

**Mechanismen und Regulation der  
(Methyl-)Ammoniumaufnahme in  
*Corynebacterium glutamicum***

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

*Jana Sheila Meier-Wagner*

aus Berlin

Köln, September 2000

**Berichtersteller:**

Herr Prof. Dr. Reinhard Krämer

Frau PD Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 11. Dezember 2000

**Für meine Mutter**

## Mechanisms and regulation of (methyl-)ammonium uptake in *Corynebacterium glutamicum*

*C. glutamicum* is a Gram-positive soil bacterium which belongs to the group of mycolic acid-containing actinomycetes. Different mutant strains of *C. glutamicum* are used to produce amino acids on an industrial scale.

An important step in amino acid synthesis is the supply of nitrogen. Under conditions of nitrogen limitation a high-affinity (methyl-)ammonium uptake system, Amt, is synthesized. In the presence of excess nitrogen *amt*-transcription is repressed by the DNA-binding protein AmtR. As shown by  $K_m$ -determination Amt mediates the membrane potential-dependent uptake of (methyl-)ammonium but not of ammonia / methylamine. A second uptake system, AmtB, was determined to transport exclusively ammonium into the cell. The corresponding gene, *amtB*, is expressed at low levels even under conditions of nitrogen excess. Additionally, indications for the existence of a low-affinity ammonium-specific permease were found.

Several approaches confirmed a putative interaction between Amt and the glutamine synthetase I (GSI). In order to investigate putative interacting domains the topology of the Amt system was determined to form 10 transmembrane helices with extracellular amino- and carboxyterminal ends. Indications for the interaction between GSI with a fusion between a maltose-binding protein and Amt were found which would be in agreement with a putative regulation on the level of activity of Amt by GSI.

## **Mechanismen und Regulation der (Methyl-)Ammoniumaufnahme in *Corynebacterium glutamicum***

*C. glutamicum* ist ein Gram-positives Bodenbakterium aus der Gruppe der Mycolsäurehaltigen Actinomyceten. Es erlangte durch die Entwicklung optimierter Stämme biotechnologische Bedeutung in der Aminosäureproduktion. Eine wichtige Bedingung für die Aminosäuresynthese ist die Stickstoffversorgung. Unter Stickstoffmangelbedingungen wird ein hochaffines (Methyl-)Ammoniumaufnahmesystem, Amt, synthetisiert. Bei Stickstoffüberfluss wird hingegen die *amt*-Transkription durch das DNA-Bindeprotein AmtR reprimiert. Durch die Bestimmung seiner kinetischen Parameter konnte gezeigt werden, dass Amt (Methyl-) Ammonium transportiert und keinen Facilitator für Ammoniak / Methylamin darstellt. Ein zweites Aufnahmesystem, AmtB, transportiert ausschließlich Ammonium in die Zelle. Zusätzlich gibt es Hinweise auf die Existenz einer niedrigaffinen Ammoniumpermease.

Verschiedene Hinweise deuten auf eine putative Wechselwirkung zwischen Amt und der Glutaminsynthetase I (GSI) hin. Zur Analyse dieser Wechselwirkung wurde die Topologie des Amt-Systems bestimmt. Amt besteht demnach aus 10 Transmembranhelices mit extrazellulären Amino- und Carboxytermini. Durch Wechselwirkungsuntersuchungen zwischen einer Fusion aus MBP-Amt mit der GSI konnte eine Interaktion gezeigt werden. Diese deutet auf eine mögliche Aktivitätsregulation von Amt durch die GSI hin.

**Abkürzungen**

Antibiotikum <sup>R</sup>	resistent gegenüber Antibiotikum
Antibiotikum <sup>S</sup>	sensitiv gegenüber Antibiotikum
Ap	Carbenicillin
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Methylammoniumbromid
DMF	Dimethylformamid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
Km	Kanamycin
MBP	Maltosebindeprotein
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MSX	D,L-Methioninsulfoximin
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Nx	Nalidixinsäure
PEG	Polyethylenglykol
TG	Trockengewicht
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
XG	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
XP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	1
<b>1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>: Ein biotechnologisch bedeutendes Bakterium..</b>	1
<b>2. Stickstoffkontrolle als komplexes Regulationsmodell.....</b>	1
2.1 Regulation des Stickstoffmetabolismus in Gram-negativen Bakterien: Der Modellorganismus <i>Escherichia coli</i> .....	1
2.2 Regulation des Stickstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien: Der Sporenbildner <i>Bacillus subtilis</i> .....	5
2.3 Regulation des Stickstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien: Der Aminosäureproduzent <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	7
<b>3. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	10
<b>II. Material und Methoden</b> .....	12
<b>1. Chemikalien und Materialien</b> .....	12
<b>2. Bakterienstämme und Plasmide</b> .....	12
<b>3. Medien, Zusätze und Wachstumsbedingungen</b> .....	19
3.1 Medien .....	19
3.2 Zusätze und Antibiotika .....	20
3.3 Wachstumsbedingungen.....	21
<b>4. Gentechnische und molekularbiologische Methoden</b> .....	21
4.1 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	21
4.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation .....	22
4.3 Konstruktion einer <i>C. glutamicum</i> -Deletionsmutante .....	22
4.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	22
4.5 RNA-Isolierung, -Hybridisierung und -Detektion .....	23
4.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> .....	23
4.5.2 Spezifische RNA-Detektion mit Hilfe von „Dot Blots“ und Hybridisierungen .	23
<b>5. Biochemische Methoden</b> .....	24
5.1 Herstellung von Rohextrakten aus <i>C. glutamicum</i> -Kulturen.....	24
5.2 Proteinbestimmung .....	24
5.3 Bestimmung von Glutaminsynthetase-Aktivitäten.....	24
5.4 Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen .....	25
5.4.1 Photometrische Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen.....	25
5.4.2 Messung von Ammoniumkonzentrationen mit einer Ammonium-Elektrode ..	25

5.5 Bestimmung von [ <sup>14</sup> C]-Methylammoniumaufnahme in <i>C. glutamicum</i> .....	26
5.5.1 Bestimmung der kinetischen Parameter für die [ <sup>14</sup> C]-Methylammonium- aufnahme in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 .....	26
5.5.2 Bestimmung des apparenten K <sub>i</sub> -Wertes für die Hemmung der Methyl- ammoniumaufnahme durch Ammonium in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	27
5.5.3 Bestimmung der [ <sup>14</sup> C]-Methylammoniumaufnahme in Anwesenheit weiterer putativer Substrate.....	27
5.5.4 Untersuchung des Methylammoniummetabolismus in verschiedenen <i>C. glutamicum</i> -Stämmen .....	27
5.6 SDS-PAGE und Western-Hybridisierung.....	28
5.7 Elektroelution von Proteinen.....	29
5.8 Reinigung des Repressors der <i>amt</i> -Transkription AmtR.....	29
5.8.1 Expression einer <i>malE-amtR</i> -Fusion.....	29
5.8.2 Reinigung von AmtR.....	30
5.9 Untersuchung der putativen Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen MBP-Amt und der Glutaminsynthetase .....	30
5.9.1 Herstellung von MBP-Amt-Zellextrakten .....	30
5.9.2 Kopplung des MBP an Amylosesäulenmaterial und Durchführung von Bindetests.....	31
<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
<b>1. Der Mechanismus der (Methyl-)Ammoniumaufnahme in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>32</b>
1.1 Bestimmung der kinetischen Parameter des Ammoniumtransporters Amt für die Methylammoniumaufnahme .....	32
1.2 Aufnahme und Metabolisierung von Methylammonium durch <i>C. glutamicum</i> .....	34
1.3 Konkurrenz der Methylammoniumaufnahme durch Zugabe von putativen Substraten.....	38
1.4 Inhibierung der Methylammoniumaufnahme durch Ammonium .....	40
1.5 Regulation der <i>amt</i> - und <i>amtB</i> -Transkription in Abhängigkeit des externen pH- Wertes .....	41
1.6 Der pH-Wert hat keinen Einfluss auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> - Stämmen bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen .....	43
1.7 Messungen der Ammoniumaufnahme verschiedener <i>C. glutamicum</i> -Stämme ...	45
1.8 Ermittlung des apparenten K <sub>m</sub> -Wertes für den Methylammoniumumsatz durch die Glutaminsynthetase.....	47



<b>2. Regulation des Amt-Systems auf Aktivitätsebene</b> .....	48
2.1 Untersuchung der Topologie des Amt-Systems.....	48
2.2. Isolierung der Glutaminsynthetase und Gewinnung eines polyklonalen Antiserums .....	52
2.2.1 Isolierung der Glutaminsynthetase als MBP-Fusionsprotein .....	52
2.2.2 Isolierung der Glutaminsynthetase durch Elektroelution und Erzeugung eines polyklonalen Antiserums.....	53
2.2.3 Reinigung der Glutaminsynthetase aus <i>C. glutamicum</i> -Zellextrakten.....	53
2.3 Reinigung des Repressors der <i>amt</i> -Transkription AmtR und Herstellung eines polyklonalen Antiserums .....	54
2.3.1 Reinigung des Repressors der <i>amt</i> -Transkription AmtR .....	54
2.3.2 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen AmtR .....	56
2.3.3 AmtR-Kristallisation .....	56
2.4 Biochemischer Nachweis der Bindung des Fusionsproteins MBP-Amt an die Glutaminsynthetase aus Zellextrakten.....	57
2.5 Untersuchung der putativen Wechselwirkung des Amt-Systems mit der Glutaminsynthetase <i>in vivo</i> mit Hilfe eines „Two-Hybrid“-Systems in Hefe .....	60
2.5.1 Das „Sos-recruitment System“ .....	61
2.5.2 Molekularbiologische Untersuchung von Protein-Protein Wechsel- wirkungen .....	63
<b>IV. Diskussion</b> .....	67
<b>1. Die Ammoniumaufnahmesysteme von <i>C. glutamicum</i></b> .....	67
1.1 Die (Methyl-)Ammoniumaufnahme durch das Amt-System ist energieabhängig.	67
1.2 Die Ammoniumtransporter Amt, AmtB und AmtN .....	69
<b>2. Die Topologie des Amt-Systems</b> .....	70
<b>3. Die Wechselwirkung der Glutaminsynthetase mit dem Ammonium-     transporter Amt</b> .....	74
<b>4. Der globale Transkriptionsregulator AmtR</b> .....	76
<b>5. Das Modell der Stickstoffkontrolle in <i>C. glutamicum</i></b> .....	76
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	78
<b>VI. Literatur</b> .....	79-88

## I. Einleitung

### 1. *Corynebacterium glutamicum*: Ein biotechnologisch bedeutendes Bakterium

*Corynebacterium glutamicum* ist ein Gram-positives, unbewegliches, Biotin-auxotrophes Bakterium aus der Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten und somit eng verwandt mit den Genera *Gordona*, *Rhodococcus*, *Nocardia* und *Mycobacterium* (Pascual *et al.*, 1995). *C. glutamicum* wurde 1957 aus Bodenproben isoliert und erstmalig beschrieben. Seine namensgebenden Merkmale sind zum einen seine stäbchen- bis keulenförmige (coryneforme) Gestalt und zum anderen seine Fähigkeit zur Glutamatproduktion. Bei Biotinmangel kommt es vermutlich durch eine gestörte Fettsäuresynthese zu bisher ungeklärten Veränderungen in der Zytoplasmamembran und somit zur Exkretion intrazellulär angehäuften Glutamats (Kinoshita *et al.*, 1957). Wirtschaftliche Bedeutung erlangte *C. glutamicum* schließlich durch die Entwicklung optimierter Stämme, die zur Produktion von Aminosäuren eingesetzt werden. So werden jährlich etwa 1.000.000 t L-Glutamat, das in Form von Mononatriumglutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie Anwendung findet, und etwa 400.000 t L-Lysin, das als Futtermitteladditiv und in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt wird, sowie weitere Aminosäuren (L-Alanin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Prolin) in geringerem Maßstab und Vitamine produziert (Leuchtenberger, 1996).

In *C. glutamicum* sind sowohl die Assimilation seiner bevorzugten Stickstoffquelle Ammonium als auch die Regulation des Stickstoffmetabolismus trotz ihrer Bedeutung für die Biotechnologie noch nicht hinreichend geklärt. Für Gram-negative Enterobakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Klebsiella pneumoniae* dagegen ist die Regulation der Stickstoffassimilation vergleichsweise gut verstanden und verdeutlicht exemplarisch die Komplexität der Stickstoffregulation.

### 2. Stickstoffkontrolle als komplexes Regulationsmodell

#### 2.1 Regulation des Stickstoffmetabolismus in Gram-negativen Bakterien:

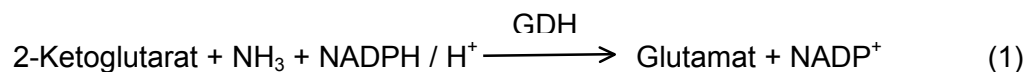
##### Der Modellorganismus *Escherichia coli*

Bakterien sind in der Lage, eine Vielzahl von Stickstoffquellen zu nutzen. Diese reichen von einfachen Ionen wie Nitrat und Ammonium bis zu komplexen organischen Substanzen wie Aminosäuren und Nucleosiden. In Abhängigkeit von den vorhandenen Stickstoffquellen werden unterschiedliche Enzyme und Transportsysteme synthetisiert bzw.

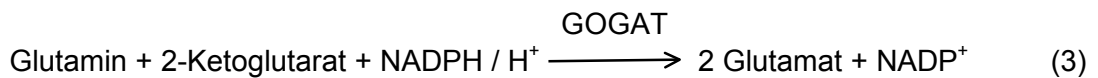
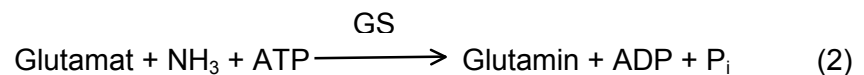
aktiviert. Von den meisten Bakterien wird jedoch Ammonium mit Präferenz aufgenommen und assimiliert (Merrick und Edwards, 1995; Magasanik, 1996).

*E. coli* kann wie die meisten Bakterien zwischen Stickstoffüberschuss- und Stickstoffmangelbedingungen „unterscheiden“ und angepasst darauf „reagieren“. Unter Stickstoffüberschussbedingungen gelangt Ammoniak über Diffusion in die Zelle und wird dort durch die „niedrigaffine“ Glutamatdehydrogenase GDH ( $K_m$ -Wert circa 1 mM) unter Verbrauch von NADPH /  $H^+$  auf 2-Ketoglutarat übertragen (Reaktion 1, Weg A, s. u.). Unter Stickstoffmangelbedingungen wird hingegen Ammonium über das Aufnahmesystem AmtB in die Zelle transportiert und dort durch die Reaktion der „hochaffinen“ Glutaminsynthetase GS ( $K_m$ -Wert circa 200  $\mu$ M) unter Verbrauch von ATP auf Glutamat übertragen (Reaktion 2, Weg B). In einer Folgereaktion kann das so gebildete Glutamin durch die Reaktion der Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase GOGAT in Glutamat umgewandelt werden (Reaktion 3, Weg B).

Weg A



Weg B



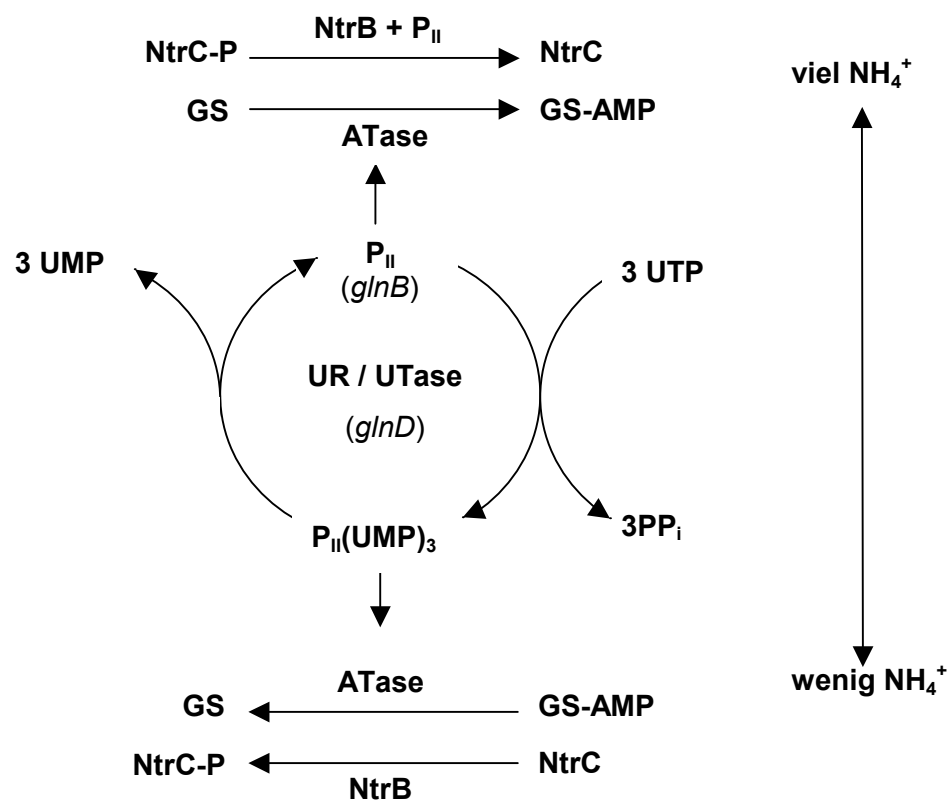
Die Aufnahme von Ammonium und dessen Fixierung unter Stickstoffmangelbedingungen ist auf diese Weise ungleich energieaufwendiger für die Zelle als der Energieaufwand durch die Reaktion der Glutamatdehydrogenase. Zusätzlich kann energieabhängig aufgenommenes Ammonium der Zelle in Form von Ammoniak durch 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 -fixierung ist somit ein zentraler Anpassungsmechanismus an das sich ändernde Stickstoffangebot des Lebensraums und stellt einen Selektionsvorteil dar. Tatsächlich sind solche Regulationsmechanismen beobachtet worden: So besitzt zum Beispiel Glutamin einen inhibitorischen Effekt auf die Aufnahme von Ammonium über eine negative Regulation der Transporteraktivität (Kleiner und Castorph, 1982; Jayakumar *et al.*, 1986). Die Regulation in Abhängigkeit von dem Metaboliten Glutamin erscheint besonders sinnvoll, da die zellinterne Glutaminkonzentration ein direktes Maß für die Stickstoffversorgung der Zelle ist (Merrick und Edwards, 1995).

*E. coli* verfügt über eine strikte Regulation des Stickstoffmetabolismus und besitzt ein globales Stickstoffregulationssystem (Ntr von „nitrogen regulatory system“) (Merrick und Edwards, 1995; siehe Abbildung 1). Das zentrale Molekül der Stickstoffregulation in *E. coli* ist das Signaltransduktionsprotein P<sub>II</sub>. Es ist ein nur zwölf kDa großes, trimeres Protein (kodiert durch *glnB*), welches die Stickstoffregulation über die Modulation der Aktivität und der Expression vieler Komponenten des Stickstoffmetabolismus steuert. Die zellinternen Konzentrationen von 2-Ketoglutarat, ATP und Glutamat wirken dabei als Effektoren von P<sub>II</sub> (de Mel *et al.*, 1994; Kamberov *et al.*, 1995; Liu und Magasanik, 1995). Die ATP-Konzentration spiegelt den Energiehaushalt der Zelle wieder, während die 2-Ketoglutaratkonzentration die Versorgung mit Kohlenstoffquellen anzeigt. Der Glutamat- bzw. Glutaminspiegel sind ein Maß für den Zustand der Stickstoffversorgung. Unter Stickstoffmangelbedingungen kommt es zu einer Akkumulation von 2-Ketoglutarat in der Zelle, welches an P<sub>II</sub> bindet. P<sub>II</sub> wird dadurch in einer Konformation stabilisiert, die eine Uridylierung an einem spezifischen Tyrosinrest (Tyr51) durch die Aktivität des bifunktionellen Enzyms Uridylyltransferase / Deuridylylierendes Enzym (UTase / UR, kodiert durch *glnD*) begünstigt. Im uridylylierten Zustand veranlasst P<sub>II</sub> das ebenfalls bifunktionelle Enzym Adenylyltransferase / Deadenylylierendes Enzym (ATase, kodiert durch *glnE*), die Glutaminsynthetase zu aktivieren, indem die deadenylylierende Aktivität der ATase die AMP-Reste von einem spezifischen Tyrosinrest (Tyr394) jeder Untereinheit der Glutaminsynthetase abspaltet. Die Aktivität der Glutaminsynthetase steigt sukzessiv mit der Deadenylylierung ihrer zwölf Untereinheiten an und sorgt schließlich für die Fixierung des aufgenommenen Ammoniums. Steigt die Stickstoffkonzentration in der Zelle wieder an, so erhöht sich auch die Glutaminkonzentration. Glutamin sorgt dann durch seine Bindung an die UTase / UR, dass das uridylierte P<sub>II</sub>-Protein von der deuridylylierenden Aktivität der UTase / UR deuridylyliert wird. Im Gegenzug veranlasst P<sub>II</sub> die adenylylierende Aktivität der ATase, die Glutaminsynthetase zu adenylylieren und somit zu inaktivieren. Neben dieser Regulation der Glutaminsynthetase durch posttranslationale Modifikation wird sie außerdem durch Glutamin „feedback“ inhibiert.

P<sub>II</sub> ist außer auf Aktivitätsebene auch auf Expressionsebene wirksam. Es werden bei anhaltendem Stickstoffmangel eine Reihe von Abbauwegen komplexer Stickstoff-haltiger Verbindungen wie z.B. Histidin und Arginin aktiviert. Außerdem wird die Synthese des Ammoniumaufnahme-systems AmtB induziert (Atkinson und Ninfa, 1998) und die Expression des *glnA*-Gens, welches für die Glutaminsynthetase kodiert, erhöht. Das *glnA*-Gen kann neben einer konstant niedrigen Expression über einen  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotor auch über einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen, Stickstoff-regulierten Promotor abgelesen werden (Merrick, 1993). Hier spielt das Zwei-Komponenten-System NtrB / C eine zentrale Rolle. Das *ntrB*-Gen kodiert für die Histidin-Proteinkinase NtrB und das *ntrC*-Gen für den DNA-

bindenden „response regulator“ NtrC. Unter Stickstoffmangelbedingungen ist NtrB in der Lage, nach Autophosphorylierung einen Phosphatrest auf NtrC zu übertragen. NtrC ist nur im phosphorylierten Zustand aktiv und aktiviert dann seinerseits die Transkription verschiedener  $\sigma^{54}$ -abhängiger, unter Stickstoffkontrolle stehender Gene, wie z. B. die des *glnA*-Gens.

Bei Stickstoffüberschuss interagiert NtrB mit dem nicht-uridylylierten  $P_{II}$ -Protein. Diese Wechselwirkung hemmt die Autophosphorylierungsaktivität von NtrB und aktiviert seine Phosphataseaktivität bezüglich NtrC (Kamberov *et al.*, 1995). Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung des „response regulators“ NtrC und somit zu einer Verminderung der Transkription. Der Mechanismus der Regulation der Glutaminsynthetase über die Aktivität der ATase,  $P_{II}$ , UTase / UR und NtrB / C wurde vor kurzem im rekonstituierten System untersucht. Dabei wurden die Kinetiken aufgeklärt und die als Effektoren wirkenden Metabolite identifiziert (Jiang *et al.*, 1998a; b; c).



**Abb. 1: Modell der Stickstoffregulation in *E. coli***

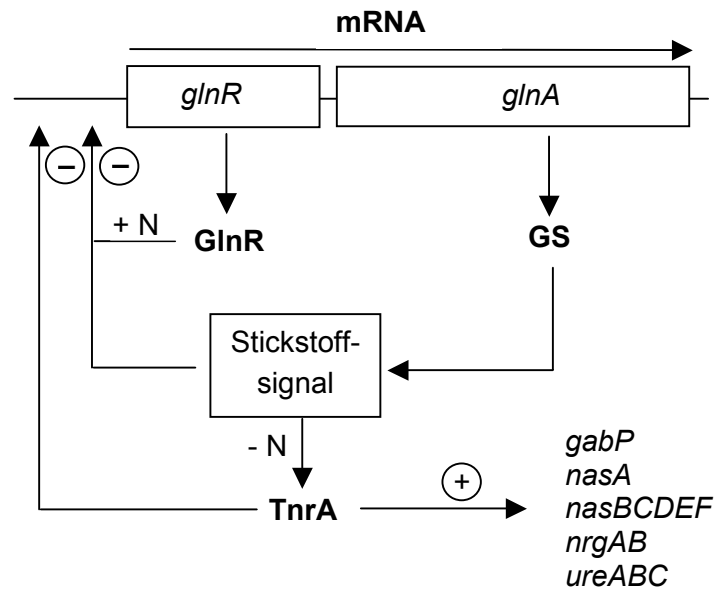
Die UR / UTase (Produkt von *glnD*) katalysiert die De- / Uridylylierung des  $P_{II}$ -Proteins (Produkt von *glnB*). Die ATase (Produkt von *glnE*) katalysiert die De- / Adenylierung der Glutaminsynthetase (GS). Die Histidinkinase NtrB de- / phosphoryliert das NtrC-Protein (nach Edwards und Merrick, 1995).

## 2.2 Regulation des Stickstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien: Der Sporenbildner *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* ist ein Gram-positiver Bodenorganismus und besitzt im Vergleich zu dem Gram-negativen Enterobakterium *E. coli* ein völlig anderes Konzept der Stickstoffregulation (Überblick siehe Fisher, 1999). *B. subtilis* besitzt die Möglichkeit, Nährstoffmangel im allgemeinen durch Sporulation zu überstehen. Diese Anpassung beeinflusst auch die Reaktionen in bezug auf Stressbedingungen wie Stickstofflimitation. In *B. subtilis* wurde noch kein Hinweis auf das Vorhandensein eines globalen Stickstoffregulationssystems ähnlich des NtrB / C Zwei-Komponenten-Systems aus *E. coli* gefunden. Außerdem steht *B. subtilis* zur Fixierung von Ammonium nur der GS / GOGAT-Weg zur Verfügung. Die Glutaminsynthetase wird nicht über kovalente Modifikation, sondern nur über „feedback“-Inhibierung durch Glutamin, der bevorzugten Stickstoffquelle in *B. subtilis*, in ihrer Aktivität reguliert. Das Gen für die Glutaminsynthetase (*glnA*) befindet sich in einem bicistronischen Operon mit dem negativen Transkriptionsregulator (*glnR*). Bei einsetzendem Stickstoffmangel gibt GlnR die Synthese der Glutaminsynthetase frei und Ammonium kann fixiert werden. Auch das P<sub>II</sub>-Protein (Produkt von *nrgB*) aus *B. subtilis* unterscheidet sich von dem aus *E. coli*. Es besitzt kein Uridylylierungsmotiv und Versuche mit *nrgB*-Deletionsmutanten zeigten, dass P<sub>II</sub> keinen übergeordneten Regulator darstellt (Fisher, 1999).

Drei globale Regulatoren sind für die Steuerung der Expression von Genen zuständig, die im Stickstoffmetabolismus von *B. subtilis* eine Rolle spielen. Die homologen Regulatoren GlnR und TnrA binden unter gegensätzlichen Stickstoffversorgungszuständen an die gleichen DNA-Sequenzen. Der Regulator TnrA ist nur unter Stickstoffmangelbedingungen aktiv und wirkt als Transkriptionsaktivator auf die Expression von Genen, deren Produkte Stickstoffquellen abbauen bzw. aufnehmen (z. B. *ureABC*, kodiert für eine Urease; *nrgAB*, kodiert für eine putative Ammoniumpermease und ein P<sub>II</sub>-Protein). Außerdem wirkt TnrA reprimierend auf die Expression des *glnRA*- und *gltAB*-Operons (kodiert für die GOGAT). Der Regulator GlnR reprimiert die Expression von z. B. *glnRA*, *ureABC* unter Stickstoffüberschussbedingungen. TnrA und GlnR sind in der Lage, ihre eigene Synthese und die des jeweils anderen Regulators zu steuern. Das Signal, welches die Regulation bedingt, ist allerdings noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Glutaminsynthetase in die Signaltransduktion involviert ist, indem sie entweder die Synthese von Metaboliten katalysiert, die die Aktivität von TnrA und GlnR direkt regulieren oder selber als Stickstoffsensor wirkt oder aber mit TnrA und GlnR interagiert (Fisher, 1999).

Der dritte Regulator CodY reprimiert bei schnellem Wachstum der Zellen in aminosäure-reichem Medium die Expression verschiedener Gene, die im Stickstoffstoffwechsel, der natürlichen Kompetenz und im Acetatstoffwechsel von Bedeutung sind (Fisher, 1999).



**Abb. 2: Modell der Stickstoffkontrolle in *B. subtilis***

Der Regulator TnrA ist unter Stickstoffmangelbedingungen (- N) aktiv und wirkt als Aktivator auf die Transkription folgender Gene: *gabP* ( $\gamma$ -Aminobutyratpermease), *nasA*, *nasBCDEF* (Gene für die Nitratassimilation), *nrgAB* (putatives Ammoniumaufnahme-system und  $P_{II}$ -Protein), *ureABC* (Urease) und als Repressor auf die Transkription des *glnRA*-Operons. Der Regulator GlnR ist unter Stickstoffüberschussbedingungen (+ N) aktiv und reprimiert ebenfalls die Transkription des *glnRA*-Operons. GS: Glutaminsynthetase; + Aktivierung der Genexpression; - Repression der Genexpression. Der Mechanismus, durch den Stickstoffüberfluss bzw. Stickstoffmangel registriert und weitergeleitet werden, ist nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass die Glutaminsynthetase in die Signaltransduktion involviert ist (nach Wray *et al.*, 1996).

### 2.3 Regulation des Stickstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien: Der Aminosäureproduzent *Corynebacterium glutamicum*

*C. glutamicum* ist im Gegensatz zu dem Gram-negativen Enterobakterium *E. coli* weder in der Lage widrigen Umweltbedingungen durch Chemotaxis zu entgehen, noch kann es sich durch Sporulation entziehen, wie das Gram-positive Bakterium *B. subtilis*. Außerdem ist es *C. glutamicum* im Gegensatz zu z. B. Rhizobien oder Cyanobakterien nicht möglich, molekularen Stickstoff zu fixieren. *C. glutamicum* musste daher ein System der Stickstoffkontrolle „entwickeln“, das angepasst an seine spezifischen Eigenschaften und Umweltbedingungen ist und für eine bestmögliche Anpassung sorgt. So ist *C. glutamicum* in der Lage, andere im Boden vorkommende Stickstoffquellen aufzunehmen, die durch den Abbau von tierischen und pflanzlichen Materialien entstehen, und in den Stickstoffmetabolismus einzuleiten. Je nach Stickstoffangebot kann *C. glutamicum* variabel darauf reagieren: Bei hohen Konzentrationen im Medium gelangt Ammoniak über Diffusion in die Zelle und wird von der niedrigaffinen Glutamatdehydrogenase assimiliert (Kimura, 1962; Oshima *et al.*, 1964). Das für die Glutamatdehydrogenase kodierende Gen, *gdh*, wurde isoliert und sequenziert. Die Glutamatdehydrogenase wurde charakterisiert. Soweit bekannt findet keine Regulation auf Transkriptions- oder Translationsebene statt (Börmann *et al.*, 1992; Tesch *et al.*, 1998). Erst unter Stickstoffmangel wird ein Ammoniumaufnahme-system, Amt, synthetisiert. Das für das Amt-System kodierende Gen, *amt*, wurde isoliert und sequenziert (Siewe *et al.*, 1996). Das Amt-System unterliegt einer Regulation auf Transkriptions- und Aktivitätsebene: So konnte in einem molekularbiologischen Suchverfahren das Gen für einen Repressor der *amt*-Transkription, *amtR*, isoliert und sequenziert werden (Jakoby *et al.*, 2000).

