

**AmtR - ein globaler Repressor der Stickstoff-
kontrolle in *Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Gabriele Beckers

aus Erftstadt

Köln, Mai 2004

Berichterstatter:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Karin Schnetz

Tag der Disputation: 30.06.2004

AmtR – a global repressor of the nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*

The Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* is used in industrial processes to synthesize amino acids – mainly glutamate and lysine – and gained great biotechnological importance in the last few years. For the production of amino acids a good nitrogen supply of the cell is essential. *C. glutamicum* is able to take up and use a broad spectrum of nitrogen sources such as ammonia, urea, glutamate, and glutamine. The adaptation of bacteria to a particular environmental condition occurs by the synthesis of specific transporters systems and assimilating enzymes. Both, regulation on the level of expression and activity prevent an unnecessary loss of energy by futile cycling and are termed nitrogen control. Under nitrogen surplus, the regulator AmtR represses the transcription of the *amt-soxA-ocd* operon, the *amtB-glnK-glnD* operon, the *gltBD* operon, as well as the genes *glnA*, *cmnT*, and NCgl1099. In this work the AmtR-regulon was investigated in detail. First of all the effect of the *amtR* deletion on the transcriptome of the cell was characterized using DNA-microarrays. Furthermore, the genome of *C. glutamicum* was screened for putative AmtR binding sites by a bioinformatic approach. The results of microarray analysis and bioinformatic approach were examined by Northern Hybridization experiments and *real-time* PCR and, simultaneously, the strength of repression by AmtR was quantified. Beside the genes mentioned above, new AmtR-regulated genes like the *gluABCD* operon (encoding a glutamate transporter), the NCgl2300-2302 operon, the NCgl1015-1918 operon (encoding a putative peptide transporter), the *urtABCDE* operon (coding for an urea transporter), the *ureABCEFGD* operon (coding for an urease), the NCgl1362-gene, the *cda*-gene (encoding a creatinine deaminase) and the NCgl1099-gene were found.

The putative AmtR binding sequences, which were determined by the bioinformatic approach, were proven by gel retardation assays. By the application of a multiple alignment a consensus sequence could be derived:

T t t C T A T n g n n c n A T A G a a A

capital letters: strong conserved regions, small letters: conserved regions
grey small letters: no conservation

AmtR – ein globaler Repressor der Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium glutamicum*

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* wird in der Industrie zur Synthese von Aminosäuren – vornehmlich Glutamat und Lysin – eingesetzt und gewann daher in den letzten Jahren an großer biotechnologischer Bedeutung. Zur Herstellung von Aminosäuren ist eine gute Stickstoff-Versorgung der Zelle essentiell. *C. glutamicum* ist in der Lage verschiedenen Stickstoffquellen, wie z. B. Ammonium, Harnstoff, Glutamin und Glutamat, aufzunehmen und zu verwerten. Bakterien adaptieren sich an die jeweilig vorherrschenden Bedingungen durch Synthese spezifischer Transporter und assimilierender Enzyme. Regulatorische Prozesse auf Expressions- sowie Aktivitätsebene vermeiden einen unnötigen Energieverbrauch der Zellen z. B. durch *futile cycling* und werden unter dem Begriff Stickstoffkontrolle zusammengefaßt. Unter Stickstoffüberschuß reprimiert der Regulator AmtR die Expression des *amt-soxA-ocd*-Operons, des *amtB-glnK-glnD*-Operons, des *gltBD*-Operons, sowie der Gene *glnA*, *crnT* und NCgl1099. Innerhalb dieser Arbeit sollte das gesamte AmtR-Regulon genauer charakterisiert werden. Mit Hilfe von Microarrays konnten die Auswirkungen einer *amtR*-Deletion auf das gesamte Transkriptom untersucht werden. Weiterhin wurden das gesamte Genom von *C. glutamicum* mit einem bioinformatischen Ansatz nach putativen Bindesequenzen in den für AmtR durchsucht. Die Ergebnisse der Microarray-Analyse und der Promotoranalyse wurden mit Hilfe von Northern Hybridisierungen und *real-time* PCRs überprüft und die Repressionsstärke durch AmtR quantifiziert. Dabei konnte nicht nur für die schon genannten Gene, sondern auch für das *gluABCD*-Operon (kodiert für einen Glutamattransporter), das NCgl2300-2302-Operon, das NCgl1015-1918-Operon (kodiert für einen putativer Peptidtransporter), das *urtABCDE*-Operon (kodiert für den Harnstofftransporter), das *ureABCEFGD*-Operon (kodiert für die Urease), das NCgl1362-Gen, das *cda*-Gen (kodiert für eine Creatinindeaminase) und das NCgl1099-Gen eine AmtR-abhängige Regulation gezeigt werden. Die putativen AmtR-Bindesequenzen, die durch die Promotoranalyse ermittelt worden sind, wurden mit Hilfe von Gelretardationsassays überprüft. Durch Erstellung eines multiplen Alignments konnten eine Konsensussequenz abgeleitet werden:

T t t C T A T n g n n c n A T A G a a A

Großbuchstaben: streng konserviertes Motiv; Kleinbuchstaben: konserviertes Motiv
Graue Kleinbuchstaben: keine Konservierung

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	10
1. Bakterienstämme und Plasmide	10
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	13
2.1 Nährmedien.....	13
2.2 Kultivierungsbedingungen	14
3. Biochemische Techniken	15
3.1 Aufnahmemessungen.....	15
3.1.1 Bestimmung der Aminosäureaufnahme.....	15
3.1.2 Bestimmung der Harnstoffaufnahme	16
3.2 Bestimmung der ATP-Konzentration	16
3.3 Herstellung von Zellextrakten	17
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellextrakten	17
3.5 Bestimmung der Urease-Aktivität	18
3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)	19
3.7 Kolloidale Coomassie-Färbung	20
4. Molekularbiologische Techniken	20
4.1 DNA-Techniken	20
4.1.1 Plasmid-Präparationen aus <i>E. coli</i>	20
4.1.2 Präparation chromosomaler DNA	20
4.1.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	21
4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	21
4.1.5 Restriktion und Ligation von DNA	22
4.1.6 Polymerase-Kettenreaktion: PCR und RT-PCR.....	22
4.1.7 Klonierung von PCR-Fragmenten	23
4.1.8 Gelretardationstest.....	24
4.2 RNA-Techniken	26
4.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> und RNA-Gelelektrophorese	26
4.2.2 RNA-Hybridisierungen	27

4.2.3	Präparation von RNA-Sonden durch <i>in-vitro</i> -Transkription	29
4.2.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR	30
4.2.5	DNA-Arrays	31
4.3	Techniken zur Manipulation von Zellen	33
4.3.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	33
4.3.2	Konstruktion von Insertionsmutanten	34
4.4	Bioinformatische Ansätze	35
4.4.1	Ähnlichkeitssuche	35
4.4.2	Multiples Alignment und Hidden-Markov-Modell	36
III.	Ergebnisse	37
1.	Bioinformatischer Ansatz	37
2.	Transkriptionsanalyse	39
2.1	DNA Microarrays	39
2.1.1	Kontrollexperiment	40
2.1.2	Vergleich der Expressionsmuster des Wildtyps ATCC13032 unter N-Überschuß und N-Mangel	43
2.1.3	Vergleich der Expressionsmuster der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18 und des Wildtyps ATCC13032 unter N-Überschuß	46
2.1.4	Vergleich der Expressionsmuster der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18 unter N-Mangel und N-Überschuß	48
2.1.5	Vergleich der Expressionsmuster der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18 und des Wildtyps ATCC13032 unter N-Mangel	50
2.2	Organisation AmtR-regulierter Gene	50
2.3	Quantifizierung der Repression durch AmtR	57
2.3.1	RNA-Hybridisierungen	57
2.3.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR	66
3.	Untersuchung des Bindemotivs von AmtR	69
3.1	Gelshiftexperimente	69
3.2	Erstellung einer Konsensussequenz	73
4.	Analyse des MJ6-18-Stamms auf Proteomebene	75
5.	UreR als putativer Regulator des <i>ure</i>-Operons	77
6.	Charakterisierung des Harnstofftransporters	79

IV. Diskussion	86
1. AmtR, ein globaler Regulator der Stickstoffkontrolle in <i>C. glutamicum</i>	86
2. Transport und Assimilation von Harnstoff.....	95
V. Zusammenfassung	98
VI. Literaturverzeichnis	100
VII. Anhang	108
1. Stammkonstruktionen.....	108
2. Plasmidkonstruktionen	109

Abkürzungen

2-D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
Ap ^R	Resistenz gegen Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
Cm ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-5-chloro-1H-benzodiazepin-2-yl)phenyl phosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>et al.</i>	'et alii' (und andere)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOGAT	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
Km ^R	Resistenz gegen Kanamycin
LB	Luria-Bertani
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
N	Stickstoff
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid (-2'-phosphat), reduziert
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm

ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP _i	anorganisches Phosphat
RT	Raumtemperatur (20-22 °C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Units

I. Einleitung

Neben Kohlen- und Sauerstoff ist Stickstoff ein zentrales Element in Biomolekülen wie Proteinen und Nucleinsäuren. Zwar bildet er in seiner elementaren Form (N_2) zu fast 70% die Erdatmosphäre, ist dann jedoch den meisten Organismen unzugänglich. Pro Jahr reduzieren diazotrophe Microorganismen schätzungsweise 10^{11} kg des reaktionsträgen Stickstoffs zu NH_3 (Stickstofffixierung). Die geladene Form, Ammonium, ist eine für viele Organismen nutzbare Stickstoffquelle und bildet die Ausgangsbasis zur Herstellung anderer Stickstoff-haltiger Verbindungen wie Aminosäuren, Nucleotide und Coenzyme. Neben Ammonium stellen auch Harnstoff, Aminosäuren und Nucleotide eine mögliche Stickstoffquelle für Organismen dar. Je nach Verfügbarkeit der Substrate werden zur Aufnahme und Assimilation spezifische Transportsysteme und Enzyme, deren Synthese und Aktivierung einer strikten Regulation unterliegen, eingesetzt. Alle Prozesse, die an dieser Regulation beteiligt sind, werden unter dem Namen Stickstoffkontrolle zusammengefaßt. Die Stickstoffregulation in Enterobakterien wurde schon sehr gut untersucht (Merrick und Edwards, 1995; Reitzer, 1996). Hier existiert das globale Stickstoffregulationssystem Ntr (*nitrogen regulatory system*) mit den Komponenten P_{II} , der Uridylyltransferase, NtrB und NtrC (Abb. 1). P_{II} bildet ein Trimer, das unter Stickstoffmangel durch die Uridylyltransferase an einem spezifischen Tyrosylrest (Tyr51) uridylyliert wird. In diesem Zustand kann es durch Wechselwirkung mit einer Adenylyltransferase (*glnE*-Genprodukt) adenylylierte Glutaminsynthetase deadenylylieren und somit mit der Histidin-Proteinkinase NtrB interagiert. Diese wiederum phosphoryliert den Transkriptionsregulator NtrC, der nun die Transkription verschiedener Gene, u.a. *glnA* (Glutaminsynthetase) durch Bindung an σ^{54} -abhängige Promotorbereiche induziert. Unter Stickstoffüberschuß deuridylyliert die Uridylyltransferase das P_{II} -Protein. Die Adenylyltransferase modifiziert die Glutaminsynthetase, so daß sie inaktiviert wird. Des weiteren kontrolliert P_{II} unter diesen Bedingungen auch die Dephosphorylierung von NtrC durch NtrB. Der Auslöser für eine Antwort auf Stickstoffhunger ist das Verhältnis von α -Ketoglutarat und Glutamin. Unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen bindet α -Ketoglutarat an das P_{II} -Protein und bewirkt die Transkription NtrC-abhängiger Gene und die Aktivierung der GS; unter Stickstoffüberschuß signalisiert die Uridylyltransferase den Anstieg der Glutamin-Konzentration und leitet das Signal an das P_{II} -Protein weiter.

1. Einleitung

Es erfolgt die Dephosphorylierung des NtrC-Proteins und die Einstellung der Transkription bzw. die Inaktivierung der GS durch Modifikation.

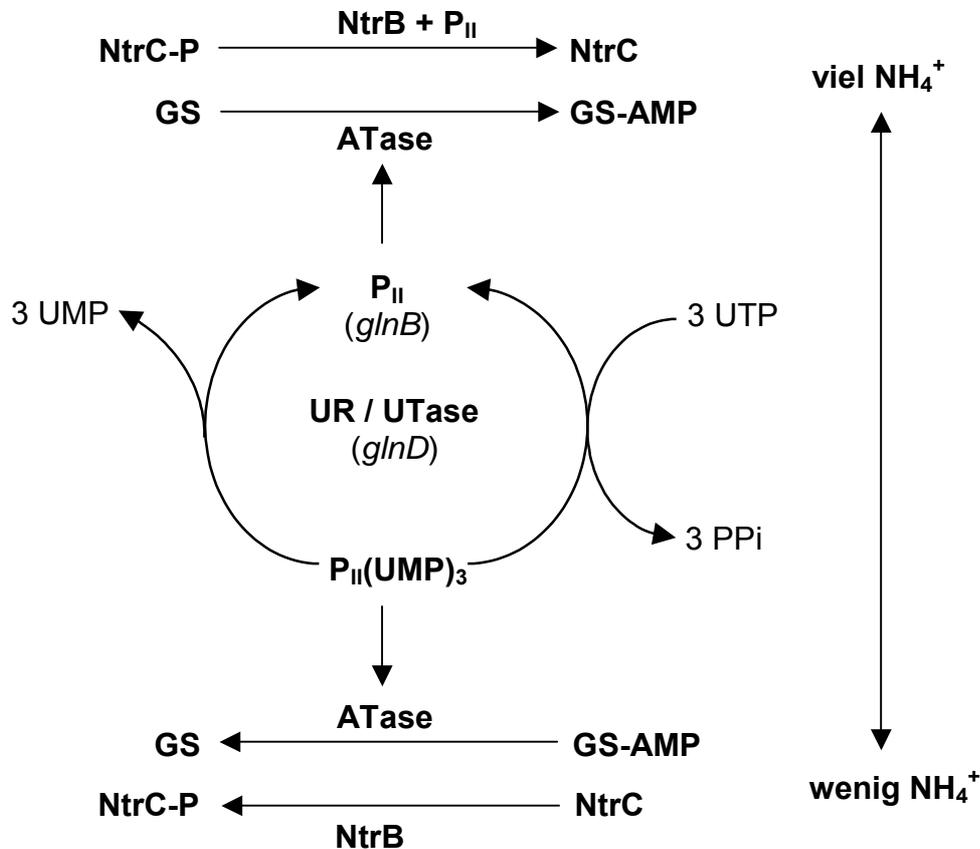


Abb. 1: Modell der Stickstoffkontrolle in Enterobakterien. Je nach Stickstoffstatus der Zelle bewirkt die Uridylyltransferase/deuridylylierendes Enzym (*glnD*) die Uridylylierung bzw. Deuridylylierung des P_{II} -Proteins (*glnB*). Die Adenylyltransferase/deadenylylierendes Enzym katalysiert die Adenylierung bzw. Deadenylierung der Glutaminsynthetase (GS) und dadurch deren Aktivität. Die Histidinkinase NtrB phosphoryliert bzw. dephosphoryliert das NtrC-Protein (nach Merrick & Edwards, 1995).

Die Stickstoffkontrolle in dem Modellorganismus für Gram-positive Bakterien mit geringem GC-Gehalt, *Bacillus subtilis*, ist noch nicht komplett aufgeklärt. Da diese Bakterien Sporenbildner sind, können sie sich ungünstigen Umweltbedingungen durch Sporenbildung entziehen. Möglicherweise besitzt *B. subtilis* deshalb nur den GS/GOGAT-Weg zur Assimilation von Ammonium. Die GDH dient ausschließlich dem Glutamatabbau (Kane *et al.*, 1981).

1. Einleitung

Bei der Stickstoffkontrolle in *B. subtilis* spielen drei verschiedene Transkriptionsregulatoren (TnrA, GlnR und CodY) eine Rolle (Fisher *et al.*, 1999). TnrA und GlnR, Proteine der Mer-Familie, regulieren Gene, die an der Stickstoffaufnahme und -assimilation beteiligt sind, z.B. *gabP* (γ -Aminobuttersäure-Permease), *ureABC* (Urease), *nrgAB* (putative NH_4 -Permease, P_{II} -Protein) und *nasABCDEF* (Nitrat-assimilierende Enzyme). TnrA und GlnR binden an ähnliche DNA-Sequenzen jedoch unter verschiedenen Bedingungen. So reprimiert GlnR Gene unter Stickstoffüberschuß, während TnrA diese Gene unter Stickstofflimitation aktiviert. Bisher ist noch unbekannt, wie der Stickstoffstatus der Zelle in *B. subtilis* gemessen und die Information an die Regulatoren weitergeleitet wird. Dennoch gibt es Hinweise, daß die Signaltransduktionskaskade über die Glutaminsynthetase läuft. Der Repressor CodY reguliert in Abhängigkeit der Wachstumsrate neben Genen des Stickstoffmetabolismus z.B. dem *hut*-Gen (Histidin Abbau; Fisher *et al.*, 1996), dem *dpp*-Gen (kodiert für einen Dipeptidtransporter; Slack *et al.*, 1995), dem *bkd*-Gen, dessen Genprodukt im Isoleucin- und Valin-Abbau involviert ist, und dem *ureABC*-cluster (Urease, Wray *et al.*, 1997), auch Gene, die für Enzyme des Acetatstoffwechsels (z.B. *gabP*) bzw. in der Entwicklung der Zellkompetenz involviert sind.

Aufgrund seines niedrigen GC-Gehalts und seiner Zellwandzusammensetzung gilt *B. subtilis* nur bedingt als Modellorganismus für Gram-positive Bakterien. Eine andere Gruppierung der Gram-positiven Bakterien stellen auch die mycolsäurehaltigen Actinomyceten dar, die neben einem hohen GC-Gehalt eine komplexe Zellhülle mit einer Mycolsäureschicht als zusätzlicher Permeabilitätsbarriere aufweisen. Zu dieser Gruppe gehört u. a. *Corynebacterium glutamicum* (Abbildung 2), ein keulenförmiges, nicht-sporulierendes Bodenbakterium. Es ist verwandt mit pathogenen Vertretern wie *C. diphtheriae* und Vertretern der Gattung *Mycobacterium* (*M. leprae* und *M. tuberculosis*) und wurde 1957 im Zoo von Tokio aus einer Bodenprobe isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957, Abe *et al.*, 1967). Da es sich bei diesem Bakterium um einen natürlichen Glutamatproduzenten handelt, gewann er schnell an biotechnologischer Bedeutung. Durch weitere Stammentwicklung werden von *C. glutamicum* heute ca. 1.000.000 t/a L-Glutamat und 560.000 t/a L-Lysin produziert. Glutamat wird in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt, L-Lysin dient als Futtermitteladditiv. Zusätzlich werden noch in

fermentativen Prozessen weitere Aminosäuren (z.B. L-Isoleucin, L-Threonin und L-Methionin) und Nukleotide hergestellt (Leuchtenberger *et al.*, 1996).

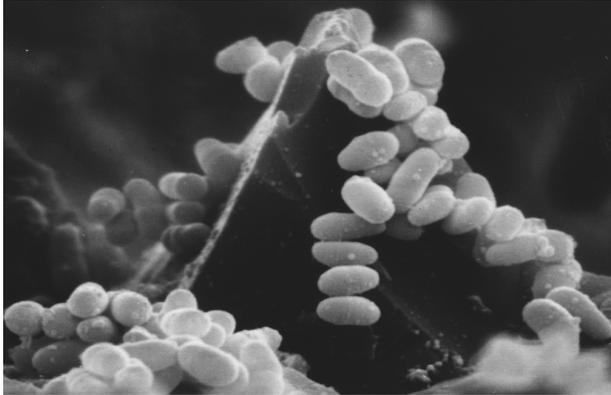


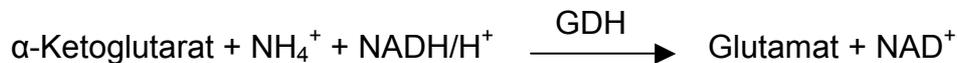
Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum*-Zellen. Der Name *Corynebacterium* leitet sich von der auf dem Bild gut sichtbaren keulenförmigen Morphologie der Zellen ab (Quelle: FZ-Jülich).

Aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung wurden in den letzten Jahren der Kohlenstoff-Metabolismus bzw. die Aminosäurebiosynthese in *C. glutamicum* intensiv untersucht und beteiligte Enzyme charakterisiert. Als hilfreich erweist sich dabei, daß das Genom von *C. glutamicum* komplett sequenziert (www.qib.genes.nig.ac.jp / www.ncbi.nlm.nih.gov) und das Bakterium genetisch gut zugänglich, apathogen und leicht zu kultivieren ist. Für die Biosynthese von Aminosäuren ist neben Kohlenstoff auch Stickstoff von essentieller Bedeutung, so daß genaue Kenntnisse des Stickstoffmetabolismus wichtig zur Optimierung der Produktionsprozesse sind. In den letzten Jahren wurde dieses Gebiet von unserer Arbeitsgruppe intensiv untersucht und schon einige Gene und Proteine identifiziert, die in die Aufnahme und Assimilation von Stickstoffquellen involviert sind. *C. glutamicum* kann verschiedene Stickstoffverbindungen nutzen. Neben Ammonium, Glutamin, Glutamat und Harnstoff stehen dem Organismus noch verschiedene Aminosäuren wie Arginin, Allantoin und Ornithin zur Verfügung. Ammonium stellt dabei die bevorzugte Stickstoffquelle dar und kann bei hohen Konzentrationen als Ammoniak die Zellmembran durch Diffusion passieren. In der Zelle wird dann das Ammonium durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) in einer oxidativen Aminierungsreaktion auf ein α -Ketoglutarat übertragen. Es entsteht Glutamat, welches für die Herstellung anderer Aminosäuren und Nukleotiden von zentraler Bedeutung ist. Unter diesen Bedingungen ist die Aktivität der Glutaminsynthetase

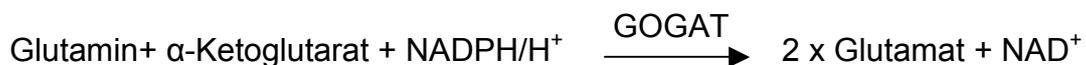
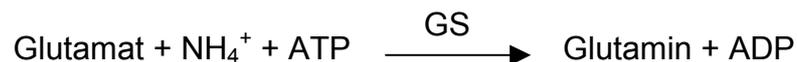
1. Einleitung

teilweise durch Feedback-Inhibition bzw. Adenylylierung gehemmt. Die Restaktivität der GS unter ausreichender Stickstoffversorgung deckt den Glutaminbedarf der Zellwandsynthese. Bei geringer Ammonium-Konzentration im Medium werden spezifische Transportsysteme (Amt, AmtB bzw. ein bisher unbekannter Transporter; Siewe *et al.*, 1996; Meier-Wagner *et al.*, 2001) aktiviert und ermöglichen die Aufnahme von Ammonium unter Verwendung des Membranpotentials. Die Expression des *amt*-Gens wird durch den Repressor AmtR geregelt. Die Assimilation erfolgt nun über den GS/GOGAT-Weg, da die GDH eine niedrige Affinität (Km-Wert von ~1mM) zu Ammonium besitzt. Dabei wird das Ammonium zunächst auf ein Glutamat übertragen, so daß Glutamin entsteht. Diese Reaktion wird durch die Glutaminsynthetase (GS, Km-Wert von 200µM) katalysiert. Anschließend wird die Stickstoffgruppe durch eine Transaminierungsreaktion durch die Glutamatsynthase (GOGAT) auf ein α-Ketoglutarat übertragen, wodurch zwei Glutamat-Moleküle entstehen. Die beiden verschiedenen Reaktionswege über die GDH und den GS/GOGAT-Weg sind unten angegeben:

A)



B)



Der Assimilationsweg über GS/GOGAT ist im Vergleich zur Assimilation durch die GDH energieaufwendiger, da neben dem NADPH-Molekül auch ein ATP verwendet wird. Zudem verbraucht auch der aktive Transport durch Amt Energie. Da unter Stickstoffüberschußbedingungen die Möglichkeit eines *futile cyclings* besteht - Ammonium also aktiv in die Zelle geschleust und in seiner ungeladenen Form (Ammoniak) die Zelle über Diffusion wieder verlassen kann, um dann erneut aufgenommen zu werden - ist eine strikte Regulation der Proteine unter Stickstoffüberschußbedingungen essentiell für die Zelle. Für die GDH konnte bislang

noch keine Regulation unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen gezeigt werden (Toshikura *et al.*, 1984; Börmann *et al.*, 1992). Anders zeigte sich bei der GS eine Regulation in Abhängigkeit des Stickstoffstatus der Zelle. Die Aktivitätsregulation geschieht in *C. glutamicum* wie in *E. coli* über eine Adenylylierung/Deadenylylierung eines Tyrosylrestes (Jakoby *et al.*, 1999). Verantwortlich für diese posttranslationale Modifikation ist eine Adenylyltransferase (kodiert durch *glnE*; Nolden *et al.*, 2001a). Auch auf Expressionsebene steht das *glnA*-Gen unter Stickstoffkontrolle und wird unter limitierenden Bedingungen translatiert. Eine ähnliche Regulation konnte auch für das *gltBD*-Operon (kodiert für die GOGAT) gezeigt werden (Beckers *et al.*, 2001). Jedoch kommt diesem Enzym keine bedeutsame Rolle zu, weil es unter Stickstoffmangel nur eine geringe Aktivität aufweist und seine Funktion von anderen Transaminasen übernommen werden kann (Tesch *et al.*, 1999). Außerdem zeigen Mutanten mit defekter GOGAT im Vergleich zum Wildtyp auf verschiedenen Kohlenstoffquellen keine Wachstumsdefizite. Somit stellt die GOGAT keinen Verknüpfungspunkt zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus dar (Beckers *et al.*, 2001), wie es für *B. subtilis* vorgeschlagen wurde (Faires *et al.*, 1999). Bei einer *gdh*-Deletion kann die Glutamatsynthase jedoch die Funktion der Glutamatdehydrogenase ersetzen (Börmann-El Kholly *et al.*, 1993).

Bisher konnte teilweise auf Proteinebene und teilweise auf Expressionsebene eine Regulation der an der Stickstoffkontrolle beteiligten Gene bzw. Proteine unter Stickstoffüberschuß festgestellt werden. Während die Aktivität der Proteine durch posttranslationale Modifikation z.B. Phosphorylierungen (Bendt *et al.*, 2003) und Adenylylierung/Deadenylylierung reguliert wird, konnte für die Regulation auf Expressionsebene bisher nur der Repressor AmtR gefunden werden. Dieser reprimiert die Expression der Gene der Ammoniumtransporter Amt und AmtB (Jacoby *et al.*, 2000), der assimilatorischen Enzyme GS und GOGAT (Nolden *et al.*, 2001a, Beckers *et al.*, 2001), der Proteine der Signaltransduktionskaskade GlnK und GlnD (Nolden *et al.*, 2001b) sowie des *codA*-Gens, welches für eine Creatintransporter kodiert (Bendt *et al.*, 2004) und ein Gen mit unbekannter Funktion (NCgl1362) (Nolden, 2001c). Eine Übersicht des AmtR-Regulons ist in Abbildung 3a gegeben.

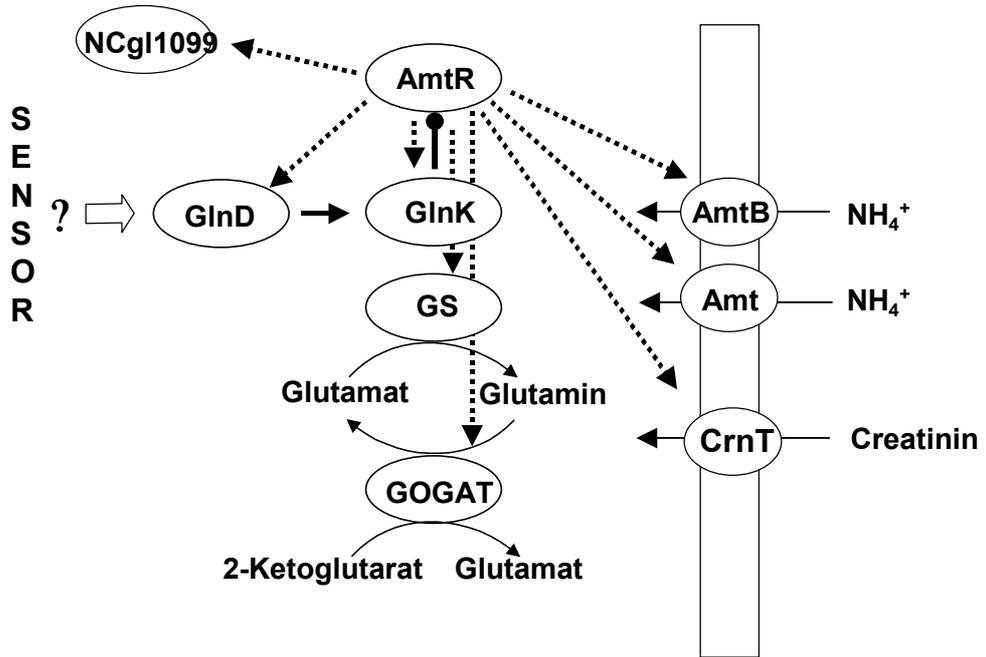
Sowohl AmtR als auch AmtB werden wahrscheinlich über die Wechselwirkung mit GlnK reguliert. Vermutlich interagiert GlnK unter Stickstoffüberschuß mit AmtB und blockiert den Transporter. Unter Stickstoffmangel wird GlnK durch GlnD adenylyliert

und tritt dann mit AmtR, der nun die Gene zur Transkription freigibt, in Wechselwirkung. Bisher ist noch nicht bekannt, wie *C. glutamicum* Stickstoff-limitierende Bedingungen feststellt und an GlnD bzw. die Adenylyltransferase weitergibt. Als Sensor ausgeschlossen werden konnten aber GlnK und GlnD (Nolden, 2001c). Abbildung 3b zeigt das derzeitige Model der Stickstoffkontrolle im Bezug auf die Ammoniumaufnahme und –assimilation. (Für einen Überblick siehe Burkovski, 2003a, Burkovski, 2003b, Burkovski, 2004).

Neben Ammonium stehen *C. glutamicum* noch weitere Stickstoffquellen zur Verfügung. Glutamin wird über einen Na⁺-gekoppelten Symporter aufgenommen. Die Regulation ist zur Zeit noch unklar (Siewe *et al.*, 1995). Glutamat kann sowohl über eine Na⁺-gekoppelte Permease (Burkovski *et al.*, 1996) als auch über einen hochaffinen ABC-Transporter (*gluABCD*; Krämer & Lambert, 1990; Kronemeyer *et al.*, 1995) in die Zelle gelangen. Während die Permease nur bei Wachstum auf Komplexmedium aktiv ist, steht das *gluABCD-cluster* unter Katabolitenrepression. Über eine Regulation in Abhängigkeit der Stickstoffversorgung ist nichts bekannt.

Harnstoff kann wie Ammoniak als ungeladenes Teilchen die Zellmembran passieren. Daher ist ein Aufnahmesystem unter guter Harnstoffversorgung nicht notwendig. Bei geringen Konzentrationen wird ein hochaffines Harnstoffaufnahme-system (Km von 9µM) mit geringer Transportrate von 2 bis 3,5 nmol min⁻¹ (mg Trockengewicht)⁻¹ aktiviert. Da der Harnstofftransporter nach Zusatz von CCCP eine verminderte Aufnahmerate zeigte, wurde geschlossen, daß es sich wahrscheinlich um ein sekundäres System (Siewe *et al.*, 1998) handelt. In der Zelle werden die Harnstoffmoleküle durch die Urease (Km von 55 mM) zu Ammonium und CO₂ gespalten. Die Gene *ureA*, *ureB* und *ureC* kodieren für das Core-Enzym und werden in einem gemeinsamen Transkript abgelesen (Nolden *et al.*, 2000). Für die anderen Gene *ureEFGD*, die für akzessorischen Untereinheiten kodieren, konnte keine Operonstruktur nachgewiesen werden. Eine Stickstoff-abhängige Transkription konnte nicht gezeigt werden (Nolden *et al.*, 2000). Für die weiteren Stickstoffquellen Allantoin, Arginin und Ornithin sind noch keine Transporter und assimilierenden Enzyme in *C. glutamicum* bekannt.

3A



3B

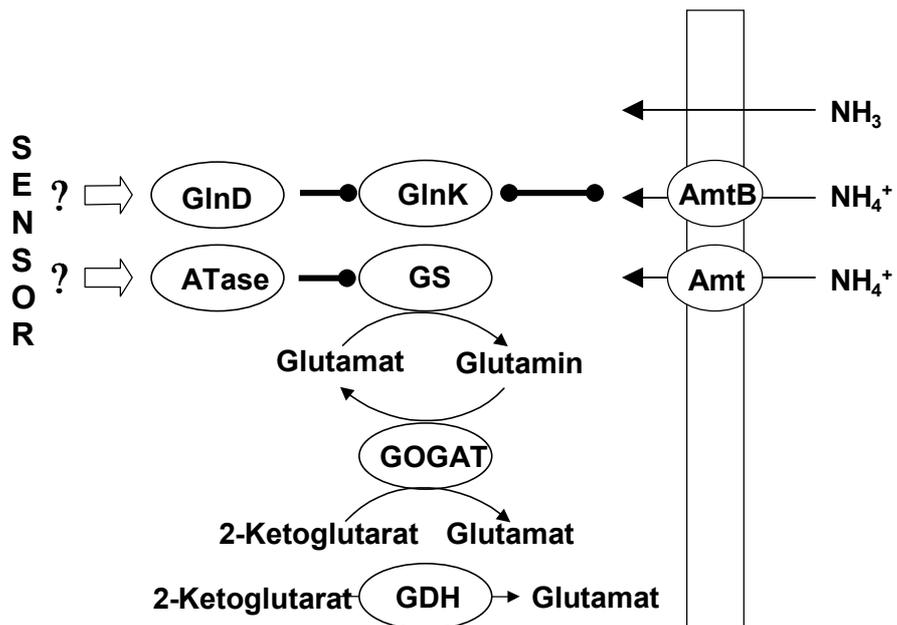


Abbildung 3: Aktuelles Model der Stickstoffkontrolle. **Abb. 3A** zeigt die Regulation auf Expressionsebene. AmtR ist der einzig bisher bekannte Regulator und reprimiert die meisten bisher bekannten Gene der Stickstoffkontrolle. **Abb. 3B** zeigt die Regulation auf Aktivitätsebene. Ein bisher unbekannter Sensor gibt das Signal des Stickstoffstatus an GlnD bzw. die ATase weiter. Die ATase kontrolliert die Aktivität der GS. GlnD modifiziert GlnK, welches vermutlich je nach Adenylylierungsstatus mit AmtB oder AmtR interagiert.

—● Regulation durch Protein-Protein-Wechselwirkung▶ Regulation durch AmtR

Zielsetzung der Arbeit

Bisher konnte für einige Gene, deren Genprodukte an der Stickstoffkontrolle beteiligt sind, eine AmtR-abhängige Regulation gezeigt werden. Innerhalb dieser Arbeit sollte das AmtR-Regulon möglichst vollständig charakterisiert werden. Zunächst sollte durch zwei voneinander unabhängige, globale Ansätze ein Überblick über putativ AmtR-regulierte Gene geschaffen werden. Im nächsten Schritt sollte die Regulation dieser Gene verifiziert und die Stärke ihrer Repression unter Stickstoffüberschuß ermittelt werden. Im Rahmen der Promotoranalysen sollten die AmtR-Bindungsstellen *upstream* dieser Gene lokalisiert und miteinander verglichen werden, um die Ermittlung einer Konsensussequenz zu ermöglichen. Ein Vergleich der einzelnen Bindemotive mit den ermittelten Repressionsstärken sollte Aufschluß über einen Zusammenhang zwischen der jeweiligen Anzahl und der Konservierung der Bindungssequenzen und der AmtR-vermittelten Repressionsstärke geben. Ein weiterer Schwerpunkt bildete die Suche nach möglichen anderen Regulatoren, die an der Stickstoffkontrolle beteiligt sind.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

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

Tab. 1: In dieser Arbeit eingesetzten *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme und ihre Eigenschaften. Die Konstruktion der Stämme ist im Anhang beschrieben.

