



Prof. Dr. Jörg Stülke

Email: [jstuelk@gwdg.de](mailto:jstuelk@gwdg.de)  
<http://wwwuser.gwdg.de/~genmibio/stuelke.html>

04.07.11

Ihr Zeichen: MBFST/DD/ml  
Kennziffer: 2779

Sehr geehrte Damen und Herren,

ich möchte die Gelegenheit nutzen und Ihnen für die Förderung meiner Arbeiten durch die Max-Buchner-Forschungstiftung zu danken. Bitte finden Sie in der Anlage den erbetenen Abschlussbericht.

Ich verbleibe mit freundlichen Grüßen als

Ihr Jörg Stülke

## Einleitung und Ziel

Ziel der Arbeit ist es, die Regulation von GltC durch RocG genauer zu analysieren und Erkenntnisse über die Funktionalisierung von RocG durch die Verfügbarkeit von Glycerol zu gewinnen. Hierzu wurden Varianten von RocG isoliert und untersucht, die nicht mehr oder permanent mit GltC interagieren. Da wir während der Arbeiten zeigen konnten, dass Protein-Protein-Interaktionen wichtig für die effiziente Organisation des Stoffwechsels sind, haben wir im zweiten Berichtsjahr den Schwerpunkt auf Interaktionen zwischen Enzymen des Citratzyklus, der zentralen Drehscheibe des Stoffwechsels, gelegt.

## Durchführung

Um RocG-Varianten zu finden, die nicht mehr mit GltC interagieren, wurde eine Random-Mutagenese durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, das die Expression von RocG unter Kontrolle eines starken Promotors ermöglicht. Mit diesem Plasmid wurde eine Random-Mutagenese mit Hilfe des Mutatorstammes XL1-red durchgeführt. Dieser Stamm wurde mit dem RocG-Expressionsplasmid transformiert und die Transformanten für einen Zeitraum von 48 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C wachsen gelassen, so dass Mutationen entstehen können. Um den Effekt des RocG-Mutantenproteins auf die GltC-Aktivität zu bestimmen, wurde der Indikatorstamm GP28, der eine *gltA-lacZ*-Fusion enthält, mit den entsprechenden Plasmidpools transformiert. Zur Identifizierung von RocG-Mutantenallelen, wurden die Transformanten auf XGal-Minimalmedium mit und ohne Glukose transferiert. Zellen die das Wildtyp-RocG enthalten bilden auf XGal-Glukose-Medium blaue Kolonien. Wird GltC durch RocG inhibiert, so entstehen auf XGal-Glukose-Medium weiße Kolonien. Ohne eine katalytisch aktive Glutamatdehydrogenase ist *Bacillus subtilis* nicht in der Lage, Arginin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwerten. Mit Hilfe des XGal-Minimalmediums ohne Glukose können daher RocG-Varianten isoliert werden, die katalytisch aktiv sind, aber nicht in der Lage sind, den Aktivator GltC zu inhibieren. Der Wildtyp bildet auf diesem

Medium weiÙe Kolonien. Im Gegensatz dazu, bilden Zellen, die monofunktionale RocG-Proteine exprimieren, blaue Kolonien.

Zum Nachweis von Interaktionen zwischen Enzymen des Citratzyklus wurden Varianten dieser Enzyme hergestellt, die einen C-terminalen Strep-Tag tragen, der eine leichte Aufreinigung ermöglicht. Zu Zellen, die diese Proteine exprimieren, wurde dann Formaldehyd als Quervernetzer gegeben, um die Interaktionen zu fixieren. Die Enzyme wurde dann mit ihren Interaktionspartnern aufgereinigt und die Partner wurden identifiziert. Darüber hinaus wurden die Wechselwirkungen zwischen den Enzymen des Citratzyklus im bakteriellen „Two-Hybrid“-System analysiert.

## Ergebnisse

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode konnten sowohl eine Reihe sogenannter RocG-„Superrepressoren“, die GltC konstitutiv inhibieren, als auch monofunktionale RocG-Allele isoliert werden, die lediglich enzymatisch aktiv sind und nicht mehr als Transkriptionsregulator agieren können. Die Sequenzierung der gefundenen RocG-Varianten hat ergeben, dass die veränderten Eigenschaften jeweils durch den Austausch einzelner Basenpaare hervorgerufen werden.

Die RocG-Superrepressorproteine ermöglichen nicht das Wachstum mit Arginin als einziger Kohlenstoffquelle. Die enzymatische Aktivität scheint daher durch die Mutation beeinflusst zu sein. Die Messung der enzymatischen Aktivität dieser RocG-Variante hat ergeben, dass die enzymatische Aktivität dieses Enzyms tatsächlich reduziert ist. Der  $K_M$ -Wert dieses Enzyms war drastisch erhöht.

Das monofunktionale RocG-Protein inhibierte unter allen untersuchten Bedingungen nicht die GltC-Aktivität. *Bacillus subtilis* ist in der Lage, mit dieser RocG-Variante mit Arginin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen. Diese RocG Variante ist demnach enzymatisch aktiv. Die Enzymaktivität und die Substrataffinität ähneln der des Wildtypproteins. Diese Mutation hat demnach das Triggerenzym RocG in ein einfaches, metabolisch aktives Enzym umgewandelt, das jedoch nicht mehr als Regulatorprotein wirken kann. Die Mutation beeinflusst also die inhibitorische Interaktion von RocG mit GltC, jedoch nicht die Enzymaktivität.

Um mehr über den Zusammenhang zwischen der Struktur und der Funktion von RocG herauszufinden, wurden die Kristallstruktur des Superrepressors

RocGE93K und der Glutamatdehydrogenase GudB bestimmt. Die Superrepressorvariante von RocG unterscheidet sich strukturell nicht von dem Wildtypprotein. Die Mutationen bei den anderen isolierten RocG-Varianten befinden sich in der Nähe des aktiven Zentrums. Im Gegensatz dazu befindet sich die Mutation bei der monofunktionalen RocG Variante nicht in der Nähe des aktiven Zentrums.

Die Daten zu den Interaktionen der Enzyme des Citratzyklus liegen publiziert vor (mit Erwähnung der Buchner-Stiftung in der Danksagung), daher wird hier auf eine Wiedergabe verzichtet und auf die beiliegende Publikation verwiesen.

## **Fazit und Ausblick**

Die Identifizierung und Charakterisierung der RocG-Varianten hat neue Erkenntnisse über die Regulation des Stoffwechselflusses an dem zentralen Kreuzungspunkt zwischen dem Kohlen- und Stickstoffstoffwechsel erbracht, die für die biotechnologische Forschung von wichtiger Bedeutung sind. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, welche enorme sowohl metabolische als auch regulatorische Bedeutung die Glutamatdehydrogenase RocG hat. Die Untersuchungen haben ergeben, dass diese beiden Funktionen von unterschiedlichen katalytischen Bereichen des Enzyms ausgeführt werden. RocG ist das erste Enzym was in dieser Richtung untersucht und charakterisiert worden ist.

Die durchgeführten Untersuchungen haben einen wichtigen Grundstein für die Untersuchung weiterer wichtiger Stoffwechselprozesse gelegt. In weiteren Experimenten soll ermittelt werden, wie RocG durch unterschiedliche Kohlenstoffquellen insbesondere durch Glycerin funktionalisiert wird.