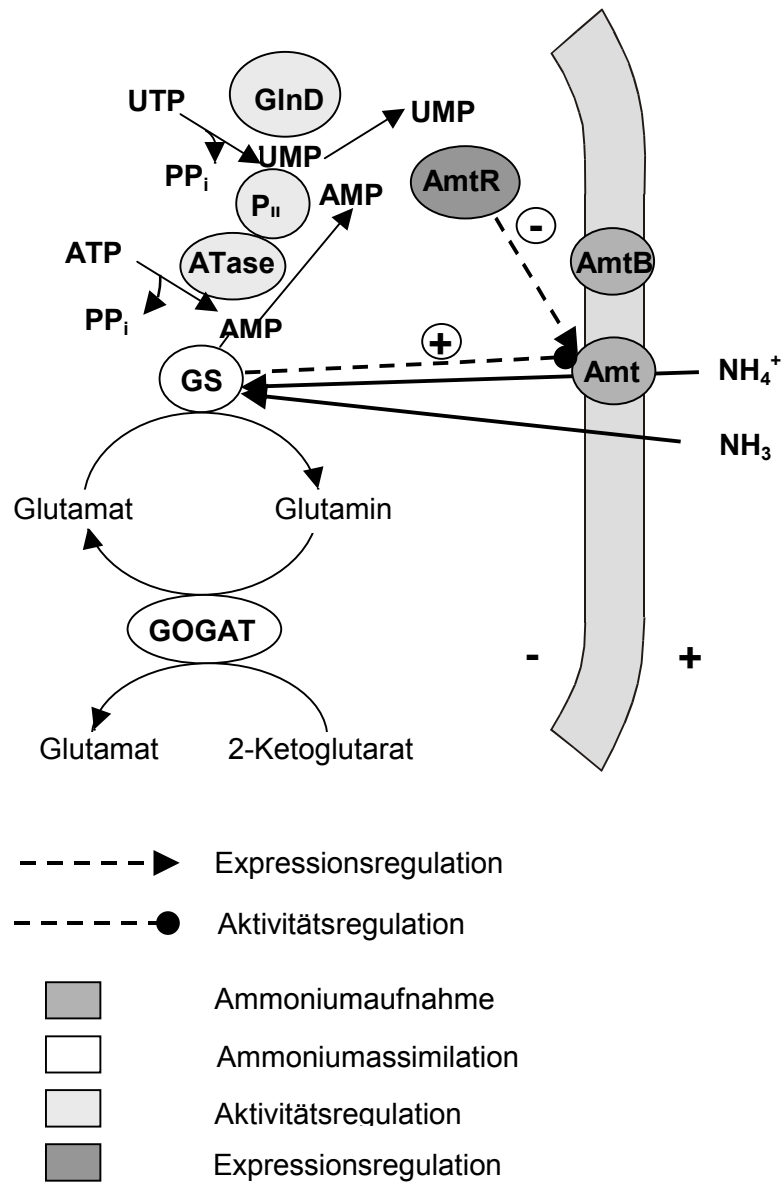
Auf Aktivitätsebene werden andere bekannte Ammoniumtransporter generell durch Glutamin und seine Analoga inhibiert (Kleiner und Castorph, 1982; Jayakumar *et al.*, 1986). Glutamin spiegelt dabei den Stickstoffstatus der Zelle wieder und verhindert durch die Aktivitätsreduktion der Ammoniumtransporter einen Energieverlust der Zelle durch unnötig transportiertes Ammonium. Diese Regulation trifft für *C. glutamicum* allerdings nicht zu. Jakoby (1998) konnte zeigen, dass unter Stickstoffmangel aufgenommenes Glutamin sofort von der Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) in Glutamat überführt wird und es zu keiner zellinternen Glutaminakkumulation kommt. Er postulierte daher eine Regulation der Aktivität des Amt-Systems durch Protein-Protein Wechselwirkungen (siehe Einleitung, Abschnitt 3). Bei niedrigen Ammoniumkonzentrationen reicht die Affinität der Glutamatdehydrogenase für eine Ammoniumfixierung nicht mehr aus. Unter diesen Bedingungen wird Ammonium über den Glutaminsynthetase / Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase-Weg (GS / GOGAT-Weg) assimiliert. Ein Glutaminsyn-



thetase I-kodierendes Gen, *glnA*, wurde isoliert und sequenziert (Jakoby *et al.*, 1997). Die Glutaminsynthetase I aus *C. glutamicum* verfügt ebenso wie das entsprechende Enzym aus *E. coli* über ein Adenylylierungsmotiv (Tyr405), an dem eine Adenylylierung durch eine ATase und eine damit verbundene Inaktivierung unter Stickstoffüberflussbedingungen ebenfalls gezeigt werden konnte (Jakoby *et al.*, 1999). Auch das GOGAT-System wurde bereits biochemisch charakterisiert (Tochikura *et al.*, 1984).

Neben der bevorzugten Stickstoffquelle Ammonium nimmt *C. glutamicum* auch andere Stickstoffquellen über spezifische Transportsysteme auf, von denen einige Transporter bereits gut charakterisiert sind. So wurden bisher zwei spezifische Aufnahmesysteme für Glutamat identifiziert. Das Substrat Glutamat kann in *C. glutamicum* sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle genutzt werden. Das *gluABCD*-Operon kodiert für einen ABC-Transporter, dessen Hauptaufgabe die Aufnahme von Glutamat als Kohlenstoffquelle ist. Entsprechend unterliegt dieses Aufnahmesystem der Kohlenstoffkatabolitenrepression (Krämer und Lambert, 1990; Krämer *et al.*, 1990; Kronemeyer *et al.*, 1995). Zusätzlich wird Glutamat durch einen bisher nur biochemisch charakterisierten sekundären Transporter in die Zelle aufgenommen. Die Regulation dieser Permease ist noch unklar (Burkovski *et al.*, 1996). Die Stickstoffquelle Glutamin wird ebenfalls durch einen sekundären Transporter im Symport mit Natriumionen aufgenommen. Dieses Transportsystem wird konstitutiv synthetisiert und ist nicht auf Aktivitätsebene reguliert (Siewe *et al.*, 1995). Die Aufnahme von Glutamin unterliegt damit nicht der Stickstoffkontrolle. Die Aufnahme von Harnstoff wird dagegen wie die Ammoniumaufnahme über die Verfügbarkeit von Stickstoff kontrolliert. Unter Stickstoffüberschuss gelangt Harnstoff über Diffusion in die Zelle. Erst unter Stickstoffmangelbedingungen wird ein sekundäres Aufnahmesystem für Harnstoff synthetisiert (Siewe *et al.*, 1998). Neben diesen Systemen konnte kürzlich ein *amt*-Paralog, *amtB*, isoliert und sequenziert werden, dessen Produkt aber noch keine endgültige Funktion zugewiesen werden konnte (Jakoby *et al.*, 2000).

Außerdem konnte *glnK*, ein für ein P<sub>II</sub>-Protein kodierendes Gen, isoliert und sequenziert werden. Das P<sub>II</sub>-Protein verfügt über ein Uridylylierungsmotiv und die Uridylylierung durch eine UTase / UR wurde biochemisch gezeigt. Das Gen für die UTase / UR, *glnD*, konnte ebenfalls isoliert und sequenziert werden (Jakoby *et al.*, 2000). Aus diesen Beobachtungen wurde ein Modell (Abbildung 3) erstellt, das dem Modell der Stickstoffkontrolle in *E. coli* in Bezug auf das Grundschema der Aktivitätsregulation zwar ähnelt, sich jedoch bezüglich der Expressionsregulation stark unterscheidet (modifiziert nach Jakoby, 1998).



**Abb. 3: Modell der Stickstoffregulation in *C. glutamicum***

Ammoniak kann durch Diffusion bzw. Ammonium durch energieabhängige Aufnahme durch das hochaffine Aufnahmesystem Amt in die Zelle gelangen. Dort wird es von der GS / GOGAT assimiliert. Die Aktivität der GS wird durch die ATase reguliert, welche wiederum durch das  $\text{P}_{\text{II}}$ -Protein je nach seinem Uridylylierungsgrad de- / aktiviert wird. GlnD de- / uridylyliert  $\text{P}_{\text{II}}$ . Der Repressor AmtR reguliert die *amt*-Transkription.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Die meisten Mikroorganismen nehmen mit Präferenz Ammonium als Stickstoffquelle auf. So wurden in verschiedenen Bakterien energieabhängige Transportsysteme für Ammonium beschrieben (Kleiner, 1993). Für die Aufnahme von Ammonium über spezifische Transportsysteme in die Zelle existieren zwei verschiedene Modelle: So wurde von Soupene *et al.* (1998) für das AmtB-System aus *E. coli* und die MEP-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* vorgeschlagen, dass diese Proteine nur den Konzentrationsausgleich von Ammoniak über die Membran erleichtern, also als Facilitatoren wirken, und die Glutaminsynthetase dabei eine Zugwirkung durch sofortige Assimilation des Ammoniak ausübt. Für *C. glutamicum* steht diese Theorie jedoch im Widerspruch zu den Beobachtungen von Siewe *et al.* (1996), die besagen, dass der (Methyl-)Ammoniumtransport einer strikten Energieabhängigkeit unterliegt und vom Membranpotenzial abhängig ist, es sich also um aktiven Transport eines Ions handeln muss. Daher sollten detaillierte Untersuchungen über den Mechanismus des Transportes durch das Amt-System im allgemeinen und die transportierten Spezies im besonderen durchgeführt werden, um das Konzept der energieabhängigen Ammoniumaufnahme zu prüfen. Des Weiteren war die Aufklärung der Funktion des putativen Ammoniumaufnahmesystems AmtB und ein Vergleich mit dem Aufnahmesystem Amt von Interesse. Für ein besseres Verständnis der Ammoniumassimilation sollte geklärt werden, warum *C. glutamicum* über zwei homologe Aufnahmesysteme verfügt. Die Expression der beiden Systeme unter unterschiedlichen Bedingungen, oder die Nutzung eines abweichenden Substratspektrums, würde die Koexistenz der Transporter Amt und AmtB unter phylogenetischen Gesichtspunkten erklären.

Die Aufnahme von Ammonium durch ein spezifisches Transportsystem beinhaltet einen potenziellen Energieverlust durch einen „futile cycle“ (Kleiner, 1985), also den Abbau des Membranpotenzials durch den zyklischen Prozess der energieverbrauchenden Aufnahme von Ammonium, welches im Gleichgewicht mit Ammoniak steht, gefolgt von einem Verlust von Ammoniak durch Diffusion aus der Zelle. Durch einen derartigen „futile cycle“ kommt es zu einem Abbau des Protonenpotenzials über der Membran. Die Repression der Transportersynthese, bei *C. glutamicum* durch AmtR unter Stickstoffüberschuss, sowie ein funktionell wie auch räumlich koordiniertes, enges Zusammenwirken des Ammoniumtransporters mit der Glutaminsynthetase durch eine Protein-Protein Wechselwirkung bei Stickstoffmangel würden für eine sofortige Assimilation von aufgenommenem Ammonium sorgen und einem „futile cycle“ entgegenwirken. Zusätzlich gibt es bereits experimentelle Hinweise auf eine Interaktion zwischen der Glutaminsynthetase und dem Ammoniumtransporter: So führt eine Deletion des *glnA*-Gens nicht nur zum Verlust der Glutamin-

synthetase-Aktivität, sondern auch zum Verlust der Ammoniumaufnahme. Ein Effekt auf Expressionsebene scheidet als Erklärung hierfür aus, da die Expression von Fusionen zwischen der Promoterregion des *amt*-Gens mit dem *lacZ*-Gen aus *E. coli* eindeutig eine *amt*-Expression belegen (Jakoby, 1998). In diesem Zusammenhang war es wichtig, Beweise für eine Interaktion des Amt-Systems mit der Glutaminsynthetase zu finden, die eine Aktivitätsregulation von Amt durch die Glutaminsynthetase implizieren. Dies wäre das erste bakterielle Modell, in dem eine direkte Protein-Protein Interaktion die Aktivität des Ammoniumtransporters, neben der ebenfalls neuartigen Transkriptionsrepression durch AmtR, reguliert. Als Methoden zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen sollten als molekularbiologische Technik ein „Two-Hybrid“-System in Hefe und als biochemische Techniken chromatographische und immunologische Methoden eingesetzt werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Materialien

Ammonium-Elektrode	Orion Research, Beverly, MA, USA
Antikörper	Sigma, Deisenhofen; Pineda Antikörper-Service, Berlin
Cellulosedünnschichtplatten	POLYGRAM CEL 300 PEI, CelluloseMN- 300polyethylenium imprägniert, Macherey-Nagel, Düren
Glasfaserfilter Typ F, Porengröße 0,45 µm	Millipore, Eschborn
[ <sup>14</sup> C]-Methylaminhydrochlorid (58 mCi / mMol; 2,15 GBq / mMol)	Amersham International, Buckinghamshire, UK
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach

Alle im Text erwähnten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht näher bezeichnet, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Roth (Karlsruhe), Schleicher & Schuell (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Qiagen (Hilden) bezogen. Komplexmedien stammten von Difco Laboratories (Detroit, USA).

### 2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sind in Tabelle 1 und die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt. Die Bezeichnung der Gene für *E. coli* K-12 folgt der Nomenklatur nach Bachmann (Bachmann, 1990). Tabelle 3 zeigt die verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen

Stamm	Beschreibung	Referenz
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
CP79 <i>phoA</i>	CP79 [ <i>thr1 leuB6 his65 relA2 argH46 thi1 ara13 gal3 malA1 λ<sup>R</sup> xyI7 mtl2 tonA2 supE44</i> ] mit $\Delta$ <i>phoA</i>	G. Sprenger, FZ Jülich
DH5 $\alpha$ <i>mcr</i>	<i>endA1 supE44 thi-1 λ<sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(alcZYA-argF) U169 Φ80ΔlacZ ΔM15mcrA Δ(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM109	F <sup>+</sup> <i>traD36 lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nx<sup>R</sup>) endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>) relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
S17-1	<i>thi-1 F<sup>-</sup> endA1 hsdR17 supE44 λ<sup>-</sup> pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<b><i>Corynebacterium glutamicum</i></b>		
ATCC 13032	Typstamm	Abe <i>et al.</i> , 1967
EB1	ATCC 13032 $\Delta$ <i>gdh</i>	Börmann <i>et al.</i> , 1992
JMW1	ATCC 13032 $\Delta$ <i>amtΔglnA</i>	diese Arbeit
LN-1.1	ATCC 13032 $\Delta$ <i>amtB</i>	Meier-Wagner <i>et al.</i> , 2000a
LN-1.2	ATCC 13032 $\Delta$ <i>amtΔamtB</i>	Meier-Wagner <i>et al.</i> , 2000a
MJ2-38	ATCC 13032 $\Delta$ <i>amt</i>	Meier-Wagner <i>et al.</i> , 2000a
MJ4-26	ATCC 13032 $\Delta$ <i>glnA</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 1997
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>		
<i>cdc25-2</i>	$\alpha$ <i>ura3 lys2 leu2 trp1 hisΔ200 ade2-101 cdc25-2</i>	Aronheim <i>et al.</i> , 1997

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pADNS	Klonierungsvektor für die 3'-terminale Endklonierung der „Beute“ im „Two-Hybrid“-System; <i>LEU2</i> , <i>ADH1</i> Promotor und Terminator; Ap <sup>R</sup> ; 8,4 kb	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pADNS <i>amtR</i>	pADNS-Derivat mit 4 kb großem <i>sos-amtR-HindIII-NotI</i> -Fragment aus pYes2 5' <i>SosamtR</i> ; 12,4 kb	diese Arbeit
pADNS <i>glnA</i>	pADNS-Derivat mit 4,5 kb großem <i>sos-glnA-HindIII-NotI</i> -Fragment aus pYes2 5' <i>SosglnA</i> ; 13,2 kb	diese Arbeit
pADNS5'SosF	pADNS-Derivat; Fusion von Sos an ein Farnesylierungssignal; 5'-Sos wird membrangebunden synthetisiert; Positivkontrolle im „Two-Hybrid“-System	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pADNS5'SosJZ	pADNS-Derivat; Fusion der c-Jun „Leucine-Zipper“ Dimerisierungsdomäne an den C-Terminus von Sos	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pADNSsp110-5'Sos	Klonierungsvektor für die 5'-terminale Klonierung der „Beute“ im „Two-Hybrid“-System; <i>LEU2</i> , <i>ADH1</i> Promotor und Terminator; Ap <sup>R</sup> ; 11,8 kb	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pADNSp110-5'Sos <i>amtR</i>	pADNSsp110-5'Sos-Derivat mit 0,7 kb großem <i>amtR-HindIII-XmaI</i> -Fragment 5'-terminal zu <i>sos</i> , aus pUC <i>amtR</i> -TH; 12,5 kb	diese Arbeit
pADNSp110-5'Sos <i>glnA</i>	pADNSsp110-5'Sos-Derivat mit 1,5 kb großem <i>glnA-HindIII-XmaI</i> -Fragment 5'-terminal zu <i>sos</i> ; 13,3 kb	diese Arbeit
pJC1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Pendelvektor; Km <sup>R</sup> ; <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>oriC<sub>g.</sub></i>	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pJC <i>glnA</i>	pJC1 mit 2,3 kb großem <i>glnA-NheI</i> -Fragment aus pUC <i>glnA</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 1997
pJCY405F	pJC1 mit 2,3 kb großem pUC <i>glnA</i> (Tyr405Phe)- <i>NheI</i> -Fragment aus pUC <i>glnAT&gt;P</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 1999

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pJL28	Proteinfusionsvektor; pMLB1034-Derivat mit Klonierungsstelle aus pNM480; <i>lacZlacY</i> ; Ap <sup>R</sup> ; 6,3 kb	G. Unden, Mainz
pJL30	Proteinfusionsvektor; pMLB1034-Derivat mit Klonierungsstelle aus pNM482; <i>lacZlacY</i> ; Ap <sup>R</sup> ; 6,3 kb	G. Unden, Mainz
pJL28 <i>amt</i> -HB	pJL28-Derivat mit 0,35 kb großem <i>HindII</i> - <i>BglII</i> - <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit
pJL28 <i>amt</i> -HS	pJL28-Derivat mit 0,5 kb großem <i>HindII</i> - <i>SacI</i> - <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit
pJL30 <i>amt</i> -HM	pJL30-Derivat mit 1,45 kb großem <i>HindII</i> - <i>MluNI</i> - <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit
pK18	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor; <i>lacZα</i> , pUC <i>ori</i> ; Km <sup>R</sup> ; 2,7 kb	Pridmore, 1987
pK <i>amt</i>	pK18-Derivat mit 1,5 kb- <i>Scal</i> - <i>XbaI</i> - <i>amt</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von pUC <i>dppc</i> ; zur Klonierung von <i>amt</i> in pMAL-c2	diese Arbeit
pK18 <i>amt</i> -TH	pK18-Derivat mit 1,5 kb- <i>HindIII</i> - <i>BamHI</i> - <i>amt</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von pUC <i>dppc</i> ; zur Klonierung von <i>amt</i> in pYes2	diese Arbeit
pKmsBΔ <i>dppc</i>	pK18-Derivat zur Deletion des <i>amt</i> -Gens in <i>C. glutamicum</i> ; <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Jakoby, 1998
pMAL-c2	Expressionsvektor für <i>malE</i> -Genfusionen ohne <i>malE</i> -Signalsequenz; Ap <sup>R</sup> ; <i>Ptac lacZα</i> ; 6,6 kb	Guan <i>et al.</i> , 1987
pM <i>amt</i>	pMAL-c2-Derivat mit <i>Scal</i> - <i>XbaI</i> - <i>amt</i> -Fragment aus pK <i>amt</i>	diese Arbeit
pM <i>amtR</i>	pMAL-c2-Derivat mit <i>Scal</i> - <i>XbaI</i> - <i>amtR</i> -Fragment aus pUC <i>amtR</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
pM <i>glnA</i>	pMAL-c2-Derivat mit <i>Scal</i> - <i>XbaI</i> - <i>glnA</i> -Fragment aus pUC19 <i>glnA</i>	diese Arbeit
pPA4	Proteinfusionsvektor; <i>lacZ'</i> <i>phoA</i> ' <i>lacZ</i> '; Ap <sup>R</sup> ; 4,1 kb	J. Meens, R. Freudl, FZ Jülich
pPA4 <i>amt</i> -HA	pPA4-Derivat mit 1,5 kb großem <i>HindII</i> - <i>AviII</i> - <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit



Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pPA4 <i>amt</i> -HB	pPA4-Derivat mit 0,35 kb großem <i>Hind</i> II- <i>Bgl</i> II- <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit
pPA4 <i>amt</i> -HM	pPA4-Derivat mit 1,45 kb großem <i>Hind</i> II- <i>Mlu</i> NI- <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit
pPA4 <i>amt</i> -HS	pPA4-Derivat mit 0,5 kb großem <i>Hind</i> II- <i>Sac</i> I- <i>amt</i> -Fragment aus pUC <i>dppc</i>	diese Arbeit
pUC11-1.8	pUC19-Derivat mit 1,8 kb großem <i>amtR'</i> - <i>citE</i> - <i>Bam</i> HI-Fragment	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
pUC18	Klonierungsvektor; Ap <sup>R</sup> ; <i>lacZ</i> α; 2,7 kb	Viera und Messing, 1982
pUC19	Klonierungsvektor; Ap <sup>R</sup> ; <i>lacZ</i> α; 2,7 kb	Viera und Messing, 1982
pUC18 <i>amtB</i> -TH	pUC18-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI- <i>amtB</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von genomischer ATCC 13032-DNA; zur Klonierung von <i>amtB</i> in pYes2	diese Arbeit
pUC <i>amtR</i>	pUC18-Derivat mit 0,7 kb großem <i>Scal</i> - <i>Xba</i> I- <i>amtR</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von pUC11-1.8; zur Klonierung von <i>amtR</i> in pMAL-c2	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
pUC <i>amtR</i> -TH	pUC18-Derivat mit 0,7 kb großem <i>Hind</i> III / <i>Bgl</i> II- <i>Bam</i> HI / <i>Xma</i> I- <i>amtR</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von genomischer ATCC 13032-DNA, zur Klonierung von <i>amtR</i> in pADNS bzw. pYes2 5'Sos	diese Arbeit
pUC <i>dppc</i>	pUC18-Derivat mit 3 kb großem <i>Bam</i> HI-Fragment mit ' <i>ppc secG amt ocd</i> '	Siewe <i>et al.</i> , 1996
pUC <i>glnA</i>	pUC18-Derivat mit 3,4 kb großem <i>Hind</i> III- <i>Sal</i> I- <i>glnA</i> -Fragment	Jakoby, 1998
pUC19 <i>glnA</i>	pUC19-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Scal</i> - <i>Xba</i> I- <i>glnA</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von pUC <i>glnA</i> ; zur Klonierung von <i>glnA</i> in pMAL-c2	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pUC <i>glnA</i> -C-TH	pUC18-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Bgl</i> II- <i>Not</i> I- <i>glnA</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von pUC <i>glnA</i> ; zur Klonierung von <i>glnA</i> in pYes2 5'Sos	diese Arbeit
pUC <i>glnA</i> -N-TH	pUC18-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Hind</i> III- <i>Xma</i> I- <i>glnA</i> -Fragment; amplifiziert durch PCR von pUC <i>glnA</i> , zur Klonierung von <i>glnA</i> in pADNSp110-5'Sos	diese Arbeit
pYeMJDP2	pYes2-Derivat; Fusion von JDP2 mit einem Myristoylierungssignal; Positivkontrolle für eine Interaktion mit 5'SosJun (auf pADNS5'SosJZ)	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pYes2	Klonierungsvektor für „Bibliothek“ im „Two-Hybrid“-System; <i>URA3</i> , <i>GAL1</i> Promotor, <i>CYC1</i> Terminator, Myristoylierungssignal; Ap <sup>R</sup> ; 5,9 kb	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pYes <i>amt</i>	pYes2-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI- <i>amt</i> -Fragment aus pK18 <i>amt</i> -TH	diese Arbeit
pYes <i>amtB</i>	pYes2-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI- <i>amtB</i> -Fragment aus pUC18 <i>amtB</i> -TH	diese Arbeit
pYes#M7	pYes2-Derivat; trägt eine Fusion eines mit Sos interagierenden Proteins mit einem Myristoylierungssignal; Kontrolle für Sos-Funktionalität	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pYes2 5'Sos	pYes2-Derivat mit einem 3,2 kb großem <i>Hind</i> III- <i>Not</i> I- <i>sos</i> -Fragment; Subklonierungsvektor zur Erzeugung von <i>sos-GenX</i> -Genfusionen; 9 kb	Aronheim <i>et al.</i> , 1997
pYes2 5'Sos <i>amtR</i>	pYes2 5'Sos-Derivat mit 0,7 kb großem <i>Bgl</i> II- <i>Bam</i> HI - <i>amtR</i> -Fragment aus pUC <i>amtR</i> -TH; zur Klonierung in pADNS	diese Arbeit
pYes2 5'Sos <i>glnA</i>	pYes2 5'Sos-Derivat mit 1,5 kb großem <i>Bgl</i> II- <i>glnA</i> -Fragment aus pUC <i>glnA</i> -C-TH; zur Klonierung in pADNS	diese Arbeit

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Eigenschaften <sup>a</sup>
<i>amt</i> bamhIL	TTG GGA TCC <u>TCA</u> TTT TGA GGC CTT TCG AGT ATC AGC	<i>Bam</i> HI-Schnittstelle, Stopcodon, 70 °C
<i>amt</i> PEcoRI	CCG GAA TTC <u>TTA</u> ACG AAT TTC CGG ACC CGT	<i>amt</i> B-Oligonukleotid, <i>Eco</i> RI-Schnittstelle, Stopcodon, 52 °C
<i>Amt</i> RBX	GAG GAT CCT <u>CAC</u> CCG GGT TTC GCG TCA GCC TGC	<i>Bam</i> HI / <i>Xma</i> I-Schnittstelle, Stopcodon, 42 °C
<i>amt</i> xbaL	GGG TCT AGA <u>TCA</u> TTT TGA GGC CTT TCG AGT ATC AGC	<i>Xba</i> L-Schnittstelle, Stopcodon, 70 °C
BamHIAmtP	CGC GGA TCC AAA <u>ATG</u> AAA AAG CTT GAC AAA ACT TCA ACG	<i>amt</i> B-Oligonukleotid, <i>Bam</i> HI-Schnittstelle, Startcodon, 52 °C
<i>gln</i> albgIII	GAT CCC AAG CTT ACC <u>ATG</u> GAG ATC TCG TTT GAA ACC CCG GAA G	<i>Hind</i> III-Schnittstelle, dann mit Startcodon; oder <i>Bg</i> III- Schnittstelle, dann ohne Startcodon, 52 °C
<i>gln</i> ANotI	ATA AGA ATG CGG CCG <u>CTT</u> <u>AGC</u> AGT CGA AGT ACA ATT C	<i>Not</i> I-Schnittstelle, Stopcodon, 64 °C
<i>gln</i> Axmal	GAG GAT CCT CAC CCG GGG CAG TCG AAG TAC AAT TC	<i>Xma</i> I-Schnittstelle, kein Stopcodon, 52 °C
HBamtR	GAT CCC AAG CTT ACC <u>ATG</u> GAG ATC TCA GGA GCA GTG GGA CGC CCC CGG	<i>Hind</i> III- <i>Bg</i> III-Schnittstelle, Startcodon, 42 °C
<i>Hind</i> IIIamt	GGG AAG CTT AAA <u>ATG</u> GAC CCC TCA GAT CTA GCC TGG ATT C	<i>Hind</i> III-Schnittstelle, Startcodon, 70 °C
malE	GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA GCC	Sequenzierung 3' von <i>mal</i> E, 66 °C
<i>sca</i> amtL	GGC CGA GTA CTG ACC CCT CAG ATC TAG CCT GGA TTC	<i>Scal</i> -Schnittstelle, kein Startcodon, 70 °C
<i>scal</i> amtRL	AAA AGT ACT GCA GGA GCA GTG GGA CGC CCC	<i>Scal</i> -Schnittstelle, kein Startcodon, 66 °C
<i>scag</i> lnA	AAA AGT ACT GCG TTT GAA ACC CCG	<i>Scal</i> -Schnittstelle, kein Startcodon, 48 °C

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Eigenschaften <sup>a</sup>
seqglnA	CTC CGG CTT CTA CGA AGT AG	Sequenzierung von <i>glnA</i> im Bereich 502–521 bp, 60 °C
xbalamtRL	TCC TCT AGA <u>TTA</u> TTT CGC GTC AGC CTG CTT G	<i>Xba</i> I-Schnittstelle, Stopcodon, 66 °C
xbaglnA	TCT AGA <u>TTA</u> GCA GTC GAA GTA CAA TTC	<i>Xba</i> I-Schnittstelle, Stopcodon, 48 °C
7/20	GTC GAC CTG TTG TCT CCC CA	365 bp vor <i>amt</i> -Startcodon, 61 °C, (Lars Nolden)

<sup>a</sup>: Unterstrichene Sequenzabschnitte bezeichnen die Stop- bzw. Startcodons in den Oligonukleotiden, kursive Sequenzabschnitte markieren die jeweiligen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Die aufgeführten Temperaturen entsprechen den Hybridisierungstemperaturen der Oligonukleotide mit den Matrizen.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt: 3 min Denaturierung bei 94 °C, 30 Zyklen mit je (0,5 min bei 94 °C, 0,5 min bei Hybridisierungstemperatur, 2 min bei 72 °C) 3 min bei 72 °C, Abkühlung und Aufbewahrung bei 4 °C.

### 3. Medien, Zusätze und Wachstumsbedingungen

#### 3.1 Medien

Komplexmedien (LB: Luria-Bertani Broth) für *E. coli* und *C. glutamicum* wurden wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben hergestellt. Festmedien wurden zusätzlich mit 1,5 % Agar versetzt. Für glutaminauxotrophe Stämme von *C. glutamicum* wurden die entsprechenden Medien mit 5 mM sterilfiltriertem L-Glutamin supplementiert. Stickstoffmangel wurde durch Kultivierung in CgCoCN-Medium induziert.