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 ϕ80ΔlacZ ΔM15mcrA $\Delta(mmr hsdRMS mcrBC)$</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM109	<i>F⁻traD36 lac^f $\Delta(lacZ)$M15 proA⁺B⁺ / e14⁻ (McrA⁻) $\Delta(lac-proAB)$ thi gyrA96 (Nx^R) endA1 hsdR17 (<i>r_km_k</i>) relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
ATCC::pDRIVE-uusC	<i>urtC</i> Insertion in den Wildtyp Stamm ATCC	diese Arbeit
MJ6-18	ATCC 13032 Δ <i>amtR</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 2000
RES 167	Restriktionsdefiziente Mutante des Wildtyp-Stamms ATCC 13032, $\Delta(cgIIIM-cgIIIR-cgIIIR)$	Tauch <i>et al.</i> , 2002
RES167::pDRIVE-ureR	<i>ureR</i> Insertion in den restriktionsdefizienten Stamm RES167	diese Arbeit
RES167::pDRIVE-uusA	<i>urtA</i> Insertion in den restriktionsdefizienten Stamm RES167	diese Arbeit
RES167::pDRIVE-uusE	<i>urtE</i> Insertion in den restriktionsdefizienten Stamm RES167	diese Arbeit

II. Material und Methoden

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit Markern und Eigenschaften. (Ap^R, Resistenz gegen Ampicillin; Cm^R, Resistenz gegen Chloramphenicol; Km^R, Resistenz gegen Kanamycin; Nx^R, Resistenz gegen Nalidixinsäure). Die Konstruktion der Plasmide ist im Anhang beschrieben. Die mit * gekennzeichneten Plasmide besitzen keine NCgl-Zuordnung

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDRIVE	Ap ^r , Km ^r , A-T Insertionsvektor	Qiagen, Hilden
pDRIVE-ureR	pDRIVE mit internem 0.5 kb <i>ureR</i> Fragment	diese Arbeit
pDRIVE-uusA	pDRIVE mit internem 1.1 kb <i>urtA</i> Fragment	diese Arbeit
pDRIVE-uusC	pDRIVE mit internem 0.8 kb <i>urtA</i> Fragment	diese Arbeit
pDRIVE-uusE	pDRIVE mit internem 0.6 kb <i>urtA</i> Fragment	diese Arbeit
pGEM3z	Ap ^R , <i>lacZ</i> α <i>E. coli</i> -Vektor für <i>in-vitro</i> -Transkription	Promega, Mannheim
pGEM4z	Ap ^R , <i>lacZ</i> α <i>E. coli</i> -Vektor für <i>in-vitro</i> -Transkription	Promega, Mannheim
pGEM3z16SrRNA	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus dem 16SrRNA-Gen. 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	Nolden, 2001
pGEM3z-amt	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>amt</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	Nolden, 2001
pGEM3z-amtB	pGEM3z mit 0,7 kb Fragment aus <i>amtB</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	Nolden, 2001
pGEM3z-gltB	pGEM3z mit 0,8 kb-Fragment aus <i>gltB</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	Nolden, 2001
pGEM3z-glnA	pGEM3z mit 0,8 kb-Fragment aus <i>glnA</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	Nolden, 2001
pGEM4z-454	pGEM4z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>crnT</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	Nolden, 2001
pGEM3z-amtR	pGEM3z mit 0,4 kb-Fragment aus <i>amtR</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-455	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>cda</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-465	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>ureR</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit

II. Material und Methoden

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEM3z-466	pGEM3z mit 0,2 kb-Fragment aus <i>ureA</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-470	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>ureF</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-471	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>ureG</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-472	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>ureD</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-572	pGEM3z mit 0,2 kb-Fragment aus <i>hkm</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-1497	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf1497</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor NCgl0892	diese Arbeit
PGEM3z-1498	pGEM4z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>urtA</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-1499	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>urtB</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.	diese Arbeit
pGEM3z-1500	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>urtC</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-1501	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>urtD</i> . 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.	diese Arbeit
pGEM3z-1731	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf1731</i> (NCgl1099). 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-1732	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf1732</i> (NCgl1100). 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-2038	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf2038</i> (NCgl1874). 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-2040	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>gluA</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-2092	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf2092</i> (NCgl1915). 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-2203	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>gdh</i> . 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-2603	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf2603</i> (NCgl1362). 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-3083	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus <i>orf3083</i> (NCgl2253). 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEM3z-3086	pGEM3z mit 0,2 kb-Fragment aus orf3086 (NCgl2252). 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pGEM3z-3238*	pGEM3z mit 0,5 kb-Fragment aus orf3238. 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor	diese Arbeit
pUC11-1.8	1,8kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus der chromosomalen DNA von <i>C. glutamicum</i> mit <i>amtR citE</i> in pUC19	Jakoby <i>et al.</i> , 2000

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1. Nährmedien

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

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

Zur Selektion der entsprechenden Resistenzmarker bei *E. coli* und *C. glutamicum* wurden den Medien bei Bedarf nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: 50 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Kanamycin. Nach Elektroporation von *C. glutamicum* wurden zur Selektion BHI-Agarplatten mit nur 10 µg/ml Kanamycin verwendet. Sobald sich Kolonien gebildet hatten, wurden diese zur weiteren Kultivierung auf BHI-Agarplatten mit 25 µg/ml Kanamycin überimpft.

Tab. 3: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.

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

2.2 Kultivierungsbedingungen

E. coli-Stämme wurden bei 37°C, *C. glutamicum*-Stämme bei 30°C kultiviert. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die *C. glutamicum*-Zellen für alle Experimente nach folgendem standardisierten Animpfverfahren behandelt: 20 ml BHI-Medium - gegebenenfalls mit Antibiotikum - wurden morgens mit dem benötigten Bakterienstamm beimpft und unter Schütteln ca. 8 h inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann CgC-Medium inokuliert. Diese Kultur wurde über Nacht unter Schütteln inkubiert, um eine optimale Anpassung der Zellen an das Minimalmedium zu erzielen. Da für alle Untersuchungen Zellen in der exponentiellen Phase benötigt wurden, wurde mit dieser Übernachtskultur frisches CgC-Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 1 angeimpft und unter Schütteln bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ ca. 4-5) inkubiert. Zur Induktion von Stickstoffmangel wurden die Zellen abzentrifugiert und in vorgewärmten CgCoN-Medium resuspendiert.

3. Biochemische Techniken

3.1 Aufnahmemessungen

3.1.1 Bestimmung der Aminosäureaufnahme

Zur Bestimmung der Glutamataufnahmerate wurden die Zellen nach Übernachtskultur in CgC-Medium in frisches CgC-Medium auf eine OD_{600} von ca. 0,5 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von ca. 4 weiterkultiviert. Nach Zentrifugation (4000 xg , 30°C) wurde das Pellet in vorgewärmten CgCoN-Medium resuspendiert. Die OD_{600} wurde nach 3 h Inkubation bestimmt und auf ca 0,5 eingestellt, 3 ml Zellen in ein Rührgefäß gegeben und im Wasserbad bei 30°C für 3 min vorgewärmt. Unter Rühren wurde dann die Aufnahme durch Zugabe von 30 μl ^{14}C -markiertem 15 μM Glutamat (10.000 Counts pro Ansatz) gestartet. Es wurde über einen Zeitraum von 10 min jeweils nach 1 min eine Probe von 200 μl entnommen. Auf einem Glasfilter wurden dann die Zellen durch Absaugen in einer Mehrfachfiltrationsanlage und nachfolgendem zweimaligem Waschen mit je 2,5 ml 100 mM LiCl vom Medium getrennt. Die Filter wurden dann in Szintillationsröhrchen mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (ROTH, Karlsruhe) gegeben und die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Scintillation Counter LS6500, Beckmann Coulter, München) bestimmt. Die Gesamtaktivität des Ansatzes wurde durch direktes Zählen von 200 μl Reaktionsansatz bestimmt. Die Aufnahmerate wurde aus dem linearen Teil der Aufnahmekinetik bestimmt und in [nmol MA/min * mg TG] angegeben.

Die Bestimmung der Serinaufnahmerate erfolgte genauso wie die Bestimmung der Glutamataufnahmerate. Jedoch wurden die Messung mit 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 und 500 μM ^{14}C -markierter Serin durchgeführt.

Die Bestimmung der Leucinaufnahmerate erfolgte genauso wie unter 3.1.1 beschrieben. Jedoch wurden die Messung mit 50 und 500 μM ^{14}C -markiertem Leucin durchgeführt.

Die Bestimmung der Leucinaufnahmerate erfolgte genauso wie unter 3.1.1 beschrieben mit 50 und 500 μM ^{14}C -markiertem Arginin.

3.1.2 Bestimmung der Harnstoffaufnahme

Da Harnstoff in der Zelle sofort durch die Urease gespalten wird, wurde zur Bestimmung der Harnstoffaufnahme zunächst die Abnahme der Harnstoffmenge im Medium gemessen. Hierzu wurde nach 3 h Inkubation in CgCoN-Medium die OD_{600} bestimmt und beim Wildtyp auf ca 0,5 eingestellt. Bei den Mutanten wurde die OD_{600} so belassen (OD_{600} von 3-7). Anschließend wurden 3 ml Zellen in ein Rührgefäß gegeben und im Wasserbad bei 30°C für 3 min vorgewärmt. Die Harnstoffaufnahme wurde durch Zugabe von 4µM [¹⁴C]-markierten Harnstoff gestartet. Die Messung der verbliebenen Harnstoffmenge im Medium erfolgte, indem die entnommene Probe direkt in ein Szintillationsröhrchen mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben wurde. Die Zeitpunkte der Probenentnahme varrierten je nach Messung zwischen 1min und 15 min. Die Radioaktivität wurde dann wiederum in einem Szintillationszähler bestimmt.

3.2 Bestimmung der ATP-Konzentration

Die Konzentration der Adeninnucleotide (ATP/ADP) in Zellen konnte unter Zuhilfenahme des Luciferin/Luciferase-Systems aus Licht-emittierenden Organen (Firefly lanterns) des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) bestimmt werden (Ludin *et al.*, 1976 und Schimz *et al.*, 1981). Dabei wurde die Lichtemission, die bei der u. a. Reaktion frei wird, über einen definierten Zeitraum gemessen.



Bei diesem Meßsystem ist die Stärke der Lichtemission proportional zur ATP-Konzentration in den Zellen. Daher wurde zur genauen Konzentrationsbestimmung eine Messreihe mit ATP-Standards (1nM-1µM) durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit dem Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad Wildbad), indem 100µl Probe oder Standard mit 100µl Luciferase vermischt und die Lichtemissionen über einen Zeitraum von 20 s gemessen und addiert wurden.

Der ATP-Standard wurde aus einer Stammlösung (1µM ATP in Puffer 1), der Luciferin/Luciferase-Extrakt aus einer Suspension von 50 mg Lyophilisat (*Buffered Firefly Lantern Extract*, Sigma, Taufkirchen) in 5 ml H₂O hergestellt. Unlösliche

Bestandteile der Enzymlösung wurden durch einen Zentrifugationsschritt (4000 x g, 4°C, 10 min) entfernt. Je nach Höhe der Emissionswerte der Nullprobe konnte der Luciferin/Luciferase-Extrakt noch weiter in Wasser verdünnt werden.

Da ATP innerhalb der Zelle schnell umgesetzt wird, mussten die Proben zügig aufbereitet werden. Hierzu wurden 40 µl Zellsuspension in 360 µl DMSO gegeben, sofort mit 1,4 ml eiskaltem Wasser versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur ATP-Konzentrationsbestimmung bei -80°C aufbewahrt.

Puffer 1:

50 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4; 3,5 mM MgSO₄; 2,5 mM K₂SO₄; 0,6 mM EDTA.

3.3 Herstellung von Zellextrakten

Zellextrakte von *C. glutamicum* wurden in einem *FastPrep*-Gerätes (FP120, Qiogene, Heidelberg) hergestellt. Für den Aufschluß wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in ca. 350 µl Puffer resuspendiert und in ein 2,0 ml-Aufschlussgefäß mit Glasperlen (Ø 0,2-0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluß erfolgte dann durch hochfrequentes Schütteln für 2 x 30 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 min auf Eis gekühlt. Nach dem Zellaufschluß wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 4°C, 30 min) sedimentiert.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellextrakten

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in Zellextrakten von *C. glutamicum* wurde die Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) angewendet. Als Standard diente Rinder-Serumalbumin (AppliChem, Darmstadt).

3.5 Bestimmung der Urease-Aktivität

Zur Bestimmung der Urease-Aktivität von *C. glutamicum*-Stämmen wurde der Indophenoltest (Jahns *et al.*, 1988), bei dem Ammonium colorimetrisch nachgewiesen wird, eingesetzt. Zellen aus einer BHI-Vorkultur wurden über Nacht in Minimalmedium geschüttelt und morgens in Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 1 angeimpft. Nach Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ ca. 4-5) wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C), in Minimalmedium ohne Stickstoffquelle aufgenommen und weitere 3 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 50 ml der Zellen in Phosphatpuffer gewaschen und im gleichen Puffer auf eine OD₆₀₀ von ca. 200 resuspendiert. Nach dem Aufschluß der Zellen wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 4°C, 30 min) entfernt. 50 µl des zellfreien Überstandes wurden zusammen mit 900 µl Phosphatpuffer bei 30°C im Wasserbad präinkubiert. Anschließend wurde die Messung durch Zugabe von 50 µl einer 200 mM Harnstofflösung gestartet. Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Lösung 1 und 1 ml Lösung 2 gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 52°C wurden die Proben 7 ml Wasser verdünnt und ihre optische Dichte gegen einen Blindwert, bei dem die Harnstofflösung nach Lösung 1 und 2 zugegeben wurde, bei 546 nm gemessen. Die Angabe der spezifischen Enzymaktivität erfolgte in U x mg Protein⁻¹ (µmol gebildetes Ammonium x min⁻¹ x mg Protein⁻¹). Für die Eichkurve wurde Ammoniumchlorid in einem Konzentrationsbereich von 0 – 5µmol eingesetzt.

Phosphatpuffer:

50 mM KH₂PO₄, pH (KOH) = 7,0.

Lösung 1:

5% wassergesättigtes Phenol, 0,025% Natriumnitroprussiat.

Lösung 2:

2,5% NaOH, 0,2% Natriumhypochlorit.

3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Die 2D-Gelelektrophorese ermöglicht eine Trennung von Proteinen zunächst durch eine isoelektrische Fokussierung im pH-Gradientengel, bei der jedes Protein an seinem isoelektrischen Punkt fokussiert und eine anschließende Trennung nach dem Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel. Für die isoelektrische Fokussierung wurden 24 cm IPG-Streifen des pH-Bereichs pH 4-7 (*Immobiline®DryStrips*, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. 100 µg Protein wurden direkt in 350 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen und in die sorgfältig gereinigte Kammer pipettiert. Nach Entfernen der Schutzfolie wurde der *DryStrip* mit der Gelseite zuunterst auf die Lösung gelegt, ohne dass Flüssigkeit auf die Rückseite des Strips gelangte und die Kammer anschließend mit einem Deckel abgedeckt. Die Fokussierung erfolgte bei 20°C in einem *IPGphor™ Isoelectric Focussing System* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach folgendem Programm: 6 h 30V, 6 h 60V, 1 h 500V, 1 h 1.000V, 1 h 8.000V, 9 h 8.000V, so daß 68.000 Vh erreicht wurden. Die fokussierten Streifen wurden vor der zweiten Dimension zur Reduktion der Proteine 15 min in Äquibrierlösung, die 1% DTT enthielt, inkubiert. Um überschüssiges DTT zu entfernen und die reduzierten Cysteinreste durch Alkylierung zu stabilisieren, wurden die Probenstreifen anschließend 15 min in Äquibrierlösung mit 4% Iodacetamid geschüttelt. Die Streifen wurden kurz auf angefeuchtetem Filterpapier von überschüssiger Lösung befreit und nachfolgend auf die vorbereiteten Gele (*ExcelGel Gradient XL 12-14*, Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt. Die zweite Dimension lief 1 h bei 20 mA, nach Entnahme der Probenstreifen und Verlegung des Pufferstreifens für weitere 2½ h bei 40 mA. Nach der Elektrophorese wurden die 2D-Gele mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Rehydratisierungslösung

6 M Harnstoff (*plus one*-Qualität), 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 0,5% Pharmalyte 3-10, einige Körnchen Bromphenolblau, ad 10 ml mit H₂O_{bidest.} Die Lösung wurde à 1 ml aliquotiert und konnte bei -20°C mindestens 3 Monate verwahrt werden. Vor Gebrauch wurden 0,4% DTT dazugeben.

Äquibrierlösung

50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 134 ml H₂O_{bidest.}; ergibt 400 ml, pH (HCl) = 6,8.

3.7 Kolloidale Coomassie-Färbung

Eine intensive Färbung der 2-D-Gele konnte mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blue erzielt werden. Gleichzeitig mit der Färbung werden die Proteine durch ein Essigsäure/Methanol-Gemisch im Gel fixiert. Die Inkubationszeit des Gels in der Färbelösung betrug ca. 1 h. Die Entfärbung erfolgte über Nacht bzw. über mehrere Stunden, wobei die Entfärbelösung mehrere Male ausgewechselt wurde. Coomassie Brilliant Blue erreicht eine Nachweisempfindlichkeit von bis zu 0,1 µg.

Färbelösung:

10% v/v Essigsäure, 45% v/v Methanol und 0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250 in 1 l A. bidest lösen.

Entfärbelösung:

10% v/v Essigsäure in 1 l A. bidest lösen.

4. Molekularbiologische Techniken

4.1 DNA-Techniken

4.1.1 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFX-Micro-Plasmid-Prep-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. das NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiafilter Plasmid-Midi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

4.1.2 Präparation chromosomaler DNA

C. glutamicum-Zellen wurden über Nacht in 6 ml BHI-Medium angezogen. Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte mit Hilfe der Genomic-tips 100/G (Qiagen, Hilden) gemäß dem Qiagen Genomic DNA Handbook. Die Puffer B1 und B2 wurden

selbst angesetzt, alle weiteren Puffer aufgrund der gleichen Zusammensetzung dem QIAfilter Plasmid Midi Kit entnommen. Dnase-freie RNase wurde durch 20 minütiges Kochen einer RNase-haltigen Lösung (100mg/ml) und anschließendem Abkühlen auf Eis hergestellt. Zum Abbau der Zellwand und von Proteinen wurde die Zellen 30 min in Lysis-Puffer mit Lysozym (100 mg/ml; Sigma, Deisenhofen) bzw. Proteinase K-Lösung (19 mg/ml; Roche, Mannheim) behandelt. Die gereinigte DNA wurde anschließend in 200µl TE-Puffer aufgenommen und ihre Qualität anhand eines Agarosegels überprüft.

TE-Puffer:

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

Lysis-Puffer:

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

4.1.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Die Trennung von Proteinen aus DNA- und RNA-Lösungen erfolgte durch Fällung mit Hilfe eines Ethanol-Acetat-Gemisches. Dafür wurde dem Nukleinsäureansatz 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 4,3) und das 3-fache Volumen 100% Ethanol zugesetzt. Nach Inkubation für mindestens 1 h bei -20°C wurde die präzipitierte Nukleinsäure zentrifugiert (14000 x g, 30 min, 4°C), das Pellet zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Sediment in einem geeignetem Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder TE-Puffer aufgenommen.

4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenaufftrennung und Qualitäts- sowie Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8-2% (w/v) in 1 x TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Die jeweiligen Proben wurden mit 4x Ladepuffer (Sambrook *et al.*, 1989, Gel loading buffer II) versetzt, auf das Gel aufgetragen und mit einer Spannung von bis zu 10 V/cm Gellänge aufgetrennt. Die

Färbung der Nukleinsäure erfolgte in einem Ethidiumbromidbad und konnte durch einen Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

4.1.5 Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsenzymen von NEB (Frankfurt/Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Restriktionsansätze wurden entweder mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder durch Agarose-Gelelektrophorese in TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) gereinigt. Aus den Agarose-Gelen wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) bzw. mit dem NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mit Ready-to-go Ligationsansätzen von Amersham Biosciences (Freiburg) bzw. dem Rapid DNA Ligation Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.6 Polymerase-Kettenreaktion: PCR und RT-PCR

Zur DNA-Amplifizierung wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die Primer wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) und Operon (Qiagen, Hilden) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 nM gelöst. Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurden zusammenpipettiert:

25 µl Master-Mix (Qiagen, Hilden)

je 1 µl Primer

1 µl "template"

Wasser ad 50 µl.

Als "template" diente chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder eine 10 min bei 95°C gekochte Suspension von Zellen in Wasser. Die PCR wurde in einem Mastercycler[®] personal bzw. Mastercycler[®] gradient (Eppendorff GmbH, Hamburg) durchgeführt. Zur Amplifikation wurde das *template* zunächst 3 min lang bei 95°C denaturiert. Im

Anschluß erfolgte die Amplifikation des Fragments durch eine Wiederholung (25-40 Zyklen) folgender Schritte:

Denaturierung (94°C, 30 s)

Annealing ("annealing"-Temperatur der Primer, 30 s)

Elongation (72°C, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments

Um eine vollständige Synthese der DNA-Stränge zu gewährleisten, erfolgte erneut ein Elongationschritt (72°C, 10 min). Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

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

4.1.7 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des "SureClone Ligation Kits" von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Zur gerichteten Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren wurden die Fragmente mit Primern amplifiziert, an deren 5'-Ende die gewünschte Schnittstelle und eine vorgegebene Anzahl Basen (siehe NEB-Katalog) angefügt wurden. Die an die Schnittstellen angehängten Basen ermöglichten zum einen eine erhöhte Effizienz der Restriktion, zum anderen einen besseren Zusammenhalt der Enden der DNA-Fragmente. Das PCR-Produkt wurde für 2 h mit den jeweiligen Restriktionsenzymen inkubiert und anschließend gereinigt und direkt in den entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten Vektor ligiert.

4.1.8 Gelretardationstest

Zum Nachweis der Bindung von AmtR an die Promotorregion putativ AmtR-regulierter Gene diente der Gelretardationstest. Dabei wird ein DIG-markiertes DNA-Fragment, welches die putative AmtR-Bindesequenz enthält, mit AmtR enthaltenden Proteinextrakten inkubiert und anschließend auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Bei Bindung des Proteins an die DNA wird diese in ihrem Gellauf verlangsamt. Für die eingesetzte DNA wurde jeweils ein Bereich der Promotorregion über PCR amplifiziert und anschließend durch Verwendung des DIG Oligonucleotide 3-End Labeling Kit, 2nd Generation (Roche, Mannheim) am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert. Das AmtR-Protein wurde in *E. coli* DH5 α *mcr* pUC11-1.8 durch Überexpression des *amtR*-Gens hergestellt. Dazu wurden die Zellen in 250 ml LB-Medium mit Carbenicillin in einem 2 l-Kolben über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 xg, 4°C) geerntet und in TEK-Puffer (2 ml pro Gramm Naßgewicht) resuspendiert. Die Zellen wurden im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) aufgebrochen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 4°C, 30 min) entfernt. Die zellfreien Überstände wurden mit dem gleichen Volumen TEK-Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert. Für das Experiment wurden auf einer eisgekühlten Petrischale steigende Mengen Protein (0, 5, 10, 20 und 30 μ g), ca. 10 μ g DIG-markiertes DNA-Fragment und 2 μ g Kalbsthymus-DNA (Ultraschall-fragmentiert; Sigma, Taufkirchen) zur Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen gemischt. Das Volumen wurde mit TEK-Puffer + 200 μ g/ml BSA auf 15 μ l ergänzt, anschließend wurden die Ansätze 15 min auf Eis inkubiert. Vor Beladen des Gels wurde den Ansätzen je 2 μ l Gelladepuffer zugegeben. Das 4%-ige Acrylamid-Gel lief bei 15 mA mit 0,5 x TBE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) als Laufpuffer bis der Bromphenolblau-Marker den unteren Gelrand erreicht hat. Für den Transfer wurden auf das Gel eine Nylon-Membran und 2 WHATMAN-Papiere aufgelegt. Durch Einwirken von Kapillarkräften wurde die DNA in 45 min auf die Membran geblottet. Dann wurde die Membran kurz in 10 x SSC-Puffer gewaschen, getrocknet und für 3 min zur DNA-Fixierung im UV-Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) mit einer Energiedosis von 125 mJ/cm², (Einstellung "preset 0") bestrahlt.

Die Blockierung der Membran erfolgte durch 30-minütige Inkubation in 1 x Blocking Reagenz. Anschließend wurde dem Blocking Reagenz Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10.000 zugegeben. Nach 30 min

II. Material und Methoden

Inkubationszeit folgten drei Waschgänge à 20 Minuten in Waschpuffer. Zur Detektion wurde die Membran zunächst für 2 min in P3-Puffer äquilibriert und anschließend mit CSPD-Lösung (1:1000 in P3-Puffer verdünnt; Roche, Mannheim) benetzt. In Folie eingeschweißt wurde die Membran 15 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fuji *luminescent image analyzer* LAS 100 (Raytest, Straubenhardt).

TEK-Puffer:

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

4%iges Acrylamid-Gel:

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

Gelladepuffer:

TEK-Puffer mit 15% Ficoll 400 und 0,002% Bromphenolblau.

10X Blocking-Reagenz:

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

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) = 7,5) mit 0,3% Tween 20.

Detektionspuffer:

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

CSPD-Lösung:

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

4.2 RNA-Techniken

Alle RNA-Arbeiten wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt, weshalb durchgehend Handschuhe getragen wurden. Grundsätzlich wurden alle Geräte und Lösungen, soweit möglich, zur Eliminierung von RNase-Kontaminationen für 40 min bei 121°C autoklaviert.

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

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde das NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Zellen wurden über Nacht in CgC-Medium angezogen. Mit dieser Übernacht-Kultur wurde frisches Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5-1,0 angeimpft und die Zellsuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 4-5 weiter inkubiert. Nach Erreichen dieser OD₆₀₀ wurde je 1 ml Zellsuspension in vorgekühlten 2 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (14.000 x g, 1 min, 4°C). Das Pellet wurde sofort in 350 µl RA1-Puffer resuspendiert, in einem 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Nach Antauen der Zellsuspension auf Eis erfolgte der Zellaufschluß durch hochfrequentes Schütteln der Zellen im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) für 2 x 30 s bei 6,5 m/s. Zwischen den beiden Durchgängen wurden die Röhrchen für 2 min auf Eis abgekühlt, um eine starke Erwärmung der Zellsuspension zu verhindern. Anschließend wurden die entstandenen Zelltrümmer in 30 minütiger Zentrifugation bei 14.000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde mit 350 µl Ethanol versetzt und nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet, wobei die RNA während der Präparation routinemäßig mit DNase behandelt wurde. Ein zweiter Dnase-Verdau mit der Turbo-DNase (Ambion, Austin, TX, USA) wurde an die RNA-Präparation angeschlossen, um die chromosomale DNA vollständig zu entfernen. Zur Kontrolle der Präparation wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel unter UV-Licht betrachtet. Die Zusammensetzung des verwendeten Gelladepuffers ist unten angegeben. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde durch Anwendung des RiboGreen® RNA Quantitation Kits (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelt und mögliche Kontamination der RNA durch DNA durch ein PCR ausgeschlossen. Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

Gelladepuffer:

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

4.2.2 RNA-Hybridisierungen

Dot- und Slot-Blots

Zur Untersuchung der Transkription von Stickstoff-kontrollierten Genen wurden Dot- bzw. Slot-Blots durchgeführt. Ca. 5 µg Gesamt-RNA pro Dot und 1 µg pro Slot wurden in 10X SSC verdünnt und mittels einer Dot-Blot (S & S Minifold I, Schleicher & Schüll, Dassel) bzw. Slot-Blot Apparatur (Fisher Scientific, Schwerte) unter langsamem Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBond™Nylon Membrane, Sigma, Taifkirchen) aufgetragen. Nach Trocknen der Membran wurde die RNA durch UV-Bestrahlung in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) fixiert (125 mJ/cm², Einstellung "preset 0"). Die Membran wurde dann 1 h bei 50°C in Hybridisierungslösung blockiert. Nach Erwärmen auf 68°C wurde die DIG-markierte RNA-Sonde zugegeben und bei dieser Temperatur die Hybridisierung über Nacht durchgeführt. Zur Entwicklung der Blots wurde die Membran zweimal in Waschlösung 1 bei 20°C für je 15 min gewaschen, dann zweimal in Waschlösung 2 bei 68°C für je 25 min. Nach kurzem Waschen mit Waschpuffer bei 20°C wurde die Membran durch 30 min Inkubation bei 20°C in 20 ml 1X Blocking-Reagenz blockiert. Hierauf wurde Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim; Verdünnung 1:10.000) zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 20 min wurde die Membran für 3 min in Detektionspuffer inkubiert, mit CSPD-Lösung benetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nach 15 min Inkubation bei 37°C konnten die Signale mittels eines Fuji *luminescent image analyzer* LAS 100 (Raytest, Straubenhardt) detektiert werden. Die Quantifizierung der Signale konnte mit Hilfe der Software AIDA 2.0 (Raytest, Straubenhardt, Germany) ausgewertet werden.

II. Material und Methoden

Hybridisierungslösung:

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

20X SSC:

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

Waschlösung 1:

2X SSC, 0,1% SDS.

Waschlösung 2:

0,2X SSC, 0,1% SDS.

Maleinsäurepuffer:

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

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween 20.

10X Blocking-Reagenz:

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

Detektionspuffer:

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

CSPD-Lösung:

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

Northern Hybridisierung:

Für Northern Hybridisierungen wurden die RNA-Proben in dreifachem Volumen Gelladepuffer aufgenommen, 10 Minuten bei 70°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Nach Einfüllen der Proben in die Geltaschen wurde MOPS-Puffer in die Kammer gefüllt, bis die Oberkante des Gels gerade erreicht war. Das Gel lief zunächst bei 50 Volt und wurde auf 100 Volt hochgeschaltet und mit Puffer bedeckt, nachdem die Proben ins Gel gelaufen waren.

Das Gel wurde zweimal 15 Minuten in 10x SSC äquibriert, bevor es in der Vaku-Blot-Apparatur (LKB VakuGene XL, Amersham Pharmacia, Freiburg) auf die Nylon-Membran gelegt und mit Transferlösung bedeckt wurde. Der Transfer lief für zwei Stunden bei 50 mbar. Die Membran wurde dann zwischen WHATMAN-Papier getrocknet und im UV-Crosslinker bei einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt, um die RNA auf der Membran zu fixieren.

Die Membran wurde anschließend in der Prähybridisierungslösung mindestens eine Stunde bei 50°C inkubiert. Dann wurde 1 µl Sonde in der Lösung verdünnt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal 15 Minuten in 2 mal in 2x SSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur und im Anschluß daran zweimal 25 Minuten in 0,2x SSC mit 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Blockierung der Membran erfolgte in Blockierungslösung für 30-40 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde ein Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche; Mannheim) in diesem Reagenz 1:10.000 verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden drei Waschschritte von 20 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in Detektionpuffer äquibriert. Währenddessen wurde das CSPD-Reagenz im Verhältnis 1:100 mit Detektionspuffer verdünnt. Die Membran wurde mit dem CSPD benetzt, eingeschweißt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Signale konnten nun mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

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

Zur Untersuchung der Expression einzelner Gene wurden Digoxigenin-markierte "antisense"-RNA-Sonden verwendet. Zur Herstellung dieser Sonden wurde ein ca. 0,3 – 0,6 kb großes Fragment des entsprechenden Gens in die Vektoren pGEM3z

oder pGEM4z (Promega, Mannheim) kloniert. Bei beiden Vektoren ist die "multiple cloning site" von Promotoren der RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7 eingerahmt. Nach Linearisierung der Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen am 5`-Ende des Inserts wurden sie über eine Gelelektrophorese gereinigt und als "template" in einem *in-vitro*-Transkriptionsansatz eingesetzt. Zur Markierung der entstehenden RNA-Sonden diente Digoxigenin-11-dUTP. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

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

Die *in vitro* transkription wurde 2 h bei 37°C durchgeführt. Das „template“ wurde durch Zugabe von 1 µl DNase (Roche, Mannheim) und 20 min Inkubation bei 37°C entfernt. Die Sonden wurden nun bei –80°C aufbewahrt. Zur Hybridisierung wurde 1 µl des Ansatzes verwendet.

4.2.4 Quantitative *real-time* PCR

Mit Hilfe der *real-time* PCR konnte die Menge spezifischer mRNA in den Zellen ermittelt werden, indem zunächst in einer Reverse-Transkriptase-Reaktion die RNA in cDNA umgewandelt wurde und die Produktzunahme in einer anschließenden PCR durch eine fluorimetrische Echtzeitbestimmung erfasst wurde. Die Detektion des entstehenden DNA-Produktes geschah mit Hilfe des interkalierenden Fluorophoren „SYBR Green 1“, der sich nur in doppelsträngige DNA einlagert und unter diesen Umständen eine erhöhte Fluoreszenz aufweist. Für die *real-time* PCR wurde das QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR KIT (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein Reaktionsansatz von 20 µl setzt sich wie folgt zusammen:

10 µl 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix

Primer A (Endkonzentration 0,5 µM)

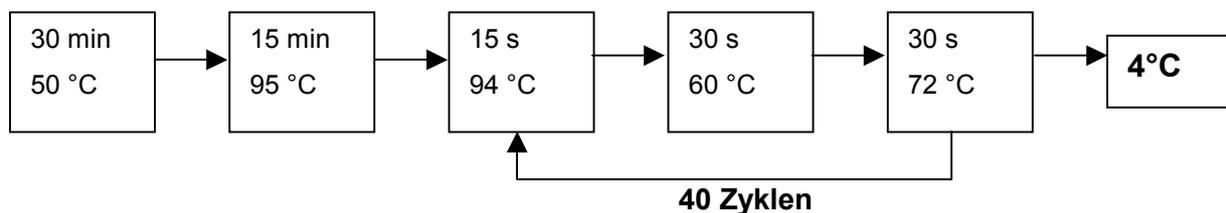
Primer B (Endkonzentration 0,5 µM)

0,2 µl QuantiTect RT Mix

Template RNA (100 ng)

Ad 20 µl mit Rnase-freiem H₂O

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



Nach jedem Zyklus wurde die Zunahme des PCR-Produktes anhand der erhöhten Fluoreszenz gemessen. Am Ende der *real-time* PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität und die Reinheit des erhaltenen Produktes zu prüfen.

4.2.5 DNA-Arrays

Die Herstellung von DNA-'Microarrays'

Die Synthese der 'primer', die PCRs, die DNA-Reinigung und die 'Microarray'-Herstellung erfolgte durch die Firma GeneScan Europe AG (Freiburg im Breisgau). Insgesamt konnten 3081 (N-Limitationsexperimente im Wildtyp) bzw. 3556 PCR-Produkte hergestellt werden. Diese wurden in dreifacher Ausführung auf Aminosilan-beschichtete Glasobjektträger (CMT-GAPS, Corning GmbH, Wiesbaden) „gespottet“.

Synthese fluoreszenz-markierter cDNA

Für die Microarrays wurden 50 µg RNA, die in der Speed-Vac auf ein Volumen von 20 µl eingengt wurden, mit 10 µl Random-Primern (100 pmol/ml, Hexamer/Oktamer-Gemisch im Verhältnis 1:1) versetzt, das Gemisch 10 min bei 70°C denaturiert und schnell auf Eiswasser abgekühlt (Komponente 1). Zugleich wurde eine zweite Komponente erstellt, welche aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt wurde:

- 1 µl Nucleotidmix (25 mM dATP, dGTP, dCTP und 5 mM dTTP)
- 10 µl 5 x Erststrangpuffer (Gibco),
- 5 µl 100 mM DTT
- und 2 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl, Gibco, Eggenstein)

3 µl Cy3 bzw. Cy5 dUTP (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden jeweils zu dem RNA-Primer-Mix (Komponente 1) zugegeben. Anschließend wurden 18 µl der Komponente 2 hinzugefügt und das Gemisch wurde zunächst 10 min bei Raumtemperatur und dann 110 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 µl EDTA (20 mM) und 2,5 µl NaOH (500 mM) und anschließender Inkubation für 10 min bei 70°C wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Zur Neutralisierung wurden 2,5 µl HCl (500 mM) zugegeben, anschließend wurde die cDNA über das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) gereinigt.

