Wirkstoffziele

Überlebenswichtig: Glutaminsynthetase-homologe Proteine in Streptomyceten

SERGII KRYSSENKO, WOLFGANG WOHLLEBEN

INTERFAKULTÄRES INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND INFektionsMEDIZIN
TÜBINGEN (IMIT), EXZELLENZCLUSTER – KONTROLLE VON MIKROORGANISMEN ZUR
BEKÄMPFUNG VON INFektionen (CMFI), UNIVERSITÄT TüBINGEN

Streptomycetes have to cope with fluctuating nitrogen conditions in soil. Key enzymes in nitrogen metabolism in streptomycetes are the two glutamine synthetases (GSs), GlnA and GlnII. We demonstrated that GlnA3 and GlnA4, proteins previously annotated as GSs, are involved in utilization and detoxification of polyamines and ethanolamine. Homologs of these enzymes are present in pathogenic Actinobacteria and are promising drug targets. We designed a novel strategy for development of anti-tubercular antibiotics based on the inhibition of GlnA3.

DOI: 10.1007/s12268-022-1685-x
© Die Autoren 2022

■ Streptomyceten sind Bodenbakterien, die unter variablen Nährstoffbedingungen leben und Stickstoff und Kohlenstoff aus zahlreichen Quellen nutzen. Die Gattung *Streptomyces* wurde 2016 von der VAAM zur „Mikrobe des Jahres“ gewählt. Sie spielt eine wichtige ökologische Rolle im Boden, etwa bei der Zersetzung von organischem Material. Streptomyceten sind außerdem von großer biotechnologischer Bedeutung als Produzenten von Sekundärmetaboliten, da viele dieser Verbindungen eine pharmazeutische Anwendung finden. Darüber hinaus dienen Streptomyceten aufgrund ihrer Verwandtschaft zu Mykobakterien und anderen pathogenen Aktinomyzeten auch als Modellorganismen zur Untersuchung der Besonderheiten des Stoffwechsels, die beim Infektionsgeschehen eine Rolle spielen. Die am besten untersuchte Spezies ist *Streptomyces coelicolor*, dessen Genetik und Biochemie seit mehr als vier Jahrzehnten analysiert wird.

S. coelicolor ist in der Lage, viele verschiedene Verbindungen als Stickstoffquelle zu nutzen, z. B. Aminosäuren, Peptide, Ammonium, Nitrat, Nitrit und Harnstoff [1]. Die bevorzugte anorganische Stickstoffquelle von Streptomyceten ist Ammonium, in das die meisten aufgenommenen Substanzen

umgewandelt werden. Bei hohen Stickstoffkonzentrationen katalysiert die Glutamatdehydrogenase (GDH) in einer NADPH-abhängigen Reaktion die Synthese von Glutamat aus Ammonium und 2-Oxyglutarat. Unter niedrigen Stickstoffkonzentrationen, wie sie normalerweise im Boden vorliegen, katalysieren Glutaminsynthetasen (GS) die Bildung von L-Glutamin aus L-Glutamat und Ammonium in einer ATP-abhängigen Reaktion. Das so synthetisierte Glutamin dient als wesentlicher Baustein in der Proteinbiosynthese sowie als wichtige Stickstoffquelle für biosynthetische Reaktionen in der Zelle. Glutamin kann von der Glutamatsynthase (GOGAT) genutzt werden, um zusammen mit 2-Oxyglutarat zwei Moleküle Glutamat zu synthetisieren (Abb. 1A, [8]).

GS-ähnliche Enzyme metabolisieren Polyamine und Ethanolamin

Um sich im Boden mit Stickstoff zu versorgen und zu überleben, nutzt *S. coelicolor* verschiedene alternative Stickstoffquellen, die schwer abbaubar sind. So kann *S. coelicolor* viele Polysaccharide verwerten, die im Boden als Bestandteile von abgestorbenen Pflanzen und Tieren vorkommen, beispielsweise Chitin [7]. Mehrere Abbauwege für diese

Substanzen wurden in *S. coelicolor* beschrieben.

Andere stickstoffhaltige Verbindungen, die in Folge der Zersetzung vom tierischen und pflanzlichen Material lokal im Boden auftreten, sind Polyamine, die häufige Bestandteile von pro- und eukaryotischen Zellen sind. Diese Substanzen erfüllen eine Reihe wichtiger zellulärer Funktionen insbesondere bei der Regulation der Transkription, der Reaktion auf oxidativen Stress, der Stabilisierung der DNA und dem Aufbau der Zellmembran [6]. Viele Bakterien können für die eigene Homöostase Polyamine bzw. das Monoamin Ethanolamin in niedrigen Konzentrationen synthetisieren oder aus der Umwelt aufnehmen. Doch da in vielen Böden die Stickstoffverfügbarkeit ein limitierender Faktor ist, haben Streptomyceten die Fähigkeit entwickelt, auf Polyamine und Monoamine als Stickstoffquelle zurückzugreifen, wie wir zeigen konnten [4].

Eine Besonderheit von *S. coelicolor* ist das Vorkommen zweier funktioneller Glutaminsynthetasen, GlnA und GlnII, die an der Glutaminbiosynthese und der Stickstoffassimilation beteiligt sind [9]. Im Genom von *S. coelicolor* und allen anderen bekannten Streptomyceten existieren mit *glnA2* (*sco2241*), *glnA3* (*sco6962*) und *glnA4* (*sco1613*) weitere drei Gene, die zwar GS-Genen signifikant ähneln (40–50 % Aminosäuren Sequenzähnlichkeit) [9], deren Genprodukte aber keine Glutaminsynthetaseaktivität aufweisen [10, 4]. Um die biochemische Aktivität dieser GS-ähnlichen Enzymen zu ermitteln, untersuchten wir *in vivo* das Wachstum von *glnA*-, *glnII*-, *glnA3*- und *glnA4*-Deletionsmutanten auf Minimalmedium in Anwesenheit verschiedener Polyamine als einziger Stickstoffquelle (Abb. 1B). Demnach ist GlnA3 für die Verwertung der Polyamine als Stickstoffquelle essenziell (Abb. 1B, [5]). Die gleichen Effekte beobachteten wir mit der *glnA4*-Mutante auf definiertem Medium mit Ethanolamin als einziger Stickstoffquelle [2].

Weitere Untersuchungen zur Schlüsselrolle von GlnA3 und GlnA4 für das Überle-

▲ **Abb. 1:** Rolle von Glu A3 im Polyamin- und Ethanolamin-Metabolismus **A**, Stickstoff-Assimilierung in *Streptomyces coelicolor* mit den identifizierten Polyamin- und Ethanolaminabbauwegen (Intermediate grau unterlegt) (modifiziert nach [3]). **B**, Phänotypische Analyse von *S. coelicolor*-Deletionsmutanten. Das Wachstum von *S. coelicolor* M145 sowie $\Delta glnA2$, $\Delta glnA3$ - und $\Delta glnA4$ -Mutanten wurde auf definiertem Evans-Agar, supplementiert mit Put – Putrescin, Cad – Cadaverin, Sm – Spermin, Sd – Spermidin, Glu – Glutamat, Gln – Glutamin, NH_4Cl – Ammonium und $NaNO_3$ – Natrium als einziger Stickstoffquelle getestet. *S. coelicolor* M145 kann Polyamine verwerten, die $\Delta glnA3$ -Mutante dagegen nicht [5].

ben von *S. coelicolor* unter getesteten Bedingungen deuten darauf hin, dass diese Enzyme den ersten Schritt des Polyamin- bzw. Ethanolamin-Abbauwegs darstellen. Mithilfe von bioinformatischen und transkriptionellen RT-PCR- und RNAseq-basierten Studien identifizierten wir weitere Enzyme, die an diesen Abbauwegen in *S. coelicolor* beteiligt sind (**Abb. 1A**, [4]).

GlnA3 und GlnA4 katalysieren Glutamylierungsreaktionen

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von GlnA3 und GlnA4 zu GS vermuteten wir, dass diese GlnA-ähnlichen Enzyme eine Reaktion ähn-

lich der GS-Reaktion katalysieren könnten (**Abb. 2A**). Da Glutaminsynthetasen Glutamat und Ammonium verknüpfen, war die Annahme, dass GlnA3 und GlnA4 Glutamat mit Polyamin bzw. Ethanolamin verknüpfen könnten. Daher reinigten wir GlnA3 und GlnA4 als His-Tag-Fusionsproteine auf und zeigten *in vitro*, dass GlnA3 eine Gamma-Glutampolyaminsynthetase ist (**Abb. 2B**), die den ersten Schritt des Polyaminabbauwegs in *S. coelicolor* katalysiert [5]. Diese Untersuchungen belegen außerdem, dass das für die Ethanolaminverwertung verantwortliche Enzym GlnA4 eine Gamma-Glutamylethanolamidsynthetase ist (**Abb. 2C**), die den

ersten Schritt des Ethanolaminabbauwegs bewerkstelligt [2].

GlnA3 detoxifiziert Polyamine

Im Boden sind die typischen Konzentrationen von Polyaminen gering (0,16–0,62 nmol/g) und für *S. coelicolor* nicht schädlich. Allerdings können diese Substanzen im Boden bei Zersetzung abgestorbener Pflanzen und Tieren in erhöhten Konzentrationen auftreten. Um unter hohen Polyaminmengen zu überleben, muss *S. coelicolor* diese Substanzen detoxifizieren. Um das nachzuweisen, testeten wir das Wachstum von *glnA*-, *glnII*-, *glnA3*- und *glnA4*-Deletionsmutanten in

Anwesenheit von Polyamin zusammen mit weiteren verschiedenen stickstoffhaltigen Substanzen. Dabei zeigte sich, dass *S. coelicolor* M145 in der Lage ist, in Anwesenheit hoher Konzentration von Polyaminen (Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin) zu wachsen. Dass dafür GlnA3 essenziell ist, zeigte das Verhalten der Δ glnA3-Mutante: Sie konnte in Anwesenheit unterschiedlicher Polyamine nicht überleben (**Abb. 3**).

GlnA4 ermöglicht die Ethanolamindetoxifizierung

Weitere Untersuchungen des Wachstums der *S. coelicolor*-Deletionsmutanten ergaben, dass die Anwesenheit von Ethanolamin im komplexen Medium das Wachstum der Δ glnA4-Mutante hemmt [2]. Ethanolamin ist als Bestandteil der bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Zellmembranen in Form von Phosphatidyl-Ethanolamin eine verbreitete Verbindung in der Natur [11]. Infolge der Zelllyse und Zersetzung der Zellmembranen toter Organismen können im Boden auch, wie bei Polyaminen, erhöhte Konzentrationen von Ethanolamin auftreten. In unseren phänotypischen Analysen war GlnA4 für das Überleben von *S. coelicolor* im ethanolaminhaltigen Medium essenziell, was die Funktion von GlnA4 für die Ethanolamindetoxifizierung belegt.

GS-ähnliche Enzyme erlauben Pathogenen das Überleben im Wirt

Zwar sind Polyaminabbauwege bereits in einigen Bakterien beschrieben worden, z. B. in den Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* [6]. Bisher war jedoch nichts über die Polyamin- und Ethanolaminverwertung in Aktinobakterien und *S. coelicolor* bekannt. Mit unseren *in silico*-Analysen von *glnA*-ähnlichen Genen in 24 aktinobakteriellen Genera wiesen wir das häufige Auftreten von GlnA3- und GlnA4-Orthologen nach, beispielsweise in *Nocardia spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Frankia spp.*, *Amiclatopsis spp.*, *Kitasatospora spp.*, *Saccharopolyspora spp.* und *Mycobacterium spp.* Während *glnA3* und *glnA4* in vielen aktinobakteriellen Genomen vorhanden sind, findet man diese Gene in Gram-negativen Bakterien nicht, was auf eine spezialisierte Funktion hindeutet [4].

Diese Enzyme sind am Überleben, der Kolonisierung und Vermehrung der Aktinobakterien in verschiedenen Lebensräumen beteiligt, wo Poly- und Monoamine

vorhanden sind. Außer im Boden, dem natürlichen Habitat von *S. coelicolor*, sind diese Substanzen auch in anderen ökologischen Nischen zu finden. So wurden Orthologe von GlnA3 in Pflanzenpathogenen wie *Streptomyces ipomoeae* und *Streptomyces scabies* gefunden, die erhöhten Polyaminkonzentrationen in faulenden Kartoffeln ausgesetzt sind [12].

Von besonderer Bedeutung ist GlnA3 für *Mycobacterium tuberculosis*. Der Lebensraum dieses Humanpathogens im menschlichen Körper sind Makrophagen. Diese reagieren auf die Infektion durch *M. tuberculosis* mit der Synthese von Polyaminen, vor allem Spermin. *M. tuberculosis* kann diesen Abwehrmechanismus überwinden und in Makrophagen persistieren, indem es die polyamindetoxifizierende Wirkung von GlnA3 nutzt.

In unseren aktuellen Studien befassen wir uns damit, diese Überlebensstrategie der Mykobakterien durch Inhibierung von GlnA3 zu blockieren. So ließe sich ein neuer Ansatz zur Bekämpfung des Tuberkuloseerregers entwickeln. Diese Therapie hätte darüber hinaus den Vorteil, hochspezifisch zu sein, da weder der Mensch noch die allermeisten Mikroorganismen des Mikrobioms GlnA3 besitzen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Agnieszka Bera, Nicole Okoniewski, Arne Matthews und Andreas Kulik für die langjährige und produktive Zusammenarbeit. Diese Arbeiten wurden vom DFG-Graduiertenkolleg GRK1708 (I und II) „Molekulare Grundlagen bakterieller Überlebensstrategien“ unterstützt sowie durch das BMBF, Fördermaßnahme „Targetvalidierung für die pharmazeutische Wirkstoffentwicklung“, Projekt GPS-TBT (FKZ: 16 GW0183K) und Projekt GSS-TUBTAR (FKZ: 16 GW0253K). ■

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Hier steht eine Anzeige.

Springer

▲ **Abb. 2:** Biochemische Analysen von GlnA3 und GlnA4. In einer GS-basierten Reaktion (A) mittels LC/MS nachgewiesene Synthese von Gamma-Glutamylputrescin durch GlnA3 (B) und von Gamma-Glutamylethanolamid durch GlnA4 (C). Die Modellstrukturen zeigen 6 von 12 Untereinheiten mit dem Farbschema „Chain“ (B und C, links) (modifiziert nach [5, 2, 4]). P/E: Polyamin/Ethanolamin; ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; P_i : anorganisches Phosphat.

▲ **Abb. 3:** Phänotypische Analyse von *Streptomyces coelicolor*-Deletionsmutanten. Wir testeten das Wachstum von *S. coelicolor* M145, $\Delta glnA$, $\Delta glnI$, $\Delta glnA_2$, $\Delta glnA_3$ und $\Delta glnA_4$ -Mutanten auf komplexem LB-Agar mit Putrescin (100 mM) (A) oder Spermidin (100 mM) (B). Während Putrescin das Wachstum der $\Delta glnA_3$ -Mutante reduziert, kann die Mutante in Anwesenheit von Spermidin nicht wachsen.

Literatur

- [1] Hodgson DA (2000) Primary metabolism and its control in Streptomyces. Adv Microbial Physiol 42: 47–238
- [2] Krysenko S, Matthews A, Okoniewski N et al. (2019) Initial metabolic step of a novel ethanolamine utilization pathway and its regulation in *Streptomyces coelicolor* M145. mBio 10: e00326–19
- [3] Krysenko S (2018) Characterization of polyamine and ethanolamine utilization pathways in *Streptomyces coelicolor* M145. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität-Tübingen.
- [4] Krysenko S, Matthews A, Busche T et al. (2021) Poly- and monoamine metabolism in *Streptomyces coelicolor*: the new role of glutamine synthetase-like enzymes in the survival under environmental stress. Microb Physiol 1–15
- [5] Krysenko S, Okoniewski N, Kulik A et al. (2017) Gamma-glutamylpolyamine synthetase GlnA3 is involved in the first step of polyamine degradation pathway in *Streptomyces coelicolor* M145. Front Microbiol 8: 726
- [6] Kusano T, Suzuki H (Hrsg.) (2015) Polyamines: A universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. Springer-Verlag, Tokyo
- [7] Lacombe-Harvey MÈ, Brzezinski R, Beaulieu C (2018) Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. Appl Microbiol Biotechnol 102: 7219–7230
- [8] Merrick MJ, Edwards RA (1995) Nitrogen control in bacteria. Microbiol Rev 59: 604–622
- [9] Reuther J, Wohlleben W (2007) Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and posttranslational regulation. J Mol Microbiol Biotechnol 12: 139–146
- [10] Rexer HU, Schäberle T, Wohlleben W, Engels A (2006) Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Arch Microbiol 186: 447–458
- [11] Sohlenkamp C, Geiger O (2016) Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. FEMS Microbiol Rev 40: 133–159
- [12] Walters DR (2000) Polyamines in plant-microbe interactions. Physiol Mol Plant Pathol 57: 137–146

Korrespondenzadresse:

Dr. Sergii Krysenko
Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben
Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin (IMIT)
Mikrobiologie / Biotechnologie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 28
D-72076 Tübingen
wolfgang.wohlleben@biotech.uni-tuebingen.de

AUTOREN

Sergii Krysenko

2011 Bachelor in Biologie, Kiew-Mohyla Akademie, Ukraine.
2015 Master in Biologie, TU Dresden, Institut für Genetik.
2015–2018 Promotion in Biologie, Mikrobiologie/Biotechnologie, Universität Tübingen.
2018–2020 Postdoc, Universität Tübingen. Seit 2020 Gruppenleiter, Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT).

Wolfgang Wohlleben

1974–1977 Promotion in Physik, Universität Erlangen.
1977–1979 Postdoc am Institut Mikrobiologie/Biochemie, Universität Erlangen.
1980–1992 Gruppenleiter am Lehrstuhl Genetik, Universität Bielefeld.
1992–1994 Professor, Universität des Saarlands.
1994–2019 Professor am Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen. Seit 2019 Senior-Professor der Universität Tübingen.