CgCoCN (pro Liter; auf pH 7,0 eingestellt mit NaOH):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MOPS	42,0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Biotin	200 µg

Davon getrennt wurden autoklaviert und anschließend zugegeben:

1 ml Spurensalzlösung ( auf pH 1,0 mit HCl; Angaben pro Liter):

FeSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,02 g
NiCl <sub>2</sub>	2 mg

1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>

Als definiertes Minimalmedium für *C. glutamicum* wurde CgC-Medium (CgCoCN mit 0,5 % Harnstoff, 2 % Ammoniumsulfat) verwendet. Allen Medien für *C. glutamicum* wurde nach dem Autoklavieren Glukose in einer Endkonzentration von 2 % zugesetzt.

Für *S. cerevisiae* wurde als Komplexmedium YPD-Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Bacto Pepton, 2 % Glukose) verwendet. Zur Selektion wurden Ynb Glukose-Medium (0,17 % Yeast Nitrogen W / O Amino Acids, 0,5 % Ammoniumsulfat, 2 % Glukose) bzw. Ynb Galaktose-Medium (0,17 % Yeast Nitrogen W / O Amino Acids, 0,5 % Ammoniumsulfat, 3 % D-Galaktose, 2 % D-Raffinose, 2 % Glyzerin) verwendet. Beiden Minimalmedien wurden folgende Substanzen in einer Endkonzentration von 50 µg / ml aus konzentrierten Stammlösungen zugesetzt: Adenin, L-Histidin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Tryptophan, Uracil.

### 3.2 Zusätze und Antibiotika

Die unten aufgeführten Zusätze und Antibiotika wurden den auf 50 °C abgekühlten Medien aus sterilen Stammlösungen in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt:

Zusatz / Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ap	50 mg / ml	50 µg / ml
Km	25 mg / ml	25 µg / ml
Nx	50 mg / ml in 0,4 N NaOH	50 µg / ml
IPTG	100 mM	0,3 mM
XG	40 mg / ml in DMF	40 µg / ml
XP	40 mg / ml in DMF	40 µg / ml

### 3.3 Wachstumsbedingungen

*E. coli*-Kulturen wurden bei 37 °C, *C. glutamicum*-Kulturen bei 30 °C gut belüftet auf Schüttlern bei 110-120 Upm inkubiert. Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Dabei entspricht einer Bakterienkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 etwa 10<sup>9</sup> Zellen pro ml (Miller, 1992).

Zur Durchführung von *C. glutamicum* Wachstumsversuchen bzw. [<sup>14</sup>C]-Methylammoniumaufnahmemessungen wurden Starterkulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml LB-Medium über Tag angezogen, dann 100 ml CgC-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>600</sub> von 1 damit angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese vorgezogenen Zellen wiederum in 100 ml CgC-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3 (3 Stunden Wachstum, exponentielle Wachstumsphase) inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit CgCoCN-Medium gewaschen und für weitere 3 Stunden in CgCoCN-Medium Stickstoffgehungert.

Der *S. cerevisiae*-Stamm *cdc25-2* ist temperatursensitiv und wurde daher bei Raumtemperatur angezogen. Unter Selektionsbedingungen wurde er auf Minimalmedium-Agarplatten bei 37 °C inkubiert.

Zur Stammhaltung wurden Zellen von Agarplatten isoliert und in dem „Advanced microorganism storage system“ (Microbank™ Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada) bei -70 °C gelagert.

## 4. Gentechnische und molekularbiologische Methoden

### 4.1 Plasmid-Präparation aus *E. coli* und *C. glutamicum*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* wurde mit dem Qiaprep Plasmid Spin Kit (Qiagen) durchgeführt. Dabei wurden folgende Modifikationen des Ausgangsprotokolls eingeführt: Der Puffer P1 wurde mit 15 mg / ml Lysozym versetzt und die Zellen nach der Ernte darin für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Volumen der Puffer P1, P2 und P3 wurden verdoppelt, der optionale Waschschrift mit Puffer PB wurde grundsätzlich durchgeführt. Die Plasmid-DNA konnte nach der Elution von den Säulchen direkt für die Elektroporation eingesetzt werden (Jakoby, 1998).

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgten PCR (GeneAmp® PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Weiterstadt oder Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg), Re-

strikation, Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten über Agarosegele, Auffüllen von 5'-Überhängen, Dephosphorylierung und Ligation (Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase bzw. Klonierung in pUC18 mit Hilfe des „SureClone™ Ligation kits“, [Amersham Pharmacia Biotech]) nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. nach Angaben des Herstellers.

#### 4.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und transformiert. Die Technik beruht auf einer modifizierten CaCl<sub>2</sub>-Methode. Durch die Anzucht der Zellen bei Raumtemperatur wird eine der Elektroporation vergleichbare Transformationseffizienz erreicht.

Kompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach der Methode von Liebl *et al.* (1989), modifiziert durch van der Rest *et al.* (1999), hergestellt und durch Elektroporation (2,5 kV, 600 Ω, 25 µF mit einem BioRad-Gene-Pulser, München) mit Plasmiden transformiert.

*S. cerevisiae*-Zellen wurden nach Standardmethoden mit Lithiumacetat kompetent gemacht und mit je 2 Plasmiden mit unterschiedlichen Selektionsmarkern transformiert (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 4.3 Konstruktion einer *C. glutamicum*-Deletionsmutante

Die Konstruktion einer *C. glutamicum*-Deletionsmutante ( $\Delta amt$ ) erfolgte nach den Methoden von Schäfer *et al.* (1990, 1994): Das *amt*-Deletionsplasmid pKmsB $\Delta dppc$  wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1 transformiert und dieser mit der *C. glutamicum glnA*-Deletionsmutante MJ4-26 konjugiert. Die Auswahl der  $\Delta amt\Delta glnA$ -Doppelmutante JMW1 geschah unter Ausnutzung der Selektionsmarker Sucrosesensitivität, Km<sup>R</sup> und Nx<sup>R</sup>. Zur Bestätigung der erfolgreichen *amt*-Deletion wurden PCRs mit *amt*-spezifischen Oligonukleotiden (*amt*xbaL und 7/20) durchgeführt und das *amt*-Gen nach elektrophoretischer Auftrennung als Bande mit einer Größe von 1,7 kb und ein deletiertes *amt*-Gen als Bande mit einer Größe von 650 bp nachgewiesen.

#### 4.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Überprüfung von Klonierungen wurden die jeweils konstruierten Plasmide sequenziert. Das Prinzip der Sequenzreaktion basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger

*et al.* (1977) und wurde nach Zimmermann *et al.* (1990) modifiziert. Bei dieser Methode wird der Kettenabbruch von Nukleotiden ausgelöst, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Reaktion entspricht einer abgewandelten PCR, in die eine modifizierte AmpliTaq<sup>®</sup>DNA Polymerase eingesetzt wird. Die Sequenzierreaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt (ABI PRISM<sup>™</sup> Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) und die Sequenzierungsprodukte mit einer automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems) kapillar-elektrophoretisch getrennt und detektiert.

Datenbankvergleiche mit bekannten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) am „National Center for Biotechnology Information“ ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) über das „World Wide Web“ durchgeführt.

#### **4.5 RNA-Isolierung, -Hybridisierung und -Detektion**

##### **4.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum***

Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) aus 15 ml exponentiell wachsenden Kulturen in CgC bzw. CgCoCN präpariert. Dazu wurden die Zellsuspensionen pelletiert und in 1 ml Puffer (10 mM Tris / HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA) ankonzentriert, wiederum abzentrifugiert, in 100 µl des gleichen Puffers aufgenommen und mit 700 µl RLT-Puffer („RNeasy Mini Kit“) versetzt. Dann wurden diese Zellsuspensionen in Kryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (0,15-0,25 mm Durchmesser) für 30 Sekunden mit Hilfe eines Amalgamators (Silamat S5, Vivadent) aufgeschlossen. Zur Präparation der RNA wurde dann weiter nach Angaben des Herstellers (Qiagen) verfahren.

Die Integrität und Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese anhand der Existenz distinkter 16S rRNA und 23S rRNA-Banden überprüft. Dazu wurden die Anweisungen des „RNeasy Mini Handbooks“ (Qiagen) mit folgenden Modifikationen befolgt: Je 6 µl RNA wurden mit dem dreifachen Volumen RNA-Ladepuffer (mit 2 µl Ethidiumbromid [10 mg / ml] auf 300 µl) versetzt und auf ein 0,9 %iges Agarose-Formaldehyd-Gel (ohne Ethidiumbromid) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

##### **4.5.2 Spezifische RNA-Detektion mit Hilfe von „Dot Blots“ und Hybridisierungen**

„Dot Blots“ (Apparatur: SRC 96 D, Minifold I, Schleicher & Schuell), Hybridisierungen und Detektionen wurden nach dem Handbuch „The DIG System Users Guide for Filter Hybridization“ (Roche Diagnostics) durchgeführt. Als Sonden wurden RNA-Sonden gegen *amt*



und *amtB* und als Kontrolle eine Sonde gegen 16S rRNA eingesetzt (die Sonden wurden freundlicherweise von Lars Nolden zur Verfügung gestellt). Zur Detektion der Signale wurden Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT) für 1 Minute mit den Membranen exponiert.

## 5. Biochemische Methoden

### 5.1 Herstellung von Rohextrakten aus *C. glutamicum*-Kulturen

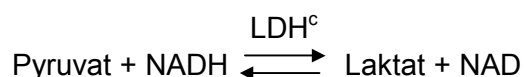
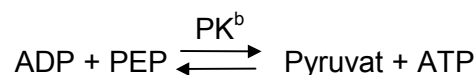
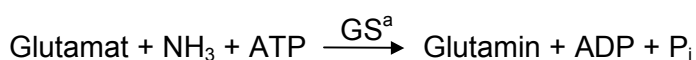
Rohextrakte aus *C. glutamicum* wurden mittels Ultraschallaufschluß hergestellt: 100 ml einer Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation geerntet, in 1 ml des Kulturüberstandes bzw. für die Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität in Imidazol-Puffer (Wakisaka *et al.*, 1990) resuspendiert und zweimal 5 Minuten bei einem „duty cycle“ von 30 % und „output“ Stufe 3 mit einem Branson™ Sonifier 250 (Branson Power Co, Danbury, USA) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch eine 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 x g abgetrennt. Die Rohextrakte konnten dann direkt für Enzym- oder Binde-tests eingesetzt werden.

### 5.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in *C. glutamicum*-Rohextrakten bzw. im Verlauf von Proteinreinigungen (siehe Abschnitt 5.8) wurde mit Hilfe des „BioRad Protein-Microassays“ (BioRad) mit BSA als Referenzprotein nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinbestimmung basiert auf der Methode von Bradford (1976).

### 5.3 Bestimmung von Glutaminsynthetase-Aktivitäten

Die Aktivität der Glutaminsynthetase wurde nach Wakisaka *et al.* (1990) mit der „*in vivo*-like mixture“ bestimmt. Mit diesem Test werden nur die aktiven, d. h. die nicht durch Adenylierung deaktivierten Untereinheiten der Glutaminsynthetase gemessen. Der Test verläuft nach folgendem Prinzip:



<sup>a</sup> Glutaminsynthetase  
<sup>b</sup> Pyruvatkinase  
<sup>c</sup> Laktatdehydrogenase

Gemessen wird die Abnahme von NADH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,3 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; die Messung erfolgte bei 30 °C), 1 Unit Glutaminsynthetase-Aktivität entspricht dem Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  NADH / min.

#### 5.4 Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen

Um die Ammoniumaufnahme in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines optischen Ammoniumnachweises bzw. mit Hilfe einer Ammonium-Elektrode (Orion Research) die Abnahme zugesetzten Ammoniums im Medium in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden *C. glutamicum*-Zellen wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben kultiviert, den Kulturen definierte Konzentrationen an Ammoniumchlorid zugegeben und die Abnahme der Ammoniumkonzentrationen in den Kulturüberständen verfolgt.

Nach Zugabe von Ammoniumchlorid auf eine Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  erfolgte die Probenentnahme minütlich über 10 Minuten, nach Zugabe von Ammoniumchlorid auf eine Endkonzentration von 5 mM stündlich in einem Zeitraum über 6 Stunden.

##### 5.4.1 Photometrische Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen

Für die Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen, die auf der Bildung von Indophenol beruht (Jahns *et al.*, 1988), wurden den Kulturen Proben entnommen, diese abzentrifugiert und die Überstände 1 / 1000 bis unverdünnt in den Test eingesetzt. Ein Volumen Kulturüberstand wurde mit  $\frac{1}{2}$  Volumen Lösung A (3 % Phenol (w / v), 0,003 % Natriumnitroprussid (w / v)) und  $\frac{1}{2}$  Volumen Lösung B (2 % NaOH (w / v), 0,4 % (v / v) 13 % NaClO) gemischt, 45 Minuten im Dunkeln inkubiert und dann die Extinktionsänderung bei 635 nm photometrisch verfolgt. Als Referenz diente eine Ammoniumchlorid-Lösung (0 bis 150  $\mu\text{M}$  im Test; der Test ist im  $\mu\text{M}$ -Bereich sensitiv; Anwesenheit von Glukose stört den Test).

##### 5.4.2 Messung von Ammoniumkonzentrationen mit einer Ammonium-Elektrode

Wie unter Abschnitt 5.4 beschrieben, wurden den Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten 3 ml-Proben entnommen, diese mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Amersham Pharmacia Biotech) abfiltriert, die Überstände mit 6 % (v / v) ISA („Ionic Strength Adjustor“, Orion Research) versetzt und mit Hilfe einer Ammonium-Elektrode

(Orion Research) die Spannungsänderung an einem pH-Meter (Knick, 776 Calimatic) im mV-Modus verfolgt. Zur Ermittlung der Ammoniumkonzentrationen wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$  - 10 mM) an Ammoniumchlorid erstellt.

### 5.5 Bestimmung von [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme in *C. glutamicum*

Zur Bestimmung von [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme durch das Amt-System wurden *C. glutamicum*-Zellen, wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben, kultiviert. 2 ml Zellsuspension ( $\text{OD}_{600}$  3 - 4) wurde in einem Wasserbad bei 30 °C gerührt und die Transportmessung, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium (ca. 2,5 kBq im Gesamtansatz) gestartet. Zur Messung der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme durch das AmtB-System wurden Zellsuspensionen mit einer optischen Dichte  $\text{OD}_{600}$  von 10 mit 1 mM [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium unter analogen Bedingungen inkubiert. Im Abstand von 15 Sekunden wurden über einen Zeitraum von 90 Sekunden Proben von je 200  $\mu\text{l}$  entnommen und auf Glasfaserfilter pipettiert. Das umgebende Medium wurde durch eine Mehrfachfiltrationsanlage (Amersham Pharmacia Biotech) abgesaugt und der Rest des Mediums durch zweimaliges Waschen mit je 2,5 ml 0,1 M LiCl-Lösung entfernt. Die Filter wurden in Szintillationsgefäßen mit 3,5 ml Szintillatorflüssigkeit (Rotiszint Eco Plus, Roth) überschichtet und die Radioaktivitäten in einem Szintillationszähler (Multi Purpose-Scintillations Counter LS 6500, Beckman Coulter, München) gemessen. Die Gesamtaktivität des Reaktionsansatzes wurde durch direktes Zählen von 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz ermittelt. Die Transportgeschwindigkeit bzw. die Aufnahme rate wurde aus der Steigung des linearen Teils der Aufnahmekinetik ermittelt.

#### 5.5.1 Bestimmung der kinetischen Parameter für die [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032

Zur Bestimmung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ - Wertes für die [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme des Amt-Systems bei pH 6,0 und pH 8,5 wurden *C. glutamicum* ATCC 13032-Kulturen wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben angezogen. Nach dreistündigem Stickstoffhunger in CgCoCN-Medium (pH 7,0) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in CgCoCN-Medium, pH 6,0 bzw. pH 8,5, eine  $\text{OD}_{600}$  von 3, 6 und 10 eingestellt. Die Aufnahmemessungen wurden wie unter Abschnitt 5.5 beschrieben durchgeführt. Die Messungen wurden mit verschiedenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumkonzentrationen gestartet: Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 3 wurde mit 1 bis 50  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium gestartet, bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 6 mit 50 bis 500  $\mu\text{M}$  und bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 10 mit 500  $\mu\text{M}$  bis 3 mM. Die

Auswertung der Messungen und die Bestimmung der  $K_m$ -Werte geschah durch direkte Extrapolation aus den Originaldaten.

### **5.5.2 Bestimmung des apparenten $K_i$ -Wertes für die Hemmung der Methylammoniumaufnahme durch Ammonium in *C. glutamicum* ATCC 13032**

Um den  $K_i$ -Wert für die Hemmung der Methylammoniumaufnahme durch Ammonium zu ermitteln, wurden *C. glutamicum* ATCC 13032-Zellen wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben kultiviert und die Messungen wie unter Abschnitt 5.5 beschrieben mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Kulturen einer  $OD_{600}$  von 2 wurden 0 bis 200  $\mu\text{M}$  Ammonium und 50 bzw. 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium zugesetzt. Dann wurde die Hemmung der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme in Abhängigkeit von der zugegebenen Ammoniumkonzentration bestimmt.

### **5.5.3 Bestimmung der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme in Anwesenheit weiterer putativer Substrate**

Um zu untersuchen, welche anderen Substrate das Amt-System akzeptiert, wurden *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen kultiviert (siehe Abschnitt 3.3) und [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahmemessungen (siehe Abschnitt 5.5) mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Eine Minute vor Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium wurde der Kultur ein 50facher Überschuß an putativem Substrat (Dimethylaminhydrochlorid, Trimethylaminhydrochlorid, Tetramethylaminhydrochlorid, Ethylamin, Propylamin, Butylamin; Sigma / Fluka) angeboten und die Hemmung der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme durch den prozentualen Vergleich der Aufnahmeraten zueinander ermittelt.

### **5.5.4 Untersuchung des Methylammoniummetabolismus in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen**

Zur Untersuchung des Methylammoniummetabolismus in verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen wurden die Aufnahmemessungen, wie unter Abschnitt 5.5 beschrieben durchgeführt. Nach Filtration der Zellen über eine Mehrfachfiltrationsanlage wurden die Glasfaserfilter zum Zellaufschluß und Abstoppen des Zellmetabolismus für 1 Stunde in 4 ml 70 % Ethanol / 0,05 % SDS bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lösungsmittel wurde dann mit Druckluft verdampft (Rapp *et al.*, 1986), das Pellet in 20  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert

und die Lösung auf eine Cellulosedünnschichtplatte aufgetropft. Als Referenz wurde [<sup>14</sup>C]-Methylammonium verwendet. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte für 3 Stunden mit einem Laufmittel aus n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 1. Nach Trocknen der Celluloseplatte wurde sie mit einer BAS-MP 2025 „Imaging Platte“ exponiert und mit Hilfe eines „Bio-Imaging Analyzers“ (Raytest, Fujifilm BAS-1800; Fuji, Omiya, Japan) ausgewertet.

### 5.6 SDS-PAGE und Western-Hybridisierung

Bakterielle Proteine und Zellextrakte wurden in 10 oder 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) bzw. in 10 %igen Harnstoff-haltigen Tricine-SDS-Polyacrylamidgelen (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Sambrook *et al.*, 1989).

Für einen immunologischen Nachweis der MBP-Amt-Fusion, der Glutaminsynthetase bzw. AmtR wurden die Proteinen nach dem Gellauf elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinyliden Difluorid)-Membran (Porengröße: 0,45 µM, Immobilon-P, Millipore) mit Hilfe eines „semi-dry Blots“ übertragen (Kyhse-Andersen, 1984). Der spezifische Nachweis erfolgte durch eine enzymatisch vermittelte Farbreaktion, die durch die Bindung zweier Antikörper an das Protein hervorgerufen wird.

Das erste Antiserum bestand aus einem polyklonalen Meerschweinchen-Antiserum gegen die Glutaminsynthetase oder AmtR (Pineda, Antikörper-Service) bzw. aus einem Kaninchen-Antiserum gegen das MBP (New England Biolabs), welches jeweils in der Verdünnung 1 / 10.000 eingesetzt wurde. Der zweite Antikörper (Verdünnung 1 / 10.000) bestand aus einem Konjugat aus Anti-Meerschweinchen- bzw. Anti-Kaninchenserum aus der Ziege mit Alkalischer Phosphatase (Sigma). Die kolorimetrische Reaktion erfolgte durch eine Reaktion der Phosphatase mit den Substraten XP und NBT (Roche Diagnostics).

Für die aminoterminalen Ansequenzierung des AmtR-Proteins im Labor von Dr. R. Schmid (Universität Osnabrück) wurde dieses elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Die Membran wurde dann für 5 Minuten in 0,1 % Amidoschwarz, 40 % Methanol, 11 % Essigsäure gefärbt und mit 45 % Methanol und 7 % Essigsäure entfärbt. Nach Trocknen und Einschweißen der Membran wurde sie nach Osnabrück gesandt.

## 5.7 Elektroelution von Proteinen

Für die Produktion von Antikörpern gegen die Glutaminsynthetase bzw. AmtR wurden beide Proteine mit Hilfe des MBP-Systems (siehe Abschnitt 5.8) als Proteinfusionen mit dem MBP über eine Amylosesäule vorgereinigt, mit Hilfe der Protease Faktor Xa geschnitten und mittels Acetonfällung bzw. eines Centricon-Röhrchens (Ultrafree<sup>®</sup>-Centrifugal Filter, Millipore, Bedford, MA, USA) ankonzentriert. Die Proteine wurden in 10 %igen Harnstoff-haltigen Tricine-SDS-Polyacrylamidgelen (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch aufgetrennt und während des Gellaufs gefärbt (Schägger *et al.*, 1988). Proteinbanden der entsprechenden Größe wurden ausgeschnitten und die Proteine mit Hilfe eines Elektroeluters (Elektro-Eluter Model 442, BioRad) nach Angaben des Herstellers in Natriumkarbonat-Puffer eluiert. Die Proteine wurden mittels einer „speed vac“ (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) getrocknet und die Proteinkonzentration bestimmt. Je 1 mg Protein wurde zur Produktion eines polyklonalen Antiserums an die Firma Pineda Antikörper-Service gesandt.

## 5.8 Reinigung des Repressors der *amt*-Transkription AmtR

### 5.8.1 Expression einer *malE-amtR*-Fusion

Für die Überproduktion und Reinigung von AmtR wurde das „Protein Fusion & Purification System“ von New England Biolabs (Schwalbach) eingesetzt und die Anweisung des Herstellers befolgt. *amtR* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *scaamtRL* und *xbaamtRL* amplifiziert (Hybridisierungstemperatur: 66 °C), in den Vektor pUC18 (Sure-Clone<sup>™</sup> Ligation Kit) zwischenkloniert und das resultierende Plasmid pUC*amtR* zur Kontrolle sequenziert. Das *amtR*-tragende Fragment wurde ausgeschnitten (*Scal-XbaI*) und im korrekten Leserahmen an den 3'-Bereich von *malE* in den Vektor pMAL-c2 (*Xmnl-XbaI*) ligiert. Das so erzeugte Plasmid p*MamtR* wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert.

Für die Überproduktion der Proteinfusion aus MBP-AmtR wurden Übernachtskulturen von BL21 p*MamtR* in LB-Medium (mit 0,2 % Glukose, Ap) angezogen und damit am nächsten Morgen 1 Liter frisches Medium inokuliert. Beim Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} \sim 0,5$ ) wurde die Transkription der *malE-amtR*-Genfusion durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und die Pellets in 50 ml Puffer (20 mM Tris / HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen und

einmaligen Passieren der French-Press ( $10^5$  kPa) wurden die Zelltrümmer durch 30minütige Zentrifugation bei 9000 x g abgetrennt und die Überstände mit Hilfe einer Amylosesäule gereinigt.

### 5.8.2 Reinigung von AmtR

Zur Reinigung der MBP-AmtR-Proteinfusion wurde nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) verfahren: Die Proteinfusion wurde mit Hilfe einer Amylosesäule gereinigt und durch Zugabe von Puffer mit 20 mM Maltose von der Säule eluiert (GradiFrac, Amersham Pharmacia Biotech). Die Elution wurde mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) überprüft. Zur Trennung der Fusion in MBP und AmtR wurde die durch die Konstruktion vorgegebene Schnittstelle für die Endoprotease Faktor Xa ausgenutzt. Die Schnittstelle befindet sich zwischen dem Carboxyterminus des MBP und dem Aminoterminus des AmtR-Proteins. 1 µg Faktor Xa pro mg Fusionsprotein wurden zu den Protein-enthaltenden Proben gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Ankonzentrierung der Proteinlösung mittels Dialyse gegen Puffer mit 20 % PEG 20.000, konnte AmtR mit Hilfe einer Gelfiltration (Superdex 75, Amersham Pharmacia Biotech; Biosys™ 2000, Beckman Coulter) vom MBP getrennt werden. Das AmtR-enthaltende Eluat wurde dann mit Hilfe einer HiPrep 26/10 Säule (Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt und danach lyophilisiert.

## 5.9 Untersuchung der putativen Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen MBP-Amt und der Glutaminsynthetase

### 5.9.1 Herstellung von MBP-Amt-Zellextrakten

Für die Überproduktion einer Fusion aus MBP und Amt wurde das „Protein Fusion & Purification System“ von New England Biolabs (Schwalbach) eingesetzt und die Anweisung des Herstellers befolgt. Das *amt*-Gen wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *scaamtL* und *xbaamtL* amplifiziert (Hybridisierungstemperatur: 70 °C), in den Vektor pK18 zwischenkloniert und das resultierende Plasmid *pKamt* zur Kontrolle sequenziert. Das *amt*-tragende Fragment wurde ausgeschnitten (*ScaI-XbaI*) und im korrekten Leserahmen an den 3'-Bereich von *malE* in den Vektor pMAL-c2 (*XmnI-XbaI*) ligiert. Das so erzeugte Plasmid *pMamt* wurde in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ *mcr* transformiert und die MBP-Amt-Proteinfusion wie unter Abschnitt 5.8.1 für AmtR beschrieben überproduziert. Nach Ernten der Zellen durch Zentrifugation, wurden die Pellets in 50 ml Puffer (20 mM Tris / HCl,

pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen und zweimaligem Passieren der French-Press (10<sup>5</sup> kPa), wurden die Zelltrümmer durch eine 30minütige Zentrifugation bei 9000 x g abgetrennt. Die Überstände konnten dann in Bindetests eingesetzt werden.

### **5.9.2 Kopplung des MBP an Amylosesäulenmaterial und Durchführung von Bindetests**

Zur Bindung der MBP-Amt-Fusion an Amylosesäulenmaterial wurde nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) verfahren: 200 µl Säulenmaterial wurden kurz abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 1,5 ml Puffer gewaschen und in 200 µl Puffer resuspendiert. Je 100 µl Säulenmaterial wurden dann mit 100 µl MBP-Amt-Zellextrakt und je 100 µl corynebakteriellem Zellextrakt (ATCC 13032, gezogen in CgC-Medium; ATCC 13032, gezogen in CgCoCN-Medium; MJ4-26; MJ4-26 pJC1; MJ4-26 pJC*glnA*; MJ4-26 pJCY405F; Herstellung der Rohextrakte siehe Abschnitt 5.1) gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Um nicht-gebundenes Protein zu entfernen wurden die Ansätze für eine Minute zentrifugiert, die Pellets in 1 ml Puffer gewaschen und dann in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Bindung der MBP-Amt-Fusion an Amylose mit Hilfe einer Western-Hybridisierung mit einem Antikörper gegen das MBP verifiziert. Die Wechselwirkungen der Glutaminsynthetase aus corynebakteriellen Zellextrakten mit MBP-Amt wurde mit Hilfe einer Western-Hybridisierung mit einem polyklonalen Antiserum gegen die Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum* untersucht.



### III. Ergebnisse

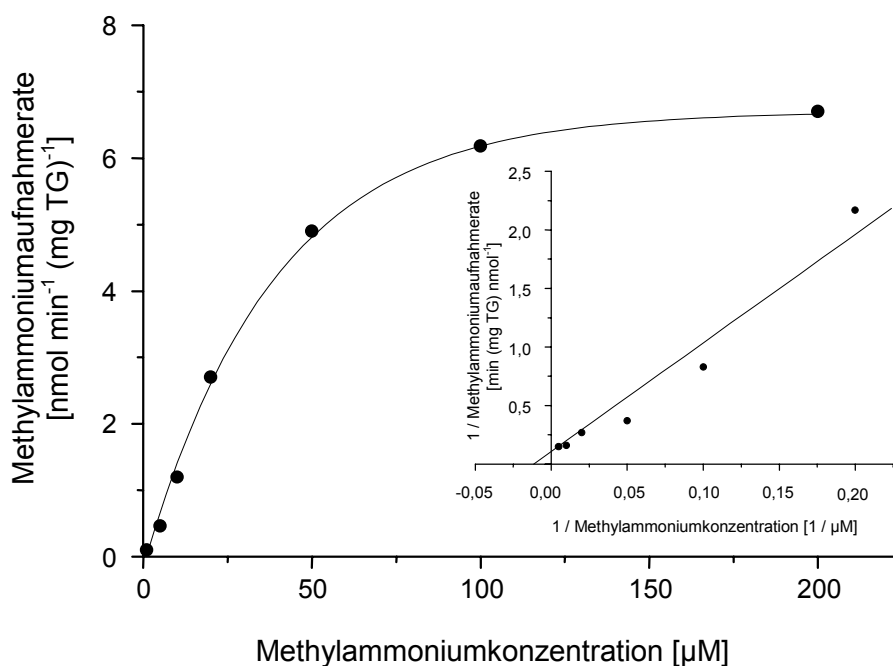
#### 1. Der Mechanismus der (Methyl-)Ammoniumaufnahme in *C. glutamicum*

##### 1.1 Bestimmung der kinetischen Parameter des Ammoniumtransporters Amt für die Methylammoniumaufnahme

Es werden generell zwei verschiedene Modelle zur Funktion von Ammoniumaufnahme-systemen diskutiert: Soupene *et al.* (1998) definieren das AmtB-System aus *E. coli* als ein Protein, das die Diffusion von Ammoniak über die Membran erleichtert, wobei die unmittelbare Umsetzung von Ammoniak durch die Glutaminsynthetase die Ammoniakaufnahme antreiben soll. Das zweite Modell beschreibt hingegen die energieabhängige Aufnahme der geladenen Form des Ammoniaks, des Ammoniumions. Zur Aufklärung der Funktion und des Mechanismus des Amt-Systems in *C. glutamicum* wurden seine kinetischen Parameter bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Die apparenten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte des Ammoniumtransporters für Methylammonium wurden bei pH-Werten von 6,0 und 8,5 ermittelt. Diese Werte geben Aufschluss über die transportierte Substratspezies: Da Methylammonium einen pK-Wert von 10,65 aufweist, ändert sich die Konzentration von Methylamin in diesem pH-Bereich um das 300fache, wohingegen die Konzentration von Methylammonium mehr oder weniger konstant bleibt (nach Henderson-Hasselbalch). So liegen bei einer theoretischen Gesamtkonzentration von Methylamin und Methylammonium von 1 mM bei einem pH-Wert von 6,0 nur 20 nM als Methylamin vor. Der Anteil der Diffusion am Transport ist in diesem Bereich irrelevant, da die Methylaminkonzentration limitierend ist. Bei einem pH-Wert von 8,5 liegt Methylamin jedoch in einer Konzentration von 6300 nM vor. Wenn Methylamin die transportierte Substratspezies darstellte, so sollte der apparente  $K_m$ -Wert bei steigendem pH-Wert abnehmen, da der Anteil an Methylamin an der Gesamtkonzentration stark zunimmt. Stellt Methylammonium hingegen das Substrat dar, so sollten die apparenten  $K_m$ -Werte mehr oder weniger konstant bleiben, da sich die Menge von Methylammonium an der Methylamin-Methylammoniumgesamtkonzentration nur um 0,6 % ändert.

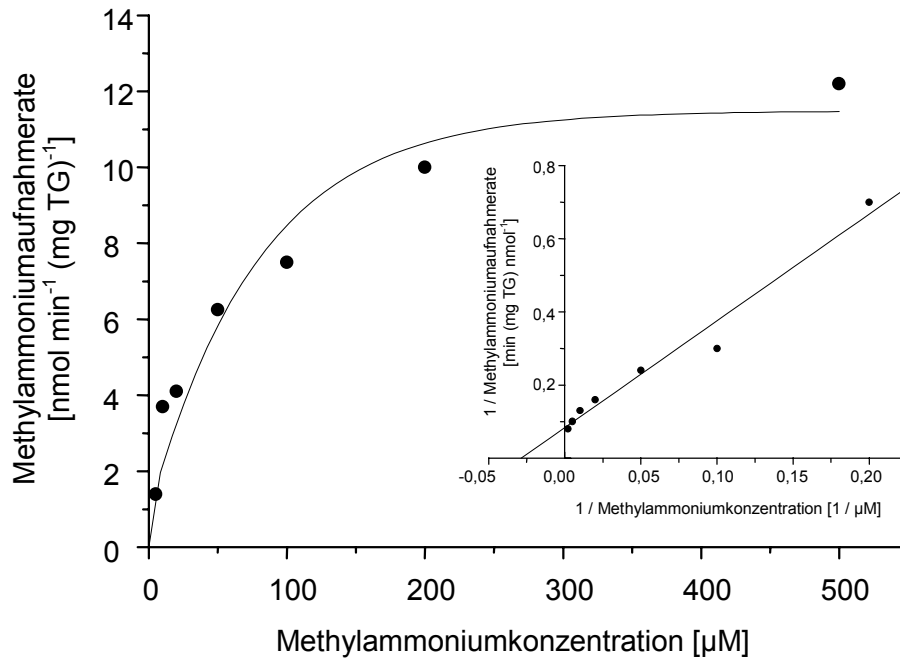
Nach den Messungen der Kinetiken und der direkten Extrapolation aus den Originaldaten, wurde bei einem pH-Wert von 6,0 ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $53 \pm 11 \mu\text{M}$  und ein  $V_{max}$ -Wert von  $7,8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  ermittelt. Abbildung 4 zeigt eine Auftragung dieser Kinetik nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burke. Bei einem pH-Wert von 8,5 wurde ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $47 \pm 8 \mu\text{M}$  und ein  $V_{max}$ -Wert von  $12,1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  bestimmt (Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burke-Auftragung in Abbildung 5). Diese

Ergebnisse stimmen mit der Bestimmung eines apparenten  $K_m$ -Wertes von  $44 \pm 7 \mu\text{M}$  bei einem pH-Wert von 7,0 durch Siewe *et al.* (1996) überein. Aus diesen Meßergebnissen ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass (Methyl-)Ammonium und nicht Methylamin / Ammoniak die Substrate für den Ammoniumtransporter darstellen. Als weiteres Argument für den energieabhängigen Transport von (Methyl-)Ammonium existiert außerdem die Beobachtung von Siewe *et al.* (1996), dass die Rate der (Methyl-)Ammoniumaufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 in einem Bereich von 25 bis 150 mV linear vom Membranpotenzial abhängig ist, dass also der Transport eines geladenen Substrates gefordert werden muss.



**Abb. 4: Bestimmung der kinetischen Parameter des Amt-Systems bei einem pH-Wert von 6,0**

Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burke-Auftragung (innen). Ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $53 \pm 11 \mu\text{M}$  für die Methylammoniumaufnahme durch das Amt-System bei einem pH-Wert von 6,0 wurde durch die direkte Extrapolation der Originaldaten ermittelt.



**Abb. 5: Bestimmung der kinetischen Parameter des Amt-Systems bei einem pH-Wert von 8,5**

Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burke-Auftragung (innen). Ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $47 \pm 8 \mu\text{M}$  für die Methylammoniumaufnahme durch das Amt-System bei einem pH-Wert von 8,5 wurde durch die direkte Extrapolation der Originaldaten ermittelt.

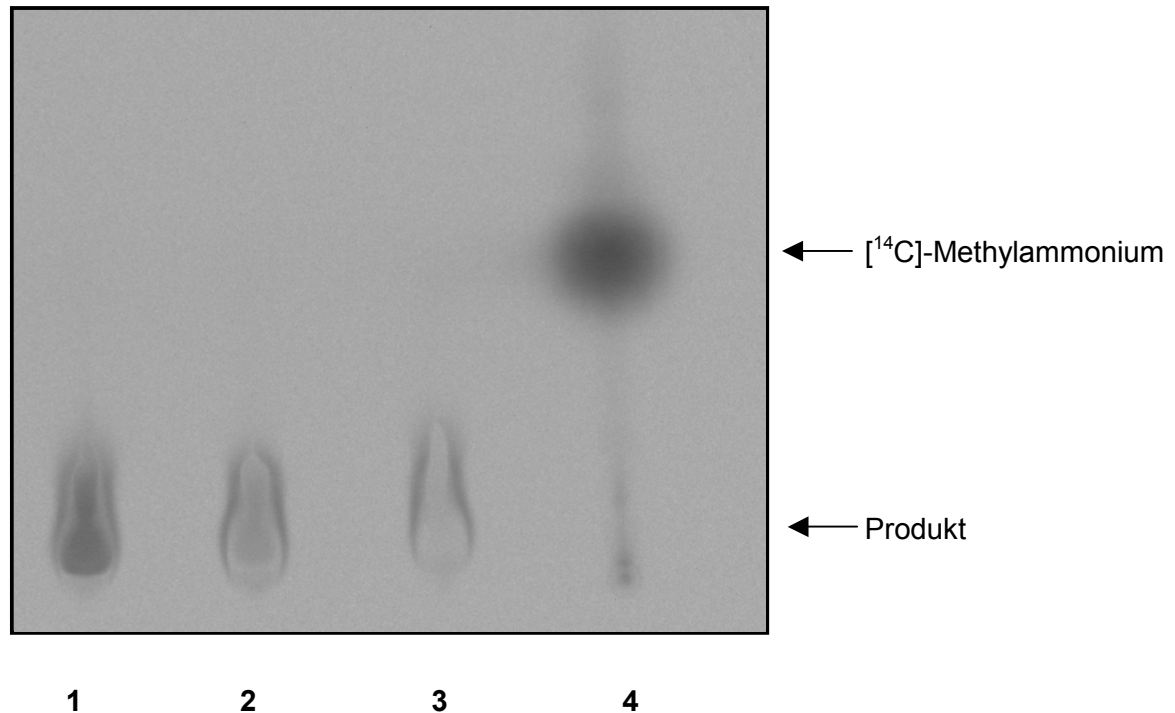
## 1.2 Aufnahme und Metabolisierung von Methylammonium durch *C. glutamicum*

Zur weiteren Charakterisierung der Methylammoniumaufnahme durch das Amt-System wurden verschiedene Methylammoniumaufnahme- und -Effluxexperimente mit den *C. glutamicum*-Stämmen ATCC 13032 (Typstamm), MJ2-38 (*amt*-Deletionsmutante) und MJ4-26 (*glnA*-Deletionsmutante; das *glnA*-Gen kodiert für eine Glutaminsynthetase I) durchgeführt. Zur Bestimmung des Methylammoniummetabolismus durch die Glutaminsynthetase wurden im Anschluss an die Messungen Dünnschichtchromatographien mit Zellextrakten der oben aufgeführten Stämme durchgeführt. Zur Aufnahme von Methylammonium wurden Stickstoff-gehungerte Zellen mit [<sup>14</sup>C]-Methylammonium inkubiert und die Zellsuspensionen abfiltriert. Die Behandlung der Zellen auf den Filtern wurde den Anforderungen entsprechend weitergeführt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.5). Wurden die Zellen auf den Filtern zur Vorbereitung von Dünnschichtchromatographien nach der üblichen Methode in 100 %igem Ethanol bei 80 °C inkubiert, so kam es zu einem vollständigen Verlust des Methylammoniums durch Verdampfen (Dampfdruck: 48 °C). Aus diesem Grund wurden die verbleibenden Zellen auf den Filtern durch eine

Inkubation in 70 %igen Ethanol mit 0,05 % SDS bei Raumtemperatur aufgeschlossen und schließlich die restlichen Flüssigkeiten mit Druckluft verdampft. Durch diese Art der Filterbehandlung war es möglich mehr als 75 % der eingesetzten Radioaktivität in den Proben wieder nachzuweisen.

Nach Auswertung der Methylammoniumaufnahme- und -Exfluxmessungen sowie der Dünnschichtchromatographien stellte sich heraus, dass der *C. glutamicum*-Typstamm ATCC 13032 eine maximale Akkumulation der eingesetzten 50 bis 200  $\mu\text{M}$  Methylammonium nach 30 Minuten Inkubation mit Methylammonium mit Aufnahmeraten von 5 bis 6  $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  zeigte. Bei Zugabe eines Überschusses an Ammonium fand nur noch Diffusion von Methylammonium statt, die durch ein Absinken der Methylammoniumaufnahme auf 0,1 bis 0,6  $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  dargestellt wurde. Nach Durchführung von Dünnschichtchromatographien wurde deutlich, dass Methylammonium quantitativ umgesetzt wurde (Abbildung 6, Spur 1). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Methylammonium durch die Glutaminsynthetase zu 5-N-Methylglutamin metabolisiert wird (Soupene *et al.*, 1998).

Die *amt*-Deletionsmutante MJ2-38 war nicht mehr in der Lage, Methylammonium aktiv aufzunehmen. Dies zeigte sich durch den Vergleich mit den Methylammoniumaufnahme-raten des Wildtypstammes. MJ2-38 erreichte seine maximale Aufnahme von Methylammonium durch Diffusion mit einer Rate von 0,1 bis 0,4  $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  erst nach drei bis vier Stunden Inkubation. Die Diffusion von Methylammonium wurde, wie erwartet, nicht durch die Zugabe von Ammonium gehemmt. Das AmtB-System, welches in der *amt*-Mutante MJ2-38 weiterhin synthetisiert wird, ist offensichtlich nicht in der Lage, Methylammonium zu transportieren. Denn wenn AmtB ein zweites Membranpotenzial-abhängiges Methylammoniumaufnahme-system darstellte, sollte es auf einen Abbau des Membranpotenzials mit einem Verlust der Aufnahmeaktivität reagieren. Die Zugabe von CTAB, das zur Permeabilisierung der Membran und dadurch zum Abbau des Membranpotenzials führt, resultierte aber nicht in einer Senkung der Methylammoniumaufnahme-rates. 30 bis 50 % des durch Diffusion aufgenommenen Methylammoniums ließen sich in Dünnschichtchromatographien als metabolisiert nachweisen (Abbildung 6, Spur 2). Möglicherweise weist die Glutaminsynthetase in der *amt*-Deletionsmutante eine reduzierte Aktivität auf, wie dies auch schon für *K. pneumoniae* gezeigt wurde (Castorph und Kleiner, 1984). Die *glnA*-Deletionsmutante MJ4-26 verhielt sich ähnlich der *amt*-Deletionsmutante. Auch sie nahm Methylammonium mit einer Rate von 0,1  $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  auf und metabolisierte es zu 30 bis 50 % (Abbildung 6; Spur 3).



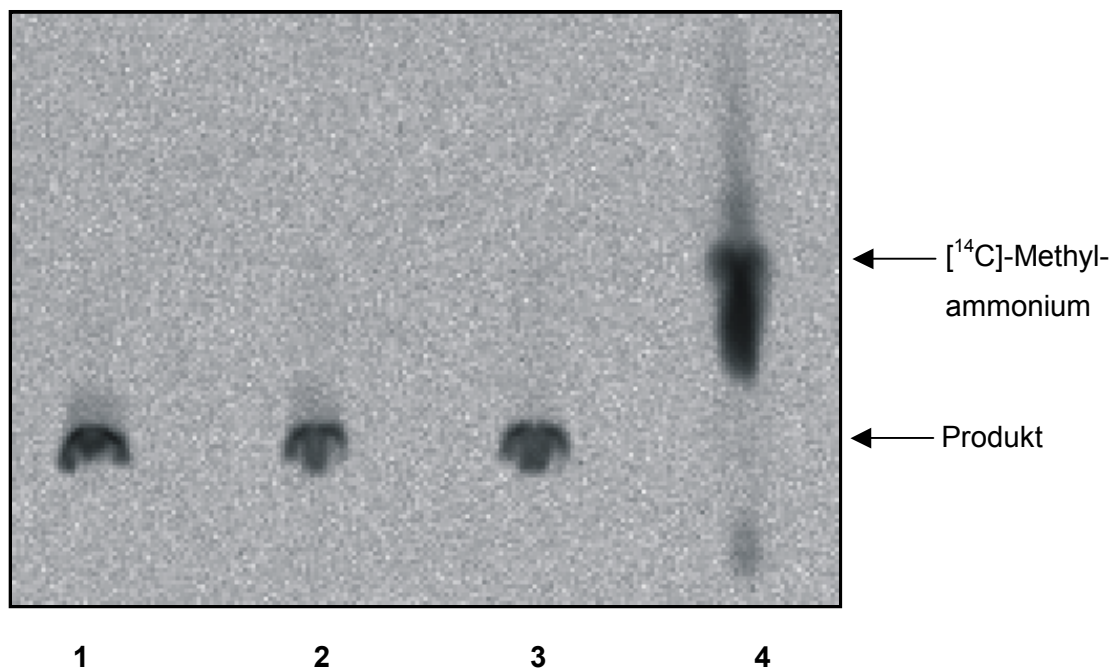
#### Abb. 6: Metabolisierung von Methylammonium

Autoradiogramm einer Dünnschichtchromatographie: Die *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032 (Spur 1), MJ2-38 (Spur 2), MJ4-26 (Spur 3) wurden mit [<sup>14</sup>C]-Methylammonium inkubiert und ihre Zellextrakte mit einer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Kontrolle wurde [<sup>14</sup>C]-Methylammonium (Spur 4) aufgetragen.

Die Ergebnisse der Metabolismusuntersuchungen der *glnA*-Mutante MJ4-26 warfen die Frage auf, warum die Methylammoniumaufnahme so gering war. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass aufgenommenes Methylammonium durch den fehlenden schnellen Umsatz durch die Glutaminsynthetase durch Waschen der Filter wieder verloren gehen kann (siehe Material und Methodenteil, Abschnitt 5.5). Diese Möglichkeit konnte in dieser Arbeit jedoch experimentell ausgeschlossen werden, da durch das Zählen der Restradioaktivität in den Waschfraktionen gezeigt werden konnte, dass nur 8 % der Radioaktivität durch Waschen der Filter verloren gingen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass in der *glnA*-Mutante das Amt-System nicht aktiv ist und so Methylammonium nur über Diffusion in die Zelle gelangen konnte. Außerdem wäre eine dritte plausible Erklärung, dass die Glutaminsynthetase tatsächlich, wie von Soupene *et al.* (1998) gefordert, die treibende Kraft der Methylammoniumaufnahme darstellt. Des Weiteren fiel auf, dass in Zellextrakten des *glnA*-Deletionsstammes MJ4-26, der keine Glutaminsynthetase-Aktivität mehr aufwies und folglich für Glutamin auxotroph war (Jakoby *et al.*, 1997), dennoch eine Metabolisierung von Methylammonium stattfand. Die Glutaminsynthetase stellt offenbar nicht das einzige Enzym dar, das Methylammonium umsetzen kann. Allerdings war es daher mit

diesen Experimenten auch nicht möglich, zwischen einer Aktivitätsregulation des Amt-Systems durch die Glutaminsynthetase oder einer Zugwirkung auf das Substrat des Amt-Systems durch den Umsatz durch die Glutaminsynthetase zu unterscheiden. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden daher weitere Experimente durchgeführt (siehe Abschnitte 1.8 und 2.4).

Um die Metabolisierung von Methylammonium in der *glnA*-Mutante MJ4-26 zu umgehen und eine Konzentrierung von Methylammonium in der Zelle zu erreichen, wurde versucht, den GS / GOGAT-Weg der Ammoniumassimilation durch Zugabe des Glutaminanalogons MSX zu blockieren. MSX hemmt in einer Konzentration von 10 mM die Reaktion der Glutaminsynthetase vollständig ( $K_i$ -Wert: 90  $\mu$ M; Tesch *et al.*, 1998). Die Assimilation von Methylammonium durch die Glutamatdehydrogenase wurde durch die Wahl der *gdh*-Deletionsmutante EB1 unterbunden. Der Stamm EB1 wurde Stickstoff-gehungert und 30 Sekunden bzw. 30 Minuten vor Zugabe von 100  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-Methylammonium mit 100 mM MSX inkubiert. Bei Zugabe von MSX sank die Methylammoniumaufnahme zwar auf 10 bis 20 % der Ausgangsrate ab, doch ließ sich anhand von Dünnschichtchromatogrammen immer noch ein vollständiger Umsatz von Methylammonium nachweisen. Abbildung 7 zeigt ein Autoradiogramm einer Dünnschichtchromatographie von *C. glutamicum* EB1-Zellextrakten ohne Zugabe von MSX (Spur 1) und mit Zugabe von MSX (30 Sekunden bzw. 30 Minuten vor Inkubation mit [ $^{14}$ C]-Methylammonium; Spur 2 bzw. Spur 3). Da es nicht möglich war den Umsatz von Methylammonium in einer *gdh*-Deletionsmutante durch Zugabe von MSX zu inhibieren, kann dies als Hinweis auf die Existenz einer weiteren (Methyl-)Ammonium-umsetzenden Aktivität gesehen werden. So fanden Jakoby *et al.* (1997) durch Southern-Hybridisierungen schon erste Hinweise auf das Vorhandensein einer zweiten Glutaminsynthetase, deren Aktivität in der *glnA*-Deletionsmutante MJ4-26 allerdings nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 7: Die Metabolisierung von Methylammonium verläuft unabhängig von der Glutamatdehydrogenase und vom GS / GOGAT-Weg**

Autoradiogramm einer Dünnschichtchromatographie. Der *gdh*-Deletionsstamm EB1 wurde ohne und mit Zugabe von MSX mit 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium inkubiert. Spur 1: ohne Zugabe von MSX; Spur 2: Zugabe von 100 mM MSX 30 Sekunden vor der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumzugabe; Spur 3: Zugabe von 100 mM MSX 30 Minuten vor der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumzugabe. Als Kontrolle wurde [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium (Spur 4) aufgetragen.

### 1.3 Konkurrenz der Methylammoniumaufnahme durch Zugabe von putativen Substraten

Zur Diskriminierung der Funktion des Amt- und des AmtB-Systems war es interessant, das Amt-System hinsichtlich eines breiteren Substratspektrums zu untersuchen. Dazu wurden Methylammoniumaufnahmemessungen in Anwesenheit der 50fachen Konzentration verschiedener putativer Substrate durchgeführt. Je eine Minute vor Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium wurden die *C. glutamicum* ATCC 13032-Kulturen mit je 5 mM Methylammonium, Dimethylammonium, Trimethylammonium, Tetramethylammonium, Ethylammonium, Propylammonium oder Butylammonium inkubiert. Die Ergebnisse dieser Messreihen sind als prozentuale Aufnahmeraten in Tabelle 4 aufgeführt. Einer relativen Rate von 100 % entspricht hier die Aufnahmerate ohne Zugabe von zusätzlichem Substrat von 24,3  $\text{nmol min}^{-1}$  ( $\text{mg TG}^{-1}$ ). Die Zugabe eines Überschusses an nicht-radioakti-

dem Methylammonium hemmte die [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme wie erwartet vollständig. Auch Dimethylammonium wurde durch das Amt-System transportiert. Allerdings sanken mit zunehmender Anzahl an substituierten Methylgruppen der eingesetzten Substanzen ihre Aufnahme durch das Amt-System, so wurden Tri- und Tetramethylammonium nicht mehr aufgenommen. Ethylammonium stellte ebenso wie Dimethylammonium ein Substrat für das Amt-System dar. Mit zunehmender Kettenlänge (Propylammonium, Butylammonium) war allerdings durch Permeabilisierung der Zellen keine Aufnahme mehr messbar. Das Amt-System besitzt also ein relativ breites Substratspektrum, das sich neben den Substraten Ammonium und Methylammonium auch auf Dimethylammonium und Ethylammonium erstreckt.

In Wachstumsexperimenten zeigte sich, dass von diesen Substraten nur Ammonium als Stickstoffquelle genutzt werden konnte. Die Methylammonium-, Dimethylammonium- und Ethylammoniumaufnahme durch das Amt-System haben daher für *C. glutamicum* unter natürlichen Bedingungen wahrscheinlich keine Bedeutung oder diese Substrate werden nur zusammen mit anderen Metaboliten kometabolisiert.

**Tab. 4: Inhibition der [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme durch Zugabe verschiedener Amine.**

Die relative [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahme bezieht sich auf die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium ohne Zugabe von zusätzlichem Substrat. Eine Aufnahme von  $24,3 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  wurden als 100 % definiert. nf.: nicht feststellbar; kein Transport messbar wegen einer Permeabilisierung der Zellen.

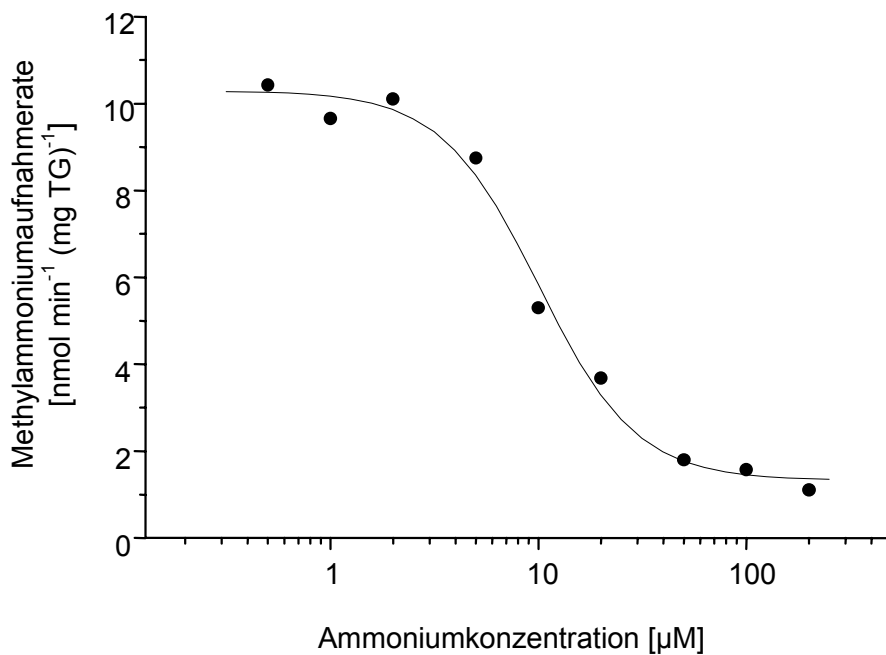
Substrat	Relative Methylammoniumaufnahme [%]
ohne	$100 \pm 4$
Methylaminhydrochlorid	$3 \pm 0$
Dimethylaminhydrochlorid	$35 \pm 2$
Trimethylaminhydrochlorid	$93 \pm 3$
Tetramethylaminhydrochlorid	$99 \pm 1$
Ethylamin	$6 \pm 0$
Propylamin	n. f.
Butylamin	n. f.



#### 1.4 Inhibierung der Methylammoniumaufnahme durch Ammonium

Das einzige Substrat des Ammoniumtransporters Amt, das von der Zelle verwertet wird, ist Ammonium, dessen direkte Aufnahmekinetik jedoch experimentell schlecht zugänglich ist, da ein geeignetes Radioisotop fehlt. Um die kinetischen Parameter zu ermitteln, wurde daher die Inhibitionskonstante  $K_i$  der Methylammoniumaufnahme für das kompetitierende Substrat Ammonium ermittelt.

In [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumaufnahmemessungen wurde die [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammoniumkonzentration mit 50  $\mu\text{M}$  konstant auf den apparenten  $K_m$ -Wert der Methylammoniumaufnahme eingestellt und steigende Mengen Ammonium zugegeben. Aus der Inhibierungskinetik in Abbildung 8 ist zu entnehmen, dass durch die Zugabe von Ammonium bis zu einer Endkonzentration von bis zu 2  $\mu\text{M}$  keine Hemmung, bei höheren Ammoniumkonzentrationen jedoch eine starke Inhibierung der Methylammoniumaufnahme stattfand. Aus Abbildung 8 kann eine halbmaximale Inhibierung der Methylammoniumaufnahme des Amt-Systems für Ammonium von 5  $\mu\text{M}$  abgeleitet werden. Allerdings deutet der Verlauf der Inhibierungskinetik auf die Existenz eines zweiten Ammoniumaufnahmesystems hin, da keine vollständige Hemmung der Aufnahme erreicht wurde. Ob es sich bei dem zweiten Ammoniumaufnahmesystem um das AmtB-System handelte, wurde im folgenden untersucht (Abschnitt 1.7).



**Abb. 8: Inhibition der [<sup>14</sup>C]-Methylammoniumaufnahme durch Ammonium**

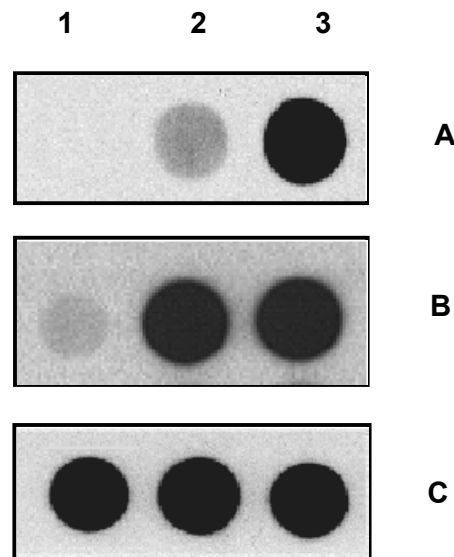
Durch Auftragung der Methylammoniumaufnahme in Abhängigkeit der zugesetzten Ammoniumkonzentration konnte ein  $K_i$ -Wert der Methylammoniumaufnahme für Ammonium von 5  $\mu$ M graphisch ermittelt werden.

### 1.5 Regulation der *amt*- und *amtB*-Transkription in Abhängigkeit des externen pH-Wertes

In dieser Arbeit wurden bisher Argumente für einen aktiven Transport von (Methyl-)Ammonium durch das Amt-System ermittelt. Um die Argumentation zu vervollständigen, war es aber zusätzlich wichtig, Informationen über die *amt*-Expression unter unterschiedlichen Bedingungen miteinzubinden. Es ist bekannt, dass die Repression der *amt*-Transkription unter Stickstoffmangelbedingungen aufgehoben wird (Jakoby *et al.*, 2000). Falls es sich bei dem corynebakteriellen Amt-System ebenso um einen Facilitator der Ammoniakaufnahme handeln sollte wie bei dem AmtB-System in *E. coli* (Soupene *et al.*, 1998), wäre es physiologisch sinnvoll, wenn die *amt*-Expression bei einem niedrigen pH-Wert des Mediums anstiege, da unter diesen Bedingungen die Ammoniakdiffusion limitierend wird und mehr Protein zur Erleichterung der Diffusion synthetisiert werden müsste. Handelt es sich jedoch um den Transport von (Methyl-)Ammonium, so ist keine erhöhte Expression des *amt*-Gens bei niedrigen pH-Werten zu erwarten. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde Gesamt-RNA aus Stickstoff-versorgten und Stickstoff-gehungenerten

ATCC 13032-Kulturen bei einem pH-Wert des Mediums von 6,0 bzw. 7,0 präpariert und in Northern-Hybridisierungsexperimenten eingesetzt. Die Ergebnisse der Northern-Hybridisierungen sind in Abbildung 9 dargestellt. Die RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Proben wurden durch eine Inkubation der Gesamt-RNA-Extrakte mit einer 16S rRNA-Antisense-Sonde (Abbildung 9 C) überprüft und erwiesen sich als konstant. Wurden Gesamt-RNA-Extrakte mit einer *amt*-Antisense-Sonde (Abbildung 9 A) behandelt, so zeigte sich keine Expression nach Wachstum in Stickstoff-haltigen CgC-Medium (Spur 1). Nach Inkubation unter Stickstoffmangelbedingungen bei einem pH-Wert des Mediums von 6,0 (Spur 2), ließ sich nur ein sehr schwaches Signal detektieren, wohingegen nach Inkubation in Medium mit einem pH-Wert von 7,0 (Spur 3) ein deutliches Signal erschien. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Erwartung, dass die *amt*-Expression nur unter Stickstoffmangelbedingungen stattfindet, zeigen aber auch, dass das *amt*-Gen bei niedrigen pH-Werten des Mediums kaum exprimiert wird und bilden so ein weiteres Argument gegen die Theorie der Ammoniakdiffusion durch das Amt-System.

Wurden die Gesamt-RNA-Extrakte jedoch mit einer *amtB*-Antisense-Sonde inkubiert, so zeigte sich ein völlig anderes Expressionsmuster (Abbildung 9 B): Eine sehr geringe *amtB*-Expression fand auch in Stickstoff-haltigem Medium statt. Unter Stickstoffmangelbedingungen wurde unabhängig vom pH-Wert des Mediums eine starke Expression beobachtet. Das AmtB-System erfüllt so eher die Anforderungen, die an einen putativen Ammoniakfacilitator gestellt werden.



**Abb. 9: Expression der Gene *amt* und *amtB***

Northern-Hybridisierung mit Gesamt-RNA-Extrakten aus *C. glutamicum* ATCC 13032. Spur 1: Nach Wachstum der Kulturen in Stickstoff-haltigem Medium; Spur 2: Nach Inkubation der Kulturen in Stickstoff-freiem Medium bei einem pH-Wert von 6,0; Spur 3: Nach Inkubation der Kulturen in Stickstoff-freiem Medium bei einem pH-Wert von 7,0; A: Hybridisierung mit einer *amt*-Antisense-Sonde; B: Hybridisierung mit einer *amtB*-Antisense-Sonde; C: Hybridisierung mit einer 16S rRNA-Sonde.