Hybridisierung

Die Cy3- und Cy5-markierten cDNAs wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit 3 µl Heringsperma-DNA-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Das Gemisch wurde zur Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die markierte RNA in 55 µl Hybridisierungslösung aufgenommen und auf einen DNA-Microarray aufgetragen. Um die Austrocknung des Microarrays zu verhindern, wurde ein Deckglas aufgelegt und mit Flüssigkleber (Fixogum, Marabu, Tamm) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (mind. 16 h) in einer Hybridisierungskammer (Vysis HYBrite, Abbott Diagnostika, Wiesbaden) bei 50°C. Das Deckglas wurde dann vorsichtig entfernt und der Microarray jeweils 10 min nach folgendem Schema gewaschen:

- 1) einmal in 2x SSC, 0,2% SDS;
- 2) zweimal in 1x SSC, 0,1% SDS;
- 3) 0,5x SSC
- 4) A. bidest.

Die Microarrays wurden durch Druckluft getrocknet und anschließend eingescannt.

Datenanalyse

Die DNA-'Microarrays' wurden mit einem GSI-Lumonics 'laser scanner' (ScanArray 400, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) ausgelesen, wobei jeweils einmal der Cy3-Farbstoff und der Cy5-Farbstoff angeregt und das dabei entstehende Bild gespeichert wurde. Die so erzeugten Bilder im tif-Format wurden mit der Software QuantArray (Version 3.0.0.0 PackardBioScience, Meriden, CT, USA) übereinandergelegt und ausgewertet.

Mit den einzelnen Microarrays wurde jeweils eine Normalisierung durchgeführt, um systematische Abweichungen - z.B. unterschiedliche Bindungseffizienz der Farbstoffe - zu korrigieren. Bei drei bis vier Wiederholungen eines Experiments konnten bis zu zwölf Datenpunkte pro Gen erhalten werden. Ein ermittelter Datenpunkt wurde dann für aussagekräftig erachtet, wenn das gemessene Signalverhältnis zwischen beiden Kanälen, also das Genexpressions-Verhältnis, größer als 2 bzw. kleiner als 0,5 war.

4.3 Techniken zur Manipulation von Zellen

4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli*-Stamms JM109 und Transformation

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Zunächst wurden *E. coli*-Zellen tagsüber in 20 ml LB-Medium angezogen, von dieser Vorkultur wurde abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) in einem 2 l Kolben gegeben. Über Nacht wurden die Zellen bei 20°C geschüttelt und am nächsten Morgen nach 10 min Eiskühlung

abzentrifugiert (4.000 x g, 4°C, 10 min). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendieren in 40 ml TB-Puffer wurden 1,4 ml DMSO zugegeben und die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden à 200 µl aliquotiert, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Transformation erfolgte mit Hilfe des Hitzeschockverfahrens. Hierzu wurden 200 µl Zellen mit Plasmid-DNA vermischt und zunächst für 30 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen für 40 sec auf 42°C erwärmt. Zur Regeneration wurden die Zellen nach Zugabe von 600 µl SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) eine Stunde bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Dann wurden die Zellsuspensionen (je 200 µl) auf LB-Agarplatten mit dem gewünschten Antibiotikum ausplattiert.

TB-Puffer:

10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6,7 mit KOH eingestellt.

Kompetente Zellen von *C. glutamicum* und Elektroporation

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Methode, die von Liebl *et al.* (1989) beschrieben wurde. Die Bakterien wurden tagsüber in BHI vorkultiviert und abends in 200 ml LB mit Wachstumsinhibitoren mit einer OD von 0,2 – 0,3 aufgenommen. Über Nacht wurden die Zellen bei einer Temperatur von 18-22°C und bei 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (4°C, 4.000 x g, 5 min) und in 10%-igem eiskaltem Glycerin resuspendiert. Der Waschvorgang in Glycerin wurde viermal wiederholt. Zum Schluß wurden die Zellen in 1 ml 10%-igem Glycerin aufgenommen, in Volumina von 100 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen konnten anschließend bei -80°C gelagert werden. Zur Transformation wurden die Zellen aufgetaut und 50 µl davon zusammen mit der nötigen Menge an Plasmid in eine sterile, eisgekühlte Elektroporationsküvette (Reqlab, Erlangen) mit 2mm Elektrodenabstand pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Elektroporation wurde unter Einsatz eines Gene Pulsers (BIORAD, München) durch einen Elektropuls bei 600 Ω (Parallelwiderstand), 25µF (Kapazität) und 2,5 kV durchgeführt.

Sofort nach dem Elektroschock wurde der Ansatz in 1 ml BHIS (1,8 g BHI-Medium und 4,55 g D-Sorbitol in 50 ml Wasser) resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden zur Regeneration 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert, das Pellet im Rückfluß resuspendiert und auf eine Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte 1-2 Tage bei 37°C.

LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren:

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

4.3.2 Konstruktion von Insertionsmutanten

Die Konstruktion von Insertionsmutanten von *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe des Qiagen®PCR Cloning Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Für Insertionen wurde ein 500 - 1000 bp großes internes DNA-Fragment des entsprechenden Gens in pDrive kloniert und dieses Konstrukt in die Zellen eingebracht. Der Vektor pDrive kann von den Zellen nicht repliziert werden, und bleibt nur erhalten wenn eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination erfolgt. Dadurch wird das entsprechende Gen inaktiviert. Die Klone, die über eine Kanamycinresistenz selektiert werden konnten, wurden über PCR auf die Insertion hin getestet.

4.4 Bioinformatische Ansätze

4.4.1 Ähnlichkeitssuche

Die Datenbankuche nach homologen Sequenzen wurde online bei diversen Websites durchgeführt. Zur Suche eines Gens innerhalb des *C. glutamicum*-Genoms, wurde die website :

http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Cglu_ATCC13032

verwendet. Bei der Ähnlichkeitssuche von *C.glutamicum*-Sequenzen zu Genen anderer Organismen wurde das Blast-Tool von NCBI verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.4.2 Multiples Alignment und Hidden Markov-Modell

Zunächst wurde aus den bekannten AmtR-Motiven (Nolden, 2001) ein *multiple alignment* hergestellt. Dafür wurden die zu untersuchenden Sequenzen in ein Fasta-Format gebracht. Aus diesem multiple alignment konnte eine statistische Beschreibung einer Konsensus-Sequenz abgeleitet und innerhalb einer Datenbanksuche durch Verwendung eines Hidden Markov-Modells eingesetzt werden. Die dazu verwendete Sequenzanalyse-Software HMMER 2.1.1 ist frei erhältlich unter <http://hmmer.wustl.edu/>.

III. Ergebnisse

Bisher konnten innerhalb unserer Arbeitsgruppe verschiedene Komponenten der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* identifiziert werden. Auf Expressionsebene reguliert AmtR verschiedene Gene, die für Aufnahmesysteme (Amt und AmtB), assimilierende Enzyme (Glutaminsynthetase und GOGAT), Proteine der Signaltransduktion (GlnD, GlnK) und Proteine unbekannter Funktion kodieren. Ziel dieser Arbeit war die genaue Analyse des Regulons von AmtR sowie die Suche nach weiteren möglichen Regulationsmechanismen unter Stickstofflimitation. Dazu sollten verschiedene globale Untersuchungsmethoden genutzt werden.

1. Bioinformatischer Ansatz

Ein globaler Ansatz, ein Regulon zu charakterisieren, ist die Durchführung einer Promotoranalyse unter Anwendung eines Hidden-Markov-Modells (Eddy, 1998). Hierzu wurden die bisher identifizierten AmtR-Bindemotive (ATCTATAG-N4-ATAG *upstream* von *amt*; ATCTATAG-N1-ATAG *upstream* von *amtB*; ATCTATAG *upstream* von *gltB* und das verkürzte Motiv ATCATA *upstream* von *glnA*; Nolden *et al.*, 2001a) als Vorgaben zur Erstellung einer Konsensussequenz unter Berücksichtigung der statistischen Gewichtung jedes Nukleotids (A, T, C oder G) an jeder Position innerhalb der Sequenz und einem möglichen Austausch verwendet. Somit bietet ein Hidden Markov-Modell den Vorteil gegenüber einer einfachen *blast*-Suche, daß sie nicht nur mit einem lokalem *alignment* arbeiten, sondern auch nicht automatisch detektierbare Sequenzähnlichkeiten in die Suche einbeziehen. Die angewendete Sequenzanalyse-Software ist im Internet unter der Adresse <http://hmmer.wustl.edu/> erhältlich. Neben den für das Hidden Markov-Modell verwendeten Motiven konnten neue putative Bindesequenzen gefunden werden (Tabelle 4). Mittels Northern Hybridisierungen wurde kontrolliert, ob der stromabwärts der jeweiligen Bindesequenz gelegene ORF unter AmtR-Kontrolle steht.. Bis auf die in der Tabelle grau unterlegten putativ AmtR-regulierten ORFs konnten alle durch diesen bioinformatischen Ansatz erhaltenen Kandidaten als unter AmtR-Kontrolle stehend verifiziert werden.

III. Ergebnisse

Tabelle 4: Putativ-regulierte Gene, die *upstream* des Startcodons eine mögliche AmtR-Bindesequenz (untere Sequenz; obere Sequenz entspricht der ermittelten Konsensussequenz; die mittlere der Übereinstimmung beider Sequenzen) aufweisen. Für die grau unterlegten Orfs konnten mit Hilfe von Northern Hybridisierungen keine AmtR-Regulation festgestellt werden. Die mit * gekennzeichneten ORFs besitzen keine NCgl-Nummer.

ORFs	<i>Upstream-Region mit möglicher AmtR-Bindesequenz</i>
Sequenz zwischen NCgl1099 (putative Hydrolase) & NCgl1100 (Peptidsynthetase-Module)	tat t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t t c t a t a t c + a t a g a t a t a T A T T T T C T A T C A A T C T A T A G A T A c T A
Sequenz vor <i>crnT</i> (1) (Creatinintransporter)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t c t a t a g a t + g a t a g a t + a + T A C T T T C T A T A G A T T G A T A G A A A t G T
Sequenz vor <i>crnT</i> (2) (Creatinintransporter)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t t t t c t a t a t c + a t a g a + a t + C C T T T T C T A T C A A T C T A T A G A A A c T T
Sequenz vor <i>codA</i> (Creatinindeaminase)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t t t t c t a t g t + g a + a g + t a t a T C T A T T C T A T T G C T T G A C A G G T A t T A
Sequenz vor <i>amt</i> (1)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t t c t a t c + a t a g a t a + T A T T T T C T A T T C C G C T A T A G A T A a A C
Sequenz vor <i>amt</i> (2)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t + t t c t a t g t c + a t a g a t + T T T T A C C T A T C G T T C T A T A G A T T t C T
Sequenz zwischen <i>hkm</i> und <i>gltB</i> (1)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a + t t t c t a t a g t + g a t g a + a t a G T T T T C C T A T A G G T T G A T C G A A A g T A
Sequenz zwischen <i>hkm</i> und <i>gltB</i> (1)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t c a g a t + g a t a g a + a T A T T A T C G A A C G A T T G A T A G A A A c A G
Sequenz vor NCgl1915	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a a t t t c t a t a c + a t a g a + a + A A A T T T C T A T C A A A C T A T A G A A A g A T
Sequenz zwischen Orf3237/3238* und <i>glnA</i>	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a a t t t a t a g a t c g a + a g + t a + t A A G T T T T G A T A G A T C G A C A G G T A a T G
Sequenz vor <i>amtB</i> (1)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t t c t a t a g t + a + a g + t a + t + T A T T T T C T A T A G T T T A A C A G G T A a T T
Sequenz vor <i>amtB</i> (2)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a + t c t a t a g a c + a + a g a + a t a C T C T A A C T A T A G A C C T A C A G A A A c T A
Sequenz zwischen <i>urtA</i> und NCgl 1105 (hypothetisches Protein) (1)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a c t a t a g a c + a t a g a + a t + T A A A A A C T A T A G A G C T A T A G A A A c T T
Sequenz zwischen <i>urtA</i> und NCgl 1105 (hypothetisches Protein) (2)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a a t c t a t a g + g a + a g a + a t A A C T A C C T A T A G G C T G A C A G A A A c T C
Sequenz vor NCgl1362 (CTP Synthase)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a a t t c t t g a t c + a t a g a t a + A A T C A T C T G T T G A T C T A T A G A T A g A T
Sequenz zwischen Orf3083* (hypothetisches Protein) und Orf3086* (hypothetisches Protein)	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t c t a t a c + a + a + a t T A C T T T C T A T C A A C C T A C A A G C A c T C
Sequenz zwischen Orf2038* (hypothetisches Protein) und <i>gluA</i>	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a a t t c t a t + g a t a g + t a + + C A A T A T C T A T C A T G T G A T A G G T A a A T
Sequenz zwischen <i>ureR</i> und <i>ureA</i>	t a t t t t c t a t a g a t c g a t a g a t a . t a t a t t t c t + g a + a g a + a T A A T T T C T G T T A C C T G A C A G A A A g G G

2. Transkriptomanalyse

2.1 DNA-Microarrays

Die Methode der DNA-Microarray-Analyse ermöglicht die Untersuchung des Transkriptoms von *C. glutamicum* unter verschiedenen Bedingungen. So wurden Expressionsprofile von RNA, die aus dem Wildtyp und dem MJ6-18-Stamm (*amtR*-Deletionsmutante) unter Stickstoffüberschuß sowie -mangel isoliert wurde, erstellt. Die jeweiligen Zellen wurden immer gleich behandelt, um unerwünschte Effekte, die nicht auf die veränderten Parameter zurückzuführen sind, zu vermeiden. Statistische Schwankungen wurden durch Präparation von einander unabhängigen Zellanzuchten verringert. Es wurden Microarrays der Degussa AG, auf welchen PCR-Produkte interner Fragmente von 3081 bzw. 3556 ORFs in dreifacher Ausführung immobilisiert worden waren, eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gesamt-RNA von Zellen des Wildtyps und der *amtR*-Deletionsmutante und Stickstoffüberschuß und -mangel isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase bei zeitgleichem Einbau von Cy 3- bzw. Cy 5-dUTPs in cDNA umgeschrieben. Da sich Cy5 im Vergleich zum Cy3-Farbstoff besser in die RNA einbaut, so daß das Endergebnis der Experimente zu Gunsten der Cy5 markierten RNA ausfiel, wurde die RNA einer Experimentreihe immer wechselseitig markiert. Die erhaltenen Intensitäten der einzelnen Spots konnten dann gemittelt werden (Loos *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001). Zur Auswertung der Microarrays und der statistischen Absicherung wurde RNA aus mindestens 2 voneinander unabhängig gezogenen Zellkulturen verwendet sowie pro untersuchter Bedingung eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Eine Übersicht über die durchgeführten Microarray-Experimente ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Die Auswertung der Microarrays erfolgte mit Hilfe des Programms GeneSpring (Silikon Genetics, CA). Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, müssen systematische Abweichungen minimiert werden. Diese systematischen Abweichungen entstehen z.B. durch Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe, welche unterschiedliche physikalische Eigenschaften (Lichtempfindlichkeit, Halbwertszeit und unterschiedliche Bindungseigenschaften) aufweisen, verschiedene Behandlung während der Versuchsdurchführung oder Scannereinstellung. Zur Korrektur der Fehler wurden verschiedene Normalisierungsschritte eingesetzt. Abweichungen, die den gesamten Microarray betreffen - beide Farbkanäle unterscheiden sich durch einen konstanten Faktor - wurden durch eine globale Normalisierung angeglichen. Lokale

III. Ergebnisse

Veränderungen wurden durch eine ortsabhängige Normalisierung korrigiert. ORFs, deren Expression sich mindestens um einen Faktor von 0,5 bzw. 2,0 änderten, wurden als signifikant reguliert bezeichnet. Anschließend wurde von den einzelnen Faktoren ein Mittelwert und eine Standardabweichung berechnet.

Tabelle 5: Übersicht über die durchgeführten Chipexperimente, die eingesetzte RNA und das erwartete Ergebnis

Experiment (je dreifach)	RNA aus:	RNA aus:	Ergebnis
Wildtyp gegen den MJ6-18-Stamm unter N+	WT Zellen in CgC	MJ6-18 Zellen ($\Delta amtR$) in CgC	alle Orfs, die durch AmtR reguliert werden.
Wildtyp gegen den MJ6-18 Stamm unter N-	WT Zellen 30 min in CgCoN	MJ6-18 Zellen 30 min in CgCoN	alle Orfs, die stark durch AmtR beeinträchtigt sind.
Wildtyp: N+ gegen N-	WT Zellen in CgC	WT Zellen 30 min in CgCoN	alle Orfs, die unter N-Mangel erhöht exprimiert werden
MJ6-18 Stamm: N+ gegen N-	MJ6-18 Zellen in CgC	MJ6-18 Zellen 30 min in CgCoN	alle Orfs, die unter N-Mangel vermehrt transkribiert, aber nicht durch AmtR reguliert werden.

2.1.1 Kontrollexperiment

Zur Kontrolle der Chip-Qualität und der Reproduzierbarkeit von RNA-Präparationen wurden zwei Chip-Experimente mit RNA, die unter gleichen Wachstumsbedingungen (30 min in CgC-Medium) unabhängig voneinander kultiviert und präpariert worden sind, durchgeführt. Zu erwarten war ein nahezu identisches Expressionsprofil beider Proben, so daß die einzelnen ORFs im Scatter-Plot auf der Winkelhalbierenden liegen sollten. Unterschiede in der Fluoreszenz bewirken, daß sich der Standort des Datenpunktes von der Winkelhalbierenden nach links oder rechts verschiebt. Ob ein Punkt am Anfang oder Ende der Winkelhalbierenden liegt, hängt generell von der Stärke der Signale beider RNA-Proben im Vergleich zum Hintergrundsignal ab. Das Ergebnis der Kontrolle ist in Abbildung 4 dargestellt. Nahezu alle Datenpunkte

III. Ergebnisse

befinden sich auf der Winkelhalbierenden; Abweichungen lagen zum Großteil innerhalb eines Faktors von 2 bzw. 0,5, die als Schwellenwerte, gekennzeichnet durch die Linien links und rechts der Winkelhalbierenden, festgesetzt wurden. ORFs, deren Faktoren größer als 2 oder kleiner als 0,5 waren, wurden als signifikant reguliert angesehen. Innerhalb dieses Kontrollexperiments konnten jedoch die Datenpunkte ober- und unterhalb dieses Schwellenwerts meist den Farbstoffkontrollen für Cy3 und Cy5 zugeordnet werden.

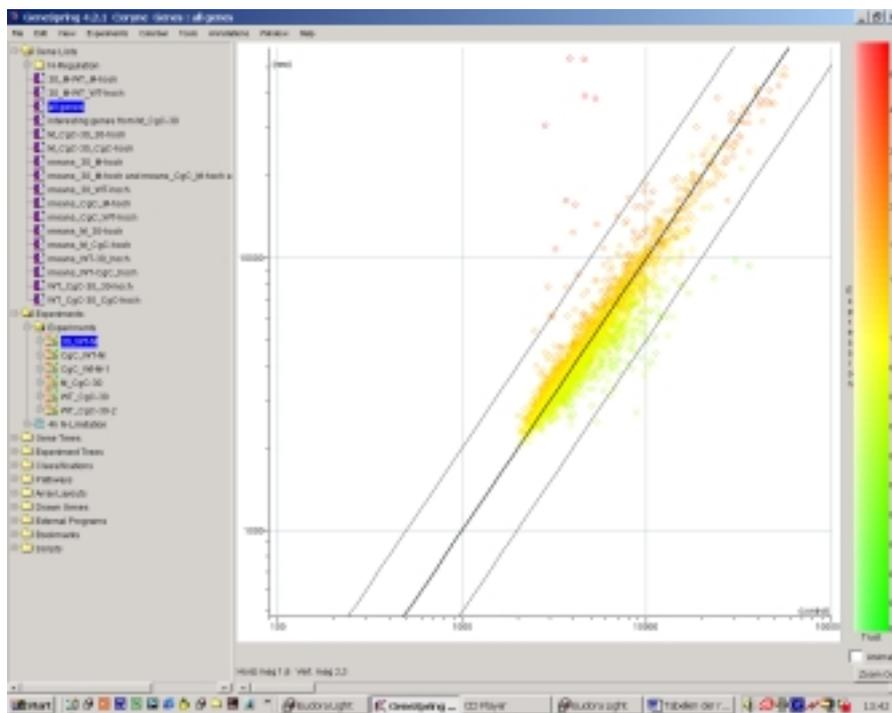


Abbildung 4: Kontrollexperiment mit zwei unabhängigen RNA-Proben isoliert aus Wildtyp-Zellen unter N-Überschuß. Die meisten Spots befinden sich auf der Winkelhalbierenden bzw. innerhalb der beiden äußeren Linien, die eine Expressionsänderung um einen Faktor von 0,5 bzw. 2 markieren.

Zur Auswertung der Chip-Experimente wurde die Software QuantArray (Packard BioScience, CT, USA) eingesetzt. Zur weiterer Analyse wurde die Software GeneSpring 3.2.12 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) verwendet, mit der die Faktoren ermittelt und in Scatter-Plots, eine graphische Darstellung der Expressionsverhältnisse der im Experiment eingesetzten RNAs, dargestellt wurden. In Excel wurden dann die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung gebildet.

2.1.2 Vergleich der Expressionsmuster des Wildtyps ATCC13032 unter N-Überschuß und N-Mangel

Zunächst wurde das Transkriptom des Wildtyps unter Stickstoffüberschußbedingungen mit dem unter Stickstoffmangel verglichen. Insgesamt konnten 33 Gene gefunden werden, die unter N-Mangel reprimiert werden (Tabelle 6). Darunter fallen zunächst neben ORFs, die für hypothetische Proteine kodieren, viele Gene, deren Genprodukte in Transkriptions- sowie Translationsprozesse involviert sind (z. B. ribosomale Proteine oder Transkriptionsregulatoren). Weiterhin wird anscheinend die Cysteinbiosynthese vermindert, da die Gene für eine Phosphoadenosin-Phosphosulfatreduktase und ein Cysteinsynthase reprimiert werden. Eine Repression konnte auch für die Gene *gap* und *eno*, die für Proteine der Glykolyse kodieren, beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten (Schmid *et al.*, 2000), wo eine erhöhte Transkription unter Stickstoffmangel für *gap* und *fda* gezeigt werden konnte.

Unter N-Mangel-Bedingungen wurden nicht nur *gltD* (kleine Untereinheit der GOGAT), *glnD* (GlnD-Protein), und *glnK* (GlnK-Protein), die gemeinsam mit *amtB* (Ammoniumpermease) im Operon liegen, als vermehrt exprimiert gefunden, sondern auch das gesamte *amt-soxA-ocd*-Operon (Ammoniumtransporter, putative Ornithincyclodeaminase, putative Sarcosinoxidase) sowie *glnA* (Glutaminsynthetase). Für diese Gene konnte schon durch frühere Experimente eine Abhängigkeit vom Stickstoffstatus der Zelle gezeigt werden. Zusätzlich konnten durch dieses Experiment Hinweise auf eine mögliche Stickstoffkontrolle weitere Gene gefunden werden. So wurden unter anderem auch die Gene *ureA* und *ureE*, die für eine Strukturuntereinheit der Urease bzw. ein akzessorisches Protein kodieren, unter N-Mangel vermehrt exprimiert. Des Weiteren konnten auch zwei Gene des

III. Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht über die im Wildtyp unter Stickstoffmangel im Vergleich zu 30 Minuten Stickstoffüberschuß um mindestens einen Faktor von 0,5 reprimierten Gene. Die Bezeichnung der Gene ist der NCgl-Nomenklatur entnommen und daher nicht immer durch eine genetische Charakterisierung verifiziert. Die mit * gekennzeichneten ORFs besitzen keine NCgl-Zuordnung; die Bezeichnung dieser ORFs wurde der Degussa-Datenbank entnommen.

ORF	NCgl	Cgl	Name	Mittelwert	Fehler
198*	-	-	hypothetisches Protein	0,190	0,084
312	2816	2917	putatives integrales Membrantransportprotein	0,282	0,102
2890	2473	2562	Cysteinsynthase [EC:2.5.1.47]	0,326	0,159
197	2717	2816	Phosphoadenosin-Phosphosulfatreduktase [EC:1.8.4.8]	0,356	0,065
1549	0935	0974	Enolase [EC:4.2.1.11]	0,364	0,094
1743	1109	1156	putative Helicase	0,397	0,193
403	2880	2982	einzelsträngige DNA-Bindeprotein	0,401	0,239
2574*	-	-	putativer ORF	0,413	0,119
2487	1526	1588	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	0,416	0,297
2084	1910	1985	Translation Initiationsfaktor 2	0,422	0,152
199	2718	2817	putative Nitritreduktase [EC:1.7.7.1]	0,450	0,159
3511	2409	2495	3-Oxoacyl-(Acyl-Transportprotein) Synthase [EC:2.3.1.85]	0,455	0,095
671	0251	0255	Katalase [EC:1.11.1.6]	0,463	0,132
755	0313	0319	Klasse III Zn-abhängige Alkoholdehydrogenase [EC:1.2.1.66]	0,470	0,122
2630	1339	1393	hypothetisches Protein	0,475	0,081
2742*	-	-		0,481	0,235
2456	1504	1565	putativer Transkriptionregulator	0,482	0,207
1744*	-	-	ATP-abhängige RNA Helicase <i>deaD</i> - <i>E. coli</i>	0,485	0,234
794	0337	0344	putative ATPase involviert in Chromosomenteilung	0,487	0,220
1661	1035	1080	ABC-Transporter, Komponente der Permease	0,490	0,312
2591	1372	1427	Cytidylatkinase [EC:2.7.4.14]	0,494	0,122
2333	2110	2190	Rieske Fe-S Protein	0,495	0,231
3775	0489	0508	ribosomales Protein L23	0,205	-
3776	0486	0504	ribosomales Protein S10	0,216	-
3735	2553	2642	Phosphotransferasesystem IIC Komponente [EC:2.7.1.69]	0,236	-
3767	0171	0174	Kälteschockprotein	0,298	-
3778	0492	0513	ribosomales Protein	0,064	-
3777	0491	0511	ribosomales Protein S19	0,124	-
3798*	-	-	ribosomales Protein S6 <i>rpsF</i> - <i>B. subtilis</i>	0,176	-
3568*	-	-	Maltodextrin-Phosphorylase <i>malP</i> - <i>E. coli</i>	0,379	-
3553*	-	-	ribosomales Protein L3 <i>rplC</i> - <i>B. subtilis</i>	0,447	-
3673	1756	1831	hypothetisches Protein	0,448	-
3763	2890	2992	hypothetisches Protein	0,493	-

III. Ergebnisse

Tabelle 7: Übersicht über die im Wildtyp unter 30 Minuten Stickstoffmangel im Vergleich zu Stickstoffüberschuß um mindestens einen Faktor von 2 induzierten Gene. Die Bezeichnung der Gene ist der NCgl-Nomenklatur entnommen und daher nicht immer durch eine genetische Charakterisierung verifiziert. Die mit * gekennzeichneten ORFs besitzen keine NCgl-Zuordnung; die Bezeichnung dieser ORFs wurde der Degussa-Datenbank entnommen.

ORF	NCgl	Cgl	Annotation	Mittelwert	Fehler
155	2684	2782	putativer Transkriptionsregulator	4,975	4,827
156	2685	2783	putativer Co/Zn/Cd Kationtransporter	2,442	1,104
466	0083	0084	Harnstoff-Amidohydrolase (Urease) Gamma Untereinheit [EC:3.5.1.5]	2,459	0,848
469	0086	0087	Urease, akzessorisches Protein UreE [EC:3.5.1.5]	3,121	1,713
575	0182	0185	Glutamine 2-Oxoglutarat Aminotransferase, kleine Untereinheit [EC:1.4.1.13]	9,600	8,299
576*	-	-	hypothetisches Protein	2,094	1,177
730	0295	0300	hypothetisches Protein	2,129	0,954
931	0434	0449	hypothetisches Protein	2,304	2,030
1155*	-	-	möglicher ORF	2,142	0,720
1245	0697	0727	ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	2,011	1,403
1380*	-	-	hypothetisches Protein	2,038	0,806
1384	0800	0834	hypothetisches Protein	12,001	18,649
1458*	-	-	hypothetisches Protein	2,073	1,384
1499	0894	0931	Permease des Harnstofftransporters <i>urtB</i> – <i>C. glutamicum</i>	3,718	2,001
1501	0896	0933	ATPase des Harnstofftransporters <i>urtD</i> – <i>C. glutamicum</i>	2,766	1,455
2147*	-	-	hypothetisches Protein	2,336	2,235
2173	1981	2059	UTP:GlnB (Protein PII) Uridyltransferase [EC:2.7.7.59]	2,860	1,718
2175	1982	2060	Regulatorprotein in der Stickstoffkontrolle, PII	5,108	3,484
2177*	-	-	hypothetisches Protein	2,625	1,699
2397	1462	1519	hypothetisches Protein	2,792	1,622
2476*	-	-	putative transposase - <i>Rhodococcus erythropolis</i>	2,105	0,514
2478	1519	1581	Glycin/D-Aminosäureoxidase [EC:1.5.3.1]	7,483	5,195
2479	1520	1582	putative Ornithincyclodeaminase, EC:4.3.1.12]	4,556	2,922
2480	1521	1583	Ammoniumpermease	8,876	6,719
2912	2457	2545	hypothetisches Protein	2,606	1,374
3236	2133	2214	Glutaminsynthase GS [EC:6.3.1.2]	3,428	2,518
3552	0485	0503	Acetyl-CoA Hydrolase [EC:2.8.3.8]	2,287	-
3560*	-	-	hypothetische Oxidoreductase - <i>Mesorhizobium loti</i>	2,772	-
3574	1408	1464	Hydroxyethylthiazolkinase [EC:2.7.1.50]	2,078	-
3626	1633	1701	hypothetisches Protein	2,220	-
3637	1716	1790	ATPase mit Chaperonaktivität, ATP-Bindeuntereinheit	2,343	-
3648	1725	1799	hypothetisches Protein	2,296	-
3662	1744	1819	hypothetisches Protein	2,352	-
3671	1754	1829	hypothetisches Protein	2,260	-
3678	1766	1840	hypothetisches Protein	2,107	-
3680	1769	1843	Topoisomerase IA [EC:5.99.1.2]	2,006	-
3697*	-	-	Oligopeptide-Bindeprotein <i>oppA</i> - <i>S. typhimurium</i>	2,229	-
3727	2323	2407	Dehydrogenase	2,248	-

Harnstofftransporters (siehe 6.) gefunden werden. Somit zeigt auch der Harnstoffaufnahme- und -assimilationsweg eine Abhängigkeit vom Stickstoffstatus der Zelle. Die restlichen der 41 regulierten Gene (Tabelle 7) sind noch nicht weiter charakterisiert, so daß eine genaue Aussage über die Funktion und den Sinn ihrer Regulation derzeit nicht getroffen werden kann.

2.1.3 Vergleich der Expressionsmuster der Δ *amtR*-Mutante MJ6-18 und des Wildtyps ATCC13032 unter N-Überschuß

Zur Charakterisierung des AmtR-Regulaons wurden die Expressionsprofile des Wildtyps und der Δ *amtR*-Mutante jeweils unter ausreichender Stickstoffversorgung miteinander verglichen. Zunächst wurden in diesem Experiment schon bekannte Daten verifiziert (siehe Tabelle 8). So waren in unserer Arbeitsgruppe schon folgende Gene zuvor als AmtR-kontrolliert gezeigt worden: *amt* (Ammoniumpermease), *soxA* (putative Sarcosineoxidase), *ocd* (putative Ornithincyclodecarboxylase), *amtB* (Ammoniumpermease), *glnK* (GlnK-Protein), *glnA* (Glutamin-Synthetase) und das *gltD*-Gen, welches für die kleine Untereinheit der GOGAT kodiert. Auch Gene der Urease (*ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureE* und *ureF*) und des Harnstofftransporters (*urtA*, *urtB* und *urtC*; siehe 6.) konnten gefunden. Für diese Gene zeigte sich auch schon unter 2.1.2 eine Stickstoff-abhängige Regulation. Neben den oben schon genannten Stickstoff-assimilierenden Enzymen konnten noch für das *codA* Gen, welches für eine Creatinindeaminase kodiert, sowie für drei weitere ORF mit unbekannter Funktion (NCgl1099 (putative Hydrolase), NCgl2300 Untereinheit einer Nitritreductase) und NCgl2301 (putative Reduktase) eine AmtR-abhängige Regulation gezeigt werden. Auffällig ist, daß in der *amtR*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp vor allem Transportproteine vermehrt exprimiert sind. Darunter fallen zusätzlich zu den Ammonium- und Harnstofftransportern, das *gluABCD*-Operon (Glutamattransporter), ein putativer ABC-Transporter (NCgl1915-NCgl1918, laut EC-Nummer handelt es sich um einen putativen Peptidtransporter) und zwei weitere putative Permeasen (NCgl2302 und NCgl2303). Zuverlässige Informationen über die Funktionen dieser Transporter gibt es zur Zeit noch nicht, sie könnten aber durch Erstellen von Insertions- oder Deletionsmutanten der jeweiligen ORFs und einer anschließenden Charakterisierung der Mutante, erhalten werden.

III. Ergebnisse

Tabelle 8: Übersicht über die in der $\Delta amtR$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp um mindestens einen Faktor von 2 induzierten Gene. Die Bezeichnung der Gene ist der NCgl-Nomenklatur entnommen und daher nicht immer durch eine genetische Charakterisierung verifiziert.

ORF	NCgl	Cgl	Name	Mittelwert	Fehler
281	2787	2887	putatives Flavoprotein involviert in den K ⁺ Transport	2,701	0,64
455	0075	0076	Creatinindeaminase <i>codA</i> – <i>C. glutamicum</i> .	2,697	2,28
466	0083	0084	Harnstoff-Amidohydrolase (Urease) Gamma Untereinheit [EC:3.5.1.5]	2,794	0,59
467	0084	0085	Harnstoff-Amidohydrolase (Urease) Beta Untereinheit [EC:3.5.1.5]	3,540	1,20
468	0085	0086	Harnstoff-Amidohydrolase (Urease) Alpha Untereinheit [EC:3.5.1.5]	3,082	1,05
469	0086	0087	Urease, akzessorisches Protein UreE [EC:3.5.1.5]	4,349	1,93
470	0087	0088	Urease, akzessorisches Protein UreF [EC:3.5.1.5]	2,221	0,77
575	0182	0185	Glutamin 2-Oxoglutarat Aminotransferase kleine Untereinheit [EC:1.4.1.13]	2,815	0,18
1498	0893	0930	Bindeprotein des Harnstofftransporters <i>urtA</i> - <i>C. glutamicum</i>	3,754	2,21
1499	0894	0931	Untereinheit der Permease des Harnstofftransporters <i>urtB</i> - <i>C. glutamicum</i>	4,089	0,96
1500	0895	0932	Untereinheit der Permease des Harnstofftransporters <i>urtC</i> - <i>C. glutamicum</i>	2,835	0,60
1731	1099	1144	putative Hydrolase	2,171	0,96
2040	1875	1950	Glutamat-ABC-Transporter, ATPase Komponente	3,051	0,80
2041	1876	1951	Glutamat ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	2,712	0,58
2042	1877	1952	Glutamat ABC-Transporter, Permease-Komponente	2,195	0,41
2092	1915	1990	ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	4,370	1,90
2093	1915	1990	ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	4,013	1,49
2094	1916	1991	ABC-Transporter, Permease Komponente	2,601	1,36
2095	1917	1992	ABC-Transporter, Permease Komponente	3,617	1,90
2175	1982	2060	GlnK	2,359	0,74
2176	1983	2061	Ammoniumpermease AmtB	2,249	0,19
2478	1519	1581	Glycin/D-Aminosäureoxidase [EC:1.5.3.1]	2,917	0,98
2479	1520	1582	putative Ornithincyclodeaminase [EC:4.3.1.12]	2,882	0,61
2480	1521	1583	Ammoniumpermease Amt	4,107	2,02
3236	2133	2214	Glutaminsynthase GS [EC:6.3.1.2]	2,938	1,50
3703	2300	2383	Ferredoxin-Untereinheit der Nitritreduktase und Ring-hydroxylierende Dioxygenases [EC:1.14.13.82]	12,046	8,98
3704	2301	2384	Flavodoxinreduktase Familie 1	6,832	1,67
3705	2302	2385	Permease einer <i>facilitator superfamily</i>	4,216	1,46
3707	2303	2386	putative Permease	3,664	1,48
3723	2319	2402	Protocatechuat 3,4-Dioxygenase Beta Untereinheit [EC:1.13.11.1]	2,161	1,54

Insgesamt zeigt sich in diesem Microarray-Experiment eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Promotoranalyse, so daß die Wahrscheinlichkeit einer AmtR-Regulation dieser ORFs sehr hoch ist. Im Wildtyp sind im Vergleich zum MJ6-18-Stamm keine Gene unter N-Überschuß höher exprimiert. Die Deletion des *amtR*-Gens führt demnach innerhalb der Zelle zu keinen sekundären Effekten, so daß alle Expressionsunterschiede zwischen WT und Mutante direkt auf eine Regulation durch AmtR zurückgeführt werden können. Außerdem ist damit auch eine mögliche Rolle von AmtR als Aktivator auszuschließen.

2.1.4 Vergleich der Expressionsmuster der Δ *amtR*-Mutante MJ6-18 unter N-Mangel und N-Überschuß

Obwohl die Transkriptomvergleiche unter 2.1.2 und 2.1.3 darauf schließen lassen, daß AmtR der Haupt-Regulator der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* ist, wurde zur Kontrolle noch ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem RNA, die aus der Mutante unter N-Überschuß bzw. unter N-Mangel isoliert worden ist, miteinander verglichen wurde. Unter N-Mangel sollten nun alle Gene, die unter einer AmtR-unabhängigen Stickstoffkontrolle stehen, vermehrt exprimiert sein. Hier zeigten sich vier höher exprimierte Gene (Tabelle 9). Darunter befindet sich auch *urtA* (Bindeprotein des Harnstofftransporters). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Treffer um einen Artefakt. Eine weitere Erklärung wäre die Beteiligung eines weiteren Regulators. Genauen Aufschluß über die Regulation von *urtA* sollen die Northern-Hybridisierungsexperimente (siehe 2.3.1) geben.

Bei den Produkten der anderen drei regulierten Gene handelt es sich zwar um Proteine, die stickstoffhaltige Verbindungen umsetzen, jedoch zeigten alle drei Gene in diesem Experiment eine relativ hohe Standardabweichung. Ebenso konnte keines dieser Gene im Vergleich des Expressionsmusters des Wildtyp unter N-Überschuß und N-Mangel gefunden werden. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern sie tatsächlich unter diesen Bedingungen exprimiert werden. Dennoch handelt es sich bei diesen drei Gene um interessante Kandidaten: Eins der Gene (NCgl2751) kodiert für die Deoxycytidineaminase, welche unter Abspaltung von Ammonium CTP in UTP umwandelt, ein weiteres Genprodukt, eine Aminotransferase (NCgl2844), ist am Abbau verschiedener Aminosäuren (z.B.

III. Ergebnisse

Glutamat und Arginin) beteiligt. Der letzte ORF kodiert für eine putative Permease (NCgl2747).

Tabelle 9: Übersicht über die in der $\Delta amtR$ -Mutante unter 30 Minuten Stickstoffmangel im Vergleich zu Stickstoffüberschuß um mindestens einen Faktor von 2 induzierten Gene. Die Bezeichnung der Gene ist der NCgl-Nomenklatur entnommen und daher nicht immer durch eine genetische Charakterisierung verifiziert.

ORF	NCgl	Cgl	Name	Mittelwert	Fehler
955	0453	0470	Gamma-Aminobutyratpermease oder verwandte Permease	2,109	1,056
239	2751	2848	Deoxycytidineaminase [EC:3.5.4.13]	2,545	1,603
234	2747	2844	PLP-abhängige Aminotransferase [EC:2.6.1.1]	3,331	3,000
1498	0893	0930	Bindeprotein des Harnstofftransporters <i>urtA</i> – <i>C. glutamicum</i>	4,823	2,899

Unter Stickstoffmangelbedingungen wurden, wie sich schon bei dem Wildtyp gezeigt hat, einige Gene, die für Proteine des Transkriptions- und Translationsapparates kodieren, reprimiert. Zusätzlich konnte auch eine erhöhte Expression einiger Gene, die unter AmtR-Kontrolle stehen (Tabelle 10) festgestellt werden.

Dieses Ergebnis war unerwartet, da aufgrund der AmtR-Deletion unter den gewählten Bedingungen keine Gene, die unter AmtR-Kontrolle stehen, reprimiert sein sollten. Möglicherweise spielt hier eine bisher unbekannte Regulation der RNA-Abbaus eine Rolle, da ein ähnliches Ergebnis auch schon mit einer *amt*-Überexpression erhalten wurde (Nolden, Stroesser, persönliche Mitteilung). Unter N-Überschußbedingungen konnte eine hohe Expression festgestellt werden. Nach Umsetzen in N-Mangelmedium nahm die Transkriptionsmenge ab. Da diese Überexpression jedoch Plasmid-kodiert war, war eine Regulation der Transkription auszuschließen.

III. Ergebnisse

Tabelle 10: Übersicht über die in der $\Delta amtR$ -Mutante unter Stickstoffmangel im Vergleich zu 30 Minuten Stickstoffüberschuß um mindestens einen Faktor von 0,5 reprimierten Gene. Die Bezeichnung der Gene ist der NCgl-Nomenklatur entnommen und daher nicht immer durch eine genetische Charakterisierung verifiziert. Die mit * gekennzeichneten ORFs besitzen keine NCgl-Zuordnung; die Bezeichnung dieser ORFs wurde der Degussa-Datenbank entnommen.

ORF	NCgl	Cgl	Annotation	Mittelwert	Fehler
469	0086	0087	Urease akzessorisches Protein UreE [EC:3.5.1.5]	0,396	0,192
573	0181	0184	Glutamin 2-Oxoglutarat Aminotransferase große Untereinheit [EC:1.4.1.13]	0,465	0,243
776	0327	0334	dTDP-D-Glukose 4,6-Dehydratase [EC:4.2.1.46]	0,487	0,143
802	0345	0352	UDP-N-Acetylglucosaminolpyruvyltransferase [EC:2.5.1.7]	0,478	0,286
963*	-	-	Succinta-Dehydrogenase B <i>sdhB</i>	0,419	0,104
1017*	-	-	Ribosomales Protein S8 <i>rpsH</i> - <i>B. subtilis</i>	0,469	0,148
1069	0556	0581	ribosomales Protein L13	0,479	0,347
1297	0737	0771	putative Helicase	0,325	0,187
1898*	-	-	RNA Polymerase RPB8 - <i>S. cerevisiae</i>	0,475	0,263
2040	1875	1950	Glutamat ABC-Transporter, ATPase Komponente	0,358	0,173
2041	1876	1951	Glutamat ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	0,497	0,243
2042	187	1952	Glutamat ABC-Transporter, Permease Komponente	0,486	0,231
2092	1915	1990	ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	0,446	0,151
2093	1915	1990	ABC-Transporter, periplasmatische Komponente	0,380	0,149
2095	1916	1991	ABC-Transporter, Permease Komponente	0,460	0,189
2203	1999	2079	Glutamatdehydrogenase/Leucindehydrogenase [EC:1.4.1.4]	0,498	0,200
2456	1504	1565	putativer Transcriptionsregulator	0,223	0,140
2487	1526	1588	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	0,462	0,499
3072	2261	2343	ribosomales Protein S20	0,366	0,010
3777	0491	0511	ribosomales Protein S19	0,445	0,205

2.1.5 Vergleich des Expressionsmusters der $\Delta amtR$ -Mutante MJ6-18 und des Wildtyps ATCC13032 unter N-Mangel

Innerhalb dieses Experiments wurde die Bindungsstärke von AmtR an die einzelnen Bindemotive der regulierten Gene untersucht. Bei einer starken Bindung von AmtR würde die Expressionsrate der regulierten Gene im WT unter N-Mangel niedriger ausfallen als in der Mutante. Das Ergebnis (Tabelle 11) zeigte eine erhöhte Expressionsrate einiger Gene, die schon in den ersten Experimenten (2.1.2 und 2.1.3) unter N-Mangel bzw. in der Mutante vermehrt transkribiert worden sind. Jedoch weist eine höhere Expressionsrate nicht unbedingt auf eine stringente Regulation durch AmtR hin. Statt dessen müssen auch Möglichkeiten wie z.B. ein weiterer Regulator und RNA-Abbau berücksichtigt werden.

Tabelle 11: Übersicht über die im Wildtyp unter Stickstoffmangel im Vergleich zur $\Delta amtR$ -Mutante unter Stickstoffmangel um mindestens einen Faktor von 2 induzierten Gene. Die Bezeichnung der Gene ist der NCgl-Nomenklatur entnommen und daher nicht immer durch eine genetische Charakterisierung verifiziert.

ORF	NCgl	Cgl	Name	Mittelwert	Fehler
469	0086	0087	Urease akzessorisches Protein UreE [EC:3.5.1.5]	2,21	0,10
1498	0893	0930	Bindeprotein des Harnstofftransporter <i>urtA</i> - <i>C. glutamicum</i>	2,18	0,44
1499	0894	0931	Untereinheit der Permease des Harnstofftransporter <i>urtB</i>	3,48	0,98
1500	0895	0932	Untereinheit der Permease des Harnstofftransporter <i>urtC</i>	2,41	0,06
3703	2300	2383	Ferredoxin Untereinheit der Nitritreduktase und Ring-hydroxylierende Dioxygenases [EC:1.14.13.82]	9,7	4,05
3704	2301	2384	Flavodoxinreductase Familie 1	6,97	0,96
3705	2302	2385	Permease der <i>facilitator superfamily</i>	4,22	2,17
3707	2303	2386	putative Permease	3,32	1,78

Im MJ6-18-Stamm zeigte nur ein ORF (NCgl2709) eine höhere Expression als im Wildtyp. Es handelt sich dabei um eine Zink-abhängige Dehydrogenase.

2.2 Organisation AmtR-regulierter Gene

Die durch die Promotoranalyse und die Microarrays identifizierten AmtR-regulierten Gene waren teilweise im Genom in *clustern* angeordnet. Dies weist auf eine mögliche Operonstruktur dieser Gene hin, die durch Northern Hybridisierungs-experimente sowie Reverse Transkriptase-PCR bewiesen werden sollte.

Das *amt-ocd-soxA-cluster*

Zunächst konnte ein gemeinsames Transkript des *clusters amt-ocd-soxA* (Abb. 5A), welche für einen Methylammoniumtransporter, eine putative Ornithincyclo-decarboxylase und eine putative Sarcosinoxidase kodieren, nachgewiesen werden (Abbildung 5B). Für dieses Experiment wurde mRNA isoliert aus Wildtyp- und Δ *amtR*-Zellen unter Stickstoffüberschuß- bzw. Stickstoffmangelbedingungen verwendet. Durch ein Kontroll-PCR Experiment konnte eine DNA-Kontamination der RNA ausgeschlossen werden.

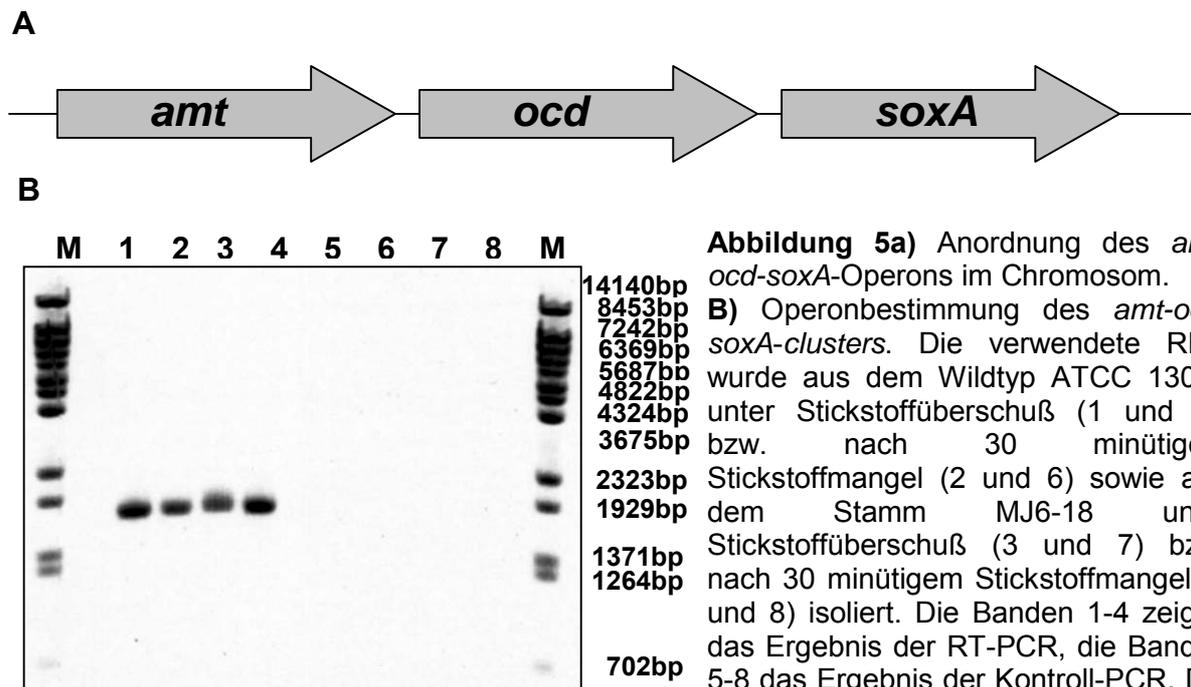


Abbildung 5a) Anordnung des *amt-ocd-soxA*-Operons im Chromosom.
B) Operonbestimmung des *amt-ocd-soxA-clusters*. Die verwendete RNA wurde aus dem Wildtyp ATCC 13032 unter Stickstoffüberschuß (1 und 5), bzw. nach 30 minütigem Stickstoffmangel (2 und 6) sowie aus dem Stamm MJ6-18 unter Stickstoffüberschuß (3 und 7) bzw. nach 30 minütigem Stickstoffmangel (4 und 8) isoliert. Die Banden 1-4 zeigen das Ergebnis der RT-PCR, die Banden 5-8 das Ergebnis der Kontroll-PCR. Die Markerbande ist mit M gekennzeichnet.

Das *gluABCD*-cluster

In einem weiteren Versuch wurde das *gluABCD*-cluster (Abb. 6A), welches für das primäre Aufnahmesystem für Glutamat in *C. glutamicum* kodiert, untersucht. Aus dem Wildtyp- bzw. dem MJ6-18-Stamm unter Stickstoffüberschuß und -mangel isolierte mRNA wurde zusammen mit Primer, die in *gluA* und *gluD* lokalisiert waren, in einem RT-PCR Experiment eingesetzt. Durch Erhalt einer Bande der erwarteten Größe von ca. 2100 bp konnte bewiesen werden, daß die *gluABCD*-Gene unter den untersuchten Bedingungen gemeinsam transkribiert werden (Abb. 6B). Eine DNA-Kontamination konnte durch eine Kontroll-PCR widerlegt werden.

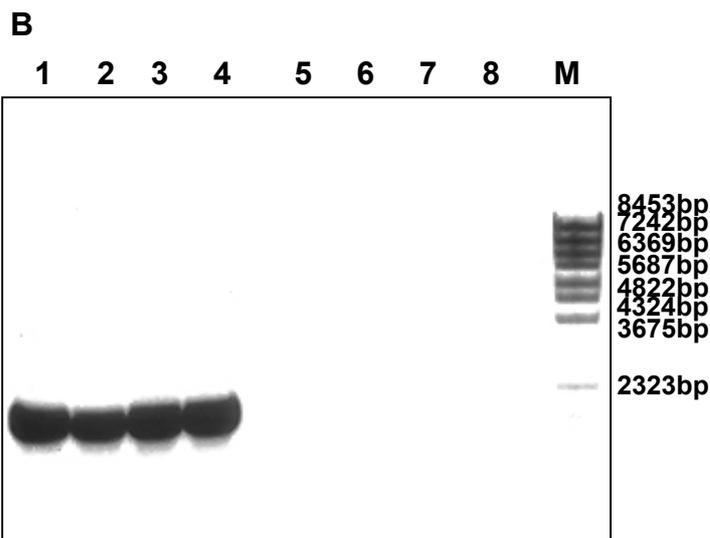
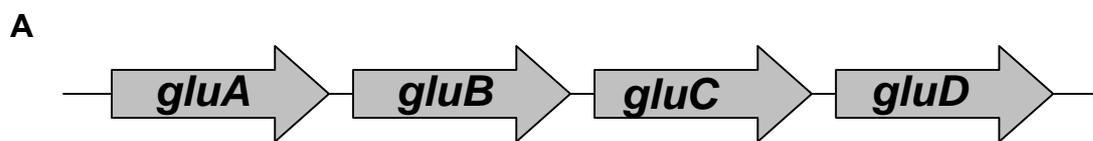
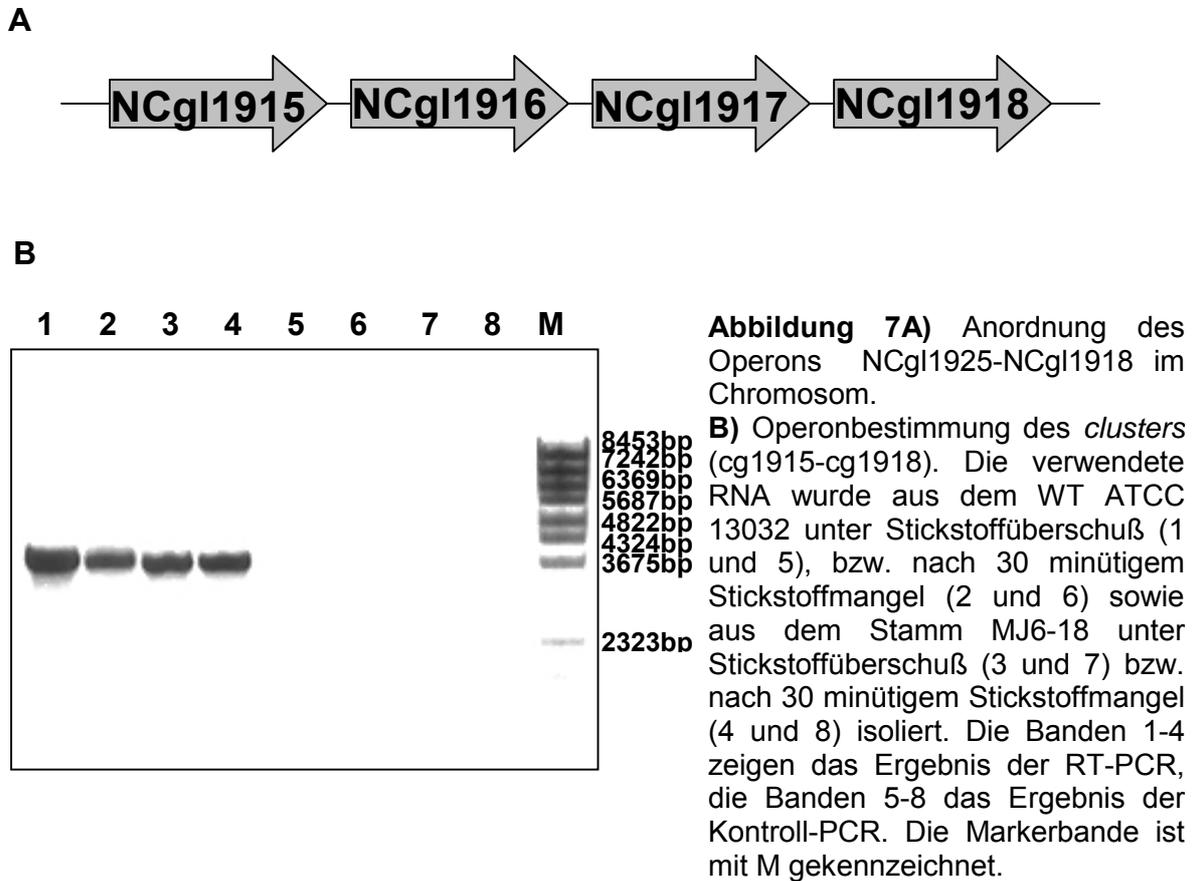


Abbildung 6A) Anordnung des *gluABCD*-Operons im Chromosom. **B)** Operonbestimmung des *gluABCD*-clusters. Die verwendete RNA wurde aus dem Wildtyp ATCC 13032 unter Stickstoffüberschuß (1 und 5), bzw. nach 30 minütigem Stickstoffmangel (2 und 6) sowie aus dem Stamm MJ6-18 unter Stickstoffüberschuß (3 und 7) bzw. nach 30 minütigem Stickstoffmangel (4 und 8) isoliert. Die Banden 1-4 zeigen das Ergebnis der RT-PCR, die Banden 5-8 das Ergebnis der Kontroll-PCR. Die

Das NCgl1915-NCgl1918-cluster

Ein weiteres *cluster* bilden die Gene NCgl1915-NCgl1918 (ein ABC-Aufnahmesystem möglicherweise für Peptide) (Abb. 7A). Um eine mögliche Operonstruktur zu prüfen, wurden in einer RT-PCR Primer eingesetzt, die innerhalb der Gene NCgl1915 und NCgl1918 binden. Als *template* diente aus Wildtyp- und MJ6-18-Zellen unter Stickstoffüberschuß- bzw. Stickstoffmangelbedingungen isolierte m-RNA. Dabei

wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe (3500 bp) beobachtet (Abb7B). Offensichtlich bildet das NCgl1915-NCgl1918-*cluster* ein Operon.



Das *urtABCDE*-cluster

Der Harnstofftransporter in *C. glutamicum* wird durch das Gen-*cluster uusABCDE* kodiert. Die dichte Abfolge der Gene ließ auf eine Organisation in einem Operon schließen (Abb.8A). Zur Aufklärung dieser Beobachtung wurden Northern Hybridisierungen und RT-PCR-Experimente durchgeführt. Die in der RT-PCR verwendeten Primer waren in *urtA* und *urtE* lokalisiert. Als *template* diente RNA aus Wildtyp-Zellen unter N-Mangel und dem Stamm MJ6-18 unter N-Überschuß. Es zeigte sich ein PCR-Produkt der erwarteten Größe (4100bp), welches die vermutete Operonstruktur von *urtABCDE* bestätigte (Abb. 8B). Gleichzeitig wurde eine Northern Hybridisierung mit Hilfe der Sonde von *urtA* durchgeführt. Das Ergebnis (Abb. 8C) zeigt ein mögliches Produkt zwischen 3000b-5000b. Da die erwartete Größe eines

gemeinsamen Produkts 4000b beträgt, ließ dieses Ergebnis auf eine Operon schließen.

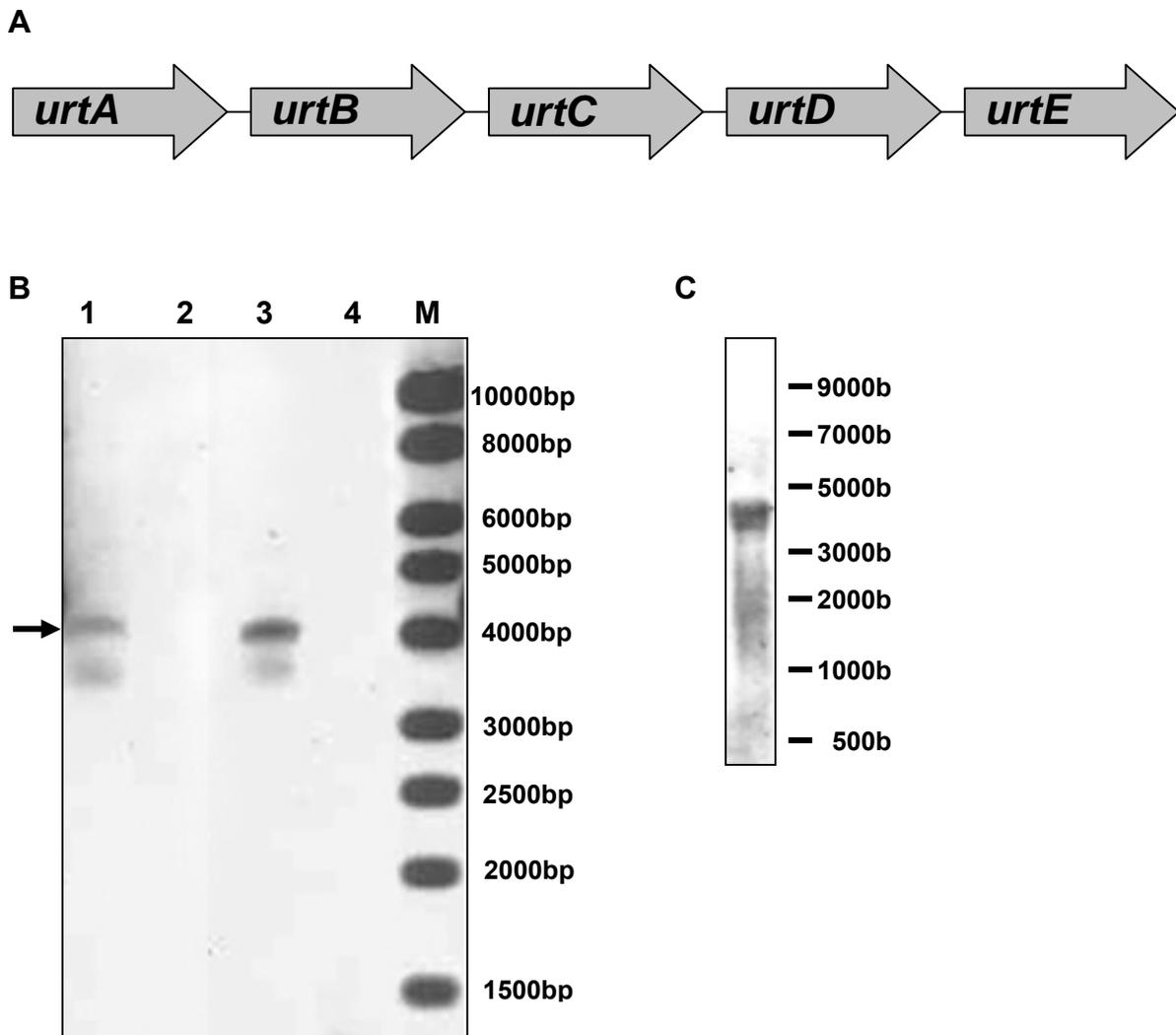


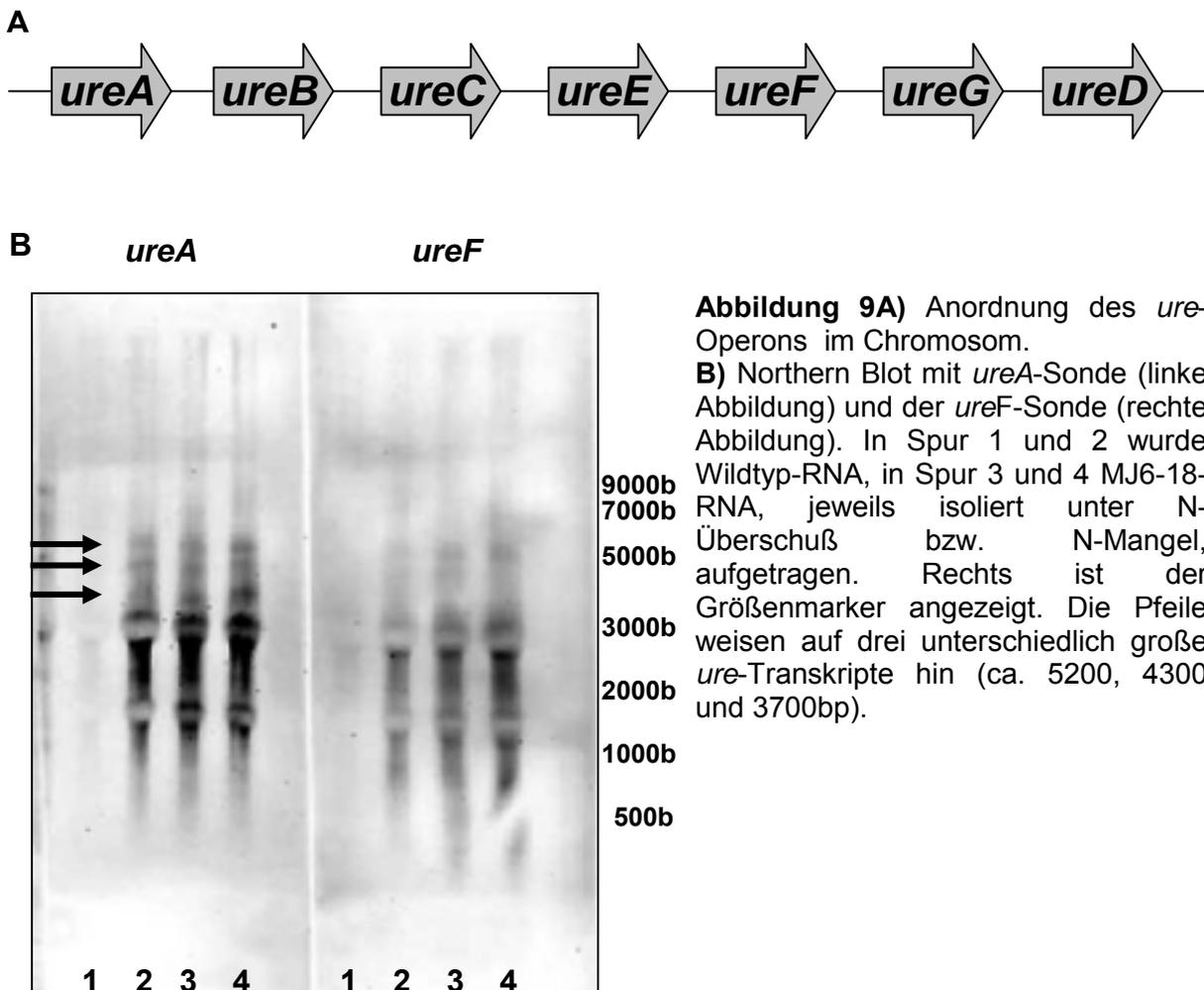
Abbildung 8A) Anordnung des *urt*-Operons im Chromosom.

B) Ergebnis der RT-PCR zur Bestimmung eines gemeinsamen Transkripts des *urt-clusters*. In Bande 1-2 wurde RNA, die aus WT-Zellen unter 30 min. N-Mangel isoliert worden ist, eingesetzt. In Bande 3-4 wurde RNA aus der MJ6-18-Mutante unter N-Überschuß verwendet. Bande 1 und 3 zeigen das Ergebnis der RT-PCR Experimente; Bande 2 und 4 zeigen jeweils die PCR mit RNA (Negativkontrolle). Die Banden, die mit einem M markiert ist, zeigt den Marker.

C) Northern Hybridisierung mit der Sonde von *urtA*. Für den Northern Blot wurde RNA, die aus dem Wildtyp unter Stickstoffüberschuß isoliert worden ist, aufgetragen. Rechts sind die Größeneinheiten des RNA-Markers angegeben.

Das *ureABCEFGD*-cluster

Die Urease besteht aus drei strukturellen Untereinheiten, welche durch die Gene *ureABC* kodiert werden, und vier akzessorischen Proteinen, kodiert durch *ureEFGD* (Abb.9A). Bisher konnte gezeigt werden, daß *ureABC* unter Stickstoffüberschuß und -mangel in einem Operon transkribiert werden (Nolden *et al.*, 2000). Zunächst wurde mittels Northern Hybridisierungen überprüft, ob die *ureABCEFGD*-Gene nicht doch in einem gesamten Operon angeordnet sind. Als Sonden dienten DIG-markierte, interne Genfragmente von *ureA* und *ureF*. Für den Blot wurde RNA aus dem WT und der Δ *amtR*-Mutante, jeweils unter N-Überschuß und N-Mangel isoliert, eingesetzt (Abb. 9B). Sowohl mit der *ureA*-Sonde als auch mit der *ureF*-Sonde wurden drei verschiedene Banden der Größen >5000b, ca. 4500b



III. Ergebnisse

und ca. 3700b detektiert. Diese Banden stimmen mit der Größe des gesamten *ure*-Operons (ca. 5200b), bzw. mit einem *ureABCEF*-Operon (ca. 3700) oder einem *ureABCEFG*-Operon (4300b) überein. Auch wurde mit der Sonde die 23S- bzw. 16S-rRNA markiert. Da die beiden RNS viel kleiner sind als das *ure-cluster* (ca. 3000b für die 23Sr-RNA und 1500b für die 16Sr-RNA), beeinflussen sie das Ergebnis des Northern Blots nicht.

Zur Kontrolle des Ergebnisses wurde ein RT-PCR Experiment mit Primern durchgeführt, die innerhalb des *ureA*- bzw. *ureD*-Gens binden. Das Ergebnis (Abb. 10) zeigt, wie erwartet, ein PCR-Produkt der Größe von ca. 5100bp. Das gesamte *ureABCEFGD-cluster* bildet also ein Operon.

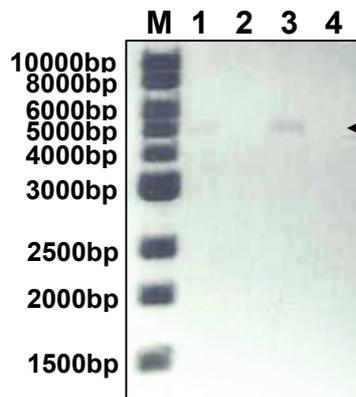


Abbildung 10: Ergebnis der RT-PCR zur Bestimmung eines gemeinsamen Transkripts des *ure*-Clusters. In Bande 1-2 wurde aus Wildtyp-Zellen unter 30 min. N-Mangel isolierte RNA eingesetzt. In Bande 3 und 4 wurde RNA aus der MJ6-18-Mutante unter N-Überschuß verwendet. Banden 1 und 3 zeigen das Ergebnis der RT-PCR Experimente, Bande 2 und 4 zeigen jeweils die PCR mit RNA (Negativkontrolle). Das erhaltene Produkt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Bande M zeigt den Marker.

Das NCgl2300-NCgl2302-cluster

Ein weiteres putatives Operon wird durch die Gene NCgl2300-NCgl2302 gebildet. Die drei hintereinander angeordneten Orfs kodieren für eine putative Reduktase (NCgl2300-NCgl2301) und eine Permease (NCgl2302). Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der RT-PCR, ein Produkt der erwarteten Länge von ca. 2700 bp. Die Negativkontrolle zeigt kein Produkt auf, so daß das Ergebnis also nicht auf eine DNA-Kontamination der RNA-Präparation zurückzuführen ist.

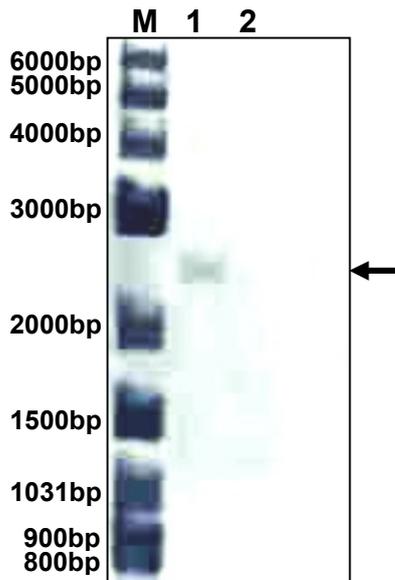


Abbildung 11: zeigt das Ergebnis der RT-PCR zur Bestimmung eines gemeinsamen Transkripts der Orfs NCgl2300-NCgl2302. In Bande 1 und 2 wurde RNA aus der MJ6-18-Mutante unter N-Überschuß verwendet. Bande 1 zeigt das Ergebnis der RT-PCR (siehe Pfeil), Bande 2 die PCR mit RNA (Negativkontrolle). Die Bande M zeigt den Marker.

2.3 Quantifizierung der Repression durch AmtR

2.3.1 RNA-Hybridisierungen

Lars Nolden hat innerhalb seiner Doktorarbeit zeigen können, dass bestimmte AmtR-regulierte Gene (z.B. *glnA*) unter N-Überschuß noch eine geringe Expressionsrate aufweisen, während andere Gene, beispielsweise *amt*, komplett reprimiert sind. Weiterhin zeigte er, daß die Bindemotive für AmtR *upstream* dieser Gene unterschiedliche Längen aufweisen. Diese Ergebnisse lassen auf eine Korrelation zwischen Bindemotivlänge und Repressionsstärke durch AmtR schließen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Expression der AmtR-regulierten Gene quantifiziert. Eine Möglichkeit hierzu war die Durchführung von Slot Blot-Experimenten. Hierfür wurde RNA eingesetzt, die aus dem Wildtyp bzw. dem Stamm MJ6-18 unter N-Mangel und N-Überschuß isoliert worden ist. Anstelle einer Kontrolle durch Hybridisierungen mit einer 16S-rRNA-Sonde wurde die RNA-Konzentration durch Einsatz des RiboGreen® RNA Quantification Kits (Molecular Probes, Leiden, NL) bestimmt. Pro Slot wurde 1 µg mRNA eingesetzt. Anschließend wurden die Transkripte bestimmter Gene mit einer spezifischen Sonde detektiert, wobei die Stärke des detektierten Signals proportional zur Expressionsstärke des untersuchten

III. Ergebnisse

Tabelle 12: Übersicht über die Ergebnisse der Northern Hybridisierungen. Gezeigt sind die Faktoren und ihre Standardabweichung. Der Wert „Wildtyp unter N-Überschuß“ wurde bei jeder Messung gleich 1 gesetzt und die anderen Werte wurden dementsprechend angeglichen.

RNA	NCgl			NCgl		<i>amt</i>	<i>amtB</i>	<i>crnT</i>
	<i>ureR</i>	<i>ureA</i>	<i>glnA</i>	1099	1100			
WT								
N+	1	1	1	1	1	1	1	1
WT	2 ±	7 ±	3,5 ±	2,3 ±	7 ±	4 ±	10 ±	32 ±
N- 5min.	0,5	2,5	0,9	0,4	4	1	2	5
WT	1,6 ±	7,5 ±	4 ±	2,7 ±	19 ±	4 ±	23 ±	39 ±
N- 15min.	0,7	1,7	1	0,7	5	2	14	18
WT	1,8 ±	11 ±	4 ±	4,5 ±	31 ±	5 ±	40 ±	68 ±
N- 30min.	0,9	4	1,5	1,5	4	3	9	26
Δ <i>amtR</i>	2,1 ±	18 ±	4 ±	14 ±	53 ±	6 ±	34 ±	93 ±
N+	0,8	6	1,3	9	10	2	17	25
Δ <i>amtR</i>	2,2 ±	17 ±	5 ±	16 ±	70 ±	16 ±	47 ±	910 ±
N- 5min.	1,1	5	2	9	17	7	15	337
Δ <i>amtR</i>	1,9 ±	13 ±	5 ±	9 ±	45 ±	7 ±	37 ±	251 ±
N- 15min.	0,9	4	1,3	6	13	3	17	78
Δ <i>amtR</i>	2 ± 0,8	15 ±	5 ±	12 ±	73 ±	5 ±	28 ±	163 ±
N- 30min.		4	2	8	37	2	10	49

RNA	NCgl			NCgl		NCgl	
	<i>codA</i>	<i>gltB</i>	<i>urtA</i>	1362	<i>gluA</i>	<i>oppA</i>	2300
WT							
N+	1	1	1	1	1	1	1
WT	7 ±	28 ±	15 ±	5,5 ±	0,4 ±	0,06 ±	1,7 ±
N- 5min.	1,5	7	4	2,4	0,2	0,01	0,6
WT	8 ±	35 ±	60 ±	10 ±	0,5 ±	0,7 ±	2 ±
N- 15min.	3	9	30	2,5	0,3	0,2	0,2
WT	10 ±	34 ±	109 ± 60	6 ±	1 ±	0,9 ±	1,9 ±
N- 30min.	4	13		2	0,3	0,2	1
Δ <i>amtR</i>	30 ±	19 ±	236 ± 62	5 ±	2 ±	1,6 ±	62 ±
N+	13	6		2	0,8	0,4	27
Δ <i>amtR</i>	39 ±	111 ± 44	517 ±	11 ±	0,6 ±	0,1 ±	3 ±
N- 5min.	14		299	4	0,1	0,06	0,8
Δ <i>amtR</i>	19 ±	48 ±	345 ±	16 ±	0,5 ±	0,4 ±	13 ±
N- 15min.	9	20	204	7	0,1	0,2	2
Δ <i>amtR</i>	23 ±	41 ±	213 ±	10 ±	1,3 ±	1,4 ±	171 ±
N- 30min.	12	11	141	7	0,3	0,6	115

Gens ist. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Aida 2.0 (Raytest, Straubenhardt). Für die Vergleichbarkeit der Daten wurde das Ursprungssignal (Wildtyp-RNA isoliert unter N-Überschuß-Bedingungen) gleich 1 gesetzt und die anderen Ergebnisse entsprechend umgerechnet. Dadurch konnte der Faktor der Expressionssteigerung bzw. -verminderung ermittelt werden. Untersucht wurden alle Gene, die durch die Microarray-Experimente und den bioinformatischen Ansatz gefunden und per Dot Blots als AmtR reguliert verifiziert werden konnten. Bei den Genen, die in einem Operon angelegt sind, wurde jeweils das erste in Ableserichtung liegende Gen stellvertretend für die anderen ORFs des Operons betrachtet. Die Ergebnisse der Northern Hybridisierungen sind in Tabelle 12 aufgezeigt.

Die ORFs konnten nach Abschluß der Hybridisierungsversuche in drei Gruppen mit verschiedenem Expressionsmuster eingeteilt werden. In der ersten Gruppe (*ureR*, *ureA*, NCgl1099, NCgl1100 und *glnA*) zeigte der Wildtyp in der Expression unter N-Mangel einen Anstieg der Expressionsrate (Abb. 12, Abb. 13). In der Mutante zeigte sich statt dessen eine gleichbleibende Expression. Dies entspricht dem eigentlich zu erwartenden Ergebnis. Da bei Fehlen des Regulators AmtR keine weitere Regulation der Gene mehr stattfinden kann, vorausgesetzt, es liegt neben AmtR kein weiterer Regulator dieser Gene unter den gegebenen Umständen vor.

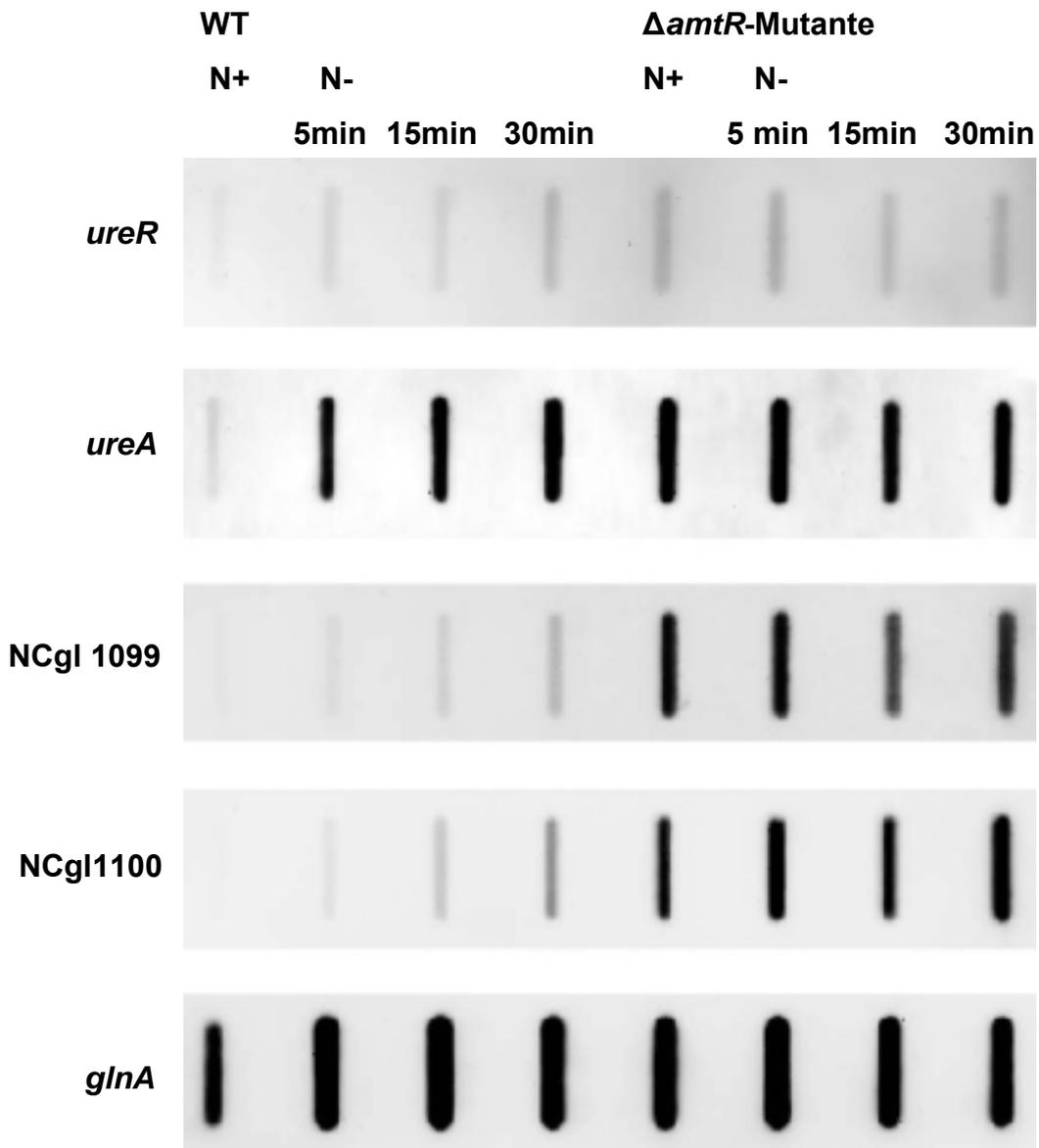


Abb. 12: Northern Hybridisierung der RNA aus Wildtyp-Zellen und dem MJ6-18-Stamm, isoliert unter Stickstoffüberschuß bzw. 5, 15 und 30 min Stickstoffmangel mit den Sonden *ureR*, *ureA*, *glnA*, NCgl1099 und NCgl1100.

III. Ergebnisse

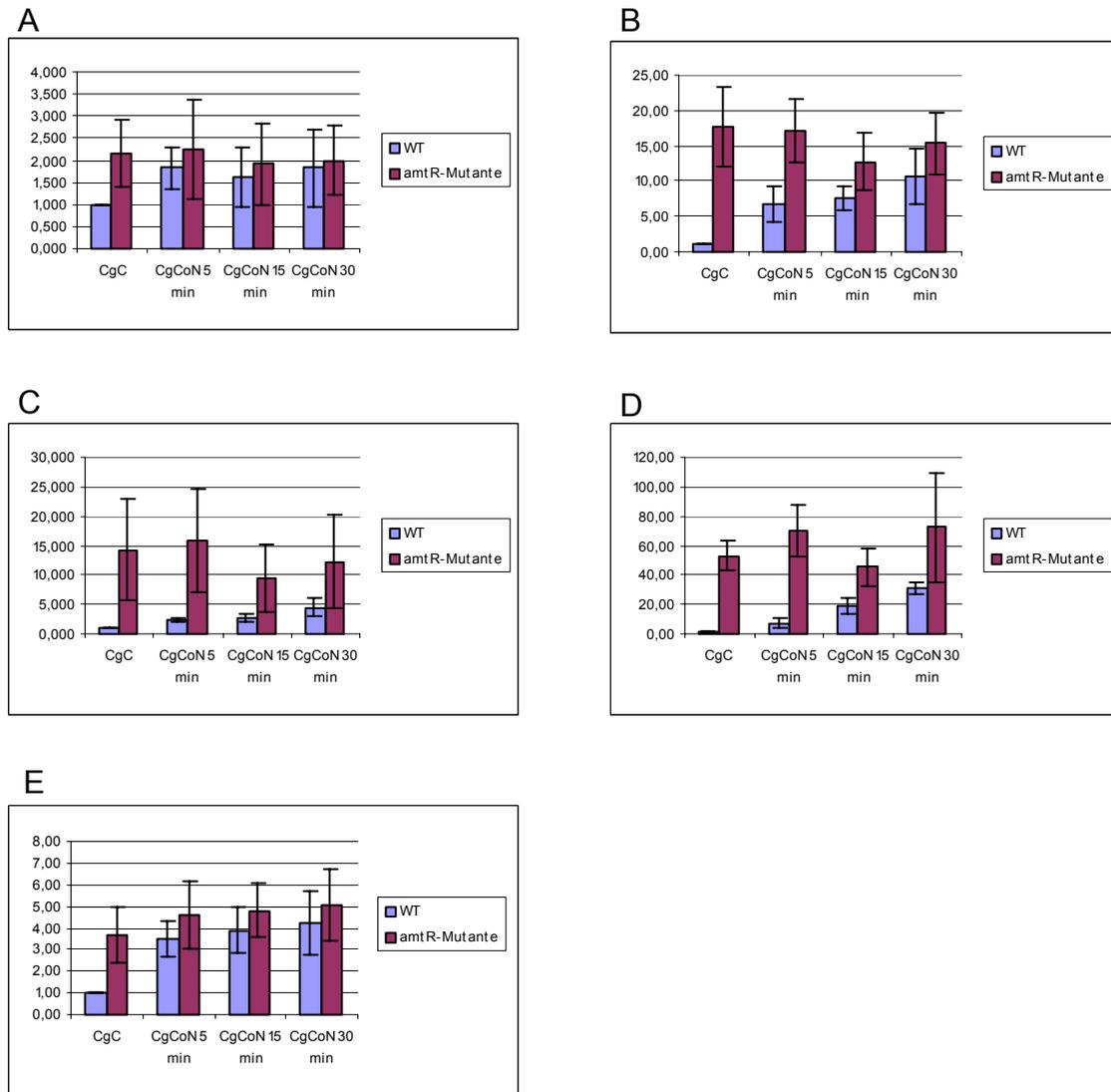


Abbildung 13: Balkendiagramme der Expressionsmuster der Gene *ureR* (A), *ureA* (B), NCgl1099 (C), NCgl1100 (D) und *glnA* (E). Beim Wildtyp (blaue Balken) zeigt sich ein stetigen Anstieg der Expression unter N-Mangel (5, 15 bzw. 30 min), während die Transkriptmenge in der Mutante (rote Balken) immer gleich bleibt.

Die Möglichkeit einer weiteren Regulation durch einen noch unbekanntem Regulator kommt für die ORFs der zweiten Gruppe in Betracht (Abb. 14, Abb. 15). Hier steigt die Expressionsrate im WT zwar wie in Gruppe 1 nach Einleiten des N-Hungers stetig an, erfährt in der Mutante aber nach 5 min N-Mangel ihren Höhepunkt und fällt anschließend wieder ab. Teilweise ist die Expressionsrate nach 30 Minuten N-Hunger sogar niedriger als unter N-Überschuß. Dieses Expressionsverhalten konnte für die Gene *crnT* (Creatintransporter), *codA* (Creatinindeaminase), das *gltB* (GOGAT), *urtA* (Harnstofftransporter), das *amt* (Methylammoniumtransporter), *amtB* (Ammoniumtransporter) und NCgl1362 gezeigt werden. Ähnliche Expressionsmuster

konnten schon im Rahmen der Microarray-Experimente beobachtet werden (siehe 2.1.4).

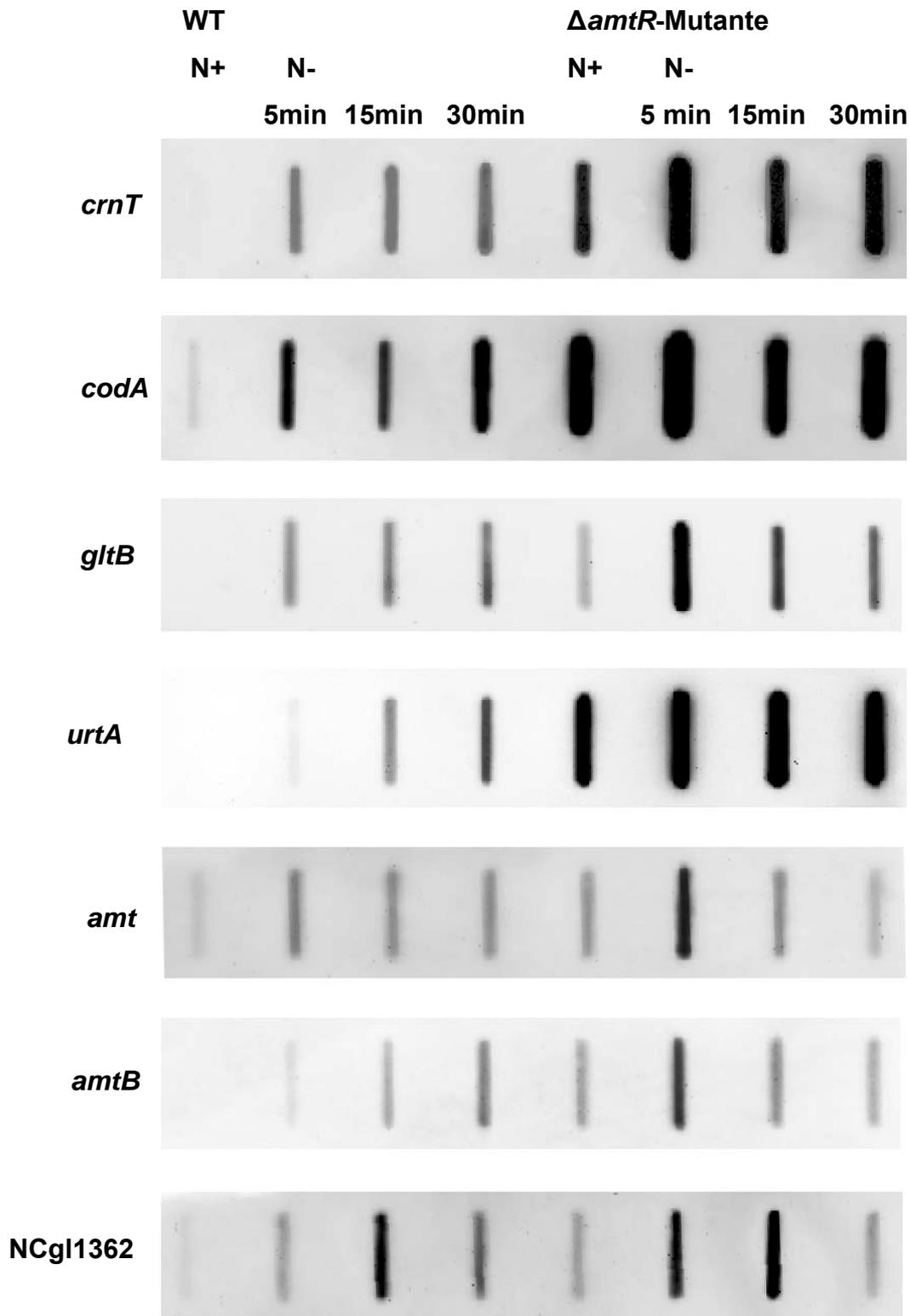


Abb. 14: Northern Hybridisierung der RNA aus Wildtyp-Zellen und dem MJ6-18-Stamm, isoliert unter Stickstoffüberschuß, bzw. 5, 15 und 30 min Stickstoffmangel mit den Sonden *crnT*, *codA*, *gltB*, *urtA*, *amt*, *amtB* und NCgl1362.

III. Ergebnisse

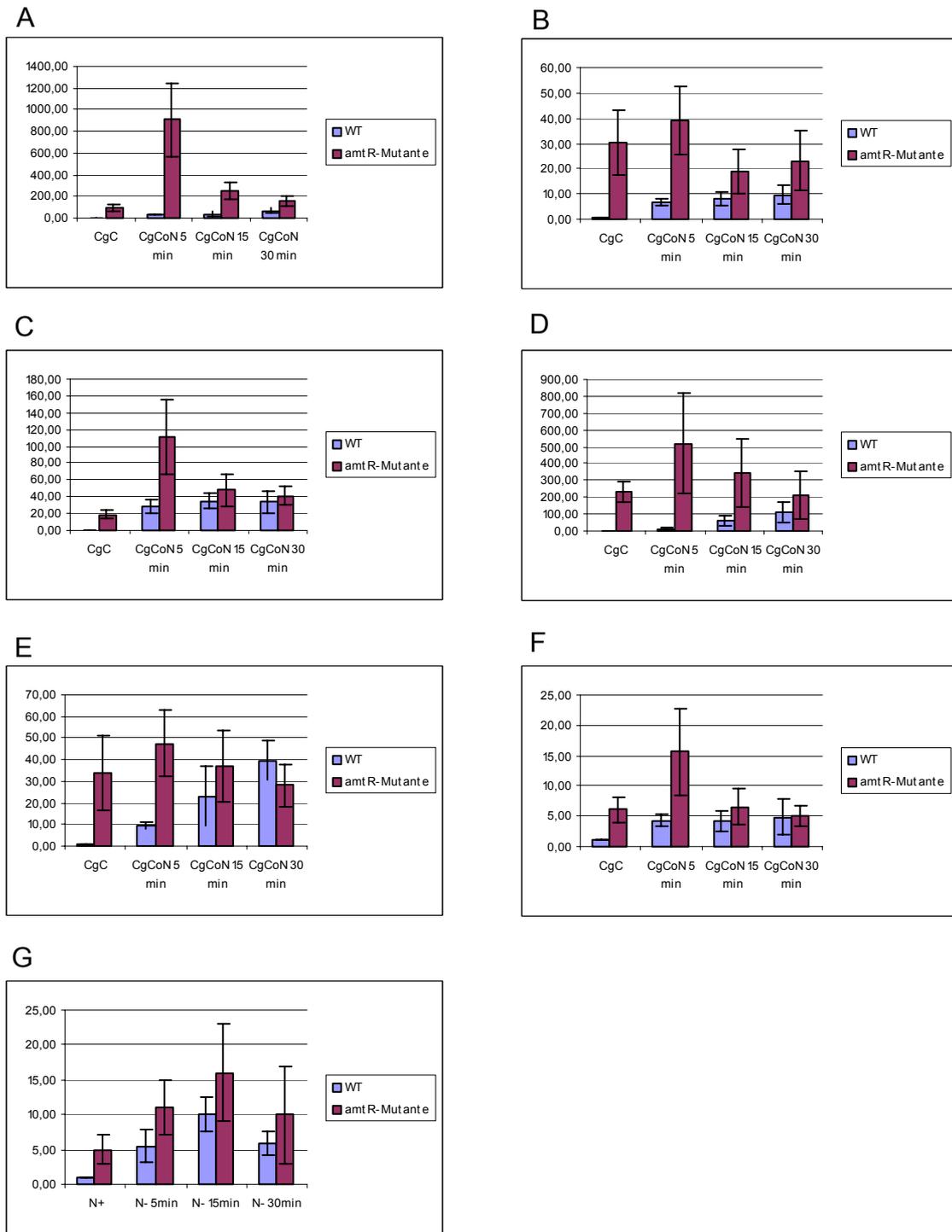


Abbildung 15: Balkendiagramme der Expressionsmuster von *crnT* (Creatintransporter) (A), *codA* (Creatinindeaminase) (B), *gltB* (GOGAT) (C), *urtA* (Harnstofftransporter) (D), *amt* (Methylammoniumtransporter) (E), *amtB* (Ammoniumtransporter) (F) und NCgl1362 (G). Diese Gene zeigen im Wildtyp (blaue Balken) einen stetigen Anstieg ihrer Expression unter N-Mangel, erreichen jedoch in der Mutante (rote Balken) die höchste Expression nach 5 Minuten.

III. Ergebnisse

Die Gene *gluA* und NCgl1915 zeigten sowohl im WT als auch in der $\Delta amtR$ -Mutante direkt nach Einleiten des N-Hunger zunächst einen starken Abfall der Transkriptmenge, die aber anschließend wieder zunimmt und nach 30 min die Ausgangsmenge an RNA wieder erreicht (Abb. 16, Abb. 17). Die Transkriptmenge von NCgl2300 steigt im Wildtyp stetig an, fällt in der Mutante jedoch genau wie bei *gluA* und NCgl1915 nach Einleitung der Stickstoffmangelbedingungen ab. Möglicherweise ist eine schneller „turnover“ der RNA für diese Beobachtung verantwortlich. Weiterhin könnten die Zellen durch den Zentrifugationsschritt beim Umsetzen in Stickstoff-freies Medium gestreßt sein z.B. durch Sauerstoffmangel, so daß sich das Expressionsmuster aufgrund dessen verändert. Ein Effekt des N-Mangels ist auszuschließen, da ein ähnliches Expressionsmuster bei Überführung der zentrifugierten Zellen in Stickstoff-reiches Medium gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Außerdem pendelte sich die Expression der Gene nach 15-30 Minuten wieder ein. Dies beweist auch, daß dieser Effekt nicht auf den N-Mangel zurückzuführen ist.

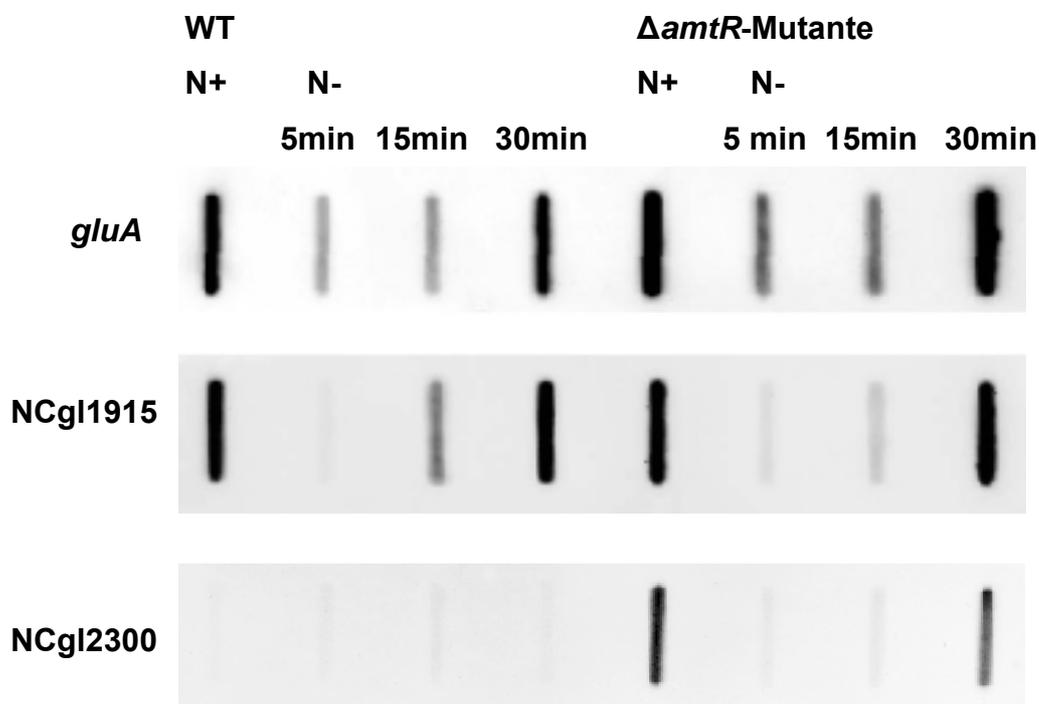


Abb. 16: Northern Hybridisierung der RNA aus Wildtyp-Zellen und dem MJ6-18-Stamm, isoliert unter Stickstoffüberschuß, bzw. 5, 15 und 30 min Stickstoffmangel mit den Sonden *gluA*, NCgl1915 und NCgl2300.

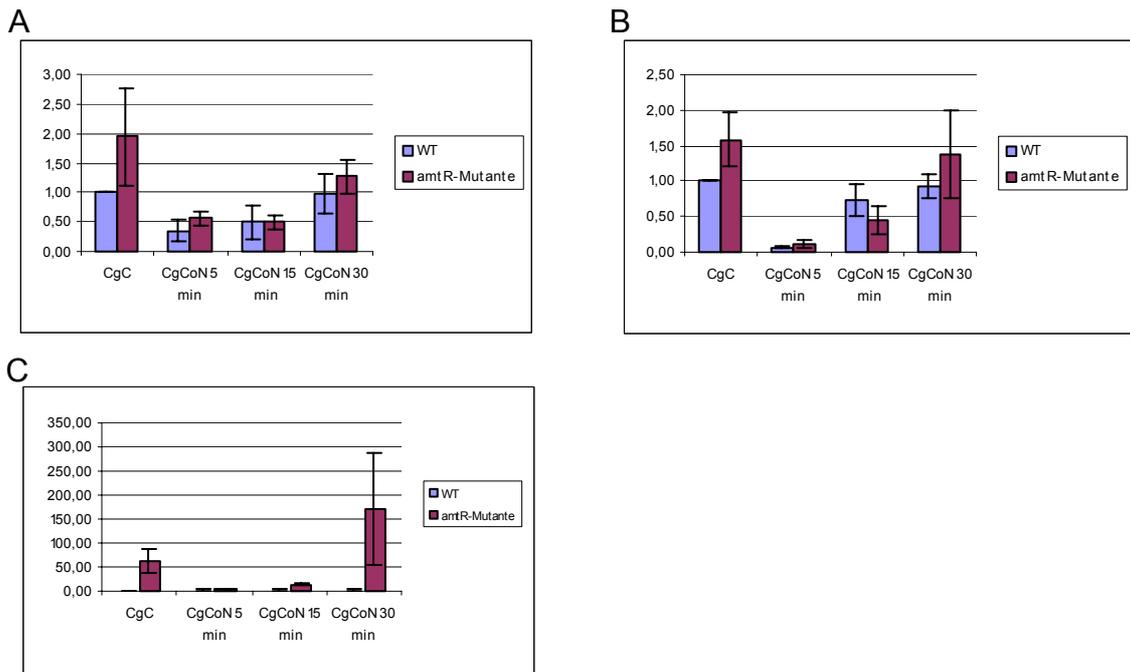


Abbildung 17: Balkendiagramme zu den Expressionsmustern von *gluA* (Bindeprotein des Glutamataufnahmesystems) (A), *NCgl1915* (Bindeprotein eines putatives Aufnahmesystem) (B) und *NCgl2300* (putative Reduktase). Diese Gene zeigen in der Mutante (rote Balken) nach Einleiten des N-Hunger zunächst eine verminderte Expressionsrate, die dann stetig wieder ansteigt. Bei *gluA* und *NCgl1915* zeigt sich dieses Expressionsmuster auch im Wildtyp (blaue Balken).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Expressionsänderung der Gene von Gruppe 3 könnte eine Reaktion auf generellen Stress bzw. ein Hinweis auf eine Verknüpfung mit dem Kohlenstoffmetabolismus sein, da zumindest die Operons *gluABCD* und *NCgl1915-1918*, sowie *NCgl2300-NCgl2302* unter Acetatregulation stehen. So zeigten Microarray-Experimente (Vergleich Glucose und Acetat), daß die o. a. Operons unter Acetat als Kohlenstoffquelle reprimiert werden (J. Kalinowski, persönliche Mitteilung; Gerstmeier 2003).

2.3.2 Quantitative *real-time* PCR

Die bei der Northern Hybridisierung erhaltenen Faktoren unterschieden sich sehr stark von den Faktoren, die durch die Microarray-Analysen ermittelt wurden. Aus diesem Grund wurde die *real-time* PCR als weitere Methode eingesetzt, um die Expression der AmtR-regulierten Gene zu quantifizieren. Das Prinzip der quantitativen RT-PCR beruht auf der Bestimmung der Produktzunahme mittels Fluoreszenz. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA, so daß der Konzentrationsanstieg des Produktes während einer PCR gemessen und dadurch Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der Matrize (mRNA) gezogen werden können. Diese Methode erlaubt sehr genaue Rückschlüsse auf Expressionsänderungen. Zunächst wurde die Effizienz der verwendeten Primer ermittelt, indem je Primerpaar chromosomale DNA (50ng/µl) in 4 verschiedenen Verdünnung (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) in einer *real-time* PCR eingesetzt wurden. Anschließend wurde der CT-Wert (*threshold cycle*) bestimmt, der dem Zyklus entspricht, bei dem die Fluoreszenz den zuvor festgelegten Schwellenwert überschreitet. Die CT-Werte der einzelnen Verdünnung sollten sich ca. um einen Faktor 3,33 voneinander unterscheiden. Abweichungen von diesem Wert spiegeln die Unterschiede der Primerpaare in ihrer Effizienz wider.

Tabelle 13: Übersicht über die Effizienzen der Primer für die *real-time* PCR-Experimente

ORF	Primereffizienz
<i>crnT</i>	2,09
<i>codA</i>	1,97
<i>ureA</i>	2,03
<i>gltB</i>	2,18
<i>urtA</i>	2,29
NCgl1099	2,25
NCgl1100	1,95
<i>gluA</i>	1,91
NCgl1915	2,19
<i>amtB</i>	1,84
<i>amt</i>	2,22
<i>glnA</i>	2,3

Die genaue Bestimmung der Primereffizienz ist wichtig, um anschließend den Faktor aus den CT-Werten der *real-time* PCR-Experimente besser bestimmen zu können.

Generell liegt die Effizienz der Primer bei dem Wert 2, doch schon minimale Abweichungen von diesem Wert führen bei der Berechnung der Faktoren zu größeren Fehlern, wie sich aus der Formel zur Berechnung des Faktors (Primereffizienz $(\sim 2)^{\text{CT-Wert}}$) erschließen läßt. In Tabelle 13 sind die Primereffizienzen dargestellt.

Die Abwesenheit von DNA Kontaminationen in den RNA-Proben wurden mit Hilfe von *real-time* PCR-Experimenten, denen keine Reverse Transkriptase zugesetzt worden war, überprüft. Pro Gen wurde jeweils mindestens eine Dreifachbestimmung mit unabhängigen RNA-Proben durchgeführt. Pro Ansatz wurde jeweils 0,1 µg RNA eingesetzt. Es wurden keine *housekeeping*-Gene als interne Kontrolle verwendet, da es schwierig ist, eine genaue Aussage darüber zu treffen, ob diese nicht doch unter den untersuchten Bedingungen einer Expressionsschwankung unterliegen. Statt dessen wurde unter der Annahme, daß sich die Menge an Gesamt-RNA innerhalb der Zelle unter den gewählten Bedingungen nicht verändert - dies beinhaltet auch, daß sich nur in einzelnen Fällen die Anzahl der spezifischen mRNAs ändert - immer die exakt gleiche Menge an RNA für ein Experiment eingesetzt.

Am Ende jeder quantitativen RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 18) durchgeführt, um zu prüfen, ob unspezifische Nebenprodukte gebildet worden sind. Zeigen sich neben einem Hauptpeak, der das erwartete PCR-Produkt darstellt, weitere Peaks, so ist von einer Verunreinigung der Probe durch unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere auszugehen. Da sich SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert, ist dann mit einer Verfälschung der Ergebnisse zu rechnen. Die Schmelzkurvenanalysen zeigten jedoch keine unspezifischen Produkte während der Schmelzkurvenanalyse.

Stellvertretend für alle Gene, die in einem Operon angeordnet sind, wurde jeweils das erste Gen des *clusters* untersucht. Die höchsten Expressionsraten wurden mit den Primern, die innerhalb des *urtA*, des *gltB* und des *amtB*-Gens binden, erzielt. Das stimmt im Falle von *urtA* auch mit den Hybridisierungsdaten überein. Die Ergebnisse des *gltB*- und *amt*-Gens liegen jedoch sehr weit auseinander. In diesem Fall ist dies vermutlich auf eine geringe Affinität der gewählten RNA-Sonde für die Northern Hybridisierungsexperimente zurückzuführen.

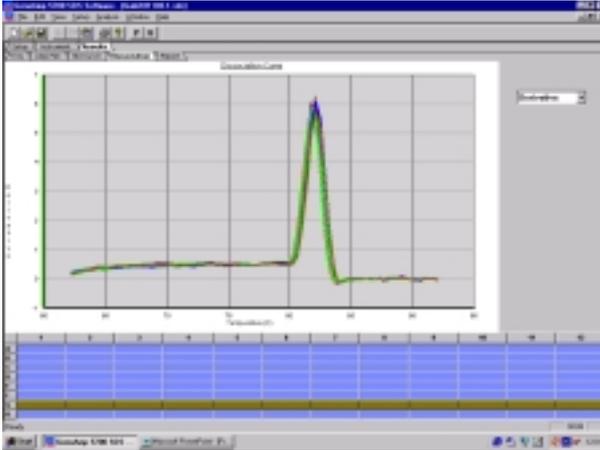


Abb. 18: Schmelzkurvenanalyse der *real-time* PCR Ansätze. Ein *peak* deutet auf nur ein einziges PCR-Produkt hin bzw. schließt eine Bildung von Primer-Dimeren aus.

Tabelle 14: Daten der *real-time* PCR Experimente. Gezeigt sind die Faktoren und ihre Standardabweichung, wobei für jedes Gen die Differenz der CT-Werte zum CT-Werts des Wildtyps unter N-Überschuß ermittelt und mit Hilfe der Primereffizienzen in einen Faktor umgerechnet wurde.

Orf	WT CgCoN 30 min		MJ6-18-Stamm CgC		MJ6-18-Stamm CgCoN 30 min	
	Faktor	Fehler	Faktor	Fehler	Faktor	Fehler
<i>crnT</i>	152	2	168	2	177	3
<i>codA</i>	12	1,6	35	2	20	2,5
<i>ureA</i>	17	2	24	3	13	4
<i>gltB</i>	1011	1	591	2	891	2
<i>urtA</i>	261	2	1581	2	2078	1
NCgl1099	8	1,25	32	1	23	1
NCgl1100	26	1,2	41	2	47	2
<i>gluA</i>	0,4	1,5	1	1,6	0,8	2
NCgl1915	0,4	3	1,5	1,4	1,6	1,4
<i>amtB</i>	78	4	137	2	163	1
<i>amt</i>	308	2	415	2	661	1
<i>glnA</i>	3	4	8	1,6	11	1,5

Die Werte für *codA*, *ureA*, NCgl1100, *gluA*, NCgl1915 und *glnA* liegen in der selben Größenordnung wie die Faktoren, die durch die Slot Blot-Experimente erhalten worden sind. Die Faktoren von *crnT*, NCgl1099 und *amtB* unterscheiden sich etwa um einen Faktor 3. Generell lassen sich die Werte der RNA-Hybridisierungsexperimente und der *real-time* PCR gut miteinander vergleichen, während die Microarray-Daten stark abweichen.

3. Untersuchung des Bindemotivs von AmtR

3.1 Gelshiftexperimente

Zwar konnten bisher die durch die Promotoranalyse erhaltenen Daten durch Hybridisierungsexperimente und *real-time* PCR bestätigt werden, jedoch konnte noch keine Aussage über die erhaltenen Bindemotive getroffen werden. Zur Verifizierung der Bindemotive wurden Gel Shift-Experimente mit Digoxigenin-markierten DNA-Sequenzen und Proteinextrakt aus *E. coli*-Zellen, welche ein AmtR-Expressionsplasmid tragen, durchgeführt. In der Regel wurden 40-mere, welche das putative Bindemotiv enthalten, für den Gelshift eingesetzt. Wurden jedoch mehrere Bindesequenzen *upstream* eines ORFs vorgeschlagen, so wurde ein größeres PCR-Fragment eingesetzt und eine mögliche Bindungen von AmtR mit den jeweiligen 40-meren kompetitiert. Dadurch konnte einerseits die Anzahl der Shifts bestätigt und andererseits die Sequenz, die das Bindemotiv für AmtR beinhaltet, weiter eingeschränkt werden. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Primer und 40-mere sowie die Größe der DNA-Fragmente. Außer bei den Sequenzen *upstream* der ORFs NCgl1362 und NCgl2253, zeigte sich ein Retardation im Gel nach Zugabe von *E. coli*-Extrakt mit AmtR. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl an Bindemotiven stromaufwärts der einzelnen Gene und der Anzahl an Shifts innerhalb der Retardationsexperimente festgestellt werden. Bei mehreren putativen Bindestellen wurden die Shifts durch Zugabe nicht-markierter 40 Basenpaar großer, doppelsträngiger Oligonucleotide, die das putative Bindemotiv für AmtR enthalten, wieder aufgehoben. Als Negativkontrolle wurden DNA ohne Protein bzw. DNA mit *E. coli*-Extrakt ohne AmtR-Protein eingesetzt. In einer weiteren Kontrolle wurde untersucht, ob eine vor AmtR selber liegende Sequenz, die

III. Ergebnisse

Ähnlichkeiten zu dem bisher bekannten Bindemotiven aufweist, die Retardation im Gel abschwächt. Bei einer spezifischen Bindung von AmtR an die DNA sollte der Shift bei dieser Kontrolle nicht schwächer werden. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der verwendeten Sequenzen.

Tabelle 15: Übersicht über die Größe der untersuchten Bindesequenzen, der Primer zur Herstellung der Sequenzen und der Oligomere zur Einschränkung der Motivs. Sind keine Primer angegeben, wurden nur die 40-mere für den Gelretardationstest eingesetzt.

Motiv vor / zwischen:	Größe:	Primer	40-mere
<i>crnT</i>	171 bp	5'-gaggccttatcatcgcc-3' 5'-ctggaacatctaacagccc-3'	5'-aaactccctttctatcaatctatagaaactgcaaaatc-3' 5'-aagtcatactttctatagattgatagaaatgtggggag-3'
<i>codA</i>	39 bp	-	5'-ccagatgctatctattctattgctgacaggatttagtg-3'
<i>ureA</i>	216 bp	5'-tcatcggtgcaagcttacg-3' 5'-agtgatatgcaattttgccc-3'	5'-cagtgaaaagagaattctataggacgccagacttag-3' 5'-gcttcattttaaggggtagatatgcagatgtagcgc-3' 5'-gctaaactaatttctgttacctgacagaaaggggcaa-3'
<i>urtA</i>	122 bp	5'-ggctgaaatgtaagacacg-3' 5'-ggacgggacatgaatacc-3'	5'-caaaaacaactacctataggctgacagaaactctaa-3' 5'-actctaaaaactatagagctatagaaactttaact-3'
<i>gltBD</i>	197 bp	5'-ggtggataggcgaacatc-3' 5'-cctgtggtttcatgcgg-3'	5'-cctcccgtttcctatagggtgatcgaaagtaacc-3' 5'-cttattatcgaacgattgatagaaacaggatta-3'
<i>gluA</i>	37 bp	-	5'-aacacgcaatatctatcatgtgataggtaaatttcgg-3'
<i>amtB</i>	173 bp	5'-cctttgggattgacacc-3' 5'-ttgcctgggtaccacc-3'	5'-ccagctcactatagacctacagaaactaatttc-3' 5'-caatacatctatagaataggtttggaggg-3' 5'-ggatattttctatagttaacaggtaatttaag-3'
NCgl1099/ NCgl1100	40 bp	-	5'-ctaaattttctatcaatctatagatactaggctatt-3'
NCgl1915	36 bp	-	5'-ctcacaatttctatcaactatagaaagatatttg-3'
NCgl1362	132 bp	5'-ggagtgtctaggcaaatgg-3' 5'-aaccacagcataaacacagc-3'	5'-cgcgaatcatctgtgatctatagatagataaccaga-3'
NCgl2253	150 bp	5'-cttctgtttccgaggag-3' 5'-agttggcccgatcccac-3'	5'-tagtttactttctatcaacctacaagcactccaggc-3'
<i>amtR</i>	40 bp	-	5'-gcagagttcctatttggtatcgatttcacgggctcaacg-3'
<i>glnA</i>	34 bp	-	5'-aagtttgatagatcgacaggtaatgcattatac-3'

III. Ergebnisse

Laut der Promotoranalyse liegen stromaufwärts von *crnT* zwei putative Bindemotive. Der Gelshift (Abb. 19A) zeigte eine doppelte Retardation im Gel, die durch Zugabe von 40-meren teilweise aufgehoben werden kann. Zudem konnte auch bei Gelretardationsassays mit einzelnen 40-meren einen Shift nachgewiesen werden (keine Daten gezeigt), so daß die beiden Bindemotive bestätigt werden konnten. Das gleiche Ergebnis konnte für die zwei putativen Bindemotive vor dem *urt*-Operon (Abb. 19B), auch durch Gelshifts mit dem einzelnen 40-meren (keine Daten gezeigt), beobachtet werden. Des weiteren konnte eine Bindung an die zwei putativen Bindestellen vor dem *gltBD*-Operon nachgewiesen werden (Abb. 19C).

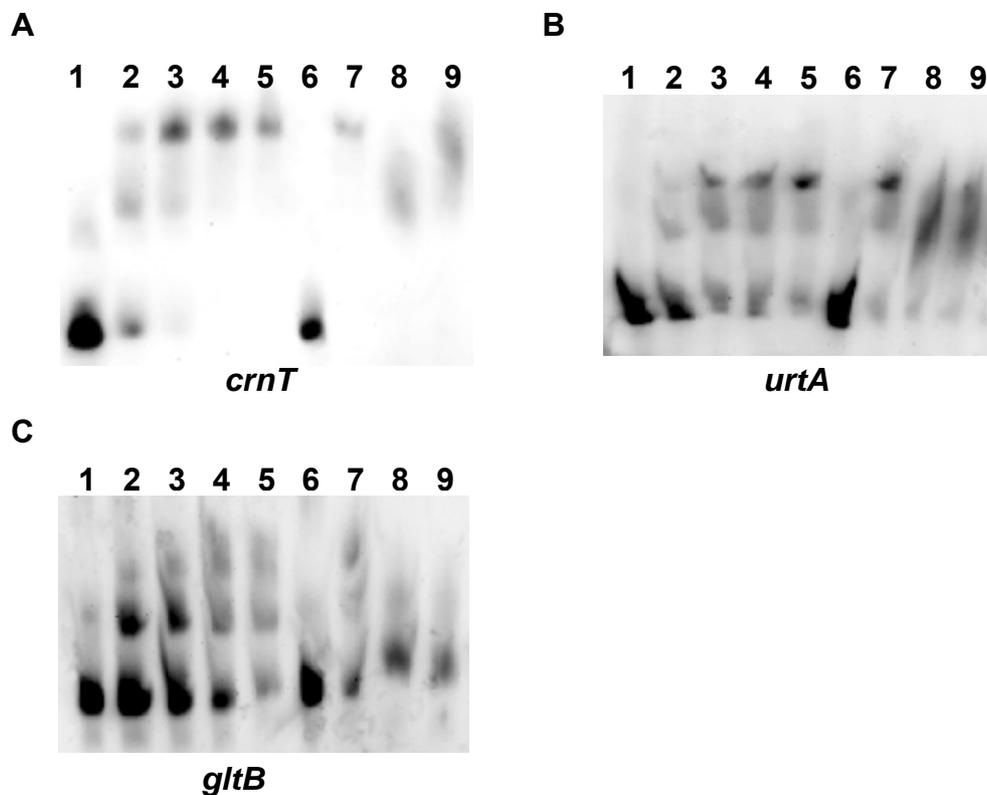


Abb. 19: Gelretardationsexperimente mit DIG-markierten DNA-Fragmenten vor *crnT*, *urtA* und *gltB*. Nachweis der Bindung von AmtR an die Sequenzen *upstream* von *crnT* (A), *upstream* von *urtA* (B) und *upstream* von *gltB* (C). Bande 1 = DNA ohne Proteinextrakt, Bande 2-5 = 5, 10, 20 bzw. 30 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR-Protein), Bande 6: Kontrolle mit Proteinextrakt aus *E. coli* (ohne AmtR), Bande 7: DNA mit 30µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 mit 40-meren vor *amtR* und Bande 8,9: DNA mit 30µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 mit 40-meren der putativen Bindesequenzen vor den jeweiligen Genen (*crnT*, *urtA* und *gltB*)

III. Ergebnisse

Vor dem *codA*-Gen, dem *gluABCD*-Operon, dem *glnA*-Gen, dem Operon NCgl1915-NCgl1918 bzw. zwischen den ORFs NCgl1099 und NCgl1100 konnte jeweils die putative Bindestelle bestätigt werden (Abbildung 20). Die putativen Bindestellen vor *ureA* konnten nicht bestätigt werden. Zwar konnte ein Shift mit der Sequenz *upstream* von *ureA* gezeigt werden (Abb. 20A), jedoch ließ sich dieser nicht durch Wettbewerbsversuche aufheben.

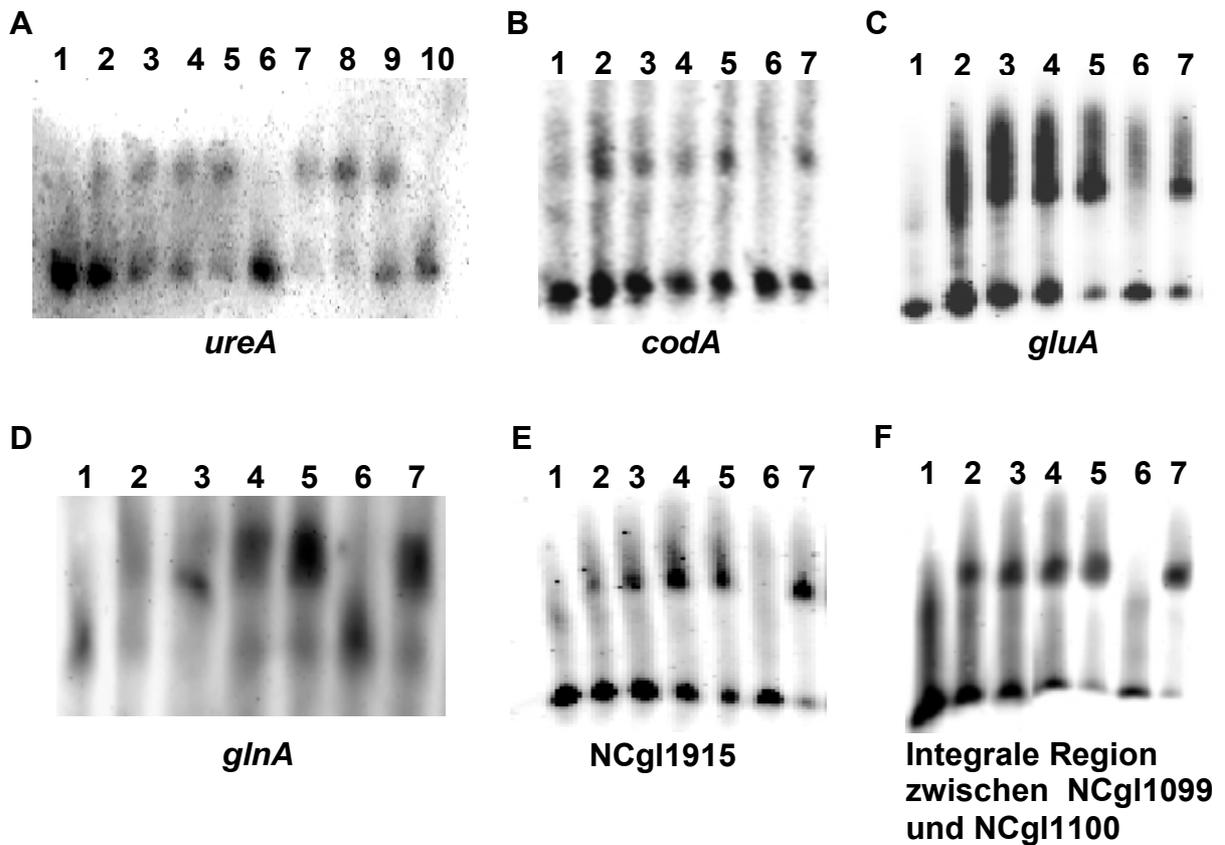


Abb. 20: Gelretardationsexperimente mit DIG-markierten DNA-Fragmenten vor *ureA*, *codA*, *gluA*, *glnA*, NCgl1915 und zwischen NCgl1099 und NCgl1100; Nachweis der Bindung von AmtR an die *upstream* von *codA* (B), *upstream* von *gluA* (C), *upstream* von *glnA* (D), *upstream* von NCgl1915 und zwischen NCgl1099 und NCgl1100. Wettbewerbsversuche mit den Sequenzen *upstream* von *ureA* führten zu keiner Aufhebung der Retardation. Bande 1 = DNA ohne Proteinextrakt, Bande 2-5 = 5, 10, 20 bzw. 30 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR-Protein), Bande 6: Kontrolle mit Proteinextrakt aus *E. coli* (ohne AmtR), Bande 7: DNA mit 30µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 mit 40-mere vor *amtR*

III. Ergebnisse

Die zwei Bindestellen *upstream* des *amt*-Operons konnten schon früher durch Gelretardationsassays bestätigt werden (Jakoby *et al.*, 2000). Dabei wurden zur genaueren Bestimmung des Bindemotivs die einzelnen Sequenzen deletiert und die Auswirkung auf das Bindeverhalten von AmtR untersucht. In früheren Arbeiten konnten auch *upstream* des *amtB*-Operons zwei Bindestellen identifiziert werden (Nolden, 2001c). Diese wurden aber nicht durch eine Deletion bestätigt. Zudem gab es die Promotoranalyse anstelle von einer dieser Sequenzen eine andere putative Bindestelle für AmtR an, so daß hier noch zur genauen Bestimmung ein Gelshift durchgeführt wurde. Alle drei putativen Sequenzen wurden eingesetzt und überprüft. Der Gelshift (Abb. 21) zeigte eine doppelte Retardation im Gel, so daß zwei Bindestellen vermutet werden konnten. Nur in zwei von drei Wettbewerbsversuchen konnte eine Aufhebung des Shifts gezeigt werden. Somit konnten für *amtB* zwei Bindestellen nachgewiesen werden, nämlich innerhalb der Sequenzbereiche ccagctctaactatagacctacagaaactaattc und ggatatttctatagtttaacaggaatttaag.

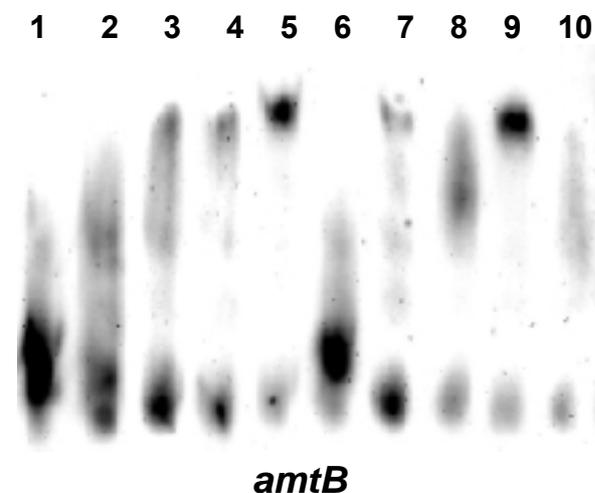


Abb. 21: Gelretardationsexperimente mit DIG-markierten DNA-Fragmenten zum Nachweis der Bindung von AmtR an die Sequenzen *upstream* von *amtB*,
Bande 1 = DNA ohne Proteinextrakt, Bande 2-5 = 5, 10, 20 bzw. 30 µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 (enthält AmtR-Protein), Bande 6: Kontrolle mit Proteinextrakt aus *E. coli* (ohne AmtR), Bande 7: DNA mit 30µg Protein aus *E. coli* pUC11-1.8 mit 40-mere vor amtR

3.2 Erstellung einer Konsensussequenz

Mit Hilfe der durch die Gelretardationsexperimente bestätigten Bindemotive für AmtR wurde ein multiples *alignment* erstellt, anhand dessen die Konsensussequenz einer AmtR-Bindungsstelle ermittelt werden konnte. Die Darstellung der Konsensussequenz wurde mit Hilfe des Programms Sequence Logos ermöglicht. Dieses Programm ist frei erhältlich unter der Web-Adresse <http://weblogo.berkeley.edu/>.

Die Höhe der Buchstaben ist ein Indiz für ihre Konservierung bzw. spiegelt den Informationsgehalt des entsprechenden Nucleotides. Somit kann durch dieses Programm nicht einfach nur die Konsensussequenz dargestellt, sondern auch die Frequenz der Basen an jeder Position festgestellt werden. Wie häufig bei Bindemotiven zu finden, weist auch das AmtR-Bindemotiv ein Palindrom auf (Abb. 22).

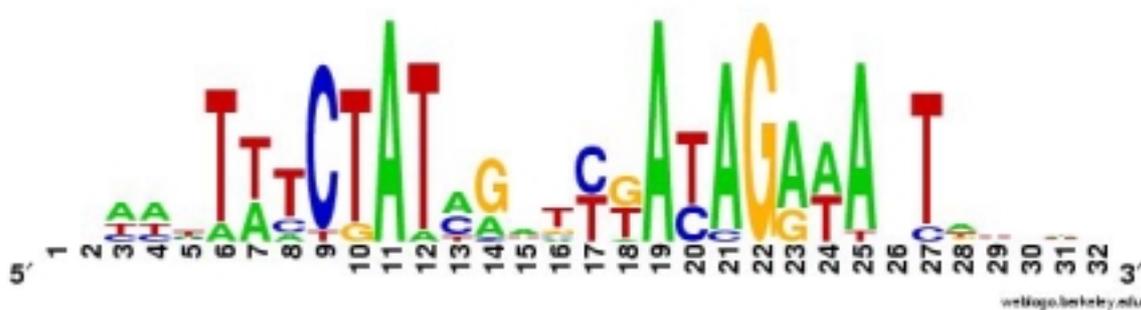


Abbildung 22: Graphische Darstellung der AmtR Konsensussequenz. Die Höhe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit der Basen an der jeweiligen Position wieder.

4. Analyse des MJ6-18-Stamms auf Proteomebene

Bisher wurde die Auswirkung des Repressor AmtR nur auf Expressionsebene betrachtet. Änderungen der Expression dieser Gene sollten sich allerdings auch auf Proteinebene widerspiegeln. Eine Methode zur globalen Analyse des Proteoms einer Zelle unter verschiedenen Bedingungen ist die 2D-Gelelektrophorese.

Für dieses Verfahren wurden cytoplasmatische Fraktionen des Wildtyps und des MJ6-18-Stamms unter N-Überschußbedingungen gewonnen und zunächst durch den isoelektrischen Punkt und anschließend nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine konnten durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Unterschiede im Proteomprofil der beiden Proteinfractionen konnten mit Hilfe des Programms Delta 2D (Decodon GmbH, Greifswald) detektiert werden. Spots, die auf dem 2D-Gel der Mutante stärker sichtbar waren, wurden ausgeschnitten und im Zentrum für molekulare Medizin Köln (ZMMK) einem tryptischen Verdau unterzogen und anschließend durch MALDI-TOF-MS und *peptide mass fingerprint*-Analyse identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 und Abbildung 23 dargestellt. Es konnten zwei Untereinheiten der Urease sowie die Creatinindeaminase identifiziert werden. Neben diesen drei Proteinen konnten noch die Genprodukte von NCgl2300 bzw. NCgl1099, für die schon bei den Microarray-Experimenten eine AmtR-Regulation festgestellt werden konnte, sowie eine putative Katalase (NCgl0251), eine Acetyl-CoA Hydrolase (NCgl2480) und die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase gefunden werden (Abb 23A). Neben den identifizierten Proteinen konnten noch weitere Proteine gefunden werden, die im Vergleich der Proteomprofile in der Mutante verstärkt exprimiert worden sind. Diese konnten schon zuvor in unserer Arbeitsgruppe durch Maike Silberbach als UreB, UreC und UreG identifiziert werden. Somit konnten insgesamt fünf der sieben Untereinheiten der Urease auf Proteomebene detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die auf Transkriptionsebene erhaltenen Daten. Da Membranproteine mit der gewählten Methode nicht detektiert werden können, konnte allerdings keines der Stickstoff-regulierten Transportsysteme im 2-D Gel gefunden werden.

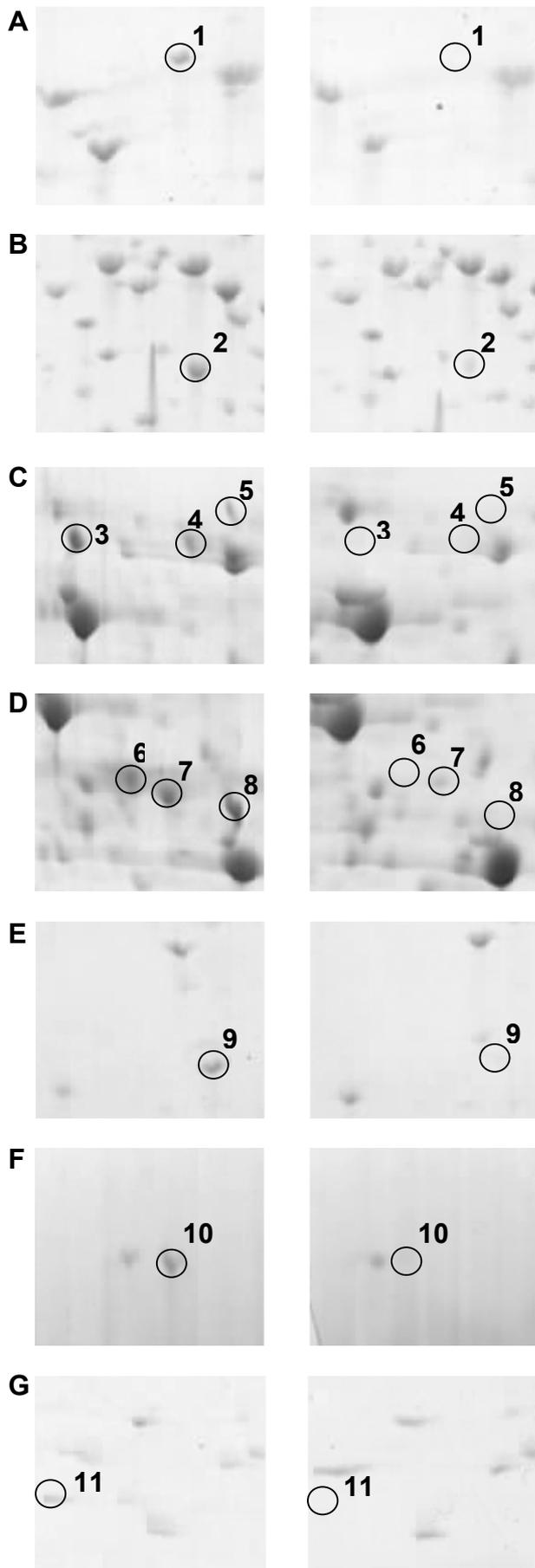


Abbildung 23: Ausschnitt zweier 2D-Gele. links ist das Proteinmuster unter Stickstoffüberschuß aus $\Delta amtR$ -Zellen und rechts aus Wildtyp-Zellen gezeigt. Die veränderten und über MALDI-TOF-MS identifizierte Proteine sind mit einem Kreis gekennzeichnet.

A) Gelausschnitt im Bereich pH 4,2-4,4 und ca. 17-24 kDa. In der Mutante zeigte sich eine verstärkte Proteinkonzentration von einer Urease-Untereinheit (UreB) (1).

B) Gelausschnitt im Bereich pH 4,3-4,5 und ca. 23-30 kDa. In der Mutante konnte eine verstärkte Proteinkonzentration von einer Urease-Untereinheit (UreG) (2) festgestellt werden.

C) Gelausschnitt im Bereich pH 5,0-5,2 und ca. 50-65 kDa. In der Mutante zeigte sich eine verstärkte Proteinkonzentration von UreC (3), einer Acetyl-CoA Hydrolase (4) und einer putative Katalase (5).

D) Gelausschnitt im Bereich pH 5,0-5,2 und ca. 35-55 kDa. In der Mutante konnte eine verstärkte Proteinkonzentration von Ferrodoxin-Untereinheit der Nitritreductase (NCgl2300) (6), der Creatinindeaminase (7) und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (8) nachgewiesen werden.

E) Gelausschnitt im Bereich pH 5,2-5,4 und ca. 16-25 kDa. In der Mutante zeigte sich eine verstärkte Proteinkonzentration von UreE (9)

F) Gelausschnitt im Bereich pH 5,2-5,4 und ca. 10-14 kDa. In der Mutante war eine verstärkte Proteinkonzentration von UreA (10)

G) Gelausschnitt im Bereich pH 6,0-6,2 und ca. 25-35 kDa. In der Mutante lag eine verstärkte Proteinkonzentration von NCgl1099 (putative Hydrolase) (11) vor.

Tabelle 16: NCgl-Nummer, theoretische Größe (kDa), theoretischer isoelektrischer Punkt (PI) und Proteinbezeichnung der identifizierten Proteine.

ORF	NCgl-Nr.	Gen	Protein	KDa	PI
455	0075	codA	Creatinindeaminase	45,6	5,02
466	0083	ureA	Harnstoff-Amidohydrolase (Urease) Gamma-Untereinheit [EC: 3.5.1.5]	11,24	5,1
469	0086	ureE	Urease, akzessorisches Protein UreE [EC: 3.5.1.5]	17,63	5,23
672	0251	-	putative Katalase [EC:1.11.1.6]	57,2	5,1
1731	1099	-	putative Hydrolase	28,8	5,71
2487	1526	gap	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	36,2	5,04
2881	2480	-	Acetyl-CoA Hydrolase [EC:2.8.3.-]	54,5	4,93
3703	2300	-	Ferredoxin-Untereinheit der Nitritreduktase [EC:1:13:11:1]	42,6	5,05

5. UreR als putativer Regulator des *ure*-Operons

Der Vergleich der Transkriptome des MJ6-18-Stamms unter Stickstoffmangel und Stickstoffüberschuß durch die Microarray-Analyse ließ vermuten, daß AmtR tatsächlich der globale Regulator der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum* ist. Slot Blot-Analysen des Expressionsmusters von *ureA*, *urtA*, *amtB* und *gltB* unter 4 mM bzw. 15 mM Harnstoff zeigten aber, daß das *ureA*-Gen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Genen nicht nur bei 4mM Harnstoff sondern auch schon bei einer Harnstoff-Konzentration von 15 mM im Medium abgelesen wird (Abb. 24). Eine Beteiligung eines weiteren Regulators neben AmtR an der Transkriptionskontrolle des *ure*-Operons ist daher wahrscheinlich. Ein möglicher Kandidat für eine weitere Regulation auf Expressionsebene wäre der putative Regulator *ureR* (NCgl0082), welcher *upstream* des *ure*-Operon liegt und schon in anderen Organismen in Anwesenheit von Harnstoff als Aktivator des *ure*-Operons bzw. als Autoregulator beschrieben wurde (Dattelbaum *et al.*, 2001). Daher wurde eine Insertionsmutante des *ureR*-Gens erstellt und erneut Northern Hybridisierungen mit RNA isoliert unter N-Überschuss, N-Mangel und 4 bzw. 15mM Harnstoff durchgeführt. Es zeigten sich keine Änderungen im Transkriptionsmuster (keine Daten gezeigt). Auf Proteinebene

III. Ergebnisse

konnte unter Stickstoffmangel-Bedingungen kein Unterschied in der Urease-Aktivität zwischen der *ureR*-Mutante ($0,27 \pm 0,1$ U/min) und dem Wildtyp ($0,32 \pm 0,13$ U/min) festgestellt werden. Somit kann *ureR* als weiterer Regulator innerhalb der Stickstoffkontrolle, zumindest unter den untersuchten Bedingungen, ausgeschlossen werden.

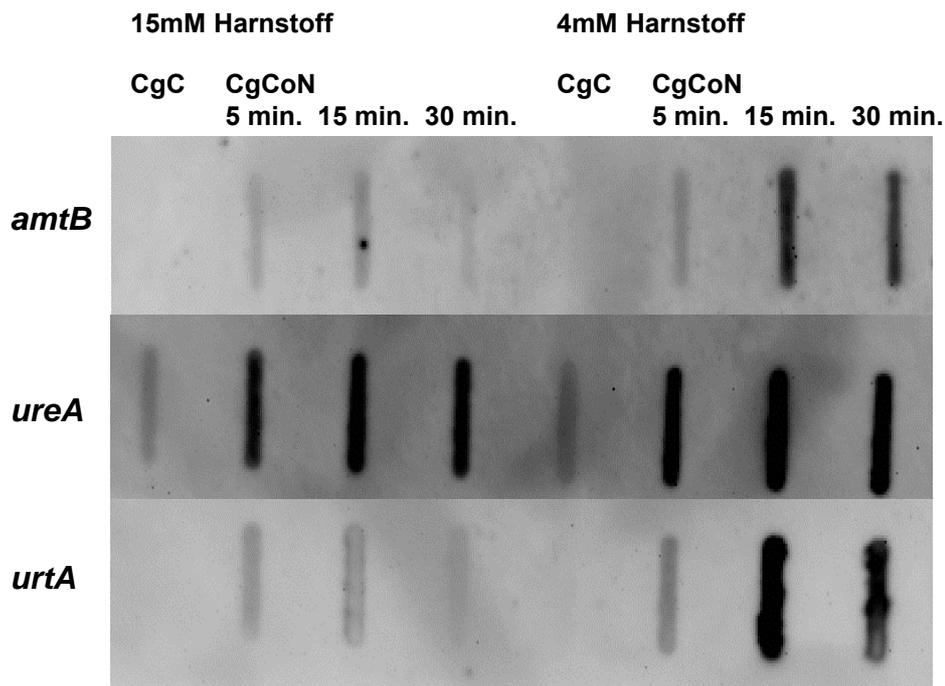


Abb. 24 zeigt die Hybridisierung der RNA aus Wildtyp-Zellen, gewachsen in 4mM bzw. 15mM Harnstoff, mit den Sonden *amt*, *ureA* und *urtA*. Die Gene *amtB* und *urtA* zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, während *ureA* schon bei 15mM Harnstoff im Medium höher exprimiert wird.

6. Charakterisierung des Harnstofftransporter

Um eine gute Stickstoffversorgung zu gewährleisten, müssen Stickstoffverbindungen zunächst in die Zelle gelangen. Dies wird durch passive Diffusion oder aktiven Transport gewährleistet. Bisher konnten in *C. glutamicum* einige Transporter, die in die Aufnahme von stickstoffhaltigen Verbindungen involviert sind, auf biochemischer und genetischer Ebene charakterisiert werden. Dazu gehören zwei Ammoniumtransporter (Amt und AmtB), ein Glutamintransporter und zwei Glutamattransporter (GltS und GluABCD). Der Harnstofftransporter konnte bisweilen nur biochemisch charakterisiert werden (Siewe *et al.*, 1998). Harnstoff stellt eine weit verbreitete Stickstoffquelle dar, die von vielen Organismen in die Umwelt exkretiert wird. In den Bakterien wird diese Verbindung durch die Urease hydrolysiert. Dabei entsteht unter Abspaltung von Ammonium Carbaminsäure, welches spontan zu NH_3 und CO_2 zerfällt. Da Harnstoff klein und ungeladen ist, kann es bei hohen Konzentrationen die bakterielle Zellmembran durch Diffusion passieren. In verschiedenen Bakterien konnten spezifische Transportsysteme, die die Aufnahme von Harnstoff bei niedrigen Konzentrationen ermöglichen, biochemisch, seltener auch genetisch charakterisiert werden. Die Mechanismen der Aufnahme sind dabei sehr unterschiedlich. Zum einen wird die Aufnahme durch erleichterte Diffusion gewährleistet (8, 23, 27) und zum anderen durch einen aktiven Energie-abhängigen Transport (16, 26). Bei einer *blast*-Suche in *C. glutamicum* konnte keine Sequenz gefunden werden, welches Ähnlichkeiten zu *yut* (*Yersinia pseudotuberculosis*; Sebanne *et al.*, 2002) oder *ureI* (*Helicobacter pylori*; Weeks *et al.*, 2000)), zwei Gene, die für sekundäre Transporter kodieren, aufweist. Statt dessen konnte ein *Gen-cluster* mit hohen Sequenz-homologien zu den *fmd*-Genen (*Methylophilus methylotrophus*; Mills *et al.*, 1998) und den *urt*-Genen (*Anabaena*; Valladares *et al.*, 2002) gefunden werden. Weiterhin zeigte dieses *cluster* auch Ähnlichkeiten zu den Aminosäuretransporter LIV (*E. coli*; Adams *et al.*, 1990) und Bra (*Pseudomonas aeruginosa*;) (Tabelle17).

Tabelle 17: Übersicht über die Identitäten der Aminosäuresequenzen der Proteine des Harnstofftransporters zu denen anderer Transportsysteme Fmd, Bra und LIV

Identität zu	NCgl0893	NCgl0894	NCgl0895	NCgl0896	NCgl0897
Fmd	43,3	40,8	35,2	-	-
Urt	49,2	49,3	40,4	34,0	38,7
Liv	21,6	25,8	25,9	36,8	37,0
Bra	22,8	27,8	26,0	37,2	35,3

Um die Funktion dieser Gene näher zu untersuchen, wurden drei verschiedene Mutanten mit einer Insertion im Bindeprotein, der Permease bzw. der ATPase hergestellt. Harnstoffaufnahmemessungen mit den Insertionsmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp ($0,8 \pm 0,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$) eine sehr geringe Aufnahme ($0,01-0,04 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$) (Abb. 25 A). Bei diesem Gen-*cluster* handelt es sich folglich um ein Harnstoffaufnahmesystem.

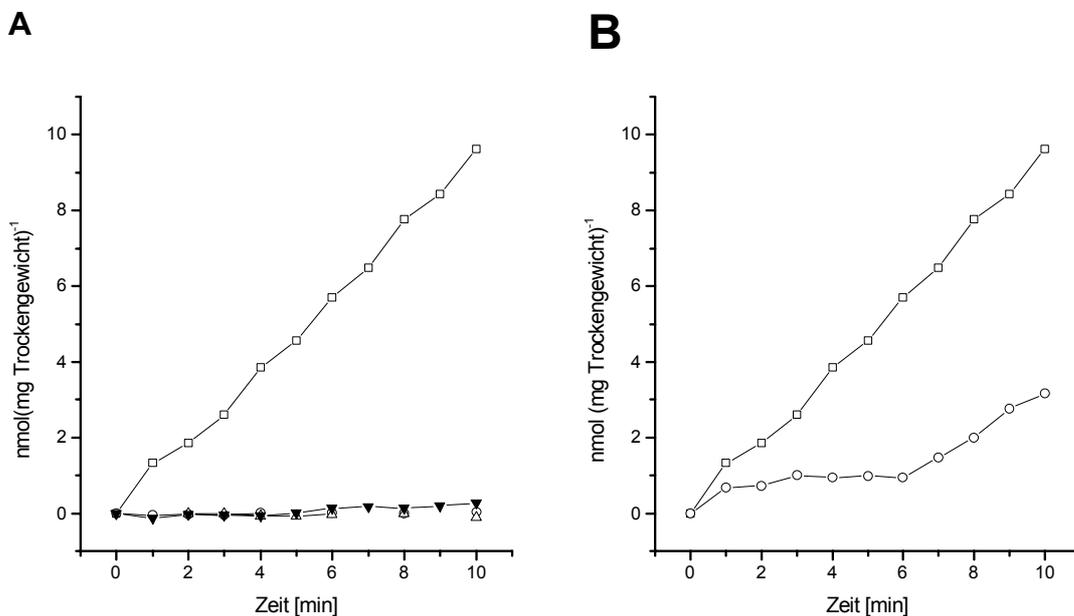


Abbildung 25: (A) Harnstoffaufnahmemessungen im Wildtyp (□), der ATCC::pDRIVE-urtA-Mutante (○), der RES167::pDRIVE-uusA-Mutante (Δ) und der RES167::pDRIVE-uusE-Mutante (▼) (B) Harnstoffaufnahmemessungen im Wildtyp mit 4µM Harnstoff (□) und 4µM Harnstoff kompetitiert mit 40µM Harnstoff (○).

Da dieses Aufnahmesystem, wie schon oben erwähnt, Ähnlichkeiten zu anderen Transporter aufweist (Urt in Cyanobakterien, LIV in *E. coli*, Bra in *P. aeruginosa* und Fmd in *M. methylotrophus*) wurden verschiedener Substrate zur Konkurrenz eingesetzt. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht über die Substrate der einzelnen Transporter.

Tabelle 18: Übersicht über die Transporter Urt, Fmd, LIV und Bra und die von Ihnen transportierten Substrate

Transporter	Substrate
Urt	Harnstoff
Fmd	Harnstoff, Formamid, Acetamid, Propionamid, Butyramid
LIV	Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Threonin, Serin
Bra	Glutamat, Histidin, Leucin, Arginin, γ -Aminobuttersäure

In einem Kontrollexperiment wurde die Harnstoffaufnahme durch Zugabe der 10-fachen Menge nicht-radioaktiven Harnstoffs, wie erwartet, scheinbar um 90% gesenkt (Abb. 25 B). Zugabe der 10-fachen Konzentration von Ammonium, Formamid, γ -Amino-Buttersäure, L-Glutamat, L-Glutamin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Alanin, L-Threonin und L-Valin zeigte keinen Einfluß auf die Harnstoffaufnahme. In weiteren Experimenten wurde die Aufnahme von L-Arginin (50 und 500 μ M Endkonzentration), L-Serin (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 500 μ M Endkonzentration) und L-Leucin (50 und 500 μ M Endkonzentration) im Wildtyp und der *urtA* bzw. *urtC*-Mutante untersucht. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten festgestellt werden. Die untersuchten Substanzen stellen also keine Substrate für diesen Transporter dar.

Ruth Siewe und Lars Nolden konnten während ihrer Arbeit zeigen, daß die Aktivität des Harnstofftransporters von einer intakten Urease abhängig ist (Siewe, 1998; Nolden, 2001c). Sobald eine Untereinheit der Urease deletiert wurde, war auch keine Harnstoffaufnahme mehr zu messen. Wahrscheinlich steht also die Urease in Wechselwirkung mit dem Transporter und ermöglicht so die Harnstoffaufnahme. Es stellte sich daher die Frage, wie die Urease reagiert, wenn Untereinheiten des Transporters zerstört sind. Urease-Aktivitätsmessungen im Wildtyp und den drei

Insertionsmutanten zeigte keine Änderungen der Aktivität in den Mutanten (*urtA*-Mutante: $0,24 \pm 0,1$ U/min; *urtC*-Mutante: $0,48 \pm 0,12$ U/min, *urtE*-Mutante: $0,25 \pm 0,07$ U/min) im Vergleich zum Wildtyp ($0,32 \pm 0,13$ U/min). Die Urease-Aktivität wird also unabhängig von der Funktion der Transporter reguliert.

Eine andere Möglichkeit der Regulation der Transportaktivität konnte für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden (Jahns, 1992). Hier wurden Expression und Aktivität des Harnstofftransporters durch Zugabe von externem Ammonium gehemmt; vermutlich wird die Regulation über den internen Glutaminspiegel gesteuert. In *C. glutamicum* blieb die Harnstoff-Transportrate trotz Zugabe verschiedenen Ammonium-Konzentrationen unbeeinträchtigt. Es liegt also keine Regulation des Transportsystems durch Ammonium bzw. der internen Glutamin-Konzentration vor.

Das *urt*-cluster besteht aus fünf Genen, *urtA* kodiert für das Bindeprotein, *urtB* und *urtC* für die Permease bzw. *urtD* und *urtE* für die ATPase. Da sowohl eine Mutation im Bindeprotein, in einer der Permeaseuntereinheiten als auch in einer der beiden ATPase-Untereinheiten zu einem Verlust der Aufnahme führten, handelt es sich bei dem Harnstofftransporter um einen ATP-abhängigen ABC-Transporter. Dieses steht im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen, in denen das Harnstoffaufnahme-system als sekundärer Transporter charakterisiert worden ist. Bei Aufnahmemessungen konnte dort eine Abhängigkeit der Transportrate von dem Protonophoren CCCP (Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon) und Vanamycin gezeigt werden (Siewe *et al.*; 1998). Die Zugabe dieser Entkoppler bewirkt den Zusammenbruch des Membranpotentials. Als Folge können mit Protonen oder anderen Ionen gekoppelte Aufnahmesysteme ihre Substrate nicht mehr transportieren. Da diese Beobachtung zunächst nicht mit einem ABC-Transporter in Einklang zu bringen ist, wurden die Experimente mit CCCP wiederholt. Hierzu wurden Zellen mit $4 \mu\text{M}$ Harnstoff und $0, 5$ bzw. $50 \mu\text{M}$ CCCP versetzt. Die Aufnahme wurde anschließend über einen Zeitraum von 5 min verfolgt. Dabei sank die Aufnahmerate von $0,9 \pm 0,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ (kein CCCP) auf $0,66 \pm 0,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ ($5 \mu\text{M}$ CCCP) und $0,23 \pm 0,06 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ ($50 \mu\text{M}$ CCCP) (Abb. 27A). Nachdem ein eindeutiger Effekt von CCCP auf das Harnstoffaufnahme-system beobachtet werden konnte, mußte nun überprüft werden, ob dieser Effekt auf eine Beeinflussung des intrazellulären ATP-Pools zurückzuführen ist. Bisher wurde gezeigt, daß der intrazelluläre ATP-Pool in *C. glutamicum* nach Zusammenbruch des

III. Ergebnisse

Membranpotentials zunächst nicht betroffen ist, so daß ATP-abhängig Transport-systeme noch ungehindert funktionieren können (Siewe *et al.*, 1998). Innerhalb dieser Arbeit wurde daher eine ATP-Pool Messung vorgenommen. Dazu wurde die ATP-Konzentration aus Zellen, die mit 0 μM , 5 μM bzw. 50 μM CCCP versetzt worden waren, durch das Luciferin/Luciferase-Testverfahren am Luminomat über einen Zeitraum von einer Stunde bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 gezeigt. Wurde entweder kein CCCP oder 5 μM CCCP zugegeben, nahm der ATP-Pool nur langsam von 4,9 bzw. 4,6 mM auf 2,8 bzw. 3,3 mM ab. Eine Zugabe von 50 μM CCCP bewirkte einen schnellen Zusammenbruch des ATP-Pools schon innerhalb von 10 Minuten nach der Zugabe (4,9 mM vor CCCP-Zugabe; 2,5 mM nach 10 min und 0,6 mM nach 60 min).

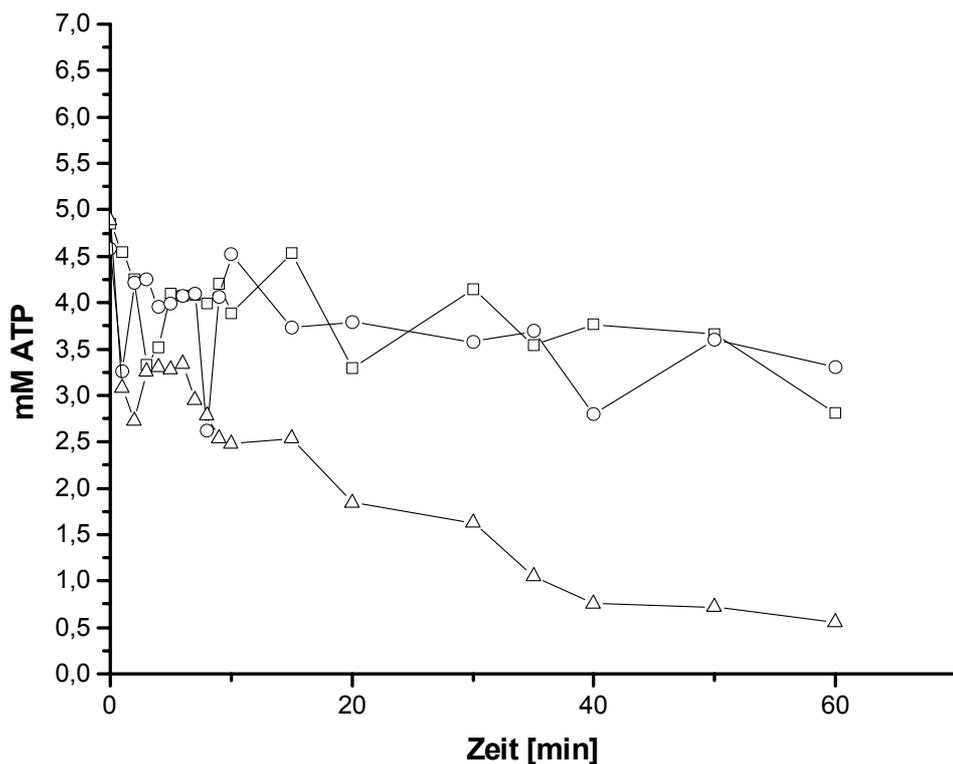


Abbildung 26: ATP-Aufnahmemessungen im Wildtyp ATCC13032 nach Zugabe von 0 (\square), 5 (\circ) und 50 μM (Δ) CCCP

III. Ergebnisse

Da der ATP-Pool bei Zugabe von 50 μM CCCP nicht mehr stabil ist, büßen auch ABC-Transporter unter hohen CCCP-Konzentrationen im Medium ihre Transportkapazität ein. Folglich läßt sich die gehemmte Transportrate nach Zugabe von 50 μM CCCP tatsächlich eine Verminderung der ATP-Konzentration zurückführen, die reduzierte Transportgeschwindigkeit nach Zugabe von 5 μM CCCP jedoch nicht.

Zur Klärung, ob diese Beobachtung spezifisch für den Harnstofftransporter ist, oder ob sich möglicherweise auch andere ABC-Transporter so verhalten, wurde die Aufnahme von Glutamat über den ABC-Transporter *gluABCD* unter Zugabe von CCCP (0 μM , 5 μM und 50 μM) getestet. Im Kontrollexperiment ohne CCCP wurde eine Aufnahmerate von 1,3 $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ gemessen. Diese änderte sich bei Zugabe von 5 μM CCCP nur geringfügig auf 1,2 $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$, sank bei Einsatz von 50 μM CCCP jedoch drastisch um 46% auf 0,7 $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ (Abb. 27B). Beide Transporter zeigten eine

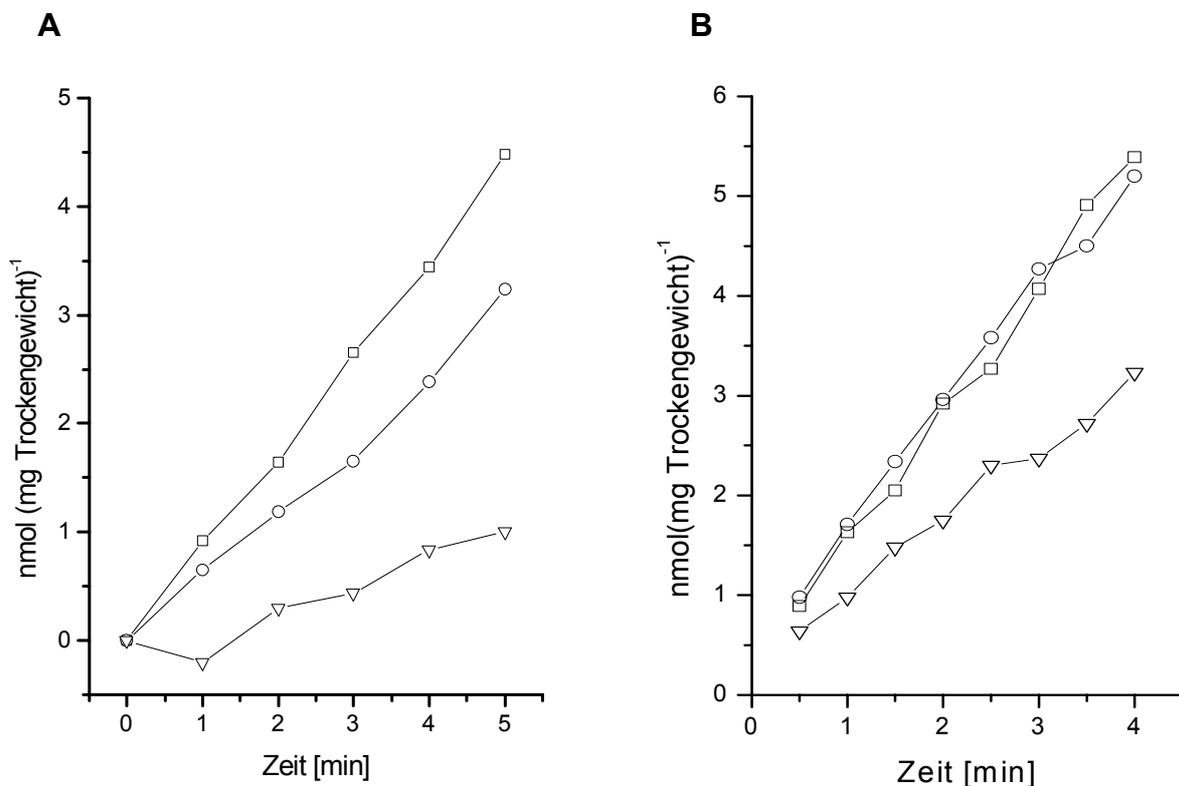


Abbildung 27: Aufnahmemessungen des Harnstofftransporters (A) und des Glutamattransporters (B) nach Zugabe von 0 (□), 5 (o) und 50 μM (Δ) CCCP

III. Ergebnisse

verminderte Aufnahme nach Zugabe von 50 μM CCCP. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der starken Abnahme des ATP-Pools unter diesen Bedingungen. Bei 5 μM CCCP im Ansatz wurde der Glutamattransporter kaum beeinflusst, während der Harnstofftransporter seine Aufnahmeaktivität um 27% verminderte. Dieses Ergebnis könnte auf eine Empfindlichkeit des Systems bei Zusammenbruch des Membranpotentials unter Zugabe von CCCP zurückgeführt werden. Möglicherweise spielt auf die Änderung des internen pH-Wertes, die durch den unkontrollierten Einstrom der Protonen verursacht wird, eine Rolle.

IV. Diskussion

1. AmtR, ein globaler Regulator der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*

Bakterien sind häufig Umweltschwankungen ausgesetzt, so daß eine schnelle Adaptation an die jeweilige Situation erforderlich ist. Globale regulatorische Netzwerke ermöglichen eine optimale Anpassung der Microorganismen an die veränderten Umweltbedingungen z. B. an eine Stickstofflimitation. Verschiedene Mechanismen der Stickstoffkontrolle konnten schon für Modellorganismen wie *E. coli* oder *B. subtilis* entschlüsselt werden. Bisherige Untersuchungen der Stickstoffkontrolle von *C. glutamicum* lassen jedoch vermuten, daß sich die Stickstoffregulation in diesen Bakterien stark von der in *E. coli* bzw. *B. subtilis* unterscheidet (Burkovski, 2003b). So werden z.B. Stickstoff-regulierte Gene in *C. glutamicum* nicht wie in *E. coli* über ein 2-Komponentensystem, sondern durch das AmtR-Protein reguliert. AmtR gehört zur TetR-Familie und weist wie die anderen Mitglieder dieser Familie an der DNA-Bindestelle ein typisches Helix-Turn-Helix Motiv auf (Jacoby *et al.*, 2000). Zunächst konnte eine Bindung des Repressorproteins im Promotorbereich des *amt-soxA-ocd*-Operons und des *amtB-glnK-glnD*-Operons nachgewiesen werden (Jacoby *et al.*, 2000). Weitere Bindestellen befinden sich *upstream* von *glnA* (Glutaminsynthetase; Nolden *et al.*, 2001a), *gltBD* (GOGAT; Beckers *et al.*, 2001) und eines bisher unbekanntes ORFs (NCgl1099; Nolden, 2001c). Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des gesamten AmtR-Regulons. Zunächst wurde mit Hilfe von DNA-Microarrays und einer Bindemotivesuche im gesamten Genom von *C. glutamicum* mittels eines Hidden-Markov-Modells eine globale Analyse des AmtR-Regulons durchgeführt. Neben den bereits bekannten Genen des Stickstoffmetabolismus bzw. der Stickstoffkontrolle konnte noch für weitere Gene eine Abhängigkeit der Regulation von dem Repressor AmtR gezeigt werden. Größtenteils handelt es sich dabei um Gene, die für Aufnahmesysteme kodieren, z.B. *gluABCD* (kodiert für den Glutamattransporter), NCgl1915-NCgl1918 (putatives Oligopeptidaufnahmesystem), *urtABCDE* (kodiert für den Harnstofftransporter), *crnT* (Creatininpermease; Bendt *et al.*, 2004) sowie NCgl2302 (eine putative Permease). Ähnliche Änderungen des Transkriptionsmusters abhängig von der Stickstoffversorgung wurden auch in anderen Organismen beobachtet. So kodieren in *E. coli* 2/3 aller unter Stickstoffmangel regulierten Gene für Transporter

(Zimmer *et al.*, 2000). Durch die Aktivierung der Aufnahmesysteme versuchen die Bakterien dem Stickstoffmangel entgegenzuwirken, indem sie auch gering konzentrierte Stickstoffquellen im Medium über hochaffine Systeme aufnehmen. Neben den Transporter-kodierenden Genen konnten in *C. glutamicum* auch Gene, die für die metabolisierenden Enzyme kodieren, identifiziert werden. Dazu gehören neben *codA* (Creatinindeaminase) und NCgl2300 bzw. NCgl2301, die beide für Untereinheiten einer putativen Reduktase kodieren und mit NCgl2302 in einem Operon angeordnet sind, das *ureABCEFGD-cluster* (Urease). Es stehen also nicht nur die Transporter der jeweiligen N-Quelle, sondern auch die dazu gehörigen metabolisierenden Enzyme unter AmtR-Kontrolle.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse konnten durch einen bioinformatischen Ansatz bestätigt werden. Somit erweist sich AmtR als der globale Regulator der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*. Bekräftigt wurde diese Theorie durch Microarray-Experimente. Bei dem Vergleich der Transkriptionsmuster des MJ6-18-Stammes unter Stickstoffhunger und unter Stickstoffüberschuß zeigten nur wenige Gene unter den limitierenden Bedingungen eine höhere Expression. Außerdem wiesen nur vier dieser Gene einen Bezug zum Stickstoffmetabolismus auf. Durch weitere Untersuchungen des Expressionsmusters dieser Gene durch Northern Hybridisierungen und *real-time* PCR könnte eine Stickstoff-abhängige Regulation nachgewiesen und eine mögliche Beteiligung von AmtR an dieser untersucht werden.

Eine mögliche Funktion von AmtR als Aktivator, wie es für TnrA in *B. subtilis* beschrieben worden ist (Lewis *et al.*, 1997), konnte durch die DNA-Microarrays nicht gezeigt werden. Es wurden keine Gene festgestellt, die unter ausreichender Stickstoffversorgung im Wildtyp höher exprimiert wurden als in der Mutante.

In weiteren Microarray-Experimenten konnte ausgeschlossen werden, daß die Deletion des *amtR*-Gens zu sekundären Effekten in *C. glutamicum* führt. So wird im Wildtyp und im MJ6-18-Stamm unter Stickstofflimitierung die Transkription von Genen eingeschränkt, deren Produkte an Transkriptions- und Translationsprozessen beteiligt sind. Auf diese Weise wird die Proteinbiosynthese und das Wachstum der Bakterienkultur gehemmt. Diese Reaktion ist daher ein Adaptationsmechanismus auf die Stickstoff-limitierenden Bedingungen und steht möglicherweise, wie für *E. coli* beschrieben, in Verbindung mit der *stringent response* (Wehmeier *et al.*, 2001). Im

MJ6-18-Stamm ist dieses Phänomen unter Stickstoffüberschußbedingungen nicht zu beobachten und somit nicht auf die Deletion des *amtR*-Gens zurückzuführen.

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten wurden Gene, die für glykolytische Enzyme kodierenden, z.B. *gap* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) und *eno* (Enolase), im Wildtyp unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen reprimiert. Vorherigen Beobachtungen zeigten jedoch unter Stickstofflimitation eine stärkere Zellatmung bzw. vermehrte Expression von einigen Glykolyse-Genen (*gap* und *fdx*; Schmid *et al.*, 2000). Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse gibt es derzeit nicht, jedoch könnten Microarray-Artefakte eine mögliche Ursache sein. Gegebenenfalls spielt aber auch die Behandlung der Zellen während des Wachstums eine Rolle. So konnten bei Microarray-Analysen von RNA aus Zellen, die im Fermenter angezogen worden waren, eine vermehrte Expression der Gene des Kohlenstoffmetabolismus beobachtet werden (persönliche Mitteilung, Maike Silberbach). Außerdem konnte die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase innerhalb der 2-D-Gel Analyse unter Stickstoffüberschuß im Wildtyp aber nicht in der Δ *amtR*-Mutante gefunden werden. Dieser Befund könnte auch auf eine Regulation der GAPDH durch Modifizierung zurückzuführen sein. Unter diesen Umständen wären die Proteinspots im Wildtyp und der Δ *amtR*-Mutante an zwei verschiedenen Stellen zu finden. Eine Klärung dieser Frage könnte durch eine detaillierte Proteomanalyse beider Stämme erreicht werden. Sollte sich eine Modifikation der GAPDH in der Mutante bestätigen, wäre dies ein Indiz für die Verbindung der Stickstoffregulation mit dem Kohlenstoffmetabolismus (siehe unten).

Generell wiesen die Expressionsänderungen der regulierten Gene bei den Microarray-Experimenten nur geringe Faktoren auf. Im Allgemeinen sind die Ergebnisse bei Microarray-Experimenten im Vergleich zu anderen quantitativen Methoden (z. B. *real-time* PCR oder Reporter-Gen-Assays) ungefähr um einen Faktor von 2-10 herabgesetzt (Conway & Schoolnik, 2003), dennoch lassen sich in diesem Fall die geringen Faktoren teilweise auch auf eine schlechte Qualität der Microarrays zurückführen. So zeigten die Spots auf einigen Glasslides verschiedene Größen und waren sogar teilweise ineinander verlaufen. Durch eine Einzelauswertung konnten die meisten Fehler aufgedeckt und entfernt werden. Eine Konsequenz waren jedoch hohe Standardabweichungen und eine zu geringe Anzahl als Stickstoff-regulierte erkannter Gene. Dies gilt vor allem für das Experiment, in dem die Wildtyp-RNA

isoliert unter Stickstoffüberschußbedingungen mit Wildtyp-RNA isoliert unter Stickstoffmangel miteinander verglichen wurde.

Aufgrund der hohen möglichen Fehlerquellen und der Tatsache, daß die Faktoren der Microarray-Experimente sehr gering ausfielen, wurden zur Ergänzung Northern Hybridisierungen bzw. *real-time* PCR-Experimente durchgeführt. Zuvor wurden alle Gene, die innerhalb eines *clusters* angeordnet sind, auf ein gemeinsames Transkript hin untersucht. In allen Fällen konnte eine Operonstruktur bestätigt werden. Durch diese Operonstruktur ist eine schnelle, gut regulierbare Transkription der Gene der verschiedenen Untereinheiten eines Enzyms oder Transporters gewährleistet. In weiteren Experimenten wurden die Gene *ureA*, *gltB*, *urtA*, *amt*, *amtB*, *gluA*, NCgl2300 und NCgl1915 stellvertretend für das jeweilige gesamte Operon *ureABCEFGD*, *gltBD*, *urtABCDE*, *amt-soxA-ocd*, *amtB-glnK-glnD*, *gluABCD*, NCgl2300-2302 und NCgl1915-1918 untersucht.

Generell lassen sich die Werte der *real-time* PCR und der Northern Hybridisierungen gut miteinander vergleichen. Die Faktoren der Expressionsänderungen der Gene *codA*, *ureA*, NCgl1100, *gluA*, NCgl1915 und *glnA* sind ähnlich, während sich die Faktoren der Expressionsänderungen von *cmT*, *urtA*, NCgl1099 und *amtB* höchstens um eine Faktor von 3 unterscheiden. Die Muster der RNA-Regulation dieser Gene sind jedoch gut vergleichbar. Die Faktoren der Gene *gltB* und *amt*, die innerhalb der Northern Hybridisierungen erhalten wurden, fallen viel geringer aus als die Faktoren der *real-time* PCR. Vermutlich ist hier eine schlechte Bindungsaffinität der Sonden, die für die Northern Hybridisierungen eingesetzt wurden, verantwortlich. Die Ergebnisse der *real-time* PCR sind im Vergleich zu denen der Northern Hybridisierungen verlässlicher, da die Effizienz der Primer für die *real-time* Experimente zuvor bestimmt worden ist, während die Bindungsqualität der Slot-Blot Sonden nicht getestet werden konnte.

Auffällig ist, daß die untersuchten Gene in ihrer Repression starke Unterschiede zeigen, obwohl ihre Regulation unter den untersuchten Bedingungen nur von AmtR gesteuert werden sollte. So werden manche Gene höchstens um einen Faktor 50 reguliert, während andere Gene einen Faktor über 100 bzw. bis zu einem Faktor 2000 aufweisen. Die Unterschiede sind wahrscheinlich nicht allein auf die Bindungsaffinität von AmtR an die jeweilige Sequenz zurückzuführen, sondern auch auf RNA-Abbau (Conway & Schoolnik, 2003), Promotorqualität bzw. anderen Regulationen neben der Stickstoffkontrolle (z.B. Katabolitenrepression).

Um eine Korrelation zwischen der Repressionstärke durch AmtR und der Bindesequenz zu untersuchen, mußte die AmtR-Binderegion besser definiert werden. Dazu wurde zunächst ein Hidden-Markov-Modell genutzt, in dem die schon bekannten Bindesequenzen vor *amt*, *amtB*, *glnA*, *gltB*, *crnT* und NCgl1099 (Tabelle 19) eingesetzt wurden (Jacoby *et al.*, 2000; Nolden *et al.*, 2001a; Beckers *et al.*, 2001, Nolden, 2001c). Interessanterweise konnte durch das Hidden Markov-Modell *upstream* der stärker regulierten Gene mehrere putative Bindemotive gefunden werden, während Gene, die schwächer reprimiert werden jeweils nur eine mögliche Bindesequenz besaßen.

Tabelle 19: Übersicht über die im Hidden Markov-Modell verwendeten Sequenzen

AmtR-regulierte Gen	Bindesequenz <i>upstream</i> der Gene
<i>amt</i>	TATTTTCTATTCCGCTATAGATAAAC
<i>amt</i>	TTTACCTATCGTTCTATAGATTTCT
<i>amtB</i>	TATTTTCTATAGTTTAAACAGGTAATT
<i>amtB</i>	CTCTAACTATAGACCTACAGAACTA
<i>glnA</i>	AAGTTTTGATAGATCGACAGGTAATG
<i>gltBD</i>	GTTTTCCTATAGGTTGATCGAAAGTA
<i>crnT</i>	TACTTTCTATAGATTGATAGAAATGT
NCgl1099	TATTTTCTATCAATCTATAGATACTA

Durch eine genaue Analyse mittels Gelshiftassays konnten die meisten putativen Bindesequenzen verifiziert werden. Daher scheint es tatsächlich eine Abhängigkeit der Repressionsstärke zumindest von der Häufigkeit des identifizierten Motivs *upstream* der betreffenden Gene zu geben. Weiterhin konnte aus den verifizierten Bindemotiven zunächst ein multiples Alignment erstellt werden. Aus der graphischen Darstellung des multiplen Alignments ließ sich dann folgende Konsensussequenz ableiten:

T t t C T A T n g n n c n A T A G a a A

Großbuchstaben: streng konservierte Basen
 Kleinbuchstaben: konservierte Basen
 Graue Kleinbuchstaben: keine Konservierung

Zwar konnte eine Beziehung zwischen der Anzahl an Bindemotiven *upstream* des jeweiligen Gens und der Repressionsstärke durch AmtR gezeigt werden, dennoch wiesen einige Gene mit gleicher Menge an Bindesequenzen Unterschiede in ihrer Regulation auf. Bei einem Vergleich der Bindemotive miteinander ließ sich feststellen, daß das Bindemotiv *upstream* des *glnA*-Gens am stärksten von der Konsensussequenz abweicht. Dies stimmt mit bisherigen Beobachtungen überein, bei denen eine Expression von *glnA* schon unter ausreichender Stickstoffversorgung nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 12; Nolden *et al.*, 2001a). Da die Glutaminsynthetase auch unter Stickstoffüberschußbedingungen aktiv sein muß, um eine Versorgung der Zelle mit Glutamin für die Zellwandsynthese zu gewährleisten, ist eine schwache Regulation des *glnA*-Gens sinnvoll. Andere Gene, wie z.B. *amt* und *amtB* (kodieren für die Ammonium-transporter Amt und AmtB) sowie das *urtABCDE*-Operon (kodiert für den Harnstofftransporter) und das *gltBD*-Operon (kodiert für die GOGAT) weisen zwei Bindestellen im Promotorbereich auf, von denen mindestens eines sehr stark konserviert ist. Daher unterliegen diese Gene einer strikten Repression, vermutlich um unnötigen Energieverlust - z.B. durch *futile cycling* oder nicht notwendiger Proteinsynthese - entgegenzuwirken. Neben der Anzahl der Bindemotive stromaufwärts des jeweiligen Gens ist also auch das Ausmaß der Konservierung des Bindemotivs für die Stärke der Repression des Gens durch AmtR von Bedeutung.

Die schwache Regulation der Operons *gluABCD* und NCgl1915-1918 läßt sich nicht allein durch die Art des Bindemotivs für AmtR erklären, da in beiden Fällen eine hoch konservierte AmtR-Bindesequenz im Promotorbereich vorliegt. Eine AmtR-abhängige Regulation ließ sich jedoch erst durch die Gelshift-Assays bestätigen. Vermutlich liegt hier eine Verbindung des Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus vor. Hinweise darauf geben Microarray-Experimente, in denen die Transkriptome von *C. glutamicum* mit Acetat und Glucose als jeweils einziger Kohlenstoffquelle miteinander verglichen wurden. Es zeigte sich eine geringere Expression des *gluABCD*-Operons und des NCgl1915-1918-Operons, aber auch des NCgl2300-2302-Operons sowie des *gdh*-Gens, wenn Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde (persönliche Mitteilung, Jörn Kalinowski; Gerstmeier, 2003) Zwar konnte durch die Promotoranalyse keine AmtR-Bindesequenz für das *gdh*-Gen bzw. das NCgl2300-2302-Operon gefunden werden, dennoch wurde eine AmtR-abhängige Regulation für NCgl2300-2302 mittels Northern Hybridisierungen gezeigt.

Durch eine *blast*-Suche mit diesen ORFs innerhalb der NCBI-Datenbank konnte eine Ähnlichkeit der DNA-Sequenz zu den Genen *vanA*, *vanB* und *vanK* gefunden werden, die für eine Vanillatdemethylase bzw. eine Protocatechuat-Permease kodieren. Durch weitere genetische und biochemische Charakterisierung des NCgl2300-2302-Operons könnten Informationen über eine Verbindung zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus gesammelt werden, da Vanillat eine C-Quelle für für andere Organismen, u.a. *Acinetobacter*, darstellt (Segura *et al.*, 1999). Für das *gdh*-Gen konnte weder durch Northern Hybridisierungen noch durch *real-time* PCR eine AmtR-abhängige Regulation gezeigt werden. Eine zweite Promotoranalyse, die erneut unter Verwendung eines Hidden Markov-Modells, diesmal jedoch mit den innerhalb dieser Arbeit bestätigten Daten, durchgeführt wurde, zeigte neben anderen putativen Bindemotiven auch eine mögliche Bindesequenz für AmtR *upstream* des *gdh*-Gens. Diese neuen Daten müssen aber zunächst noch durch Northern Hybridisierungen, *real-time*-PCR und Gelshift-Assays überprüft und verifiziert werden. Weiterhin sind Untersuchungen über die Abhängigkeit des *gdh*-Gens sowie des NCgl2300-2302-Operon, des *gluABCD*-Operons, und des NCgl1915-1918-Operons von der Kohlenstoffversorgung notwendig. Hierzu könnte zunächst durch Microarray-Experimente das Transkriptom unter Glucoseüberschuß und -mangel miteinander verglichen werden. Außerdem könnte man eine putative Regulation dieser Gene in Abhängigkeit von einem CcpA-ähnlichen Regulator untersuchen. Unter anderem wurde das CcpA Protein in *B. subtilis* als zentraler Regulator der Kohlenstoff-, Energie- und Stickstoffmetabolismen beschrieben. Weiterhin wurde vermutet, daß CcpA neben diesen Eigenschaften eine regulierende Rolle im anaeroben, fermentativen Wachstum spielt (Faires *et al.*, 1999). In *C. glutamicum* gibt es drei Gene, deren Sequenzen Ähnlichkeit zum CcpA-Gen aufweisen (persönliche Mitteilung Tim Müller). Diese drei CcpA-ähnlichen Gene müßten deletiert und die Auswirkung dieser Deletionen mit Hilfe von Microarrays, Northern Hybridisierungen bzw. *real-time* Experimenten überprüft werden. Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung dieser Gene mit dem Kohlenstoffmetabolismus ist die Tatsache, daß sich vor bzw. direkt hinter den jeweiligen Translationsstarts von *gdh*, *oppA* und *gluA* eine der Konsensussequenz des CRE Motivs (TGWNANCGNTNWCA) in *Bacillus subtilis* (Hueck & Hillen, 1995) ähnliche Sequenz befand. Das CRE-Motiv dient dem CcpA in *B. subtilis* als Bindestelle.

Die innerhalb dieser Arbeit erhaltenen Daten können zu einem neuen Model der Stickstoffkontrolle zusammengefaßt werden (Abb. 28). Auffällig ist, daß die Proteine ganzer Stoffwechselwege von der Aufnahme bis zum Metabolismus durch AmtR reguliert werden. Diese Ergebnisse konnten nicht nur durch Transkriptomanalysen erzielt, sondern auch auf Proteomebene durch 2D-PAGE Gelelektrophorese verifiziert werden. Hier konnten neben fünf der sieben Urease-Untereinheiten die Creatinindeaminase und eine Untereinheit der Nitritreduktase (NCgl2300) identifiziert werden. Da bisher keine Methode der 2D-Page Gelelektrophorese zur Auftrennung von Membran-gebundenen Proteine bekannt ist, konnten innerhalb der Proteomanalyse keine Untereinheiten der Transporter und keine Permeasen gefunden. Dennoch wurde das Ergebnis der Expressionsdaten auch auf Proteomebene bestätigt, da 40% der erwarteten Genprodukte (die Transporter ausgeschlossen) auf diese Weise gefunden und so ihre Regulation unter AmtR-Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

Der globale Repressor AmtR spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Antwort von *C. glutamicum* auf Stickstoff-limitierende Bedingungen. Da bisher kein weiterer Regulator innerhalb Stickstoffkontrolle unter reinem Stickstoffhunger bekannt ist, wäre es interessant zu untersuchen, ob die Zelle nicht nur auf N-Mangel, sondern auch mit anderen Regulationsmechanismen auf geringen Konzentrationen von Stickstoffquelle z.B. Glutamat, Glutamin, Allantoin, Ornithin und Harnstoff reagiert. Einen Hinweis auf AmtR unabhängige Regulationen nach Zugabe von geringen Konzentrationen von Stickstoffquellen gab die Reaktion von *C. glutamicum* auf 15 mM Harnstoff. Unter diesen Bedingungen wurde das *ure-cluster* transkribiert, während andere Gene die auch unter AmtR-Kontrolle stehen, nicht exprimiert wurden. Dies läßt tatsächlich auf eine AmtR-unabhängige und an geringe Harnstoffkonzentrationen angepaßte Regulation noch unbekannter Natur schließen.

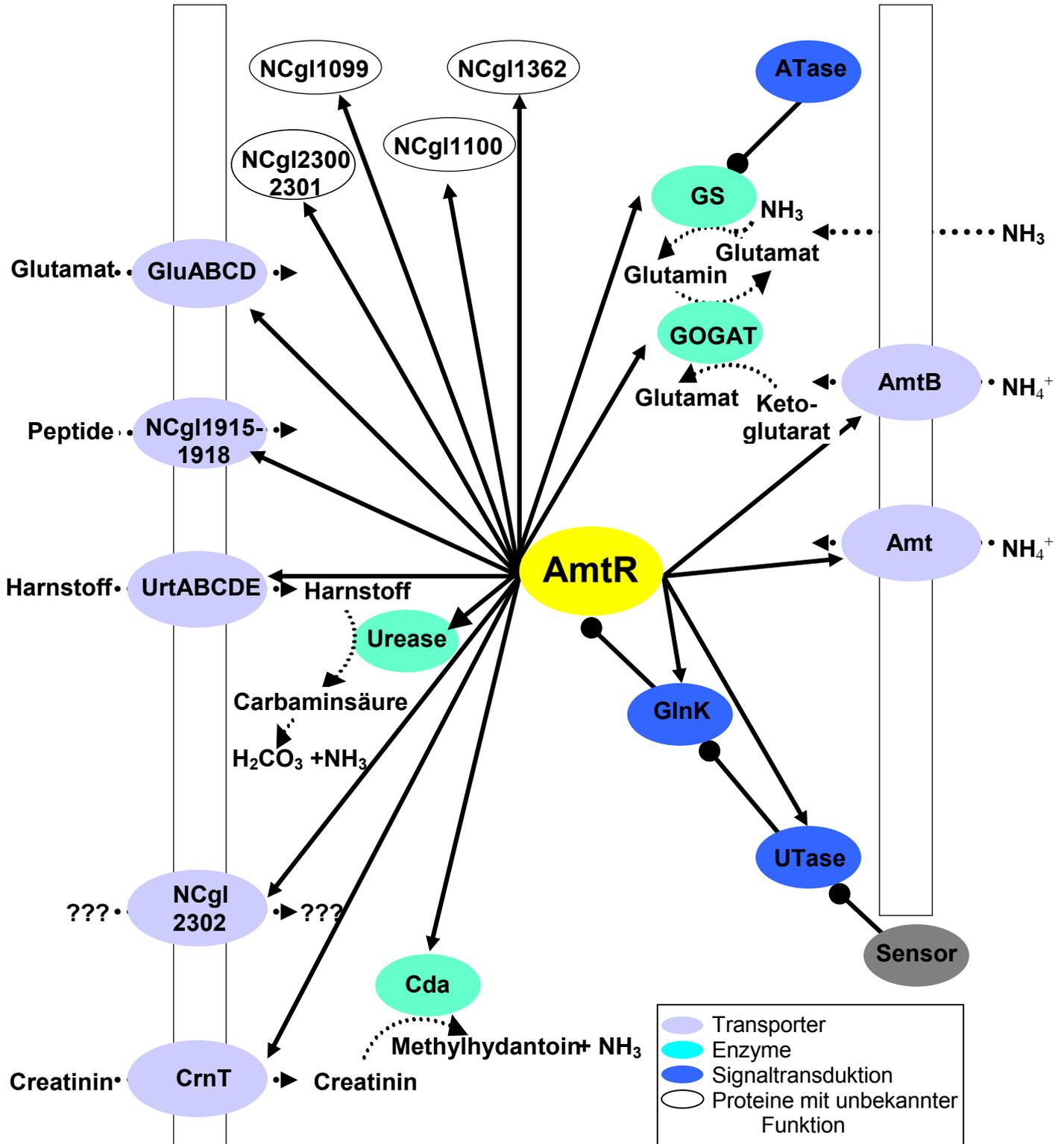


Abbildung 28: Neues Model der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*. Der AmtR-Repressor stellt den einzigen bisher bekannten Regulator dar und scheint global die Expression von Genen zu steuern, die relevant für die Stickstoff-Versorgung der Zelle sind. Ein bisher unbekannter Sensor mißt dabei den Stickstoffstatus der Zelle und gibt diese Information entweder direkt oder über weitere Proteine an die GlnD weiter. Diese modifiziert GlnK, das anschließend mit AmtR wechselwirkt. Unter N-Mangel gibt AmtR die Transkription der regulierten Gene frei. Die GS wird neben der Transkriptionsregulation auch noch über eine Modifikation durch die Adenylyltransferase (ATase) reguliert. Die Regulation der ATase ist bisher noch unbekannt.

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

2. Transport und Assimilation von Harnstoff

Regulation der Harnstoffaufnahme und -assimilation

Harnstoff ist eine weit verbreitete und gut verwertbare Stickstoffquelle. Zur Aufnahme und Metabolisierung dieses Substrats stehen *C. glutamicum* ein Harnstofftransporter, der zu Beginn dieser Arbeit nur biochemisch charakterisiert worden war, und die Urease zur Verfügung. Der genaue Regulationsmechanismus des Harnstofftransporters war bisher unbekannt. Es konnte nur eine erhöhte Aufnahmerate unter Stickstoffmangel festgestellt werden. Für die Urease konnte auf Expressionsebene keine Regulation in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung bzw. des AmtR-Proteins gezeigt werden, während auf Proteinebene eine erhöhte Ureaseaktivität unter Stickstofflimitierung nachgewiesen wurde (Nolden *et al.*, 2000). Zwar konnte diese Regulation der Ureaseaktivität schon für *Bacillus pasteurii*, *Morganella morganii*, *Sporosarcina urea* und *Anabeana variabilis* gezeigt werden (Mobley *et al.*, 1995), dennoch gibt es weitere Modelle der Regulation der Urease, die innerhalb dieser Arbeit untersucht werden sollten. Das zweite Modell sieht eine Regulation der Urease-Gene in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration im Medium vor (László *et al.*, 2000). Unter diesen Umständen könnte der Aktivator UreR die Regulation des *ure-clusters* übernehmen. Dies wurde schon für die Organismen *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* und *E. coli* gezeigt (Mobley *et al.*, 1995; Dattelbaum *et al.*, 2003). Eine weitere Möglichkeit ist die Abhängigkeit der Transkription der *ure*-Gene von der Stickstoffkontrolle. Bei *B. subtilis* und *Proteus mirabilis* wurde unter anderem eine Abhängigkeit der Regulation von GlnR und TnrA nachgewiesen (Wray *et al.*, 1997; Poore *et al.*, 2003).

Bisherige Ergebnisse zeigten keine Abhängigkeit des *ure-clusters* von der Stickstoffversorgung der Zelle bzw. vom globalen Regulator AmtR (Nolden *et al.*, 2000). Innerhalb dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Northern Hybridisierungen mit den Sonden gegen *ureA*, *urtA* bzw. *amtB* und Wildtyp-RNA isoliert unter N-Mangel sowie aus Medium mit einer Harnstoffkonzentration von 4 mM bzw. 15 mM gezeigt werden, daß das *ure*-Operon im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen schon bei einer Harnstoffkonzentration von 15 mM transkribiert wird. Daher steht die Transkription des *ure*-Operons neben der Regulation durch AmtR noch unter dem Einfluß eines weiteren Regulators. Dies weist auf eine Regulation ähnlich der in

B. subtilis hin, wo die *ure*-Gene neben TnrA und GlnR auch von CodY und Spo0H reguliert werden (Lewis *et al.*, 1997).

Ein Gen, welches stromaufwärts des *ure*-Operons liegt, weist Sequenzähnlichkeiten zum Regulator UreR auf und stellt neben AmtR einen putativen Regulator der *ure*-Gene dar. Eine Insertionsmutante des *ureR*-Gens wurde für Northern Hybridisierungen mit den Sonden *ureA*, *urtA* und *amtB* eingesetzt. Zwischen Wildtyp und Insertionsmutante zeigte sich kein Unterschied im Expressionsverhalten. Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene durch Messung der Urease-Aktivität bestätigt werden. Unter Stickstoffmangel wurde in der *ureR*-Insertionsmutante die gleiche Aktivität wie im Wildtyp gemessen. Somit kann UreR als Regulator des *ure*-Operons unter N-Mangel und bei 4 mM bzw. 15 mM Harnstoff als einzige Stickstoffquelle ausgeschlossen werden.

Das *urtABCDE*-Operon steht nur unter AmtR-Kontrolle, wird also bei einer Harnstoff-Konzentration von 15 mM nicht exprimiert. Wahrscheinlich wird der Harnstofftransporter jedoch noch auf Proteinebene durch eine Protein-Wechselwirkung mit der Urease reguliert. Zellen, bei denen das *ureC*- bzw. das *ureD*-Gen zerstört worden ist, zeigten neben dem Verlust der Urease-Aktivität auch keine Aufnahmeaktivität mehr (Siewe *et al.*, 1998; Nolden *et al.*, 2000). Eine intakte Urease ist also für die Aufnahme von Harnstoff essentiell, umgekehrt ist ein intakter Transporter für die Urease-Aktivität nicht von Bedeutung. Dies zeigten Urease-Aktivitätsmessungen im Wildtyp und in den Insertionsmutante für *urtA*, *urtC* und *urtE*. In allen Stämmen konnte unter Stickstoffmangel die gleiche Enzymaktivität gemessen werden. Dieser Regulationsmechanismus ist sinnvoll, da die Urease schon bei höheren Harnstoffkonzentrationen aktiv ist, um den Harnstoff spalten zu können, der Transporter ist aber nur notwendig, sobald die Diffusion über die Membran nicht mehr ausreicht. Sollte die Urease durch eine Mutation nicht mehr im Stande sein, die Spaltung von Harnstoff durchzuführen, ist die Aufnahme von Harnstoff nutzlos und würde nur zu einem Energieverlust führen.

Eine weitere Regulation auf Aktivitätsebene durch Anwesenheit von Ammonium, wie sie für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden konnte (Jahn, 1992), konnte durch Messung der Transportaktivität unter Anwesenheit verschiedener Ammoniumkonzentrationen ausgeschlossen werden.

Harnstofftransport in *C. glutamicum*

In früheren Arbeiten konnte der Harnstofftransporter in *C. glutamicum* biochemisch charakterisiert werden. Neben einer hohen Affinität zu Harnstoff zeigt dieser Transporter auch eine niedrigere Affinität zu Thioharnstoff und Hydroxyharnstoff (Siewe *et al.*, 1998). Zunächst lag die Vermutung nahe, daß es sich um einen sekundären Transporter handelt, da die Aufnahme von Harnstoff durch Zugabe von CCCP bzw. Valinomycin und Kalium gehemmt wurde. In dieser Arbeit konnte der Harnstofftransporter genetisch charakterisiert werden. Durch Insertionen in den Genen *urtA* (kodiert für das Bindeprotein), *urtC* (kodiert für eine Untereinheit der Permease) und *urtE* (kodiert für eine Untereinheit der ATPase) konnte nachgewiesen werden, daß das gesamte *urtABCDE*-Operon für den Harnstofftransporter kodiert. Die Struktur des Operons entspricht einem primären ABC-Transportsystem. Die Tatsache, daß selbst eine Insertion in den Gene der ATPase-Untereinheit einen Verlust der Aufnahme bei geringen Harnstoffkonzentrationen zur Folge hatte, bestätigte diese Annahme. Ein Transportmechanismus, wie er für die TRAP-Transporter vorgeschlagen wurde (Kelly & Thomas, 2001), konnte auch durch dieses Experiment ausgeschlossen werden. Bei diesen TRAP-Transportern handelt es sich um hochaffine Aufnahmesysteme, die ein Bindeprotein aber keine ATPase-Untereinheit besitzen und somit biochemisch gesehen Ähnlichkeit zu einem sekundären Transporter haben aber gleichzeitig in ihrer Genstruktur einem primären Transporter gleichen.

Aufnahmemessungen von Harnstoff und vergleichsweise von Glutamat, jeweils unter Zugabe des Entkopplers CCCP, sollten zeigen, ob der Effekt des CCCP auf die Aufnahme des Substrats spezifisch für den Harnstofftransporter ist oder auch für andere ABC-Transporter gilt. Auch beim Glutamattransporter *GluABCD* hatte die Zugabe von CCCP einen hemmenden Effekt auf die Aufnahmegeschwindigkeit des Substrats. Dieses Ergebnis wird wahrscheinlich durch eine Abnahme des ATP-Spiegels in der Zelle verursacht. Gleichzeitig spielen aber vermutlich auch Änderungen im pH-Wert innerhalb der Zelle, die durch den Zusammenbruch des Membranpotentials entstehen, eine Rolle.

Bei dem Harnstoff-Aufnahmesystem handelt es sich also um einen ABC-Transporter, der vermutlich empfindlich auf Veränderungen des internen pH-Wertes reagiert, so daß schon geringe Menge eines Entkopplers einen Einfluß auf die Aufnahmegeschwindigkeit von Harnstoff nehmen können.

V. Zusammenfassung

1) In dieser Arbeit wurde die Stickstoffkontrolle von *C. glutamicum* auf Expressionsebene untersucht. Hierzu wurden zwei globale Ansätze – eine Untersuchung der Änderungen im Transkriptom durch Microarrays und eine Promotoranalyse durch Verwendung eines Hidden Markov-Modells – eingesetzt und die Daten mit Hilfe von Northern Hybridisierungen und *real-time* PCRs verifiziert und quantifiziert. Neben den schon bekannten Ammonium-aufnehmenden und -assimilierenden Proteinen konnten verschiedene Transporter für Aminosäuren (Glutamat und Oligopeptide), Creatinin und Harnstoff sowie weitere metabolisierende Enzyme z.B. die Urease und die Creatinindeaminase und weitere unbekannte Enzyme und putative Transportsysteme (NCgl1099, NCgl1100, NCgl2300, NCgl2301, NCgl2302 und NCgl1362) gefunden werden. Weiterhin zeigten die Auswertung der Transkriptomanalysen, daß AmtR den globalen Regulator unter Stickstoffmangel darstellt. Die Beteiligung eines weiteren putativen Regulators UreR an der Regulation des *amtB*-Gens, dem *gltBD*-Operon, dem *ureABCEFGD* und dem *urtABCDE*-Operon kann unter Stickstoffmangelbedingungen sowie unter geringen Harnstoffkonzentrationen bis zu 15 mM ausgeschlossen werden.

Unterschiede der Expressionsstärke der einzelnen Gene unter Stickstoffüberschuß wiesen auf eine mögliche Korrelation zwischen Bindemotiv und Repression durch AmtR hin. Ein Vergleich der durch Quantifizierung der Northern Hybridisierungen und der *real-time* PCR erhaltenen Daten läßt tatsächlich einen Schluß auf ein *fine tuning* der Regulation einzelner Gene in Abhängigkeit des Konservierungsgrads des Bindemotivs zu. Generell müssen aber auch andere Einflüsse, wie RNA-Stabilität und Qualität des Promotorbereichs berücksichtigt werden. Die innerhalb dieser Arbeit erstellte AmtR-Konsensussequenz bildet, wie schon häufig für Bindemotive festgestellt werden konnte, ein Palindrom.

2) Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten die Gene des Harnstofftransporters, der zuvor schon biochemisch charakterisiert worden ist (Siewe *et al.*, 1998), identifiziert werden. Es handelt sich bei dem Aufnahmesystem nicht, wie vorherige Ergebnisse vermuten ließen, um einen sekundären Transporter, der Harnstoff durch den Symport mit Protonen aufnimmt, sondern um ein primäres Transportsystem. Dieses

Harnstoffsystem wird auf Expressionsebene durch AmtR kontrolliert. Auf Aktivitätsebene bestehen Hinweise einer Wechselwirkung zwischen der Urease und dem Harnstofftransporter. Eine Aktivitätsregulation über Ammonium, wie für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt, konnte ausgeschlossen werden.

VI. Literaturverzeichnis

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

Adams, M. A., Wagner, L. M., Graddis, T. J., Landick, R., Antonucci, T. K., Gibson, A. L. & Oxender, D. L. (1990). Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry.* **265 (20)**: 11436-11443.

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

Bendt, A. K., Burkovski, A., Schaffer, S., Bott, M., Farwick, M. & Hermann, T. (2003). Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics.* **3 (8)**: 1637-1646.

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

Börmann E. R., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **6**: 317-326.

Börmann_El Kholly, E. R., Eikmanns, B. J., Gutmann, M. & Sahm, H. (1993). Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2329-2331.

Burkovski, A., Weil, B., Krämer, R. (1996). Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 169-173.

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

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

Burkovski, A. (2004). Nitrogen metabolism and its regulation. In: Bott, M. & Eggeling L. (eds.) Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL., in press.

Conway, T. & Schoolnik, G. K. (2003). Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. Mol. Microbiol. **47 (4)**: 879-889.

Dattelbaum, J., D., Lockatell, V., C., Johnson, D., E. & Mobley, H., L., T. (2003). UreR, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. Infect. Immun. **71 (2)**: 1026-1030.

Eddy, S., R. (1998). Profile hidden Markov models. Bioinformatics **14 (9)**: 755-763.

Fisher, S. H., Rohrer, K. & Ferson, A. E. (1996). Role of CodY in regulation of the *Bacillus subtilis* hut operon. J. Bacteriol. **178**: 3779-3784.

Fisher, S.H. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence!. Mol. Microbiol. **32 (2)**: 223-232.

Gerstmeier, R. (2003). Regulation des Acetatstoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Ulm.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. **177**: 751-766.

Grant, S. N. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990). Different plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 4645-4649.

Heller, K. B., Lin, E. C. & Wilson T. H. (1980). Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **144**: 274-278.

Hueck, C. J. & Hillen W. (1995): Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria?. Mol. Microbiol. **15(3)**: 395-401

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**: 23-28.

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

Jahns, T. (1992). Regulation of urea uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie Van Leeuwenhoek. **62 (3)**: 173-179.

Jakoby, M., Krämer, R., Burkovski, A. (1999). Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. FEMS Microbiol. Lett. **173**: 303-310.

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

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

Kelly, D. J. & Thomas, G. H. (2001). The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. FEMS Microbiol. Rev. **25 (4)**: 405-424.

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

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

Krämer, R. & Lambert, C. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. Evidence for a primary active transport system. Eur J Biochem 194: 937-944.

Kronemeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Eggeling, L., Sahm, H. (1995). Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 177: 1152-1158.

László, P. G., Masayuki, I. & Yukawa, H. (2000). Structure of the urease operon of *Corynebacterium glutamicum*. DNA Sequence. 11 (5): 383-394.

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

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

Loos, A., Glanemann, C., Willis, L. B., O'Brian, X. M., Lessard, P. A., Gerstmeier, R., Guillouet, S. & Sinskey, A. J. (2001). Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2310-2318.

Lewis, V., Wray, J. R., Ferson, A. E. & Fisher, S. H. (1997). Expression of the *Bacillus subtilis ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. *J. Bacteriol.* **179 (17):** 5494-5501.

Ludin, A., Rickardson, A. & Thore, A. (1976). Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **75:** 611-620.

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

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

Mills, J., Wyborn, N. R., Greenwood, J. A., Williams, S. G. & Jones, C. J. (1998). Characterisation of a binding-protein-dependent, active transport system for short-chain amides and urea in the methylotrophic bacterium *Methylophilus methylotrophus*. *Eur. J. Biochem.* **251:**45-53

Mobley, H. L., Island, M. D. & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59:** 451-480

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

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

Nolden, L., Ngouto-Nkili, C.-E., Bendt, A. K., Krämer, R., Burkovski, A. (2001b). Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: The role of *glnK* and *glnD*. *Mol. Microbiol.* **42:** 1281-1295.

Nolden, L. (2001c). Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J., Völker, U., Hecker, M. (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.

Poore, C. A. & Mobley, H. L. T. (2003). Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. *Microbiology* **149**: 3383-3394.

Reitzer, L. J. (1996). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagines, L-alanine and D-alanin. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. (Neidhart, F. C., Curtiss, R. III., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E.; Eds.) American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.

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

Schimz, K. L., Rütten, B. & Tretter, M. (1981). Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on bioluminescence analyser. *Adv. Biotechnol.* **1**: 457-462.

Schmid, R., Uhlemann, E.-M., Nolden, L., Wersch, G., Hecker, R., Hermann, T., Marx, A., Burkovski, A. (2000). Response to nitrogen starvation in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 83-88.

Sebbane, F., Bury-Moné, S., Cailliau K., Browaeys-Poly, E., De Reuse H. & Simonet, M. (2002). The *Yersinia pseudotuberculosis* Yut protein, a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels and functionally interchangeable *in vitro* with *Helicobacter pylori* Urel protein. *Mol. Microbiol.* **45**: 1165-1174.

Segura, A., Bünz, P. V., D`Agenio, D. A. & Ornston, N. L. (1999). Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB*, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **181** (11): 3494-3504

Siewe, R. M., Weil, B. & Krämer, R. (1995). Glutamine uptake by a sodium dependent secondary transport system in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **164**: 98-103.

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

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

Siewe, R. M. (1998). Funktion und Regulation von Aufnahmesystemen für stickstoffhaltige Substrate bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation am Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich.

Slack, F. J., Serror, P., Joyce, E. & Sonenshein, A. L. (1995). A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide Permease operon. *Mol. Microbiol.* **15**: 689-702.

Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2002). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr. Microbiol.* **45**: 362-367.

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

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

Valladares, A., Montesinos, M. L., Herrero, A. & Flores, E. (2002). An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. Mol. Microbiol. **43**: 703-715.

Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., & Sachs, E. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science **287**: 482-485

Wehmeier, L., Brockmann-Gretza, O., Pisabarro, A., Tauch, A., Pühler, A., Martin, J. F. & Kalinowski J. (2001). A *Corynebacterium glutamicum* mutant with a defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p)ppGpp accumulation upon amino acid starvation. Microbiology **147**: 691-700.

Wray, L. V. Jr., Ferson, A. E. & Fisher, S. H. (1997). Expression of the *Bacillus subtilis* *ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA and Spo0H. J. Bacteriol. **179**: 5494-5501.

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

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A., Kustu, S. (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 14044-14045.

VII. Anhang

1. Stammkonstruktionen

Im folgenden sind die Konstruktionen der in Tabelle 1 aufgelisteten Stämme aufgeführt.

ATCC::pDRIVE-urtC

Dieser ATCC 13032-Stamm mit einer Insertion des pDRIVE-urtC-Plasmids ins *urtC*-Gen wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pDRIVE-urtC hergestellt und anschließend durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

RES167::pDRIVE-urtA

Dieser RES 167-Stamm mit einer Insertion des pDRIVE-urtA-Plasmids ins *urtA*-Gen wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pDRIVE-urtA hergestellt und anschließend durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

RES167::pDRIVE-urtE

Dieser RES 167-Stamm mit einer Insertion des pDRIVE-urtE-Plasmids ins *urtE*-Gen wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pDRIVE-urtA hergestellt und anschließend durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

RES167::pDRIVE-ureR

Dieser RES 167-Stamm mit einer Insertion des pDRIVE-ureR-Plasmids ins *ureR*-Gen wurde durch Elektroporation von ATCC 13032 mit Plasmid pDRIVE-ureR hergestellt und anschließend durch eine Kontroll-PCR verifiziert.

2. Plasmidkonstruktionen

Im folgenden sind die Konstruktionen der in Tabelle 2 aufgelisteten Plasmide aufgeführt.

pGEM3zamtR

Mit den Primern 5`-CG **GAA TTC** ATC GCT GAT GCC GTG GGA-3` und 5`-CG **GGA TCC** AGG GAG GCG TCG GCA AGC AT-3` wurde über PCR ein 0,4 kb-Fragment aus dem *amtR*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI/BamHI* behandelt und in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3z455

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** ACG TAG ATG TCA CCG ATC C-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** GCA TAC TGC AAA ACG AAC C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *codA*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* geschnitten und in *EcoRI/HindIII*-verdauten und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z465

Über PCR wurde mit den Primern 5`- GCG CGC **AAG CTT** GAC TCC CAT TTC AAC ATG C-3` und 5`- GCG CGC **GGA TCC** TTT TAC GAA CCT TGG ATG C-3` ein 0,5 kb-Fragment aus dem *ureR*-Gen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *HindIII/BamHI* geschnitten und in *HindIII/BamHI*-verdauten und dephosphorylierten pGEM3z-Vektor ligiert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z466

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** CGT CGC CGT AAA GAT CG-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** ATC AAA CGT TGC TTC AAC C-3` wurde über PCR ein 0,2 kb-Fragment aus dem *ureA*-Gen amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z470

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGT ACC** TGC ATT TAT CGG ATT CAG C-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** GCA CCG ATA TGC TCA CG-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *ureF*-Gen über PCR amplifiziert, mit *KpnI/XbaI* behandelt und in *KpnI/XbaI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z471

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGT ACC** ATG GCT GCA ATC ACT AAC G-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** CAA GTC CTG CAT CAT CAC C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *ureG*-Gen amplifiziert, mit *KpnI/XbaI* behandelt und in *KpnI/XbaI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z472

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GGT ACC** GCT GTG CTG GAA TAC TTG G-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** GTA CTT CCG CAA ATT CAC C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *ureD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *KpnI/XbaI* behandelt und in *KpnI/XbaI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z572

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAG CTC** TCA CCG AAA CAG AAG AAG C-3` und 5`-GCG CGC **CTG CAG** AAT GCC TGG AAC GTT AAG C-3` wurde ein 0,2 kb-Fragment aus dem *hkm*-Gen über PCR amplifiziert, mit *SacI/PstI* behandelt und in *SacI/PstI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z1497

Mit den Primern 5`- GCG CGC **AAG CTT** CAC CGT GAT CAA CAA ATG G-3` und 5`-GCG CGC **GAA TTC** GGC TTG GAC TTT GAA GAC G-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl0892-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3z1498

Mit den Primern 5`- GCG CGC **GAA TTC** GAT TAC CTG CGT GAA AAC G-3` und 5`-GCG CGC **CTG CAG** ATC GGA GGT CAC TTT GTC C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *urtA*-Gen über PCR amplifiziert, mit *PstI/HindIII* behandelt und in *PstI/HindIII*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z1499

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** GGA TCG GTC CTT CTA TTG G-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** TGC GAT TTA GGA ACA CAG C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *urtB*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/PstI* behandelt und in *EcoRI/PstI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z1500

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TAC TTT GCC ATC GTG AAC C-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** TGG AAA TAG GAC CAC ATG C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *urtC*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/PstI* behandelt und in *EcoRI/PstI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z1501

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** GAT GGC ACT GAG ATT CTG G-3` und 5`-GCG CGC **TCT AGA** ACC CCT CAC ACA AGA TCG-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *urtD*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/PstI* behandelt und in *EcoRI/PstI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3z1731

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAG CTC** ATC AGT GGG ACA CCC TAG C-3` und 5`-GCG CGC **CTG CAG** CGG GTT AGC TCG ATT GC-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl1099-Gen über PCR amplifiziert mit *SacI/PstI* behandelt und in *SacI/PstI*-geschnittenen, dephosphorylierten pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z1732

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** GTG GAT ATG TGG TCC ATG C-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** AGC TTC CCA AAG AAA CAG C-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl1100-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z2038

Mit den Primern 5`-GCG CGC **AAG CTT** GCA GAG GTA CAA GCA CTG G-3` und 5`-GCG CGC **GGA TCC** CCT GCA CAA CTT CTT TTG G-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl1874-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum T7-Promotor.

pGEM3z2040

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TCG AAA TCG ATG GAA AGG-3` und 5` GCG CGC **CTG CAG** TGC ACG ATC AGA CTT AGG G-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *gluA*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/PstI* behandelt und in *EcoRI/PstI*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z2092

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** GCA ACA CCA ACG AAG TAG G-3` und 5`-GCG CGC **CTG CAG** GGT GTA GTC CGC GTT AGG-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl1915-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/PstI* behandelt und in *EcoRI/PstI*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

.

pGEM3z2203

Mit den Primern 5`-GCG CGC **GAA TTC** TTC ATG ACC GAG CTA CAC C-3` und 5`-GCG CGC **AAG CTT** GAG TTG GCA CAA GGA AGA GC-3` wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem *gdh*-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3`-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z2603

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GAA TTC** TCT TTG GTG CCA TAC TTG G-3' und 5'-GCG CGC **AAG CTT** GTT TCG CAA TCA TCT GAG G-3' wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl1362-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z3083

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GAA TTC** TGC ACT ACC CAA CTT GAC C-3' und 5'-GCG CGC **CTG CAG** CAC ACG AGT TAA CCC AAG G-3' wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem NCgl2253-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/PstI* behandelt und in *EcoRI/PstI*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z3086

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GAA TTC** ACA GCA AGA TGC TCT TTG G-3' und 5'-GCG CGC **AAG CTT** GAG GGC AAT GAA GTC AAG C-3' wurde ein 0,2 kb-Fragment aus dem NCgl2252-Gen über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pGEM3z3238

Mit den Primern 5'-GCG CGC **GAA TTC** CGC CCT CTA CAT GTT TGG-3' und 5'-GCG CGC **AAG CTT** CAG CAT CCA CCA TCA CG-3' wurde ein 0,5 kb-Fragment aus dem ORF3238 (Degussa-Annotation) über PCR amplifiziert, mit *EcoRI/HindIII* behandelt und in *EcoRI/HindIII*-geschnittenen pGEM3z-Vektor kloniert. Das 3'-Ende zeigt zum SP6-Promotor.

pRIVE-urtA

Mit den Primern 5'-AGC AAC ACC GCA GCT TCC-3' und 5'-GCA GCG GTG GTC TTG GC-3' wurde über PCR ein 1,1 kb-Fragment innerhalb des *urtA*-Gens amplifiziert und in den pDRIVE-Vektor kloniert.

PDRIVE-urtC

Mit den Primern 5`-TGC GGT AGG GCT GTG CGC-3` und 5`-CCA CCC AGC CCA GCA CC-3` wurde über PCR ein 0,8 kb-Fragment innerhalb des *urtC*-Gens amplifiziert und in den pDRIVE-Vektor kloniert.

PDRIVE-urtE

Mit den Primern 5`-ATT TGT GTG CAG GTT ATG GC-3` und 5`-GCG CCT TGT CCC GAT TCC-3` wurde über PCR ein 0,6 kb-Fragment innerhalb des *urtE*-Gens amplifiziert und in den pDRIVE-Vektor kloniert.

PDRIVE-ureR

Mit den Primern 5`-TTA CGA ACC TTG GAT GCG CG-3` und 5`-CGA CAG GCC GAC TCC CAT T-3` wurde über PCR ein 0,5 kb-Fragment innerhalb des *ureR*-Gens amplifiziert und in den pDRIVE-Vektor kloniert.

Lebenslauf

- 18.06.1976 Geboren in Köln
- 1982-1986 Besuch der Donatus-Grundschule in Erfstadt
- 1986-1995 Besuch des Viller-Gymnasiums in Erfstadt, Abschluß:
Abitur
- 1992-1993 Besuch der Western High School, Russiaville, IN, USA
- 1995-1998 Diplomstudiengang Biologie an der Universität zu Köln,
Abschluß: Vordiplom
- 1998-2001 Diplomstudiengang Biologie an der Universität zu Köln,
Abschluß: Diplom; Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof.
Dr. R. Krämer; Thema: "*Stickstoffkontrolle in Corynebakterien*".
- 2001-2004 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in
der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer. Thema: "AmtR- ein
globaler Repressor der Stickstoffkontrolle in *Corynebacterium
glutanium*".

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Krämer für die Überlassung eines interessanten Arbeitsthemas, sowie seine stete menschliche und fachliche Unterstützung.

Frau Prof. Dr. K. Schnetz danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Mike Farwick danke ich für die Möglichkeit der Durchführung von Microarray-Experimenten und für den ein oder anderen Biergarten- bzw. Kneipenbesuch. Gleichmaßen gilt dieser Dank auch Jennifer Brehme, die uns durch ihr Engagement im und außerhalb des Labors sehr behilflich war.

Herrn Prof. Dr. H. Bothe danke ich für die Ermöglichung und Dr. Ulrich Hildebrandt für die Unterstützung bei der Durchführung der *real-time* PCR Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andreas Burkovski für die kontinuierliche gute Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft. Natürlich möchte ich mich auch beim ihm für das anstrengende Korrekturlesen bedanken. Ich weiß, es war manchmal nicht einfach!

Danke Maike, für deine aufmunternden Worte, wenn keiner an mich glaubte, und Julia, für nette Ballspiele am Samstagnachmittag. Für eine tolle Zeit, fruchtbare Diskussionen und viel Spaß bei der Arbeit danke ich auch Lars, Anja, Britta, Tim, Alja, Eva und Hedda. Insbesondere bedanke ich mich auch bei Anne für eine Zeit voll Höhen und Tiefen im LL-Labor. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das ein oder andere Stück Kuchen bedanke ich mich auch ganz herzlich bei allen anderen Mitarbeitern.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in meiner Studienwahl bestärkt und während meines Studiums finanziell und moralisch unterstützt haben. Meinem Vater danke ich auch für die vielen Mensa-Gänge und sein Korrekturlesen. Boris danke ich sehr für seine konstruktive Kritik an meiner Arbeit und die aufbauenden Worte nach erfolglosen Arbeitstagen!

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die

benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser

Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Bendt, A. K., Beckers, G., Silberbach, M., Wittmann, A. & Burkovski, A. (2004). Utilization of creatinine as an alterative nitrogen source in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. In press.

Datum: Köln, Mai 2004

Unterschrift:

