mutante LN-DpEKEX2glnD waren erfolgreich (Daten nicht gezeigt) und zeigten Signale wie der Wildtyp (vgl. Punkt 3.1.4). Der einzige Unterschied zum Wildtyp war, dass aufgrund einer induzierten Expression des Gens *glnK* auf dem pEKEX2-Vektor bereits bei guter Stickstoffversorgung ein Signal für den Stamm NR-1pEKEX2glnK detektiert werden konnte. Die Komplementationen zeigten somit, dass die Plasmid-kodierten Gene für funktionsfähige Proteine kodierten, da das Modifizierungsmuster von GlnK erhalten blieb.



**Abb. 3.10: Überexpressionsexperimente mit Komponenten des *amtB-glnK-glnD*-Operons.** Es wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt zum Nachweis von GlnK im Wildtyp ATCC 13032, der mit den verschiedenen pEKEX2-Plasmiden zur Überexpression von *glnK* (A), *glnD* (B), *glnK-glnD* (C), *amtB-glnK-glnD* (D), *amtB-glnKY51F-glnD* (E) und *glnKY51F* (F) transformiert wurde. Die Cytoplasma- (1-4) und die Membranfraktion (5-8) wurden präpariert aus Zellen, die bei guter Stickstoffversorgung (1/5), bei Stickstoffmangel (2/6) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 15 min (3-4/7-8) kultiviert wurden (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

Eine Überexpression des *glnK*-Gens im Wildtyp (Abb. 3.10A) zeigte im Cytoplasma unter guter Stickstoffversorgung demodifiziertes GlnK. Bei Stickstoffmangel wurde das Protein

adenylyliert und konnte nach einem Stickstoffpuls nur noch deadenylyliert nachgewiesen werden. In dieser Form war es in der Membranfraktion detektierbar. Die Modifikation von GlnK funktionierte demnach ebenso wie die Membranbindung an AmtB. Es konnte jedoch im Gegensatz zum Wildtyp nach einem Stickstoffpuls eine schwächere "Proteolyse" des Proteins beobachtet werden (vgl. Punkt 3.1.4). Offensichtlich ist die durch IPTG induzierte Synthese des GlnK-Proteins durch den Überexpressionsvektor pEKEX2 stärker als die Proteolysekapazität der Zelle. Ein Antikörperrnachweis von GlnK zeigte für eine Überexpression von *glnD* im Wildtyp (Abb. 3.10B) die gleichen Signale wie der Wildtyp ohne Plasmid (vgl. Punkt 3.1.4), während eine Überexpression von *glnK* und *glnD* im Wildtyp (Abb. 3.10C) das gleiche Proteinmuster wie eine Überexpression von *glnK* allein zeigte. Eine verstärkte Synthese der beiden zentralen Komponenten der Stickstoffkontrolle, GlnK und GlnD, hatte keinen Einfluss auf die stickstoffabhängige Modifikation von GlnK.

Eine Überexpression des gesamten Operons *amtB-glnK-glnD* (Abb. 3.10D) im Wildtyp zeigte in Western Blot Experimenten eine zusätzliche Bande im Vergleich zu einer Überexpression von *glnK* und *glnD*. Bereits bei guter Stickstoffversorgung konnte das deadenylylierte GlnK-Protein in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Durch die Überexpression des gesamten Operons stand dem GlnK-Protein der Interaktionspartner AmtB bereits bei guter Stickstoffversorgung zur Verfügung, so dass es zu einer Interaktion der beiden Proteine kam. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass eine Überexpression von GlnK, GlnD und/oder AmtB keinen Einfluss auf die Modifikation von GlnK, die Interaktion mit AmtB und eingeschränkt die "Proteolyse" von GlnK hat. Ein Antikörperrnachweis für GlnK von Proteinextrakten, die auf nativen Gelen aufgetrennt worden waren, zeigte, dass eine Überexpression der verschiedenen Genprodukte auch keinen Einfluss auf die Trimerisierung hatte (Daten nicht gezeigt).

Um zu analysieren, ob sich das Modifikationsmuster von GlnK ändert, wenn ein GlnK-Protein überexprimiert wird, das nicht mehr modifiziert werden kann, wurde das Tyrosin an Position 51 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht. In Western Blot Experimenten mit GlnK konnte im Wildtyp für die beiden Plasmide pEKEX2amtB-glnKY51F-glnD und pEKEX2glnKY51F ein vergleichbares Proteinmuster detektiert werden. Eine Überexpression des gesamten Operons (Abb. 3.10E) mit einem mutierten GlnK-Protein zeigte für die Cytoplasmafraktion unter guter Stickstoffversorgung das deadenylylierte Protein, bei Stickstoffmangel die deadenylylierte sowie adenylylierte Form in ungefähr gleichen Mengen und nach einem Stickstoffpuls demodifiziertes GlnK. In der Membranfraktion war das Protein unter allen Bedingungen in der deadenylylierten Form nachweisbar, da AmtB durch die Überexpression unter allen Bedingungen zur Verfügung stand. Das Proteinmuster unterschied sich von den vorherigen dadurch, dass unter Stickstoffmangel keine vollständige Adenylylierung möglich war. Neben dem genomischen, funktionsfähigen *glnK*-Gen wurde zusätzlich Plasmid-kodiert

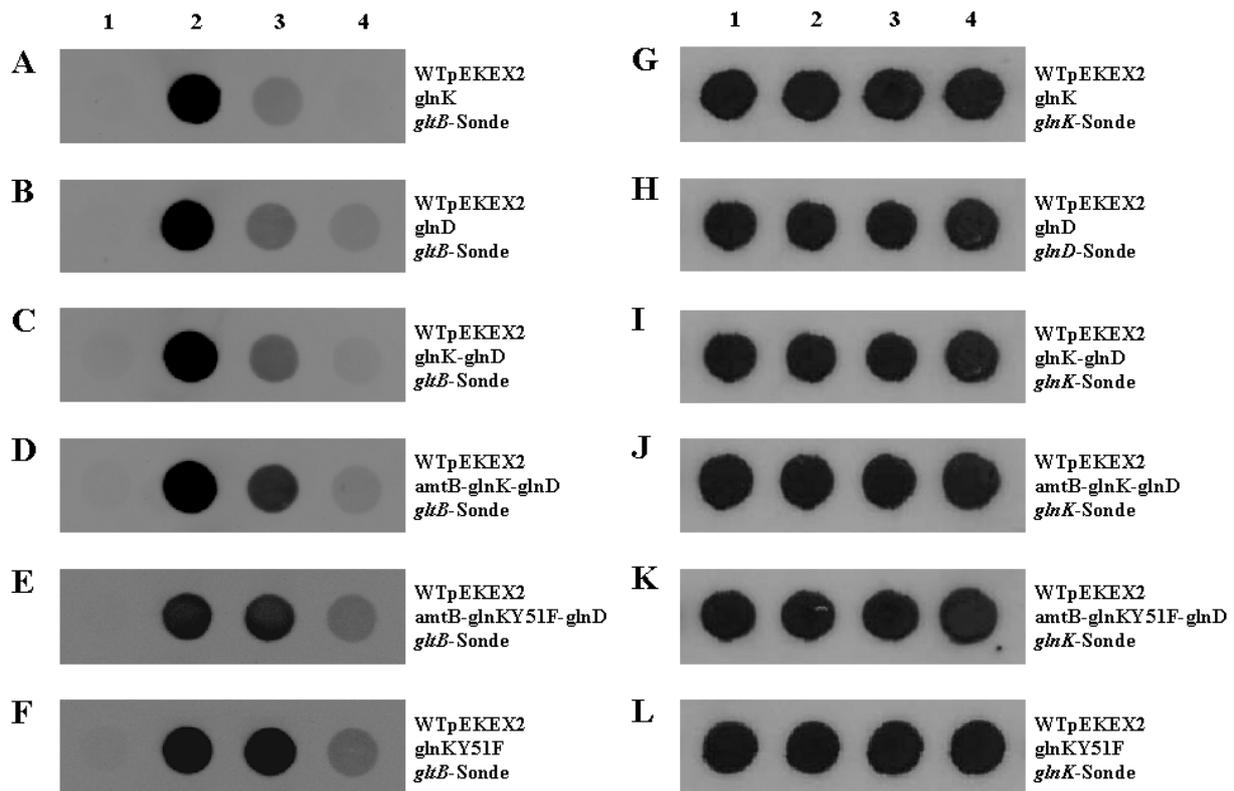
ein *glnK*-Gen exprimiert, das nicht mehr modifiziert werden konnte. Dieses Protein wurde nicht als falsch erkannt und abgebaut. Das gleiche Proteinmuster konnte für die Cytoplasmafraktion des Wildtyps pEKEX2glnKY51F (Abb. 3.10F) gezeigt werden. In der Membranfraktion zeigte sich jedoch erst unter Stickstoffmangel ein GlnK-Signal, da *amtB* hier nicht Plasmid-kodiert vorlag und die Expression AmtR-regulierter Gene erst unter dieser Bedingung angeschaltet wurde.

Die Frage, ob die auf dem SDS-Gel nachgewiesenen Untereinheiten von mutiertem GlnK noch in der Lage sind, sich zu Trimeren zusammenzulagern, wurde mit nativen Gelen beantwortet. Unter allen gewählten Bedingungen waren Trimere nachweisbar. Die Untereinheiten aus GlnK und mutiertem GlnK konnten Heterotrimere bilden. Es kam nicht zu einer Ansammlung von Monomeren oder Dimeren. Was jedoch auffiel war, dass unter Stickstoffmangel verstärkt vollständig modifizierte oder vollständig deadenylierte Trimere detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss einer Überexpression der Komponenten des *amtB-glnK-glnD*-Operons auf Expressionsebene zu analysieren, wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Hierfür wurde die RNA unter verschiedenen Stickstoffbedingungen isoliert und mit einer Sonde für das unter AmtR-Kontrolle stehenden Gens *gltB* hybridisiert. Ein Nachweis der zu untersuchenden Überexpression erfolgte, indem die isolierte RNA mit einer Sonde des überexprimierten Gens hybridisiert wurde. Abbildung 3.11G-L zeigt für alle überexprimierten Gene ein positives Signal.

Da die Komplementationen von *glnK* in NR-1 und *glnD* in LN-D ein Expressionsmuster für AmtR-regulierte Gene zeigten wie der Wildtyp (vgl. Punkt 3.1.2), konnte davon ausgegangen werden, dass die Plasmid-kodierten Gene *glnK* und *glnD* funktionsfähige Proteine synthetisierten (Daten nicht gezeigt). Alle untersuchten Überexpressionen fasst Abbildung 3.11A-F zusammen. Eine Überexpression von *glnK*, *glnD*, *glnK-glnD* oder des gesamten Operons im Wildtyp hatte keinen Einfluss auf die Stickstoffregulation auf Genexpressionsebene. Die Signale entsprachen denen des Wildtyps mit Kontrollvektor bzw. ohne Plasmid (vgl. Punkt 3.1.2). Unter guter Stickstoffversorgung reprimiert AmtR die Expression des stickstoffregulierten Gens *gltB*, bei einsetzendem Stickstoffmangel wird die Transkription induziert und nach einem Stickstoffpuls erfolgt eine Repression der Expression innerhalb weniger Minuten.

Das gleiche Expressionsmuster konnte auch für eine Überexpression der *glnK*-Mutanten pEKEX2amtB-glnKY51F-glnD und pEKEX2glnKY51F im Wildtyp beobachtet werden. Hier reichte die Menge an GlnK, das noch adenilyliert werden konnte, bei Stickstoffmangel aus, um eine Derepression AmtR-regulierter Gene auszulösen. Die Anwesenheit von Protein, das nicht mehr modifiziert werden konnte, hatte keinen Einfluss auf die Induktion der Expression.



**Abb. 3.11: Einfluss einer Überexpression von Komponenten des *amtB-glnK-glnD*-Operons auf die Expressionsregulation.** Zum Nachweis der Expression stickstoffregulierter Gene im Wildtyp ATCC 13032, der mit den verschiedenen pEKEK2-Plasmiden zur Überexpression von *glnK* (A/G), *glnD* (B/H), *glnK-glnD* (C/I), *amtB-glnK-glnD* (D/J), *amtB-glnKY51F-glnD* (E/K) und *glnKY51F* (F/L) transformiert wurde, wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die bei guter Stickstoffversorgung (1), nach Inkubation von 1,5 h in Stickstoffmangel (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 15 min (3/4) kultiviert wurden, und mit einer *gltB*- (A-F), einer *glnK*- (G/I-L) oder einer *glnD*-Sonde (H) hybridisiert.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Überexpression von *amtB*, *glnK* und/oder *glnD* keinen Einfluss auf die Regulation auf Genexpressionsebene und Proteinaktivitätsebene hat. Dies steht im Widerspruch zu früheren Experimenten, in denen eine Überexpression des Operons zu einer Deregulation auf Expressionsebene führte (Nolden *et al.*, 2001b). Das *amtB-glnK-glnD*-Operon wurde jedoch so konstruiert, dass der Promotor auf dem Plasmid noch vorhanden war und eine Erhöhung der Kopienzahl an AmtR-Bindemotiven zu einer Austitrierung des Repressors führte. Um diesen Effekt auszuschließen, erfolgte eine Überexpression in diesem Versuch unter der Kontrolle des Plasmid-eigenen Promotors. Dass die von Nolden *et al.* beobachtete Deregulation auf einen Titrierungseffekt zurückzuführen ist, zeigte eine Überexpression mit einer sensitiveren Methode, der *real-time* RT-PCR.

In einer *real-time* RT-PCR-Reaktion ist es möglich, die Expression AmtR-regulierter Gene im Detail zu analysieren, indem die eingesetzte Transkriptmenge quantifiziert wird. Das Prinzip der *real-time* RT-PCR beruht auf der Bestimmung der Produktzunahme mittels Fluoreszenz.

Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass der Konzentrationsanstieg des Produktes während einer PCR gemessen und dadurch Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der Matrize (mRNA) gezogen werden können. Zunächst wurde die Effizienz der verwendeten Primer ermittelt, indem je Primerpaar chromosomale DNA (50 ng/μl) in verschiedenen Verdünnungen in einer *real-time* PCR eingesetzt wurde. Anschließend wurde der CT-Wert (*threshold cycle*) bestimmt, der dem Zyklus entsprach, bei dem die Fluoreszenz den zuvor festgelegten Schwellenwert überschritt. Die genaue Bestimmung der Primereffizienz ist wichtig, um den Faktor aus den CT-Werten der *real-time* RT-PCR Experimente errechnen zu können. Generell liegt die Effizienz der Primer bei dem Wert 2, doch schon minimale Abweichungen von diesem Wert führen bei der Berechnung der Faktoren zu größeren Fehlern, wie sich aus der Formel zur Berechnung des Faktors (Primereffizienz  $(\sim 2)^{\text{CT-Wert}}$ ) erschließen lässt (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Übersicht über die Primer-Effizienzen für die *real-time* RT-PCR Experimente.**

Gen	Primereffizienz
<i>amtA</i>	2,22
<i>amtB</i>	1,84
<i>gltB</i>	2,18

DNA Kontaminationen in den RNA-Proben wurden mit *real-time* PCR-Experimenten, denen keine Reverse Transkriptase zugesetzt worden war, überprüft. Pro Gen wurde mindestens eine Dreifachbestimmung mit unabhängigen RNA-Proben durchgeführt. Für ein Experiment wurde immer die exakt gleiche Menge an RNA eingesetzt. Über eine Schmelzkurvenanalyse am Ende jeder quantitativen RT-PCR konnte die Entstehung unspezifischer Produkte während der *real-time* PCR-Reaktion ausgeschlossen werden. Stellvertretend für alle unter AmtR-Regulation stehenden Gene wurde die Expression des *gltB*-Gens, des *amtA*-Gens und des *amtB*-Gens untersucht. Der Wildtyp ATCC 13032 wurde mit den verschiedenen Plasmiden pZ8-1, pZglnK, pZglnD, pZamtB-glnK-glnD und pZglnKY51F transformiert und die RNA isoliert. Die Zellen wurden bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 15 Minuten kultiviert. Aus den Ergebnissen der *real-time* Daten lassen sich mit der Primereffizienz die einzelnen Faktoren berechnen (Tab. 3.2).

Für den Wildtyp, der nur mit dem Leervektor pZ8-1 transformiert wurde, zeigte sich unter Stickstoffmangel im Vergleich zu guter Stickstoffversorgung eine um den Faktor 185 höhere Expression von *amtA*, eine um den Faktor 208 höhere Transkription des *amtB*-Gens und

eine um den Faktor 495 höhere Expression von *gltB* (Tab. 3.2). Nach einem Stickstoffpuls ging die Expression wieder zurück und verdeutlichte die Regulation von AmtR-regulierten Genen abhängig vom Stickstoffstatus der Zelle. Für den Wildtyp, der mit den Plasmiden pZglnK, pZglnD und pZamtB-glnK-glnD transformiert wurde, zeigte sich ein einheitliches Bild. Im Stamm ATCC 13032 pZglnK (Tab. 3.2) wurde die Transkription unter Stickstoffmangel viel deutlicher induziert als im Wildtyp, der mit dem Leervektor transformiert worden war. Sie lag bspw. für das *gltB*-Gen um einen Faktor von ca. 1000 höher als bei guter Stickstoffversorgung. Nach einem Stickstoffpuls wurde die Expression wieder reprimiert. Die auf dem Plasmid pZ8-1 konstitutive Transkription des *glnK*-Gens führte zu einer erhöhten Expression AmtR-regulierter Gene unter Stickstoffmangel. Das gleiche Expressionsmuster konnte ebenfalls für die Plasmide pZglnD und pZamtB-glnK-glnD nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der beiden Schlüsselkomponenten GlnK und GlnD hatte keinen nachteiligen Effekt auf die Stickstoffkontrolle, sondern sorgte für eine verstärkte Expression stickstoffregulierter Gene unter Stickstoffmangel.

**Tab. 3.2: Daten der *real-time* RT-PCR Experimente.** Gezeigt sind die Faktoren und ihre Standardabweichung, wobei für jedes Gen (*amtA*, *amtB* und *gltB*) die Differenz der CT-Werte zum CT-Wert des Wildtyps transformiert mit dem entsprechenden Plasmid unter guter Stickstoffversorgung ermittelt wurde. Der Wert bei guter Stickstoffversorgung wurde auf 1 gesetzt. Mit Hilfe der Primereffizienzen wurden die CT-Werte in einen Faktor umgerechnet. Die Zellen wurden unter guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel (CgCoN) und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 15 Minuten (CgCoN+N) kultiviert und die RNA wurde isoliert.

Gen	WT pZ8-1		WT pZglnK		WT pZglnKY51F	
	CgCoN	CgCoN+N	CgCoN	CgCoN+N	CgCoN	CgCoN+N
<i>amtA</i>	185±0,9	2±0,1	417±2,3	23±1,4	38±2,1	5±2,0
<i>amtB</i>	208±1,1	4±0,3	631±3,1	76±1,6	57±1,9	11±1,1
<i>gltB</i>	495±2,8	7±1,3	1176±3,8	92±1,2	112±2,4	26±1,3

Um die Bedeutung der Modifikation des GlnK-Proteins für die Regulation auf Expressionsebene zu untersuchen, wurde der Wildtyp mit dem Plasmid pZglnKY51F (Tab. 3.2) transformiert, welches ein GlnK-Protein synthetisierte, das nicht mehr modifiziert werden konnte. Die Expression bei Stickstoffmangel wurde für alle betrachteten Gene nur ungefähr um ein Viertel im Vergleich zum Wildtyp gesteigert, der das Leerplasmid trug. Nach einem Stickstoffpuls ging die Transkription wieder zurück. Die Expression eines mutierten

*glnK*-Gens zusätzlich zur Transkription des genomischen *glnK* führte demnach zu einer geringeren Expression AmtR-regulierter Gene unter Stickstoffmangel. Dieses Phänomen konnte in den vorherigen Dot Blot Experimenten vermutlich aufgrund der geringen Sensitivität der Methode nicht beobachtet werden. Das Grundschema der Regulation auf Expressionsebene blieb jedoch bestehen, so dass der in früheren Experimenten beobachtete Effekt einer deregulierten Stickstoffkontrolle mit diesen Experimenten nicht bestätigt werden konnte.

### **3.2 Proteolyse von GlnK nach einem Stickstoffpuls**

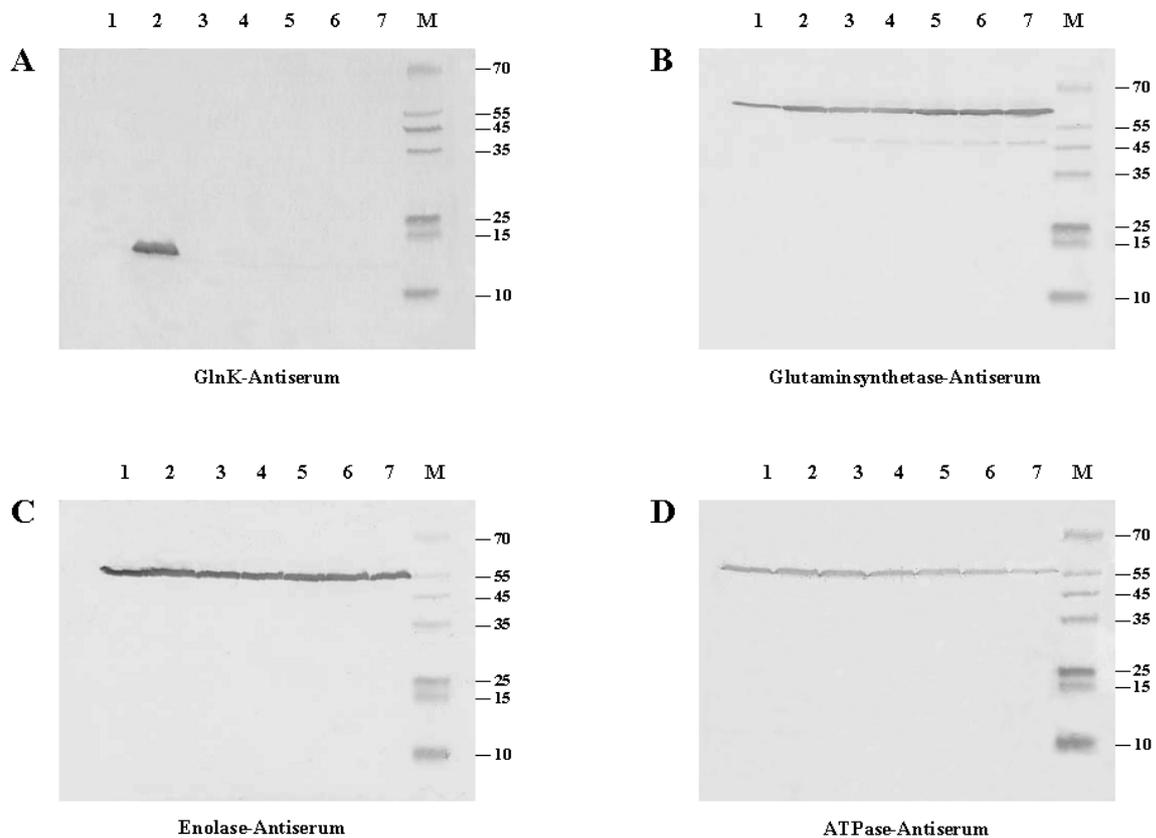
Das GlnK-Protein unterliegt nach einem Stickstoffpuls offensichtlich einem Abbau. An diesem ist zumindest indirekt der AmtB-Transporter beteiligt, da in der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 keine Proteolyse beobachtet werden konnte. Welche Protease für den Abbau von GlnK verantwortlich ist, wurde im Folgenden analysiert.

#### **3.2.1 Proteolyse als allgemeines Phänomen nach einem Stickstoffpuls**

Um zunächst zu überprüfen, ob es sich bei der Proteolyse des GlnK-Proteins um ein Phänomen handelt, was speziell für dieses Protein zu beobachten ist, oder ob auch andere Proteine, z.B. weitere Proteine des Stickstoffmetabolismus nach einem Stickstoffpuls proteolytisch abgebaut werden, wurden Western Blot Experimente durchgeführt. Die Glutaminsynthetase (GS) wurde als ein Protein des Stickstoffmetabolismus, die Enolase als ein cytoplasmatisches Protein und die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase als ein membranassoziiertes Protein ausgewählt. Wildtyp-Zellen ATCC 13032 wurden unter guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kultiviert und die Zellextraktfraktionen präpariert.

Ein Antikörpernachweis von GlnK (Abb. 3.12A) zeigte das bereits bekannte Proteinmuster, einen Abbau von GlnK nach einem Stickstoffpuls: bei guter Stickstoffversorgung war kein Protein detektierbar, nach Inkubation in Stickstoffmangel konnte die adenylylierte Form des Proteins nachgewiesen werden und nach einem Stickstoffpuls von 30 Minuten war das Protein nicht mehr zu detektieren. Die anderen Antikörpernachweise zeigten, dass sich die Menge der untersuchten Proteine nach einem Stickstoffpuls im Gegensatz zur Menge bei Stickstoffmangel nicht änderte. Diese Proteine unterlagen keinem Abbau. Die GS (Abb. 3.12B) zeigte als ein Protein des Stickstoffmetabolismus unter guter Stickstoffversorgung ein schwächeres Signal als bei Stickstoffmangel. Nach einem Stickstoffpuls blieb die Proteinmenge über einen Zeitraum von mindestens 4 Stunden konstant. Die Enolase und die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase zeigten unter den gewählten Bedingungen gleich starke Signale (Abb. 3.12C/D). Ihre Synthese unterlag somit weder der Stickstoffkontrolle noch

wurden diese Proteine nach einem Stickstoffpuls abgebaut. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der für GlnK beobachtete Abbau spezifisch für dieses Protein ist.



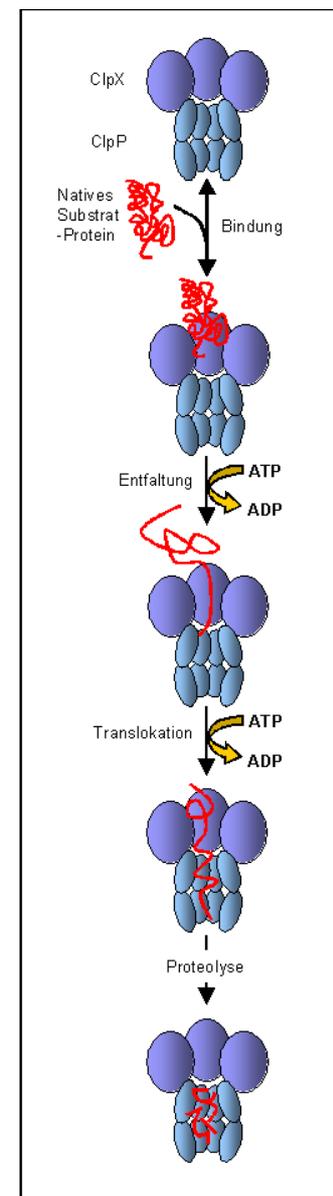
**Abb. 3.12: Proteolyse in *C. glutamicum* nach einem Stickstoffpuls.** Es wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen zum Nachweis von GlnK (**A**), des Glutaminsynthetase-Proteins (**B**), der Enolase (**C**) und der  $\beta$ -Untereinheit des ATPase-Proteins (**D**) durchgeführt. Wildtyp-Zellen ATCC 13032 wurden bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 30 min und 1, 2, 3 und 4 h (3-7) kultiviert und die Zellextrakte präpariert (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

### 3.2.2 Einfluss von Clp und FtsH auf den GlnK-Abbau

Im Folgenden wurde untersucht, welche Protease für den Abbau des GlnK-Proteins verantwortlich ist. *C. glutamicum* besitzt abhängig von der Genomannotation etwa 40 Gene für Proteasen. Die ersten Gene, die deletiert wurden, kodierten für die regulatorischen Untereinheiten ClpC und ClpX sowie für die proteolytische Untereinheit ClpP1P2 des Clp-Protease-Komplexes (Kooperation mit Steffen Schaffer, Forschungszentrum Jülich). Clp-Proteasen sind große Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten (Abb. 3.13, nach Wickner *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 2000). Sie bestehen grundsätzlich aus einem proteolytischen Kernbereich (der ClpP-Protease), in dem Serinproteasen mit ihren aktiven Zentren den Proteinabbau vollziehen. Die regulatorische ATPase-Einheit besteht aus einem

hexameren Ring aus ClpC- oder ClpX-ATPasen und fungiert als Erkennungsbereich für Substratproteine. Die ATPase-Untereinheiten können als Chaperone wirken und das entfaltete Substratprotein wieder rückfalten, oder das entfaltete Protein in die proteolytische Kammer leiten.

Zellen der Mutanten ATCC 13032  $\Delta clpX$  und ATCC 13032  $\Delta clpC$  wurden unter verschiedenen Stickstoffbedingungen kultiviert, die Zellextrakt-, die Cytoplasma- und die Membranfraktion präpariert und Antikörpernachweise von GlnK durchgeführt. In der Zellextrakt- (Abb. 3.14A) und in der Cytoplasmafraktion (Abb. 3.14B) der Mutante ATCC 13032  $\Delta clpX$  war bereits bei guter Stickstoffversorgung demodifiziertes GlnK nachweisbar. Die Ursache für dieses sehr hohe Signal war vermutlich die Ansammlung von GlnK über einen langen Zeitraum, das ohne die benötigte Protease nicht abgebaut werden konnte. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das Vorkommen von GlnK unter guter Stickstoffversorgung könnte allerdings eine gestörte Expression der unter Stickstoffkontrolle stehenden Gene wie *glnK* sein. Diese Möglichkeit wurde in RNA-Hybridisierungen geprüft (vgl. Punkt 3.2.3). Das Signal bei Stickstoffmangel war stärker als bei guter Stickstoffversorgung und blieb nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konstant. Bei Stickstoffmangel konnte die adenylierte und deadenylierte Form von GlnK nachgewiesen werden, während nach einem Stickstoffpuls von 2 Minuten nur noch deadenyliertes GlnK detektierbar war. Für den Zellextrakt wurde die prozentuale Menge des Proteins im Vergleich zur Menge bei Stickstoffmangel bestimmt, indem die Intensität des Signals unter Stickstoffmangel als 100% gesetzt wurde. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung aus unabhängigen Western Blots durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die Quantifizierung der Signale zeigte bereits bei guter Stickstoffversorgung eine große Menge von GlnK. Bei Stickstoffmangel kam es noch zu einer Verstärkung des Signals, welches über eine Zeitspanne von 20 Minuten konstant blieb (Abb. 3.14A). GlnK wurde hier demnach nicht mehr abgebaut.



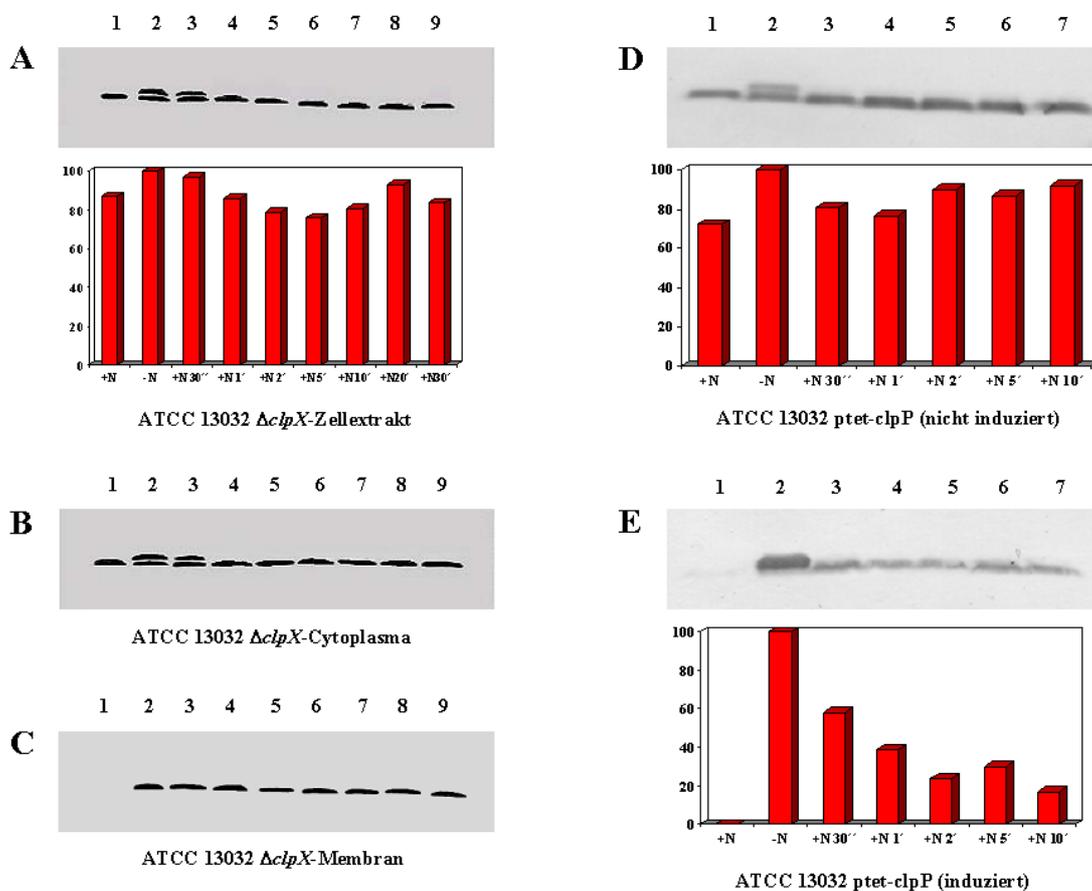
**Abb. 3.13: Modell des proteolytischen Proteinabbaus durch den Clp-Protease-Komplex.** Die hexamere ATPase Untereinheit (ClpC oder ClpX) verbindet sich mit dem proteolytischen Komplex (ClpP) unter ATP-Verbrauch zur aktiven Protease. Die ATPase-Domäne erkennt das Substratprotein, entfaltet es und transportiert das Substrat in die proteolytische Kammer. Dort wird es abgebaut. (nach Wickner *et al.*, 1999; Hoskins *et al.*, 2000).

In der Membranfraktion des Stammes ATCC 13032  $\Delta clpX$  (Abb. 3.14C) war bei guter Stickstoffversorgung kein GlnK nachweisbar. Bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls konnte GlnK hingegen detektiert werden. Das Protein war in der Lage, an die Membran zu binden, sobald die Transkription stickstoffregulierter Gene unter Stickstoffmangel angeschaltet wurde und es zu einer Expression des *amtB*-Gens kam. AmtB stand dann als Interaktionspartner von GlnK in der Membran zur Verfügung. Da GlnK bei Stickstoffmangel in der adenylierten und in der deadenylierten Form vorlag, war bereits unter diesen Bedingungen eine Interaktion zwischen GlnK und AmtB möglich. Im Wildtyp war dies nicht der Fall. GlnK war dort bei Stickstoffmangel ausschließlich in der adenylierten Form zu finden, die vermutlich wie in *E. coli* nur eine sehr niedrige Affinität zu AmtB hat (Cou tts *et al.*, 2002). Das gleiche Proteinmuster konnte für die Zellextrakt-, die Cytoplasma- und die Membranfraktion der ATCC 13032  $\Delta clpC$ -Deletionsmutante gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse eine Beteiligung der regulatorischen Untereinheiten ClpC und ClpX an dem proteolytischen Abbau von GlnK nach einem Stickstoffpuls. Neben den beiden regulatorischen Untereinheiten besteht der Clp-Protease-Komplex auch aus der für die Proteolyse verantwortlichen Untereinheit ClpP1P2. Da deren Deletion jedoch letal ist, konnte keine entsprechende Mutante hergestellt werden. Um den Einfluss von ClpP1P2 auf die Proteolyse von GlnK analysieren zu können, wurde die konditionale Mutante ATCC 13032 ptet-clpP-cJC1-pgap-tetR von ClpP1P2 genutzt (Kooperation mit Steffen Schaffer, Forschungszentrum Jülich). Hier ist das Gen für die proteolytische Funktion *clpP* im Genom ausgeschaltet, befindet sich aber auf einem Plasmid, das durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) abgelesen wird. Die Zellen können in Anwesenheit von AHT unter Wildtypkonditionen kultiviert werden. Um den Effekt einer *clpP*-Deletion zu testen, wurden die Zellen mit AHT über Nacht vorkultiviert und für die eigentliche Proteinpräparation ohne AHT-Zugabe angezogen. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit Zugabe von AHT durchgeführt. Der Zellextrakt, das Cytoplasma und die Membranfraktion wurden präpariert und ein Antikörpernachweis von GlnK durchgeführt.

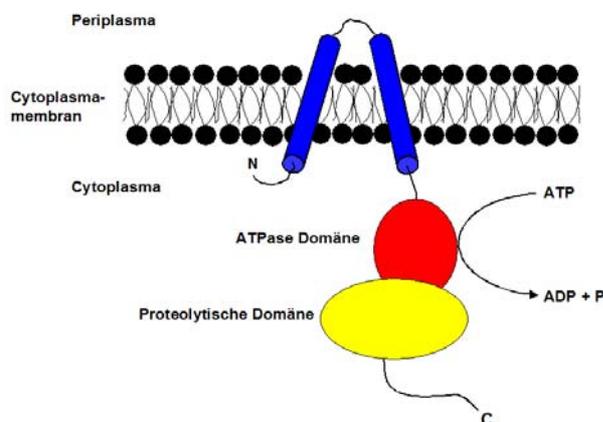
Für den Zellextrakt (Abb. 3.14D) und das Cytoplasma (Daten nicht gezeigt) des Stammes ATCC 13032 ptet-clpP-cJC1-pgap-tetR, in dem die Expression des Protease-Gens nicht induziert wurde, wurde GlnK nach einem Stickstoffpuls nicht mehr abgebaut. Die Signale blieben konstant. Die Quantifizierung der Signale für die Zellextraktproben zeigte, dass bereits unter guter Stickstoffversorgung GlnK in großer Menge detektierbar war (Abb. 3.14D). Das Signal bei Stickstoffmangel wurde als 100% gesetzt und die anderen Signalstärken berechnet. Da die Werte nach einem Stickstoffpuls ebenfalls ungefähr 100% betragen, konnte so noch einmal bestätigt werden, dass GlnK nach einem Stickstoffpuls nicht mehr abgebaut wurde. Für die Membranfraktion zeigte sich das gleiche Bild wie für die

Mutanten ATCC 13032  $\Delta clpX$  und ATCC 13032  $\Delta clpC$  (Daten nicht gezeigt). Ein Antikörpernachweis von GlnK im Stamm ATCC 13032 p<sub>tetpClpP-cJC1-pgap-tetR</sub>, der unter Zugabe von AHT kultiviert wurde, zeigte ein Proteinmuster, wie es für den Wildtyp beobachtet wurde (vgl. Punkt 3.1.4). Das Protein wurde im Zellextrakt (Abb. 3.14E) und im Cytoplasma abgebaut (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung der Zellextraktproben (Abb. 3.14E) zeigte dem Wildtyp entsprechende Werte (vgl. Punkt 3.1.4). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass sowohl die regulatorischen Untereinheiten ClpC und ClpX, als auch die proteolytische Domäne ClpP1P2 die Proteolyse von GlnK beeinflussen.



**Abb. 3.14: Quantifizierung der Proteolyse von GlnK in Protease-Deletionsmutaten.** **A-C)** Zum Nachweis von GlnK im Zellextrakt (**A**), im Cytoplasma (**B**) und in der Membranfraktion (**C**) der ATCC 13032  $\Delta clpX$ -Mutante bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(NH_4)_2SO_4$  und Inkubation für 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 20 min (3-9) wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Quantifizierung der Signale in der Zellextraktfraktion erfolgte, indem das Signal bei Stickstoffmangel als 100% gesetzt wurde. **D/E)** Es wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen zum Nachweis von GlnK im Zellextrakt von ATCC 13032 p<sub>tetpClpP-cJC1-pgap-tetR</sub> ohne eine Induktion der *clpP* Mutation mit Anhydrotetracyclin (**D**) und nach einer Induktion der *clpP* Mutation mit Anhydrotetracyclin (**E**) bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(NH_4)_2SO_4$  und Inkubation für 1, 2, 5, 10 und 20 min (3-7) durchgeführt. Die Quantifizierung der Signale in der Zellextraktfraktion erfolgte, indem das Signal bei Stickstoffmangel als 100% gesetzt wurde.

Da der Clp-Protease-Komplex im Cytoplasma lokalisiert ist, GlnK aber vermutlich nach Bindung an AmtB an der Membran abgebaut wird, lag die Vermutung nahe, dass GlnK unter Beteiligung einer weiteren Protease proteolytisch gespalten wird. So könnte GlnK durch Bindung an den AmtB-Transporter mit einer membranständigen Protease in Wechselwirkung treten, die GlnK zunächst für den Abbau "markiert". Der Gesamtabbau könnte dann von den Clp-Protease-Komplexen ClpCP und ClpXP übernommen werden, die im Cytoplasma lokalisiert sind. *C. glutamicum* besitzt je nach Genomannotation etwa 10 Gene, die für membranständige Proteasen kodieren. Eine in der Membran lokalisierte Protease ist FtsH (*Filamentation temperature sensitive*; Santos & De Almeida, 1975), die über zwei Transmembranhelices in der cytoplasmatischen Membran verankert ist (Abb. 3.15). Sie weist



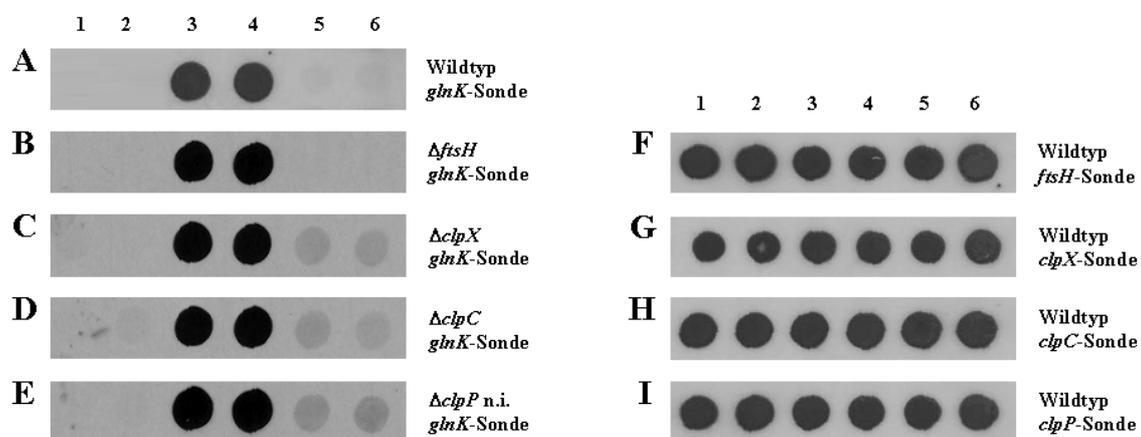
**Abb. 3.15: Schematische Darstellung der FtsH-Protease.** FtsH ist über zwei Transmembranhelices an der N-terminalen Domäne in der Membran verankert. Die Proteine werden durch die ATPase Domäne entfaltet und durch die proteolytische Domäne abgebaut (nach Schmidt *et al.*, 1999).

eine ATPase-Domäne und eine proteolytische Domäne auf. Als Metall-Protease trägt sie in ihrem aktiven Zentrum ein  $Zn^{2+}$ -Ion. Die FtsH-Protease könnte eine "Markierung" von GlnK für die Gesamtproteolyse übernehmen. Ein Antikörpernachweis von GlnK in der Deletionsmutante ATCC 13032  $\Delta ftsH$  (Kooperation mit Steffen Schaffer, Forschungszentrum Jülich) zeigte weder im Zellextrakt noch im Cytoplasma einen Abbau des Proteins (Daten nicht gezeigt). Die FtsH Protease beeinflusst demnach wie die Clp-Protease-Komplexe ClpCP und ClpXP die Proteolyse des GlnK-Proteins.

### 3.2.3 Stickstoffkontrolle in den Protease-Mutanten und Expression der Protease-Gene im Wildtyp

Um zu zeigen, ob die fehlende Proteolyse von GlnK in den Protease-Deletionsmutanten ATCC 13032  $\Delta ftsH$ , ATCC 13032  $\Delta clpX$ , ATCC 13032  $\Delta clpC$  und ATCC 13032 ptet-clpP-cJC1-pgap-tetR darauf zurückzuführen ist, dass die für den Abbau verantwortliche Protease fehlt oder eine mögliche Deregelation zu einer ständigen Expression des *glnK*-Gens führt, wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Die RNA wurde isoliert und mit einer *glnK*-Sonde hybridisiert. In den Stämmen ATCC 13032  $\Delta ftsH$ , ATCC 13032  $\Delta clpX$ , ATCC 13032  $\Delta clpC$  und ATCC 13032 ptet-clpP-cJC1-pgap-tetR (Abb. 3.16B-E) zeigte sich das gleiche

Expressionsmuster für das stickstoffregulierte Gen *glnK* wie im Wildtyp ATCC 13032 (Abb. 3.16A). Unter guter Stickstoffversorgung war keine Transkription von *glnK* detektierbar, nach Inkubation in Stickstoffmangel wurde die Expression des *glnK*-Gens induziert und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wieder reprimiert. Das GlnK-Protein wurde somit bei Stickstoffmangel neu synthetisiert, obwohl bei guter Stickstoffversorgung bereits eine große Menge an Protein vorhanden war (vgl. Punkt 3.2.2). Die Stickstoffkontrolle ist noch intakt und die konstanten Signale von GlnK nach einem Stickstoffpuls in den Protease-Deletionsmutanten sind nicht mit einer deregulierten Expression des *glnK*-Gens zu erklären, sondern mit einer fehlenden Proteolyse des GlnK-Proteins.



**Abb. 3.16: Stickstoffkontrolle in den Protease-Deletionsmutanten und Expression der Protease-Gene im Wildtyp. A-E)** Es wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt zum Nachweis der Expression stickstoffregulierter Gene im Wildtyp ATCC 13032 (A) und in den Deletionsmutanten ATCC 13032  $\Delta ftsH$  (B),  $\Delta clpX$ - (C),  $\Delta clpC$ - (D) und ATCC 13032 ptet-clpP-cJC1-pgap-tetR, in der das Plasmid zur Expression von *clpP* nicht mit Anhydrotetracyclin (AHT) induziert wurde (E). Die RNA wurde isoliert aus Zellen, die bei guter Stickstoffversorgung (1), nach Inkubation von 0, 15 und 30 min in Stickstoffmangel (2-4) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 15 und 30 min (5/6) kultiviert worden waren. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *glnK*-Sonde. **F-I)** Zum Nachweis der Expression der Protease-Gene wurde die RNA aus Wildtyp-Zellen ATCC 13032 isoliert und mit einer *ftsH*- (F), *clpX*- (G), *clpC*- (H) und *clpP*-Sonde (I) hybridisiert.

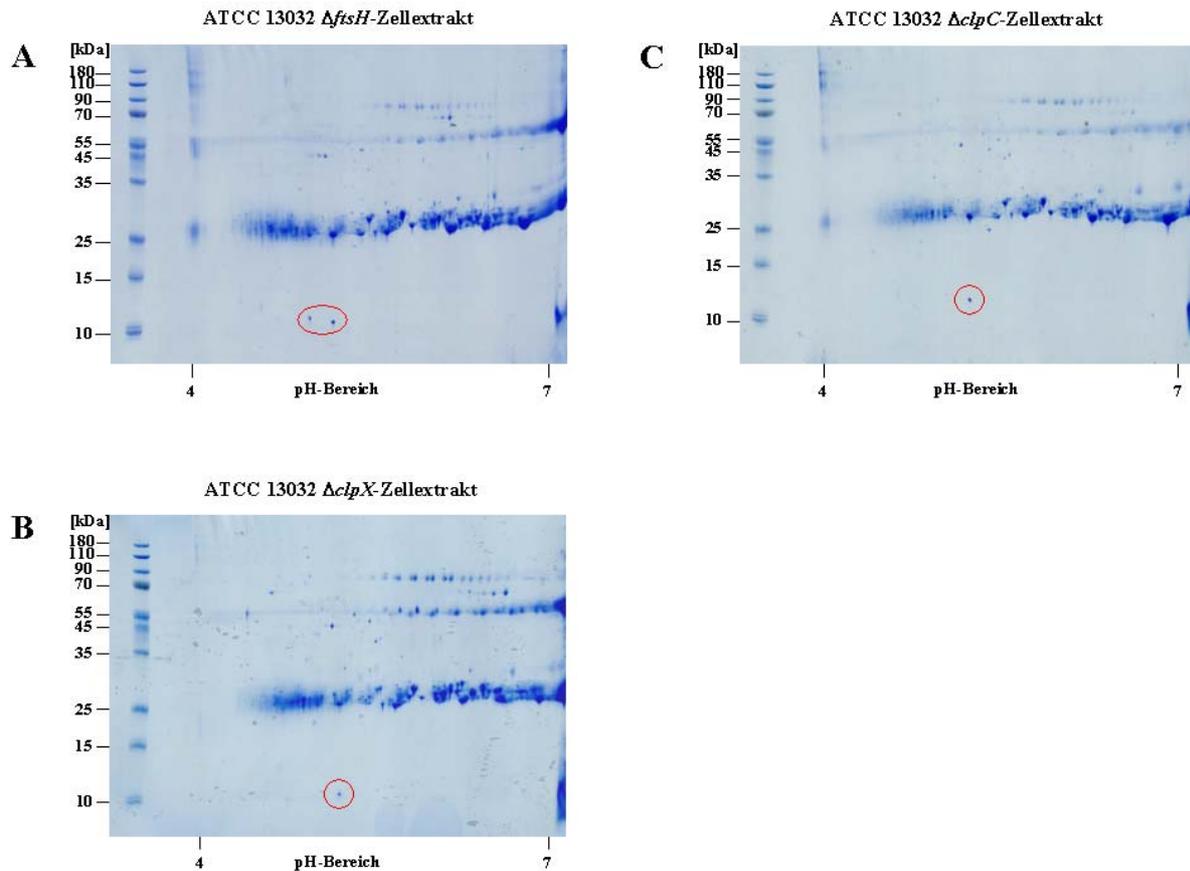
Stickstoffmangel stellt für die Zellen eine Stresssituation dar, auf die sie mit der Expression stickstoffregulierter Gene reagieren. Proteasen werden ebenfalls unter Stressbedingungen verstärkt synthetisiert, um z.B. nach einem Hitzeschock falsch gefaltete oder denaturierte Proteine, abzubauen. Ob auch in einer Stickstoffmangelsituation eine verstärkte Expression von Protease-Genen beobachtet werden kann, wurde mit weiteren RNA-Hybridisierungen analysiert. Für die Protease-Gene *ftsH*, *clpX*, *clpC* und *clpP* wurden Sonden hergestellt und die RNA aus dem Wildtyp ATCC 13032 und der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 wurde unter unterschiedlichen Stickstoffbedingungen isoliert. RNA-Hybridisierungen von Wildtyp-RNA mit

den Sonden *ftsH*, *clpX*, *clpC* und *clpP* (Abb. 3.16F-I) zeigten unter guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gleich starke Signale. Ein identisches Expressionsmuster konnte auch mit RNA der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass ein fehlender Abbau des GlnK-Proteins in dieser Mutante nicht auf eine geringere Expression der Protease-Gene zurückgeführt werden konnte. Die Protease-Gene wurden unter allen gewählten Stickstoffbedingungen konstitutiv exprimiert und unterlagen nicht der Stickstoffregulation durch AmtR.

### 3.2.4 GlnK-Isolierung aus den Protease-Deletionsmutanten

Eine Untersuchung der Protease-Mutanten zeigte, dass die Stickstoffregulation auf Expressionsebene noch funktionierte und die konstanten GlnK-Mengen nach einem Stickstoffpuls auf eine fehlende Proteolyse zurückzuführen ist. Der Abbau von GlnK wird sowohl durch die Clp-Protease-Komplexe ClpCP und ClpXP als auch durch die membranständige Protease FtsH beeinflusst. Der Ablauf einer Proteolyse von GlnK könnte so aussehen, dass GlnK nach Kontakt mit AmtB zuerst von der FtsH-Protease "markiert" wird, um danach von den Clp-Protease-Komplexen, die im Cytoplasma lokalisiert sind, abgebaut zu werden. Um diese Überlegung experimentell zu untersuchen, wurde das GlnK-Protein aus den verschiedenen Protease-Deletionsstämmen ( $\Delta\text{ftsH}$ ,  $\Delta\text{clpX}$  und  $\Delta\text{clpC}$ ) isoliert. Hierfür wurde der Zellextrakt von Zellen, die bei Stickstoffmangel kultiviert worden waren und denen dann ein Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  für 10 Minuten gegeben wurde, präpariert. GlnK wurde mit Hilfe von Protein A-gekoppelten *Magnetic Beads* und einem GlnK-Antikörper aus dem Zellextrakt isoliert. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem 2-D-Gel aufgetrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt (Abb. 3.17).

Auf den 2-D-Gelen befanden sich auf einer Höhe von 25 kDa die leichten Ketten und auf einer Höhe von 55 kDa die schweren Ketten des GlnK-Antikörpers. Diese wurden zusammen mit GlnK co-eluiert. Auf einer Höhe von 12 kDa waren für den Stamm ATCC 13032  $\Delta\text{ftsH}$  zwei deutliche Spots erkennbar, der rechte zeigt die deadenylierte Form von GlnK ( $\text{pI} = 5,0$ ) und der linke das adenylierte GlnK-Protein ( $\text{pI} = 4,8$ ). In den Mutanten ATCC 13032  $\Delta\text{clpX}$  und ATCC 13032  $\Delta\text{clpC}$  konnte jeweils nur die deadenylierte Form von GlnK detektiert werden, da das Protein dort nach einem Stickstoffpuls schneller deadenyliert wurde. Die Spots, die vermutlich das isolierte GlnK-Protein darstellten, wurden aus dem 2-D-Gel ausgeschnitten, mit Trypsin bzw. alternativ mit Chymotrypsin verdaut und zur Analyse über MALDI-TOF-MS ins ZMMK gegeben.



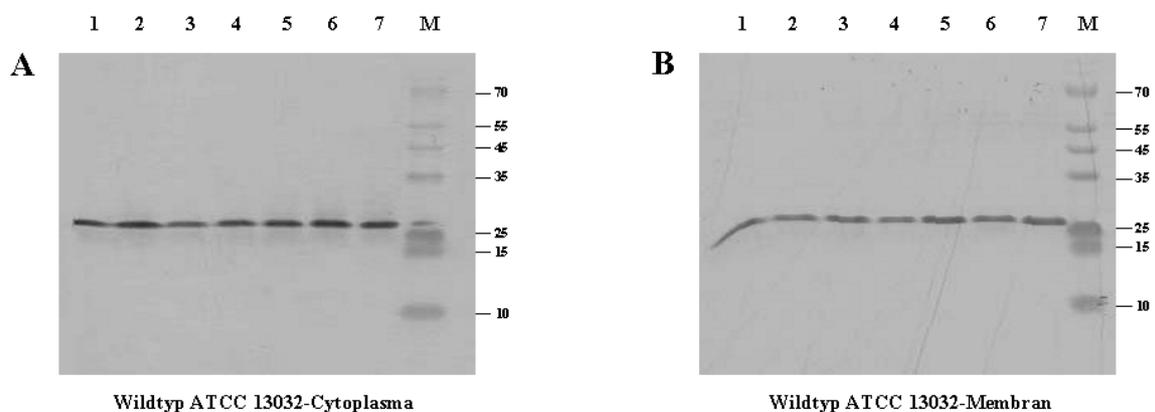
**Abb. 3.17: Modifikation des GlnK-Proteins in den Protease-Deletionsmutanten.** Das GlnK-Protein wurde aus dem Zellextrakt der Protease-Mutanten ATCC 13032  $\Delta ftsH$  (A),  $\Delta clpX$  (B) und  $\Delta clpC$  (C) von Zellen, die unter Stickstoffmangel kultiviert und dann mit 100 mM  $(NH_4)_2SO_4$  für 10 min gepulst wurden, isoliert. Nach einer Elution wurden die Proteine auf einem 2-D-Gel aufgetrennt, mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt, die markierten Spots ausgeschnitten und über MALDI-TOF-MS identifiziert (Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

Eine Analyse der N-terminalen sowie C-terminalen Peptide zeigte, dass eine proteolytische Modifizierung ebenso ausgeschlossen werden konnte wie eine Modifikation z.B. eine Methylierung oder Phosphorylierung. Die Isolierung des GlnK-Proteins aus den Stämmen ATCC 13032  $\Delta ftsH$ , ATCC 13032  $\Delta clpX$  und ATCC 13032  $\Delta clpC$  trug somit nicht zum weiteren Verständnis des Abbaus von GlnK bei. Es waren keine Zwischenformen im Abbauprozess von GlnK nachweisbar.

### 3.2.5 Lokalisierung von ClpP in der Zelle

Die Proteolyse von GlnK verläuft vermutlich unter Beteiligung der membranassoziierten Protease FtsH und der Clp-Protease-Komplexe ClpCP und ClpXP. Da in der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 kein Abbau beobachtet werden konnte (vgl. Punkt 3.1.4), muss die Bindung von GlnK an AmtB für die Proteolyse eine Bedeutung haben. Die FtsH-Protease ist

wie AmtB in der Membran verankert, der Clp-Protease-Komplex wird hingegen im Cytoplasma vermutet. Ob dieser auch in Wechselwirkung mit der Membran treten kann, indem er mit einem Membranprotein interagiert, wurde mit Hilfe eines ClpP1-Antikörpers analysiert. Hierfür wurden Zellen vom Wildtyp ATCC 13032 und der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 unter verschiedenen Stickstoffbedingungen kultiviert und die Cytoplasma- sowie die Membranfraktion präpariert. Für alle Fraktionen des Wildtyps (Abb. 3.18A) und des *amtB*-Deletionsstammes LN-1.1 (Daten nicht gezeigt) zeigte ein Antikörpernachweis von ClpP1 unter guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls ein gleich starkes Signal, so dass eine konstitutive und stickstoffunabhängige Synthese des ClpP-Proteins beobachtet werden konnte.



**Abb. 3.18: Lokalisierung des ClpP1-Proteins in der Zelle.** Es wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt zum Nachweis der proteolytischen Untereinheit ClpP1 des Clp-Protease-Komplexes im Cytoplasma (**A**) und in der Membranfraktion (**B**) des Wildtyps ATCC 13032 bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 1, 2, 5, 10 und 20 min (3-7) (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

Da die Membranfraktion des Wildtyps (Abb. 3.18B) und der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 (Daten nicht gezeigt) die gleichen Proteinmuster zeigten, konnte ein Einfluss des AmtB-Transporters auf die Lokalisierung des ClpP1-Proteins in der Zelle ausgeschlossen werden. Durch den Nachweis von ClpP1 in der Membranfraktion und aufgrund der Ergebnisse der GlnK-Isolierung aus den Deletionsmutanten ATCC 13032  $\Delta\text{ftsH}$ , ATCC 13032  $\Delta\text{clpC}$  und ATCC 13032  $\Delta\text{clpX}$  ist es wahrscheinlich, dass das GlnK-Protein unter Beteiligung der FtsH-Protease und der Clp-Protease-Komplexe ClpCP und ClpXP an der Membran abgebaut wird.

### 3.3 Interaktionsstudien zu Proteinen der Stickstoffkontrolle

#### 3.3.1 Untersuchungen von Interaktionen des Repressors AmtR mit anderen Proteinen

Die Regulation des Stickstoffmetabolismus erfolgt auf Expressionsebene durch den globalen Repressor AmtR, der zur TetR-/AcrR-Familie zählt und vermutlich als Dimer aktiv ist. Er reprimiert bei guter Stickstoffversorgung die Expression von insgesamt 36 Genen. Für eine Derepression AmtR-kontrollierter Gene scheinen das GlnK-Protein und die Transferase GlnD notwendig zu sein (Nolden *et al.*, 2001b). Ein Experiment mit einer GlnK-Mutante, die den Tyrosylrest gegen Phenylalanin ausgetauscht hatte, zeigte bei Stickstoffmangel, wie eine *glnK*- und eine *glnD*-Deletionsmutante, keine Expression AmtR-regulierter Gene mehr (Nolden *et al.*, 2001b). Da aufgrund der bisherigen Ergebnisse für eine Derepression stickstoffregulierter Gene eine direkte Interaktion von AmtR mit GlnK diskutiert wurde, wurden *Pull-Down* Experimente zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von AmtR durchgeführt.

##### 3.3.1.1 *Pull-Down* Experimente mit AmtR

###### Überexpression von AmtR mit Hilfe des pMAL-Systems

Für *Pull-Down* Experimente mit AmtR wurde das pMAL-System verwendet. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm BL21, mit dem Plasmid pMAL-c2amtR transformiert. Durch eine Induktion mit IPTG wurde das Fusionsprotein AmtR-MBP synthetisiert. Das Maltose-Bindeprotein (MBP) konnte mit dem fusionierten AmtR an eine Amylose-Matrix binden. Um mögliche Interaktionspartner von AmtR-MBP zu isolieren, wurde eine Zellextraktfraktion aus *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen ATCC 13032 auf die mit AmtR gesättigte Säule gegeben. Nach dem Entfernen von nicht gebundenen Proteinen wurden alle verbliebenen an AmtR-MBP gebundenen Proteine durch Zugabe von Maltose von der Amylose-Säule eluiert, da das Maltose-Bindeprotein eine höhere Affinität zu Maltose besitzt als zu Amylose. AmtR-MBP und mögliche Interaktionspartner aus dem Zellextrakt von *C. glutamicum* wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt, mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt und über MALDI-TOF-MS identifiziert.

Die *Pull-Down* Experimente mit AmtR-MBP wurden an einer FPLC-Anlage (*Fluid Pressure Liquid Chromatography*) durchgeführt. Für die folgenden Versuche wurden Zellextrakte von *E. coli* pMAL-c2amtR und von *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen präpariert. Die SDS-Gele der Auftragsfraktionen zeigten, dass AmtR-MBP aus dem Zellextrakt von *E. coli* pMAL-c2amtR an die Amylose-Säule gebunden hatte, da die Menge an überexprimiertem Protein in den Auftragsfraktionen deutlich abnahm (Daten nicht gezeigt). Die SDS-Gele der Wasch-

fraktionen waren proteinfrei. Nach dem Auftrag des *C. glutamicum*-Zellextraktes wurde eine deutliche Bande auf der Höhe des AmtR-MBP-Fusionsproteins sichtbar, die im *C. glutamicum*-Zellextrakt vorher nicht zu sehen gewesen war (Daten nicht gezeigt). Da auf den SDS-Gelen der Waschfraktionen nach dem Auftrag des *C. glutamicum*-Zellextraktes sowie auf den SDS-Gelen der Elutionsfraktionen keine Proteine detektiert werden konnten, wurde spekuliert, dass es sich bei der zusätzlichen Bande in den Auftragsfraktionen des *C. glutamicum*-Zellextraktes um das AmtR-MBP-Fusionsprotein handelte. Weitere Versuche konnten diese Vermutung bestätigen, so dass der *C. glutamicum*-Zellextrakt für eine Lösung der Bindung zwischen Amylose-Matrix und AmtR-MBP verantwortlich war. Eine Analyse des *C. glutamicum*-Zellextraktes zeigte, dass es weder zu einer Veränderung des pH-Wertes kam noch Maltose im Zellextrakt detektierbar war, die eine Bindung lösen könnte. Es konnten allerdings Amylasen im *C. glutamicum*-Zellextrakt nachgewiesen werden. Amylasen spalten die Amylose zu Zuckern wie Glukose. Für den Nachweis einer Amylase-Aktivität im *C. glutamicum*-Zellextrakt wurde ein Test benutzt, um reduzierende Zucker mit Hilfe von Dinitrosalicylsäure (DNS-Reagenz) zu detektieren, die durch die Umsetzung von Stärke zu Glukose entstehen. Als Vergleich wurde die Amylase-Aktivität im *E. coli*-Zellextrakt mit dem überexprimierten Protein AmtR-MBP bestimmt. Hier konnten im Gegensatz zum *C. glutamicum*-Zellextrakt jedoch keine reduzierenden Zucker nachgewiesen werden. Die Amylasen im *C. glutamicum*-Zellextrakt waren somit für eine Spaltung der Bindung zwischen der Amylose-Säule und AmtR-MBP verantwortlich. Da die *Pull-Down* Experimente mit dem pMAL-System erfolglos waren, wurde stattdessen das Nickel-NTA-System eingesetzt.

### **Überexpression von AmtR unter Verwendung des Nickel-NTA-Systems**

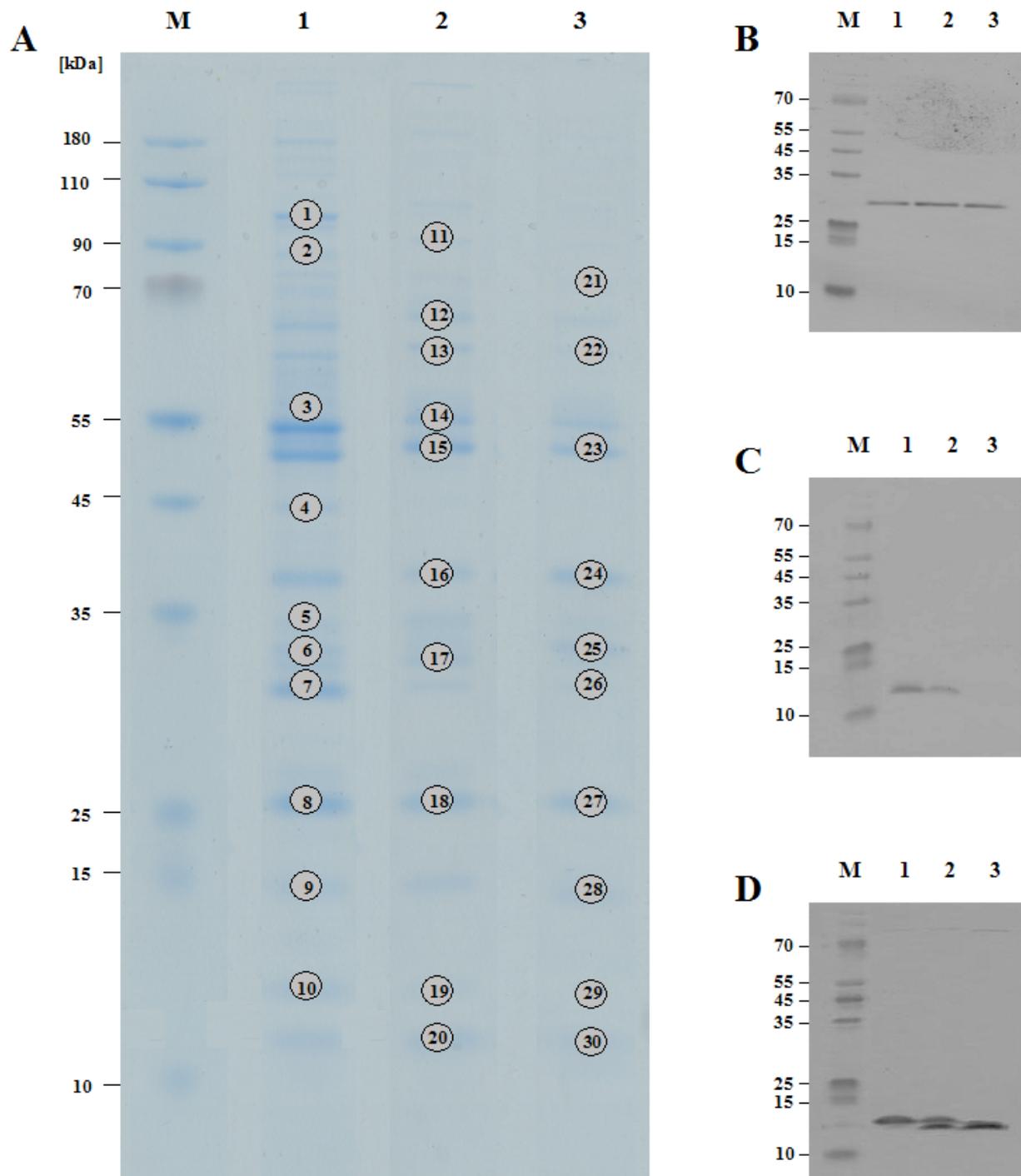
Um eine Interaktion zwischen AmtR und anderen Proteinen zu detektieren, wurden die folgenden *Pull-Down* Experimente mit dem Nickel-NTA-System durchgeführt. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm JM109 mit dem Plasmid pQE60amtR transformiert. Das *amtR*-Gen wurde *in-frame*, stromaufwärts von sechs Histidinresten, in den Vektor pQE60 kloniert, so dass das Protein AmtR-HIS synthetisiert wurde. Nachdem die Nickel-Sepharose mit dem Fusionsprotein gesättigt war, wurden die *Pull-Down* Experimente gestartet. Interaktionspartner von AmtR-HIS wurden isoliert, indem Zellextrakt aus *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen ATCC 13032 auf die Säule gegeben wurde. Eine Elution von AmtR-HIS und möglichen Interaktionspartnern erfolgte mit Imidazol, das eine höhere Affinität zu Nickel-Ionen besitzt als Histidin.

Für die folgenden Versuche wurden *E. coli* pQE60amtR-Zellextrakt und Zellextrakte von *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen präpariert. Die Nickel-NTA-Säule wurde mit *E. coli* pQE60amtR-Zellextrakt beladen, so dass die Nickel-Sepharose mit AmtR-HIS gesättigt war. Nach der Entfernung von unspezifischen Proteinen wurde der *C. glutamicum*-Zellextrakt aus

Zellen, die bei Stickstoffmangel (CgCoN) kultiviert worden waren, auf die Nickel-NTA-Säule aufgetragen. Nach einer Elution mit Imidazol konnten auf dem Coomassie gefärbten Gel mehrere Banden detektiert werden (Abb. 3.19A), die sowohl Interaktionspartner von AmtR-HIS aus dem *E. coli*-Zellextrakt als auch aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt sein könnten. Um sicher zu gehen, dass das Fusionsprotein AmtR-HIS exprimiert wurde, wurde ein Antikörperrnachweis von AmtR mit dem *E. coli*-Zellextrakt pQE60amtR vor dem Auftrag auf die Säule durchgeführt (Abb. 3.19B). Auf dem Western Blot konnte ein Signal detektiert werden, das die Expression von AmtR-HIS bestätigte.

Der Versuch wurde analog mit *C. glutamicum*-Zellextrakt von Zellen, die unter Stickstoffmangel gezogen wurden und dann für 5 Minuten (CgCoN+N<sub>5min</sub>) bzw. 10 Minuten (CgCoN+N<sub>10min</sub>) mit 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gepulst wurden, durchgeführt. Eine Überexpression von AmtR-HIS im *E. coli*-Zellextrakt konnte erneut mit einem Antikörperrnachweis bestätigt werden (Abb. 3.19B). Das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Elutionsfraktionen zeigte für beide untersuchten Stickstoffbedingungen zahlreiche Banden, die Interaktionspartner von AmtR-HIS repräsentieren könnten (Abb. 3.19A). Für eine Identifizierung über MALDI-TOF-MS wurden bevorzugt die Banden ausgeschnitten, die nicht unter allen drei Bedingungen zu finden und demnach für diese Bedingung charakteristisch waren. Die ausgeschnittenen Banden wurden tryptisch verdaut und zur Analyse über MALDI-TOF-MS ins ZMMK gegeben. Die Proben konnten bis auf wenige Ausnahmen identifiziert werden.

Abbildung 3.19A zeigt das Gel, aus dem die Banden ausgestanzt wurden. Jedem Spot wurde eine Nummer zugeordnet, dessen Identifizierung den Tabellen 3.3 bis 3.5 entnommen werden kann. Grau unterlegt sind Proteine, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt von pQE60amtR isoliert wurden und schwarz diejenigen aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt. In den Tabellen 3.3 bis 3.5 ist zu sehen, dass AmtR-HIS unter allen Bedingungen isoliert werden konnte, so dass eine Bindung des überexprimierten Proteins AmtR-HIS an Nickel-NTA-Sepharose bestätigt wurde. Außerdem konnte für *Pull-Down* Experimente mit *C. glutamicum*-Zellextrakt aus Zellen, die unter Stickstoffmangel (CgCoN) kultiviert wurden sowie aus Zellen, die nach einer Stickstoffmangelperiode für 5 Minuten mit 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gepulst wurden (CgCoN+N<sub>5min</sub>), das P<sub>II</sub>-Protein GlnK nachgewiesen werden. Eine Analyse der Peptide ergab, dass das co-eluierte, identifizierte GlnK-Protein unter beiden Bedingungen in der adenylierten Form vorlag. In *Pull-Down* Experimenten mit Zellextrakt aus *C. glutamicum*-Zellen, die für 10 Minuten (CgCoN+N<sub>10min</sub>) mit 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gepulst wurden, konnte das GlnK-Protein nicht detektiert werden. Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wurde ein Antikörperrnachweis von GlnK in den jeweiligen Elutionsfraktionen durchgeführt (Abb. 3.19C). Der Western Blot zeigte, dass GlnK tatsächlich nur in den Elutionsfraktionen von *Pull-Down* Experimenten mit CgCoN- und CgCoN+N<sub>5min</sub>-Zellextrakt mit AmtR-HIS co-eluiert wurde und kein Signal in der Elutionsfraktion mit CgCoN+N<sub>10min</sub>-Zellextrakt detektiert werden konnte.



**Abb. 3.19: Pull-Down Experimente mit AmtR-HIS.** **A)** Die Pull-Down Experimente wurden mit *C. glutamicum*-Zellextrakt CgCoN (1), CgCoN+N<sub>5min</sub> (2) und CgCoN+N<sub>10min</sub> (3) durchgeführt. Nach einer Elution mit 500 mM Imidazol im Säulenpuffer wurden die Proben auf einem denaturierenden 1-D-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Die Nummern zeigen die Banden, die aus dem Gel ausgeschnitten und über MALDI-TOF-MS identifiziert wurden. Die erhaltenen Proteine sind in den Tabellen 3.3 bis 3.5 dokumentiert. **B)** Zum Nachweis von überexprimiertem AmtR in den Auftragsfraktionen des *E. coli* pQE60amtR-Zellextraktes der Pull-Down Experimente (1-3) wurde ein Western Blot Experiment eines denaturierenden 1-D-Gels durchgeführt. **C)** Es wurde ein Western Blot zum Nachweis von GlnK in den Elutionsfraktionen der Pull-Down Experimente mit *C. glutamicum*-Zellextrakt CgCoN (1), CgCoN+N<sub>5min</sub> (2) und CgCoN+N<sub>10min</sub> (3) durchgeführt. **D)** Zum Nachweis von GlnK in den präparierten Zellextraktfraktionen von *C. glutamicum*-Zellextrakt CgCoN (1), CgCoN+N<sub>5min</sub> (2) und CgCoN+N<sub>10min</sub> (3) vor dem Auftrag auf die Säule wurde ein Western Blot Experiment durchgeführt (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

Wie Abbildung 3.19D zeigt, lag das GlnK-Protein im eingesetzten *C. glutamicum*-Zellextrakt CgCoN adenyliert vor, während im CgCoN+N<sub>5min</sub>-Zellextrakt die modifizierte sowie die demodifizierte Form von GlnK detektierbar waren. Im CgCoN+N<sub>10min</sub>-Zellextrakt konnte hingegen nur das deadenylierte Protein nachgewiesen werden. Es konnte somit eine Co-Elution von GlnK mit AmtR-HIS gezeigt werden, wenn das Protein adenyliert vorlag. Die deadenylierte Form war nicht in der Lage, an AmtR-HIS zu binden.

Die anderen Proteine, die mit AmtR-HIS co-eluiert und über MALDI-TOF-MS identifiziert wurden, waren sehr häufig vorkommende Proteine, wie der Elongationsfaktor Tu, ribosomale Proteine, das Chaperonin GroEL oder die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Neben diesen vermutlich falsch positiven Interaktionspartnern konnte kein anderes Protein identifiziert werden, das mit AmtR-HIS interagiert. Interessanterweise war jedoch unter allen untersuchten Bedingungen ein hypothetisches Protein detektierbar. Hierbei handelte es sich für *Pull-Down* Experimente mit CgCoN-Zellextrakt um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25,9 kDa und für *Pull-Down* Versuche mit CgCoN+N<sub>5min</sub>- und CgCoN+N<sub>10min</sub>-Zellextrakt um ein 8,7 kDa großes Protein. Diesen beiden Proteinen konnte bislang keine Funktion zugeschrieben werden. Eine Charakterisierung dieser potentiellen Interaktionspartner könnte einen weiteren Hinweis über den Ablauf der Signalkaskade geben. Für eine Analyse blieb in dieser Arbeit jedoch keine Zeit.

**Tab. 3.3: Identifizierte Spots aus *Pull-Down* Experimenten mit pQE60amtR *E. coli*- und CgCoN *C. glutamicum*-Zellextrakt.** In der Tabelle sind die Cg-Nummer für *C. glutamicum*, die theoretische Größe (kDa), der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die Gen- sowie Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine aufgelistet. Schwarz unterlegt sind die Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt co-eluiert wurden und grau solche, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt isoliert wurden.

Spot	Cg-Nr.	Gen	Protein ( <i>Pull-Down</i> CgCoN)	pI	kDa
1	-	<i>katA</i>	Kette D, Katalase	5,5	84,1
2	-	<i>ppk</i>	Polyphosphat Kinase	8,9	80,4
3	-	<i>gapA</i>	Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase	6,8	56,7
4	-	-	nicht identifiziert	-	-
5	0598	<i>rplB</i>	50S ribosomales Protein L2	11,3	31,1
6	0941	-	Hypothetisches Protein	6,1	25,9
7	0648	<i>adk</i>	Adenylat Kinase	4,6	23,6
8	0986	<i>amtR</i>	AmtR-Protein	5,5	24,4
9	0673	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L13	9,4	18,9
10	2260	<i>glnK</i>	GlnK-Protein	5,0	12,2

**Tab. 3.4: Identifizierte Spots aus Pull-Down Experimenten mit pQE60amtR *E. coli*- und CgCoN+N<sub>5min</sub> *C. glutamicum*-Zellextrakt.** In der Tabelle sind die Cg-Nummer für *C. glutamicum*, die theoretische Größe (kDa), der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die Gen- sowie Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine aufgelistet. Schwarz unterlegt sind die Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt co-eluiert wurden und grau solche, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt isoliert wurden.

Spot	Cg-Nr.	Gen	Protein ( <i>Pull-Down</i> CgCoN+N <sub>5min</sub> )	pI	kDa
11	2559	<i>aceB</i>	Kette A, Malatsynthase	5,0	82,4
12	-	<i>acs</i>	Acetyl-CoA Synthetase	5,4	72,1
13	-	<i>glpK</i>	Kette O, Glycerol-Kinase	5,3	56,1
14	0693	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	4,7	56,7
15	2221	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu	4,9	43,9
16	-	<i>gatY</i>	Tagatose-1,6-bisphosphat Aldolase	5,9	31,1
17	-	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	6,6	26,7
18	0986	<i>amtR</i>	AmtR-Protein	5,5	24,4
19	2260	<i>glnK</i>	GlnK-Protein	5,0	12,2
20	0239	-	Hypothetisches Protein	4,91	8,7

**Tab. 3.5: Identifizierte Spots aus Pull-Down Experimenten mit pQE60amtR *E. coli*- und CgCoN+N<sub>10min</sub> *C. glutamicum*-Zellextrakt.** In der Tabelle sind die Cg-Nummer für *C. glutamicum*, die theoretische Größe (kDa), der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die Gen- sowie Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine aufgelistet. Schwarz unterlegt sind die Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt co-eluiert wurden und grau solche, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt isoliert wurden.

Spot	Cg-Nr.	Gen	Protein ( <i>Pull-Down</i> CgCoN+N <sub>10min</sub> )	pI	kDa
21	-	-	nicht identifiziert	-	-
22	-	<i>glpK</i>	Kette O, Glycerol-Kinase	5,3	56,1
23	2221	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu	4,9	43,9
24	-	<i>gatY</i>	Tagatose-1,6-bisphosphat Aldolase	5,9	31,1
25	-	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	6,6	26,7
26	-	-	nicht identifiziert	-	-
27	0986	<i>amtR</i>	AmtR-Protein	5,5	24,4
28	0673	<i>rplM</i>	50S ribosomales von Protein L13	9,4	18,9
29	-	-	nicht identifiziert	-	-
30	0239	-	Hypothetisches Protein	4,91	8,7

### 3.3.1.2 Gelretardationsexperimente zum Nachweis des Repressor-DNA-Komplexes

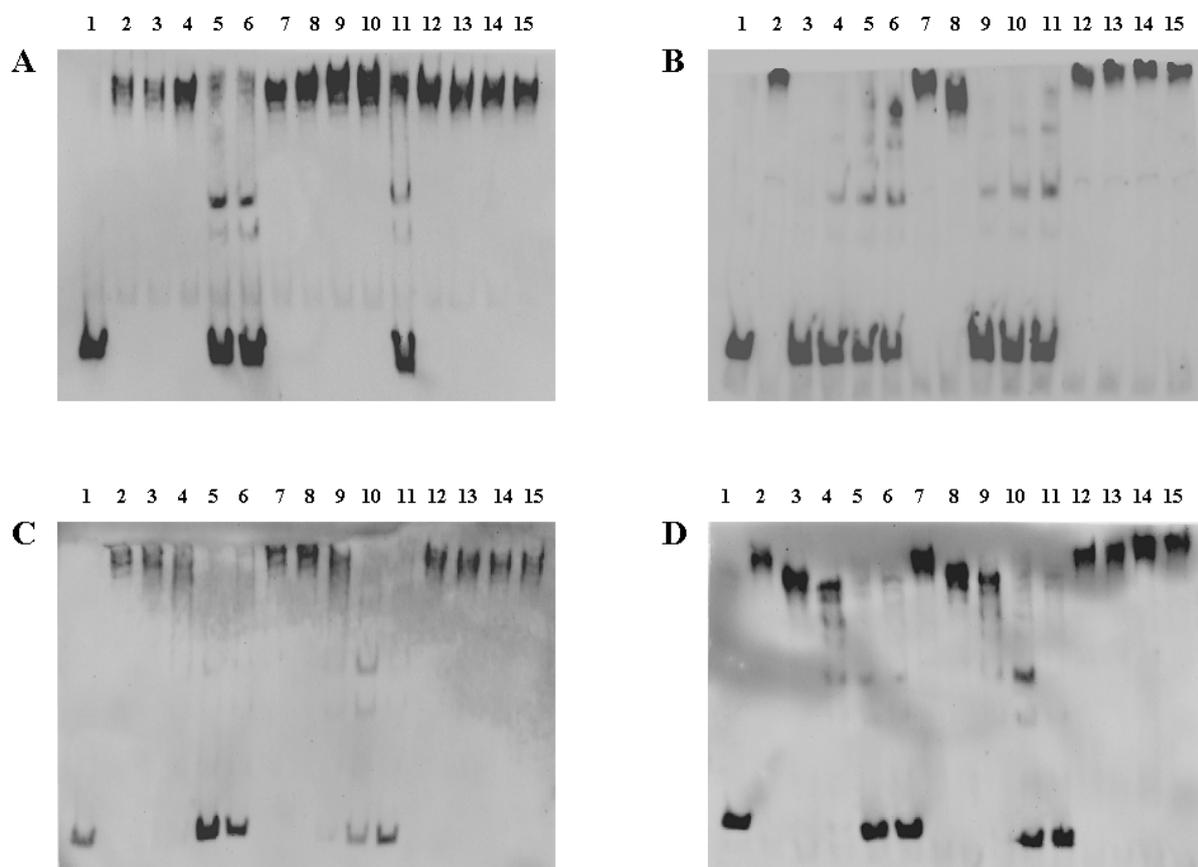
Das AmtR-Protein reprimiert bei guter Stickstoffversorgung die Expression stickstoff-regulierter Gene, indem es an dessen Promotorbereich bindet. Unter Stickstoffmangel interagiert AmtR mit GlnK-AMP, so dass eine weitere Repression verhindert wird. Um die mit *Pull-Down* Analysen gezeigte Interaktion zwischen AmtR und GlnK-AMP durch eine andere Methode zu bestätigen, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, DNA und insbesondere DNA-Protein-Komplexe in einem Polyacrylamid-Gel aufzutrennen. Hierfür wurde ein 150 bis 200 bp Fragment aus dem Promotorbereich des *amtB*- bzw. *gltB*-Gens am 3'-Ende mit Digoxigenin markiert und konnte so über einen Nachweis gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper detektiert werden. Die Fragmente wurden so ausgesucht, dass die Bindesequenz für den Repressor AmtR in diesen enthalten war. Durch Zugabe von gereinigtem AmtR-HIS zu dem Promotorbereich der stickstoffregulierten Gene *amtB* und *gltB* kommt es bei einer Bindung des Proteins an die DNA zu einem Shift, da die freie DNA in einem Polyacrylamid-Gel ein schnelleres Laufverhalten zeigt als ein DNA-Protein-Komplex. Als Kontrolle diente Digoxigenin-markierte DNA des Promotorbereiches von *amtB* oder *gltB* ohne Protein.

Eine Interaktion zwischen AmtR und GlnK-AMP konnte mit zwei verschiedenen Versuchsreihen bestätigt werden: In der ersten Versuchsreihe wurde der Protein-DNA-Komplex aus Digoxigenin-markierter DNA von *amtB* oder *gltB* und AmtR-HIS zusätzlich mit verschiedenen Zellextrakten von *C. glutamicum* inkubiert. Die Zellen wurden einerseits unter Stickstoffmangel (CgCoN) kultiviert, andererseits wurde ihnen nach einer Stickstoffmangelperiode ein Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  für 5 Minuten (CgCoN+N<sub>5min</sub>) und 10 Minuten (CgCoN+N<sub>10min</sub>) gegeben. In der zweiten Versuchsreihe wurden statt der Zellextraktfraktionen die Elutionsfraktionen aus den *Pull-Down* Experimenten mit AmtR-HIS eingesetzt.

Abbildung 3.20A zeigt ein Gelretardationsexperiment für den Promotorbereich von *gltB*. Nach der Zugabe von gereinigtem AmtR-HIS erfolgte ein Shift, da die DNA mit dem Protein einen Komplex bildete. Dieser blieb auch nach Zugabe von 2 und 10 µg CgCoN-Gesamtzellextrakt erhalten. Nach Zugabe von 25 µg Zellextrakt löste sich die Bindung zwischen der DNA und dem Protein wieder. Ein Protein oder ein mögliches Effektormolekül aus dem CgCoN-Zellextrakt sorgte somit für eine Spaltung des Komplexes zwischen AmtR und dem Promotorbereich stickstoffregulierter Gene. Dass es sich bei diesem Protein um GlnK-AMP handelte, das direkt mit AmtR interagiert, konnte aus den vorherigen *Pull-Down* Experimenten abgeleitet werden.

Für die anderen beiden Bedingungen (CgCoN+N<sub>5min</sub> und CgCoN+N<sub>10min</sub>) konnte keine Interaktion mit dem GlnK-Protein aus dem Zellextrakt gezeigt werden, AmtR blieb an den Promotorbereich von *gltB* gebunden. Interagiert GlnK in seiner adenylierten Form mit

AmtR-HIS würde man jedoch auch bei Zugabe von CgCoN+N<sub>5min</sub>-Zellextrakt einen Shift erwarten, da unter dieser Bedingung beide Formen GlnK und GlnK-AMP vorhanden waren. Der Versuch wurde mit einer höheren Konzentration an Zellextrakt wiederholt und wie Abbildung 3.20B zeigt, wurde bei einer Konzentration von 25, 50 und 75 µg CgCoN-Zellextrakt sowie bei einer Konzentration von 50 und 75 µg CgCoN+N<sub>5min</sub>-Zellextrakt der DNA-Protein-Komplex aus Digoxigenin-markierter DNA von *gltB* und dem Repressorprotein AmtR-HIS aufgelöst. Eine Zugabe von CgCoN+N<sub>10min</sub>-Zellextrakt hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des DNA-Protein-Komplexes; AmtR blieb an den Promotorbereich des stickstoffregulierten Gens *gltB* gebunden.



**Abb. 3.20: Gelretardationsexperimente zum Nachweis einer Interaktion zwischen GlnK-AMP und dem Repressor AmtR.** Mit einem Fragment aus dem *gltB*-Promotorbereich (**A-C**) und dem *amtB*-Promotorbereich (**D**), in denen die Bindestelle für AmtR enthalten war, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Als Kontrolle diente Digoxigenin-markierte DNA von *gltB* (0,4 ng/µl) und *amtB* (0,4 ng/µl) ohne gereinigtes AmtR-HIS (1, 6, 11) und mit 50 ng gereinigtem AmtR-HIS (2, 7, 12). Für den Nachweis von Interaktionspartnern aus dem Zellextrakt von *C. glutamicum* oder der Elutionsfraktion der *Pull-Down* Experimente wurden von gereinigtem AmtR-HIS 50 ng, den Zellextraktfraktionen 2, 10, 25 µg (**A**) und 25, 50, 75 µg (**B**) aufgetragen. Von den Elutionsfraktionen wurden 1, 2, 5 µg (**C/D**) aufgetragen. Als Stickstoffbedingungen wurden CgCoN (3-5), CgCoN+N<sub>5min</sub> (8-10) und CgCoN+N<sub>10min</sub> (13-15) gewählt. Die Proben wurden auf einem 6 % Tris-Borat-EDTA Gel aufgetrennt, das Gel wurde auf eine positiv geladene Nylon-Membran geblottet und die DNA bzw. DNA-Protein-Komplexe wurden über eine Antikörperdetektion nachgewiesen.

Um auszuschließen, dass ein anderes Protein aus dem Zellextrakt von *C. glutamicum* mit AmtR interagiert, wurde das gleiche Experiment mit den Elutionsfraktionen aus den *Pull-Down* Analysen durchgeführt. Nach Zugabe der *Pull-Down* Elutionsfraktionen mit CgCoN- und CgCoN+N<sub>5min</sub>-Zellextrakt wurde der DNA-Protein-Komplex gelöst, während er nach Zugabe der CgCoN+N<sub>10min</sub>-Elutionsfraktion erhalten blieb (Abb. 3.20C/D). In den Elutionsfraktionen befanden sich nur Proteine, die mit AmtR-HIS co-eluiert wurden, unter CgCoN und CgCoN+N<sub>5min</sub> war dies GlnK-AMP. Unter CgCoN+N<sub>10min</sub>-Zellextrakt wurde kein GlnK bzw. GlnK-AMP mit AmtR-HIS co-eluiert und in den Gelretardationstests blieb der DNA-Protein-Komplex stabil.

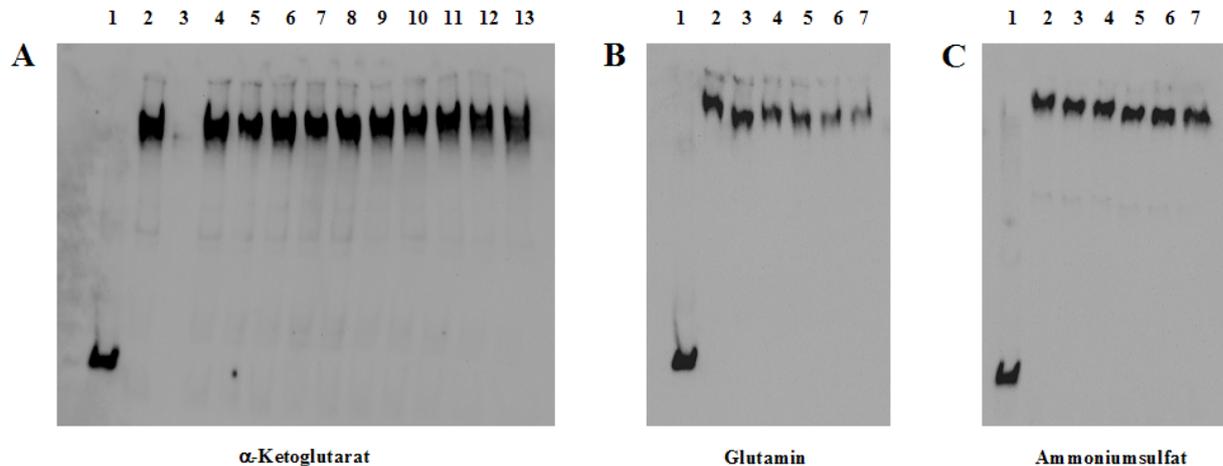
Mit diesen Experimenten konnte nochmals bestätigt werden, dass AmtR nur mit GlnK-AMP interagiert und nicht mit dem unmodifizierten GlnK-Protein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen AmtR und GlnK-AMP zu einer Auflösung des DNA-Repressor-Komplexes führt.

Ob die Bindung zwischen AmtR und dem Promotorbereich stickstoffregulierter Gene nur gelöst wird, wenn GlnK adenylyliert vorliegt, oder ob z.B. eine hohe Metabolitenkonzentration für eine Lösung des Repressors von der DNA sorgen könnte, wurde mit weiteren Gelretardationsexperimenten untersucht. Als mögliche Metabolite wurden  $\alpha$ -Ketoglutarat, Oxalacetat, L-Glutamat, L-Glutamin, Ammoniumsulfat und ATP in einer Konzentration von 10 bis 100 mM untersucht. Digoxigenin-markierte DNA des Promotorbereiches des *gltB*-Gens wurde exemplarisch für ein stickstoffreguliertes Gen eingesetzt.

Abbildung 3.21A zeigt, dass die Zugabe von AmtR-HIS zur markierten DNA wie in den vorherigen Versuchen zu einem Shift führte. Bei Zugabe von  $\alpha$ -Ketoglutarat blieb der DNA-Protein-Komplex stabil und die Bindung zwischen DNA und Protein konnte nicht durch eine Konzentration von bis zu 100 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat gelöst werden. Das gleiche konnte ebenfalls für Oxalacetat (Daten nicht gezeigt), L-Glutamat (Daten nicht gezeigt), L-Glutamin (Abb. 3.21B), Ammoniumsulfat (Abb. 3.21C), ATP (Daten nicht gezeigt) und einer Kombination aus ATP und  $\alpha$ -Ketoglutarat (Daten nicht gezeigt) gezeigt werden.

In *E. coli* bindet das P<sub>II</sub>-Protein an jeder Untereinheit ein  $\alpha$ -Ketoglutarat und ein ATP. Eine Bindung dieser beiden Moleküle führt auch ohne dass das P<sub>II</sub>-Protein modifiziert wird zu einer Anschaltung des 2-Komponentensystems NtrB/NtrC (Ninfa & Atkinson, 2000). Ein Einfluss der beiden Effektormoleküle  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP auf das GlnK-Protein in *C. glutamicum*, konnte bislang nicht bestätigt werden. Ob eine mögliche Bindung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP an GlnK zu einer Interaktion zwischen AmtR und GlnK führt, wurde untersucht, indem zusätzlich zu dem Ansatz aus DNA, Protein und möglichem Metabolit der Zellextrakt einer CgCoN+N<sub>10min</sub>-Bedingung gegeben wurde. Aber auch durch die Anwesenheit des unmodifizierten GlnK-Proteins konnte die Bindung zwischen dem

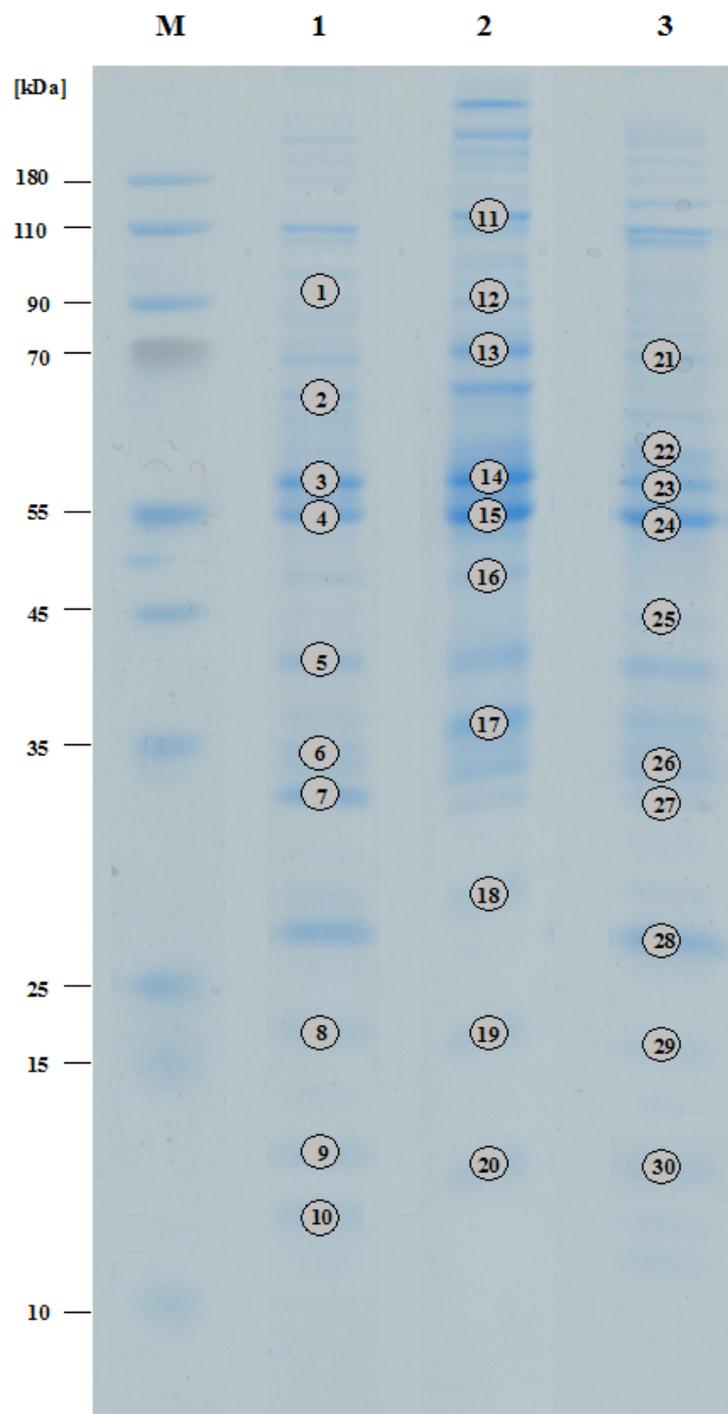
Promotorbereich AmtR-regulierter Gene wie *gltB* und dem Repressor AmtR nicht gelöst werden (Daten nicht gezeigt). Einzig das modifizierte Protein GlnK-AMP konnte diese Aufgabe übernehmen.



**Abb. 3.21: Gelretardationsexperimente zum Einfluss verschiedener Metabolite auf die Bindung zwischen dem Promotorbereich AmtR-regulierter Gene und dem Repressor AmtR.** **A)** Es wurden Gelretardationsversuche mit einem Fragment aus dem *gltB*-Promotorbereich durchgeführt, in dem die Bindestelle für AmtR enthalten war. Als Kontrolle diente Digoxigenin-markierte DNA von *gltB* (0,4 ng/μl) ohne gereinigtes (1) und mit 50 ng gereinigtem AmtR-HIS (2). Dem DNA-Protein-Komplex wurde α-Ketoglutarat in einer Konzentration von 10 bis 100 mM (4-13) zugegeben. Die Proben wurden auf einem 6 % Tris-Borat-EDTA Gel aufgetrennt, das Gel wurde auf eine positiv geladene Nylon-Membran geblottet und die DNA bzw. DNA-Protein-Komplexe wurden über eine Antikörperdetektion nachgewiesen. **B/C)** Gelretardationsexperimente wurden mit einem Fragment aus dem *gltB*-Promotorbereich (0,4 ng/μl) durchgeführt, das ohne gereinigtes (1) und mit 50 ng gereinigtem AmtR-HIS (2) inkubiert wurde. Dem DNA-Protein-Komplex wurde Glutamin (**B**) bzw. Ammoniumsulfat (**C**) in einer Konzentration von 10 bis 100 mM zugegeben (3-7, zur Erklärung siehe A).

### 3.3.2 Identifizierung von Interaktionspartnern des GlnD-Proteins

In *Pull-Down* Experimenten mit AmtR-HIS wurde zumindest ein potentieller Interaktionspartner von AmtR isoliert, so dass diese Methode ebenfalls angewandt wurde, um Interaktionspartner eines anderen zentralen Proteins der Stickstoffkontrolle zu identifizieren. Da eine Expressionsregulation in der *glnD*-Deletionsmutante LN-D ausbleibt, könnte das GlnD-Protein entweder selbst der Sensor der Stickstoffkontrolle sein, der das Signal wahrnimmt und weiterleitet, oder ein bisher unbekannter Sensor signalisiert GlnD den Stickstoffstatus der Zelle. Die Identifizierung von Interaktionspartnern des GlnD-Proteins könnten zum Verständnis der Signalaufnahme und Signalweiterleitung beitragen. Die *Pull-Down* Experimente wurden analog den Versuchen mit AmtR-HIS durchgeführt. Der *E. coli*-Stamm JM109 wurde mit dem Plasmid pQE60glnD transformiert. Die Zellen wurden kultiviert und der *E. coli*- und der *C. glutamicum*-Zellextrakt präpariert.



**Abb. 3.22: Pull-Down Experimente mit GlnD-HIS.** Die *Pull-Down* Experimente wurden mit *C. glutamicum*-Zellextrakt CgCoN (1), CgCoN+N<sub>5min</sub> (2) und CgCoN+N<sub>10min</sub> (3) durchgeführt. Nach einer Elution mit 500 mM Imidazol im Säulenpuffer wurden die Proben auf einem denaturierenden 1-D-Gel aufgetrennt und mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Die Nummern zeigen die Banden, die aus dem Gel ausgeschnitten und über MALDI-TOF-MS identifiziert wurden. Die identifizierten Proteine sind in den Tabellen 3.6 bis 3.8 dokumentiert (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

**Tab. 3.6: Identifizierte Spots aus Pull-Down Experimenten mit pQE60glnD *E. coli*- und CgCoN *C. glutamicum*-Zellextrakt.** In der Tabelle sind die Cg-Nummer für *C. glutamicum*, die theoretische Größe (kDa), der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die Gen- sowie Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine aufgelistet. Schwarz unterlegt sind die Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt co-eluiert wurden und grau solche, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt isoliert wurden.

Spot	Cg-Nr.	Gen	Protein (Pull-Down CgCoN)	pI	kDa
1	-	-	nicht identifiziert	-	-
2	-	<i>sdh</i>	Succinat-Dehydrogenase	5,8	64,4
3	2221	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu	4,9	43,9
4	2258	<i>glnD</i>	GlnD-Protein	6,6	76,0
5	1791	<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	5,1	36,0
6	0601	<i>rpsC</i>	50S ribosomales Protein S3	10,5	28,1
7	-	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	6,6	26,7
8	0673	<i>rplM</i>	50S ribosomales von Protein L13	9,4	18,9
9	2260	<i>glnK</i>	GlnK-Protein	5,0	12,2
10	0096	-	Hypothetisches Protein	8,5	8,8

**Tab. 3.7: Identifizierte Spots aus Pull-Down Experimenten mit pQE60glnD *E. coli*- und CgCoN+N<sub>5min</sub> *C. glutamicum*-Zellextrakt.** In der Tabelle sind die Cg-Nummer für *C. glutamicum*, die theoretische Größe (kDa), der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die Gen- sowie Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine aufgelistet. Schwarz unterlegt sind die Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt co-eluiert wurden und grau solche, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt isoliert wurden.

Spot	Cg-Nr.	Gen	Protein (Pull-Down CgCoN+N <sub>5min</sub> )	pI	kDa
11	2289	<i>glgP2</i>	Glucan-Phosphorylase	4,9	90,5
12	-	-	Putative-Oxidoreduktase	5,2	87,2
13	-	<i>acs</i>	Acetyl-CoA Synthetase	5,4	72,1
14	2221	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu	4,9	43,9
15	2258	<i>glnD</i>	GlnD-Protein	6,6	76,0
16	-	-	nicht identifiziert	-	-
17	-	<i>gatY</i>	Tagatose-1,6-bisphosphat Aldolase	5,9	31,1
18	1791	<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	5,1	36,0
19	0673	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L13	9,4	18,9
20	2260	<i>glnK</i>	GlnK-Protein	5,0	12,2

**Tab. 3.8: Identifizierte Spots aus Pull-Down Experimenten mit pQE60glnD *E. coli*- und CgCoN+N<sub>10min</sub> *C. glutamicum*-Zellextrakt.** In der Tabelle sind die Cg-Nummer für *C. glutamicum*, die theoretische Größe (kDa), der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die Gen- sowie Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine aufgelistet. Schwarz unterlegt sind die Proteine, die aus dem *C. glutamicum*-Zellextrakt co-eluiert wurden und grau solche, die aus dem *E. coli*-Zellextrakt isoliert wurden.

Spot	Cg-Nr.	Gen	Protein ( <i>Pull Down CgCoN+N<sub>10min</sub></i> )	pI	kDa
21	-	-	nicht identifiziert	-	-
22	0693	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	4,7	56,7
23	1791	<i>gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	5,1	36,0
24	2258	<i>glnD</i>	GlnD-Protein	6,6	76,0
25	-	-	nicht identifiziert	-	-
26	0601	<i>rpsC</i>	50S ribosomales Protein S3	10,5	28,1
27	-	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	6,6	26,7
28	0280	-	Hypothetisches Protein	3,72	18,2
29	0673	<i>rplM</i>	50S ribosomales von Protein L13	9,4	18,9
30	2260	<i>glnK</i>	GlnK-Protein	5,0	12,2

Für die *Pull-Down* Analysen wurde die Nickel-Sepharose mit GlnD-HIS gesättigt und mit verschiedenen Zellextrakten von *C. glutamicum* inkubiert. Als Stickstoffbedingungen wurden Stickstoffmangel (CgCoN) und Stickstoffpulse für 5 Minuten (CgCoN+N<sub>5min</sub>) und 10 Minuten (CgCoN+N<sub>10min</sub>) untersucht. GlnD-HIS wurde zusammen mit möglichen Interaktionspartnern nach Zugabe von Imidazol von der Säule eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem SDS-Gel (Abb. 3.22) aufgetrennt und das Gel wurde mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt. Die ausgestanzten Banden wurden tryptisch verdaut und über MALDI-TOF-MS identifiziert. Die Tabellen 3.6 bis 3.8 fassen die Ergebnisse aus den *Pull-Down* Experimenten mit GlnD-HIS zusammen. Jedem Spot wurde eine Nummer zugeordnet, dessen Identifizierung den Tabellen entnommen werden kann. Die Tabellen 3.6 bis 3.8 zeigen, dass das GlnD-HIS-Fusionsprotein in allen Elutionsfraktionen detektiert werden konnte. Eine Bindung von überexprimiertem GlnD-HIS an die Nickel-Sepharose-Säule war somit erfolgreich gewesen. Außerdem konnte das Signaltransduktionsprotein GlnK in den durchgeführten *Pull-Down* Experimenten als Interaktionspartner von GlnD identifiziert werden. Eine Analyse der Peptide zeigte, dass das Protein in der modifizierten und demodifizierten Form isoliert werden konnte. Ein Antikörpernachweis von GlnK bestätigte diese Interaktion, da das GlnK-Protein in allen Elutionsfraktionen detektierbar war (Daten nicht gezeigt). Neben diesen beiden

Proteinen konnten vermutlich sonst nur falsch positive Proteine eluiert werden, die sehr häufig in der Zelle vorkommen und keine spezifischen Interaktionspartner von GlnD-HIS darstellen. Hierzu zählten z.B. das Chaperonin GroEL, der Elongationsfaktor TU, die ribosomalen Proteine und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Außerdem wurden ein 8,8 kDa großes hypothetisches Protein unter CgCoN-Bedingungen und ein hypothetisches Protein mit einer Größe von 18,2 kDa unter CgCoN+N<sub>10min</sub> nachgewiesen. Den hypothetischen Proteinen konnte bislang keine Funktion zugewiesen werden, so dass eine spezifische Interaktion mit GlnD nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Charakterisierung dieser Proteine wurde innerhalb dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

### 3.3.3 *Two-Hybrid* Interaktionsstudien

In *Pull-Down* Analysen konnte eine Interaktion zwischen AmtR und GlnK und zwischen GlnD und GlnK gezeigt werden. Zur Untersuchung weiterer Interaktionen zwischen unterschiedlichen Komponenten der Stickstoffkontrolle wurde das BacterioMatch II *Two-Hybrid* System gewählt, da es im Gegensatz zu *Pull-Down* Experimenten die Möglichkeit bietet gezielt Interaktionen zu untersuchen. Dieses *E. coli*-System ist in der Lage, durch die Aktivierung der Transkription bestimmter Gene Protein-Protein Interaktionen zu detektieren. Hierfür wurde ein Gen, das für eines der beiden möglichen Interaktionspartner (Köder oder bait) kodiert, stromabwärts des Gens, das für das Bacteriophage  $\lambda$  Repressor Protein ( $\lambda$ cl, 237 Aminosäuren) kodiert, in den Vektor pBT kloniert, so dass es *in-frame* mit diesem zusammen abgelesen wurde. Das Repressorprotein besteht aus einer aminoterminalen DNA-Bindedomäne und einer carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne. Das Gen, das für den möglichen anderen Interaktionspartner kodiert (Ziel oder target), wurde stromaufwärts des Gens, das für die  $\alpha$ -Untereinheit einer RNA-Polymerase (248 Aminosäuren) kodiert, *in-frame* in den Vektor pTRG kloniert, so dass auch diese beiden Gene gemeinsam abgelesen wurden und ein Fusionsprotein entstand. Interagierten die beiden potentiellen Interaktionspartner (bait und target), wurde die Bindung der RNA-Polymerase über den  $\lambda$ cl-Repressor auf dem Promotorbereich der DNA stabilisiert und die Transkription des *HIS3* Reportergens aktiviert. Zusätzlich wurde noch ein zweites Gen, *aadA*, transkribiert, so dass eine einfache Selektion bei einer Interaktion der ausgewählten Proteine möglich war.

Für die folgenden *Two-Hybrid* Analysen wurden die Gene für die Glutaminsynthetase (GS), die Glutamatdehydrogenase (GDH), die große und die kleine Untereinheit der Glutamatsynthase (GOGAT), das GlnK- und GlnD-Protein, die ATase und den Repressor AmtR in die Vektoren pBT und pTRG kloniert. Die möglichen Interaktionspaare wurden in einem Reporterstamm co-exprimiert und selektiert. Zur Kontrolle wurden die rekombinanten Plasmide mit dem entsprechend anderen Leerplasmid co-exprimiert. Hier sollten keine

Kolonien sichtbar sein. Eine Auswertung der Anzahl der Kolonien ergab die folgenden Interaktionen: Für AmtR-AmtR, GS-GS und GlnD-GlnD konnte mindestens eine dimere Struktur gezeigt werden. Dies war aufgrund von Strukturvorhersagen für die Glutaminsynthetase (GS) und das AmtR-Protein nicht unerwartet, während eine multimerere Struktur des GlnD-Proteins noch nicht gezeigt werden konnte. Außerdem kam es zu einer Interaktion von GltB und GltD, so dass sich die GOGAT, wie aus früheren Untersuchungen bekannt war, aus den beiden Untereinheiten GltB und GltD zusammensetzt. Desweiteren konnte keine Interaktion zwischen GlnK und AmtR detektiert werden. Dies könnte daran liegen, dass das GlnK-Protein nicht modifiziert vorlag. GlnK ist aber in der Lage, mit GlnD zu interagieren und es konnte eine Interaktion zwischen der GS und der ATase gezeigt werden. Eine Interaktion zwischen GlnK und der ATase oder der GS und GlnD konnte nicht nachgewiesen werden, so dass die Enzyme GlnD und die ATase, obwohl sie die gleiche Reaktion ausführen, nicht mit dem jeweilig anderen Substrat interagieren können. Überhaupt keine Interaktion konnte für die Glutamatdehydrogenase gezeigt werden.

### **3.4 Ortsgerichtete Mutagenese des glnK-Gens**

Aus den bisherigen Ergebnissen wird deutlich, dass das GlnK-Protein durch die Bindung verschiedener Interaktionspartner die Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* reguliert. So wird das trimere GlnK bei Stickstoffmangel von GlnD modifiziert und nach einem Stickstoffpuls wieder demodifiziert. In der modifizierten Form ist das Protein in der Lage, mit dem Repressorprotein AmtR in Wechselwirkung zu treten, während es in der demodifizierten Form mit dem AmtB-Transporter interagiert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte eine umfassende Analyse der trimeren GlnK-Struktur mit Hilfe einer ortsgerechten Mutagenese durchgeführt werden. Um zu analysieren, welche Aminosäuren für eine Interaktion von GlnK mit anderen Proteinen oder eine Trimerisierung wichtig sind, wurden Antikörpernachweise und RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Dieses Analyseverfahren bietet die Möglichkeit, eine Trimerisierung durch eine Auftrennung auf nativen Gelen, eine Interaktion zwischen GlnK und AmtB durch eine Präparation der Membranfraktion, eine Interaktion zwischen GlnK und GlnD sowie ein Abbau des Proteins durch eine Untersuchung des Modifikationsmusters im Cytoplasma und eine Bindung von GlnK und AmtR durch eine Expressionsanalyse stickstoffregulierter Gene zu zeigen. In *E. coli* ist das P<sub>II</sub>-Protein GlnK in der Lage,  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP zu binden. Die Bindung dieser beiden Effektormoleküle ist kooperativ und erfolgt an allen drei Untereinheiten (Kamberov *et al.*, 1995). Durch die Bindung beider Effektormoleküle wird eine Interaktion von GlnK und GlnD erleichtert, die für eine Modifikation des Proteins sorgt (Jiang *et al.*, 1998a).

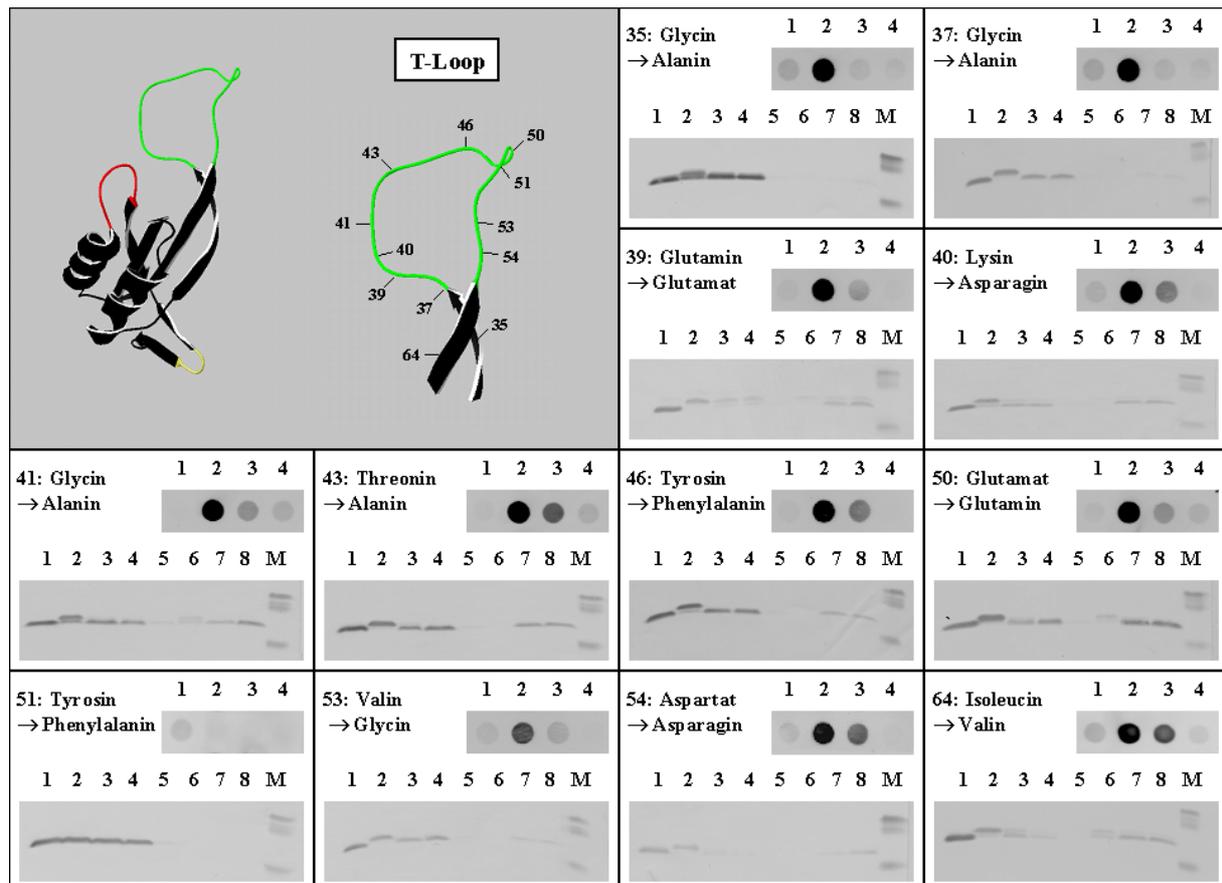
P<sub>II</sub>-Proteine sind trimere Proteine, deren Untereinheiten aus verschiedenen Loops aufgebaut sind. So ist der B-Loop für eine Bindung des Effektormoleküls ATP wichtig, während der C-Loop zu einer Stabilisierung aller gebundenen Moleküle führt. An einer Bindung von ATP sind z.B. direkt die im C-Loop lokalisierten Argininreste 101 und 103 beteiligt, indem sie über Wasserstoffbrückenbindungen die negativen Ladungen der Phosphatreste des ATPs stabilisieren (Xu *et al.*, 2001). Der B-Loop bildet eine Bindetasche für ATP aus Glycinresten. Die Bedeutung einer ATP-Bindung ist bislang nicht geklärt. Vermutet wird, dass die Ladungsverteilung des B-Loops sowie C-Loops durch eine Interaktion mit ATP so verändert wird, dass das Protein unterschiedliche Interaktionspartner binden kann (Xu *et al.*, 2001). Als Bindestelle des zweiten Effektormoleküls  $\alpha$ -Ketoglutarat wird der Glutaminrest an Position 39 im T-Loop diskutiert (Jiang *et al.*, 1997). Der T-Loop enthält außerdem die Stelle, an der das Protein kovalent modifiziert wird. Er besitzt eine hohe Beweglichkeit und ist in der Lage, unterschiedliche Sekundärstrukturen anzunehmen, wodurch er die Möglichkeit hat, verschiedene Interaktionspartner zu binden (Xu *et al.*, 1998).

Ausgehend von der GlnK-Struktur in *E. coli* wurden verschiedene Aminosäuren in *C. glutamicum*-GlnK durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht. Hierfür wurden Positionen ausgewählt, die in *E. coli* die Bindung von Interaktionspartnern beeinflussen. Der T-Loop gliedert sich in die Aminosäuren 36 bis 55, der B-Loop besteht aus den Aminosäuren 81 bis 88 und der C-Loop ist am kürzesten und setzt sich aus den Aminosäuren 101 bis 105 zusammen. Die Struktur des B-Loops und des C-Loops ist am stärksten konserviert, indessen die Struktur des T-Loops sich in den meisten Bakterien stark unterscheidet (Arcondéguy *et al.*, 2001). So ist der T-Loop in *E. coli* wahrscheinlich für eine Interaktion mit NRII, der UTase, der ATase und AmtB verantwortlich (van Heeswijk *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1998a-c; Pioszak *et al.*, 2000; Coutts *et al.*, 2002), während der T-Loop in *Synechococcus elongatus* für eine Interaktion mit der N-Acetyl-L-Glutamatkinase essenziell ist (Heinrich *et al.*, 2004).

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit Hilfe des pEKEX2-Vektors durchgeführt und das Plasmid-kodierte *glnK*-Gen mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch in den *glnK*-Deletionsstamm NR-1 kloniert. Abbildung 3.23 und 3.24 fassen die Ergebnisse aus den Western Blot Analysen und RNA-Hybridisierungen zusammen.

Ein Austausch verschiedener Aminosäuren des T-Loops führte zu einer Stabilisierung des Proteins und somit zu einer fehlenden Proteolyse. Beobachtet werden konnte dies für einen Austausch von Glycin gegen Alanin an den Positionen 35, 37 und 41, von Threonin gegen Alanin an Position 43 sowie von Tyrosin gegen Phenylalanin an den Positionen 46 und 51 und von Valin gegen Glycin an Position 53. Eine Stabilisierung des Proteins hatte meistens auch eine fehlende oder reduzierte Bindung von GlnK an AmtB zur Folge. Nach einem Austausch an den Positionen 35 und 37 (Glycin gegen Alanin), an Position 51 (Tyrosin

gegen Phenylalanin) und an Position 53 (Valin gegen Glycin) konnte keine Membranbindung für GlnK gezeigt werden, während sie nach einem Austausch an Position 46 (Tyrosin gegen Phenylalanin) sehr schwach war. Eine fehlende Bindung von GlnK und AmtB war nur für einen Aminosäureaustausch an Tyrosin 51 eindeutig erklärbar. Dieser Austausch hatte zur Folge, dass das Protein nicht mehr modifiziert werden konnte, so dass eine Derepression stickstoffregulierter Gene wie *amtB* nicht mehr möglich war.



**Abb. 3.23: Ortsgerichtete Mutagenese des *glnK*-Gens von Aminosäuren des T-Loops.** Die Zahl steht für die ausgetauschte Position. Die erste Aminosäure stellt diejenige dar, die ausgetauscht wurde, und die zweite Aminosäure die, welche mit der ausgetauschten ersetzt wurde. Zum Nachweis von GlnK in dem *glnK*-Deletionsstamm NR-1, der Plasmid-kodiert *glnK*-Gene mit verschiedenen Mutationen exprimierte, wurden Western Blot Experimente von denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Cytoplasma- (1-4) und die Membranfraktion (5-8) wurden präpariert aus Zellen, die bei guter Stickstoffversorgung (1/5), bei Stickstoffmangel (2/6) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 15 min (3-4/7-8) kultiviert wurden (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna: 25, 15 und 10 kDa). Zum Nachweis der Transkription AmtR-regulierter Gene wurden RNA-Hybridisierungen mit einer *glnK*-Sonde durchgeführt (zur Erklärung siehe oben). Die dreidimensionale Struktur des GlnK-Proteins wurde mit den Programmen SWISS-prot TrEMBL und SWISS-model database anhand der Aminosäuresequenz entworfen und bearbeitet und konnte über den SWISS-Pdb viewer 3.7 dargestellt werden.

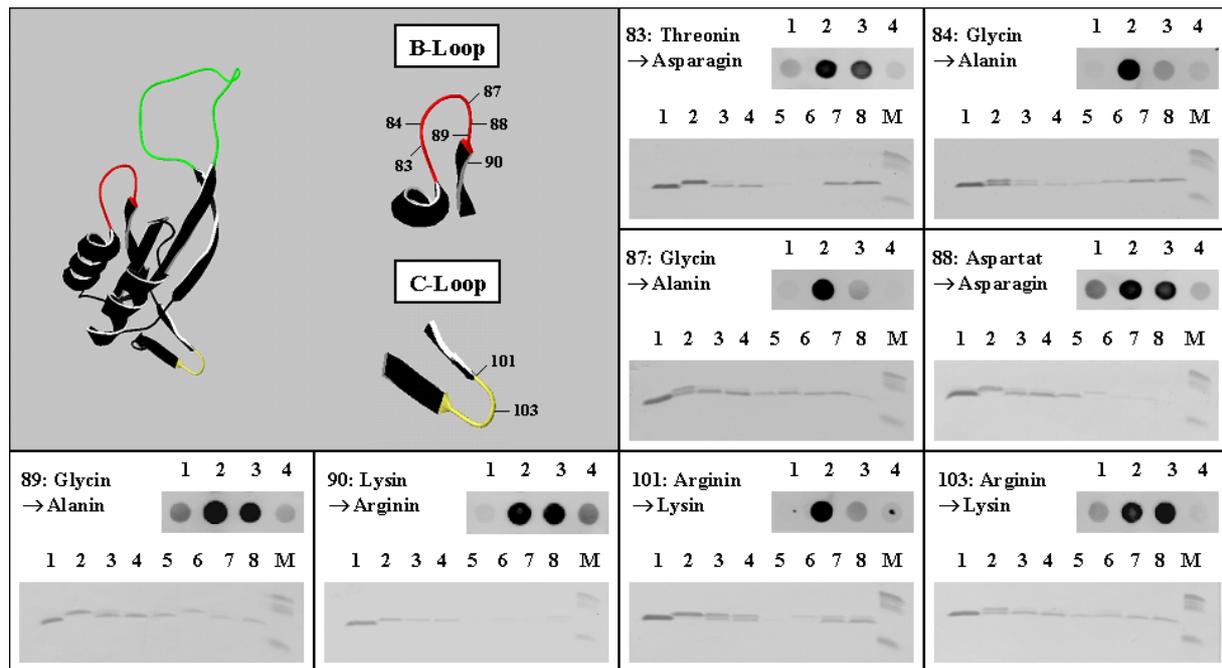
Eine Analyse des stickstoffabhängigen Modifikationsmusters von GlnK ergab, dass das Protein unter Stickstoffmangel immer - wenn auch für die Positionen 29 (Threonin gegen

Methionin, Daten nicht gezeigt), 35 und 41 (Glycin gegen Alanin) nicht die gesamte GlnK-Menge – adenyliert wurde. Die Anwesenheit von unmodifiziertem GlnK hatte keinen Einfluss auf die Derepression AmtR-kontrollierter Gene. Allerdings konnte aufgrund der Expression des *amtB*-Gens unter Stickstoffmangel eine Interaktion zwischen demodifiziertem GlnK und AmtB beobachtet werden. Dies traf z.B. für einen Austausch von Threonin gegen Methionin an Position 29 und von Glycin gegen Alanin an Position 41 zu. Eine fehlende Deadenylierung nach einem Stickstoffpuls war hingegen nach einem Austausch von Glutamin gegen Glutamat an Position 39 zu beobachten. Eine aufgrunddessen erwartete Expression stickstoffregulierter Gene konnte aber nicht gezeigt werden. Ein Austausch an den Positionen 7, 40, 50 und 64 hatte keinen Einfluss.

In weiteren Western Blot Analysen wurden zur Proteinauftrennung statt denaturierenden Gelen native Gele genutzt. Eine mit dieser Methode nachweisbare Trimerisierung konnte für alle Aminosäureaustausche gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die einzige Mutation ohne die Expression eines GlnK-Proteins war der Austausch an Position 49 (Alanin gegen Prolin). Hier konnten weder in Western Blot Analysen noch in RNA-Hybridisierungen Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). RNA-Hybridisierungen zeigten außerdem, dass ein Austausch von Aminosäuren des T-Loops bis auf den Austausch an Tyrosin 51 keinen Einfluss auf die stickstoffabhängige Expressionsregulation in *C. glutamicum* hatte. Das Expressionsmuster entsprach dem des Wildtyps (vgl. Punkt 3.1.4).

Neben Aminosäuren des T-Loops wurden Aminosäuren im B-Loop bzw. im C-Loop ausgetauscht. Ein Antikörpernachweis von GlnK zeigte für einen Austausch an Position 83 (Threonin gegen Asparagin) keinen Effekt. Eine Veränderung an Position 84 und 87 (Glycin gegen Alanin) führte dazu, dass nicht die gesamte GlnK-Menge unter Stickstoffmangel modifiziert wurde und das deadenylierte GlnK mit AmtB bereits unter dieser Bedingung interagieren konnte. Eine Interaktion von GlnK und AmtB konnte nach einem Austausch an Position 88 (Aspartat gegen Asparagin) und 89 (Glycin gegen Alanin) aufgrund einer Expression des *amtB*-Gens bereits bei guter Stickstoffversorgung nachgewiesen werden. Eine niedrige Expression AmtR-regulierter Gene bei guter Stickstoffversorgung konnte mit RNA-Hybridisierungen bestätigt werden. Zusätzlich zu dieser Beobachtung zeigte GlnK nach einem Stickstoffpuls ein Modifikationsmuster wie der Komplementationsstamm (Daten nicht gezeigt), eine reduzierte Membranbindung sowie eine höhere Stabilität. Ein Austausch von Lysin gegen Arginin an Position 90 zeigte eine fehlende Deadenylierung sowie Membranbindung von GlnK. Dies führte jedoch zu keiner ständigen Expression AmtR-regulierter Gene. Die adenylierte Form, obwohl sie vorhanden war, interagierte scheinbar nicht mit AmtR. Ein Aminosäureaustausch an Position 102 (Valin gegen Isoleucin, Daten nicht gezeigt) zeigte ein Proteinmuster wie der Komplementationsstamm, während ein Aminosäureaustausch an Position 101 zur Folge hatte, dass GlnK langsamer demodifiziert

wurde. Nach einem Austausch von Arginin an Position 103 gegen Lysin lag GlnK unter allen Bedingungen unter anderem deadenyliert vor und zeigte eine Interaktion mit AmtB, so dass es unter guter Stickstoffversorgung bereits zu einer Expression des *amtB*-Gens kommen musste. Dies bestätigten RNA-Hybridisierungen. Ein Austausch an den Positionen 101 und 103 führte demnach zu einer langsameren Demodifizierung nach einem Stickstoffpuls bzw. einer nicht vollständigen Adenylierung des GlnK-Pools bei Stickstoffmangel.



**Abb. 3.24: Ortsgerichtete Mutagenese des *glnK*-Gens von Aminosäuren des B- und des C-Loops.** Die Zahl steht für die ausgetauschte Position. Die erste Aminosäure stellt diejenige dar, die ausgetauscht wurde, und die zweite Aminosäure die, welche mit der ausgetauschten ersetzt wurde. Zum Nachweis von GlnK in dem *glnK*-Deletionsstamm NR-1, der Plasmid-kodiert *glnK*-Gene mit verschiedenen Mutationen exprimierte, wurden Western Blot Experimente von denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Cytoplasma- (1-4) und die Membranfraktion (5-8) wurden präpariert aus Zellen, die bei guter Stickstoffversorgung (1/5), bei Stickstoffmangel (2/6) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 15 min (3-4/7-8) kultiviert wurden (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna: 25, 15 und 10 kDa). Zum Nachweis der Transkription AmtR-regulierter Gene wurden RNA-Hybridisierungen mit einer *gltB*-Sonde durchgeführt (zur Erklärung siehe oben). Die dreidimensionale Struktur des GlnK-Proteins wurde mit den Programmen SWISS-prot TrEMBLE und SWISS-model database anhand der Aminosäuresequenz entworfen und bearbeitet und konnte über den SWISS-Pdb viewer 3.7 dargestellt werden.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass ein Aminosäureaustausch im T-Loop zu einer erhöhten Stabilität des GlnK-Proteins und einer verminderten oder fehlenden Membranbindung führte. Eine Interaktion zwischen GlnK und GlnD wird scheinbar durch alle Loops beeinflusst, da nach einem Austausch im B-, C- und T-Loop eine langsamere Modifikation bzw. Demodifikation beobachtet wurde.

### 3.5 Signalaufnahme und Signalweiterleitung

#### 3.5.1 Sensoreigenschaften der Ammoniumtransporter AmtA und AmtB

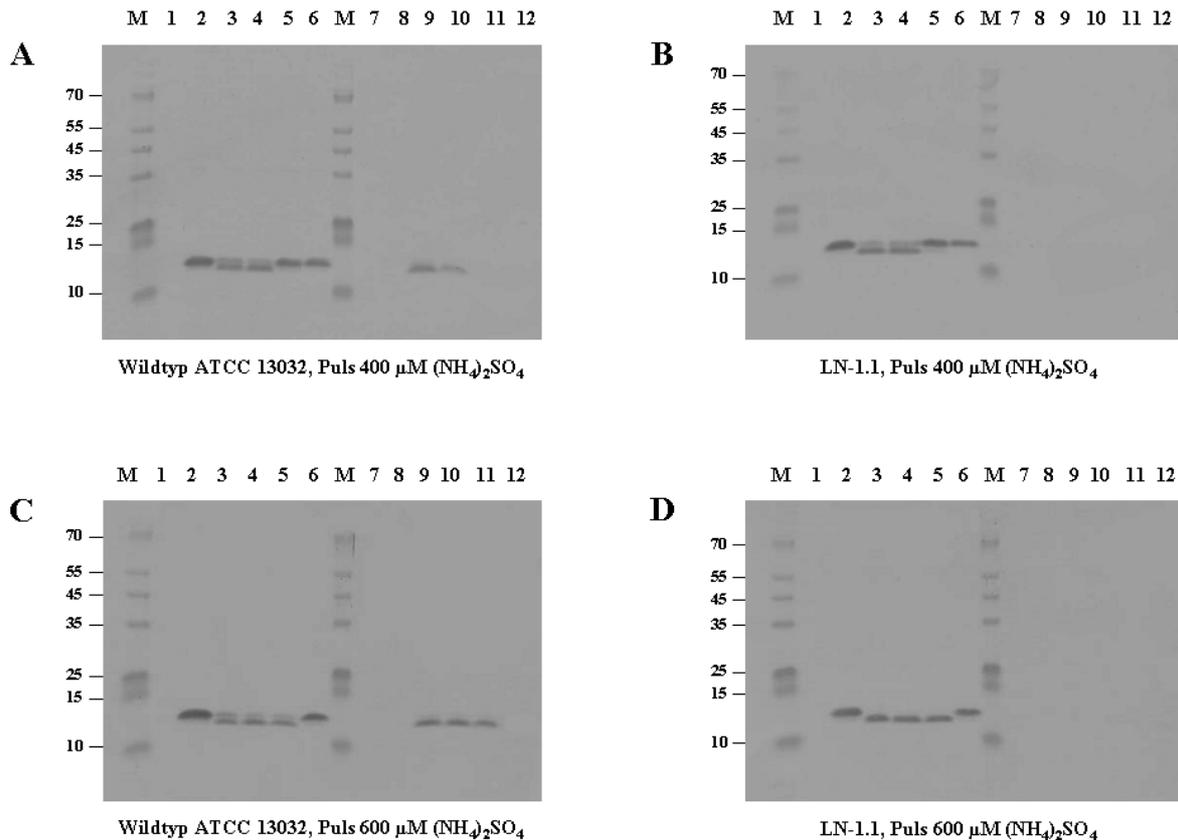
Bei guter Stickstoffversorgung gelangt Ammoniak über Diffusion in die Zelle. Unter Stickstoffmangel wird es über die beiden Ammoniumaufnahmesysteme AmtA und AmtB in die Zelle transportiert. In vielen Organismen wie *S. cerevisiae* (Lorenz & Heitmann, 1998) oder *E. coli* (Javelle *et al.*, 2004) wird eine Sensorfunktion der Amt-Proteine diskutiert. Über die hochaffinen Ammoniumtransporter können die Zellen das Ammonium im Medium wahrnehmen, binden und in die Zelle transportieren. Dass AmtA oder AmtB auch in *C. glutamicum* eine Sensorfunktion übernehmen, konnte bislang nicht gezeigt werden. Hierfür wurden der Wildtyp und die Transportermutanten von AmtA und AmtB untersucht. Gelangt Ammonium nicht in der membranpermeablen Form Ammoniak, sondern ausschließlich über die Transporter in die Zelle, müsste sich die Stickstoffantwort der untersuchten Stämme nach einem Puls auf Expressions- und Aktivitätsebene unterscheiden. So würde man für die Doppeldeletionsmutante erwarten, dass sich die Zellen ständig unter Stickstoffhunger befinden, da eine Weiterleitung des Signals aufgrund des Fehlens von AmtA und AmtB unterbleibt.

##### 3.5.1.1 Einfluss von AmtA und AmtB auf die De-/Adenylierung von GlnK

Für den folgenden Versuch wurden Proteinpräparationen im Wildtyp ATCC 13032 und in den *amtA*-, *amtB*-Einzeldelentionsmutanten MJ2-38 und LN-1.1 und der Doppeldeletionsmutante JS-1 durchgeführt, indem die Zellen unter Stickstoffmangel kultiviert wurden und ihnen dann bei einer OD<sub>600</sub> von 8 ein Stickstoffpuls von unterschiedlichen Konzentrationen an (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegeben wurde. Das Cytoplasma und die Membranfraktion wurden präpariert und ein Antikörpernachweis für GlnK durchgeführt.

Für einen Puls von 100 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zeigten Western Blot Experimente nur für das Cytoplasma bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls in den untersuchten Stämmen die adenylierte Form von GlnK (Daten nicht gezeigt), so dass die Zellen bei dieser Konzentration für Stickstoff limitiert waren. Ein Stickstoffpuls von 200 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Daten nicht gezeigt) und 400 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Abb. 3.25A) zeigten ein ähnliches Modifikationsmuster für GlnK. Für die Cytoplasmafraktion des Wildtyps sowie der Doppel- und Einzeldelentionsmutanten war unter guter Stickstoffversorgung kein GlnK nachweisbar, bei Stickstoffmangel konnte ausschließlich die adenylierte Form von GlnK detektiert werden und nach einem Stickstoffpuls von 30 Sekunden für 200 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und von 30 Sekunden und 2 Minuten für 400 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> war sowohl das adenylierte als auch das deadenylierte Protein nachweisbar. Dann erfolgte eine Modifikation von GlnK und die Zellen befanden sich bereits nach 2 bzw. 5 Minuten wieder unter Stickstoffhunger. Ob GlnK mit AmtB interagiert, sobald

es im Cytoplasma von GlnD deadenyliert wird, konnte durch eine Präparation der Membranfraktion gezeigt werden. Entsprechende Antikörpernachweise von GlnK zeigten für den Wildtyp sowie die *amtA*-Mutante MJ2-38 nach einem Stickstoffpuls von 30 Sekunden für 200  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Daten nicht gezeigt) bzw. 30 Sekunden und 2 Minuten für 400  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Abb. 3.25B) die deadenylierte Form von GlnK während für die Doppelmutante JS-1 und die *amtB*-Mutante LN-1.1 kein Protein detektierbar war.



**Abb. 3.25: Modifizierung von GlnK unter Ammoniumlimitierung.** Es wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt zum Nachweis von GlnK im Cytoplasma (1-6) und in der Membranfraktion (7-12) des Wildtyps ATCC 13032 (**A/C**) und der *amtB*-Mutante LN-1.1 (**B/D**). Die Zellen wurden bei guter Stickstoffversorgung (1/7), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2/8) und nach Zugabe von 400  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (**A/B**) oder 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (**C/D**) und Inkubation für 30 s, 2, 5 und 10 min (3-6/9-12) kultiviert (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna).

Die Signale in Western Blot Experimenten für einen Stickstoffpuls von 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  unterschieden sich in den untersuchten Stämmen. So zeigte ein Antikörpernachweis von GlnK für die Cytoplasmafraktion des Wildtyps (Abb. 3.25C) und der *amtA*-Mutante MJ2-38 (Daten nicht gezeigt) unter guter Stickstoffversorgung kein GlnK, bei Stickstoffmangel nur die adenylierte Form und nach einem Puls von bis zu 5 Minuten die adenylierte sowie die

deadenylylierte Form des Proteins. In der Membranfraktion des Wildtyps (Abb. 3.25C) sowie der *amtA*-Mutante MJ2-38 (Daten nicht gezeigt) war deadenylyliertes GlnK nach einem Puls von bis zu 5 Minuten detektierbar. Für die Doppelmutante JS-1 (Daten nicht gezeigt) und die Mutante LN-1.1 (Abb. 3.25D) zeigte sich ein anderes GlnK-Modifizierungsmuster. Bei guter Stickstoffversorgung war kein Protein nachweisbar, bei Stickstoffmangel das adenylylierte Protein und nach einem Puls von bis zu 5 Minuten konnte nur die deadenylylierte Form detektiert werden. Für die Membranfraktionen der Doppelmutante JS-1 (Daten nicht gezeigt) und der *amtB*-Mutante LN-1.1 (Abb. 3.25D) waren keine Signale nachweisbar. Abschließend wurden noch zwei weitere Stickstoffpulse untersucht, 800  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Daten nicht gezeigt). Das Modifikationsmuster von allen untersuchten Stämmen entsprach dem für einen Puls von 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Die dargestellten Experimente konnten in mehreren unabhängigen Versuchsreihen bestätigt werden.

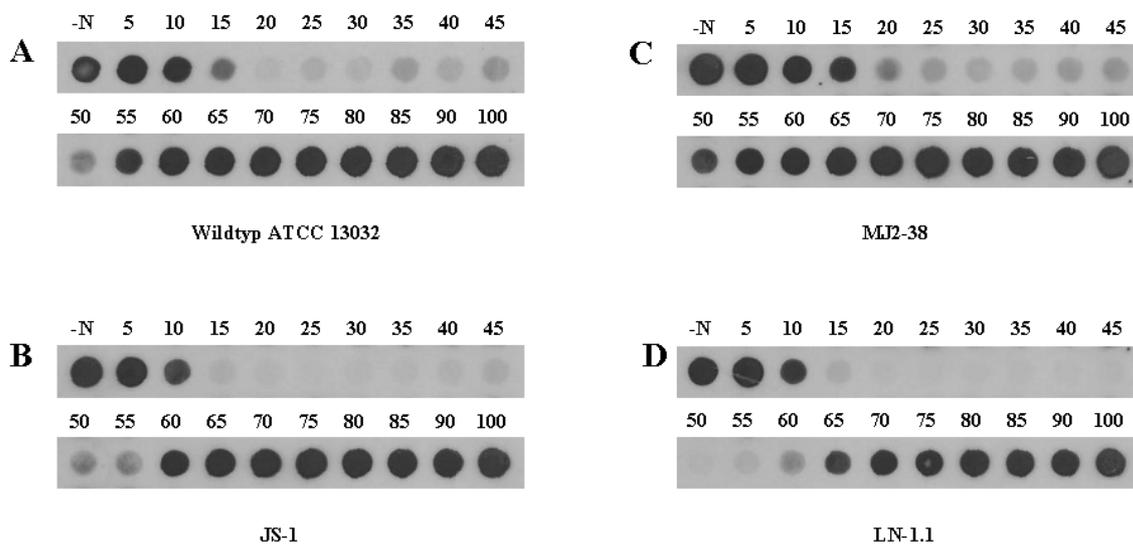
Für eine Ammoniumkonzentration unter 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  war das Modifikationsmuster von GlnK im Cytoplasma in den vier untersuchten Stämmen gleich, während es sich bei einer Konzentration über 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  unterschied: die Deadenylylierung von GlnK war nach einem Stickstoffpuls über 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in der *amtB*-Deletionsmutante und der *amtA amtB*-Doppeldeletionsmutante schneller als im Wildtyp und der *amtA*-Deletionsmutante. Dieses Ergebnis bestätigten Beobachtungen aus früheren Experimenten mit einem Stickstoffpuls von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , in denen auch eine schnellere Demodifizierung von GlnK in JS-1 und LN-1.1 beobachtet wurde (vgl. Punkt 3.1.4). Die Zellen müssen demnach unterscheiden, ob viel oder wenig Ammonium im Medium verfügbar ist. Dieser Effekt muss auf das Fehlen des AmtB-Transporters zurückgeführt werden.

Eine Sensorfunktion der Ammoniumtransporter konnte mit diesen Experimenten nicht gezeigt werden, da das Signal auch bei einer Deletion von *amtA* und *amtB* in die Zelle geleitet wird. Wird die Ammoniumkonzentration in der Zelle gemessen, muss Ammonium über Diffusion in die Zelle gelangen, da es in der Doppelmutante sonst nicht zu einer Stickstoffantwort kommen konnte. Der einzige Weg für Ammonium in die Zelle ist hier durch die Deletion der Transporter-Gene ausgeschaltet.

### 3.5.1.2 Expressionsregulation unter Ammoniumlimitierung

Auf Proteinebene zeigte sich, dass die Doppelmutante JS-1 sowie die *amtB*-Mutante LN-1.1 auf eine Ammoniumkonzentration von 400  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  anders reagieren als auf eine Konzentration von 600  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Für den Wildtyp und die Mutante MJ2-38 konnte dies nicht detektiert werden. Ob eine ähnliche Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration auch auf Expressionsebene zu beobachten ist, wurde mit RNA-Hybridisierungen untersucht. Die Kultivierung und Probennahme erfolgten analog wie für Western Blot Experimente. Die RNA wurde isoliert und mit einer *glnK*-Sonde hybridisiert. Ein Puls von 100  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

fürte zu einer ständigen Expression stickstoffregulierter Gene (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass die mRNA in dem beobachteten Zeitraum von 20 Minuten so stabil war, dass sie noch detektiert werden konnte, obwohl die Expression bereits reprimiert war. Ein vergleichbares Expressionsmuster konnte bis zu einem Stickstoffpuls von 2 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Antwort auf Expressionsebene war demnach nicht so sensitiv wie auf Proteinebene. Unter Berücksichtigung der möglichen hohen Stabilität der mRNA wurde der Versuch so abgewandelt, dass nach einem Stickstoffpuls von 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  über einen Zeitraum von 100 Minuten im Abstand von 5 Minuten Proben entnommen wurden.



**Abb. 3.26: Sensoreigenschaften der Transporter AmtA und AmtB.** Zum Nachweis der Expression stickstoffregulierter Gene im Wildtyp ATCC 13032 (A) und in den Mutanten JS-1 (B), MJ2-38 (C) und LN-1.1 (D) wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die bei Stickstoffmangel (-N) und nach Zugabe von 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5-100 min (5-100) kultiviert wurden. Eine Hybridisierung erfolgte mit einer *gltB*-Sonde.

Für den Wildtyp ATCC 13032 konnte das in Abbildung 3.26A gezeigte Expressionsmuster detektiert werden. Unter Stickstoffmangel wurde das stickstoffregulierte Gen *glnK* exprimiert und zeigte nach einem Puls von 15 Minuten eine deutlich verminderte Transkription. 50 Minuten, nachdem das zugegebene Ammonium im Medium aufgebraucht war, wurde die Expression erneut induziert und die Zellen waren wieder für Stickstoff limitiert. Für die Doppelmutante JS-1 wurde die Transkription AmtR-regulierter Gene (Abb. 3.26B) bereits nach 10 Minuten wieder reprimiert und erst nach 60 Minuten wieder induziert. Die Reaktion auf gute Stickstoffversorgung läuft somit schneller ab als im Wildtyp, die Rückantwort auf Stickstoffmangel jedoch langsamer. Für die *amtA*-Mutante MJ2-38 (Abb. 3.26C) zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie für den Wildtyp, die Expression wurde jedoch nach

einem Puls langsamer reprimiert und dafür früher wieder induziert. Der *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 (Abb. 3.26D) zeigte ein Expressionsmuster, das mit dem der Mutante JS-1 vergleichbar war, die Zellen blieben jedoch länger für Stickstoff limitiert. Die Experimente wurden in mehreren unabhängigen Versuchsreihen bestätigt. Die Stabilität der mRNA in den einzelnen Stämmen wurde hier nicht untersucht, so dass die verschiedenen Expressionsmuster auch auf unterschiedlich stabile mRNAs in den Zellen zurückgeführt werden könnten.

Die Antwort in der Doppelmutante JS-1 und in der *amtB*-Mutante LN-1.1 auf einen Stickstoffpuls war schneller als im Wildtyp und in der *amtA*-Mutante MJ2-38. Dies bestätigte das Ergebnis, das schon in den Western Blots zu beobachten war (vgl. Punkt 3.1.4). Eine schnellere Deadenylylierung in den Stämmen JS-1 und LN-1.1 führte zu einer Auflösung der Interaktion zwischen AmtR und GlnK-AMP, so dass die Expression stickstoffregulierter Gene reprimiert wurde. Ein sensorischer Effekt von AmtA und/oder AmtB konnte mit diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden. Die Deletion der Ammoniumtransporter hatte keinen Einfluss auf die Expressionsregulation. Das Ammonium gelangt wahrscheinlich auch bei niedrigen Konzentrationen über Diffusion in die Zelle und löst dort eine Stickstoffantwort aus. Welchen Einfluss alternative Stickstoffquellen im Unterschied zu Ammoniak bzw. Ammonium auf die Expressionsregulation und Aktivitätsregulation in *C. glutamicum* haben, wurde bislang nicht untersucht und stand im Mittelpunkt der folgenden Versuche.

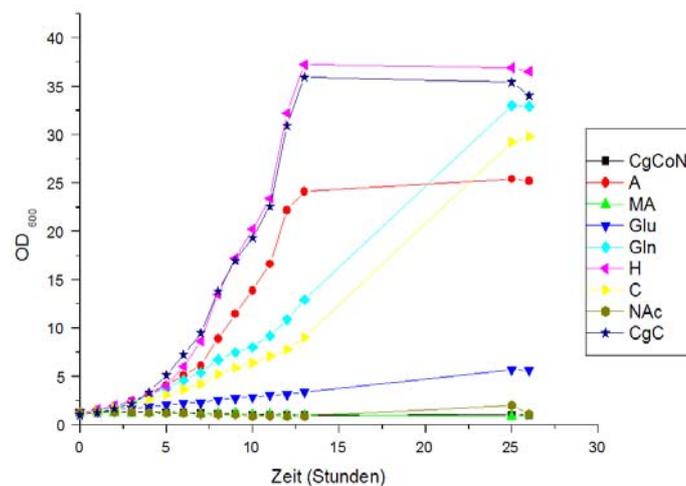
### 3.5.2 Regulation der Stickstoffkontrolle bei Gabe verschiedener Stickstoffquellen

Im Allgemeinen wird Ammoniak bzw. Ammonium von den Zellen bevorzugt aufgenommen und assimiliert. *C. glutamicum* besitzt neben den Amt-Proteinen AmtA und AmtB allerdings noch andere Transportsysteme zur Aufnahme alternativer Stickstoffquellen. So werden Aufnahmesysteme für Harnstoff (UrtABCDE), Creatinin (CrnT), Methylammonium (AmtA und AmtB) und Glutamat (GluABCD und GltS) synthetisiert, deren Gene unter Stickstoffmangel verstärkt exprimiert werden, sowie ein Transportsystem für Glutamin, dessen Expression nicht abhängig ist vom Stickstoffstatus der Zelle (Kronemeyer *et al.*, 1995; Siewe *et al.*, 1995; Jakoby *et al.*, 2000; Meier-Wagner *et al.*, 2001; Bendt *et al.*, 2004; Beckers *et al.*, 2004). Der alleinige Transport dieser Substanzen in die Zelle reicht bei schlechter Stickstoffverfügbarkeit nicht aus, um die Stickstoffversorgung der Zelle zu gewährleisten. Deshalb werden unter Stickstoffmangel bestimmte Enzyme synthetisiert, wie die Glutaminsynthetase (GS) und die Glutamatsynthase (GOGAT) zur Glutamat- und Ammoniumassimilation, die Urease zur Verwertung von Harnstoff und die Creatinindeaminase zur Spaltung von Creatinin, um die in die Zelle transportierten Substanzen zu assimilieren (Tesch *et al.*, 1999; Bendt *et al.*, 2004; Beckers *et al.*, 2004).

Die Fragestellungen der folgenden Versuchsreihen war, ob *C. glutamicum* einerseits in der Lage ist, alternative Stickstoffquellen zu Ammoniak bzw. Ammonium zu nutzen und ob diese Stickstoffquellen andererseits die Signalkaskade in gleicher Weise beeinflussen wie dies für Ammoniak und Ammonium durch eine Regulation auf Expressionsebene und Proteinaktivitätsebene gezeigt werden konnte.

### 3.5.2.1 Wachstum auf unterschiedlichen Stickstoffquellen

In den folgenden Wachstumsversuchen wurden Wildtyp-Zellen ATCC 13032 auf verschiedenen Stickstoffquellen kultiviert. Hierfür wurden die Zellen in CgCoN-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 1 angeimpft und jedem Kolben wurde eine andere Stickstoffquelle zugesetzt. Als Stickstoffquellen wurden Ammoniumsulfat, Methylammonium, Glutamat, Glutamin, Harnstoff, Creatinin und N-Acetylglukosamin in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. CgC- sowie CgCoN-Medium dienten als Vergleich für ein Wachstum unter guter Stickstoffversorgung und ein Wachstum bei Stickstoffmangel. Für die Wachstumskurven wurde stündlich die  $OD_{600}$  bestimmt. Die Wachstumsversuche wurden in mehreren unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Abbildung 3.27 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 3.27: Wachstumsversuche mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.** Die Wildtyp-Zellen ATCC 13032 wurden in CgCoN-Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen auf eine  $OD_{600}$  von 1 angeimpft und es wurde stündlich die  $OD_{600}$  bestimmt. Als Stickstoffquellen wurden 100 mM Ammoniumsulfat (A), Methylammonium (MA), Glutamat (Glu), Glutamin (Gln), Harnstoff (H), Creatinin (C) und N-Acetylglukosamin (NAc) eingesetzt. Als Vergleich diente CgC- bzw. CgCoN-Medium.

Zellen, die in CgCoN-Medium mit den Substanzen Methylammonium oder N-Acetylglukosamin kultiviert wurden, zeigten kein Wachstum, sondern stagnierten bei einer  $OD_{600}$  von 1. Zellen, die auf Glutamat gezogen wurden, wuchsen sehr langsam und kamen nicht über eine  $OD_{600}$  von 5 hinaus, während Zellen, die auf Creatinin und Glutamin als Stickstoff-

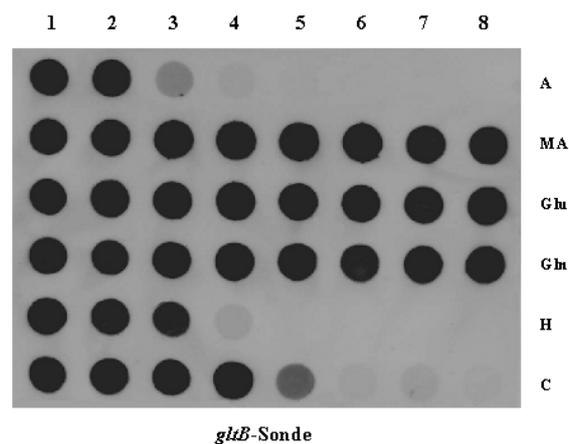
quelle kultiviert wurden, zwar langsam wuchsen, nach 26 Stunden aber eine  $OD_{600}$  von 30 bzw. 33 erreichten. Zellen, die in CgC-Medium und auf Harnstoff als Stickstoffquelle inkubiert wurden, zeigten das beste Wachstum mit der geringsten Verdopplungszeit. Sie erreichten bereits nach 13 Stunden die stationäre Phase und eine  $OD_{600}$  von 36. Dies konnte ebenfalls für Ammoniumsulfat beobachtet werden; die Zellen zeigten jedoch beim Eintritt in die stationäre Phase eine geringere  $OD_{600}$ , so dass sich die Zellen früher in einer Limitierung befanden. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass Harnstoff und Ammoniumsulfat als Stickstoffquellen am besten geeignet sind. Die Zellen können ebenfalls gut auf Creatinin und Glutamin wachsen, während Glutamat, Methylammonium und N-Acetylglukosamin nicht als Stickstoffquellen geeignet sind.

### 3.5.2.2 Einfluss alternativer Stickstoffquellen auf die Expressionsregulation

Um die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit einer anderen Methode zu verifizieren, wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Aus früheren Experimenten war bekannt, dass die Expression stickstoffregulierter Gene durch Zugabe von Ammoniumsulfat wieder reprimiert wird (Nolden *et al.*, 2001b). Ob dieser Effekt nur auf Ammoniak bzw. Ammonium als Stickstoffquelle zurückzuführen ist, oder ob auch andere Stickstoffquellen für eine Repression AmtR-regulierter Gene sorgen können, wurde im Folgenden untersucht. Hierfür wurden Wildtyp-Zellen ATCC 13032 nach Inkubation unter Stickstoffmangel mit verschiedenen Stickstoffquellen versetzt und die Expression AmtR-kontrollierter Gene über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden beobachtet. Die RNA wurde isoliert und mit einer *glnK*-Sonde hybridisiert (Abb. 3.28). Als Stickstoffquellen wurden je 100 mM Methylammonium, Glutamat, Glutamin, Harnstoff, Creatinin und als Vergleich Ammoniumsulfat gewählt. N-Acetylglukosamin wurde hier nicht untersucht, da es aufgrund der Wachstumsversuche als Stickstoffquelle ausgeschlossen werden konnte. Ein Aufnahmesystem für N-Acetylglukosamin ist bisher nicht bekannt und so gelangt dieses vermutlich gar nicht erst in die Zelle.

Für Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle war unter einer Stickstoffmangelbedingung, die hier als Vergleich diente, und nach einem 5-minütigen Ammoniumsulfatpuls eine Expression des stickstoffregulierten Gens *glnK* nachweisbar. Danach konnte keine Transkription mehr beobachtet werden. Nach einem Ammoniumsulfatpuls diffundiert Ammoniak über die Zellmembran und wird von der Glutamatdehydrogenase (GDH) zu Glutamat umgesetzt. Das gleiche Expressionsmuster konnte für Harnstoff und Creatinin als Stickstoffquellen beobachtet werden, wobei die Repression AmtR-regulierter Gene nach einem Harnstoffpuls etwas länger und nach einem Creatininpuls sehr viel länger dauerte. So wurde die Expression stickstoffregulierter Gene erst nach 20 Minuten bzw. nach einer Stunde wieder durch AmtR reprimiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Wachstumsversuche.

Zellen, die auf Creatinin gezogen wurden, hatten eine höhere Verdopplungszeit als Zellen, die auf Harnstoff oder Ammoniumsulfat kultiviert wurden, so dass man erwarten würde, dass auch die Antwort auf Expressionsebene verzögert abläuft. Harnstoff diffundiert wie Ammoniak bei hohen Konzentration über die Membran. In der Zelle wird der Harnstoff durch die Urease in Kohlendioxid und Ammoniak gespalten (Beckers *et al.*, 2004). Creatinin wird über eine Permease in die Zelle aufgenommen und dort durch die Creatinindeaminase in Methylhydantoin und Ammonium gespalten (Bendt *et al.*, 2004). Der Ammoniak bzw. das Ammonium steht dann der Assimilation über die GDH zur Verfügung. Eine verzögerte Antwort auf Expressionsebene für einen Harnstoff- und Creatininpuls im Vergleich zu einem Ammoniumsulfatpuls kann so erklärt werden, dass Harnstoff bzw. Creatinin nach der Aufnahme in die Zelle erst in Ammoniak bzw. Ammonium umgewandelt werden müssen, um eine Stickstoffantwort auszulösen. Außerdem muss Creatinin in die Zelle transportiert werden, während Harnstoff und Ammoniumsulfat über Diffusion in die Zelle gelangen.



**Abb. 3.28: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf die Expression AmtR-regulierter Gene.** Die RNA wurde aus dem Wildtyp ATCC 13032 nach Inkubation in Stickstoffmangel für 1,5 h (1) und nach Zugabe von 100 mM Ammoniumsulfat (A), Methylammonium (MA), Glutamat (Glu), Glutamin (Gln), Harnstoff (H) und Creatinin (C) und Inkubation für 5, 10, 20, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h (2-8) isoliert und mit einer *glnK*-Sonde hybridisiert.

Nach einem Methylammonium-, Glutamat- und Glutamin-Puls konnten für das *glnK*-Gen deutliche Signale detektiert werden, die nach einem Puls von 5 Minuten bis zu 4 Stunden genauso stark waren wie bei einer Kultivierung ohne eine Stickstoffquelle. Die Zellen befanden sich ständig in einer Stickstofflimitierung. Dies war für einen Methylammonium- sowie einen Glutamat-Puls aufgrund der Ergebnisse der Wachstumsversuche zu erwarten gewesen. Methylammonium wird von den unter Stickstoffmangel synthetisierten Transportproteinen AmtA und AmtB wie Ammonium aufgenommen (Meier-Wagner *et al.*, 2001,

B. Walter, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung), kann dann in der Zelle aber nicht weiterverwertet werden. Die Zellen sind für Stickstoff limitiert. Die Glutamataufnahme erfolgt entweder durch den ABC-Transporter (Kronmeyer *et al.*, 1995) oder die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Permease (Trötschel *et al.*, 2003) und wird in der Zelle sofort weiterverwertet. Wegen des fehlenden Ammoniums können die Zellen allerdings kein Glutamin herstellen, so dass sie deshalb für Stickstoff limitiert sind. Glutamin wird durch ein sekundäres Transportsystem im Symport mit Na<sup>+</sup>-Ionen aufgenommen (Siewe *et al.*, 1995). Zellen, die auf Glutamin kultiviert wurden, wuchsen ähnlich gut wie Zellen, die auf Creatinin gezogen wurden. Die Expressionsmuster waren jedoch verschieden. So wurde die Stickstoffantwort nach einem Glutaminpuls im Gegensatz zu einem Creatinin-Puls nicht mehr abgeschaltet und die Zellen blieben für Stickstoff limitiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ammonium der Marker des Stickstoffstatus ist und nicht Glutamin, da nach einem Glutaminpuls keine Regulation auf Genexpressionsebene beobachtet werden konnte.

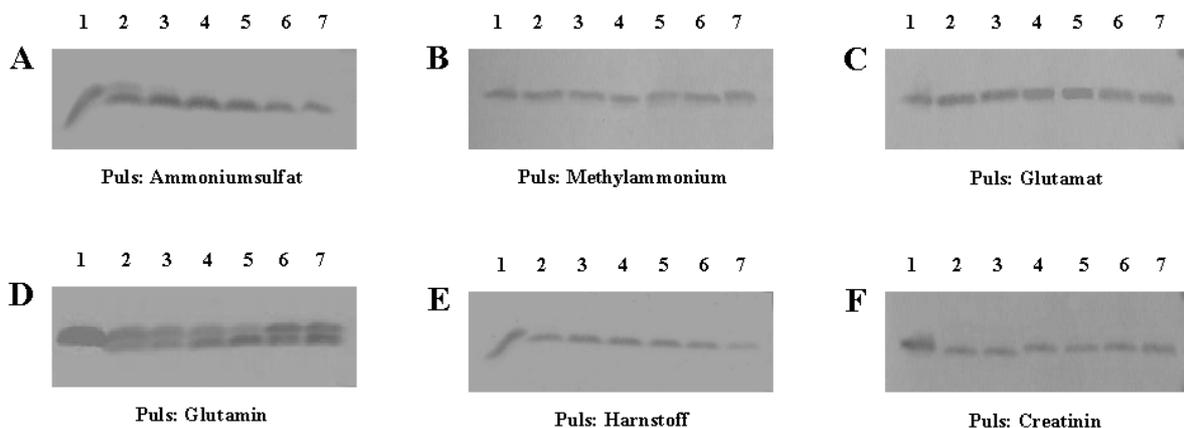
Abschließend lässt sich festhalten, dass ein Puls mit Harnstoff und Creatinin wie mit Ammoniumsulfat zu einer Repression der unter Stickstoffkontrolle stehenden Gene führt, während die Expression stickstoffregulierter Gene nach einem Puls mit Methylammonium, Glutamat und Glutamin induziert bleibt.

### 3.5.2.3 GlnK-Modifikation nach Kultivierung unter verschiedenen Stickstoffquellen

Neben einer Regulation auf Genexpressionsebene hat Ammoniak bzw. Ammonium einen Einfluss auf das Modifikationsmuster von GlnK. Ein Antikörpernachweis von GlnK sollte zeigen, ob die ausgewählten möglichen Stickstoffquellen zu einer Aktivitätsregulation von GlnK führen wie sie für Ammoniak bzw. Ammonium beobachtet werden konnte (vgl. Punkt 3.1.4). Hierfür wurden Proteinpräparationen im Wildtyp ATCC 13032 durchgeführt und als Stickstoffquellen analog den vorigen Experimenten 100 mM Glutamat, Glutamin, Harnstoff, Creatinin, Methylammonium und Ammoniumsulfat als Vergleich eingesetzt.

Ein Antikörpernachweis von GlnK zeigte für Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle das bekannte Proteinmuster (Abb. 3.29A): unter Stickstoffmangel war die adenylierte Form von GlnK nachweisbar und bereits nach einem Puls von 2 Minuten dominierte die demodifizierte Form des Proteins. Ein Ammoniumsulfatpuls führt hier zu einer Deadenylylierung von GlnK. Das gleiche Modifikationsmuster zeigte sich auch für einen Puls mit Harnstoff (Abb. 3.29E) und Creatinin (Abb. 3.29F). Obwohl die Wachstumsversuche zeigten, dass die Zellen auf Harnstoff deutlich schneller wuchsen als auf Creatinin, sorgten beide Substanzen für eine schnelle Demodifizierung von GlnK. Die Antwort auf Proteinebene ist somit für einen Harnstoff- sowie einen Creatininpuls identisch mit der für einen Ammoniumsulfatpuls, im Gegensatz zu der verzögerten Antwort auf Expressionsebene, die insbesondere nach einem Creatininpuls beobachtet werden konnte.

Ein Antikörpernachweis von GlnK für Zellen, die mit Glutamin (Abb. 3.29D) gepulst wurden, zeigte ein anderes Proteinmuster. Bei Stickstoffmangel war adenyliertes GlnK nachweisbar und nach einem Glutaminpuls konnte über einen Zeitraum von 4 Stunden die adenylierte sowie die deadenylierte Form von GlnK in gleichen Mengen detektiert werden. Obwohl die Zellen, die auf Glutamin gezogen wurden, genauso wuchsen, wie Zellen, die auf Creatinin kultiviert wurden, war der Einfluss auf die Signalkaskade anders. GlnK wurde nach einem Glutaminpuls nicht mehr vollständig demodifiziert. Die hier zu jeder Zeit vorhandene Menge an adenyliertem GlnK ist vermutlich für eine weitere Derepression stickstoffregulierter Gene nach einem Glutamin-Puls verantwortlich, indem GlnK-AMP mit AmtR interagiert. AmtR ist nicht in der Lage, seine Funktion als Repressor auszuführen, so dass eine ständige Expression stickstoffregulierter Gene beobachtet wurde.



**Abb. 3.29: Einfluss möglicher Stickstoffquellen auf die Modifizierung von GlnK.** Zum Nachweis von GlnK im Zellextrakt von Wildtyp-Zellen ATCC 13032 wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert bei Stickstoffmangel für 1,5 h (1) und anschließend mit möglichen Stickstoffquellen gepulst und für 2, 5, 30 min sowie 1, 2 und 4 h inkubiert (2-7). Als Stickstoffquellen wurden 100 mM Ammoniumsulfat (A), Methylammonium (B), Glutamat (C), Glutamin (D), Harnstoff (E) und Creatinin (F) gewählt.

Western Blot Experimente für Zellen, die mit Glutamat (Abb. 3.29C) und Methylammonium (Abb. 3.29B) gepulst wurden, zeigten unter allen Bedingungen nur die adenylierte Form. Glutamat und Methylammonium waren somit nicht in der Lage, eine Deadenylylierung von GlnK auszulösen. Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen aus den Wachstumsversuchen und RNA-Hybridisierungen überein. Zellen, die auf Methylammonium und Glutamat kultiviert wurden, wuchsen sehr langsam bzw. gar nicht. Sie waren für Stickstoff limitiert und eine Stickstoffregulation blieb aus.

Aus den Versuchen wird deutlich, dass von sechs möglichen Stickstoffquellen nur Harnstoff, Creatinin und Ammoniumsulfat gut geeignet sind, da sie für eine Deadenylylierung von GlnK

sorgen und die Signalkaskade in gleicher Weise beeinflussen. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Ammonium und nicht Glutamin den Stickstoffstatus der Zelle widerspiegelt, da ein Glutaminpuls im Gegensatz zu einem Ammoniumsulfatpuls nicht zu einer vollständigen Demodifikation von GlnK führt und keine Repression AmtR-regulierter Gene auslösen kann. Da Harnstoff und Creatinin vermutlich erst in die Zelle transportiert und zu Ammonium gespalten werden müssen, um eine Stickstoffantwort auszulösen, ist es wahrscheinlicher, dass die interne Ammoniumkonzentration wahrgenommen wird und nicht die Konzentration im Medium.

### 3.5.3 Analyse der Mutanten LNGLNA2, LNΔGLTBD, LNΔGDH, LNΔGS und LNGLNE

Bei guter Stickstoffversorgung diffundiert Ammoniak passiv über die Zellmembran und wird über oxidative Aminierung durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) unter Verbrauch von einem Reduktionsäquivalent  $\text{NADH}+\text{H}^+$  assimiliert. Bei Stickstoffmangel kann nicht mehr ausreichend Ammoniak in die Zelle diffundieren, stattdessen wird Ammonium über AmtA und AmtB in die Zelle transportiert. Unter diesen Bedingungen wird Ammonium in einem zweiten anabolischen Weg durch die Glutaminsynthetase (GS) assimiliert, indem sie Ammonium unter Energieverbrauch auf Glutamat überträgt, wobei Glutamin entsteht. Glutamin und  $\alpha$ -Ketoglutarat werden weiter mit der Glutamatsynthase (GOGAT) unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  zu Glutamat umgewandelt. Um den Einfluss von Proteinen des Stickstoffmetabolismus auf die Regulation auf Expressionsebene und Aktivitätsebene zu testen, wurden die Einzeldelentionsmutanten LNGLNE ( $\Delta\text{glnE}$ ), LNΔGS ( $\Delta\text{glnA}$ ), LNΔGDH ( $\Delta\text{gdh}$ ), LNGLNA2 ( $\Delta\text{glnA2}$ ) und LNΔGLTBD ( $\Delta\text{gltBD}$ ) im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 analysiert.

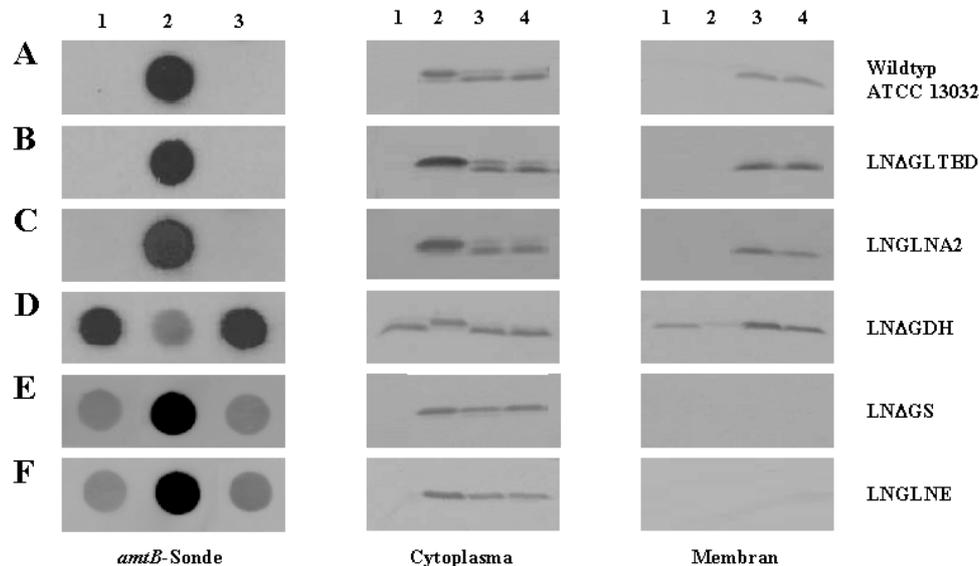
RNA-Hybridisierungen mit einer *amtB*-Sonde sowie Antikörpernachweise von GlnK im Cytoplasma und in der Membranfraktion zeigten für den Wildtyp ATCC 13032 und die Deletionsmutanten LNGLNA2 ( $\Delta\text{glnA2}$ ) und LNΔGLTBD ( $\Delta\text{gltBD}$ ) das gleiche bekannte Expressionsmuster bzw. Modifikationsmuster für GlnK (Abb. 3.30A-C). Die Deletion des *glnA2*-Gens sowie des *gltBD*-Operons hat somit keinen Einfluss auf die Regulation auf Expressionsebene und Proteinaktivitätsebene. Das *glnA2*-Gen kodiert für eine Glutaminsynthetase vom GS I  $\alpha$ -Typ (GS 2), der im Unterschied zur GS in Deletions- und Überexpressionsansätzen bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte (Nolden *et al.*, 2001a). Das *gltBD*-Operon kodiert für die Glutamatsynthase (GOGAT), die im Gegensatz zur Situation in *E. coli* in *C. glutamicum* scheinbar nur eine untergeordnete Rolle spielt (Beckers *et al.*, 2001).

Das Expressionsmuster für den *gdh*-Deletionsstamm LNΔGDH zeigte eine deregulierte Expression AmtR-kontrollierter Gene (Abb. 3.30D). Bei guter Stickstoffversorgung war die

Transkription des *amtB*-Gens induziert, bei Inkubation in Stickstoffmangel ging die Expression zurück und nach einem Stickstoffpuls war wieder ein deutliches Signal detektierbar. Durch die Deletion des Gens für die Glutamatdehydrogenase (GDH) kommt es zu einem Anstieg des  $\alpha$ -Ketoglutaratpools unter guter Stickstoffversorgung, da dieses nicht umgesetzt werden kann (T. Müller, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung). Dies signalisiert der Zelle vermutlich einen Stickstoffmangelzustand, so dass die Expression AmtR-kontrollierter Gene induziert wird. Bei Stickstoffmangel sinkt der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Spiegel aufgrund der enzymatischen Reaktion der GOGAT. Dies könnte zu einer teilweisen Repression AmtR-regulierter Gene führen. Western Blot Experimente für die *gdh*-Mutante LN $\Delta$ GDH (Abb. 3.30D) zeigten bei guter Stickstoffversorgung im Cytoplasma sowie in der Membranfraktion deadenyliertes GlnK-Protein. Bei Stickstoffmangel war nur noch im Cytoplasma GlnK nachweisbar, wobei es sich dort um die adenylierte Form handelte. Nach einem Stickstoffpuls konnte dann sowohl im Cytoplasma als auch in der Membranfraktion deadenyliertes Protein detektiert werden. Da die Expression stickstoffregulierter Gene bereits unter guter Stickstoffversorgung angeschaltet war, interagierte GlnK mit AmtB. Diese Untersuchungen zeigten, dass sich die Ergebnisse der RNA-Hybridisierungen von denen der Western Blots unterschieden. Eine Deregulation auf Expressionsebene hat keine Änderung des Modifikationsmusters von GlnK zur Folge. Das Signal zur Adenylierung von GlnK bei Stickstoffmangel bzw. zur Deadenylierung nach einem Stickstoffpuls ist unabhängig von der GDH.

Für den *glnA*-Deletionsstamm LN $\Delta$ GS und die *glnE*-Deletionsmutante LNGLNE (Abb. 3.30E/F) konnte bei guter Stickstoffversorgung eine schwache Expression des stickstoffregulierten Gens *amtB* detektiert werden, bei Stickstoffmangel wurde die Transkription induziert und nach einem Stickstoffpuls konnte eine Repression beobachtet werden. Der *glnA*-Deletionsstamm LN $\Delta$ GS ist Glutamin-auxotroph. Selbst durch eine Kultivierung mit Glutamin kommt es im Gegensatz zu einem Ammoniumsulfatpuls nicht zu einer Repression AmtR-regulierter Gene (T. Müller, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung). Dies bestärkt die Vermutung, dass Ammonium der Marker des Stickstoffstatus ist und nicht Glutamin. Eine Deletion von *glnE* führt zu einer Deregulation der GS-Aktivität, die scheinbar eine nicht vollständige Repression der Expression stickstoffregulierter Gene unter guter Stickstoffversorgung zur Folge hat. Ein Antikörpernachweis in den Stämmen LN $\Delta$ GS ( $\Delta$ *glnA*) und LNGLNE ( $\Delta$ *glnE*) zeigte das folgende Modifikationsmuster für GlnK (Abb. 3.30E/F): im Cytoplasma konnte bei guter Stickstoffversorgung kein GlnK-Protein detektiert werden, während bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls nur die adenylierte Form nachgewiesen werden konnte. In der Membranfraktion war weder in der LN $\Delta$ GS- noch in der LNGLNE-Mutante Protein nachweisbar, das adenylierte Protein interagiert nicht mit dem AmtB-Transporter. Warum das GlnK-Protein in einem LN $\Delta$ GS- bzw. LNGLNE-

Deletionsstamm nicht mehr deadenyliert wird, bleibt unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass die GS eine regulatorische Funktion übernimmt, indem sie eine Demodifikation von GlnK durch GlnD stimuliert. Die ATase könnte hier als Bindeglied den Stickstoffstatus der Zelle wahrnehmen und die GS dementsprechend aktivieren oder deaktivieren.



**Abb. 3.30: Stickstoffregulation in verschiedenen Deletionsmutanten.** Die Versuche wurden durchgeführt im Wildtyp ATCC 13032 (**A**) und den Mutanten LN $\Delta$ GLTBD (**B**), LNGLNA2 (**C**), LN $\Delta$ GDH (**D**), LN $\Delta$ GS (**E**) und LNGLNE (**F**). Zum Nachweis der Expression stickstoffregulierter Gene wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die bei guter Stickstoffversorgung (1), nach Inkubation für 1,5 h in Stickstoffmangel (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 15 min (3) kultiviert wurden, und mit einer *amtB*-Sonde hybridisiert. Zum Nachweis von GlnK im Cytoplasma und in der Membranfraktion wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 5 und 10 min (3/4).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Deletion von *glnA2* und des *gltBD*-Operons keinen Effekt auf die Stickstoffregulation hat. Eine Deletion des *gdh*-Gens beeinflusst nicht das Modifizierungsschema von GlnK und eine Deregulation auf Expressionsebene in der Mutante LN $\Delta$ GDH kann durch eine Verschiebung des internen  $\alpha$ -Ketoglutaratpools erklärt werden. Eine *glnA*- und eine *glnE*-Deletion führten zu einer fehlenden Demodifikation des GlnK-Proteins nach einem Stickstoffpuls. Dieser Effekt könnte durch eine fehlende Protein-Protein-Interaktion in diesen beiden Mutanten erklärt werden, die eine Demodifikation von GlnK stimuliert oder eine Veränderung der Metabolitenkonzentrationen könnte der Zelle einen Stickstoffmangel signalisieren, so dass GlnK modifiziert bleibt. Diese Ergebnisse deuten erstmals auf einen zusätzlichen Signalinput hin, der nicht abhängig ist von GlnK und GlnD. So könnte die ATase selbst den

Stickstoffstatus wahrnehmen und das Signal an die GS weiterleiten. Eine Untersuchung der GS-Aktivität in Abhängigkeit von GlnK und GlnD war Gegenstand des folgenden Kapitels.

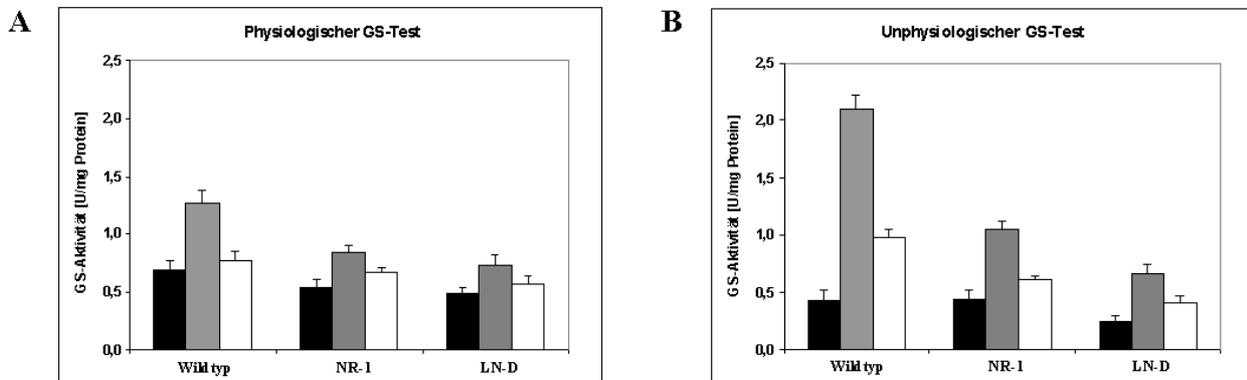
### 3.5.4 Regulation der Aktivität der Glutaminsynthetase (GS)

Bei guter Stickstoffversorgung wird die Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) durch posttranslationale Adenylylierung reduziert, so dass die GS nur rund ein Drittel der Ammoniumassimilation übernimmt (Tesch *et al.*, 1999). Unter Stickstoffmangel wird die GS durch die Adenylyltransferase (ATase) demodifiziert und aktiviert. Eine Untersuchung der Aktivitätsregulation der GS in *S. coelicolor* führte zu dem Ergebnis, dass die Modifikation der GS durch die ATase in diesem Organismus unabhängig von der Anwesenheit des P<sub>II</sub>-Proteins und der Transferase GlnD ist (Hesketh *et al.*, 2002). Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen in *E. coli*, in dem eine Regulation der Aktivität der GS nur stattfindet, wenn das P<sub>II</sub>-Protein anwesend ist. In *C. glutamicum* wurde zu Beginn dieser Arbeit vermutet, dass das P<sub>II</sub>-Protein GlnK oder die Transferase GlnD der Adenylyltransferase (ATase) den Stickstoffstatus der Zelle signalisiert, so dass die ATase darauf mit einer Modifikation bzw. Demodifikation der GS reagieren kann. Ob die Regulation der GS-Aktivität tatsächlich von der Anwesenheit des GlnK- oder GlnD-Proteins abhängig ist, wurde bislang nicht untersucht.

In einem physiologischen sowie einem unphysiologischen Test wurde die Aktivität der GS bestimmt. In einem physiologischen Glutaminsynthetase-Test werden nur die aktiven Untereinheiten der GS, das heißt die nicht durch Adenylylierung deaktivierten Untereinheiten, erfasst. Die GS katalysiert dabei die Reaktion, die sie auch *in vivo* übernimmt. Neben ihrer physiologischen Aktivität kann die GS bei der Anwesenheit von ADP und Arsenat auch die Transferreaktion von Glutamin und Hydroxylamin zu  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat katalysieren. Die physiologische Reaktion des Enzyms ist dabei vollständig inhibiert. Das entstandene Produkt  $\gamma$ -Glutamylhydroxamat kann durch einen unphysiologischen Glutaminsynthetase-Test nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität wurde im Wildtyp ATCC 13032 und in der *glnK*-Deletionsmutante NR-1 sowie der *glnD*-Deletionsmutante LN-D bestimmt. Hierfür wurden die Zellen bei guter Stickstoffversorgung, bei Stickstoffmangel und nach einem Stickstoffpuls von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 15 Minuten kultiviert und der Zelleextrakt wurde präpariert.

Im physiologischen GS-Test (Abb. 3.31A) war unter guter Stickstoffversorgung eine geringe Aktivität der GS messbar, nach Inkubation unter Stickstoffmangel stieg die Aktivität an und sank nach einem Stickstoffpuls wieder. Die GS war somit nie vollständig inhibiert, sondern katalysierte auch bei guter Stickstoffversorgung die Umsetzung von Glutamat zu Glutamin. In den Mutanten NR-1 und LN-D konnte ein vergleichbares Regulationsmuster beobachtet wer-

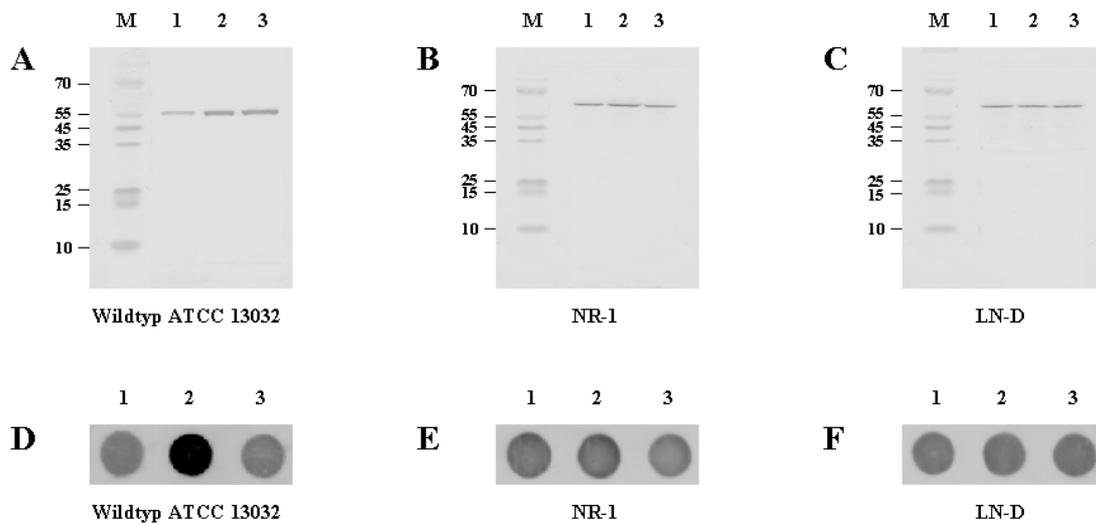
den. Die Aktivität der GS zeigte im Wildtyp jedoch eine deutlichere Steigerung unter Stickstoffmangel als in der *glnK*-Deletionsmutante NR-1 und der *glnD*-Deletionsmutante LN-D.



**Abb. 3.31: Spezifische Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) [U/mg Protein].** Ein physiologischer Glutaminsynthetase-Test (A) und ein unphysiologischer Glutaminsynthetase-Test (B) wurden durchgeführt zum Nachweis der GS-Aktivität im Zellextrakt des Wildtyps ATCC 13032 und den Deletionsmutanten NR-1 und LN-D. Die Zellen wurden kultiviert bei guter Stickstoffversorgung (schwarze Balken), bei Stickstoffmangel (graue Balken) und nach Zugabe von 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Inkubation für 15 min (weiße Balken).

Bei einer Abwesenheit von GlnK oder GlnD ist eine stickstoffabhängige Expression nicht möglich, so dass es zu keiner verstärkten Expression des *glnA*-Gens unter Stickstoffmangel kommt. RNA-Hybridisierungen zeigten bei Stickstoffmangel lediglich eine Induktion der Expression stickstoffregulierter Gene im Wildtyp, während die Signale in den Stämmen NR-1 und LN-D konstant waren (Abb. 3.32D-F). Da die GS auch unter guter Stickstoffversorgung aktiv sein muss, um eine Versorgung der Zelle mit Glutamin zu gewährleisten, ist eine schwache Regulation des *glnA*-Gens sinnvoll (Jakoby *et al.*, 1997). Dadurch wird gewährleistet, dass die Expression unter reprimierenden Bedingungen von Genen, deren Produkte auch bei guter Stickstoffversorgung essenziell sind, noch ausreichend ist. Western Blot Experimente konnten diese Beobachtungen bestätigen. Ein Antikörpernachweis des GS-Proteins zeigte, dass das GS-Protein im Wildtyp bei Stickstoffmangel synthetisiert wurde und das Signal nach einem Stickstoffpuls konstant blieb (Abb. 3.32A). Für die *glnK*-Deletionsmutante NR-1 und die *glnD*-Deletionsmutante LN-D konnte unter allen Bedingungen ein gleich starkes Signal nachgewiesen werden (Abb. 3.32B/C).

Wie in *S. coelicolor* (Hesketh *et al.*, 2002) scheint die GS-Aktivitätsregulation auch in *C. glutamicum* unabhängig von GlnK oder GlnD zu sein. Eine Signalweiterleitung von GlnK oder GlnD zur ATase ist anhand dieses Experiments unwahrscheinlich.



**Abb. 3.32: Expression von *glnA* und Synthese des Glutaminsynthetase-Proteins (GS).** A-C) Zum Nachweis des Glutaminsynthetase-Proteins im Zellextrakt des Wildtyps ATCC 13032 (A) und der Deletionsmutanten NR-1 (B) und LN-D (C) wurden Western Blot Experimente mit denaturierenden 1-D-Gelen durchgeführt. Die Zellen wurden bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 15 min (3) kultiviert (M = Prestained Proteinmarker Broad Range [kDa], MBI Fermentas, Wilna). D-F) Zum Nachweis der Expression stickstoffregulierter Gene im Wildtyp ATCC 13032 (D), in der *glnK*-Deletionsmutante NR-1 (E) und in der *glnD*-Deletionsmutante LN-D (F) wurden RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die bei guter Stickstoffversorgung (1), unter Stickstoffmangel für 1,5 h (2) und nach Zugabe von 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Inkubation für 15 min (3) kultiviert wurden. Eine Hybridisierung erfolgte mit einer *glnA*-Sonde.

Mit einem unphysiologischen Test konnte die von GlnK und GlnD unabhängige Aktivitätsregulation der GS nochmals bestätigt werden. Abbildung 3.31B zeigte, dass die Aktivität der GS in allen untersuchten Stämmen bei guter Stickstoffversorgung gering war, unter Stickstoffmangel kam es zu einem Anstieg der GS-Aktivität und nach einem Stickstoffpuls nahm die GS-Aktivität ab. Die Aktivität im Wildtyp unter Stickstoffmangel war hier deutlich höher als die Aktivität in den Mutanten NR-1 und LN-D.

Ein Vergleich der beiden Testverfahren zeigte, dass die Unterschiede zwischen den Aktivitäten unter guter Stickstoffversorgung und bei Stickstoffmangel in einem physiologischen GS-Test viel geringer waren als in einem unphysiologischen GS-Test. Außerdem nahm die GS-Aktivität unter Stickstoffmangel in einem unphysiologischen Test viel deutlicher zu als in einem physiologischen Test. Ein physiologischer GS-Test ist somit schwer mit einem unphysiologischen GS-Test zu vergleichen. Aus beiden GS-Tests wird dennoch deutlich, dass die Aktivitätsregulation der GS unabhängig ist von der Anwesenheit des GlnK- oder GlnD-Proteins. Die ATase nimmt den Stickstoffstatus der Zelle wahr und aktiviert bzw. deaktiviert dementsprechend die GS.

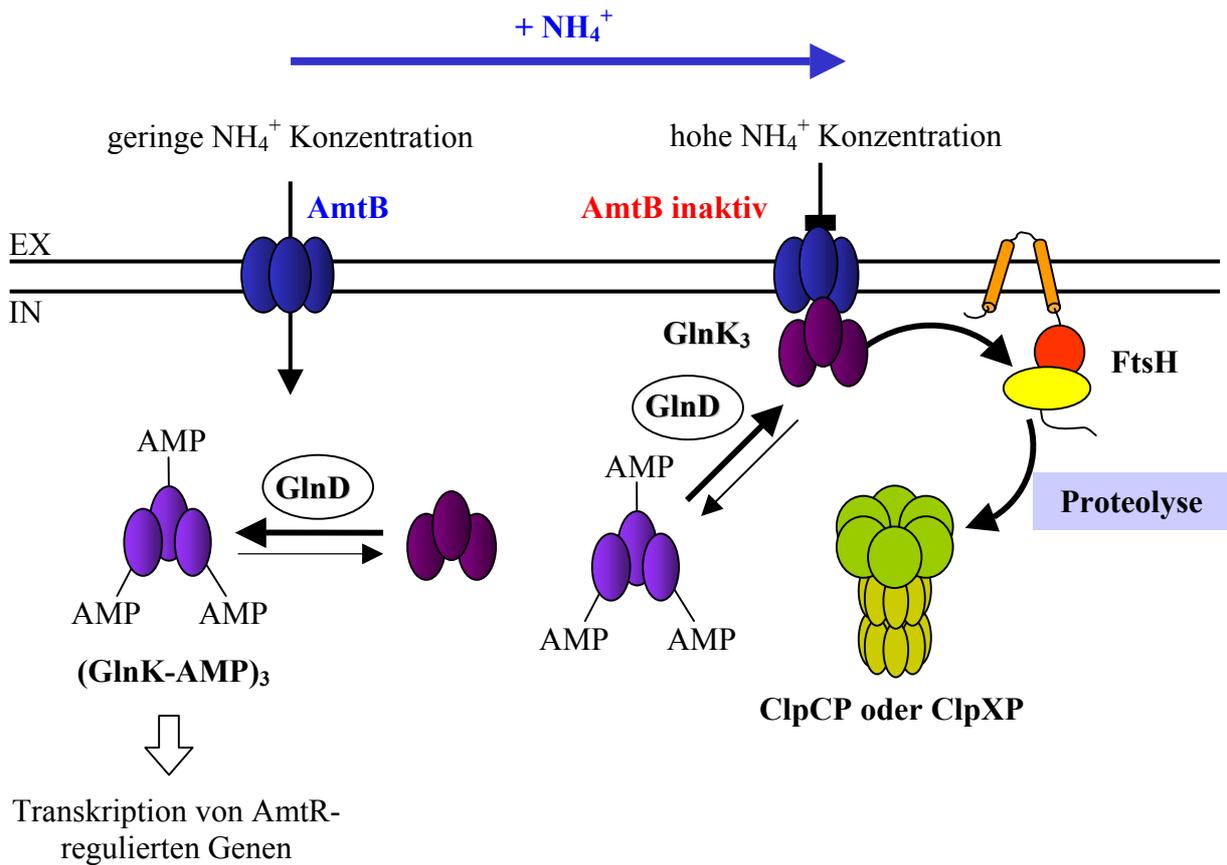
## IV. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung des GlnK-Proteins

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die GlnK-abhängige Regulation des Stickstoffmetabolismus. So ist das Modifikationsmuster von GlnK für die Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* von essenzieller Bedeutung. GlnK ist ein Signaltransduktionsprotein, das zur Familie der P<sub>II</sub>-Proteine gehört. P<sub>II</sub>-Proteine steuern die Stickstoffregulation über die Modulation der Aktivität und der Expression vieler Komponenten des Stickstoffmetabolismus. P<sub>II</sub>-Proteine sind 12 kDa groß, bilden Trimere und können als Antwort auf den Stickstoffstatus posttranslational modifiziert werden. In *E. coli* kommt es bspw. bei Stickstoffmangel zu einer Uridylylierung des P<sub>II</sub>-Proteins durch das bifunktionelle Enzym GlnD (Jiang *et al.*, 1998a), während in dem zu *C. glutamicum* nahe verwandten *S. coelicolor* eine GlnD-abhängige Adenylylierung beobachtet werden konnte (Hesketh *et al.*, 2002). Außerdem unterliegt das Protein in *S. coelicolor* nach einem Stickstoffpuls einer proteolytischen Modifizierung, indem es zu einer Abspaltung von drei Aminosäuren der N-terminalen Domäne kommt (Hesketh *et al.*, 2002). Das Gen, welches für das P<sub>II</sub>-Protein GlnK kodiert, ist in den meisten Bakterien zusammen mit einem weiteren, das für das AmtB-Ammoniumaufnahme-system kodiert, in einem Operon organisiert (Thomas *et al.*, 2000a). Eine Trimerisierung des GlnK-Proteins aus *E. coli* konnte mit Hilfe einer Kristallisation gezeigt werden (MacPherson *et al.*, 1998). Da aufgrund von Strukturanalysen auch für den Ammoniumtransporter AmtB eine trimere Struktur nachgewiesen werden konnte (Blakey *et al.*, 2002), ermöglicht die Quartärstruktur dieser beiden Proteine eine optimale Interaktion untereinander. Sowohl in *E. coli* (Coutts *et al.*, 2002) als auch in *Bacillus subtilis* (Detsch & Stülke, 2002) konnte eine Interaktion zwischen dem GlnK-Protein und dem Ammoniumtransporter AmtB mit Antikörperbindungsstudien detektiert werden.

Aufbauend auf den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnte ein Modell zur Interaktion und Proteolyse von GlnK in *C. glutamicum* aufgestellt werden, welches die Abbildung 4.1 wiedergibt: Eine Analyse der Modifikation des GlnK-Proteins mit *Magnetic Beads* unter verschiedenen Stickstoffbedingungen ergab, dass das Protein in *C. glutamicum* unter Stickstoffmangel adenylyliert wird. Die durch einen tryptischen und chymotryptischen Verdau gewonnenen Peptidspektren zeigten außerdem, dass eine proteolytische Modifikation der N-terminalen Domäne in *C. glutamicum* nicht nachgewiesen werden konnte. In *S. coelicolor* wird das GlnK-Protein durch eine Adenylylierung sowie eine proteolytische Modifikation reguliert (Hesketh *et al.*, 2002). Das modifizierte GlnK-Protein stimuliert hier im Gegensatz zur P<sub>II</sub>-abhängigen Regulation in Enterobakterien (Merrick & Edwards, 1995a) nicht die Aktivität der Glutaminsynthetase (GS), eine Beobachtung, die, wie in dieser Arbeit gezeigt,

auch in *C. glutamicum* (vgl. Punkt 4.5) gemacht wurde. Das Gen *glnK* ist in *C. glutamicum* nicht nur zusammen mit dem *amtB*-Gen, sondern auch mit *glnD* in einem Operon organisiert (Jakoby *et al.*, 1999). Eine Operonstruktur von *amtB-glnK-glnD* konnte außerdem für *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) und *S. coelicolor* (Fink *et al.*, 2002) gezeigt werden und scheint in Actinomyceten konserviert zu sein.



**Abb. 4.1: Modell zur Interaktion und Proteolyse von GlnK.** GlnK wird bei Eintreten eines Stickstoffmangels im Cytoplasma synthetisiert. Das Protein formt Homotrimere, welche unmittelbar vom GlnD-Protein adenyliert werden. Das vollständig adenylierte GlnK-Protein interagiert mit dem globalen Repressorprotein AmtR, welches dann die Transkription stickstoffabhängiger Gene freigibt (vgl. Punkt 4.2). Ein plötzlicher Ammoniumpuls hat die sofortige Deadenylierung von GlnK durch das GlnD-Protein zur Folge. Unmodifizierte Trimere können nicht mehr an AmtR binden, so dass die Transkription gestoppt wird (vgl. Punkt 4.2). Statt dessen erfolgt eine Bindung an AmtB, wodurch eventuell wie in *E. coli* die Transportaktivität reduziert wird (Coutts *et al.*, 2002). Außerdem leitet die Membranbindung eine sequenzielle Proteolyse des GlnK-Proteins ein, in welche neben der membran- gebundenen FtsH-Protease auch die ClpCP- und ClpXP-Proteasekomplexe involviert sind. So kann die Signalkaskade der Stickstoffkontrolle bei Bedarf schnell und gezielt abgeschaltet werden.

Für die Adenylierung von GlnK unter Stickstoffmangel und die Deadenylierung nach einem Stickstoffpuls ist in *C. glutamicum* wie in *E. coli* (Jiang *et al.*, 1998a) und *S. coelicolor* (Hesketh *et al.*, 2002) das bifunktionelle Enzym GlnD verantwortlich. Durch Western Blot

Analysen konnte gezeigt werden, dass Plasmid-kodiert exprimiertes GlnK in der *glnD*-Deletionsmutante LN-D nicht mehr modifiziert werden konnte. Die Untersuchung eines verkürzten GlnD-Proteins, das nur noch die adenylylierende Funktion übernehmen konnte, ergab, dass GlnK unter Stickstoffmangel zwar adenylyliert wurde, es nach einem Stickstoffpuls jedoch nicht mehr zu einer Demodifizierung kam. Eine direkte Interaktion der Proteine GlnK und GlnD konnte mit *Pull-Down* Analysen mit Hilfe eines Nickel-NTA-Systems sowie mit *Two-Hybrid* Assays bestätigt werden. Im Gegensatz zu der konstitutiven stickstoffunabhängigen Expression des *glnD*-Gens in *E. coli* (van Heeswijk *et al.*, 1996) und *K. pneumoniae* (Merrick & Edwards, 1995b) wird die Expression des *glnD*-Gens in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung durch AmtR reguliert und steht damit unter Stickstoffkontrolle (Nolden *et al.*, 2001b). Eine stickstoffabhängige Expression des *amtB-glnK-glnD*-Operons konnte ebenfalls für *S. coelicolor* gezeigt werden (Fink *et al.*, 2002), die erneut die enge Verwandtschaft dieser beiden Organismen unterstreicht. In *C. glutamicum* wird die Expression des *amtB-glnK-glnD*-Operons über eine Repression reguliert (Jakoby *et al.*, 2000) und in *S. coelicolor* führt Stickstoffmangel zu einer Aktivierung der Transkription des *amtB-glnK-glnD*-Operons (Fink *et al.*, 2002).

Das Modifikationsmuster von GlnK zeigt, dass das Protein unter guter Stickstoffversorgung in sehr geringen Mengen in der demodifizierten Form nachweisbar ist; unter Stickstoffmangel wird GlnK verstärkt synthetisiert und durch die Transferase GlnD adenylyliert. Nach einem Stickstoffpuls erfolgt eine Demodifizierung ebenfalls durch das GlnD-Protein und GlnK liegt erneut deadenylyliert vor. Das GlnK-Protein bildet ein Homotrimer, das sich aus drei identischen Monomeren zusammensetzt. Antikörperbindungsstudien mit GlnK zeigten für die Auftrennung des Gesamtproteoms auf nativen Gelen alle Modifizierungsstadien des GlnK-Proteins. Unter Stickstoffmangel liegt das Protein mit drei AMP-Resten vollständig adenylyliert vor, während ein Stickstoffpuls zu einer Abspaltung aller AMP-Reste führt.

Wie bereits angesprochen, befindet sich das Gen für das Ammoniumaufnahmesystem AmtB im gleichen Operon wie *glnK* und *glnD*, so dass eine Interaktion zwischen dem GlnK-Protein und dem AmtB-Transporter, wie sie zuerst für *E. coli* gezeigt wurde (Coutts *et al.*, 2002), auch in *C. glutamicum* wahrscheinlich war. Western Blot Experimente bestätigten eine solche Interaktion. Eine Isolierung des GlnK-Proteins aus der Membranfraktion und eine anschließende Analyse über MALDI-TOF-MS ergaben, dass es sich bei dem isolierten Protein um das demodifizierte GlnK handelte. In der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 konnten in der Membranfraktion keine Signale nachgewiesen werden, so dass aufgrund der vorliegenden Ergebnisse von einer Interaktion zwischen dem GlnK-Protein und dem Ammoniumtransporter AmtB ausgegangen wird. Die Bedeutung einer Interaktion zwischen GlnK und AmtB konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. In *E. coli* wird durch die Bindung des GlnK-Proteins die Aktivität des Transporters herabgesetzt. GlnK fungiert hierbei

als negativer Regulator des AmtB-Transporters. Eine ähnliche Funktion des GlnK-Proteins wäre ebenfalls für *C. glutamicum* denkbar. Hierfür sprechen die Ergebnisse aus Western Blot Experimenten, in denen deutlich wurde, dass die Bindung zwischen GlnK und AmtB reversibel ist. Eine Verschiebung der Lokalisierung von GlnK vom Cytoplasma zur Membran nach einem Stickstoffpuls ist durch einen Stickstoffmangel wieder aufhebbar, so dass sich GlnK von AmtB löst und in das Cytoplasma zurückkehren kann. Für eine Interaktion der Proteine GlnK und AmtB ist in *E. coli* die im Cytoplasma lokalisierte C-terminale Domäne des Transporters essenziell (Coutts *et al.*, 2002). Vergleichende Experimente stehen in *C. glutamicum* noch aus.

Außerdem zeigte sich in der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 eine signifikant schnellere Demodifizierung von GlnK durch GlnD. Dies steht im Gegensatz zu *E. coli*, in dem eine langsamere Demodifizierung von GlnK nach einem Stickstoffpuls detektiert werden konnte, wenn der AmtB-Transporter fehlte (Coutts *et al.*, 2002). Dies macht Sinn, da AmtB in *E. coli* als Ammoniumsensor diskutiert wird (Javelle *et al.*, 2004). In *C. glutamicum* konnte bislang keine Erklärung für dieses abweichende Modifikationsmuster gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Affinitäten zwischen den einzelnen Proteinen unterschiedlich sind. So könnte es bspw. nach einem Stickstoffpuls zu einer schwachen Bindung zwischen modifiziertem GlnK und AmtB kommen, wie für *E. coli* gezeigt werden konnte (Coutts *et al.*, 2002). Dies könnte zu einer Verschiebung der Lokalisation des GlnK-Proteins führen und das zu GlnK weniger affine GlnD müsste erst Kontakt mit der Membran aufnehmen, um GlnK zu demodifizieren. Ein Fehlen des Transporters würde so eine Demodifikation von GlnK durch GlnD beschleunigen. Für eine Bindung von GlnK und AmtB ist das GlnD-Protein nicht essenziell, wie Western Blot Analysen in der *glnD*-Deletionsmutante LN-D, die Plasmid-kodiert das *amtB*- und *glnK*-Gen exprimiert, zeigten. So war GlnK auch in Abwesenheit von GlnD in der Membranfraktion nachweisbar. In diesem und weiteren Überexpressionsversuchen mit nicht modifizierbarem GlnKY51F konnte eine Interaktion von GlnK und AmtB sogar bei Stickstoffmangel detektiert werden. Die Affinität von demodifiziertem GlnK-Protein ist anscheinend so hoch, dass eine Interaktion unabhängig vom Stickstoffstatus der Zelle zu beobachtet ist. Ein Austausch an Position 51 von Tyrosin gegen Phenylalanin hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit AmtB.

Untersuchungen der *amtA*-Deletionsmutante MJ2-38 zeigten, dass die Lokalisierung von GlnK in der Zelle nur von AmtB nicht aber von AmtA abhängt. Die Aktivität des AmtA-Transporters wird somit nicht durch eine Interaktion mit dem P<sub>II</sub>-Protein GlnK moduliert. Eine Reduktion der Transportaktivität ist jedoch essenziell, um einen "futile cycle" zu verhindern. Jakoby *et al.* (1997) konnten eine direkte Bindung von Glutamin an den AmtA-Transporter, wie sie für einige Ammoniumaufnahmesysteme beschrieben wurde (Kleiner & Castorph, 1982; Jayakumar *et al.*, 1986; Kleiner, 2000), bereits ausschließen, zeigten jedoch, dass in

einer *glnA*-Deletionsmutante keine (Methyl-)Ammoniumaufnahme mehr nachweisbar war. Aus weiteren Experimenten wurde vermutet, dass eine regulatorische Protein-Protein-Interaktion zwischen der Glutaminsynthetase (GS) und dem AmtA-Transporter besteht, die die Aktivität des AmtA-Transporters induziert (Jakoby *et al.*, 1997). Ein Antikörpernachweis mit dem GS-Protein im Wildtyp zeigte, dass die GS zwar in der Membranfraktion in geringen Spuren detektierbar war, eine regulatorische Funktion der Membranbindung aber nur schwer denkbar ist. Das gleiche Expressionsmuster konnte auch für die *amtA*-Deletionsmutante MJ2-38, den *amtB*-Deletionsstamm LN-1.1 und die Doppelmutante JS-1 nachgewiesen werden, so dass eine Interaktion der GS mit einem der beiden Transporter aufgrund dieser Ergebnisse nicht bestätigt wurde.

Lokalisierungsstudien des GlnK-Proteins zeigten nicht nur eine Interaktion mit dem Ammoniumtransporter AmtB, sondern zusätzlich eine Proteolyse von GlnK. Die GlnK-Menge im Wildtyp reduzierte sich nach einem Stickstoffpuls innerhalb weniger Minuten auf ca. 10% im Vergleich zu Stickstoffmangelbedingungen. Eine stickstoffabhängige Proteolyse stellt eine neue Form der Regulation dar, wie sie in anderen Bakterien bisher nicht beobachtet werden konnte. Dieser *C. glutamicum*-spezifische Mechanismus steht im Gegensatz zu *E. coli* (Coutts *et al.*, 2002; Blauwkamp & Ninfa, 2002) und *S. coelicolor* (Hesketh *et al.*, 2002), in denen GlnK über einen längeren Zeitraum stabil bleibt. In der *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 war kein Abbau des Proteins nachweisbar, so dass die AmtB-abhängige Bindung von GlnK an die Membran für eine Proteolyse des Proteins notwendig sein könnte. Da die Expressionsmuster für den Wildtyp und die *amtB*-Mutante LN-1.1 identisch waren, konnte eine reduzierte Proteinmenge im Wildtyp auch nicht mit einer unterschiedlichen Genexpression erklärt werden (Strösser *et al.*, 2004).

Eine AmtB-abhängige Proteolyse nach einem Stickstoffpuls führt zu einer Verschiebung des GlnK-Pools vom Cytoplasma zur Membran, so dass GlnK fast vollständig aus dem Cytoplasmapool verschwindet. Dass eine Proteolyse von GlnK spezifisch für dieses Protein ist, zeigten Antikörperbindungsstudien mit unterschiedlich lokalisierten Proteinen. Neben der Glutaminsynthetase als einem weiteren Protein des Stickstoffmetabolismus wurde die Enolase als ein cytoplasmatisches Protein und die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase als ein membranassoziiertes Protein untersucht. Diese Proteine waren nach einem Stickstoffpuls stabil, so dass die Proteolyse von GlnK kein generelles Phänomen darstellt. Western Blot Experimente machten deutlich, dass ein Abbau von GlnK durch die regulatorischen ATPase Untereinheiten ClpC und ClpX, die heptamere proteolytische Untereinheit ClpP1P2 und die membranassoziierte Protease FtsH beeinflusst wird. Diese komplexe Proteolyse erscheint sinnvoll, da GlnK an AmtB gebunden sein muss, um abgebaut zu werden. Die FtsH-Protease befindet sich als membranständige Protease in direkter Nachbarschaft zum AmtB-Transporter und könnte ein Bindeglied zwischen GlnK und dem cytoplasmatischen Clp-

Protease-Komplex bilden. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten, wie ein Abbau des GlnK-Proteins ablaufen kann. Einerseits könnte die FtsH-Protease zunächst eine "Markierungsfunktion" übernehmen, so dass GlnK über eine proteolytische Modifikation so verändert wird, dass die weiteren ClpCP- und ClpXP-Proteasen den Geamtabbau des Proteins durchführen. Andererseits könnte es zu einem Multi-Protein-Komplex kommen, indem alle drei Proteasen zusammen das GlnK-Protein abbauen und keine Intermediate detektierbar sind. Eine Isolierung des GlnK-Proteins aus den einzelnen Protease-Mutanten und eine anschließende Analyse über MALDI-TOF-MS zeigten keine nachweisbaren Zwischenprodukte der GlnK-Proteolyse. GlnK konnte nach einem Stickstoffpuls in allen Mutanten in der deadenylierten Form detektiert werden und wurde nicht durch z.B. eine Methylierung, Phosphorylierung oder eine proteolytische Modifikation verändert. Dass mehrere Proteasen für den Abbau eines Substratproteins verantwortlich sind, ist für Bakterien nicht ungewöhnlich. So wird in *E. coli* bspw.  $\sigma^{32}$  von den ATP-abhängigen Proteasen FtsH, Lon, ClpAP und HslUV abgebaut (Kanemori *et al.*, 1997). Außerdem konnte ebenfalls für *E. coli* gezeigt werden, dass die Proteolyse einer Vielzahl von Proteinen sowohl von ClpAP als auch von ClpXP abhängt (Weichart *et al.*, 2003). In Antikörperbindungsstudien mit dem ClpP1-Protein zeigte eine Lokalisierung der proteolytischen Untereinheit, dass der Clp-Protease-Komplex, anders als bisher aufgrund seiner Funktion angenommen, auch in der Membranfraktion nachgewiesen wurde. Der Abbau des GlnK-Proteins wird demnach von den Clp-Protease-Komplexen ClpCP und ClpXP sowie der membranständigen Protease FtsH beeinflusst und läuft wahrscheinlich an der Membran ab.

#### **4.2 Expressionsregulation durch AmtR**

Globale regulatorische Netzwerke ermöglichen eine optimale Anpassung der Mikroorganismen an die veränderten Umweltbedingungen z.B. an eine Stickstofflimitation, indem die Expression von Genen, deren Genprodukte in dieser Situation benötigt werden, gemeinsam reguliert wird. Verschiedene Mechanismen der Stickstoffkontrolle konnten schon für die Modellorganismen *E. coli* oder *B. subtilis* entschlüsselt werden. Bisherige Untersuchungen der Stickstoffkontrolle von *C. glutamicum* zeigten, dass sich die Stickstoffregulation in diesen Bakterien stark von der in *E. coli* bzw. *B. subtilis* unterscheidet (Burkovski, 2003a,b). So werden z.B. stickstoffregulierte Gene in *C. glutamicum* nicht wie in Enterobakterien über ein 2-Komponentensystem (Merrick & Edwards, 1995a) oder wie in *B. subtilis* über mehrere Transkriptionsfaktoren (Fisher & Sonenshein, 1991), sondern durch das globale Repressorprotein AmtR reguliert (Jakoby *et al.*, 2000). Durch Aminosäuresequenzvergleiche konnte eine Ähnlichkeit des Repressors AmtR zu anderen Mitgliedern der TetR-/ArcR-Familie von Transkriptionsregulatoren nachgewiesen werden (Jakoby *et al.*, 2000).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen neben einer Charakterisierung des GlnK-Proteins Untersuchungen zur Expressionsregulation durch AmtR. Der Repressor AmtR reprimiert unter guter Stickstoffversorgung die Expression von mindestens 36 Genen. Zu diesen zählen neben Enzymen zur Stickstoffmetabolisierung eine große Anzahl von Transportproteinen zur Aufnahme alternativer Stickstoffquellen. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass für eine Derepression AmtR-kontrollierter Gene bei Stickstoffmangel GlnK und GlnD essenziell sind, so dass in *glnD*- und *glnK*-Deletionsmutanten bei Stickstoffmangel keine Expressionszunahme mehr detektierbar war (Nolden *et al.*, 2001b). Mit *Two-Hybrid* Assays wurde zunächst eine dimere Struktur des AmtR-Proteins bestätigt. In weiteren *Pull-Down* Analysen und Gelretardationsexperimenten konnte dann eine direkte Interaktion zwischen dem GlnK-Protein und dem Repressor AmtR nachgewiesen werden. Die durch einen tryptischen Verdau in MALDI-TOF-MS Analysen erhaltenen Peptidspektren zeigten, dass ausschließlich die adenylylierte Form des GlnK-Proteins mit AmtR interagiert. Die demodifizierte Form von GlnK konnte nicht mit AmtR co-eluiert werden. Das GlnK-Protein in *C. glutamicum* ist demnach in der Lage, mit der Transferase GlnD, dem Ammoniumtransporter AmtB und dem Repressor AmtR zu interagieren.

In *E. coli* existieren zwei  $P_{II}$ -ähnliche Proteine, GlnK und GlnB, von denen jedes das Fehlen des anderen kompensieren kann (Atkinson & Ninfa, 1998). Das GlnK-Protein in *C. glutamicum* ist essenziell für die zelluläre Antwort auf Stickstoffmangel. Da die Expression des *glnK*-Gens bei guter Stickstoffversorgung durch AmtR reprimiert wird, ist der Level an Signaltransduktionsprotein unter diesen Bedingungen extrem gering. Dieses Regulationsverhalten stellt einen deutlichen Unterschied zu *E. coli* dar, bei dem die Expression des *glnB*-Gens konstitutiv erfolgt und nur die Expression des *glnK*-Gens unter Stickstoffmangel induziert wird (Atkinson & Ninfa, 1998).

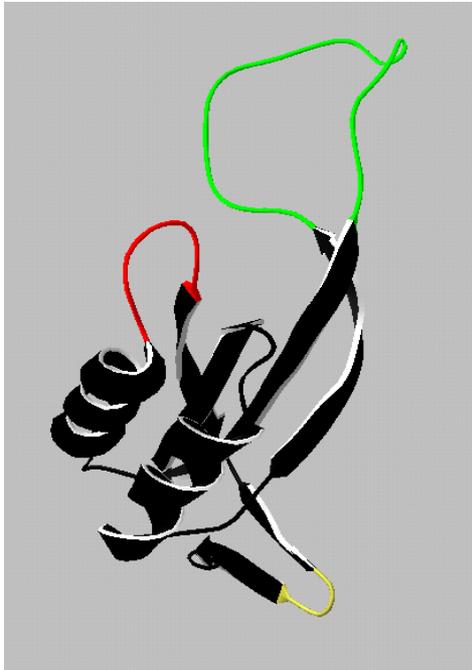
In *E. coli* wird dem T-Loop der  $P_{II}$ -Proteine eine besondere Bedeutung zugewiesen, da er durch die Ausbildung verschiedener Sekundärstrukturen unterschiedliche Interaktionspartner binden kann (Kamberov *et al.*, 1995). So kommt es bspw. in *E. coli* zu einer Interaktion der  $P_{II}$ -Proteine mit der Adenylyltransferase (van Heeswijk *et al.*, 1996), mit der Sensorkinase NtrB (Jiang & Ninfa, 1999) und dem Ammoniumtransporter AmtB (Coutts *et al.*, 2002). In *Rhodobacter capsulatus* konnte eine Interaktion von  $P_{II}$ -Proteinen mit dem Nitrogenase-System DraT/DraG, NtrB und dem NifA1/A2-System (Hallenbeck, 1992; Pawlowski *et al.*, 2003) gezeigt werden, während in *Azotobacter vinelandii* eine Interaktion von  $P_{II}$  mit dem NifA-NifL-System berichtet wurde (Little *et al.*, 2000). Für *S. elongatus* konnte vor kurzem eine Wechselwirkung von  $P_{II}$  und einem Protein der Argininsynthese N-Acetyl-L-Glutamatkinase bestätigt werden (Heinrich *et al.*, 2004). Dies unterstreicht nochmals eindrucksvoll die Schlüsselfunktion der  $P_{II}$ -Proteine im Stickstoffmetabolismus und die Bedeutung des T-Loops innerhalb der GlnK-Struktur (vgl. Punkt 4.3).

Eine nähere Charakterisierung der Komponenten des *amtB-glnK-glnD*-Operons zeigte, dass eine Überexpression von *glnK*, *glnD*, *glnK-glnD* oder des gesamten Operons weder einen Einfluss auf die Expression AmtR-kontrollierter Gene hatte, noch das stickstoffabhängige Modifikationsmuster von GlnK beeinflusste. Dies steht im Widerspruch zu früheren Experimenten, in denen eine Überexpression von *glnK* und *glnD* zu einer leichten Deregulation und eine Überexpression des gesamten Operons zu einer vollständigen Deregulation auf Expressionsebene führte (Nolden *et al.*, 2001b). Diese Ergebnisse deuteten zunächst daraufhin, dass die Transferase GlnD nicht der Sensor des Stickstoffstatus sein kann, da eine Deregulation bei einer Überexpression des Sensorproteins keinen regulatorischen Nutzen hätte. Das *amtB-glnK-glnD*-Operon wurde jedoch so konstruiert, dass der Promotor des Operons auf dem Plasmid noch vorhanden war. Eine Erhöhung der Kopienzahl an Bindemotiven vor AmtR-regulierten Genen führte daher zu einer Austitrierung des Repressors, die eine deregulierte Expression zur Folge hatte. Um diesen Störeffekt auszuschließen, erfolgte eine Überexpression in diesem Versuch unter der Kontrolle des Plasmid-kodierten Promotors. Der von Nolden *et al.* (2001b) beobachtete Effekt konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr deutet eine intakte Stickstoffkontrolle darauf hin, dass das GlnD-Protein wie in *E. coli* (Merrick & Edwards, 1995a) als Sensorprotein fungieren könnte, indem es den Stickstoffstatus der Zelle wahrnimmt und weiterleitet. In Northern Blot Analysen konnte für das *amtB-glnK-glnD*-Operon nur ein gemeinsames Transkript nachgewiesen werden, dessen Expression der Stickstoffkontrolle unterliegt.

### 4.3 Ortsgerichtete Mutagenese des *glnK*-Gens

In *E. coli* konnte eine Bindung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP an die P<sub>II</sub>-Proteine GlnB und GlnK gezeigt werden. Die Bindung dieser beiden Effektormoleküle ist kooperativ und erfolgt an allen Untereinheiten (Kamberov *et al.*, 1995). Eine Bindung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP erleichtert eine Interaktion des GlnD-Proteins mit GlnB und GlnK, die bei Stickstoffmangel zu einer Modifizierung der P<sub>II</sub>-Proteine führt (Jiang *et al.*, 1998a). P<sub>II</sub>-Proteine sind aus verschiedenen Loops aufgebaut. So ist in *E. coli* der hochkonservierte B-Loop (Aminosäuren 81-88) für eine Bindung des Effektormoleküls ATP wichtig, während der C-Loop (Aminosäuren 101-105) zu einer Stabilisierung aller gebundenen Moleküle führt. Der T-Loop (Aminosäuren 36-55) enthält die Stelle an der das Protein kovalent modifiziert wird und ist außerdem für die Bindung von Interaktionspartnern und des Effektormoleküls  $\alpha$ -Ketoglutarat wichtig (Jiang *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998). Der in den meisten Bakterien variable T-Loop kann durch seine hohe Beweglichkeit unterschiedliche Sekundärstrukturen annehmen (Ninfa & Atkinson, 2000).

Ausgehend von der *E. coli* GlnK-Struktur wurden Aminosäuren in *C. glutamicum* GlnK (Abb. 4.2) durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht. Die Experimente zeigten, dass Aminosäureaustausche im T-Loop zu einer erhöhten Stabilität des GlnK-Proteins und einer reduzierten oder fehlenden Interaktion mit AmtB führten. Da eine Proteolyse von GlnK nur



**Abb. 4.2: GlnK-Strukturvorhersage.** Der B-Loop ist rot dargestellt, der C-Loop in gelb und der T-Loop in grün. Die dreidimensionale Struktur des GlnK-Proteins wurde mit den Programmen SWISS-prot TrEMBLE und SWISS-model database anhand der Aminosäuresequenz entworfen und bearbeitet und über den SWISS-Pdb viewer 3.7 dargestellt.

stattfindet, wenn das Protein an AmtB gebunden ist, kommt es bei einer fehlenden Membranbindung offensichtlich zu einer Stabilisierung des GlnK-Pools im Cytoplasma.  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP stimulieren in *E. coli* eine Modifikation von GlnK durch GlnD. An einer Bindung von GlnD an GlnK sind alle Loops beteiligt (Kamberov *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1998a). Auch in *C. glutamicum* scheinen der B-, der C- und der T-Loop eine Interaktion zwischen GlnK und GlnD zu beeinflussen. So führte ein Austausch von Glycin im T-Loop an Position 41 dazu, dass unter Stickstoffmangel nicht die gesamte GlnK-Menge adenylyliert wurde. Das gleiche Proteinmuster konnte auch nach einem Austausch im B-Loop bspw. von Glycin an Position 84 oder im C-Loop z.B. von Arginin an Position 103 beobachtet werden. An einer Bindung von ATP sind in *E. coli* die im C-Loop lokalisierten Argininreste 101 und 103 beteiligt (Xu *et al.*, 2001). In *C. glutamicum* beeinflussen diese beiden Reste eine Modifikation bzw. Demodifikation von GlnK, so dass diese wie

in *E. coli* über eine Bindung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP moduliert werden könnte. Eine direkte Bindung der beiden Effektoren an GlnK könnte in weiteren Experimenten durch den Einsatz von  $\alpha$ -Ketoglutarat und ATP als radioaktive Marker untersucht werden. Eine alternative Möglichkeit bieten außerdem Gleichgewichtsdialysen, in denen eine Bindung von Effektoren an das GlnK-Protein in der modifizierten und demodifizierten Form getestet werden könnte. Aminosäureaustausche im T-Loop von *C. glutamicum* GlnK führten zu einer fehlenden Membranbindung, einer erhöhten Proteinstabilität und einer Änderung des Modifikationsmusters von GlnK. Eine dreidimensionale Strukturvorhersage des GlnK-Proteins, die anhand der Aminosäuresequenz entwickelt wurde, verdeutlicht, dass der T-Loop eine besondere Stellung innerhalb der GlnK-Struktur einnimmt (Abb. 4.2).

#### 4.4 Sensoreigenschaften von Amt-Proteinen

Die Familie der Amt-Proteine besteht aus hoch-affinen Ammoniumtransportern, die die Aufgabe haben, Ammonium zu binden und in die Zelle zu transportieren. Für *S. cerevisiae* (Lorenz & Heitman, 1998) und *R. capsulatus* (Yakunin & Hallenbeck, 2000) wird eine Sensorfunktion der Amt-Proteine diskutiert. *S. cerevisiae* (MEP1; Marini *et al.*, 1994) war neben *Arabidopsis thaliana* (AMT1; Ninnemann *et al.*, 1994) einer der ersten Organismen, in denen Ammoniumtransporter isoliert und kloniert werden konnten. In *S. cerevisiae* wurden drei für Ammonium affine Transporter charakterisiert, MEP1, MEP2 und MEP3 (Dubois & Grenson, 1979; Marini *et al.*, 1994). Bei schlechter Ammoniumverfügbarkeit wachsen die diploiden Hefezellen in die Länge und bilden Filamente (Gimeno *et al.*, 1992), was den Zellen eine bessere Nährstoffversorgung ermöglicht. Für die Filamentbildung ist der MEP2-Transporter essenziell (Lorenz & Heitman, 1998), indem er als Ammoniumsensor das Ammonium extrazellulär durch einen in allen Ammoniumtransportern konservierten Aspartatrest bindet und anschließend in die Zelle transportiert (Thomas *et al.*, 2000b). In *E. coli* wirkt das integrale Membranprotein AmtB als Sensor der extrazellulären Ammoniumkonzentration (Javelle *et al.*, 2004). Ein Austausch von Aspartat an Position 182 führt zu einer reduzierten Transportaktivität und einer verzögerten Signalweiterleitung, so dass die Aminosäure 182 als Bindestelle für Ammonium diskutiert wird (Javelle *et al.*, 2004). Wie direkte Messungen zeigten, erfolgt in *C. glutamicum* ein Abfall der intrazellulären Ammoniumkonzentration nach Eintreten von Stickstoffmangel im gleichen Zeitfenster wie eine Antwort auf Expressionsebene (Nolden *et al.*, 2001b). Demnach könnte die extra- oder intrazelluläre Ammoniumkonzentration ein Marker für den Stickstoffstatus der Zelle sein. So war die Untersuchung einer möglichen Sensorfunktion der Amt-Proteine in *C. glutamicum* ein weiteres Ziel dieser Arbeit. *C. glutamicum* besitzt im Gegensatz zu *E. coli* zwei Amt-Proteine, die beide eine Sensorfunktion übernehmen könnten.

Ein "Ammonium-Sensing" wurde im Wildtyp und den Transporter-Mutanten von AmtA und AmtB (MJ2-38, LN-1.1 und JS-1) auf Expressionsebene und Aktivitätsebene untersucht. Für die RNA-Hybridisierungen wurde eine Ammoniumkonzentration von 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingesetzt, so dass die Expression stickstoffregulierter Gene durch Ammonium zunächst reprimiert und nach dem Verbrauch des Ammoniums im Medium wieder induziert wird. Hier muss jedoch beachtet werden, dass die Signale in Dot Blot Experimenten nicht zwangsläufig eine zeitliche Abhängigkeit der Expression darstellen müssen, da die RNA-Halbwertszeiten unbekannt sind und sich in den untersuchten Stämmen unterscheiden können. Eine Expression AmtR-kontrollierter Gene sollte in der Doppelmutante JS-1 ständig induziert sein, wenn Ammonium intern oder extern ein Signal auslöst, an dessen Weiterleitung der AmtA- und/oder AmtB-Transporter beteiligt ist. In den untersuchten Stämmen waren die Expressionsmuster jedoch nahezu identisch, so dass keine Sensorfunktion der Amt-Proteine

mit dieser Methode gezeigt werden konnte. Da AmtA und AmtB aufgrund der bisherigen Untersuchungen die einzigen Transporter sind, durch die Ammonium in die Zelle aufgenommen werden kann, muss Ammonium auch bei sehr niedrigen Konzentrationen in Form von Ammoniak in die Zelle diffundieren und ein Signal auslösen oder die externe Ammoniumkonzentration wird von einem noch unbekanntem Sensor gemessen und das Signal in die Zelle weitergeleitet.

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein ähnlicher Versuch auf Proteinebene durchgeführt. Antikörperbindungsstudien im Wildtyp und in den Transporter-Mutanten (MJ2-38, LN-1.1 und JS-1) zeigten, dass eine Regulation auf Proteinebene bereits bei viel niedrigeren Ammoniumkonzentrationen beobachtet werden konnte als auf Expressionsebene. Das könnte an einer sehr hohen RNA-Stabilität liegen, die den Bakterien als weiterer Mechanismus der Genregulation eine Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen durch eine Veränderung der RNA-Halbwertszeiten erlaubt (Régnier *et al.*, 2000). Über einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  Ammoniumsulfat konnte ein Unterschied im Modifikationsmuster von GlnK detektiert werden. Im Wildtyp und der *amtA*-Mutante MJ2-38 konnte eine Demodifizierung des GlnK-Proteins nach einem Stickstoffpuls sowie eine Adenylylierung nach einem Verbrauch des Ammoniums beobachtet werden. In der *amtB*-Mutante LN-1.1 und der Doppelmutante JS-1 konnte eine Stickstoffantwort im gleichen Zeitfenster detektiert werden, die Deadenylylierung war hier jedoch signifikant schneller. Für einen Stickstoffpuls unter 400  $\mu\text{M}$  Ammoniumsulfat waren die Proteinmuster für die untersuchten Stämme gleich und eine schnellere Deadenylylierung von GlnK in den *amtB*-Mutanten konnte nicht beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen muss gefolgert werden, dass die *amtB*-Mutanten LN-1.1 und JS-1 in der Lage sind, auf verschiedene Ammoniumkonzentrationen mit unterschiedlichen Modifikationsmustern von GlnK zu reagieren. Eine kontinuierliche Fermentation, die eine konstante Ammoniumkonzentration im Medium gewährleistet, könnte zu einem Verständnis des Modifikationsmusters von GlnK unter niedrigen Ammoniumkonzentrationen beitragen. Eine Sensorfunktion der Ammoniumtransporter AmtA und AmtB in *C. glutamicum* konnte innerhalb dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

#### **4.5 Einfluss möglicher Metabolite auf die Stickstoffkontrolle**

Ammonium ist eine für viele Organismen nutzbare Stickstoffquelle und bildet die Ausgangsbasis zur Herstellung anderer stickstoffhaltiger Verbindungen. So wird Ammonium bei hohen Konzentrationen über die Glutamatdehydrogenase (GDH) assimiliert, während eine Assimilation bei niedrigen Konzentrationen über den energieaufwendigen Weg aus der Glutaminsynthetase (GS) und der Glutamatsynthase (GOGAT) abläuft (Tesch *et al.*, 1999). Je nach Verfügbarkeit der Substrate werden zur Aufnahme und Assimilation spezifische

Transportsysteme und Enzyme eingesetzt, deren Synthese und Aktivierung einer strikten Regulation unterliegen. *C. glutamicum* ist in der Lage, verschiedene Stickstoffquellen zu nutzen. Wachstumsversuche zeigten, dass die Zellen auf Harnstoff ebenso gut wuchsen, wie auf der bevorzugten Stickstoffquelle Ammoniumsulfat, während die Zellen auf Creatinin und Glutamin langsamer wuchsen. Ein sehr schlechtes Wachstum zeigten die Zellen auf Glutamat; Methylammonium und N-Acetylglukosamin konnten nicht als Stickstoffquellen genutzt werden. Die Ergebnisse aus den Experimenten zur Signalaufnahme und Signalweiterleitung sind in Abbildung 4.3 zusammengefasst.

Die Regulation der Stickstoffkontrolle erfolgt auf Expressionsebene sowie auf Proteinaktivitätsebene nach einem Harnstoff- und Creatininpuls in gleicher Weise wie nach einem Puls mit Ammoniumsulfat, so dass Ammonium als Metabolit den Stickstoffstatus der Zelle signalisieren könnte. Die Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass die interne Konzentration von Ammonium wahrgenommen wird und nicht die externe, da Harnstoff und Creatinin für eine Assimilierung erst in die Zelle aufgenommen werden müssen. Dort wird der Harnstoff durch die Urease in Kohlendioxid und Ammoniak gespalten (Beckers *et al.*, 2004), während das aufgenommene Creatinin durch die Creatinindeaminase zu Methylhydantoin und Ammonium umgesetzt wird (Bendt *et al.*, 2004). Ein Glutamatpuls zeigte, dass Glutamat als alleinige Stickstoffquelle offenbar nicht ausreicht, da das für die Zellwandsynthese essenzielle Glutamin wegen des fehlenden Ammoniums nicht gebildet werden kann. Ein ähnliches Bild ergab sich für einen Methylammoniumpuls. Methylammonium wird zwar in die Zelle transportiert, kann dort jedoch nicht weiterverwertet werden. Nach einem Glutaminpuls zeigten die Zellen zwar ein exponentielles Wachstum, eine Regulation auf Expressionsebene konnte aber nicht festgestellt werden, während eine Regulation auf Aktivitätsebene verzögert ablief. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis dafür, dass nicht Glutamin sondern Ammonium den Stickstoffstatus der Zelle signalisiert. Dies steht im Gegensatz zur Situation in *Salmonella typhimurium* (Ikeda *et al.*, 1996), *K. pneumonia* (Schmitz, 2000) und *B. subtilis* (Hu *et al.*, 2000) in denen Glutamin bzw. Glutamat interne Marker für die Stickstoffversorgung der Zelle darstellen.

Unter guter Stickstoffversorgung katalysiert die Glutamatdehydrogenase (GDH) die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Ammonium zu Glutamat. Eine Deletion des *gdh*-Gens führte bereits bei diesen Bedingungen zu einer Derepression stickstoffregulierter Gene. Dieser Effekt ist mit einer Veränderung der  $\alpha$ -Ketoglutaratpools erklärbar. Unter guter Stickstoffversorgung konnte in der Mutante LN $\Delta$ GDH ein Anstieg von  $\alpha$ -Ketoglutarat gezeigt werden, da dieses ohne die fehlende GDH nicht umgesetzt werden kann (T. Müller, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung). Bei Stickstoffmangel sinkt der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Spiegel aufgrund der enzymatischen Aktivität der GOGAT, so dass dann eine teilweise Repression AmtR-regulierter Gene beobachtet wurde.

Unter Stickstoffmangel wird Ammonium über die Glutaminsynthetase (GS) und die Glutamatsynthase (GOGAT) assimiliert. Während eine Deletion des *gltBD*-Operons (LNGLTBD) keinen Effekt auf die Stickstoffregulation hat, konnte in RNA-Hybridisierungen und Western Blot Analysen gezeigt werden, dass eine Deletion von *glnA* (LNΔGS) und *glnE* (LNGLNE) Folgen für die Regulation des Stickstoffmetabolismus auf Genexpressions- und Proteinaktivitätsebene hat. So konnte in den Stämmen LNΔGS und LNGLNE eine schwache Expression stickstoffregulierter Gene bei guter Stickstoffversorgung gezeigt werden. Ein weiterer Hinweis, dass trotzdem Ammonium den Marker des Stickstoffstatus darstellt und nicht Glutamin, zeigte ein vergleichbares Experiment, in dem statt eines Ammoniumsulfatpulses ein Glutaminpuls gegeben wurde. Ein Glutaminpuls führt im Gegensatz zu einem Ammoniumsulfatpuls nicht zu einer Repression stickstoffregulierter Gene. Die Expression blieb nach einem Glutaminpuls induziert (T. Müller, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung), während nach einem Ammoniumsulfatpuls eine teilweise Repression AmtR-kontrollierter Gene beobachtet werden konnte. Neben einer Analyse der Transkriptionskontrolle wurden Western Blot Experimente durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass ein Ammoniumsulfatpuls in der *glnA*- und *glnE*-Mutante LNΔGS und LNGLNE nicht zu einer Demodifizierung von GlnK führte. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass entweder die Glutaminsynthetase (GS) und/oder die Adenylyltransferase (ATase) für eine Demodifikation von GlnK wichtig sind, indem sie selbst eine regulatorische Funktion über eine Protein-Protein-Interaktion mit GlnK oder GlnD ausführen, oder eine Veränderung der Metabolitenpools dafür sorgt, dass GlnK adenylyliert bleibt. In weiteren Experimenten könnten bspw. in der *glnA*- und der *glnE*-Mutante die internen Metabolitenpools bestimmt werden, um die Wirkung einzelner Metabolite in der Stickstoffregulation und eine mögliche Markerfunktion von Ammonium näher zu charakterisieren.

Einen Hinweis, dass die ATase den Stickstoffstatus der Zelle selbst wahrnimmt und das Signal weiterleitet, zeigte eine Untersuchung der GS-Aktivität in Abhängigkeit von GlnK und GlnD. Eine Regulation der GS-Aktivität durch die ATase ist auch in der *glnK*-Deletionsmutante NR-1 und der *glnD*-Deletionsmutante LN-D nachweisbar. Das heißt, dass die ATase auch in Abwesenheit von GlnK und GlnD den Stickstoffstatus der Zelle wahrnimmt und die GS-Aktivität durch eine Adenylylierung oder Deadenylylierung dementsprechend moduliert. Dies stimmt mit Beobachtungen in *S. coelicolor* überein, in dem die Regulation der GS ebenfalls unabhängig von GlnK und GlnD ist (Hesketh *et al.*, 2002), und steht im Gegensatz zu der Funktion von GlnB in den Enterobakterien, in denen das P<sub>II</sub>-Protein der ATase den Stickstoffstatus der Zelle signalisiert (Merrick & Edwards, 1995a).



## V. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Charakterisierung des  $P_{II}$ -Signaltransduktionsproteins GlnK und seine zentrale Bedeutung für die Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*. Desweiteren wurden Interaktionspartner von GlnK identifiziert und deren Funktion in die GlnK-abhängige Signalkaskade eingeordnet. Außerdem konnte ein zweiter Signalweg, der von GlnK und GlnD unabhängig ist, beschrieben werden.

Die Funktion von GlnK innerhalb der Stickstoffkontrolle wurde mit unterschiedlichen biochemischen und molekularbiologischen Techniken untersucht. So zeigten Western Blot Experimente, dass das GlnK-Protein unter Stickstoffmangel synthetisiert und von der Transferase GlnD an allen Untereinheiten modifiziert wird. Dass es sich bei dieser Modifikation um eine Adenylylierung handelt, konnte mit MALDI-TOF-MS-Analysen nachgewiesen werden. In der adenylylierten Form ist GlnK in der Lage, mit dem Repressor der Stickstoffkontrolle AmtR in Wechselwirkung zu treten; GlnK sorgt so für eine Derepression stickstoffregulierter Gene. Eine direkte Interaktion zwischen AmtR und adenylyliertem GlnK konnte mit *Pull-Down* Analysen und Gelretardationsexperimenten detektiert werden. Ändert sich die Stickstoffversorgung der Zelle, so wird das GlnK-Protein nach einem Stickstoffpuls von GlnD deadenylyliert. Durch eine Demodifikation von GlnK erniedrigt sich dessen Affinität zu dem Repressor AmtR, so dass dieser für eine Repression stickstoffregulierter Gene sorgt. Das unmodifizierte GlnK interagiert mit dem Ammoniumtransporter AmtB. Dies führt vermutlich wie in *E. coli* zu einer Reduktion der Transportaktivität von AmtB. Lokalisierungsstudien zeigten nicht nur eine AmtB-abhängige Membranbindung von GlnK nach einem Stickstoffpuls, sondern zusätzlich eine Proteolyse des GlnK-Proteins. Ein Vergleich mit anderen Proteinen ergab, dass der Abbau von GlnK für dieses Protein spezifisch ist. Die Proteolyse als ein Regulationsmechanismus ist für *C. glutamicum* ungewöhnlich, da dieser Organismus als proteolytisch wenig aktiv gilt. Antikörpernachweise zeigten, dass der GlnK-Abbau neben den Clp-Protease-Komplexen ClpCP und ClpXP ebenfalls von der membranständigen Protease FtsH beeinflusst wird. So kann die Signalkaskade der Stickstoffkontrolle bei Bedarf schnell und gezielt abgeschaltet werden.

Experimente zur Signalaufnahme und Signalweiterleitung lassen vermuten, dass nicht Glutamin sondern Ammonium eine Markerfunktion in der Stickstoffkontrolle übernimmt. Wie *C. glutamicum* den Stickstoffgehalt des Mediums wahrnimmt, konnte nicht geklärt werden. Eine Sensorfunktion der Amt-Proteine AmtA und AmtB ist jedoch aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unwahrscheinlich. Neben einer GlnK-abhängigen Signaltransduktion deuten erste Experimente zusätzlich auf einen von GlnK unabhängigen Signalweg hin, in dem die Adenylyltransferase den Stickstoffstatus der Zelle wahrnimmt und die Glutaminsynthetase modifiziert bzw. demodifiziert.

## VI. Literaturverzeichnis

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

**Arcondéguy, T., Jack, R. & Merrick, M. (2001).** P<sub>II</sub> 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. & Ninfa, A. J. (1999).** Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**, 301-313.

**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**, 2961-2970.

**Beckers, G., Bendt, A. K., Krämer, R. & Burkovski, A. (2004).** Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter- and urease-encoding genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **186**, 7645-7652.

**Beckers, G., Strösser, J., Hildebrandt, U., Kalinowski, J., Farwick, M., Krämer, R. & Burkovski, A. (2005).** Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR-regulon. *Mol. Microbiol.* **58**, 580-595.

**Bendt, A. K., Beckers, G., Silberbach, M., Wittmann, A. & Burkovski, A. (2004).** Utilization of creatinine as an alternative nitrogen source in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **181**, 443-450.

**Blakey, D., Leech, A., Thomas, G. H., Coutts, G., Findlay, K. & Merrick, M. (2002).** Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. *Biochem. J.* **364**, 527-535.

**Blauwkamp, T. A. & Ninfa, A. J. (2002).** Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. *Mol. Microbiol.* **46**, 203-214.

**Blum, M., Beier, H. & Gross, H. J. (1987).** Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

**Burkovski, A. (2003a).** I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **179**, 83-88.

**Burkovski, A. (2003b).** Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 617-628.

**Carr, P. D., Cheah, E., Suffolk, P. M., Vasudevan, S. G., Dixon, N. E. & Ollis, D. L. (1996).** X-ray structure of the signal transduction protein P<sub>II</sub> from *Escherichia coli* at 1.9 Å. *Acta Crystallogr.* **52**, 93-104.

**Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.

**Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.

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

**Dandekar, T., Snel, B., Huynen, M. & Bork, P. (1998).** Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 324-328.

**Detsch, C. & Stülke, J. (2002).** Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* **149**, 3289-3297.

- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J. L., Cocaign-Bousquet, M. & Lindley, N. D. (1998).** Carbon flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* **254**, 96-102.
- Dubois, E. & Grenson, M. (1979).** Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: Multiplicity and regulation. *Mol. Gen. Genet.* **175**, 67-76.
- Dulley, J. R. & Grieve, P. A. (1975).** A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* **64**, 136-141.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M. & Schaffer, S. (2004).** *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigma H. *Mol. Microbiol.* **52**, 285-302.
- Fink, D., Weisschuh, N., Reuther, J., Wohleben, W. & Engels, A. (2002).** Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **46**, 331-347.
- Fisher, S. H. & Sonenshein, A. L. (1991).** Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 107-135.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992).** Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.
- 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. Sci. USA* **87**, 4645-4649.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P. D. & Inouye, H. (1987).** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21-30.

- Gutmann, M., Hoischen, C. & Krämer, R. (1992).** Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 115-123.
- Hallenbeck, P. C. (1992).** Mutations affecting nitrogenase switch-off in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 161-168.
- Heinrich, A., Maheswaran, M., Ruppert, U. & Forchhammer, K. (2004).** The *Synechococcus elongatus* P<sub>II</sub> signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol. Microbiol.* **52**, 1303-1314.
- Hermann, T. (2003).** Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**, 155-172.
- Hesketh, A., Fink, D., Gust, B., Rexer, H. U., Scheel, B., Chater, K., Wohlleben, W. & Engels, A. (2002).** The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **46**, 319-330.
- Hoskins, J. R., Kim, S.-Y. & Wickner, S. (2000).** Substrate Recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 35361-35367.
- Howitt, S. & Udvardi, M. (2000).** Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 152-170.
- Hsieh, M. H., Lam, H. M., van de Loo, F. J. & Coruzzi, G. (1998).** A P<sub>II</sub>-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13965-13970.
- 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., Ybarluccha, W., Cheah, E., Carr, P. D., Edwards, K. J., Ollis, D. L. & Vasudevan, S. G. (1996).** The role of the signal transducing protein P<sub>II</sub> from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **391**, 223-228.

- 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.
- Jakoby, M., Krämer, R. & Burkovski, A. (1999).** Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. FEMS Microbiol. Lett. **173**, 303-310.
- 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.
- Javelle, A., Severi, E., Thornton, J. & Merrick, M. (2004).** Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. J. Biol. Chem. **279**, 8530-8538.
- Jayakumar, A., Schulman, I., MacNeil, D. & Barnes, E. M. (1986).** Role of the *Escherichia coli glnALG* operon in regulation of ammonium transport. J. Bacteriol. **166**, 281-284.
- 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<sub>II</sub> 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<sub>II</sub> 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 adenylation state. Biochemistry **37**, 12802-12810.

**Jiang, P. & Ninfa, A. J. (1999).** Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the P<sub>II</sub> signal transduction protein. *J. Bacteriol.* **181**, 1906-1911.

**Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegräbe, I. & Tauch, A. (2003).** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**, 5-25.

**Kamberov, E. S., Atkinson, M. R. & Ninfa, A. J. (1995).** The *Escherichia coli* P<sub>II</sub> signal transduction protein is activated upon binding of 2-ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.* **270**, 17797-17807.

**Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H. & Yura, T. (1997).** Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma 32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 7219-7225.

**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.

**Khademi, S., O'Connell, J. 3rd, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L. J. & Stroud, R. M. (2004).** Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **305**, 1587-1594.

**Kiefer, P., Heinzle, E., Zelder, O. & Wittmann, C. (2004).** Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 229-239.

**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.

**Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation, Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**, 193-205.

- Kleiner, D. & Castorph, H. (1982).** Inhibition of ammonium (methylammonium) transport in *Klebsiella pneumoniae* by glutamine and glutamine analogues. FEBS Lett. **146**, 201-203.
- Kleiner, D. (2000).** Ammonium uptake and ammonia excretion by bacteria—a review. Recent Res. Devel. Microbiol. **4**, 467-479.
- Krömer, J. O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. & Wittmann, C. (2004).** In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome and fluxome. J. Bacteriol. **186**, 1769-1784.
- Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H. & Eggeling, L. (1995).** Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **177**, 1152-1158.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
- Leuchtenberger, W. (1996).** Amino acids, technical production and use. In: Products of primary metabolism (Rehm, H. J. & Reeds, G., eds.). Biotechnology Vol. **6**, 455-502.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. **65**, 45-54.
- Little, R., Reyes-Ramirez, F., Zhang, Y., van Heeswijk, W. C. & Dixon, R. (2000).** Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the P<sub>II</sub> regulatory protein. EMBO J. **19**, 6041-6050.
- Lorenz, M. C. & Heitman, J. (1998).** The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **17**, 1236-1247.
- MacPherson, K. H., Xu, Y., Cheah, E., Carr, P. D., van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., Luque, E., Vasudevan, S. G. & Ollis D. L. (1998).** Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Escherichia coli* GlnK. Acta Crystallogr. **54**, 996-998.
- Marini, A. M., Vissers, S., Urrestarazu, A. & André, B. (1994).** Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **13**, 3456-3463.

- Marini, A. M. & André, B. (2000).** *In vivo* N-glycosylation of the Mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol. Microbiol.* **38**, 552-564.
- Marini, A. M., Matasse, G., Raynal, V., André, B., Cartron, J.-P. & Chérif-Zahar, B. (2000).** The human Rhesus-blood-group associated RhAG protein and a novel kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genet.* **26**, 341-344.
- 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.
- Merkens, H., Beckers, G., Wirtz, A. & Burkovski, A. (2005).** Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Curr. Microbiol.* **51**, 59-65.
- 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.
- Mullins, K. B., Farone, F. A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986).** Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Nakashima, N., Mitani, Y. & Tamura, T. (2005).** Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories* **4**, 7-11.
- Nelson, M. & McClelland, M. (1992).** Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combination for megabase mapping chromosomes. *Methods Enzymol.* **216**, 279-303.
- Ninfa, A. J. & Atkinson, M. R. (2000).** P<sub>II</sub> signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* **8**, 172-179.
- Ninfa, A. J. & Jiang, P. (2005).** P<sub>II</sub> signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 168-173.

- Ninnemann, O., Jauniaux, J. C. & Frommer, W. B. (1994).** Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. *EMBO J.* **13**, 3464-3471.
- Nolden, L., Farwick, M., Krämer, R. & Burkovski, A. (2001a).** Glutamine synthetases in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 91-98.
- Nolden, L., Ngouoto-Nkili, C.-E., Bendt, A. K., Krämer, R. & Burkovski, A. (2001b).** Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: The role of *glnK* and *glnD*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1281-1295.
- Onishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K. & Ikeda, M. (2002).** A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 217-223.
- Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A., Gimenez, M. N. & Collins, M. D. (1995).** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 724-728.
- Pawlowski, A., Riedel, K. U., Klipp, W., Dreiskemper, P., Gross, S., Bierhoff, H., Drepper, T. & Masepohl, B. (2003).** Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **185**, 5240-5247.
- Pioszak, A. A., Jiang, P. & Ninfa, A. J. (2000).** The *Escherichia coli*  $P_{II}$  signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. *Biochemistry* **39**, 13450-13461.
- Régnier, P. & Arraiano, C. M. (2000).** Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *BioEssays* **22**, 235-244.
- Reitzer, L. (2003).** Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 155-176.
- Rick, W. & Stegbauer, H. P. (1974).** Amylase measurement of reducing groups. In: Bergmeyer H. V. (ed.), *Methods of enzymatic analysis* **2**, Academic Press, New York.

- Saier, M. H. (1999).** Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 1-56.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santos, D. & de Almeida, D. (1975).** Isolation and characterization of a new temperature-sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **124**, 1502-1507.
- Schaffner, W. & Weissmann, C. (1973).** A rapid sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**, 502-514.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schmidt, M., Lupas, A. N. & Finley, D. (1999).** Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 584-591.
- Schmitz, R. A. (2000).** Internal glutamine and glutamate pools in *Klebsiella pneumoniae* grown under different conditions of nitrogen availability. *Curr. Microbiol.* **41**, 357-362.
- Shapiro, B. M. & Stadtman, E. R. (1970).** The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **24**, 501-524.
- Siewe, R. M., Weil, B. & Krämer, R. (1995).** Glutamine uptake by a sodium dependent secondary transport system in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **164**, 98-103.
- 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.
- Silberbach, M. (2004).** Biochemische, biotechnologische und molekularbiologische Analyse eines Signaltransduktionsweges in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

- Soupene, E., He, L., Yan, D. & Kustu, S. (1998).** Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 7030-7034.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierachic classification system, *Actinobacteria classis* nov. Int. J. System. Bacteriol. **47**, 97-102.
- Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R. & Burkovski, A. (2004).** Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. **54**, 132-147.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990).** Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. **185**, 60-89.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2002).** Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. Curr. Microbiol. **45**, 362-367.
- Tesch, M., de Graaf, A. A. & Sahm, H. (1999).** *In-vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol. **65**, 1099-1109.
- Thomas, G., Coutts, G. & Merrick, M. (2000a).** The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. Trends Genet. **16**, 11-14.
- Thomas, G., Mullins, J. G. L. & Merrick, M. (2000b).** Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. Mol. Microbiol. **37**, 331-344.
- Tochikura, T., Sung, H.-C., Tachiki, T. & Kumagai, H. (1984).** Occurence of glutamate synthase in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **48**, 2149-2150.
- Trötschel, C., Kandirali, S., Diaz-Archirica, P., Meinhardt, A., Morbach, S., Krämer, R. & Burkovski, A. (2003).** GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. Appl. Microbiol. Biotechnol. **60**, 738-742.

- van Heeswijk, W. C., Hoving, S., Molenaar, D., Stegeman, B., Kahn, D. & Westerhoff, H. V. (1996).** An alternative P<sub>II</sub> protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**, 133-146.
- 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.
- Weichart, D., Querfurth, N., Dreger, M. & Hengge-Aronis, R. (2003).** Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 115-125.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999).** Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Wohlleben, W., Muth, G. & Kalinowski, J. (1993).** Genetic engineering of Gram-positive bacteria. In: *Genetic engineering of microorganisms* (Pühler, A., eds.). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Xu, Y., Cheah, E., Carr, P. D., van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., Vasudevan, S. G. & Ollis, D. L. (1998).** GlnK, a P<sub>II</sub>-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J. Mol. Biol.* **282**, 149-165.
- Xu, Y., Carr, P. D., Huber, T., Vasudevan, S. G. & Ollis, D. L. (2001).** The structure of the P<sub>II</sub>-ATP complex. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2028-2037.
- Yakunin, A. F. & Hallenbeck, P. C. (2000).** AmtB is necessary for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. *Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 95-96.
- 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.
- Zheng, L., Kostrewa, D., Berneche, S., Winkler, F. K. & Li, X. D. (2004).** The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17090-17095.

## II. Anhang

### Plasmid-Konstruktionen

Im folgenden sind die Konstruktionen der in Tabelle 2.2 aufgelisteten Plasmide beschrieben. Die Bezeichnung der Plasmide ist in Klammern gesetzt. Wenn nicht anders angegeben, diene für die PCR-Amplifikation chromosomale DNA von *C. glutamicum* als "template". Die fettgedruckten Basen stehen für die jeweilige Schnittstelle im forward oder reverse Primer.

#### pBTamtR:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TAT GGC AGG AGC AGT GGG A-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** TTA TTT CGC GTC AGC CTG CT-3` wurde das vollständige *amtR*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pBT-Vektor *in-frame* stromabwärts des  $\lambda$ cl-Gens ligiert (pBTamtR).

#### pBTglnA:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GCG GCC GCA** GTG GCG TTT GAA ACC CCG-3` und 5`-GCG CGC **CTC GAG** TTA GCA GTC GAA GTA CAA TTC G-3` wurde das vollständige *glnA*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *XhoI* geschnitten und in *NotI* und *XhoI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pBT-Vektor *in-frame* stromabwärts des  $\lambda$ cl-Gens ligiert (pBTglnA).

#### pBTglnD:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** CAT GAA TAA TCC AGC CCA GC-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG TTA GCC GGT TGC CCC C-3` wurde das vollständige *glnD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pBT-Vektor *in-frame* stromabwärts des  $\lambda$ cl-Gens ligiert (pBTglnD).

#### pBTglnE:

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GCG GCC GCG** ATG TCA GGA CCG TTA AGA A-3` und 5`-GCG CGC **CTC GAG** GGT TAC CCA CAC CTA CAT ATA-3` wurde das vollständige *glnE*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *XhoI* geschnitten und in *NotI* und *XhoI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pBT-Vektor *in-frame* stromabwärts des  $\lambda$ cl-Gens ligiert (pBTglnE).

**pBTglnK:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** CAT GAA ACT CAT CAC CGC AAT-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3` wurde das vollständige *glnK*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pBT-Vektor *in-frame* stromabwärts des  $\lambda$ cl-Gens ligiert (pBTglnK).

**pBTgltD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GCG GCC GCA** ATG GCC GAC CCA CAA GGA-3` und 5`-GCG CGC **CTC GAG** TCA GCT ACC TGC CAA CGA CCT-3` wurde das vollständige *gltD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *XhoI* geschnitten und in *NotI* und *XhoI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pBT-Vektor *in-frame* stromabwärts des  $\lambda$ cl-Gens ligiert (pBTgltD).

**pEKEX2amtB-glnK:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG GGT GCA GAT CAA ATT GCA-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3` wurden die beiden vollständigen Gene *amtB* und *glnK* des *amtB-glnK-glnD*-Operons über PCR amplifiziert, mit *BamHI* und *EcoRI* geschnitten und in *BamHI* und *EcoRI* geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2-Vektor ligiert (pEKEX2amtB-glnK).

**pEKEX2amtB-glnKY51F:**

Aus pEKEX2amtB-glnK wurde durch Restriktion mit *XhoI* und *BsaI* ein 170 bp-Fragment aus *glnK* entfernt und das Restplasmid dephosphoryliert. Ebenfalls mit *XhoI* und *BsaI* wurde aus dem Plasmid pEKEX2glnKY51F ein 170 bp-Fragment aus *glnK*, das die Mutation Y51F enthielt, ausgeschnitten und mit dem *XhoI* und *BsaI* geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2amtB-glnK ligiert (pEKEX2amtB-glnKY51F).

**pEKEX2amtB-glnK-glnD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG GGT GCA GAT CAA ATT GCA-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** TCA GCT ACC TGC CAA CGA C-3` wurde das vollständige *amtB-glnK-glnD*-Operon über PCR amplifiziert, mit *BamHI* und *EcoRI* geschnitten und in *BamHI* und *EcoRI* geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2-Vektor ligiert (pEKEX2amtB-glnK-glnD).

**pEKEX2amtB-glnKY51F-glnD:**

Aus pEKEX2amtB-glnK-glnD wurde durch Restriktion mit *Xho*I und *Bsa*I ein 170 bp-Fragment aus *glnK* entfernt und das Restplasmid dephosphoryliert. Ebenfalls mit *Xho*I und *Bsa*I wurde aus dem Plasmid pEKEX2glnKY51F ein 170 bp-Fragment aus *glnK*, das die Mutation Y51F enthielt, ausgeschnitten und mit dem *Xho*I und *Bsa*I geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2amtB-glnK-glnD ligiert (pEKEX2amtB-glnKY51F-glnD).

**pEKEX2glnD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG AAT AAT CCA GCC CAG CTG-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** TCA GCT ACC TGC CAA CGA C-3` wurde das vollständige *glnD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und in *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2-Vektor ligiert (pEKEX2glnD).

**pEKEX2glnK:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3` wurde das vollständige *glnK*-Gen über PCR amplifiziert, mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und in *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2-Vektor ligiert (pEKEX2glnK).

**pEKEX2glnK-glnD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** TCA GCT ACC TGC CAA CGA C-3` wurden die beiden vollständigen Gene *glnK* und *glnD* des *amtB-glnK-glnD*-Operons über PCR amplifiziert, mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und in *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen und dephosphorylierten pEKEX2-Vektor ligiert (pEKEX2glnK-glnD).

**pEKEX2glnKA49P:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GAG GTG TAC CGT GGT CCT GAA TAC GCT GTC-3` und 5`-GAC AGC GTA TTC AGG ACC ACG GTA CAC CTC-3` die Mutation A49P in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKA49P' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKA49P).

**pEKEX2glnKD54N:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GCT GAA TAC GCT GTC AAT TTT GTG CCT AAG-3` und 5`-CTT AGG CAC AAA ATT GAC AGC GTA TTC AGC-3` die Mutation D54N in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKD54N` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKD54N).

**pEKEX2glnKD88N:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-ACC GGC AAA GTC GGC AAC GGC AAA GTG TGG-3` und 5`-CCA CAC TTT GCC GTT GCC GAC TTT GCC GGT-3` die Mutation D88N in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKD88N` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKD88N).

**pEKEX2glnKE50Q:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GTG TAC CGT GGT GCT CAG TAC GCT GTC GAT-3` und 5`-ATC GAC AGC GTA CTG AGC ACC ACG GTA CAC-3` die Mutation E50Q in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKE50Q` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKE50Q).

**pEKEX2glnKG35A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GTC ACC GAA ACC CAA GCG TTT GGC CAG CAG- 3` und 5`-CTG CTG GCC AAA CGC TTG GGT TTC GGT GAC-3` die Mutation G35A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKG35A` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKG35A).

**pEKEX2glnKG37A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GAA ACC CAA GGC TTT GCG CAG CAG AAA GGC-3` und 5`-GCC TTT CTG CTG CGC AAA GCC TTG GGT TTC-3` die Mutation G37A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKG37A' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKG37A).

**pEKEX2glnKG41A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GGC CAG CAG AAA GCG CAC ACC GAG GTG TAC-3` und 5`-GTA CAC CTC GGT GTG CGC TTT CTG CTG GCC-3` die Mutation G41A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKG41A' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKG41A).

**pEKEX2glnKG84A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-ACC GCA CGC ACC GCC AAA GTC GGC GAC GGC-3` und 5`-GCC GTC GCC GAC TTT GGC GGT GCG TGC GGT-3` die Mutation G84A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKG84A' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKG84A).

**pEKEX2glnKG87A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-CGC ACC GGC AAA GTC GCG GAC GGC AAA GTG-3` und 5`-CAC TTT GCC GTC CGC GAC TTT GCC GGT GCG-3` die Mutation G87A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKG87A' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKG87A).

**pEKEX2glnKG89A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GGC AAA GTC GGC GAC GCC AAA GTG TGG ATG-3` und 5`-CAT CCA CAC TTT GGC GTC GCC GAC TTT GCC-3` die Mutation G89A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKG89A` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKG89A).

**pEKEX2glnKI7V:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-AAA CTC ATC ACC GCA GTT GTC AAG CCG TTT-3` und 5`-AAA CGG CTT GAC AAC TGC GGT GAT GAG TTT-3` die Mutation I7V in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKI7V` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKI7V).

**pEKEX2glnKI64V:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GTC AAG ATT GAA GTT GTT ATC TCC GAT GCT-3` und 5`-AGC ATC GGA GAT AAC AAC TTC AAT CTT GAC-3` die Mutation I64V in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKI64V` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKI64V).

**pEKEX2glnKK40N:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GGC TTT GGC CAG CAG AAC GGC CAC ACC GAG-3` und 5`-CTC GGT GTG GCC GTT CTG CTG GCC AAA GCC-3` die Mutation K40N in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKK40N` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKK40N).

**pEKEX2glnKK90R:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GTC GGC GAC GGC CGA GTG TGG ATG ACT AAC-3` und 5`-GTT AGT CAT CCA CAC TCG GCC GTC GCC GAC-3` die Mutation K90R in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKK90R' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKK90R).

**pEKEX2glnKQ39E:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GGC TTT GGC CAG GAG AAA GGC CAC ACC GAG-3` und 5`-CTC GGT GTG GCC TTT CTC CTG GCC AAA GCC-3` die Mutation Q39E in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKQ39E' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKQ39E).

**pEKEX2glnKR101K:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-ATC GAA GAG CTG GTT AAG GTT CGT ACC GGT-3` und 5`-ACC GGT ACG AAC CTT AAC CAG CTC TTC GAT-3` die Mutation R101K in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKR101K' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKR101K).

**pEKEX2glnKR103K:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GAG CTG GTT CGT GTT AAG ACC GGT GAG CGC-3` und 5`-GCG CTC ACC GGT CTT AAC ACG AAC CAG CTC-3` die Mutation R103K in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKR103K' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKR103K).

**pEKEX2glnKT29M:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GGT GTG CAG GGC ATG ATG GTC ACC GAA ACC-3` und 5`-GGT TTC GGT GAC CAT GCC CTG CAC ACC-3` die Mutation T29M in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKT29M` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKT29M).

**pEKEX2glnKT43A:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-CAG AAA GGC CAC GCC GAG GTG TAC CGT GGT-3` und 5`-ACC ACG GTA CAC CTC GGC GTG GCC TTT CTG-3` die Mutation T43A in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKT43A` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKT43A).

**pEKEX2glnKT83N:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GTC GAG ACC GCA CGC AAC GGC AAA GTC GGC-3` und 5`-GCC GAC TTT GCC GTT GCG TGC GGT CTC GAC-3` die Mutation T83N in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKT83N` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKT83N).

**pEKEX2glnKV53G:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GGT GCT GAA TAC GCT GGC GAT TTT GTG CCT-3` und 5`-AGG CAC AAA ATC GCC AGC GTA TTC AGC ACC-3` die Mutation V53G in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKV53G` mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKV53G).

**pEKEX2glnKV102I:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-GAA GAG CTG GTT CGT ATT CGT ACC GGT GAG-3` und 5`-CTC ACC GGT ACG AAT ACG AAC CAG CTC CTC-3` die Mutation V102I in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKV102I' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKV102I).

**pEKEX2glnKY46F:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-CAC ACC GAG GTG TTC CGT GGT GCT GAA TAC-3` und 5`-GTA TTC AGC ACC ACG GAA CAC CTC GGT GTG-3` die Mutation Y46F in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKY46F' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKY46F).

**pEKEX2glnKY51F:**

Mit dem Plasmid pEKEX2glnK als "template" wurde über PCR mit den Primern 5`-TAC CGT GGT GCT GAA TTC GCT GTC GAT TTT-3` und 5`-AAA ATC GAC AGC GAA TTC AGC ACC ACG GTA-3` die Mutation Y51F in das *glnK*-Gen eingeführt. Das PCR Produkt wurde religiert, die Mutation über Sequenzierung überprüft und das mutierte *glnK*-Gen aus dem über PCR amplifizierten Vektor pEKEX2glnKY51F' mit *Bam*HI und *Eco*RI herausgeschnitten und in *Eco*RI und *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Originalvektor pEKEX2 ligiert (pEKEX2glnKY51F).

**pGEM3zamtB2:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TCC** GCG GCC CTT GTG CTG GC-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** TCC TCG GTG CAA TCG GCG-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *amtB*-Gen amplifiziert, mit *Eco*RI und *Hind*III geschnittenen und in *Eco*RI und *Hind*III geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zamtB2). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

**pGEM3zclpC:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TCC** ACC TGC AGC AAG GTG TTG TA-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** TGC TCA GGA CTT TCA GTC GA-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *clpC*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und in *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zclpC). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

**pGEM3zclpP:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TCC** CTG AGG TTT CTG ATT CAG CTT-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** AAG GTT CTG CTG CCT GAT CT-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *clpP*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und in *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zclpP). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

**pGEM3zclpX:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TCC** CAG AGA TTT CTG ATC CAG GTT-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** CTG CTG GAT GTT CCT TCG CT-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *clpX*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und in *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zclpX). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

**pGEM3zftsH:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TCC** TTG CGT TGG CGT GGG TGT T-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** CGC CGT GGT GTT TAC GCG-3` wurde ein 0,6 kb-Fragment aus dem *ftsH*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und in *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert (pGEM3zftsH). Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das 3`-Ende des Inserts zeigt zum T7-Promotor.

**pQE60amtR:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TCA TGG CAG GAG CAG TGG G-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** TTT CGC GTC AGC CTG CTT G-3` wurde das vollständige *amtR*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten pQE60-Vektor *in-frame* stromaufwärts von 6 Histidinresten ligiert (pQE60amtR).

**pQE60glnD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TTA TGA ATA ATC CAG CCC AGC-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** GCT ACC TGC CAA CGA CCT G-3` wurde das vollständige *glnD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten pQE60-Vektor *in-frame* stromaufwärts von 6 Histidinresten ligiert (pQE60glnD).

**pTRGamtR:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TCA TGG CAG GAG CAG TGG G-3` und 5`-GCG CGC **ACT AGT** TTA TTT CGC GTC AGC CTG CT-3` wurde das vollständige *amtR*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *SpeI* geschnitten und in *EcoRI* und *SpeI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGamtR).

**pTRGgdh:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** AGA TGA CAG TTG ATG AGC AG-3` und 5`-GCG CGC **ACT AGT** TTA GAT GAC GCC CTG TGC C-3` wurde das vollständige *gdh*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *SpeI* geschnitten und in *EcoRI* und *SpeI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGgdh).

**pTRGglnA:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GCG GCC GCA** GTG GCG TTT GAA ACC CCG-3` und 5`-GCG CGC **CTC GAG** TTA GCA GTC GAA GTA CAA TTC G-3` wurde das vollständige *glnA*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *XhoI* geschnitten und in *NotI* und *XhoI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGglnA).

**pTRGglnD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TTA TGA ATA ATC CAG CCC AGC-3` und 5`-GCG CGC **ACT AGT** ATG TTA GCC GGT TGC CCC C-3` wurde das vollständige *glnD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *SpeI* geschnitten und in *EcoRI* und *SpeI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGglnD).

**pTRGglnE:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GCG GCC GCG** ATG TCA GGA CCG TTA AGA A-3` und 5`-GCG CGC **CTC GAG** GGT TAC CCA CAC CTA CAT ATA-3` wurde das vollständige *glnE*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *XhoI* geschnitten und in *NotI* und *XhoI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGglnE).

**pTRGglnK:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3` wurde das vollständige *glnK*-Gen über PCR amplifiziert, mit *BamHI* und *EcoRI* geschnitten und in *BamHI* und *EcoRI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGglnK).

**pTRGglnK-glnD:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGA TCC** ATG AAA CTC ATC ACC GCA ATT-3` und 5`-GCG CGC **ACT AGT** ATG TTA GCC GGT TGC CCC C-3` wurden die beiden vollständigen Gene *glnK* und *glnD* des *amtB-glnK-glnD*-Operons über PCR amplifiziert, mit *BamHI* und *SpeI* geschnitten und in *BamHI* und *SpeI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGglnK-glnD).

**pTRGgltB:**

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GCG GCC GCA** ATG AAA CCA CAA GGA CTC AC-3` und 5`-GCG CGC **ACT AGT** TTA GCT CAC TGC CTC CAT GA-3` wurde das vollständige *gltB*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *SpeI* geschnitten und in *NotI* und *SpeI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGgltB).

**pTRGgltD:**

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GCG GCC GCA** ATG GCC GAC CCA CAA GGA-3' und 5'-GCG CGC **CTC GAG** TCA GCT ACC TGC CAA CGA CCT-3' wurde das vollständige *gltD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *NotI* und *XhoI* geschnitten und in *NotI* und *XhoI* geschnittenen und dephosphorylierten *Two-Hybrid* pTRG-Vektor *in-frame* stromabwärts des RNA-Polymerase  $\alpha$ -Gens ligiert (pTRGgltD).

**pZamtB-glnK:**

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GAA TTC** AGG CAC TCC TTG AAC TCA TG-3' und 5'-GCG CGC **GGA TCC** TTA AAG GGC TGC TTC GCC G-3' wurden die beiden vollständigen Gene *amtB* und *glnK* über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZamtB-glnK).

**pZamtB-glnKY51F:**

Aus pZamtB-glnK wurde durch Restriktion mit *XhoI* und *BsaI* ein 170 bp-Fragment aus *glnK* entfernt und das Restplasmid dephosphoryliert. Ebenfalls mit *XhoI* und *BsaI* wurde aus dem Plasmid pEKEX2glnKY51F ein 170 bp-Fragment aus *glnK*, das die Mutation Y51F enthielt, ausgeschnitten und mit dem *XhoI* und *BsaI* geschnittenen und dephosphorylierten pZamtB-glnK ligiert (pZamtB-glnKY51F).

**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** TGC GGT CCC ATT CTG GAA C-3' wurde das an der C-terminalen Domäne des *glnD*-Gens um 1000 bp verkürzte *amtB-glnK-glnD*-Operon über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZamtB-glnK-glnD').

**pZglnD':**

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GAA TTC** TAT GAA TAA TCC AGC CCA GCT-3' und 5'-**GGA TCC** TGC GGT CCC ATT CTG GAA C-3' wurde das an der C-terminalen Domäne um 1000 bp verkürzte *glnD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten pZ8-1-Vektor ligiert (pZglnD').



## 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:

**Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R. & Burkovski, A. (2004).** Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. **54**, 132-147.

**Beckers, G., Strösser, J., Hildebrandt, U., Kalinowski, J., Farwick, M., Krämer, R. & Burkovski, A. (2005).** Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR-regulon. Mol. Microbiol. **58**, 580-595.

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: Köln, Oktober 2005

Unterschrift:

## 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.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Burkovski für die ausgezeichnete und engagierte Betreuung während der Arbeit, insbesondere für das Korrekturlesen, die Übernahme des Korreferats und nicht zuletzt für unzählige Ratschläge und Tipps bedanken.

Anja, Maike, Britta, Eva, Alja, Tim, Daniel und Gabi sowie allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe danke ich sehr für das gute Arbeitsklima und für die stete Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Two-Hybrid Partnerin Britta für die super Zusammenarbeit und die „wissenschaftlichen“ Diskussionen während und nach der Arbeit, bei meiner Labor- und Büronachbarin Maike für die Aufmunterung, Unterstützung und die vielen GlnK-Gespräche, insbesondere während des Zusammenschreibens, bei Gabi für die sportlichen Samstagnachmittage in der Uni und bei Anja und Astrid für die Hilfe in allen technischen Fragen. Ein lieber Dank gilt auch Gabi Sitek, die nicht nur dafür gesorgt hat, dass mir nie die Eppis und Spitzen ausgingen, sondern dafür, dass der Laboralltag nie langweilig war.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Tante Annegret für die professionelle Rechtschreib- und Grammatikprüfung, bei meiner Familie für die hilfreiche Unterstützung während der Doktorarbeit und der gesamten Studienzeit und bei Philipp für die zu jeder Zeit aufmunternden Worte, die Hilfe und Unterstützung nicht nur während des Zusammenschreibens und die Struktur des GlnK-Proteins bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Julia Strösser  
Geburtsdatum, -ort: 30. Juli 1977 in Köln  
Anschrift: Brunkensteinstraße 6  
50935 Köln

### Schulbesuche:

1984 bis 1988  
evang. Grundschule Gartenstraße  
in Bensberg

1988 bis 1997  
Otto-Hahn-Gymnasium  
in Frankenforst

### Hochschulbesuche:

1997 bis 2002  
Diplomstudiengang Biologie an der Universität zu Köln,  
Abschluss: Diplom; Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof.  
Dr. R. Krämer; Thema: "Einfluss der Ammoniumtransporter  
AmtA und AmtB in *Corynebacterium glutamicum*".

2002 bis 2005  
Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in  
der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer. Thema: "GlnK-  
abhängige Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*".

### Fortbildungen:

01.08.1994 bis 31.03.1996  
Beschäftigung im Presse-Shop  
des Crowne Plaza Hotels in Köln

Januar 1997  
Praktikum bei der Firma Madaus AG  
in der Abteilung Pharmakokinetik

14.08.2000 bis 17.11.2000  
Praktikum bei der Firma Schwarz Pharma  
in der Abteilung Molekularbiologie

14.06.1999 bis 30.09.2001  
Studentische Hilfskraft  
im Institut für Genetik der Universität zu Köln  
in der Abteilung Entwicklungsgenetik