### 1.6 Der pH-Wert hat keinen Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum*-Stämmen bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen

Zur Analyse der genauen Funktionen des Amt- und des AmtB-Systems, bzw. des Konzeptes der Ammoniumaufnahme in *C. glutamicum*, wurden Wachstumsexperimente bei verschiedenen pH-Werten und mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen im Medium durchgeführt. Diese Versuche basierten auf der Hypothese, dass bei einem niedrigen pH-Wert die Konzentration der unprotonierten Form des Ammoniums, des Ammoniaks, sehr gering ist und die Diffusion bzw. die Aufnahme von Ammoniak als Substrat limitierend wird (Soupene *et al.*, 1998). Aus diesem Grund würde, falls Ammoniak die transportierte Spezies darstellte, ein Unterschied im Wachstum von *C. glutamicum*-Wildtyp-Kulturen und *amt*- bzw. *amtB*-defizienter Stämme erwartet. Der *C. glutamicum*-Wildtypstamm ATCC 13032, die *amt*-Deletionsmutante MJ2-38, die *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 und die *amt-amtB*-Deletionsmutante LN-1.2 wurden nach Anzucht in Minimalmedium in Stickstoff-freiem Minimalmedium (CgCoCN-Medium) mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen (0,05; 0,1; 1 und 5 mM Ammoniumchlorid) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 6,0; 6,5;

7,0; 7,5; 8,0) über sechs bis acht Stunden inkubiert und stündlich das Wachstum der Kulturen verfolgt. In Tabelle 5 sind die Verdopplungszeiten der jeweiligen Stämme unter den relevanten Bedingungen aufgelistet.

**Tab. 5: Wachstum bei Zugabe verschiedener Ammoniumkonzentrationen**

Verdopplungszeiten der *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032, MJ2-38, LN-1.1 und LN-1.2 bei Wachstum in Minimalmedium mit Ammoniumkonzentrationen von 0,05 mM, 1 mM und 5 mM. Bei Wachstum mit Ammoniumkonzentrationen von 0,05 und 1 mM wurden zusätzlich die pH-Werte des Mediums von 6,5 bis 8,0 variiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Verdopplungszeiten der jeweiligen Stämme. Die aufgeführten End-ODs geben die Abweichungen der verschiedenen Stämme bei Wachstum in Medium mit unterschiedlichen pH-Werten wieder. Die Wachstumsexperimente wurden mit Zellkulturen einer  $OD_{600}$  von 0,5 bzw. bei einer Ammoniumkonzentration von 5 mM mit einer  $OD_{600}$  von 1 begonnen. Innerhalb von sechs Stunden verdoppelte sich die Zellzahl bis zu zweimal. Nach sechs Stunden war das zugesetzte Ammonium aufgebraucht und die Kulturen traten in die stationäre Phase ein.

Ammoniumkonzentration [mM]					End- OD <sub>600</sub>
	ATCC 13032	MJ2-38	LN-1.1	LN-1.2	
<b>Verdopplungszeit [h]</b>					
0,05	4,0	4,0	4,0	3,5	1 ± 0,1
1	3,0	3,0	-	-	1,5 ± 0,2
<b>Verdopplungszeit [h] nach 3-stündigem Stickstoffmangel</b>					
1	4,0	3,5	4,0	4,0	1,5
5	2,0	1,5	1,5	1,5	4,0

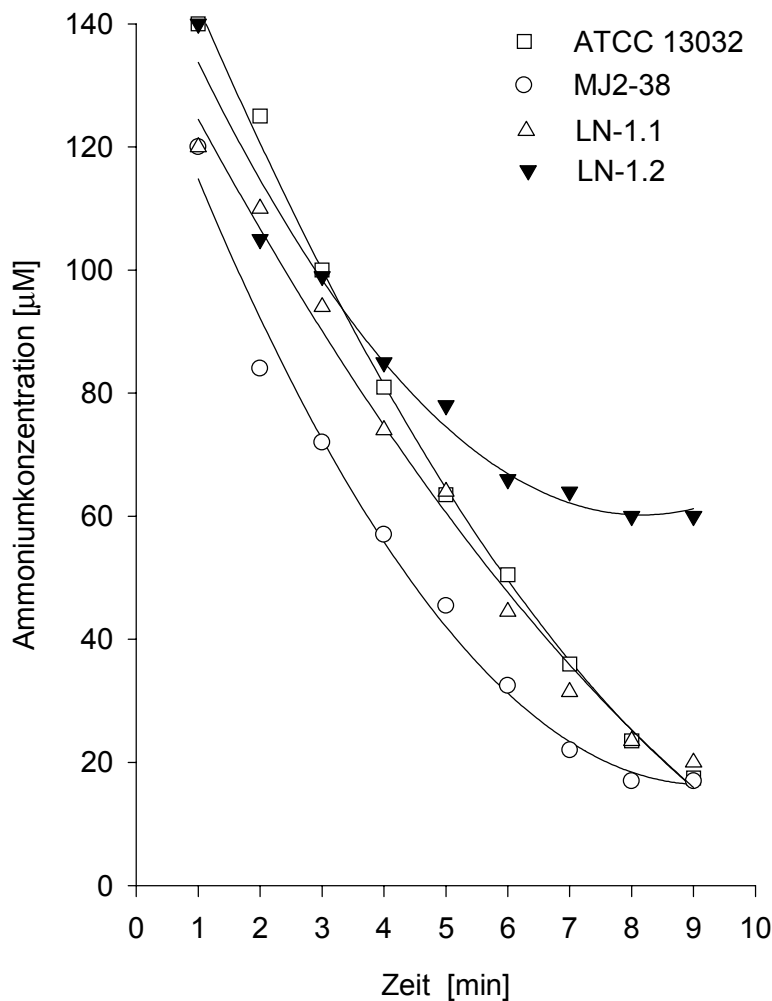
Bei einem pH-Wert von 6,0 war generell kein Wachstum der Stämme mehr möglich. Außerdem ließen sich keine signifikanten Wachstumsunterschiede im Vergleich der vier Stämme zueinander und im Vergleich ihrer Wachstumsraten bei pH-Werten des Mediums zwischen 6,5 und 8,0 erkennen. Die Wachstumsrate war unter den getesteten Bedingungen ausschließlich von der zugesetzten Ammoniumkonzentration abhängig. Bei Zugabe von nur 0,05 mM Ammonium kam es insgesamt nur zu einer Verdopplung innerhalb von sechs Stunden, wohingegen es bei einer Zugabe von 5 mM Ammonium zu zwei Verdopplungen der Zellzahl innerhalb von drei Stunden kam. Nach dieser Zeit konnte kein Ammonium mehr im Medium nachgewiesen werden, wodurch die Stagnation des Wachstums zu erklären ist. Die ähnlichen Verdopplungszeiten der vier Stämme bei Wachstumsexperimenten mit niedrigen Ammoniumkonzentrationen, entsprachen nicht der

Annahme, dass durch den Verlust von Ammoniumtransportern, die Ammoniumaufnahme durch Diffusion limitierend wird und dadurch ein Wachstumsnachteil der Mutanten im Vergleich zum Typstamm ATCC 13032 entstehen sollte. Es stellte sich daher die Frage, inwiefern unter diesen Bedingungen tatsächlich die Stagnation der Wachstumsrate mit einer fehlenden Ammoniumaufnahme zusammenhängt. Um dies zu überprüfen wurden die Kulturen nach Anzucht in Minimalmedium mit Stickstoffquellen in Minimalmedium ohne jegliche extern zugesetzte Stickstoffquelle für drei Stunden inkubiert und dabei die Zunahmen der optischen Dichten verfolgt. Für eine kurze Zeit wurde eine ähnliche Wachstumsrate wie bei Zugabe von 0,05 mM Ammonium erreicht (eine Verdopplung in vier Stunden), bevor das Zellwachstum in die stationäre Phase eintrat. Offensichtlich ist *C. glutamicum* in der Lage, für eine kurze Zeit den Effekt des Ammoniummangels zu umgehen, indem es intrazellulär angehäufte Stickstoffquellen wie Glutamat und Glutamin mobilisiert. Es wurden bis zu 200 mM internes Glutamat (Krämer und Lambert, 1990) und 50 mM internes Glutamin (Tesch *et al.*, 1999) in *C. glutamicum*-Zellen, gezogen in Minimalmedium, nachgewiesen. Wachstumsexperimente stellen offensichtlich in *C. glutamicum* keine Möglichkeit dar, die physiologische Rolle der Amt- und AmtB-Systeme zu unterscheiden.

### 1.7 Messungen der Ammoniumaufnahme verschiedener *C. glutamicum*-Stämme

Zur Aufklärung des Unterschiedes zwischen dem Amt- und dem AmtB-System und zur Zuweisung einer Funktion für das AmtB-System, wurde die Abnahme von Ammonium im Medium mit Hilfe einer Ammonium-Elektrode direkt bestimmt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.4.2). Auf diese Weise war es auch möglich, die Effekte durch intern gespeichertes Glutamat und Glutamin zu umgehen. Die *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032, MJ2-38, LN-1.1 und LN-1.2 wurden in Stickstoff-haltigem Minimalmedium angezogen und dann für drei Stunden in Stickstoff-freiem Minimalmedium inkubiert, um die internen Stickstoffvorräte zu abzubauen. Dann wurden die Kulturen mit einer optischen Dichte von 5 mit Ammoniumchlorid auf eine Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  Ammonium gebracht und über einen Zeitraum von zehn Minuten in Minutenabständen Proben der Kulturen entnommen und abfiltriert. Die Ammoniumkonzentrationen der Filtrate wurden dann mit Hilfe einer Ammonium-Elektrode bestimmt und die Abnahmen der Ammoniumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt (siehe Abbildung 10). Aus den linearen Anfangsbereichen der Abnahmekinetiken wurden die Ammoniumaufnahme-raten errechnet. So ergab sich für den Wildtypstamm ATCC 13032 eine Rate von etwa  $9 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ . Diese Rate stimmt mit den gemessenen Methylammoniumaufnahme-raten überein (Abschnitte 1.1 und 1.2). Die Transportraten der *amt*- und *amtB*-

Deletionsmutanten MJ2-38 und LN-1.1 betragen  $7$  und  $8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ . Für die *amt-amtB*-Doppelmutante LN-1.2 zeigte sich eine biphasische Abnahme der Ammoniumkonzentration in den Filtraten. Direkt nach der Zugabe von Ammonium wurde es mit einer Rate von etwa  $5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  bis zur einer Konzentration von  $65 \text{ }\mu\text{M}$  Ammonium im Medium aufgenommen. Bei Ammoniumkonzentrationen geringer als  $65 \text{ }\mu\text{M}$  fand keine Aufnahme mehr statt. Diese Daten lassen folgende Schlussfolgerungen zu: 1. Da die *amt*-Deletionsmutante MJ2-38 und die *amtB*-Deletionsmutante LN-1.1 vergleichbare Ammoniumaufnahmeleistungen aufweisen, kann ein Defekt des Amt-Systems offensichtlich durch das AmtB-System komplementiert werden und ebenso ein Defekt des AmtB-Systems durch das Amt-System ausgeglichen werden. 2. Da die *amt-amtB*-Doppelmutante LN-1.2 eine geringere Ammoniumaufnahmeleistung zeigt als die *amtB*-Mutante LN-1.1, stellt das AmtB-System offenbar ein Ammonium-spezifisches Aufnahmesystem dar. Ein ähnliches Szenario zeigt sich bei *Rhodobacter sphaeroides* (Cordts und Gibson, 1987). Auch hier fand man eine Ammonium-spezifische-Permease neben einer Methylammonium-Ammonium-Permease. 3. Es besteht die Möglichkeit der Existenz eines dritten niedrigaffinen Ammoniumtransporters (AmtN), da in der Doppelmutante LN-1.2 bis zu  $65 \text{ }\mu\text{M}$  Ammonium noch eine deutliche Aufnahme von Ammonium verfolgt werden konnte. Außerdem zeigte sich bei der Genom-Sequenzierung von *C. glutamicum* durch die Degussa-Hüls AG ein offenes Leseraster mit Ähnlichkeiten zu den *amt*- und *amtB*-Sequenzen. Möglicherweise wird also durch dieses offene Leseraster ein weiteres Gen für ein Ammoniumaufnahmeleistungssystem kodiert.



**Abb. 10: Bestimmung der Ammoniumaufnahme in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen**

Abnahme der Ammoniumkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit in Kulturüberständen der *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032, MJ2-38, LN-1.1 und LN-1.2.

### 1.8 Ermittlung des apparenten $K_m$ -Wertes für den Methylammoniumumsatz durch die Glutaminsynthetase

Um die Affinität des Ammoniumtransporters Amt im Vergleich zu der Affinität der Glutaminsynthetase zu dem Substrat Methylammonium zu untersuchen, wurde der apparente  $K_m$ -Wert der Glutaminsynthetase für Methylammonium ermittelt. Der  $K_m$ -Wert der Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum* für Ammonium wurde durch Tachiki *et al.* (1981; 1983) auf 1,1 bis 5 mM bestimmt. Zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes der Glutaminsynthetase für Methylammonium in *C. glutamicum* wurden Zellextrakte aus Stickstoff-gehungerten



ATCC 13032-Kulturen hergestellt und ihre Glutaminsynthetase-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Zugabe steigender Methylammoniumkonzentrationen bestimmt. Es wurde Methylammonium in einem Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 10 mM in die Aktivitätstests eingesetzt. Es konnte aber mit der Zugabe steigender Methylammoniumkonzentrationen keine Verminderung der Glutaminsynthetase-Aktivität beobachtet werden. Alle ermittelten spezifischen Glutaminsynthetase-Aktivitäten lagen in einem Bereich zwischen 0,7 und 0,9  $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Glutaminsynthetase entweder eine sehr niedrige Affinität zu Methylammonium aufweist (der  $K_m$ -Wert für Methylammonium ist größer als 10 mM) oder es gar nicht als Substrat akzeptiert. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass der Metabolismus durch die Glutaminsynthetase keine Zugwirkung auf die Aufnahme von Methylammonium durch das Amt-System haben kann, wie es von Soupene *et al.* (1998) für AmtB aus *E. coli* gefordert wurde, da der apparente  $K_m$ -Wert der corynebakteriellen Glutaminsynthetase für Methylammonium über 10 mM liegen muss.

## 2. Regulation des Amt-Systems auf Aktivitätsebene

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde auf den Mechanismus der (Methyl-)Ammoniumaufnahme durch das Amt-System eingegangen. Bei der Untersuchung des Methylammoniummetabolismus wurde deutlich, dass Methylammonium sofort fixiert wird. Unter den untersuchten Stickstoffmangelbedingungen sollte die Assimilation durch die Glutaminsynthetase katalysiert werden. Um nach der Membranpotenzial-abhängigen Aufnahme von (Methyl-)Ammonium einen Abbau des Protonenpotenzials durch einen „futile cycle“ zu verhindern erscheint, ist eine regulatorische Interaktion der Glutaminsynthetase mit dem Ammoniumtransporter physiologisch sinnvoll. Jakoby (1998) fand tatsächlich erste Hinweise auf eine putative Protein-Protein Wechselwirkung zwischen dem Amt-System und der Glutaminsynthetase. Im folgenden wurde in dieser Arbeit die Regulation der Ammoniumassimilation durch eine geforderte Protein-Protein Wechselwirkung zwischen der Glutaminsynthetase und dem Amt-System untersucht.

### 2.1 Untersuchung der Topologie des Amt-Systems

Die Klärung der Topologie des Amt-Systems und seiner Orientierung in der Membran stellte eine wichtige Grundlage zur Identifizierung potenziell interagierender Proteinbereiche in späteren Wechselwirkungsstudien mit der Glutaminsynthetase dar. Jakoby (1998) konnte mit Hilfe von Aminosäuresequenzanalysen zeigen, dass der carboxyterminale Bereich des Amt-Systems hohe Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz des aktiven Zen-

trums der Glutaminsynthetase aufweist (41 % Sequenzidentität über einen Bereich von 44 Aminosäureresten). Bezugnehmend auf die Topologie des AmtB-Systems aus *E. coli* (Thomas *et al.*, 2000), bei dem der Carboxyterminus im Zytoplasma lokalisiert ist, wurden computergestützte Topologievorhersagen für das Amt-System aus *C. glutamicum* erstellt. Nach diesen Vorhersagen besitzt das Amt-System entweder 11 Transmembranhelices mit einem hydrophilen, zytoplasmatischen Carboxyterminus („DAS“ - Transmembrane Prediction Server und Top Pred 2, Protein Prediction Server, Universität Stockholm [von Heinje, 1992]) oder 10 Transmembranhelices und eine extrazytoplasmatische, carboxyterminale Extension (PHDThtm, Phd Topology, EMBL, Heidelberg). In beiden Topologievariationen werden die Helices 1 bis 7 für ähnliche Aminosäuresequenzabschnitte vorhergesagt. Die Modelle unterscheiden sich in der Vorhersage der Helix 8. Im 10-Transmembranhelicesmodell bilden die Aminosäurereste 265 - 292 eine Helix (Helix 8, siehe Abbildung 11). Im 11-Transmembranhelicesmodell bilden entweder die Aminosäurereste 259 - 279 und 284 - 304 (Top Pred 2) bzw. 272 - 273 und 285 - 298 („DAS“) die Helices 8a und 8b. In allen Vorhersageprogrammen wurde der Aminoterminus des Amt-Systems als extrazytoplasmatisch bestimmt.

Befindet sich die carboxyterminale Extension im Zytoplasma, so wäre sie ein möglicher Angriffspunkt für die Aktivitätsregulation des Amt-Systems durch die Glutaminsynthetase. Befindet sie sich extrazellulär, so könnte sie eventuell an der extrazellulären Substratbindung beteiligt sein. Zur Aufklärung der Topologie des Amt-Systems wurden *phoA*- und *lacZ*-Fusionen eingesetzt. Das *amt*-Gen wurde dafür aus dem Plasmid pUCdppc mit den Enzymen *Hind*II - *Mlu*NI, *Hind*II - *Av*II, *Hind*II - *Bgl*II und *Hind*II - *Sac*I ausgeschnitten (siehe Abbildung 11), in die Vektoren pPA4 (*Sma*I und *Pml*I bzw. *Sma*I und *Hpa*I geschnitten) und pJL30 bzw. pJL28 (*Sma*I geschnitten) ligiert und in die *E. coli* Stämme JM109 ( $\Delta$ *lacZ*) bzw. CP79*phoA* ( $\Delta$ *phoA*) transformiert.

Topologieuntersuchungen an Membranproteinen mittels alkalischer Phosphatase (*phoA*, auf dem Vektor pPA4 kodiert) beruhen auf der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase von ihrer zellulären Lokalisation (Manoil und Beckwith, 1985). Die alkalische Phosphatase zeigt nur im Periplasma hohe Aktivität und ist im Zytoplasma inaktiv, da dort die Ausbildung von Disulfidbrücken nicht möglich ist und somit keine korrekte Faltung erfolgen kann (Derman und Beckwith, 1991). Bei der *phoA*-Analyse von Membranproteinen verwendet man das *phoA*-Gen aus *E. coli* ohne Promotor und Signalsequenz als Reporter gen. Werden die Fusionen aus Membranproteinbereichen und der alkalischen Phosphatase über die Zytoplasmamembran aus der Zelle geschleust, so ist die alkalische Phosphatase funktionell und wandelt die chromogene Substanz XP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat) zu 5-Bromo-4-Chloroindoxyl um, das an der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichlorindigo oxidiert.

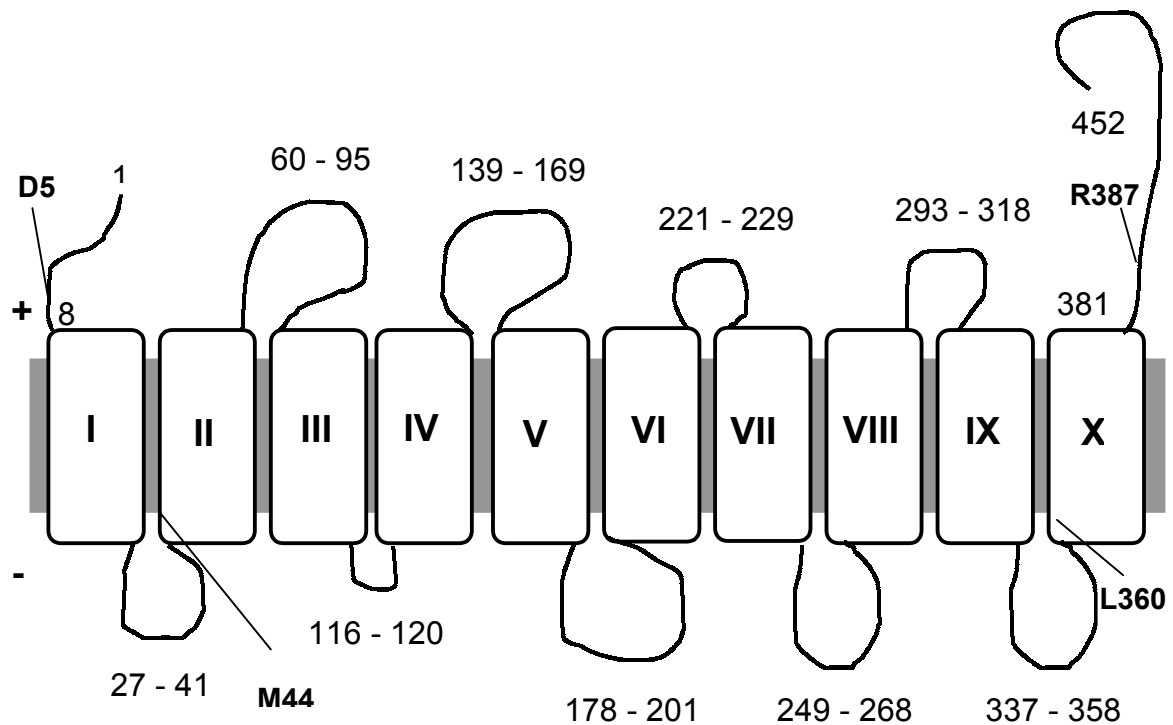
Die  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*, auf dem Vektor pJL30 kodiert) ist im Gegensatz zu der alkalischen Phosphatase nur innerhalb der Zellen aktiv (Michaelis und Beckwith, 1982; Beckwith und Silhavy, 1983) und wandelt dort XG (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) in einen blauen Farbstoff um. In Plattentests wurde überprüft, ob die pJL30*amt*-Konstrukte transformiert in den Stamm JM109 bzw. die pPA4*amt*-Konstrukte transformiert in den Stamm CP79*phoA* auf LB-Platten mit XG bzw. XP eine Blaufärbung zeigen oder weiß blieben (siehe Tabelle 6).

**Tab. 6: Genfusionen zur Aufklärung der Topologie des Amt-Systems**

Färbung *lacZ-amt* und *phoA-amt* exprimierender *E. coli*-Zellen im Plattentest auf XG- und XP-haltigen Platten.

<b><i>amt</i>-Sequenz</b>	<b><math>\beta</math>-Galaktosidase</b>	<b>alkalische Phosphatase</b>
<i>HindII</i> - <i>MluNI</i>	blau	weiß
<i>HindII</i> - <i>AvII</i>	-	blau
<i>HindII</i> - <i>SacI</i>	blau	weiß
<i>HindII</i> - <i>BglII</i>	weiß	-

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgende Topologie des Amt-Systems ableiten (siehe Abbildung 11): Im Einklang mit der computergestützten Topologievorhersage PHDThtm (Phd Topology, EMBL, Heidelberg) befindet sich die aminoterminal Extension extra-zytoplasmatisch (*HindII* - *BglII* - Konstrukte). Mit Hilfe des *HindII* - *AvII*-Konstruktes ließ sich die carboxyterminale Extension ebenfalls als extrazytoplasmatisch nachweisen. Diese Extension steht daher nicht für eine Wechselwirkung mit der Glutaminsynthetase zur Verfügung. Durch die *lacZ*- und *phoA*-Analysen wird zusammenfassend das 10-Transmembranhelicesmodell für das Amt-System bestätigt, wobei die genaue Topologie der Helices 3 bis 9 nicht experimentell überprüft wurde und auf computergestützten Vorhersagen basiert.



**Abb. 11: Das Topologiemodell des Amt-Systems**

Die computergestützte Vorhersage durch das Programm PHDThtm (Phd Topology, EMBL) wurde durch *phoA*- und *lacZ*-Fusionen gestützt. Die Aminosäurereste D5, M44, L360 und R387 entsprechen auf Nukleotidsequenzbasis den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bgl*III, *Sac*I, *Mlu*NI und *Av*II. Ihre Lokalisation wurde experimentell überprüft.

Ausgehend von verschiedenen computergestützten Topologievorhersageprogrammen wurden auch für den Ammoniumtransporter AmtB verschiedene Topologiemodelle erstellt: So wurden von PHDThtm (EMBL, Heidelberg) und „DAS“ (Transmembrane-Prediction-Server) 10 Transmembranhelices vorhergesagt. PHDThtm legte analog zu der Topologie des Amt-Systems die aminoternale und die carboxyterminale Region als extrazytoplasmatisch fest. Das Programm meta-Tmhm (EMBL, Heidelberg) dagegen sagte für das AmtB-System 11 Transmembranhelices mit einer zytoplasmatischen, carboxyterminalen Extension voraus. Analog zu den Vorhersagen für das Amt-System stimmen die Vorhersagen für die verschiedenen Modelle in den Helices 1 bis 7 und 9 und 10 überein. Im 11-Transmembranhelicesmodell werden in der Region um die achte Helix jedoch 2 Helices 8a und 8b vorhergesagt (Aminosäuresequenz 289 - 307 und 311 - 329).

## 2.2. Isolierung der Glutaminsynthetase und Gewinnung eines polyklonalen Antiserums

Für eine immunologische Nachweisbarkeit der Glutaminsynthetase in Expressionsstudien, war es notwendig, ein polyklonales Antiserum gegen die Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum* herzustellen. Aus diesem Grund wurde die Glutaminsynthetase heterolog in *E. coli* produziert und isoliert. Zur Reinigung der Glutaminsynthetase kamen verschiedene Systeme zur Anwendung.

### 2.2.1 Isolierung der Glutaminsynthetase als MBP-Fusionsprotein

Das „Protein Fusion & Purification System“ von New England Biolabs wurde, wie unter Abschnitt 5.8.1 im Material und Methodenteil für AmtR beschrieben, auch zur Reinigung der Glutaminsynthetase eingesetzt. Das *glnA*-Gen wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *scaglnA* und *xbaglnA* amplifiziert und konnte durch die Einführung von Restriktionsendonuklease-Schnittstellen (5′-*Scal* und 3′-*XbaI*) nach Zwischenklonierung in den Vektor pUC19 (ergab das Plasmid pUC19*glnA*) in den Vektor pMAL-c2 eingeführt werden. Das entstandene Plasmid pM*glnA* wurde in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ *mcr* transformiert und die Fusion aus MBP und Glutaminsynthetase durch Zugabe von IPTG überproduziert. Das Fusionsprotein stellte etwa 30 % des Gesamtproteingehalts dar. Dies entsprach etwa 17 mg Fusionsprotein pro Liter Kultur. Nach Aufschluss der Zellen und Auftragung der Zellextrakte auf eine Amylosesäule, wurde die Fusion aus MBP und Glutaminsynthetase durch Zugabe von Puffer mit 10 mM Maltose eluiert. In den Elutionsfraktionen konnten mittels SDS-PAGE Proteinbanden mit einer molekularen Masse von etwa 100 kDa, die der Masse des Fusionsproteins entsprachen, nachgewiesen werden. Allerdings waren alle Elutionsfraktionen mit unspezifischen *E. coli*-eigenen Proteinen verunreinigt, die sich auch nicht durch Änderung des Reinigungsprotokolls abtrennen ließen. Zur Trennung des Fusionproteins in MBP und Glutaminsynthetase wurde die Fusion mit der Endoprotease Faktor Xa behandelt, die aufgrund der Klonierungsstrategie eine Schnittstelle am Carboxyterminus des MBP nach der Erkennungssequenz Ile - Glu - Gly - Arg besitzt. Nach erfolgreicher Spaltung in das MBP (42 kDa) und die Glutaminsynthetase (56 kDa; Park *et al.*, 1989) wurde die Glutaminsynthetase durch elektrophoretische Auftrennung von allen anderen Proteinen separiert.

### 2.2.2 Isolierung der Glutaminsynthetase durch Elektroelution und Erzeugung eines polyklonalen Antiserums

Zur vollständigen Reinigung der Glutaminsynthetase mit dem Ziel der Antikörperproduktion, wurde die Glutaminsynthetase wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben produziert, mittels einer Amylosesäule vorgereinigt und durch Proteolyse von dem MBP getrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine, wurden die Banden, die einer molekularen Masse von 56 kDa entsprachen und somit die Glutaminsynthetase darstellten, ausgeschnitten und elektroeluiert. Nach Lyophilisierung wurden 0,75 mg Glutaminsynthetase zur Erzeugung eines polyklonalen Antiserums zu Pineda Antikörper-Service gesandt. Dort wurden zwei Meerschweinchen gegen die corynebakterielle Glutaminsynthetase immunisiert und das Serum am 85. Tag der Immunisierung entnommen. Das Antiserum gegen die Glutaminsynthetase konnte erfolgreich in einer Verdünnung von 1 / 10.000 für den spezifischen Nachweis der Glutaminsynthetase in *C. glutamicum*-Zellextrakten nach Anzucht auf Minimalmedium (mit oder ohne Stickstoffquellen) eingesetzt werden. In *C. glutamicum*-Zellextrakten kommt es zu keiner definierten Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen. Zum Nachweis von heterolog in *E. coli* produzierter Glutaminsynthetase ist das Antiserum jedoch nicht einsetzbar, da es mit vielen *E. coli*-eigenen Proteinen unspezifisch reagiert. Kreuzreaktionen von Antiseren mit *E. coli*-eigenen Proteinen treten sehr häufig auf, da es generell schwierig ist, Tiere steril aufzuziehen.

### 2.2.3 Reinigung der Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum*-Zellextrakten

Streicher und Tyler (1980) beschreiben eine Methode zur Isolierung nativer Glutaminsynthetase aus Zellextrakten durch Fällungen der Proteine mit PEG und anschließenden Zentrifugationsschritten. Nach dieser Methode konnte die Glutaminsynthetase aus Stickstoff-gehungerten *C. glutamicum* ATCC 13032-Zellen isoliert und mittels Western-Hybridisierung nachgewiesen werden. Es fiel auf, dass die Glutaminsynthetase in einer SDS-PAGE und bei Western-Hybridisierungen immer als Doppelbande auftrat. Das gleiche Phänomen wurde auch bei *Klebsiella aerogenes* beobachtet und mit der Existenz der adenylylierten und der undadenylylierten Form der Glutaminsynthetase in den Extrakten erklärt (Streicher und Tyler, 1980).

### 2.3 Reinigung des Repressors der *amt*-Transkription AmtR und Herstellung eines polyklonalen Antiserums

Der Transkriptionsregulator AmtR reprimiert bei Stickstoffüberschuss die Expression des *amt*-Gens und einiger anderer Gene, die bei der Stickstoffregulation eine Rolle spielen (Jakoby *et al.*, 2000). Außerdem stellt AmtR einen putativen Wechselwirkungspartner für das P<sub>II</sub>-Protein dar, indem er möglicherweise an der Signalweiterleitung zu P<sub>II</sub> beteiligt ist. Des Weiteren ist für das PTS-System aus *E. coli* bekannt, dass Transkriptionsregulatoren auch auf Ebene der Aktivitätsregulation wirken können (Zeppenfeld *et al.*, 2000). So wäre es möglich, dass AmtR nicht nur die Transkription des *amt*-Gens unter Stickstoffüberschussbedingungen reprimiert, sondern auch mit dem Transporter Amt selber wechselwirkt. AmtR ist also ein globaler Regulator des Stickstoffkontrollsystems, dessen Isolierung in aktiver Form eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von DNA-Bindestudien und Protein-Protein Wechselwirkungsanalysen darstellte.

#### 2.3.1 Reinigung des Repressors der *amt*-Transkription AmtR

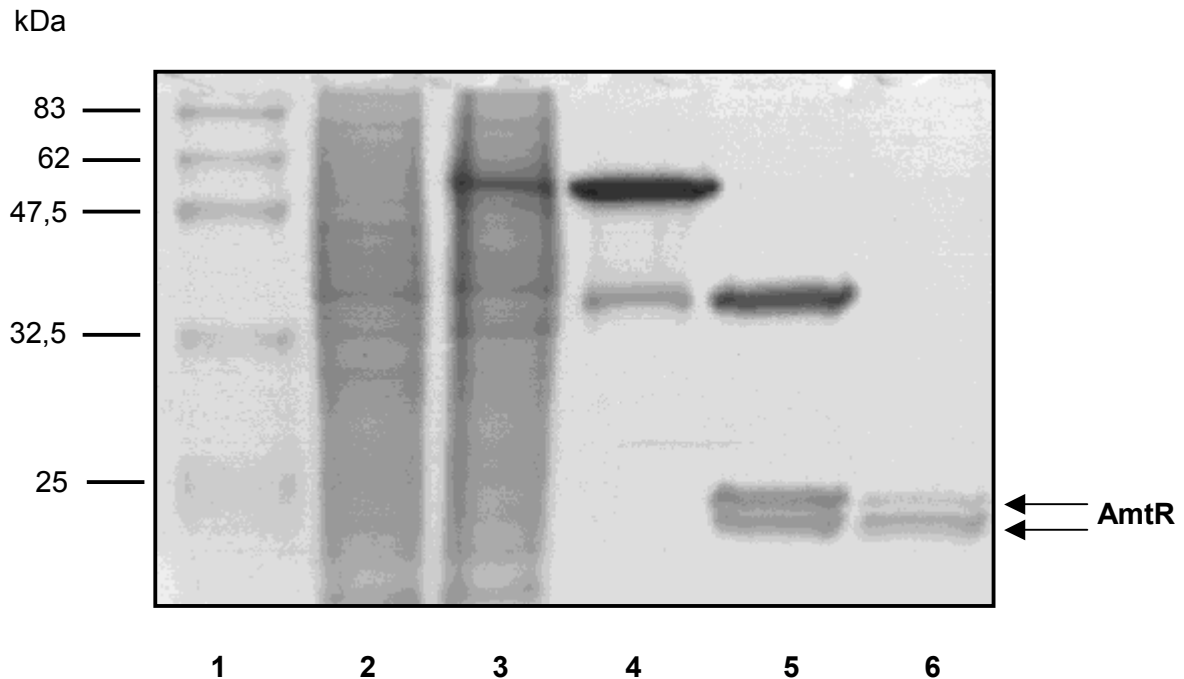
Zur Reinigung von AmtR wurde wie im Material und Methodenteil unter Abschnitt 5.8 beschrieben, das „Protein Fusion & Purification System“ von New England Biolabs eingesetzt. Die Überproduktion der Proteinfusion war in dem proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21 möglich. Hier konnten durchschnittlich 80 mg Fusionsprotein pro Liter Kultur mit Hilfe einer Amylosesäule gereinigt werden. Nach Proteolyse der Fusion und Ankonzentrierung der Proteine war eine eingeschränkte Trennung von MBP und AmtR über Gelfiltration möglich, da beide Proteine um eine Fraktion versetzt zueinander in denselben Fraktionen eluierten. Eine SDS-PAGE, die den Verlauf der Reinigung dokumentiert, ist in Abbildung 12 dargestellt. Man erkennt deutlich die Proteinbande bei etwa 60 kDa, die der Masse der überproduzierten Proteinfusion entspricht (Spur 3). Nach Durchführung einer Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Amylosesäule wurde das Fusionsprotein in sauberer Form eluiert (Spur 4) und konnte mit Hilfe des Faktors Xa der Blutgerinnungskaskade gespalten werden (Spur 5). Die Fusion aus MBP und AmtR ist allerdings relativ instabil, so dass es auch ohne Zugabe der Protease Faktor Xa zum unspezifischen Zerfall der Fusion kam. Das MBP tritt in der SDS-PAGE als Bande bei 42 kDa auf, während AmtR ein apparentes Molekulargewicht von 23 kDa besitzt. Spur 6 zeigt das saubere AmtR-Protein nach einer Gelfiltration. Nach Proteolyse der Fusion aus MBP und AmtR durch den Faktor Xa, fiel auf, dass AmtR stets als Doppelbande und in 10 % der Fälle auch als Dreifachbande auftrat. Zur Klärung dieses Phänomens wurde AmtR im Labor von Dr. R. Schmid (Universität Osnabrück) aminoterminal ansequenziert. Es stellte sich

heraus, dass beide Proteinbanden AmtR in einer vollständigen und in einer prozessierten Form darstellen. Die aminoternale Sequenz der prozessierten Form wurde mit RAGKNPREEILDASAELFTRQGF bestimmt und deutet auf den Verlust von 13 Aminosäureresten im Vergleich zum nativen AmtR-Protein hin. In weniger als 10 % der AmtR-Probe zeigte sich auch der Verlust des aminoterminalen Arginylrestes (R). Es ist wahrscheinlich, dass die Protease Faktor Xa unspezifisch schneidet und so AmtR um 13 bzw. 14 aminoternale Aminosäurereste verkürzt wurde.

Das MBP ließ sich in verschiedenen Reinigungsverläufen anderer Proteine nicht von den zu reinigenden Proteinen abtrennen (Ingeborg Feil, EMBL, Hamburg und Daniel Schlieper, pers. Mitteilung). Auch in diesem Fall teilen das MBP und AmtR viele physikalischen Eigenschaften. So wurde der isoelektrische Punkt von AmtR durch isoelektrische Fokussierung auf 4,5 bestimmt (Daniel Schlieper, pers. Mitteilung). Das MBP besitzt einen ähnlichen isoelektrischen Punkt. Durch den Vergleich von Elutionsprofilen einer Gelfiltration ließ sich die Masse, mit der AmtR von der Säule eluiert wurde, mit 50 kDa bestimmen. Da das apparente Molekulargewicht von AmtR jedoch mittels MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight)-Massenspektrometrie auf 22,9 und 21,2 kDa bestimmt wurde (Guido Sonsmann, pers. Mitteilung), war dies ein starker Hinweis darauf, dass AmtR als Dimer auftritt.

Nach Reinigung und Entsalzen des AmtR-Proteins, konnte AmtR erfolgreich in DNA-Bindestudien eingesetzt und die DNA-Bindestelle identifiziert werden (Lars Nolden, pers. Mitteilung). Dies zeigt, dass AmtR mittels der beschriebenen Methode in aktiver Form gereinigt werden konnte.





**Abb.12: SDS-PAGE der AmtR-Reinigung**

Spur 1: Proteinmarker (7708; New England Biolabs); Spur 2: Zellextrakt mit uninduziertem MBP-AmtR; Spur 3: Zellextrakt mit induziertem MBP-AmtR; Spur 4: MBP-AmtR nach Reinigung durch eine Amylosesäule; Spur 5: MBP und AmtR nach Proteolyse durch Faktor Xa; Spur 6: AmtR nach Reinigung durch Gelfiltration (Superdex 75).

### 2.3.2 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen AmtR

Die Fusion aus MBP und AmtR wurde wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben produziert, mit Hilfe einer Amylosesäule gereinigt und durch Proteolyse getrennt. Durch elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine separiert und die Banden in der SDS-PAGE, die einer molekularen Masse von 23 kDa entsprachen, ausgeschnitten und elektroeluiert. Nach Lyophilisierung der AmtR-Lösung wurden 1,5 mg Protein zur Immunisierung zweier Meerschweinchen zu Pineda Antikörper-Service gesandt.

### 2.3.3 AmtR-Kristallisation

In Zusammenarbeit mit Daniel Schlieper (Arbeitsgruppe Prof. Schomburg, Universität zu Köln) wurde mit der Kristallisation der Proteinfusion aus MBP und AmtR begonnen. Diese

Methode hat den Vorteil, dass nach einer gelungenen Kristallisation die Berechnung der Kristalle durch die schon bekannten Anteile des MBP wesentlich vereinfacht wird.

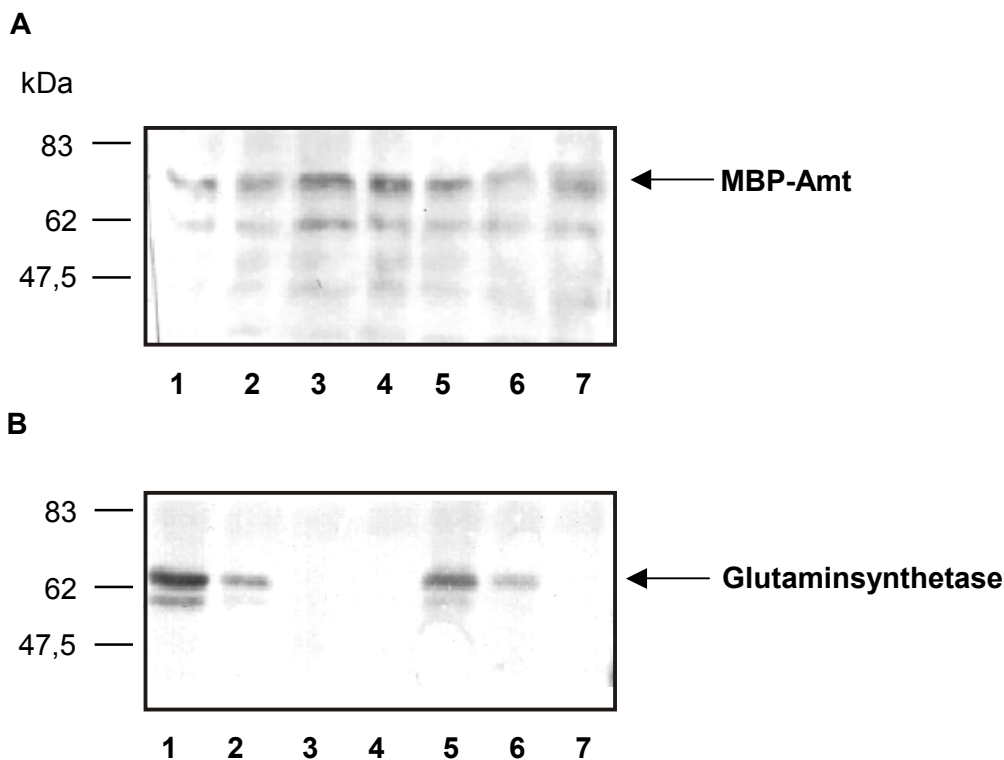
Der Nachteil dieser Kokristallisation besteht jedoch darin, dass sich aufgrund der Klonierungsstrategie ein 25 Aminosäurereste großer „Linker“ zwischen dem MBP und dem jeweiligen fusionierten Protein befindet. Dieser „Linker“ kann sich auf eine Kokristallisation störend auswirken. Wird er jedoch entfernt, so ist in vielen Fällen eine Kokristallisation möglich (Center *et al.*, 1998). Die Kristallisationsarbeiten sind zur Zeit noch im Gange und bis zur Fertigstellung dieser Dissertation wurden noch keine Ergebnisse erhalten.

#### **2.4 Biochemischer Nachweis der Bindung des Fusionsproteins MBP-Amt an die Glutaminsynthetase aus Zellextrakten**

Um die postulierte Bindung der Glutaminsynthetase an den Ammoniumtransporter nachzuweisen, wurden ein biochemischer und ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Für einen Nachweis der Interaktion durch chromatographische und immunologische Methoden war das Vorhandensein des spezifischen Antikörpers gegen die Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum* essentiell.

In einer Versuchsreihe wurden *E. coli* DH5 $\alpha$ *mcr*-Zellextrakte, die die Proteinfusion aus MBP-Amt heterolog überproduziert hatten, an Amylosesäulenmaterial gekoppelt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.9). Die Bindung konnte mit Hilfe von Western-Hybridisierungen gezeigt werden. Als Interaktionspartner wurde die Glutaminsynthetase aus Zellextrakten eingesetzt. Es wurden dafür Zellextrakte des *C. glutamicum glnA*-Deletionsstammes MJ4-26, MJ4-26 mit dem Leervektor pJC1, MJ4-26 mit plasmidkodiertem *glnA*-Gen pJC*glnA*, MJ4-26 mit plasmidkodiertem *glnA*-Gen, für eine Glutaminsynthetase ohne Adenylylierungsmotiv pJY405F hergestellt. Außerdem wurden Zellextrakte des *C. glutamicum* Typstammes ATCC 13032, gezogen unter Stickstoffmangel (CgCoCN-Medium) und unter Stickstoffüberfluss (CgC-Medium) als interne Kontrollen eingesetzt. Die Glutaminsynthetase-Aktivität der Extrakte wurde bestimmt und ließ sich nur in den Extrakten nachweisen, die tatsächlich auch über eine Glutaminsynthetase verfügten. Die *C. glutamicum*-Zellextrakte wurden mit den an Amylose gekoppelten MBP-Amt-Proteinfusionen gemischt. Nach Inkubation und Waschen der Ansätze wurden die gebundenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und in zwei verschiedenen Western-Hybridisierungen eingesetzt (siehe dazu Material und Methoden, Abschnitt 5.9). Abbildung 13 A zeigt eine Western-Hybridisierung, die die Kontrolle zu Abbildung 13 B darstellt. Es wurde ein Antikörper gegen das MBP eingesetzt, um den Nachweis der Bindung des Fusionsproteins MBP-Amt aus *E. coli*-Zellextrakten an Amylose in den verschiedenen Ansätzen zu

führen. Man erkennt Banden bei etwa 80 kDa, welche in ihrer molekularen Masse der Fusion aus MBP und Amt entsprechen und eine erfolgreiche Bindung der Fusion an Amylose nachweisen. Die Banden bei etwa 42 kDa entsprechen wahrscheinlich dem separaten MBP, da Fusionen mit dem MBP auch ohne Zugabe der Protease Faktor Xa leicht zerfallen können (eigene Beobachtungen). Abbildung 13 B zeigt eine Western-Hybridisierung, in der das polyklonale Antiserum gegen die Glutaminsynthetase eingesetzt wurde, um die spezifische Bindung der Glutaminsynthetase in den Extrakten an das MBP-Amt-System nachzuweisen.



**Abb. 13: Nachweis einer Interaktion zwischen der MBP-Amt-Fusion und der Glutaminsynthetase**

In 13 A ist eine Western-Hybridisierung mit einem MBP-Antikörper aus *E. coli* gezeigt. 13 B zeigt eine Western-Hybridisierung mit einem polyklonalen Antiserum gegen die Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum*. Spur 1: *E. coli*-Zellextrakt mit der MBP-Amt-Fusion und *C. glutamicum* MJ4-26 pJCY405F-Zellextrakt an Amylose; Spur 2: *E. coli*-Zellextrakt mit der MBP-Amt-Fusion und MJ4-26 pJCGlnA-Extrakt an Amylose; Spur 3: *E. coli*-Zellextrakt mit der MBP-Amt-Fusion und MJ4-26 pJC1-Extrakt an Amylose; Spur 4: *E. coli*-Zellextrakt mit der MBP-Amt-Fusion und MJ4-26-Extrakt an Amylose; Spur 5: *E. coli*-Zellextrakt mit der MBP-Amt-Fusion und ATCC 13032 (CgCoCN)-Extrakt an Amylose; Spur 6: *E. coli*-Zellextrakt mit der MBP-Amt-Fusion und ATCC 13032 (CgC)-Extrakt an Amylose; Spur 7: *E. coli*-Zellextrakte mit der MBP-Amt-Fusion an Amylose.

In den Abbildungen 13 A und 13 B sind in Spur 1 jeweils Zellextrakt aus MJ4-26 pJCY405F gemischt mit *E. coli*-Zellextrakt, der die MBP-Amt-Proteinfusion produziert hatte, aufgetragen. Die modifizierte nicht mehr adenylylierbare Glutaminsynthetase wird durch die Bande bei etwa 60 kDa dargestellt und muss also an die MBP-Amt-Fusion gebunden haben. Die Glutaminsynthetase tritt hier in der SDS-PAGE wie bei der Reinigung der Glutaminsynthetase aus Zellextrakten (Abschnitt 2.2.4) als Doppelbande auf. Diese Beobachtung spricht gegen die Annahme, dass die Doppelbanden die adenylylierte und die unadenylylierte Form der Glutaminsynthetase darstellen. In Spur 2 wurde MJ4-26 pJCglnA-Zellextrakt mit MBP-Amt-enthaltenden *E. coli*-Zellextrakt aufgetragen. Man erkennt, dass die native plasmidkodierte Glutaminsynthetase ebenfalls, jedoch in geringerer Konzentration, an die MBP-Amt-Fusion bindet. Nach Anzucht der Zellen in Stickstoff-haltigem Minimalmedium lag die Glutaminsynthetase hauptsächlich in adenylylierter Form vor. Möglicherweise bindet die unadenylylierte aktive Glutaminsynthetase MBP-Amt mit höherer Affinität als eine modifizierte deaktivierte Glutaminsynthetase. Die Spuren 3 und 4 dienten als Negativkontrollen. Spur 3 enthält Zellextrakt der *glnA*-Mutante mit dem leeren Vektor MJ4-26 pJC1 gemischt mit MBP-Amt-enthaltenden Zellextrakt und Spur 4 nur Zellextrakt der *glnA*-Deletionsmutante mit MBP-Amt-enthaltenden Zellextrakt. Wie erwartet ließ sich keine gebundene Glutaminsynthetase nachweisen. In Extrakten ohne Glutaminsynthetase war auch keine Aktivität derselben nachweisbar. Die Spuren 5 und 6 zeigen Zellextrakte des *C. glutamicum* Typstammes ATCC 13032 mit MBP-Amt-enthaltenden *E. coli*-Zellextrakten. Im Stamm ATCC 13032 wird das *glnA*-Gen chromosomal kodiert. Die Glutaminsynthetase wurde sowohl unter Stickstoffmangelbedingungen (Spur 5), als auch unter Stickstoffüberflussbedingungen (Spur 6) konstitutiv synthetisiert und band an MBP-Amt. Unter Stickstoffmangel gezogene ATCC 13032-Zellen zeigten neben einer erhöhten Glutaminsynthetase-Aktivität auch eine gesteigerte Glutaminsynthetase-Produktion bzw. band die unadenylylierte Form der Glutaminsynthetase auch in diesem Fall eher an MBP-Amt. Spur 7 stellt eine Kontrolle dar und zeigt nur MBP-Amt-enthaltenden Zellextrakt.

Als Kontrolle wurde zum einen sichergestellt, dass die Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum*-Zellextrakten selber nicht an Amylose binden kann. Zum anderen wurden Zellextrakte von MBP-Amt, MJ4-26, MJ4-26 pJC1, MJ4-26 pJCglnA, MJ4-26 pJY405F und ATCC 13032 (CgC- / CgCoCN-Medium) ohne Zugabe von Amylose Western-Hybridisierungen mit MBP- und Glutaminsynthetase-Antikörpern unterzogen. In Zellextrakten, die die MBP-Amt-Fusion enthielten, wurden mit dem MBP-Antikörper einige Proteine unspezifisch nachgewiesen. Nach Zugabe von Amylose und durch Waschen der Ansätze ließ sich jedoch hauptsächlich das Fusionsprotein MBP-Amt nachweisen. Diese Kontrolle verdeutlichte, dass ausschließlich das MBP an Amylose binden kann. In den coryne-

bakteriellen Zellextrakten wurden durch den MBP-Antikörper keine Proteine nachgewiesen. Das Glutaminsynthetase-Antiserum wies jedoch in allen Glutaminsynthetase-enthaltenden Proben diese als Doppelbanden nach. Zusätzlich zeigte das Antiserum mit anderen, *E. coli*-eigenen Proteinen Kreuzreaktionen. Diese Proteine ließen sich jedoch durch Waschen der Ansätze entfernen. Diese Beobachtungen erhärteten die Forderung einer Interaktion zwischen dem Amt-System und der Glutaminsynthetase. Die kinetischen Parameter der Wechselwirkung können durch die Methode der „Surface Plasmon Resonance“ noch weiter analysiert werden. Dafür wäre der Einsatz von gereinigten Proteinpartnern sinnvoll, um ein mögliches Haftenbleiben der Glutaminsynthetase am MBP auszuschließen.

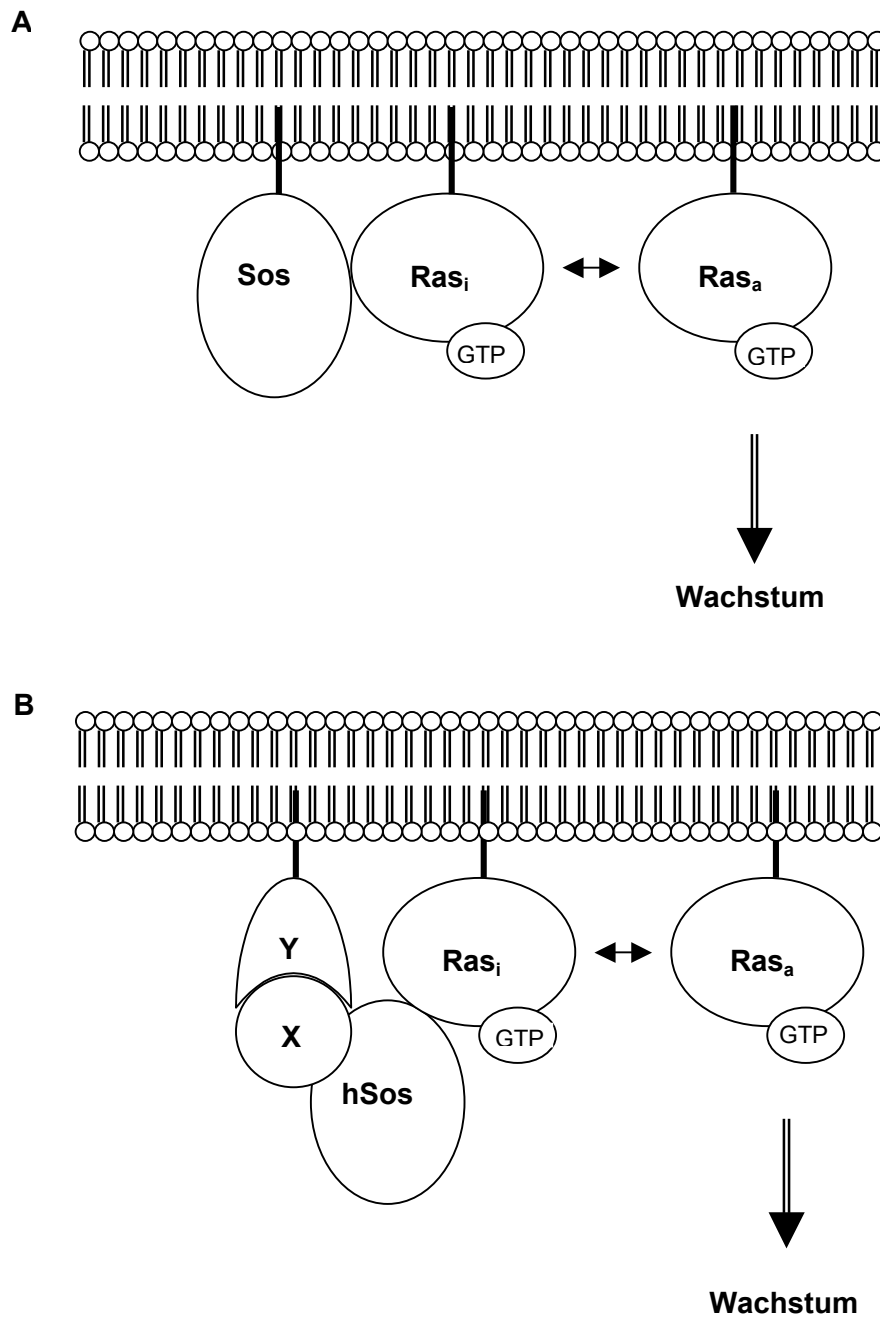
### **2.5 Untersuchung der putativen Wechselwirkung des Amt-Systems mit der Glutaminsynthetase *in vivo* mit Hilfe eines „Two-Hybrid“-Systems in Hefe**

Um die biochemischen Arbeiten zur Protein-Protein Wechselwirkung durch einen molekularbiologischen Ansatz zu ergänzen, bietet sich das Hefe „Two-Hybrid“-System als eine Methode an (Fields und Song, 1989). Die Standardsysteme besitzen jedoch folgende Limitierungen: Da die gängigen „Two-Hybrid“-Systeme auf Ebene der Transkription arbeiten, sind sie nicht dazu geeignet, Wechselwirkungen mit Proteinen nachzuweisen, die selber eine intrinsische Aktivator- oder Repressoraktivität besitzen. Des Weiteren werden die zu untersuchenden Proteine nicht in ihrer nativen Umgebung belassen, sondern werden im Zellkern lokalisiert. Auf diese Weise kann es zur Detektion von „falsch-positiven“ Interaktionen kommen (Serebriiskii *et al.*, 2000). Außerdem wirken einige Proteine toxisch oder letal, wenn sie in hohen Konzentrationen im Zellkern synthetisiert werden (Phizicky und Fields, 1995). Aus diesen Gründen wurde hier ein spezielles „Two-Hybrid“-System eingesetzt, das alle diese Limitierungen nicht aufweist und zudem die Analyse von Wechselwirkungen membranständiger Proteine mit löslichen Partnern erlaubt (Aronheim *et al.*, 1997). Die molekularbiologische Analyse der putativen Wechselwirkungen wurde, zusätzlich zu der Untersuchung der Interaktion zwischen dem Amt-System und Glutaminsynthetase, auch auf Wechselwirkungsanalysen der Proteine AmtB und AmtR ausgedehnt. Die Etablierung des „Two-Hybrid“-Systems, des „Sos-recruitment Systems“, geschah in Zusammenarbeit mit Dr. E. Boles (Universität Düsseldorf).

### 2.5.1 Das „Sos-recruitment System“

Um eine mögliche Wechselwirkung nicht nur zwischen dem Amt-System und der Glutaminsynthetase, sondern auch zwischen dem AmtB-System und der Glutaminsynthetase bzw. zwischen dem Amt-System oder dem AmtB-System mit AmtR molekularbiologisch nachzuweisen, wurde das „Sos-recruitment System“ (SRS) (Aronheim *et al.*, 1997) eingesetzt. Dieses System ist besonders für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen, an denen Membranproteine beteiligt sind, geeignet. Das SRS basiert auf der Beobachtung, dass der GDP-GTP Austauschfaktor (GEF) hSos aus Säugerzellen generell Sos aus *S. cerevisiae* ersetzen kann (Aronheim *et al.*, 1994). Sos aktiviert in *S. cerevisiae* das Protein Ras, ein Mitglied der Familie GTP-bindender Proteine, indem es den Austausch von an Ras gebundenem GDP gegen freies GTP stimuliert. Aktiviertes Ras stimuliert die Adenylatzyklase zur Produktion von cAMP. Dies resultiert in einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Kohlenstoffmetabolismus spielt und auch zahlreiche andere zelluläre Prozesse wie Wachstum und Zellzyklus beeinflusst (Boles *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* benötigt also eine funktionelle Ras-Signaltransduktionskaskade für die Lebensfähigkeit der Zelle. hSos aus Säugerzellen kann jedoch nur dann die Ras-Kaskade in *S. cerevisiae* aktivieren, wenn es an der Plasmamembran lokalisiert ist.

Eine Sos-Punktmutante von *S. cerevisiae*, *cdc25-2*, zeigt temperatursensitives Wachstum (Petitjean *et al.*, 1990), das aber durch die Synthese von hSos z. B. mit Hilfe eines Lipid-anchors an der Membran bei nichtpermissiver Temperatur wiederhergestellt werden kann. Das SRS beruht also auf der Notwendigkeit, dass hSos an der Plasmamembran verankert ist, um das Wachstum der Mutante zu erlauben. Auf diese Weise können Protein-Protein Interaktionen sichtbar gemacht werden, indem ein „target“-Protein oder die „Beute“ an hSos fusioniert wird und das Partnerprotein oder die Proteinbibliothek an ein Myristoylierungssignal fusioniert wird. Wenn beide Hybridgene in dem Hefestamm *cdc25-2* koexpriert werden, können die Zellen nur dann bei restriktiver Temperatur (36 °C) wachsen, wenn die Hybridproteine interagieren und hSos auf diese Weise indirekt in der Membran verankert wird (siehe Abbildung 14).



#### Abb. 14: Die Funktion des „Sos-recruitment Systems“

Abb. 14 A zeigt schematisch die Aktivierung der Ras-Signaltransduktionskaskade in *S. cerevisiae*-Wildtypzellen. Sos ist durch einen natürlichen Lipidrest in der Zellmembran verankert. Sos ist so aktiv und kann die Ras-Kaskade aktivieren, die essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen ist. Abb. 14 B zeigt die Verhältnisse in der *S. cerevisiae*-Mutante *cdc25-2*. Ein Protein Y ist durch Myristoylierung an der Plasmamembran verankert. Durch Interaktion von Protein Y mit Protein X, das als Fusion mit hSos synthetisiert wird, wird auch hSos indirekt an der Plasmamembran befestigt. So ist hSos funktionell und kann die Ras-Kaskade aktivieren, und es kommt zum Wachstum der *S. cerevisiae*-Zellen.

### 2.5.2 Molekularbiologische Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen

Um die Interaktionen zwischen dem Amt-System bzw. dem AmtB-System und der Glutaminsynthetase bzw. AmtR (jeweils aminoterminal und carboxyterminal an hSos fusioniert) zu untersuchen, wurden die jeweiligen Gene mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotide siehe Tabelle 3, Material und Methoden) und nach Restriktion in die folgenden Vektoren ligiert: *amt* und *amtB* wurden in den Vektor pYes2 ligiert; *glnA* und *amtR* wurden zur 5'-terminalen Klonierung an *sos* in den Vektor pADNSADp110-5'Sos und zur 3'-terminalen Klonierung nach Zwischenklonierung in den Vektor pYes2 5'Sos als *sos*-Hybridgene in den Vektor pADNS eingebracht (siehe Tabelle 2, Material und Methoden).

Der temperatursensitive Hefestamm *cdc25-2* wurde auf YPD-Agarplatten bei Raumtemperatur angezogen, kompetent gemacht und mit folgenden Plasmiden (siehe Tabelle 7) transformiert.

**Tab. 7: Verwendete Plasmide des „Sos recruitment Systems“**

Nr.	Plasmid	Beschreibung
1	pYes2	Klonierungsvektor für die „Genbibliothek“ (hier: <i>amt</i> und <i>amtB</i> ), <i>GAL1</i> Promotor, Myristoylierungssignal
2a	pYes2 <i>amt</i>	Fusion von <i>amt</i> an ein Myristoylierungssignal
2b	pYes <i>amtB</i>	Fusion von <i>amtB</i> an ein Myristoylierungssignal
3	pYeMJDP2	Fusion von JDP2 an ein Myristoylierungssignal, Positivkontrolle für eine Interaktion mit 5'SosJun
4	pYes#M7	Fusion eines mit Sos interagierenden Proteins an ein Myristoylierungssignal; erlaubt Wachstum bei 36 °C, wenn 5'Sos funktionell ist
5	pYes2 5'Sos	Subklonierungsvektor auf dem Weg zur Erzeugung von Hybridproteinen mit carboxyterminal fusioniertem Sos
6	pADNS	Klonierungsvektor für die 3'-terminale Endklonierung der „Beute“ ( <i>glnA</i> , <i>amtR</i> ) an <i>sos</i>
7	pADNSADp110-5'Sos	Klonierungsvektor für die 5'-terminale Klonierung der „Beute“ an <i>sos</i>
8a	pADNSp110-5'Sos <i>glnA</i>	trägt die Fusion von <i>glnA-sos</i>
8b	pADNSp110-5'Sos <i>amtR</i>	trägt die Fusion von <i>amtR-sos</i>



Nr.	Plasmid	Beschreibung
9b	pADNS <i>amtR</i>	trägt die Fusion von <i>sos-amtR</i>
10	pADNS5'SosJZ	Fusion der c-Jun „Leucine-Zipper“ Dimerisierungsdomäne an den Carboxyterminus von Sos
11	pADNS5'SosF	Fusion von Sos an ein Farnesylierungssignal; 5'Sos wird membrangebunden synthetisiert

Die Hefemutante wurde mit je zwei verschiedenen Plasmiden kotransformiert: Mit je einem Plasmid, welches auf dem Vektor pADNS (*LEU2*, Nr. 6 - 11) basiert und für die Sos-(Fusions)proteine kodiert und je einem Plasmid, das auf dem Vektor pYes2 (*URA3*, Nr. 1 - 5) beruht und für ein Myristoylierungssignal-(Fusions)protein kodiert. Die pYes2-Plasmide enthielten außerdem den induzierbaren *GAL1* Promotor.

In Tabelle 8 sind die Plasmidkombinationen aufgelistet, mit denen der Hefestamm *cdc25-2* transformiert wurde. Die Zellen wurden nach der Transformation auf Ynb-Glukose-Agarplatten ausplattiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Tagen wurden je 100 der 200 bis 500 Transformanten isoliert und auf Ynb-Glukose und Ynb-Galaktose-Platten (zur Induktion des *GAL1* Promotors) ausgestrichen und für drei Tage bei 36 °C inkubiert. Nach wiederholter Transformation und mehreren „Screening-Runden“ zeigte sich, dass das System als solches funktionell war. Als Kontrolle wurde sichergestellt, dass *cdc25-2* weder auf YDP-Agarplatten bei 36 °C, noch auf Ynb-Glukose-Platten bei Raumtemperatur wachsen konnte, also tatsächlich die geforderten Wachstumsnachteile bei 36 °C und Prototrophien für Leucin und Uracil besaß, um „falsch-positive“ Ergebnisse ausschließen zu können. Die Positivkontrollen (8a, 8b, 9a, 9b mit 4; 1 mit 11 und 10 mit 3) zeigten Wachstum auf den jeweils geforderten Kohlenstoffquellen: *sosF* (11) wurde mit dem Leervektor pYes2 (1) zusammen transformiert. Durch die Membranlokalisierung des farnesylierten Sos, SosF, wird der Phänotyp der *cdc25-2* Mutation supprimiert und ermöglicht den Zellen unabhängig von der Kohlenstoffquelle Wachstum bei restriktiver Temperatur. Eine weitere Positivkontrolle stellte die Transformation des *cdc25-2*-Stammes mit zwei Plasmiden dar, von denen das eine eine Fusion aus *sos* und *c-Jun* (10) trug, während das andere für ein myristoyliertes Jdp2-Protein (3) kodierte. C-Jun ist eine der Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 aus Säugerzellen und besitzt ein „Leucine-Zipper“ Motiv für die Interaktion mit anderen Untereinheiten, sowie eine basische Region für die Wechselwirkung mit der DNA (Angel und Karin, 1991; Vogt und Bos, 1990). Das JDP2-Genprodukt wurde aufgrund seiner Fähigkeit identifiziert, spezifisch mit einem Fusionsprotein aus Sos und eben dieser „Leucine-Zipper“ Domäne des C-Jun zu interagieren (Aronheim *et al.*, 1997). Infolgedessen wird den Transformanten durch die

beiden Plasmide ein Wachstum auf Galaktose als Kohlenstoffquelle bei 36 °C ermöglicht. Auf Glukose-Platten war kein Wachstum zu beobachten, da das unter der Kontrolle des *GAL1* Promotors stehende, myristoylierte Jdp2 nicht exprimiert wurde. Die Funktionalität der Fusionen mit Sos wurde in den Kontrollen 8a, 8b, 9a, 9b mit 4 (pYesM#7) überprüft. M#7 stellt ein Protein dar, welches mit funktionellem Sos wechselwirken kann. Durch diese Interaktion wird ebenfalls eine Membranlokalisierung von Sos hervorgerufen, die zum Wachstum der Transformanden auf Ynb-Platten mit Galaktose als Kohlenstoffquelle führte. Sos war also in diesen Hybridproteinen als Fusion mit AmtR bzw. der Glutaminsynthetase aktiv. Als Negativkontrollen wurden Kombinationen aus Leervektoren mit *sos-amtR*- bzw. *sos-glnA*-Hybridgenen eingesetzt. Wie erwartet fand kein Wachstum auf Ynb-Platten mit Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle bei 36 °C statt.

Trotz der nachgewiesenen Funktionalität der *sos*-Hybridgene, zeigte sich kein Wachstum auf Galaktose-Platten, auf denen die potenziellen Interaktionspartner ausgestrichen waren. In Tabelle 8 ist zusammenfassend das Wachstumsverhalten der transformierten Hefezellen aufgetragen.

**Tab. 8: Wachstum transformierter *cdc25-2*-Zellen mit verschiedenen Plasmidkombinationen auf Glukose- bzw. Galaktoseplatten**

<i>LEU2</i> -Vektor	<i>URA3</i> -Vektor	Wachstum auf Glukose	Wachstum auf Galaktose
8a ( <i>glnA-sos</i> )	2a (pYes2 <i>amt</i> )	-	-
8a ( <i>glnA-sos</i> )	2b (pYes <i>amtB</i> )	-	-
8a ( <i>glnA-sos</i> )	1 (pYes2)	-	-
8a ( <i>glnA-sos</i> )	4 (pYes#M7)	-	+
8b ( <i>amtR-sos</i> )	2a (pYes2 <i>amt</i> )	-	-
8b ( <i>amtR-sos</i> )	2b (pYes <i>amtB</i> )	-	-
8b ( <i>amtR-sos</i> )	1 (pYes2)	-	-
8b ( <i>amtR-sos</i> )	4 (pYes#M7)	-	+
9a ( <i>sos-glnA</i> )	2a (pYes2 <i>amt</i> )	-	-
9a ( <i>sos-glnA</i> )	2b (pYes <i>amtB</i> )	-	-
9a ( <i>sos-glnA</i> )	1 (pYes2)	-	-
9a ( <i>sos-glnA</i> )	4 (pYes#M7)	-	+
9b ( <i>sos-amtR</i> )	2a (pYes2 <i>amt</i> )	-	-
9b ( <i>sos-amtR</i> )	2b (pYes <i>amtB</i> )	-	-
9b ( <i>sos-amtR</i> )	1 (pYes2)	-	-
9b ( <i>sos-amtR</i> )	4 (pYes#M7)	-	+

<i>LEU2</i> -Vektor	<i>URA3</i> -Vektor	Wachstum auf Glukose	Wachstum auf Galaktose
1 (pYes2)	11 (pADNS5'SosF)	+	+
10 (pADNS5'SosJZ)	1 (pYes2)	-	-
6 (pADNS)	3(pYeMJDP2)	-	-
6 (pADNS)	4 (pYes#M7)	-	-

Durch den Einsatz dieses „Two-Hybrid“-Systems konnte also keine Interaktion zwischen dem Amt-System mit AmtR, dem Amt-System mit der Glutaminsynthetase, dem AmtB-System mit AmtR und dem AmtB-System mit der Glutaminsynthetase gezeigt werden. Keine nachgewiesene Interaktion mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems bedeutet aber nicht, dass auch keine Interaktion stattfinden kann. Die Funktionalität des Systems als solches konnte zwar durch zahlreiche Kontrollen gezeigt werden, doch kann nicht sichergestellt werden, dass die zu untersuchenden Komponenten richtig gefaltet und funktionell in *S. cerevisiae* synthetisiert werden. Möglicherweise werden auch Kofaktoren zur Interaktion benötigt, die die Hefezelle nicht zur Verfügung stellen kann.

## IV. Diskussion

### 1. Die Ammoniumaufnahme von *C. glutamicum*

Das Gram-positive Bodenbakterium *C. glutamicum* ist in der Lage, angepasst auf das vorhandene Nährstoffangebot zu „reagieren“. So kann es unter Stickstoffmangelbedingungen Transportsysteme für (Methyl-)Ammonium synthetisieren und aktivieren, um seinen Bedarf an Stickstoff weiterhin zu decken. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport von (Methyl-)Ammonium durch verschiedene Aufnahmesysteme und seine Fixierung untersucht und charakterisiert.

#### 1.1 Die (Methyl-)Ammoniumaufnahme durch das Amt-System ist energieabhängig

Das Amt-Protein aus *C. glutamicum* war das erste bakterielle Ammoniumaufnahme-system, dessen Gen *amt* kloniert und sequenziert werden konnte (Siewe *et al.*, 1996). Die (Methyl-)Ammoniumaufnahme über das Amt-System wurde durch Messung des Transports von [<sup>14</sup>C]-Methylammonium charakterisiert (Siewe *et al.*, 1996; Meier-Wagner *et al.*, 2000a). Da zwei verschiedene Modelle zum Mechanismus der (Methyl-)Ammoniumaufnahme diskutiert werden, wurden im ersten Teil dieser Arbeit Untersuchungen zur genauen Funktion des Amt-Systems durchgeführt.

Das AmtB-System aus *E. coli* stellt mit 35 % Aminosäuresequenzhomologie ein Ortholog des corynebakteriellen Amt-Systems dar. Soupene *et al.* (1998) beschreiben das AmtB-System aus *E. coli* als einen Facilitator der Ammoniak- bzw. der Methylaminaufnahme. Als Antrieb des Transports dieser ungeladenen Substrate über die Membran wurde die sofortige Fixierung von Ammoniak bzw. Methylamin durch die Glutaminsynthetase postuliert. Diese Theorie stand im Gegensatz zu den Untersuchungen von Siewe *et al.* (1996), die einen Membranpotenzial-abhängigen Transport von (Methyl-)Ammonium durch das Amt-System in *C. glutamicum* forderten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Beweis der Hypothese von Siewe *et al.* durchgeführt. Diese Versuche basierten auf der Überlegung, dass das Gleichgewicht zwischen Ammoniak und Ammoniumionen bei niedrigen pH-Werten (hier: pH-Wert von 6,0) zu Gunsten höherer Konzentrationen an Ammoniumionen verschoben wird und Ammoniak dann in limitierenden Konzentrationen vorliegt. Bei höheren pH-Werten (hier: pH-Wert von 8,5) sind aber weder die Ammoniak- noch die Ammoniumkonzentrationen limitierend. Daher war zu erwarten, falls es sich bei dem Amt-System aus *C. glutamicum* um ein Ammoniakaufnahme-system handelt, dass entweder die Affinität für

das Substrat Ammoniak / Methylamin und / oder die Expression des *amt*-Gens mit sinkendem pH-Wert steigt. Aus diesem Grund wurden die kinetischen Parameter der (Methyl-)Ammoniumaufnahme durch das Amt-System ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Amt-System Methylammonium mit einem apparenten  $K_m$ -Wert von circa 50  $\mu\text{M}$  bei pH-Werten von 6,0 und auch von 8,5 aufnimmt. Dies stimmte mit den Messungen von Siewe *et al.* (1996) überein, die einen  $K_m$ -Wert von  $44 \pm 7 \mu\text{M}$  bei einem pH-Wert von 7,0 fanden. Siewe *et al.* (1996) konnten außerdem zeigen, dass der Methylammoniumtransport linear vom Membranpotenzial in einem Bereich von 25 bis 150 mV abhängig ist. Des Weiteren wurde der aktive Methylammoniumtransport nach Abbau der Protonen-motorischen-Kraft durch Zugabe des Protonophors CCCP (Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon) sofort gehemmt, während die ATP-Konzentration in der Zelle und der primäre Transport für einige Minuten unbeeinflusst blieben (Krämer und Lambert, 1990; Krämer *et al.*, 1990). Dies deutete auf einen sekundären Aufnahmemechanismus hin, der von der Protonen-motorischen-Kraft und dem Membranpotenzial abhängig ist. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Ammoniumtransporter Amt aktiv (Methyl-)Ammonium und nicht Ammoniak oder Methylamin transportiert wie es für das AmtB-System in *E. coli* postuliert wurde (Soupene *et al.*, 1998).

Daneben konnte als Kontrolle zusätzlich gezeigt werden, dass die gemessenen  $K_m$ -Werte tatsächlich die Affinität des Amt-Systems für die (Methyl-)Ammoniumaufnahme und nicht die Affinität der Glutaminsynthetase zu (Methyl-)Ammonium widerspiegeln. Tachiki *et al.* (1981, 1983) konnten zeigen, dass die Glutaminsynthetase aus *C. glutamicum* einen apparenten  $K_m$ -Wert für die Ammoniumfixierung von 1,1 bis 5 mM aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Wert für die halbmaximale Inhibierung der Methylammoniumaufnahme durch Ammonium durch das Amt-System mit 5  $\mu\text{M}$  bestimmt. Für den apparenten  $K_m$ -Wert der Methylammoniumfixierung durch die Glutaminsynthetase wurde hier jedoch ein Wert größer als 10 mM ermittelt. Für die Methylammoniumaufnahme und -assimilation in *E. coli* gelten vergleichbare kinetische Parameter. So wurde der  $K_m$ -Wert des Methylammoniumumsatzes durch die Glutaminsynthetase auf circa 80 mM und der apparente  $K_m$ -Wert der Methylammoniumaufnahme durch das AmtB-System mit circa 300  $\mu\text{M}$  bei einer maximalen Aufnahmerate von  $20 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$  bestimmt (G. Thomas, pers. Mitteilung).

Zur Vervollständigung der Argumentation wurde in dieser Arbeit auch die Expression des *amt*-Gens bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das *amt*-Gen ausschließlich unter Stickstoffmangelbedingungen exprimiert wird. Bei Stickstoffmangel war die Expression bei einem pH-Wert von 6,0 vielfach geringer als bei einem pH-Wert von 7,0. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Annahme, dass das Amt-System die Diffusion von Ammoniak erleichtert. Es konnte also anhand von Kinetik-

und Expressionsstudien gezeigt werden, dass das Amt-System aus *C. glutamicum* ein sekundäres, Membranpotenzial-abhängiges Transportsystem für (Methyl-)Ammonium und keinen Facilitator für Ammoniak oder Methylamin darstellt.

## 1.2 Die Ammoniumtransporter Amt, AmtB und AmtN

Außer dem *amt*-Gen, das für einen hochaffinen (Methyl-)Ammoniumtransporter kodiert, wurde auch ein *amtB-glnK-glnD*-Operon isoliert und sequenziert (Jakoby *et al.*, 1999). Das *amtB*-Gen kodiert dabei für ein putatives Ammoniumaufnahme-system, das *glnK*-Gen für ein P<sub>II</sub>-Protein und das *glnD*-Gen für eine UTase. Bei Sequenzvergleichen stellte sich heraus, dass AmtB aus *C. glutamicum* 38 % Sequenzähnlichkeit zu dem corynebakteriellen Amt-System und 43 % Sequenzähnlichkeit zu dem AmtB-System aus *E. coli* aufweist. Des Weiteren liegt das *amtB*-Gen aus *E. coli* auch mit dem *glnK*-Gen in einem Operon vor. Diese Hinweise deuteten darauf hin, dass es sich bei dem AmtB-System aus *C. glutamicum* ebenfalls um einen putativen (Methyl-)Ammoniumtransporter handelte. Die Charakterisierung des AmtB-Systems im Vergleich zu dem Amt-System hinsichtlich seines Substratspektrums und seiner Synthese unter variablen Umweltbedingungen sollten Aufschluss darüber geben, warum *C. glutamicum* zwei (Methyl-)Ammoniumtransporter besitzt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Amt-System ein sekundärer Transporter für die Substrate Ammonium, Methylammonium, Dimethylammonium und Ethylammonium ist. Allerdings kann *C. glutamicum* weder Methylammonium, noch Dimethylammonium oder Ethylammonium als alleinige Stickstoffquelle verwerten. Methylammonium kann auch nicht als einzige Kohlenstoff- oder Energiequelle verwertet werden, wie das für andere Bakterien gezeigt wurde (Large, 1980). Möglicherweise können diese Substanzen jedoch als Kosubstrate zusammen mit anderen Stickstoff- oder Kohlenstoffquellen metabolisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte das AmtB-System als zweites Ammoniumtransportsystem identifiziert werden. Beide Systeme, Amt und AmtB, können sich in den jeweiligen Deletionsmutanten gegenseitig bezüglich der Ammoniumaufnahme komplementieren. Das AmtB-System ist jedoch nicht in der Lage, Methylammonium aufzunehmen (Meier-Wagner *et al.*, 2000a). In *C. glutamicum* liegen also ein (Methyl-)Ammoniumaufnahme-system Amt, das auch noch Dimethylammonium und Ethylammonium transportiert, und eine Ammonium-spezifische Permease AmtB vor. Ein ähnliches Szenario wurde auch in *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert, der ebenso über eine (Methyl-)Ammoniumpermease und ein Ammonium-spezifisches Aufnahmesystem verfügt (Cordts und Gibson, 1987). In ähnlichen Versuchen zur Genexpression, wie in den schon erwähnten

Expressionsstudien für das *amt*-Gen, wurde die Expression des *amtB*-Gens bei pH-Werten von 6,0 und 7,0 verglichen. Das *amtB*-Gen zeigte im Gegensatz zum *amt*-Gen auch nach Anzucht in Stickstoff-haltigem Medium eine basale Expression. Dies bedeutet, dass auch unter Stickstoffüberschussbedingungen Ammonium in die Zelle transportiert werden kann und dort von der ebenfalls schwach synthetisierten Glutaminsynthetase oder der Glutamatdehydrogenase assimiliert werden kann. Bei Stickstoffmangel wird das *amtB*-Gen bei pH-Werten von 6,0 und 7,0 gleichermaßen stark exprimiert. Der basale Expressionslevel bei Stickstoffüberschuss, sowie die starke Expression des *amtB*-Gens bei einem niedrigen pH-Wert des Mediums und seine Sequenzähnlichkeit zu dem *amtB*-Gen aus *E. coli*, führten zu der Überlegung, dass es sich bei dem AmtB-System aus *C. glutamicum* möglicherweise ebenso wie bei dem AmtB-System aus *E. coli* um einen Facilitator für Ammoniak handeln könnte (Soupene *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurden biochemische Hinweise auf ein weiteres, niedrigaffines Ammonium-spezifisches Aufnahmesystem in *C. glutamicum* gefunden. In einer *amt-amtB*-Deletionsmutante konnte noch eine Ammoniumaufnahme mit geringerer Rate als im Wildtyp bis zu einer Konzentration von 70  $\mu$ M Ammonium im Medium beobachtet werden. Außerdem konnte bei der Sequenzierung des *C. glutamicum* Genoms durch die Degussa-Hüls AG tatsächlich ein offener Leserahmen mit, allerdings geringer, Sequenzähnlichkeit zu *amt* und *amtB* identifiziert werden. Möglicherweise stellt dieses offene Leseraster den dritten niedrigaffinen Ammoniumtransporter AmtN von *C. glutamicum* dar. Auch in dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 wurden eine niedrigaffine Ammoniumpermease und eine hochaffine Ammoniumpermease beschrieben (Montesinos *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* über drei verschiedene Ammoniumaufnahmesysteme verfügt. Die Systeme variieren hinsichtlich ihrer maximalen Aufnahmegeschwindigkeit für Ammonium, sie besitzen ein variables Spektrum für weitere Substrate, werden unter verschiedenen Umweltbedingungen synthetisiert und unterscheiden sich möglicherweise im Aufnahmemechanismus. *C. glutamicum* ist auf diese Weise optimal an wechselnde Bedingungen in der Ammoniumversorgung angepasst.

## 2. Die Topologie des Amt-Systems

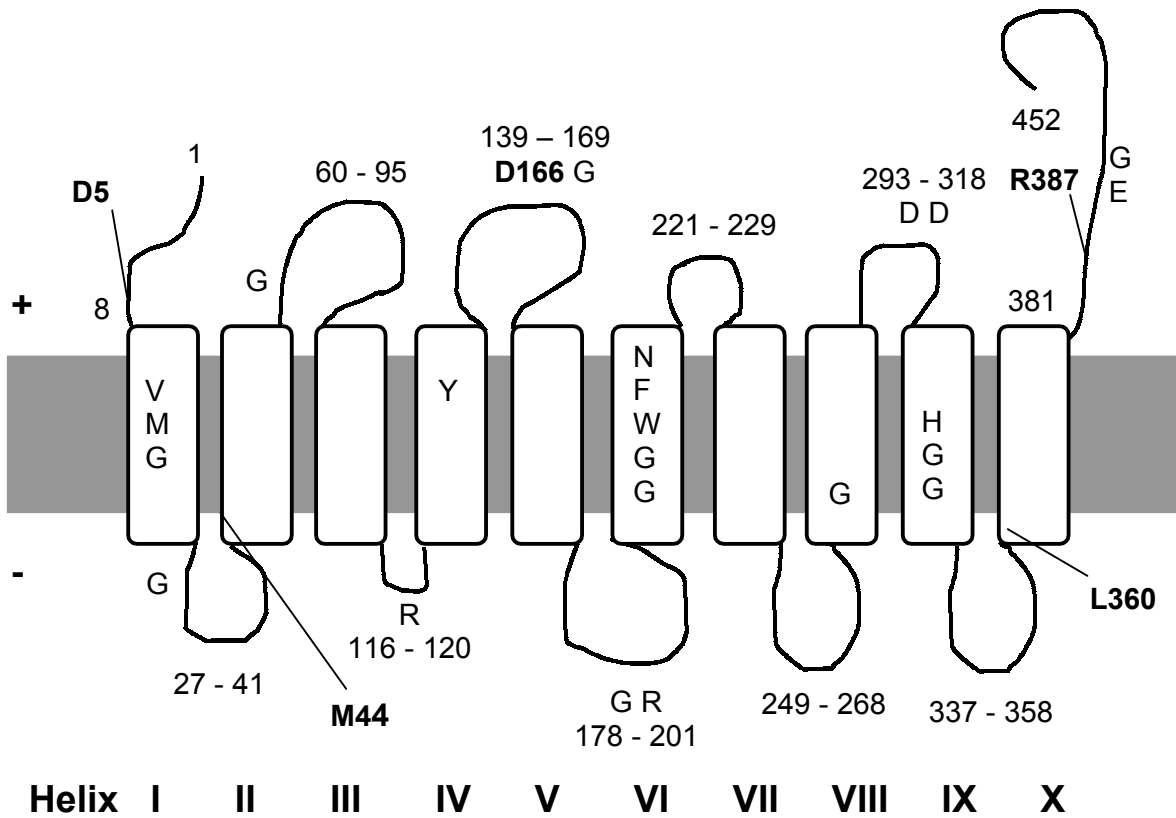
Nach dem Transport von Ammonium mit Hilfe des Amt-Systems in die Zelle ist die sofortige Fixierung von Ammonium durch die Glutaminsynthetase essentiell, da es sonst durch einen „futile cycle“ zu einem Verlust des aktiv aufgenommen Ammoniums in Form von Ammoniak und einem Abbau des Protonenpotenzials kommen würde. Daher wurde eine Wechselwirkung zwischen dem Amt-System und der Glutaminsynthetase postuliert

(Jakoby, 1998). Zur Identifizierung putativer wechselwirkender Bereiche wurde in der vorliegenden Arbeit die Topologie der endständigen Abschnitte des Amt-Systems aufgeklärt. Durch computergestützte Vorhersagen wurde das Amt-System als ein Protein mit 10 oder 11 transmembranen Helices vorhergesagt, wobei sich die Vorhersagen ab der achten Helix unterscheiden. Werden 11 Transmembranhelices gebildet, so wird der Bereich der achten Helix des 10 Transmembranhelicesmodell in die Helices 8a und 8b aufgeteilt und die carboxyterminale Extension des Transporters befände sich zytoplasmatisch und stände einer putativen Interaktion mit der Glutaminsynthetase zur Verfügung. Durch *phoA*- und *lacZ*-Analysen wurden in dieser Arbeit die aminoternale und die carboxyterminale Extension jedoch als extrazytoplasmatisch bestimmt. Dies steht im Einklang mit dem 10-Transmembranhelicesmodell für das Amt-System (siehe Abbildung 15). In diesem Modell stehen also weder die aminoternale noch die carboxyterminale Extension des Ammoniumtransporters für eine Interaktion mit der Glutaminsynthetase zur Verfügung. Allerdings stellen vier der fünf zytoplasmatischen Schleifen aufgrund ihrer Größe von circa 20 Aminosäureresten putative Interaktionsstellen dar.

Vergleicht man das corynebakterielle Amt-System mit anderen Ammoniumtransportern, so zeigen sich generell viele strukturelle und sequenzielle Übereinstimmungen, jedoch oft unterschiedliche Lokalisationen der amino- und carboxyterminalen Extensionen: Thomas *et al.* (2000b) entwickelten für das AmtB-System aus *E. coli* anhand von *phoA*- und *lacZ*-Fusionen ein 12-Transmembranhelicesmodell mit einer zytoplasmatischen aminoternalen und einer zytoplasmatischen carboxyterminalen Extension (siehe Abbildung 16). Sie identifizierten außerdem 27 konservierte Aminosäurereste in verschiedenen Ammoniumtransportern. Diese konservierten Aminosäurereste sind jeweils über das ganze Protein verteilt und finden sich auch in dem Amt-System aus *C. glutamicum* wieder. In Abbildung 15 ist ein Topologiemodell des corynebakteriellen Amt-Systems mit diesen konservierten Aminosäureresten im Ein-Buchstabencode der Aminosäuren aufgetragen. In dem 428 Aminosäurereste und 12 Transmembranhelices umfassenden AmtB-System aus *E. coli* wurden die Helices im Einklang mit Topologiemodellen anderer Ammoniumtransporter von 0 bis 11 durchnummeriert (siehe Abbildung 16). Durch die Existenz der Helix 0 ist im AmtB-System der Aminoterminus im Gegensatz zu anderen Ammoniumtransportern zytoplasmatisch lokalisiert. Die Helices 1 bis 8 des Amt-Systems aus *C. glutamicum* ähneln in ihrer Struktur und in der Verteilung der konservierten Aminosäurereste in den Helices 1 bis 8 denen des AmtB-Systems aus *E. coli*. In beiden Modellen tritt der konservierte Asparaginsäurerest (*C. glutamicum*: Amt-System: D166; *E. coli*: AmtB-System: D182), der an der Bindung und Weiterleitung der Ammoniumionen mit Hilfe der konservierten Glycinreste (siehe Abbildung 15) beteiligt sein soll, in der extrazytoplasmatischen Schleife zwischen den Helices vier und fünf auf. Dieser

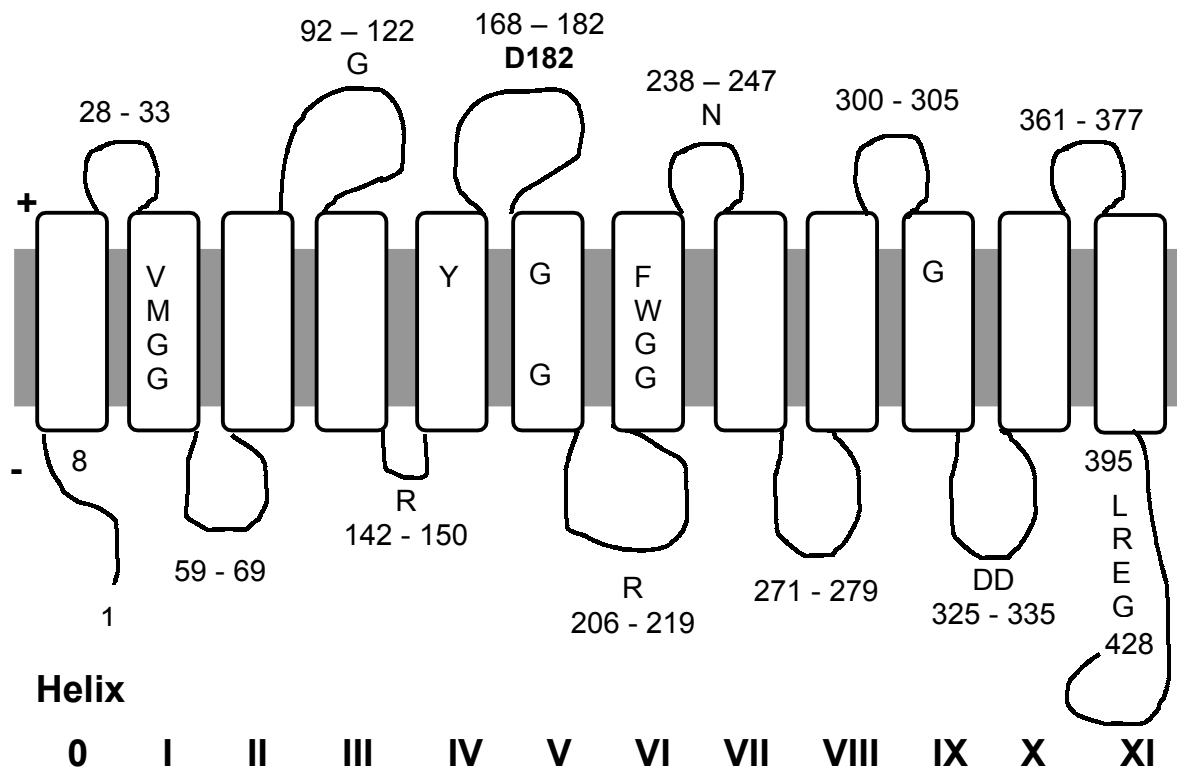


Asparaginsäurerest wird mit einem Asparaginsäurerest der Glutaminsynthetase aus *E. coli* verglichen, der ebenfalls an der Ammoniumbindung beteiligt sein soll (Alibhai und Villafranca, 1994; Liaw *et al.*, 1995). Ab der achten Helix entspricht das Topologiemodell des *E. coli* AmtB-Systems dem 11-Transmembranhelicesmodell des corynebakteriellen Amt-System, in dem der Bereich um die Helix 8 in die Helices 8a und 8b aufgeteilt ist. Aus diesem Grund ist die carboxyterminale Extension des AmtB-Systems aus *E. coli* im Gegensatz zu der carboxyterminalen Extension des Amt-Systems aus *C. glutamicum* zytoplasmatisch lokalisiert. Das MEP 1-Protein aus *S. cerevisiae* besitzt wiederum eine andere Topologie: Es werden hier 11 Transmembranhelices (Helices 1 bis 11) mit einer zytoplasmatischen carboxyterminalen Extension vorhergesagt (Marini *et al.*, 2000). Howitt und Udvardi (2000) zeigen in ihrem Review über die Struktur von Ammoniumtransportern in Pflanzen ein Topologiemodell des AtAMT1;1 Ammoniumtransporters aus *Arabidopsis thaliana*. Für AtAMT1;1 werden wie für das Amt-System aus *C. glutamicum* 10 Transmembranhelices mit einer extrazytoplasmatischen aminoterminalen und einer extrazytoplasmatischen carboxyterminalen Extension vorausgesagt. Die Autoren stellen als Erklärung für diese Topologie die Hypothese auf, dass diese 10 Transmembranhelices von einer früheren Form mit 12 (6 + 6) Transmembranhelices mit intrazellulären Amino- und Carboxytermini abstammen könnten. Möglicherweise stellt auch die Struktur des AmtB-Systems aus *E. coli* ein Modell für eine Vorform des Amt-Systems aus *C. glutamicum* dar. AtAMT1;1 zeigt des weiteren eher Sequenzähnlichkeiten zu bakteriellen Ammoniumtransportern. Auch die kinetischen Parameter von AtAMT1;1 ähneln denen des Amt-Systems aus *C. glutamicum*. So liegt der  $K_m$ -Wert für Methylammoniumaufnahme bei 65  $\mu\text{M}$ , und die Aufnahme wird durch Zugabe von Ammonium mit einem  $K_i$ -Wert von 5 bis 10  $\mu\text{M}$  inhibiert. AtAMT1;1 aus *A. thaliana* und das Amt-System aus *C. glutamicum* scheinen so auf struktureller und funktioneller Ebene ähnlich zu sein.



**Abb. 15: Topologiemodell des Amt-Systems aus *C. glutamicum* und Verteilung von konservierten Aminosäureresten**

Das Amt-System aus *C. glutamicum* besitzt 10 Transmembranhelices. 27 konservierte Aminosäurereste sind mit Hilfe des Ein-Buchstabencodes der Aminosäuren eingezeichnet. D166 steht dabei für eine putative Ammoniumbindestelle. Die Lokalisation der nicht-konservierten Aminosäurereste D5, M44 und L360 wurde mit Hilfe von *phoA*- und *lacZ*-Fusionen ermittelt. Die Lokalisation des konservierten Aminosäurerestes R387 wurde ebenfalls bestimmt.



**Abb. 16: Topologiemodell des AmtB-Systems aus *E. coli***

Das AmtB-System aus *E. coli* besitzt 12 Transmembranhelices. 27 konservierte Aminosäurereste sind mit Hilfe des Ein-Buchstabencodes der Aminosäuren eingezeichnet. D182 stellt die putative Ammoniumbindestelle dar (Thomas *et al.*, 2000).

### 3. Die Wechselwirkung der Glutaminsynthetase mit dem Ammoniumtransporter

#### Amt

Das Amt-System aus *C. glutamicum* unterliegt neben der Regulation auf Expressionsebene auch einer Aktivitätsregulation, wie dies auch bei Ammoniumaufnahmesystemen in anderen Bakterien, beispielsweise in *K. pneumoniae* (Kleiner und Castorph, 1982) gezeigt wurde. Die Zugabe von Glutamin zu Stickstoff-gehungerten Zellen führt in *C. glutamicum* zu einem schnellen, reversiblen Verlust der Ammoniumaufnahme. Diese Regulation ist allerdings nicht direkt auf einen Anstieg der zellulären Glutaminkonzentration zurückzuführen, da das aufgenommene Glutamin in Stickstoff-gehungerten Zellen sofort metabolisiert wird (Jakoby, 1998).

Mit Hilfe von Dünnschichtchromatographien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Methylammonium durch die Glutaminsynthetase sofort umgesetzt wird und dass es nicht zu einem Anstau von Methylammonium in der Zelle kommt. Da sich auch nach Ausschaltung des Glutamatdehydrogenase- und des GS / GOGAT-Weges immer noch ein kompletter Umsatz von Methylammonium nachweisen ließ, wurde die Existenz eines

weiteren (Methyl-)Ammonium-umsetzenden Enzyms postuliert. Tatsächlich wurde bei der Sequenzierung des *C. glutamicum* Genoms durch die Degussa-Hüls AG ein weiterer offener Leserahmen mit Sequenzähnlichkeiten zu dem *glnA*-Gen entdeckt. Übereinstimmend hiermit fanden Jakoby *et al.* (1997) durch Southern-Hybridisierungen erste Hinweise auf die Existenz einer zweiten Glutaminsynthetase in *C. glutamicum*.

Mit Hilfe von Wechselwirkungsanalysen zwischen Proteinfusionen aus MBP-Amt und der Glutaminsynthetase aus corynebakteriellen Zellextrakten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Wechselwirkung zwischen dem MBP-Amt-System und der Glutaminsynthetase gezeigt werden. Da die Wechselwirkung des Amt-Systems mit einer Glutaminsynthetase, die nicht mehr adenyliert werden konnte, stärker erschien als mit einer Glutaminsynthetase, die vermutlich zum großen Teil adenyliert war, ist es wahrscheinlich, dass das Amt-System nur mit aktiver, deadenylierteter Glutaminsynthetase wechselwirkt.

Betrachtet man die Kristallstruktur der Glutaminsynthetase aus *S. typhimurium* so ist ersichtlich, dass der Aminoterminus dieses Proteins etwas aus der Struktur dieses globulären Proteins herausragt (Daniel Schlieper, pers. Mitteilung). Überträgt man die Struktur dieser Glutaminsynthetase auf die corynebakterielle Glutaminsynthetase (52 % Sequenzidentität), so kann man die Hypothese aufstellen, dass der aminoternale Bereich der Glutaminsynthetase den putativen Wechselwirkungsbereich mit dem Amt-System darstellen könnte.

Dandekar *et al.* (1998) postulieren, dass bei konservierten Genpaaren oft auch ihre Produkte miteinander wechselwirken. Aus diesem Grund fordern Thomas *et al.* (2000a) für *E. coli* eine Interaktion zwischen dem AmtB-System und GlnK (Atkinson und Ninfa, 1999). Da auch in *C. glutamicum* das *amtB*-Gen und das *glnK*-Gen in einem Operon vorliegen (Jakoby *et al.*, 2000), könnte es auch hier eine Wechselwirkung auf Proteinebene geben.

#### 4. Der globale Transkriptionsregulator AmtR

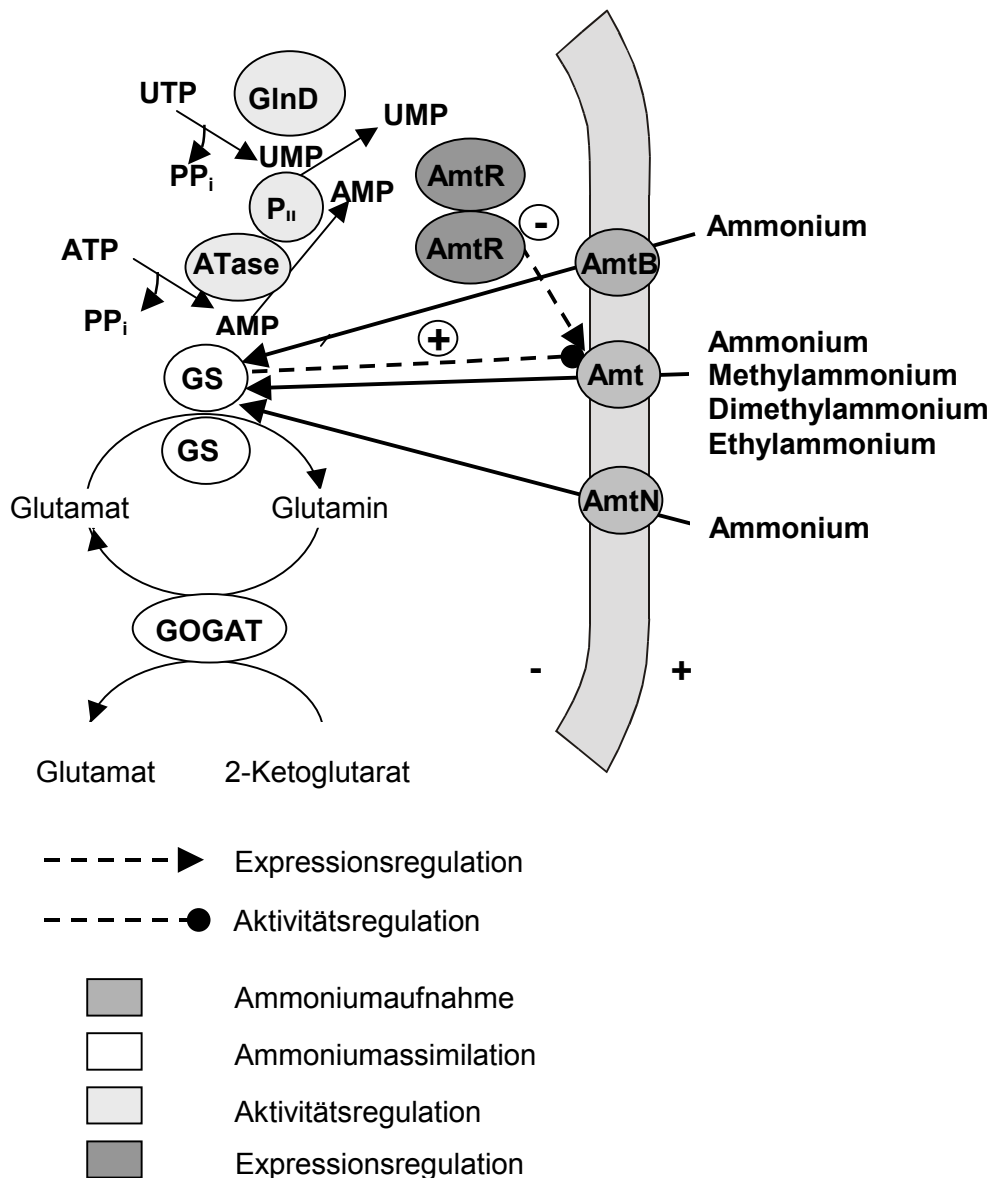
Der Repressor der *amt*-Transkription AmtR stellt einen globalen Transkriptionsregulator von Komponenten des Stickstoffkontrollsystems dar. Er besitzt Ähnlichkeiten mit Transkriptionsregulatoren aus *E. coli*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* und *Staphylococcus aureus*, sowie zu dem Tetracyclinrepressor TetR aus *E. coli*. Unter Stickstoffüberflussbedingungen reprimiert er nicht nur die Expression von *amt*, sondern auch die des *amtB-glnK-glnD*-Operons, wodurch er dann indirekt auch an der Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität beteiligt ist (Lars Nolden, pers. Mitteilung). Der Mechanismus der Repression der *amt*-Transkription unterscheidet sich von der Regulation in *E. coli*, wo eine Aktivierung der Transkription stattfindet (Merrick und Edwards, 1995).

Als möglicher Interaktionspartner des AmtR-Proteins auf Aktivitätsebene bzw. als Signalmediator kommt das  $P_{II}$ -Protein in Betracht. Metabolite wie Glutamin, Glutamat und Ammonium können hier nicht als Signale wirken, da ihre Konzentrationen in der Zelle infolge weiterer Umsetzungen durch die Reaktionen der GS / GOGAT relativ konstant bleiben. Das AmtR-Protein konnte in der vorliegenden Arbeit in nativer und aktiver Form gereinigt werden. Nach Identifizierung eines AmtR-Bindemotivs konnte eine direkte Bindung des AmtR-Proteins an die Operatorsequenz des *amt*-Gens gezeigt werden (Lars Nolden, pers. Mitteilung). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass AmtR wahrscheinlich als Dimer wirkt.

#### 5. Das Modell der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*

Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit das Modell der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* (Jakoby, 1998) durch einige Komponenten und ihre Eigenschaften komplementiert werden (siehe Abbildung 17). *C. glutamicum* besitzt demnach wahrscheinlich drei Ammoniumaufnahmesysteme, die Ammonium mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und unter verschiedenen Bedingungen in die Zelle transportieren. Das Amt-System ist ein hochaffines Aufnahmesystem für Ammonium und akzeptiert zusätzlich Methylammonium, Dimethylammonium und Ethylammonium als Substrate. Das paraloge AmtB-System stellt eine spezifische Ammoniumpermease dar, die Ammonium mit einer vergleichbar hohen maximalen Geschwindigkeit wie das Amt-System transportiert, aber unter variableren Bedingungen synthetisiert wird. Das postulierte AmtN-System wäre eine niedrigaffine Ammoniumpermease. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die optimale Versorgung von *C. glutamicum* mit Ammonium unter verschiedenen Umweltbedingungen gewährleistet ist. Nach dem Transport in die Zelle, wird Ammonium von der Glutaminsynthetase assimiliert. Dabei interagiert die Glutaminsynthetase wahrscheinlich direkt mit

dem Amt-System. Außerdem wurde eine zweite Glutaminsynthetase postuliert, die die Funktion der Glutaminsynthetase I in einer *glnA*-Deletionsmutante ersetzen konnte.



**Abb. 17: Modell der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum***

*C. glutamicum* verfügt wahrscheinlich über drei Ammoniumpermeasen Amt, AmtB und AmtN. Nach Aufnahme von Ammonium in die Zelle wird es durch die Glutaminsynthetase (GS) fixiert. Die GS wird in ihrer Aktivität über De- / Adenylylierung durch eine ATase reguliert. Die Aktivität der ATase wird durch das P<sub>II</sub>-Protein gesteuert, welches durch De- / Uridylylierung durch das GlnD-Protein modifiziert wird. AmtR wirkt als Dimer und reguliert die *amt*-Transkription und die GS reguliert die Amt-Aktivität. Die Regulation der zweiten GS ist noch nicht untersucht (nach Jakobv. 1998).

## V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Systemen und Mechanismen der Stickstoffkontrolle in dem Gram-positiven Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum*. Es wurden die Regulation der Aufnahme und Assimilation von Stickstoffquellen auf Expressions- und Aktivitätsebene untersucht. Das untersuchte Ammoniumaufnahmesystem Amt besitzt ein relativ breites Substratspektrum. Es transportiert mit Präferenz Ammonium aber auch Methylammonium, Dimethylammonium und Ethylammonium in die Zelle. Der Mechanismus und die Kinetik der (Methyl-)Ammoniumaufnahme durch das Amt-System wurden in dieser Arbeit untersucht und die apparenten  $K_m$ -Werte der Methylammoniumaufnahme ( $K_m$ -Werte circa 50  $\mu\text{M}$ ) bei verschiedenen pH-Werten, sowie der  $K_T$ -Wert der Methylammoniumaufnahme für Ammonium ( $K_T$ -Wert circa 5  $\mu\text{M}$ ) ermittelt. Es konnte bestätigt werden, dass das Amt-System ein sekundärer Membranpotenzial-abhängiger Transporter ist, der (Methyl-)Ammonium und nicht Ammoniak oder Methylamin als Substrate akzeptiert. Unter Stickstoffmangelbedingungen wird das *amt*-Gen exprimiert und zeigt bei höheren pH-Werten eine deutlich höhere Expression als bei niedrigen pH-Werten. Dieses Expressionsmuster unterstützt den Beweis, dass (Methyl-)Ammonium und nicht Ammoniak oder Methylamin die transportierten Spezies darstellen. Die Transkription des *amt*-Gens wird unter Stickstoffüberschussbedingungen durch den Regulator AmtR reprimiert. AmtR tritt als Dimer auf und konnte in dieser Arbeit in aktiver Form gereinigt werden, was durch seine Bindung an spezifische DNA-Bereiche gezeigt werden konnte (Lars Nolden, pers. Mitteilung).

Die Funktion des AmtB-Systems, eines Paraloges des Amt-Systems, wurde in dieser Arbeit aufgeklärt. Das AmtB-System ist eine Permease für Ammonium und transportiert sein Substrat mit einer vergleichbaren maximalen Geschwindigkeit wie das Amt-System. Im Gegensatz zu *amt* wird *amtB* auch bei niedrigeren pH-Werten stark exprimiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das AmtB-System aus *C. glutamicum* wie das AmtB-System aus *E. coli* einen Facilitator für Ammoniak darstellen könnte. Vermutlich existiert weiterhin noch ein niedrigaffiner Ammoniumtransporter AmtN in *C. glutamicum*.

Nach der Aufnahme in die Zelle wird Ammonium durch die Glutaminsynthetase I umgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Fusion aus MBP und Amt mit der Glutaminsynthetase I wechselwirkt. Diese neuartige Interaktion wäre eine Voraussetzung gegen einen „futile cycle, der in einem Abbau des Protonenpotenzials über der Membran resultieren würde und deutet auf eine Aktivitätsregulation des Transporters Amt durch die Glutaminsynthetase I hin.

## VI. Literatur

- Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita, S.** (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 13: 279-301.
- Alibhai, M. und Villafranca, J.J.** (1994) Kinetic und mutagenic studies of the role of the active side residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry.* 33: 682-686.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Angel, P. und Karin, M.** (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072: 129-157.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J. und Karin, M.** (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78: 949-961.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J. und Karin, M.** (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detection of protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3094-3102.
- Atkinson, M.R. und Ninfa, A.J.** (1998) Role of the GlnK signal transduction protein on the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 29: 431-447.
- Atkinson, M.R. und Ninfa, A.J.** (1999) Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32: 301-313.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (1987) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, John Wiley and Sons, NY.
- Bachmann, B.J.** (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol. Rev.* 54: 130-197.



- Beckwith, J. und Silhavy, T.J.** (1983) Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 97: 3-11.
- Boles, E., Schulte, F., Migosa, T., Freidel, K., Schluter, E., Zimmermann, F.K., Hollenberg, C.P. und Heinisch, J.J.** (1997) Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *J. Bacteriol.* 179: 2987-2993.
- Börmann, E.R., Eikmanns, B.J. und Sahn, H.** (1992) Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* 6: 317-326.
- Burkovski, A., Weil, B. und Krämer, R.** (1996) Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 169-173.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Castorph, H. und Kleiner, D.** (1984) Some properties of a *Klebsiella pneumoniae* ammonium transport negative mutant (Amt<sup>-</sup>). *Arch. Microbiol.* 139: 245-247.
- Center, R.J., Kobe, B., Wilson, K.A., Teh, T., Howlett, G., Kemp, B.E. und Pombourios, P.** (1998) Crystallization of a trimeric human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain fragment as a chimera with maltose-binding protein. *Prot. Sci.* 7: 1612-1619.
- Cordts, M.L. und Gibson, J.** (1987) Ammonium and methylammonium transport in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169: 1632-1638.
- Cremer, J., Eggeling, L. und Sahn, H.** (1990) Cloning the *dapA* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 478-480.
- Dandekar, T., Snel, B., Huyen, M. und Bork, P.** (1998) Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends Biochem. Sci.* 23: 324-328.

- Derman, A.I. und Beckwith, J.** (1991) *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. J. Bacteriol. 173: 7719-7722.
- Fields, S. und Song, O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340: 245-247.
- Fisher, S.H.** (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! Mol. Microbiol. 32: 223-232.
- Grant, S.N.G., Jessee, J., Bloom, F.R. und 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. und 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.
- Howitt, S.M. und Udvardi, M.K.** (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. Biochim. Biophys. Acta 1465: 152-170.
- Inou, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96: 23-28.
- Jahns, T., Zobel, A., Kleiner, D. und Kaltwasser, H.** (1988) Evidence for carrier-mediated, energy-dependent uptake of urea in some bacteria. Arch. Microbiol. 149: 377-383.
- Jakoby, M.** (1998) Biochemische und molekularbiologische Untersuchung der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Jakoby, M., Tesch, M., Sahm, H., Krämer, R. und Burkovski, A.** (1997) Isolation of the *Corynebacterium glutamicum glnA* gene encoding glutamine synthetase I. FEMS Microbiol. Lett. 154: 81-88.

- Jakoby, M., Krämer, R. und 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. und Burkovski, A.** (2000) AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. 37: 964-977.
- Jayakumar, A., Hong, J.-S. und Barnes, E.M. Jr.** (1986) Feedback inhibition of ammonium (methylammonium) ion transport in *Escherichia coli* by glutamine and glutamine analogs. J. Bacteriol. 169: 553-557.
- Jiang, P., Peliska, J.A. und 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. und 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. und Ninfa, A.J.** (1998c) The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state. Biochemistry 37: 12802-12810.
- Kamberov, E.S., Atkinson, M.R. und 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.
- Kimura, K.** (1962) The significance of glutamic acid dehydrogenase in glutamic acid fermentation. J. Gen. Appl. Microbiol. 8: 253-260.
- Kinoshita, S., Udaka, S. und Shimono, M.** (1957) Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol, Tokyo 3: 193-205.
- Kleiner, D.** (1985) Bacterial ammonium transport. FEMS Microbiol. Rev. 32: 87-100.

- Kleiner, D.** (1993)  $\text{NH}_4^+$  transport systems. In *Alkali cation transport systems in prokaryotes* (Bakker, E.P., ed.) S. 379-395, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kleiner, D. und Castorph, H.** (1982) Inhibition of ammonium (methylammonium) transport in *Klebsiella pneumoniae* by glutamine and glutamine analogues. *FEBS Lett.* 146: 201-203.
- Krämer, R. und Lambert, C.** (1990) Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur. J. Biochem.* 194: 937-944.
- Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C. und Ebbighausen, H.** (1990) Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.* 194: 929-935.
- Kronemeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Eggeling, L. und Sahm, H.** (1995) Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 177: 1152-1158.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffertank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Large, P.J.** (1980) Microbial Growth on  $\text{C}_1$  compounds. (Dalton, H., ed.) S. 55-69, Heyden, London, Philadelphia, Rheine.
- Leuchtenberger, W.** (1996) Amino acids-technical production and use. In *Products of primary metabolism* (Rehm, H.J. und Reeds, G., ed.). *Biotechnology* Vol. 6, S. 455-502 VCH Weinheim, Deutschland
- Liaw, S.H., Kuo, I. und Eisenberg, D.** (1995) Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. *Protein Sci.* 4: 2358-2365.

- Liebl, W., Bayerl, A., Ludwig, W. und Schleifer, K.H.** (1989) High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. 65: 99-104.
- Liu, J. und Magasanik, B.** (1995) Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator-I phosphate of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 926-931.
- Magasanik, B.** (1996) Regulation of nitrogen utilization. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., Curtiss, III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B. (Magasanik, B. et al., ed.) S. 1344-1356, Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Manoil, C.** (1991) Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and  $\beta$ -galaktosidase gene fusion. Methods Cell Biol. 34: 61-75.
- Manoil, C. und Beckwith, J.** (1985) TnPhoA: a transposon probe for protein export signals: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8129-8133.
- Meier-Wagner, J., Nolden, L., Jakoby, M., Siewe, R., Krämer, R. und Burkovski, A.** (2000a) Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: Role of Amt and AmtB. Microbiology. Akzeptiert zur Publikation.
- Meier-Wagner, J., Jakoby, M., Siewe, R., Krämer, R. und Burkovski, A.** (2000b) Regulation of (methyl)ammonium uptake in *Corynebacterium glutamicum* on the level of carrier activity. In Vorbereitung.
- Merrick, M.J.** (1993) In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ). Mol. Microbiol. 10: 903-909.
- Merrick M.J. und Edwards, R.A.** (1995) Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev. 59: 604-622.
- Michaelis, S. und Beckwith, J.** (1982) Mechanism of incorporation of the cell envelope proteins in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. 36: 435-436.

- Miller, J.H.** (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Montesinos, M.L., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., and Flores, E.** (1998) Ammonium / methylammonium permeases of a cyanobacterium. *J. Biol. Chem.* 273: 31463-31470.
- Oshima, K., Tanaka, K. und Kinoshita, S.** (1964) Studies on glutamic acid fermentation. XI. Purification and properties of L-glutamic acid dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*. *Agric. Biol. Chem.* 28: 714-722.
- Park, M.-S., Choi, S.-Y., Kim, S.-J. und Min, K.-H.** (1989) Properties of glutamine synthetase from *Corynebacterium glutamicum*. *Korean Biochem. J.* 22: 128-132.
- Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A.E., Navarro Gimenez, M. und Collins, M.D.** (1995) Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on the 16S rRNA gene sequences. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 724-728.
- Petitjean, A., Hilger, F. und Tatchell, K.** (1990) Comparison of thermosensitive alleles of the *CDC25* gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124: 797-806.
- Phizicky, E.M. und Fields, S.** (1995) Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59: 94-123.
- Pridmore, R.D.** (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56: 309-312.
- Rapp, B.J., Landrum, D.C. und Wall, J.D.** (1986) Methylammonium uptake by *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 146: 134-141.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H. und Pühler, A. (1990)** High frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 1663-1666.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und Pühler, A. (1994)** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schägger, H., Aquila, H. und von Jagow, G. (1988)** Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173: 201-205.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M. und Golemis, R.A. (2000)** Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *BIOTECHNIQUES* 28: 328-336.
- Siewe, R.M., Weil, B. und 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. und Krämer, R. (1996)** Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 271: 5398-5403.
- Siewe, R.M., Weil, B., Burkovski, A., Eggeling, L., Krämer, R. und Jahns, T. (1998)** Urea uptake and urease activity in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 169: 411-416.
- Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983)** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1: 784-791.

- Soupe, E., He, L., Yan, D. und Kustu, S.** (1998) Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of AmtB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7030-7034.
- Streicher, S.L. und Tyler, B.** (1980) Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria. *J. Bacteriol.* 142: 69-78.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., und Dubendorff, J.W.** (1990) Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. In *Methods Enzymol.* Vol. 185 S. 60-89. Academic Press, San Diego, CA.
- Tachiki, T., Wakisaka, S., Suzuki, H., Kumagai, H. und Tochikura, T.** (1981) Glutamine synthetase from *Micrococcus glutamicus*: Effect of nitrogen sources in culture medium on enzyme formation and some properties of crystalline enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 45: 287-292.
- Tachiki, T., Wakisaka, S., Suzuki, H., Kumagai, H. und Tochikura, T.** (1983) Variation of *Micrococcus glutamicus* glutamine synthetase brought about by divalent cations. *Agric. Biol. Chem.* 47: 287-292.
- Tesch, M., Eikmanns, B.J., de Graaf, A.A. und Sahm, H.** (1998) Ammonia assimilation in *Corynebacterium glutamicum* and a glutamate dehydrogenase-deficient mutant. *Biotechnol. Lett.* 20: 953-957.
- Tesch, M., De Graaf, A.A. und Sahm, H.** (1999) *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studies by <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance. *Appl. Environm. Microbiol.* 65: 1099-1109.
- Thomas, G., Coutts, G. und Merrick, M.** (2000a) The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet.* 16: 11-14.
- Thomas, G.H., Mullins, J.G.L. und Merrick, M.** (2000b) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol. Microbiol.* 2: 331-344.
- Tochikura, T., Sung, T.T., Tachiki, T. und Hidehiko, K.** (1984) Occurrence of glutamate synthase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2149-2150.



- van der Rest, M., Lange, C. und Molenaar, D.** (1999) A heat-shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 541-545.
- Viera, J. und Messing, J.** (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* 19: 259-268.
- Vogt, P.K. und Bos, T.J.** (1990) Jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* 55: 1-35.
- von Heinje, G.** (1992) Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225: 487-494.
- Wakisaka, S., Tachiki, T. und Tochikura, T.** (1990) Properties of *Brevibacterium flavum* glutamine synthetase in an "in vivo-like" system. *J. Ferm. Bioeng.* 70: 182-184.
- Wray, L.V., Ferson, A.E., Rohrer, K. und Fisher, S.H.** (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8841-8845.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, L., und Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Zeppenfeld, T., Larisch, C., Lengeler, J.W. und Jahreis, K.** (2000) Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB(Glc) and induction behavior of the *ptsG* gene. *J. Bacteriol.* 182: 4443-4452.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T. und Ansorge, W.** (1990) A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 18: 105-109.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die Überlassung des interessanten Themas, seine stete anregende Diskussionsbereitschaft und die hervorragende Betreuung unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken.

Frau PD Dr. Sabine Waffenschmidt danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Andreas Burkovski möchte ich besonders für die Einarbeitung im Labor, die vielen guten Ideen und das Durchsehen meiner schriftlichen Arbeiten danken. Dr. Michael Masow gebührt mein Dank für seine „unendliche Geduld“ beim Erklären sämtlicher Proteinreinigungsmethoden. Meinen Laborkollegen Dr. Andreas Burkovski, Daniela Kruse, Pilar Diaz-Achirica und Gregor Wersch möchte ich danken, dass der Alltag im Labor nicht nur erträglich, sondern ausgesprochen lustig war. Besonders danke ich ihnen auch für ihre ständige Hilfsbereitschaft und den moralischen Beistand während dieser Zeit.

Für unzählige kleine Hilfen und eine unvergessliche und schöne Zeit in und außerhalb des Labors möchte ich auch allen meinen anderen Laborkollegen danken: Marc Jakoby, Frank Schneider, Carole Ngouoto-Nkili, Anne Bendt, Lars Nolden, Dirk Schiller, Gaby Beckers, Francois Deuber, Birgit Haier, Andrea Meinhardt, Ute Meyer, Matthias Schauen, Sebastian Vreden, Dr. Susanne Morbach, Rene Rübenhagen, Udo Burger, Hendrik Rönsch, Daniel Nottebrock, Andreas Wolf, Ralf Steger, Inga Bellahn, Rolf Hecker, Markus Albertsen, Christian Tscheche, Martin Weinand, Eva Glees, Gaby Sitek und Frau Benova. Außerdem danke ich Daniel Schlieper für seinen schier unendlichen, und manchmal sogar ansteckenden Optimismus.

Dr. E. Boles danke ich für seine wertvollen Tipps für den Umgang mit Hefe.

Mein größter Dank gebührt aber meiner Mutter und Rainer, die mich in jeglicher Hinsicht bestärkt und unterstützt haben und mich immer wieder getröstet haben, wenn experimentell so gar nichts funktionieren wollte.

## Lebenslauf

- 04.12.72 Geboren in Berlin
- 1979 - 1983 Besuch der Brüder-Grimm-Grundschule in Marburg
- 1983 - 1992 Besuch der Martin-Luther-Schule, Gymnasium in Marburg,  
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
- 10/1992 - 08/1997 Studium der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg; Abschluss mit dem akademischen Grad Diplom-Biologin
- 11/1996 - 08/1997 Diplomarbeit im Laboratorium für Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Bremer  
Thema: „Charakterisierung des OpuC ABC-Transportsystems aus *Bacillus subtilis*“
- 11/1997 - 12/2000 Promotionsarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer  
Thema: „Mechanismen und Regulation der (Methyl-)Ammoniumaufnahme in *Corynebacterium glutamicum*“

## Erklärung

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

## Teilpublikationen

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

**Meier-Wagner, J., Nolden, L., Jakoby, M., Siewe, R., Krämer, R. und Burkovski, A.** (2000) Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: Role of Amt and AmtB. Microbiology. Akzeptiert zur Veröffentlichung.

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:

Unterschrift: