

Das Phagenschock-Protein *LiaH* aus *Bacillus subtilis*



Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Diana Wolf

aus
Leisnig

München
April 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Mascher

2. Gutachterin: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Tag der Abgabe: 10.04.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2012

Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Zudem wurden keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet. Außerdem versichere ich, dass die Dissertation keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 10.04.2012

Diana Wolf

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie
der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.“

Arno Penzias (*1933), amerik. Physiker, 1978 Nobelpreis

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
Kapitel I: Einleitung	1
I.1. Aufbau der bakteriellen Zellwand	1
I.2. Zellwandbiosynthese	2
I.3. Die Zellwand als Ziel von antibiotisch wirkenden Substanzen	5
I.4. Die Zellhüllstressantwort in Gram-positiven Bakterien am Beispiel <i>B. subtilis</i>	8
I.5. Das LiaFSR-Dreikomponentensystem in <i>B. subtilis</i>	11
I.5.1. Induktion des LiaFSR-3KS	12
I.5.2. Regulation und Funktion des LiaFSR-3KS	12
I.6. Die Zellhüllstressantwort in Gram-negativen Bakterien am Beispiel <i>E. coli</i>	14
I.7. Die Phagenschock-Antwort in <i>E. coli</i>	16
I.7.1. Induktion der Phagenschock-Antwort	17
I.7.2. Regulation der Phagenschock-Antwort	18
I.7.3. Rolle der Phagenschock-Antwort im Energiestoffwechsel	20
I.8. Die Phagenschock-Antwort in anderen Organismen	20
I.8.1. γ -Proteobakterien	
I.8.2. Actinobakterien	22
I.8.3. Cyanobakterien und Pflanzen	22
I.9. Zielsetzung der Arbeit	23
Kapitel II: In-depth profiling of the LiaR response of <i>Bacillus subtilis</i> (Originalpaper-Erstautor)	26
Kapitel III: Bacitracin sensing in <i>Bacillus subtilis</i> (Originalpaper-Zweitautor)	41
Kapitel IV: Zelluläre Lokalisation und Interaktion der Stress-Induzierbaren Proteine LiaIHG in <i>Bacillus subtilis</i>	60
IV.1. Einleitung	60
IV.2. Material und Methoden	61
IV.2.1. Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide	61
IV.2.2. Allgemeine Anzucht- und Wachstumsbedingungen	64

IV.2.3. DNA-Manipulation und Klonierung	65
IV.2.4. Konstruktion einer markerlosen <i>liaI</i> -Deletionsmutante	66
IV.2.5. Bestimmung der Topologie durch PhoA/LacZ-Aktivitäts-Analysen	66
IV.2.6. <i>in vivo</i> Crosslink-Experimente (SPINE)	66
IV.2.7. Zell-Fraktionierung	67
IV.2.8. Western Blot	67
IV.2.9. <i>Bacterial-Two-Hybrid</i> -Analyse (BACTH)	68
IV.2.10. Fluoreszenz-Mikroskopie	68
IV.2.11. Vergleichende genomische Analysen	69
IV.3. Ergebnisse	69
IV.3.1. LiaI ist ein kleines Membranprotein	69
IV.3.2. Zelluläre Lokalisation von LiaI und LiaH in <i>B. subtilis</i>	70
IV.3.3. Dynamik von LiaH unter induzierenden Bedingungen	72
IV.3.4. LiaH interagiert mit LiaI	73
IV.3.5. Die Membran-Lokalisierung von LiaH ist zum größten Teil LiaI-abhängig	76
IV.3.6. Identifizierung weiterer funktionell relevanter potentieller LiaH-Interaktionspartner	78
IV.3.7. LiaG ist ein Membranprotein mit einem extrazellulären β -Propeller-Motiv	81
Kapitel V: Rolle von LiaH in der Proteinsekretion und im Energiestoffwechsel von <i>Bacillus subtilis</i>	85
V.1. Einleitung	85
V.2. Material und Methoden	86
V.2.1. Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide	86
V.2.2. Anzucht- und Wachstumsbedingungen	88
V.2.3. DNA-Manipulation und Klonierung	88
V.2.4. Markerlose Deletion von <i>liaR</i> und <i>wapA</i>	89
V.2.5. Chronotranskriptom-Analyse	89
V.2.6. Bestimmung der Promotor-Aktivität durch β -Galaktosidase-Assays	89
V.2.7. Präparation extrazellulärer Proteine (Sekretom)	90
V.2.8. Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese	90
V.2.9. Sequenzanalysen	91
V.3. Ergebnisse	91
V.3.1. Untersuchung des extrazellulären Proteoms von <i>B. subtilis</i>	91
V.3.2. WapA ist ein Zellwand-assoziiertes Protein	93
V.3.3. Chronotranskriptom-Analyse bestätigt den Zusammenhang zwischen LiaH und WapA	93
V.3.4. Untersuchung der Regulation von P_{wapA} durch β -Galaktosidase-Assays	95
V.3.5. P_{liaI} wird nicht durch die Ionophore CCCP und Valinomycin induziert	98
Kapitel VI: Diskussion	101

VI.1. Die LiaR-vermittelte Zellhüllstressantwort in <i>B. subtilis</i>	101
VI.2. Das Lia-System in <i>B. subtilis</i> im Vergleich mit dem Psp-System in <i>E. coli</i>	102
VI.3. Die zelluläre Lokalisation und Interaktion von LiaI und LiaH	106
VI.4. Identifizierung weiterer potentieller Interaktionspartner von LiaH	107
VI.5. Rolle von LiaH in der Proteinsekretion	111
VI.6. Rolle von LiaH im Energiestoffwechsel	114
VI.7. Ausblick	115
Referenzen	118
Anhang	131
Danksagung	136

Publikationsliste

Originalpaper, die in dieser Arbeit präsentiert werden:

Kapitel II

Wolf, D., Kalamorz, F., Wecke, T., Juszczak, A., Mäder, U., Homuth, G., Jordan, S., Kirstein, J., Hoppert, M., Voigt, B., Hecker, M., and Mascher, T. 2010. In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192: 4680-4693

Kapitel III

Rietkötter, E., Hoyer, D., and Mascher, T. 2008. Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 68: 768-785

Originalpaper, das nicht in dieser Arbeit präsentiert wird:

Wolf, D., Domínguez-Cuevas, P., Daniel, R.A., and Mascher, T. 2012. Cell envelope stress response in cell wall-deficient L-forms of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(11): 5907-5915

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celsius
AAA ⁺	<i>ATPase associated with various cellular activities</i>
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	Bacillus
bla	Ampicillin-Resistenz
ble	Bleomycin-Resistenz
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
D-Ala	D-isomere Form der Aminosäure Alanin
Da	Dalton
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
d.h.	das heißt
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECF	<i>Extracytoplasmic function factor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
f.	für
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde
His	Aminosäure Histidin
HK	Histidin-Kinase
HSP	Hitzeschock-Protein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Neomycin/Kanamycin Phosphotransferase
KAP	kationische antimikrobielle Peptide
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
LB	Luria Bertani (Medium)
LFH	<i>Long flanking homology</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol l^{-1})
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight</i>
min	Minuten
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	<i>Molecular weight</i>

MH	Müller-Hinton (Medium)
ml	Milliliter
MLS	Macrolid-Lincosamid-Streptogamin
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
PEG	Polyethylen-Glykol
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ⁺ -Ionen
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
sec	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TIRFM	<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Aminosäure Tyrosin
u.a.	unter anderen
UE	Untereinheit
UDP	Uridindiphosphat
ÜN	über Nacht
USA	<i>United States of America</i>
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
Y.	<i>Yersinia</i>
2KS	Zwei-Komponenten-System
3KS	Drei-Komponenten-System

Vorsätze

k	kilo; 10 ³
m	milli; 10 ⁻³
M	mega; 10 ⁶
μ	mikro; 10 ⁻⁶
n	nano; 10 ⁻⁹

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Zusammenfassung

Für das Überleben von *Bacillus subtilis* ist eine verlässliche Überwachung der Integrität der Zellhülle essentiell, um diese zu schützen und bei Schäden adäquat zu reagieren. Neben den ECF σ Faktoren spielen Zwei-Komponenten-Systeme (2KS) in der Zellhüllstressantwort von *B. subtilis* eine zentrale Rolle. Eines dieser Systeme, das LiaRS-2KS reagiert auf eine große Anzahl verschiedener Zellwand-Antibiotika sowie andere zellhüllstress-auslösende Substanzen. Die zelluläre Funktion und Rolle des Lia-Systems konnte bisher nicht genau definiert werden. In der hier vorliegenden Dissertation wurde das Lia-System erstmals hinsichtlich seiner funktionalen Rolle in *B. subtilis* untersucht.

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde eine detaillierte Analyse der LiaR-vermittelten Zellhüllstressantwort in *B. subtilis* vorgenommen. Transkriptom-Studien dienten zur Identifizierung des LiaR-Regulons. Hierbei wurde die Genexpression des Wildtyps mit zwei Mutanten, die den „ON“ ($\Delta liaF$) und „OFF“ ($\Delta liaR$) Zustand des Lia-Systems repräsentierten, verglichen. Von den dabei identifizierten drei potentiellen LiaR-Zielloci (*liaIH*, *yhcYZ-ydhA*, *ydhE*) konnten durch anschließende Folgeuntersuchungen nur die Gene *liaI* und *liaH* als *in vivo* relevante Zielgene für LiaR verifiziert werden. Umfangreiche phänotypische Analysen zeigten, dass $\Delta liaIH$ -Mutanten nur schwach sensitiv auf einige Antibiotika sowie oxidativen Stress reagierten. Ebenso vermittelt eine Überexpression von LiaH in einer $\Delta liaF$ -Mutante keine Resistenz gegenüber stress-auslösenden Substanzen. LiaH gehört zur Familie der Phagenschock-Proteine. Weitere Mitglieder dieser Familie sind PspA aus *Escherichia coli* und Vipp1 aus *Arabidopsis thaliana*, die große oligomere Ringstrukturen bilden. Die strukturelle Untersuchung von LiaH ergab, dass auch dieses Protein große Ringe bildet (>1MDa).

Der zweite Ergebnisteil befasst sich mit der Untersuchung der Stimuluswahrnehmung der Zellhüllstress-detektierenden Systeme in *B. subtilis*. Die Zellhüllstressantwort auf das Antibiotikum Bacitracin wurde hierbei mittels β -Galaktosidase-Assay sowie Western Blot-Analyse erforscht. Das Bce-System reagiert dabei am stärksten und spezifischsten auf Bacitracin-Stress. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass der ABC-Transporter BceAB essentiell für die Stimuluswahrnehmung ist und dass das Bce-System an sich eine Resistenzdeterminante in *B. subtilis* darstellt. Das Lia-System hingegen wird erst bei höheren Bacitracin-Konzentrationen induziert. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das Bce-System Bacitracin direkt wahrnimmt (*drug sensing*) und das Lia-

System in indirekter Weise auf Zellhüllstress ausgelöst durch Bacitracin reagiert (*damage sensing*).

Im dritten Teil der Ergebnisse wurden die zelluläre Lokalisation von LiaI, LiaH und LiaG sowie die Beziehung der Proteine untereinander mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und biochemische Ansätze untersucht. Die Membranproteine LiaI und LiaG sind unter Stressbedingungen in der Zellmembran lokalisiert. LiaH, ein cytoplasmatisches Protein verändert unter Stressbedingungen seine Lokalisation vom Cytoplasma an die Membran. Die Funktion von LiaH scheint sich also an der Zellmembran zu vollziehen, wobei LiaI als Interaktionspartner identifiziert wurde. Da in einer $\Delta liaI$ -Mutante LiaH unter Stressbedingungen ebenfalls noch an die Zellmembran assoziiert ist, wurde nach weiteren Interaktionspartnern von LiaH gesucht. Eine umfangreiche *bacterial-two-hybrid*-Analyse ergab, dass sowohl LiaH als auch LiaI und LiaG in ein Interaktionsnetzwerk eingebettet sind, in welchem das bisher uncharakterisierte Protein YvIB eine Schlüsselrolle spielt. Die ebenso in dieses Netzwerk involvierten Proteine YjOB, DnaK und HtpG üben als Proteasen/Chaperone Funktionen in der Faltung und Degradierung von Proteinen aus. Ein Zusammenspiel des Lia-Systems und des Schlüsselproteins YvIB mit den Proteasen/Chaperonen als Reaktion auf Zellhüllstress ist denkbar.

Die Phagenschock-Homologe PspA in *Streptomyces lividans* und *E. coli* üben einen erheblichen Einfluss auf die Proteinsekretion sowie die elektronenmotorische Kraft der Zelle aus. Daher wurde im letzten Teil der Ergebnisse die Rolle von LiaH in der Proteinsekretion sowie im Energiestoffwechsel näher analysiert. Ein Einfluß des Lia-Systems in der Aufrechterhaltung der elektronenmotorischen Kraft der Zelle konnte nicht bestätigt werden. Durch die Analyse des Sekretoms in *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre Proteom einer $\Delta P_{liaI-liaIH}$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikante Veränderungen in der Komposition aufwies. So wurde im Sekretom der $\Delta P_{liaI-liaIH}$ -Mutante vor allem das Zellwand-assoziierte Protein WapA identifiziert, welches im Wildtyp oder in einer $\Delta liaF$ -Mutante nicht auftrat. Das Lia-System beeinflusst somit auch die Proteinsekretion von *B. subtilis*, wobei die molekularen Mechanismen noch unbekannt sind.

Summary

Monitoring the integrity of the cell envelope is crucial for the survival of *Bacillus subtilis*. Two-component-systems (2KS) form an integral part of the cell envelope stress response in this organism. One such system, the LiaRS-2KS responds to a number of diverse cell wall antibiotics as well as other envelope perturbing agents. But the exact cellular role of the Lia-System remains elusive. In the context of this thesis the Lia-System was functionally investigated for the first time.

In the first part of the results, a detailed microarray-based analysis of the LiaR-dependent cell envelope stress response was performed to identify the LiaR regulon. The gene expression profile of the wild type and two mutants, representing the “ON” ($\Delta liaF$) and “OFF” ($\Delta liaR$) status of the Lia-system, were compared. Three potential target transcripts, *liaIH*, *yhcYZ-yhdA*, *ydhE*, were identified. By follow-up analysis we could only verify the genes *liaI* and *liaH* as *in vivo* relevant targets of LiaR-dependent gene regulation. In depth phenotypic profiling revealed weak sensitivities of a $\Delta liaIH$ mutant in the presence of some antibiotics and compounds causing oxidative stress. But overexpression of LiaH in a $\Delta liaF$ mutant did not confer resistance against these substances. LiaH belongs to the phage shock protein family. Other members of this family, such as PspA of *Escherichia coli* and Vipp1 of *Arabidopsis thaliana*, form large oligomeric ring structures. A structural investigation of LiaH also revealed the formation of large rings (>1 MDa) with a nine-fold rotational symmetry, emphasizing the similarities between these proteins.

In the second part of the results, the mechanism of stimulus perception of cell envelope stress responding systems in *B. subtilis* was investigated by using β -galactosidase assays and western blot analysis. It was found that the Bce-system responds in a highly specific way to bacitracin stress. In *B. subtilis* the Bce-system confers resistance against bacitracin. Similarly, the BceAB transporter is also essential in stimulus perception. In contrast, the Lia-system is responding to higher concentrations of bacitracin, only. In summary, this led us to conclude that the Bce-system is a direct drug sensing system whereas the Lia-system is an indirect damage sensing system of the stimulus perception under cell envelope stress conditions.

In the third result section, the cellular localisation and relationship of the proteins LiaI, LiaH and LiaG were determined by using fluorescence microscopy and biochemical methods. Under stress conditions, the membrane proteins LiaI and LiaG are localized at

the cell membrane of *B. subtilis*. In contrast, the localization of LiaH, a cytoplasmic protein, is highly dynamic. Under bacitracin stress, LiaH is relocated from the cytoplasm to the membrane, its proposed site of action, where LiaI acts as its membrane anchor. Since LiaH was also observed at the membrane in a $\Delta liaI$ mutant, we searched for additional interaction partners of LiaH. By performing a comprehensive bacterial-two-hybrid analysis, we could demonstrate that LiaH, LiaI and LiaG are parts of a complex protein-protein-interaction network, in which the so far uncharacterized cytoplasmic protein YvlB seems to play a central role. Other proteins that are involved in this network are YjoB, DnaK and HtpG. These proteins act as proteases/chaperones in the folding as well as the degradation of proteins.

The phage shock proteins PspA in *Streptomyces lividans* and *E. coli* notably affect both the protein secretion and the proton motive force. Therefore, the influence of LiaH in protein secretion and proton motive force in *B. subtilis* cells was analysed in the last part of the results. We could not observe any influence of LiaH in maintaining the proton motive force of the membrane. By mapping of the secretome, a significant change in composition of extracellular proteins in a $\Delta P_{liaI-liaIH}$ mutant was demonstrated. The extracellular proteome of a $\Delta P_{liaI-liaIH}$ contains a significant increased amount of the cell wall-associated protein WapA, which was absent in the wild type or in the $\Delta liaF$ mutant. Hence, protein secretion is also affected by the phage shock protein LiaH in *B. subtilis*, but the molecular mechanism of this influence is yet unknown.

Einleitung

In seinem natürlichem Habitat, dem Boden, ist *Bacillus subtilis*, ein zur Gruppe der Firmicuten gehörendes Gram-positives Bakterium, einer Vielzahl von ständig wechselnden Umweltbedingungen (chemische und physikalische Parameter, Ressourcenlimitierung) ausgesetzt. Deshalb ist die Überwachung von und die daraus resultierende Fähigkeit einer schnellen Reaktion auf Umweltveränderungen für das Überleben von *B. subtilis* von essentieller Bedeutung. Die Anpassung von *B. subtilis* ist dabei sehr vielfältig. Neben der Befähigung der natürlichen Kompetenzausbildung, wodurch fremde DNA aufgenommen werden kann, ist *B. subtilis* in der Lage, Endosporen auszubilden. Mittels dieser Sporen kann *B. subtilis* ungünstige Umweltbedingungen, z.B. Hitze, UV-Strahlen und extreme pH-Werte, langfristig überdauern. Eine weitere sehr interessante Art der Anpassung von *B. subtilis* ist die Produktion von antibiotisch wirksamen Peptiden, z.B. Bacitracin, Surfactin (Stein, 2005), wodurch sich dieses Bakterium einen Selektionsvorteil erschaffen kann. Die Wirkung der antibiotischen Peptide richtet sich dabei oft gegen die Zellwand sowie Zellwandbiosynthese anderer Mikroorganismen.

I.1. Aufbau der bakteriellen Zellwand

Die bakterielle Zellwand ist neben der Zellmembran Bestandteil der Zellhülle und verleiht der Zelle Schutz, Form und Stabilität (Vollmer *et al.*, 2008, Weidel & Pelzer, 1964). Die Zellhülle wirkt dem zellinneren Turgordruck entgegen und fungiert als Permeabilitätsbarriere (Delcour *et al.*, 1999). Poren in der Zellhülle haben Siebfunktion, wobei diese nur von Molekülen mit einer maximalen Größe bis 55 kDa durchdrungen werden können (Dijkstra & Keck, 1996). Der spezielle Aufbau der Zellhülle in Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen ist jedoch grundlegend unterschiedlich (Abb.I.1), wobei die Unterscheidung der Bakterien in Gram-positiv oder Gram-negativ auf einem unterschiedlichen Färbeverhalten der Zellwand mit Kristallviolett/Jod beruht.

Die Zellwand der Gram-negativen Bakterien (Abb.I.1), z.B. *Escherichia coli*, besteht aus einer dünnen Peptidoglycanschicht und einer zweiten äußeren Lipiddoppelschicht (äußere Membran), die aus Phospholipiden, Lipopolysacchariden (LPS) sowie integralen

Membranproteinen aufgebaut ist. Die LPS sind dabei von besonderer Bedeutung, da diese oftmals in Zusammenhang mit schweren Infektionen (septischer Schock) stehen (Raetz & Whitfield, 2002). Über Lipoproteine, welche oftmals als Porine für den passiven Transport von kleinen Molekülen (z.B. Einfachzucker, Aminosäuren) fungieren, findet der Kontakt zwischen Peptidoglycan und äußerer Membran statt (Bos *et al.*, 2007, Silhavy *et al.*, 2010). Zwischen der Zellmembran und der Zellwand befindet sich außerdem ein zelluläres Kompartiment, das Periplasma genannt wird und aufgrund einer hohen Dichte von Proteinen eine höhere Viskosität als das Cytoplasma aufweist (Brass *et al.*, 1986).

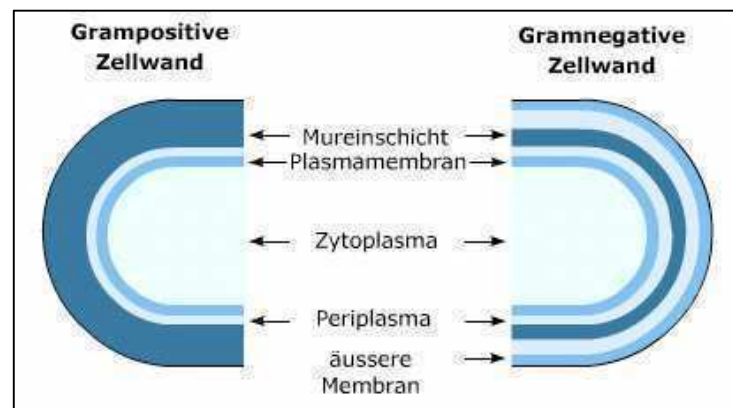


Abb.I.1: Aufbau der Zellhülle in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. (aus www.pharmawiki.ch/wiki/media/Gramfaerbung_1.png)

Die Gram-positive Zellwand (Abb.I.1) besteht aus einer dicken mehrlagigen Peptidoglycanschicht, die mit Proteinen, Teichonsäuren und Polysacchariden durchzogen ist (Delcour *et al.*, 1999, Silhavy *et al.*, 2010). Eine äußere Lipidschicht, wie sie bei den Gram-negativen Bakterien vorkommt, fehlt vollständig. In einigen Gram-positiven Bakterien, z.B. *Lactobacillus brevis* (Vidgren *et al.*, 1992), ist die Zellwand zusätzlich noch durch eine parakristalline Proteinschicht (*S-Layer*) ergänzt (Delcour *et al.*, 1999, Schäffer & Messner, 2005). Die Funktion dieser Schicht ist zum großen Teil noch unklar. Es wird aber vermutet, dass *S-Layer* als Virulenzfaktoren bei pathogenen Bakterien fungieren oder bei der Zell-Adhäsion eine Rolle spielen (Sleytr *et al.*, 1993).

I.2. Zellwandbiosynthese

Peptidoglycan (Murein) ist ein Polymer, das aus langen Glycan-Strängen besteht, die aus Disacchariden zusammengesetzt und durch Peptide quervernetzt sind (Dijkstra & Keck, 1996). Obwohl die genaue Zusammensetzung der Peptidoglycan-Schicht zwischen verschiedenen Spezies sehr stark variiert, so besteht das Murein doch immer aus einem Grundgerüst, welches aus den zwei Zuckermolekülen N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und

N-Acetyl-Muraminsäure (MurNAc) sowie einem Pentapeptid, dass an MurNAc assoziiert ist, aufgebaut ist. Durch β -1 \rightarrow 4 Verbindungen zwischen den Zuckermolekülen bilden sich große lineare Polymer-Stränge aus, die durch die Pentapeptide miteinander quervernetzt werden (Vollmer *et al.*, 2008). Die Synthese des Murein-Grundgerüsts findet im Cytoplasma sowie assoziiert an die Zellmembran statt. Hierbei wird zunächst aus Fructose-6-Phosphat das Molekül GlcNAc gebildet, welches dann durch UDP zu UDP-GlcNAc umgewandelt wird. Aus UDP-GlcNAc wird anschließend auch UDP-MurNAc synthetisiert (Delcour *et al.*, 1999). Diese ersten essentiellen Schritte werden durch die Enzyme MurA(MurZ) und MurB katalysiert (Abb.I.2) (Brown *et al.*, 1995).

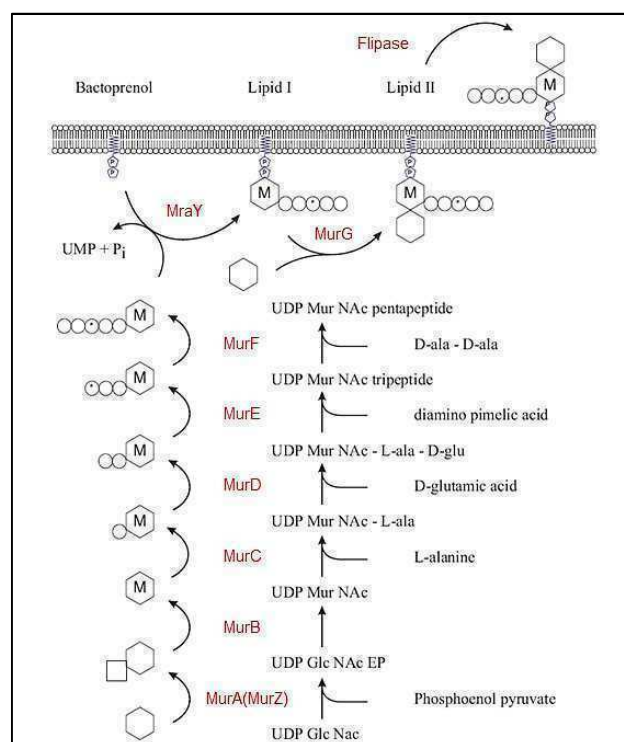


Abb.I.2: Peptidoglycan-Synthese in Bakterien. Schematische Darstellung. Katalysierende Enzyme sind rot hervorgehoben. UDP, Uridin-Diphosphat. UMP, Uridin-Monophosphat. GlcNAc, N-Acetyl-Glucosamin. MurNAc, N-Acetyl-Muraminsäure. EP, Epoxid. P, Phosphat (Patricia Domínguez-Cuevas (Newcastle, UK), modifiziert)

Im nächsten Schritt wird mittels der Ligase MurC begonnen, die Pentapeptid-Kette zu synthetisieren, indem als erstes die Aminosäure L-Alanin an UDP-MurNAc angehängt wird. An zweiter Position wird die Aminosäure D-Glutaminsäure durch das Enzym MurD ligiert. Die Aminosäure an dritter Position, welche durch MurE an die Kette angehängt wird, variiert. In den Gram-negativen Bakterien, den Mycobakterien und den Bacilli ist dies *meso*-Diaminopimelinsäure. In den meisten anderen Gram-positiven Bakterien wird L-Lysin hinzugefügt. Dieser Unterschied an dritter Position des Pentapeptids beeinflusst letztlich auch die Beschaffenheit des Peptidoglycans. Im letzten Schritt der Synthese des

Pentapeptids wird das Dipeptid D-Alanin-D-Alanin durch MurF ligiert, wobei die Bildung des Dipeptids durch das Enzym Ddl katalysiert wird. Nun wird das UDP-MurNAc-Pentapeptid mittels des Enzyms MraY mit dem membranständigen Bactoprenol (C₅₅ Undecaprenyl-phosphat) verbunden. Der auf diese Weise entstandene Komplex wird auch Lipid I genannt. Das Enzym MurG katalysiert das Anfügen von UDP-GlcNAc an Lipid I, womit die Assemblierung des Peptidoglycan-Vorläufer-Moleküls abgeschlossen ist. Dieser resultierende Komplex ist auch als Lipid II bekannt und besteht aus dem Peptidoglycan-Vorläufer, der über ein Diphosphat an Bactoprenol gebunden ist. Durch das Enzym Flippase wird Lipid II schließlich durch die Zellmembran in den extrazellulären Raum transportiert, wobei der genaue Ablauf dieser Translokation unbekannt ist (Abb.I.2). Anschließend wird das Peptidoglycan-Molekül durch Transglycolysierung in die linearen Glycan-Stränge eingefügt und durch Transpeptidierung des Pentapeptids quervernetzt (Vollmer *et al.*, 2008, Foster & Popham, 2002).

Die Synthese weiterer Komponenten der Zellwand, die u.a. Funktionen in der Adhäsion, Virulenz, Infektion und Nährstofferschließung haben, geschieht auf recht vielfältige Weise. Bei der Assemblierung von Lipoproteinen, Phospholipiden und LPS in den Gram-negativen Bakterien sowie von Teichonsäuren und Oberflächenproteinen in den Gram-positiven Bakterien, wird Energie in Form von ATP benötigt. Dies erfordert, dass die Synthese dieser Komponenten nur im Cytoplasma oder an der inneren Seite der Zellmembran geschehen kann (Silhavy *et al.*, 2010). In Gram-negativen Bakterien werden Proteine, die Komponenten der Zellwand sind, ungefaltet und mittels eines Signalpeptids am N-Terminus aus dem Cytoplasma heraus über den SecYEG-Transportweg ins Periplasma transferiert (Driessen & Nouwen, 2008). Nach Entlassen der Proteine ins Periplasma wird eine Aggregation und Missfaltung dieser durch periplasmatische Chaperone, z.B. DegP (Krojer *et al.*, 2008), verhindert. Außerdem überführen die periplasmatischen Chaperone die Proteine zur Faltung und anschließenden Funktion zu einem Terminalkomplex, dem Bam-Komplex, der sich in der äußeren Membran befindet (Sklar *et al.*, 2007).

Der Aufbau von Lipoproteinen geschieht auf ähnliche Weise. Nach Translokation des ungefalteten Proteins über den SecYEG-Transportweg auf die äußere Seite der Zellmembran wird zunächst die Signalsequenz durch die Signalpeptidase II prozessiert (Paetzel *et al.*, 2002) und anschließend eine Fettsäure-Kette angefügt. Da Lipoproteine ihre Funktion in der äußeren Membran ausüben, werden diese anschließend über das Lol-System zur äußeren Membran transportiert (Narita & Tokuda, 2006).

Die Vorläufer der Phospholipide und LPS werden an der inneren Seite der Zellmembran assembliert. Die anschließende Translokation durch die Zellmembran erfolgt mit Hilfe des ABC-Transporters MsbA (Raetz & Whitfield, 2002, Doerrler *et al.*, 2004). Über den LPS-Transportweg (Lpt) werden die LPS schließlich zur äußeren Membran gebracht und dort eingefügt (Ruiz *et al.*, 2008, Sperandio *et al.*, 2008). Über den Mechanismus, der letztlich zum Einfügen der Phospholipide in die äußere Membran führt, ist nichts bekannt (Silhavy *et al.*, 2010).

Bei den Gram-positiven Bakterien werden Zellwandproteine auf die gleiche Weise wie in Gram-negativen Bakterien durch die Zellmembran transloziert. Die Zellwandproteine in Gram-positiven Bakterien erfüllen eine Vielzahl von Funktionen. Einige dieser Oberflächenproteine sind mit dem Peptidoglycan oder den Teichonsäuren verbunden und fungieren als Adhäsine. Dies sind Proteine, die Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirtes erkennen und deshalb zur Virulenz des Bakteriums beitragen (z.B. Infektionen durch *Staphylococcus aureus*). Andere Oberflächenproteine wiederum haben eine Funktion bei der Immunantwort des Wirtes oder bei der Bindung von Bakteriophagen (Silhavy *et al.*, 2010).

Teichonsäuren sind eine weitere wichtige Komponente in der Zellwand der Gram-positiven Bakterien. Die Teichonsäuren lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die Wand-Teichonsäuren, die mit dem Peptidoglycan verbunden sind, und die Lipoteichonsäuren, die in der Zellmembran verankert sind (Silhavy *et al.*, 2010). Der strukturelle Aufbau der Teichonsäuren variiert sehr stark. Dennoch bestehen die meisten aus bis zu 60 miteinander verbundenen Disacchariden, die aus Ribitol- oder Glycerolphosphaten zusammengesetzt sind. Die Teichonsäuren bilden zusammen mit dem Peptidoglycan eine Art polyanionisches Netzwerk, das dazu beiträgt, die Zellwand elastisch, dehnbar und dennoch porös zu halten sowie elektrostatisch aufzuladen (Neuhaus & Baddiley, 2003).

I.3. Die Zellwand als Ziel von antibiotisch wirkenden Substanzen

Da die Zellwandbiosynthese ein komplexer Vorgang ist, der aus vielen essentiellen Schritten besteht, ist diese ein Angriffspunkt für eine Vielzahl von Antibiotika. Die Anfälligkeit der Bakterien auf Antibiotika kann dabei aber recht unterschiedlich sein. So kann beispielsweise das Antibiotikum Vancomycin bei den Gram-negativen Bakterien nicht optimal wirken, da es aufgrund seiner Molekülgröße die äußere Membran nicht penetrieren kann (Koebnik *et al.*, 2000).

Neben Vancomycin existiert aber eine Vielzahl anderer antibiotischer Substanzen, die oftmals sehr unterschiedliche Wirkungsspektren besitzen. Angriffspunkte für Antibiotika bilden schon die frühen Schritte in der Synthese des GluNAc-UDP-MurNAc-Pentapeptids (Abb.I.3). Das von Streptomyceten produzierte Antibiotikum Fosfomycin inhibiert das Enzym MurA und verhindert somit die Umwandlung von UDP-GluNAc zu UDP-MurNAc (Kahan *et al.*, 1974). Ein weiteres von Streptomyceten, z.B. *Streptomyces griseus*, gebildetes Antibiotikum ist D-Cycloserin. Dieses wirkt, indem es die Racemisierung von L- zu D-Alanin sowie die Ligation des Dipeptids D-Alanin-D-Alanin an die Peptidkette des Peptidoglycan-Vorläufers inhibiert (Abb.I.3) (Neuhaus & Hammes, 1981).

Die Bindung des MurNAc-Pentapeptids an Bactoprenol wird verhindert, indem z.B. Tunicamycin als Konkurrenz-Substrat von MraY gebunden wird (Kimura & Bugg, 2003). Das Lipoglycopeptid Ramoplanin sowie das Lantibiotikum Mersacidin kommen zur Wirkung, wenn das UDP-GluNAc-MurNAc-Pentapeptid gebunden an Bactoprenol (→Lipid II) durch die Zellmembran auf die extrazelluläre Seite transportiert wurde und anschließend über Transglycosylierung und Transpeptidierung in die Peptidoglycanschicht eingebaut werden soll (Abb.I.3).

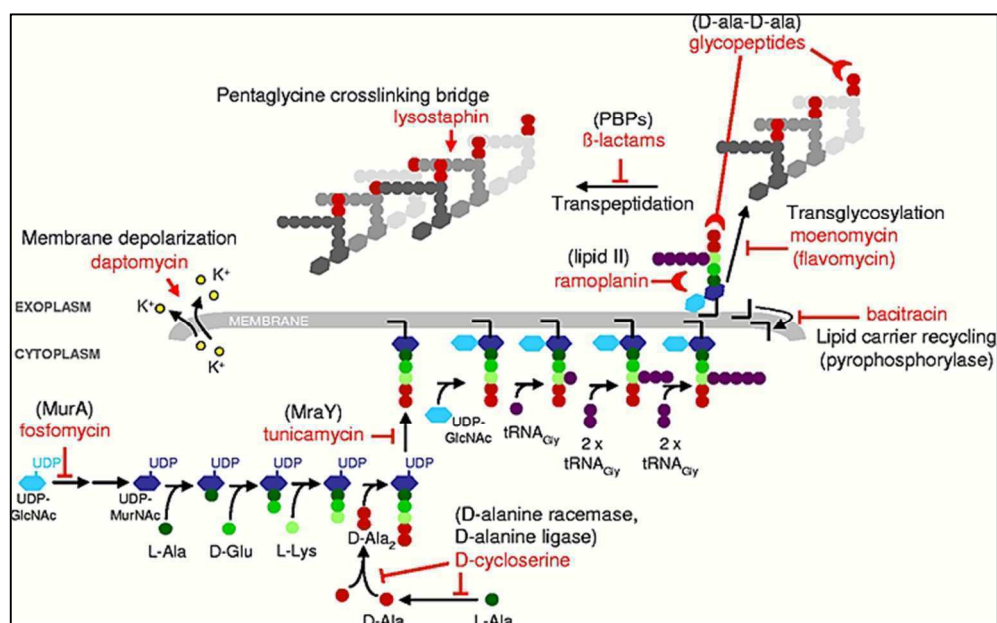


Abb.I.3: Die Zellwandbiosynthese als Ziel für Antibiotika am Beispiel von *S. aureus*. Die Blockierung von enzymatischen Reaktionen durch Antibiotika ist durch rote Block-Pfeile gekennzeichnet. Rote Halbmondpfeile markieren die Bindungspunkte für Antibiotika am Peptidoglycanvorläufer. Die Membranruptur/Depolarisation durch Daptomycin sowie der Wirkungsort von Lysostaphin sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. (McCallum *et al.*, 2011)

Beide Antibiotika bilden einen Komplex mit Lipid II, wodurch die Peptidoglycansynthese erfolgreich gehemmt wird (Brötz *et al.*, 1998). Jedoch wird Lipid II nicht nur durch die beiden schon genannten Antibiotika beeinträchtigt. Weitere Antibiotika, die Lipid II als

Wirkungsort besitzen, sind Nisin, Vancomycin und Moenomycin. Nisin ist ein Antibiotikum, welches überwiegend nur auf Gram-positive Bakterien bakterizid wirkt, da es ein sehr großes Molekül ist, welches die äußere Membran von Gram-negativen nur schwer durchdringen kann (Sahl & Bierbaum, 1998). Nisin bindet Lipid II, um anschließend Poren auszubilden, die zur Zellyse führen (Breukink *et al.*, 1999). Das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin inhibiert durch Bindung von D-Ala-D-Ala die Transglycosylierung und/oder Transpeptidierung des GluNAc-MurNac-Pentapeptids und damit den Einbau der Peptidoglycaneinheit in die bestehende Zellwand. Dabei wirkt Vancomycin sowohl an Lipid II als auch einen Schritt später, wenn das Peptidoglycan-Vorläufermolekül bereits von Bactoprenol abgespalten wurde und quervernetzt werden soll (Abb.I.3) (Kahne *et al.*, 2005). Ein weiteres Antibiotikum, welches die Transglycosylierung als Substratanalog der Glycosyltransferasen verhindert, ist Moenomycin (Abb.I.3) (Lovering *et al.*, 2007).

Das zyklische Dodecylpeptid-Antibiotikum Bacitracin inhibiert Lipid II nicht direkt. Es bildet einen Zn^{2+} -abhängigen Komplex mit Undecaprenol-Pyrophosphat (C_{55} -Carrier) und verhindert so die Dephosphorylierung zu Undecaprenol-Phosphat (Bactoprenol) und damit ein Recycling des Carriers und seinen Transport zurück auf die cytoplasmatische Seite der Zellmembran. Dies führt zum Erliegen der Peptidoglycansynthese (Stone & Strominger, 1971).

Die breite und immer noch wichtigste Gruppe der Antibiotika, die β -Lactame, hat ihre Wirkungsfunktion in den letzten Schritten (Transpeptidierung) der Peptidoglycansynthese (Abb.I.3). Wichtige Vertreter der β -Lactame sind z.B. Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme. Alle zu dieser Gruppe gehörenden Antibiotika zeichnen sich strukturell durch einen β -Lactam-Ring aus, der als Substratanalog zu einer effizienten Hemmung der Peptidtransferasen (*Penicillin-binding-proteins* (PBP's)) führt (Schneider & Sahl, 2010, Tipper & Strominger, 1965).

Daptomycin ist ein recht neues und auch in der Therapie von Infektionen durch multiresistente Bakterien (z.B. Methicillin-resistenter *S. aureus*) eingesetztes Antibiotikum. Die genaue bakterizide Wirkungsweise von Daptomycin ist jedoch umstritten. Eine spezifische Interaktion von Daptomycin mit Intermediaten der Zellwandbiosynthese konnte bisher nicht bestätigt werden (Schneider *et al.*, 2009). Es wurde jedoch gezeigt, dass Daptomycin in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen mit der Cytoplasmamembran interagiert und oligomerisiert, was zur Bildung von Poren führt. Der darauffolgende Ausstrom von Ionen, die Depolarisierung der Zellmembran sowie die

Inhibierung der Biosynthese von Makromolekülen führen letztendlich zum Absterben der Zelle. (Muthaiyan *et al.*, 2008, Wecke *et al.*, 2009). Gleichzeitig wurde aber auch beobachtet, dass Daptomycin zu einer starken Induktion der Zellhüllstressantwort in Gram-positiven Bakterien, z.B. *B. subtilis* (Wecke *et al.*, 2009) und *S. aureus* (Muthaiyan *et al.*, 2008) führt, was wiederum eine Inhibition der Zellwandbiosynthese durch Daptomycin vermuten lässt.

I.4. Die Zellhüllstressantwort in Gram-positiven Bakterien am Beispiel *B. subtilis*

Wie oben beschrieben ist die Zellhülle (Zellwand und Zellmembran) aufgrund ihrer Komplexität und essentiellen Funktion ein optimales Ziel für Antibiotika. Da die Zellhülle jedoch als äußere Barriere der Bakterienzelle entscheidend für das Überleben ist, ist es unerlässlich, dass die Integrität und Funktionalität der Zellhülle permanent überwacht wird. Die Aufgabe der Überwachung übernimmt dabei ein weitgefächertes Netz signaltransduzierender Systeme, deren Aktivierung zur Zellhüllstressantwort führt. Zellhüllstress wird jedoch nicht nur durch antibiotische Substanzen hervorgerufen. Andere Stressfaktoren sind osmotischer, alkalischer und Sekretions-Stress sowie die Anwesenheit schädlicher Chemikalien, z.B. Detergenzien und Ethanol. Somit ist die Zellhüllstressantwort im weitesten Sinne eine Antwort auf Veränderungen/Störungen in der Zellmembran, der Peptidoglycanschicht und der Komponenten (Proteine, Teichonsäuren), die sich darin befinden (Jordan *et al.*, 2008). Im Folgenden dient der Modellorganismus *B. subtilis* dazu, die Zellhüllstressantwort in den Gram-positiven Bakterien näher zu erläutern. Abbildung I.4 zeigt, dass die Zellhüllstressantwort in *B. subtilis* aus ECF (*extracytoplasmic function*) σ Faktoren und Zweikomponentensystemen (2KS) besteht, wobei einige der 2KS mit ABC-Transportern assoziiert sind.

In *B. subtilis* sind die ECF σ Faktoren σ^W , σ^M und σ^X , welche durch viele verschiedene Antibiotika induziert werden, maßgeblich an der Zellhüllstressantwort beteiligt. Die ECF-abhängige Signaltransduktion beinhaltet zwei Proteinkomponenten: ein meist membranständiges Sensorprotein (Anti- σ Faktor) und ein cytoplasmatisches Protein (ECF σ Faktor), welches als Transkriptionsregulator fungiert. Unter nicht induzierenden Bedingungen liegen die ECF σ Faktoren in inaktiver Form vor. Das bedeutet, dass der membrangebundene Anti- σ Faktor mittels Protein-Protein-Interaktion mit dem σ Faktor verbunden ist. Unter bestimmten Stressbedingungen kommt es zur Konformationsänderung oder Proteolyse des Anti- σ Faktors, wobei der σ Faktor dissoziiert

und dann als Untereinheit für die RNA-Polymerase zur Verfügung steht (Helmann, 2002, Jordan *et al.*, 2008).

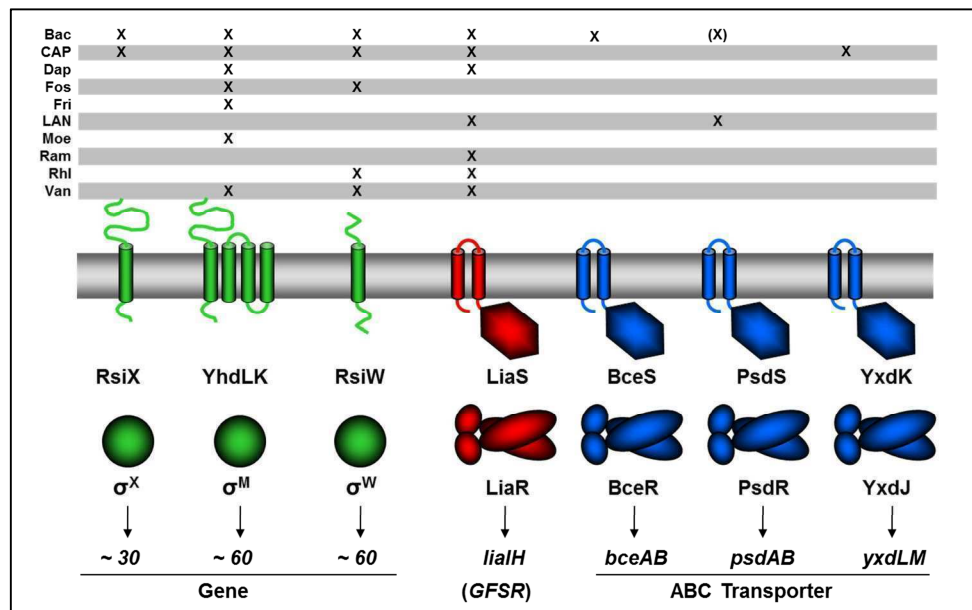


Abb.I.4: Netzwerk der Zellhüllstressantwort in *B. subtilis*. ECF σ Faktoren sind in Grün dargestellt, 2KS, die mit ABC-Transportern assoziiert sind in Blau, das Lia-2KS in Rot. Die Antibiotische Spezifität jedes Systems ist gekennzeichnet. Bac, Bacitracin; CAP, Kationische antimikrobielle Peptide; Dap, Daptomycin; Fos, Fosfomycin; Fri, Friulimicin; LAN, Lantibiotika; Moe, Moenomycin; Ram, Ramoplanin; Rhl, Rhamnolipide; Van, Vancomycin (Jordan *et al.*, 2008)

In *B. subtilis* ist der ECF σ Faktor σ^W am besten untersucht (Helmann, 2006) und wird durch eine Vielzahl von Antibiotika, wie z.B. Vancomycin und Cephalosporin C, Detergenzien sowie durch alkalischen Schock induziert (Cao *et al.*, 2002b, Wiegert *et al.*, 2001). Durch Analysen des Transkriptoms von *B. subtilis* wurde herausgefunden, dass σ^W die Transkription von bis zu 60 Zielgenen reguliert (Huang *et al.*, 1999, Cao *et al.*, 2002a). Dabei vermitteln einige Produkte der regulierten Gene Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen, z.B. Fosfomycin (Cao *et al.*, 2001), oder Immunität bei Zellyse-auslösenden Reaktionen in nichtsporulierenden Zellen, Kannibalismus (Butcher & Helmann, 2006). Des Weiteren reguliert σ^W , z.B. bei Stress durch Detergenzien (Triton X-100), auch den Einbau mehrfach gesättigter Fettsäuren in die Zellmembran (Kingston *et al.*, 2011).

Ein weiterer ECF σ Faktor, σ^X , wird primär in der logarithmischen und frühen stationären Wachstumsphase exprimiert. Eine Induktion von σ^X erfolgt aber auch unter Stress durch Bacitracin und kationische antimikrobielle Peptide (KAP's, Abb.I.4), wobei dieser ECF σ Faktor die Transkription von etwa 30 Zielgenen kontrolliert. Die vorrangige physiologische Funktion des σ^X ist die Regulation des *dltABCDE*- und des *pssA-ybfM-psd*-Operons. Beide Operons kodieren Proteine, die zu einer Herabsetzung der negativen Ladung, sowohl auf Ebene der Zellwand durch Einfügen von positiv-geladenen

Aminogruppen in die Teichonsäuren führen (Perego *et al.*, 1995) als auch durch die Synthese und den Einbau von neutralen Lipiden in die negativ geladene Zellmembran (Cao & Helmann, 2004). Durch diese Modifikation wird z.B. eine Resistenz gegenüber KAP's erreicht.

Ähnlich wie σ^W , reguliert auch ein weiterer ECF σ Faktor, σ^M , eine Anzahl von etwa 60 Genen (Abb.I.4) (Eiamphungporn & Helmann, 2008). Dieser ECF σ Faktor wird durch eine Vielzahl verschiedener Signale induziert, z.B. Zellwand-Antibiotika (Bacitracin, Vancomycin, Fosfomycin), Hitze, Ethanol sowie durch Rhamnolipide (Thackray & Moir, 2003, Wecke *et al.*, 2011). Er vermittelt außerdem eine Resistenz gegenüber Bacitracin, indem er die Expression der Undecaprenol-Pyrophosphat-Phosphatase BcrC reguliert (Mascher *et al.*, 2003, Ohki *et al.*, 2003b, Ohki *et al.*, 2003a).

Die Funktion eines weiteren ECF σ Faktors, σ^V , wurde kürzlich herausgefunden. σ^V wird auch unter Zellhüllstress, ausgelöst durch Lysozym, aktiviert. Die Funktion des ECF σ Faktors liegt, ähnlich wie beim ECF σ^X , in der Regulation des *dltABCDE*-Operons. σ^V vermittelt Resistenz gegenüber Lysozym, indem die Peptidoglycan-Stränge acetyliert und Alanin-Gruppen in die Teichonsäuren eingebaut werden, was zu einer Herabsetzung der negativen Ladung der Zellwand führt (Guariglia-Oropeza & Helmann, 2011).

Neben den ECF σ Faktoren spielen vier verschiedene Zweikomponentensysteme (2KS) eine große Rolle in der Zellhüllstressantwort von *B. subtilis*. Drei der vier 2KS sind mit ABC-Transportern assoziiert, die zur Entfernung der schädlichen Substanzen beitragen. Der ABC-Transporter bildet hierbei zusammen mit dem 2KS eine Art Detoxifizierungsmodul, wodurch Zellhüllstress-auslösende Substanzen detektiert und gleichzeitig entfernt werden können (Jordan *et al.*, 2008). In *B. subtilis* sind drei solcher Detoxifizierungsmodule bekannt: das BceRS-AB-System, das PsdRS-AB-System und das YxdJK-LM-System (Abb.I.4) (Jordan *et al.*, 2008, Staroń *et al.*, 2011).

Das BceRS-AB-System ist bereits gut untersucht worden. So wird es beispielsweise stark durch Bacitracin induziert und stellt zusätzlich zu BcrC die primäre Resistenzdeterminante in *B. subtilis* dar (Ohki *et al.*, 2003a, Mascher *et al.*, 2003). Bacitracin wird dabei aber nicht allein durch die Histidinkinase (HK) BceS wahrgenommen. Vielmehr bedarf es einem Zusammenspiel von BceS und dem assoziierten ABC-Transporter BceAB, um Bacitracin-Stress zu detektieren. Nach Aktivierung der HK BceS kann diese den Response-Regulator (RR) BceR phosphorylieren, was letztlich in der verstärkten Expression des ABC-Transporters *bceAB* resultiert (Rietkötter *et al.*, 2008).

Ein weiteres, auch durch Bacitracin induziertes Detoxifizierungsmodul ist das PsdRS-AB-System (Mascher *et al.*, 2003). Auch hier ist die Transkription des ABC-Transporters PsdAB vom RR PsdR abhängig. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Induktion durch Bacitracin auf einer Kreuzregulation zwischen dem Bce- und dem Psd-System beruht, wobei die HK BceS den RR PsdR phosphoryliert (Rietkötter *et al.*, 2008). Kürzlich wurde herausgefunden, dass das PsdRS-AB-System zum größten Teil durch Lantibiotika, z.B. Nisin, Subtilin, Gallidermin, Actagardin, induziert wird und dabei eine Resistenz gegen diese Substanzen vermittelt (Staroń *et al.*, 2011). Auffällig beim Psd-System ist, dass dieses aber nicht auf alle Lantibiotika reagiert (z.B. Duramycin und Mersacidin). Strukturell unterscheiden sich die beiden letztgenannten Lantibiotika stark von der Peptid-Struktur der Lantibiotika, die PsdRS-AB induzieren. Somit ist zu vermuten, dass das PsdRS-AB-System nur auf bestimmte antimikrobielle Peptidstrukturen reagiert (Staroń *et al.*, 2011).

Über das dritte Detoxifizierungsmodul YxdJK-LM ist nur sehr wenig bekannt. Die Regulation verläuft ebenso wie beim Bce- und Psd-System (Joseph *et al.*, 2004). Als schwacher Induktor des YxdJK-LM-Systems wurde LL-37 beschrieben (Pietiäinen *et al.*, 2005). LL-37 ist ein KAP, das zur Gruppe der Cathelicidine gehört und von menschlichen Immunzellen (Neutrophile) gebildet wird (Turner *et al.*, 1998). Da es aber recht unwahrscheinlich ist, dass das nichtpathogene Bakterium *B. subtilis* in Kontakt mit LL-37 kommt, wird vermutet, dass das Yxd-System wahrscheinlich an der Detoxifizierung von weiteren KAP's beteiligt ist, wobei die spezifischen Induktoren erst noch identifiziert werden müssen (Staroń *et al.*, 2011).

Das LiaRS-2KS stellt ebenfalls ein wichtiges System der Zellhüllstressantwort in *B. subtilis* dar, ist aber nicht mit einem ABC-Transporter assoziiert (Abb.I.4). Das 2KS wird durch das inhibitorische Protein LiaF negativ reguliert, so dass letztlich von einem LiaFSR-Dreikomponentensystem (3KS) gesprochen werden kann (Jordan *et al.*, 2006). Da dieses System Grundbestandteil dieser hier vorliegenden Arbeit ist, soll es im Folgenden näher erläutert werden.

I.5. Das LiaFSR-Dreikomponentensystem in *B. subtilis*

Das LiaFSR-3KS ist in den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt stark konserviert (Jordan *et al.*, 2006). Das 3KS ist im *lia*-Lokus kodiert, der aus sechs Genen, *liaIHGFSR*, besteht (Abb.I.5). Zunächst wurde davon ausgegangen, dass das *lia*-System ein 2KS-System bestehend aus der HK LiaS und dem RR LiaR kodiert. Analysen von

Mutanten zeigten jedoch sehr schnell, dass die LiaR-abhängige Genregulation negativ durch ein weiteres Protein, LiaF, beeinflusst wird, so dass es sich im eigentlichen Sinne um ein 3KS handelt (Jordan *et al.*, 2006). Unter nicht induzierenden Bedingungen werden die letzten vier Gene *liaGFSR* konstitutiv von einem Promotor stromaufwärts des Gens *liaG* exprimiert. Diese Gene kodieren das LiaFSR-3KS sowie LiaG, ein kleines Membranprotein mit unbekannter Funktion. Das Gen *liaG* kommt nur in *B. subtilis* und seinen sehr nahen Verwandten, *Bacillus halodurans* und *Bacillus licheniformis* vor (Jordan *et al.*, 2006).

I.5.1. Induktion des LiaFSR-3KS

Das LiaFSR-3KS wird stark durch Zellwand-Antibiotika induziert, die mit dem Lipid II-Zyklus interferieren, z.B. Bacitracin, Vancomycin, Ramoplanin, Enduracidin, Nisin, kationische antimikrobielle Peptide (Mascher *et al.*, 2003, Mascher *et al.*, 2004, Pietiäinen *et al.*, 2005, Rukmana *et al.*, 2009). Weiterhin wird das LiaFSR-3KS, wenn auch in schwächerer Form, durch alkalischen Schock, Sekretionsstress, Rhamnolipide (Biotenside) und verschiedene Chemikalien (Detergenzien, Ethanol, Phenol) induziert (Hyyryläinen *et al.*, 2005, Mascher *et al.*, 2004, Petersohn *et al.*, 2001, Pietiäinen *et al.*, 2005, Tam le *et al.*, 2006, Wecke *et al.*, 2011, Wiegert *et al.*, 2001). Der *lia*-Lokus wird außerdem in der stationären Phase in Abwesenheit eines externen Signals induziert (Jordan *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass der *liaI*-Promotor in der logarithmischen Wachstumsphase durch das Regulatorprotein AbrB reprimiert wird. Während des Übergangs zur stationären Phase wird der Repressor AbrB durch den Sporulationsregulator Spo0A vom *liaI*-Promotor abgelöst und die Transkription des *lia*-Systems durch einen noch unbekanntem Stimulus initiiert (Jordan *et al.*, 2007).

I.5.2. Regulation und Funktion des LiaFSR-3KS

Generell liegt die Stimuluswahrnehmung durch das LiaFSR-3KS noch im Unklaren. Nach der Autophosphorylierung der HK LiaS wird die Phosphatgruppe auf den RR LiaR übertragen. LiaR kann nun dimerisieren und an P_{liaI} binden, wodurch die Transkription des gesamten *lia*-Lokus aktiviert wird (Abb.I.5). Die Induktion von P_{liaI} ist vollständig LiaR-abhängig, denn in einer $\Delta liaR$ -Mutante ist der *liaI*-Promotor nicht mehr induzierbar (Jordan *et al.*, 2006). Nach Aktivierung von P_{liaI} werden zwei Transkripte gebildet. Das Haupttranskript besteht aus den Genen *liaIH*. Des Weiteren wird jedoch auch das gesamte hexacistronische Operon transkribiert (Mascher *et al.*, 2004).

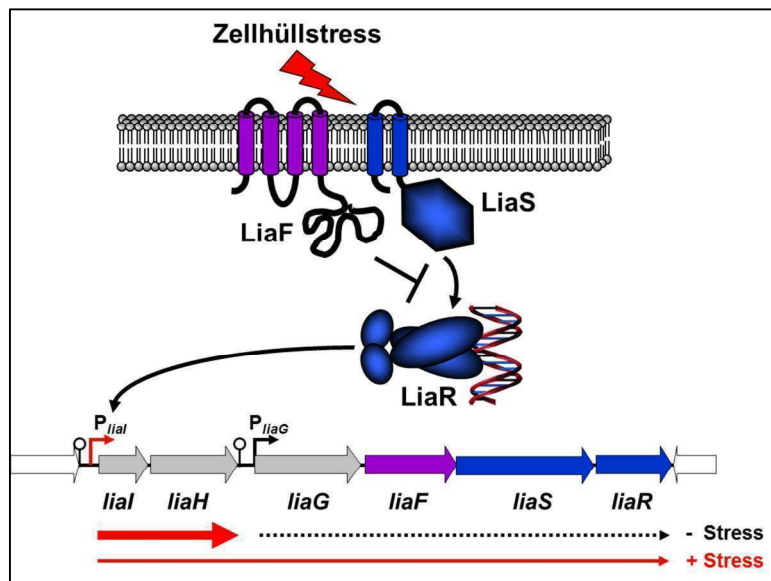


Abb.I.5: Das LiaFSR-3KS und die Regulation des *lia*-Locus in *B. subtilis*. Die Aktivierung des RR LiaR sowie des *liaI*-Promotors sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben. Die Inhibierung des LiaRS-2KS durch LiaF ist durch einen Blockpfeil gekennzeichnet. Schematische Darstellung der Transmembranproteine LiaS (blau) und LiaF (Inhibitor, lila). RR LiaR ist als Dimer dargestellt (blau), welches die Transkription des *lia*-Locus aktiviert. Es werden zwei Transkripte gebildet: Haupttranskript *liaIH* (dicker roter Pfeil), Nebentranskript gesamter *lia*-Locus (dünner roter Pfeil). Konstitutive Expression von *liaGFSR* ist durch gestrichelten Pfeil illustriert. Gebogene Pfeile deuten Promotoren an (P_{liaI} und P_{liaG}). Haarnadelstrukturen vor P_{liaI} und P_{liaG} stellen Terminatoren dar.

Obwohl das *lia*-System durch eine große Anzahl verschiedener Substanzen induziert wird, lässt sich bisher keine spezielle zelluläre Funktion des *lia*-Locus in *B. subtilis* ableiten. Hinweise auf eine mögliche Rolle in der Behebung von Zellmembranschäden ergaben sich jedoch durch kürzlich durchgeführte Untersuchungen. Es wurde beobachtet, dass das *lia*-System sehr stark durch die Antibiotika Daptomycin und Enduracidin induziert wird. Mutanten, bei denen die Gene *liaIH* oder *liaH* deletiert worden sind, zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen beiden Antibiotika (Hachmann *et al.*, 2009, Rukmana *et al.*, 2009). Die Strukturen der beiden Lipodepsipeptid-Antibiotika ähneln sich sehr stark. Obwohl bereits bekannt ist, dass Enduracidin mit Lipid II interagiert, wird nicht ausgeschlossen, dass es auch ähnlich wie Daptomycin agieren könnte. Beide Antibiotika würden demnach die Integrität der Zellmembran zerstören, wodurch eine Zellhüllstressantwort und damit die Induktion des *lia*-Systems hervorgerufen wird (Rukmana *et al.*, 2009). Dies sind jedoch nur Vermutungen, die durch Experimente klar belegt werden müssten. Letztlich bleibt die Frage nach der zellulären Funktion des *lia*-Systems, im speziellen die Funktion der Produkte der eigentlichen Zielgene *liaIH*, offen. Es ist lediglich bekannt, dass das Gen *liaI* für ein potentielles Membranprotein kodiert und dass es sich bei LiaH um ein cytoplasmatisches Protein handelt, welches zur Familie der Phagenschock-Proteine gehört. Die Phagenschock-Proteine sind eine hoch konservierte

Proteinfamilie und ein Homolog von LiaH, PspA ist in *E. coli* bereits gut untersucht worden. Bevor jedoch die Phagenschock-Antwort in *E. coli* näher erläutert wird, soll zunächst in kurzer Form in die Zellhüllstressantwort von Gram-negativen Bakterien eingeführt werden.

I.6. Die Zellhüllstressantwort in Gram-negativen Bakterien am Beispiel *E. coli*

An der Zellhüllstressantwort in *E. coli* sind sechs verschiedene Systeme beteiligt: der ECF σ Faktor σ^E , das CpxPAR-3KS, das BaeSR-2KS, der Rcs-Signalweg, die Vesikel-Antwort sowie die Phagenschock-Antwort (Laubacher & Ades, 2008, McBroom & Kuehn, 2007, Model *et al.*, 1997, Raffa & Raivio, 2002, Raivio & Silhavy, 2001). Alle sechs Systeme reagieren auf Stress, der durch Schäden in der Zellhülle verursacht wird. Da die Zellhülle in den Gram-negativen Bakterien jedoch strukturell anders aufgebaut ist als die Zellwand in den Gram-positiven, ist es nachvollziehbar, dass hier nicht die Schäden in der Peptidoglycanschicht im Vordergrund stehen, sondern vor allem Störungen in der Faltung von Proteinen der inneren und äußeren Membran und des Periplasmas. Eine Ausnahme bildet der Rcs-Signalweg, welcher auf Schäden in der Peptidoglycanschicht reagiert (Laubacher & Ades, 2008). Außerdem wurde eine deutliche Überlappung bei den aktivierenden Signalen sowie den regulierten Zielgenen zwischen den CpxPAR- und BaeSR-Systemen, σ^E und dem Rcs-Signalweg beobachtet. Unklar ist aber, welche(s) spezifische Signal/Molekülstruktur zur Induktion der jeweiligen Systeme führt (Leblanc *et al.*, 2011, Raivio & Silhavy, 1997, Raivio & Silhavy, 2001, Ruiz & Silhavy, 2005).

Der ECF σ Faktor σ^E sowie das CpxPAR-3KS werden durch missgefaltete Proteine in der inneren und äußeren Membran sowie im Periplasma induziert (Alba & Gross, 2004, Raivio & Silhavy, 2001). Unter nicht induzierenden Bedingungen wird σ^E durch den membrangebundenen Anti- σ Faktor RseA in inaktiver Form gehalten (Raivio & Silhavy, 1997). Unter induzierenden Bedingungen wird RseA proteolytisch abgebaut, σ^E wird freigesetzt und kann die Transkription von Zielgenen, welche überwiegend Proteasen und Chaperone kodieren, aktivieren (Raivio & Silhavy, 2001).

Das CpxPAR-3KS besteht aus der membranständigen HK CpxA, dem RR CpxR sowie dem periplasmatisch lokalisierten, negativ regulierenden Protein CpxP (DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Die Zielgene des Cpx-Systems kodieren, ähnlich wie bei σ^E , in der Mehrzahl für Proteasen und Chaperone, die missgefaltete periplasmatische Proteine

degradieren oder korrekt rückfalten sollen (Raivio, 2005). Außerdem ist das Cpx-System wichtig für die Überwachung des Aufbaus von Pili (Duguay & Silhavy, 2004).

Das BaeRS-2KS wird durch antimikrobielle sowie toxische Substanzen, z.B. β -Lactam-Antibiotika, Gallensalze, Novobiocin, aber auch durch missgefaltete Proteine und oxidativen Stress induziert (Hirakawa *et al.*, 2003, Raffa & Raivio, 2002). Die Aktivierung des 2KS erfolgt dabei auf dem klassischen Weg. Die HK BaeS aktiviert den RR BaeR durch Übertragung eines Phosphatrestes. Der aktivierte RR BaeR kann somit dimerisieren und anschließend die Transkription der Zielgene initiieren (Leblanc *et al.*, 2011, Raffa & Raivio, 2002). Zwei der Zielgene der BaeR-abhängigen Regulation kodieren für einen *Multidrug efflux* ABC-Transporter, der wahrscheinlich dazu dient toxische Substanzen aus der Zelle und dem Periplasma abzutransportieren (Raffa & Raivio, 2002, Raivio, 2005).

Der Rcs-Signalweg wird bei Schäden des Peptidoglycans durch antibiotische Stoffe, z.B. β -Lactam-Antibiotika, induziert (Laubacher & Ades, 2008). Unter Stress wird dabei zunächst ein 2KS, welches aus der HK RcsC und dem RR RcsB besteht, aktiviert. Der phosphorylierte RR RcsB kann nun mit einem weiteren Protein, RcsA, ein Heterodimer bilden und die Transkription von *cps* induzieren (Gottesman *et al.*, 1985, Sailer *et al.*, 2003). Das *cps*-Operon kodiert für Enzyme, die Colansäure synthetisieren (Stout, 1996). Colansäure ist ein Exopolysaccharid, welches für den Aufbau einer Schleimkapsel und somit im Zellohüllenschutz dient (Danese *et al.*, 2000).

Bei der Vesikel-Antwort in *E. coli* werden Vesikel der äußeren Membran gebildet, die als Unterstützung der anderen Zellohüllstressantwort-Systeme fungieren. Generell werden Vesikel während aller Wachstumsphasen sekretiert und dienen vielfältigen Funktionen, z.B. in der Virulenz von pathogenen Bakterien oder in der Erschließung von Nahrungsquellen durch Ausschüttung von extrazellulären Enzymen. In der Zellohüllstressantwort haben Vesikel die Funktion, dass in ihnen schädliche Substanzen verpackt werden und damit unschädlich gemacht werden können. Obwohl die Regulation von Vesikeln unter Stressbedingungen gänzlich unbekannt ist, stellen Vesikel dennoch eine einfache Art des Stress-Managements in *E. coli* dar (Kuehn & Kesty, 2005, McBroom *et al.*, 2006, McBroom & Kuehn, 2007).

Die Phagenschock-Antwort in *E. coli* wird vor allem durch Substanzen, die die Integrität sowie die elektronenmotorische Kraft (*proton motive force*) der Zellmembran zerstören, induziert (Model *et al.*, 1997). Aufgrund dass das Phagenschock-Protein A in *E. coli* ein

Homolog zu LiaH aus *B. subtilis* darstellt und Gemeinsamkeiten zwischen beiden Systemen existieren, soll nun die Phagenschock-Antwort im Detail vorgestellt werden.

I.7. Die Phagenschock-Antwort in *E. coli*

Der Anfang der Untersuchung der Phagenschock-Antwort basierte auf der Entdeckung eines Proteins, welches nach Infektion mit dem filamentösen Bakteriophagen f1 in *E. coli* Zellen stark exprimiert wurde. Die Expression von PspA (*Phage-shock-protein A*) wurde jedoch nicht durch die Bakteriophagen-Infektion selbst hervorgerufen, sondern durch das Phagen-Protein IV, welches als Porin (Sekretin) in die äußere Membran der Zellwand integriert (Brissette *et al.*, 1990, Brissette *et al.*, 1991). PspA ist im *pspABCDE*-Operon kodiert (Brissette *et al.*, 1991). Das bisher bekannte Regulon der Phagenschock-Antwort umfasst neben dem *psp*-Operon noch zwei weitere Gene, *pspF* und *pspG* (Abb.I.6).

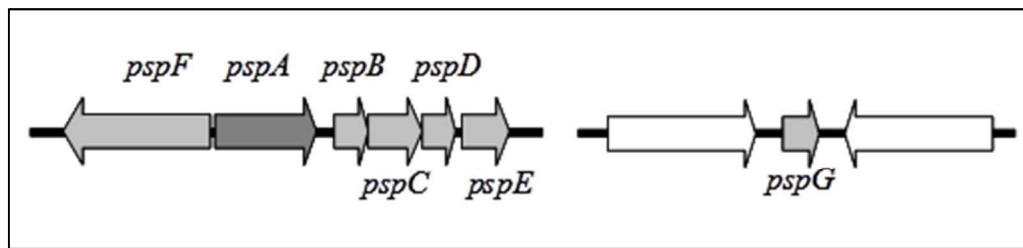


Abb.I.6: Das *psp*-Operon von *E. coli*, das Operon besteht aus zwei Genloci (*pspABCDE* und *pspG*) die Gesamtlänge des Operons beträgt ca. 3 kb, *psp*-Gene sind grau unterlegt, Haupttranskript des *psp*-Operons ist *pspA* (dunkelgrau), stromaufwärts und stromabwärts angrenzende Gene sind weiß dargestellt

I.7.1. Induktion der Phagenschock-Antwort

Das *psp*-Operon wird durch eine große Anzahl intra- sowie extrazellulärer Stresse induziert. So führen beispielsweise extremer Hitzeschock (50°C), Ethanol (10%), hyperosmotischer Stress durch NaCl oder Sukrose und Proton-Ionophore wie CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon) oder Dinitrophenol, die eine Depolarisierung der Zellmembran auslösen, zur Transkriptionsinduktion des *psp*-Operons (Brissette *et al.*, 1990, Weiner *et al.*, 1991). Die Induktion geschieht aber auch unter Stress, der durch Überexpression oder Missfaltung von Porin-Proteinen (Sekretinen) in der äußeren Membran ausgelöst wird, oder der durch die Unterbrechung der Fettsäurebiosynthese und damit einhergehenden Veränderung in der Komposition der Membran sowie der Lipopeptide hervorgerufen wird (Bergler *et al.*, 1994, Bosch & Tommassen, 1987). Eine starke Akkumulation von Protein-Vorläufern an oder in der Zellmembran sowie Defekte im Sec- und Tat-Translokationsweg führen zu Sekretionsstress. Auch dies ist ein Induktionssignal für die Phagenschock-Antwort in *E. coli* (DeLisa *et al.*, 2004, Jones *et al.*,

2003, Kleerebezem & Tommassen, 1993, van der Laan *et al.*, 2003). Zusammenfassend beeinflussen alle genannten Induktoren die Integrität der Zellhülle oder setzen die elektronenmotorische Kraft (*proton motive force*) der Zellmembran herab, was letztendlich in der Induktion der Phagenschock-Antwort von *E. coli* resultiert. Auch die stationäre Wachstumsphase ist durch Schwankungen im Energiehaushalt gekennzeichnet und die Ausscheidung von zellulären Stoffwechselendprodukten beeinträchtigt den pH-Wert der Umgebung in dem sich die Zellen befinden. Somit ist es nicht verwunderlich, dass auch hier eine Induktion der Phagenschock-Antwort zu beobachten ist (Weiner & Model, 1994).

I.7.2. Regulation der Phagenschock-Antwort

Die Transkription des *psp*-Operons sowie des Gens *pspG* unter Stressbedingungen ist sowohl von einem σ Faktor, σ^{54} , als auch vom *Enhancer*-Protein PspF abhängig (Lloyd *et al.*, 2004, Weiner *et al.*, 1991). Bei PspF handelt es sich um eine AAA⁺-ATPase, welche aus einer N-terminalen AAA⁺-ATPase- und σ^{54} -Interaktions-Domäne sowie einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne besteht. Durch Bindung des *Enhancer*-Proteins PspF an eine stromaufwärts vom *pspA*-Promotor liegende Aktivierungssequenz und der anschließenden Interaktion mit der RNA-Polymerase und σ^{54} wird die Transkription initiiert (Studholme & Dixon, 2003). Unter nicht induzierenden Bedingungen fungiert PspA als negativer Regulator, indem dieses eine Protein-Protein-Interaktion mit PspF eingeht und durch Kontrolle der ATPase-Aktivität eine Transkriptionsinitiierung unterbindet (Dworkin *et al.*, 2000, Joly *et al.*, 2010, Jovanovic *et al.*, 1996, Lloyd *et al.*, 2004, Weiner *et al.*, 1991). Die konstitutive Transkription des Gens *pspF* durch die RNA-Polymerase erfolgt mit Hilfe des primären σ Faktors σ^{70} (Jovanovic *et al.*, 1996). Das Phagenschock-Protein A ist ein an die Zellmembran assoziiertes cytoplasmatisches Protein, das in oligomeren Ringstrukturen aus 36 Monomeren komplexieren und dadurch ein Molekulargewicht von bis zu 2 MDa besitzen kann (Hankamer *et al.*, 2004, Standar *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass diese großen Komplexe eine Funktion bei der Behebung von Membranschäden und dem damit einhergehenden Energieverlust haben (Kleerebezem *et al.*, 1996, Kobayashi *et al.*, 2007). Für die Inhibition von PspF sind jedoch PspA-Hexamere nötig, die wiederum mit sechs Monomeren PspF interagieren. Dies bedeutet, dass PspA funktional in zwei verschiedenen oligomeren Komplexen auftritt (Engl *et al.*, 2009, Joly *et al.*, 2009). Unter Zellhüllstress interagieren die Membranproteine PspB und PspC mit PspA, wodurch PspA an die Zellmembran assoziiert wird. Dabei wird die Interaktion zwischen PspA und PspF gelöst und die Transkription des *psp*-Operons sowie

des Gens *pspG* aktiviert (Adams *et al.*, 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die periplasmatische Domäne von PspC Stresssignale empfangen kann und diese dann an PspB und PspA weiterleitet (Adams *et al.*, 2003). Eine andere Vermutung besteht darin, dass das ArcAB-2KS, welches den Übergang der Zellen von der aeroben Atmung zur Fermentation reguliert, an der Signalübertragung und Induktion der Phagenschock-Antwort beteiligt ist. Diese Regulierung findet jedoch nur unter mikroaerophilen Bedingungen statt, wobei die HK ArcB das Signal empfängt und über PspB an PspC weiterleitet (Jovanovic *et al.*, 2009, Jovanovic *et al.*, 2006). Bei einer Deletion des ArcAB-2KS kann die Phagenschock-Antwort aber dennoch induziert werden. Außerdem wurde auch herausgefunden, dass es unter anaeroben Bedingungen keiner Aktivierung von PspBC und dem ArcAB-2KS bedarf, um das Psp-System zu induzieren (Jovanovic *et al.*, 2009). Hier wird vermutet, dass der PspA-PspF Komplex selbst Stresssignale wahrnehmen kann. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass in anderen Organismen, z.B. *Streptomyces lividans* nur Homologe von PspA kodiert sind. Homologe von PspBC fehlen oftmals (Joly *et al.*, 2010, Vrancken *et al.*, 2007). Zusammenfassend existieren also sehr viele Spekulationen, wie die Phagenschock-Antwort in *E. coli* induziert und welches genaue Signal dabei von welchem Protein wahrgenommen wird (Joly *et al.*, 2010).

Durch die bereits intensiv durchgeführten Untersuchungen der Phagenschock-Antwort konnte aber klar demonstriert werden, dass es sich bei den Membranproteinen PspD und PspG, ähnlich wie bei PspA, um Effektorproteine handelt (Joly *et al.*, 2010, Lloyd *et al.*, 2004). PspD und PspG rufen verschiedene zelluläre Effekte hervor, die alle der Erhaltung der elektronenmotorischen Kraft der Zelle dienen. Die Funktion von PspE hingegen ist völlig unklar. Bisher ist nur bekannt, dass PspE eine Rhodanese-Aktivität besitzt, die eventuell an der Detoxifizierung von Zyanid oder Schwermetallen beteiligt ist (Adams *et al.*, 2003, Joly *et al.*, 2010, Adams *et al.*, 2002).

I.7.3. Rolle der Phagenschock-Antwort im Energiestoffwechsel

In Abschnitt I.7.2. wurde bereits beschrieben, dass die Phagenschock-Antwort generell durch verschiedene Arten von Stress induziert wird, die die Zellhüllintegrität beeinträchtigen sowie die elektronenmotorische Kraft der Zellmembran erheblich stören. Die Gene, die die Proteine der Phagenschock-Antwort in *E. coli* kodieren, sind jedoch nicht essentiell. *E. coli* ist also auch mit einer Deletion des Psp-Systems überlebensfähig, wobei sich aber gezeigt hat, dass das Energieniveau dieser Zellen deutlich reduziert ist (Darwin, 2005, Joly *et al.*, 2010). Somit könnte die Hauptfunktion der Phagenschock-

Antwort in der Aufrechterhaltung der elektronenmotorischen Kraft der Zelle liegen (Darwin, 2005, Joly *et al.*, 2010, Kleerebezem *et al.*, 1996). Diese Hypothese konnte auch schon durch verschiedene Experimente untermauert werden. So konnte gezeigt werden, dass PspA einem Protonenverlust, hervorgerufen durch die Sekretion eines defekten Porins (PhoE), entgegenwirkt (Kleerebezem *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte mittels aufgereinigtem PspA Protonen-Lecks in Membranvesikeln verschlossen werden (Kobayashi *et al.*, 2007). Der genaue Mechanismus der Sicherstellung der elektronenmotorischen Kraft durch die Phagenschock-Antwort (PspA) ist dennoch weiterhin unklar (Joly *et al.*, 2010). Gegen die Hypothese, dass große oligomere Komplexe von PspA (Standar *et al.*, 2008) einem Protonenverlust an der Zellmembran entgegenwirken, spricht, dass kürzlich mittels Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt wurde, dass PspA und PspG sowohl an den Zellpolen als auch spiralförmig in der Zelle beweglich sind. Diese spiralförmige Beweglichkeit ist mit dem Cytoskelett in der Zelle, wahrscheinlich sogar mit MreB, assoziiert, denn diese Beweglichkeit verschwindet, wenn die Zellen mit A22, einem Inhibitor von MreB, behandelt worden sind (Engl *et al.*, 2009). Es wurde postuliert, dass die Phagenschock-Antwort in Verbindung mit der Zellwandbiosynthese und anderen MreB-assoziierten Proteinen (z.B. *Penicillin-binding proteins*) steht, um hier stabilisierend auf die elektronenmotorische Kraft der Zelle zu wirken und eventuelle Zellhüll-Schäden zu reparieren (Engl *et al.*, 2009). Nachdem bekannt war, dass die Phagenschock-Antwort durch das Ionophor CCCP induziert werden kann, wurde untersucht, ob die Zerstörung der elektronenmotorischen Kraft das eigentliche Signal für die Induktion des Psp-Systems ist. Die elektronenmotorische Kraft der Zellmembran besteht aus dem Protonengradienten (ΔH^+) und dem Elektronen-Potential ($\Delta \psi$). Mittels der antibiotischen Substanz Valinomycin lässt sich das Elektronen-Potential ($\Delta \psi$) zerstören, indem K^+ -Ionen ins Cytoplasma strömen. Acetat wirkt im Cytoplasma protonierend und verhindert dadurch den Aufbau des Protonengradienten (ΔH^+). Die Versuche ergaben, dass weder die Zerstörung des Elektronen-Potentials noch die Verhinderung des Protonengradienten induzierend auf das Psp-System einwirkt (Engl *et al.*, 2011). Vielmehr ist es wahrscheinlich ein Zusammenspiel vieler Faktoren, die letztlich zu Induktion des Psp-Systems führen (Engl *et al.*, 2011, Joly *et al.*, 2010).

Auch die Proteinsekretion ist ein stark energieabhängiger Vorgang und somit ist es selbsterklärend, dass auch bei Defekten in der Sekretionsmaschinerie eine Induktion der Phagenschock-Antwort zu beobachten ist (Jones *et al.*, 2003). Die beiden Hauptwege der Sekretion, SecYEG- und Tat-Translokation, beziehen ihre Energie aus der

elektronenmotorischen Kraft der Zellmembran. Eine Deletion der Untereinheiten (*secA*, *secD*, *secE*, *secM*) des SecYEG-Translokationskomplexes führt zur Aktivierung des Psp-Systems (Jones *et al.*, 2003, Kleerebezem & Tommassen, 1993). Ähnliches wurde auch bei Mutationen in den Genen *tatABCDE* der Tat-Sekretionsmaschinerie beobachtet (DeLisa *et al.*, 2004). Aber auch hier ist das genaue Signal für die Phagenschock-Antwort unklar. Die Vermutung liegt darin, dass als Signal wahrscheinlich eine Anhäufung von missgefalteten Proteinen und nicht korrekt assemblierte Translokationseinheiten innerhalb der Zellmembran in Frage kommen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Untersuchung einer YidC-Deletionsmutante. YidC ist eine Insertase, welches essentiell für die Insertion von Membranproteinen des SecYEG-Sekretionsweges ist. Eine Deletion von YidC führt zu einer starken Induktion der Phagenschock-Antwort (van der Laan *et al.*, 2003). Da YidC außerdem eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der F₁F₀ ATPase sowie der Cytochrom-*o*-Oxidase der Atmungskette spielt, wirkt sich eine Deletion von YidC letztlich negativ auf die elektronenmotorische Kraft und der daraus resultierenden Energiegewinnung der Zelle aus (van der Laan *et al.*, 2003). In anderen Studien in *Yersinia enterocolytica* und *E. coli* wurde außerdem beobachtet, dass eine Deletion der F₁F₀ ATPase zur Induktion der Phagenschock-Antwort führt (Maxson & Darwin, 2004). Zusammenfassend bedeutet dies, dass Störungen und Modifikationen der Membranzusammensetzung und die daraus resultierende Auswirkung auf die elektronenmotorische Kraft der Zelle das auslösende Signal für die Phagenschock-Antwort darstellen.

I.8. Die Phagenschock-Antwort in anderen Organismen

I.8.1. γ -Proteobakterien

Die Phagenschock-Antwort in *Y. enterocolytica*, einem pathogenen Darmbakterium, besteht aus dem *pspABCDycjXF*-Operon, *pspF* sowie *pspG* und wird auf gleiche Weise wie in *E. coli* reguliert und induziert (Darwin, 2005, Darwin & Miller, 2001, Green & Darwin, 2004, Maxson & Darwin, 2004, Maxson & Darwin, 2006). Ein Homolog von *pspE* konnte bisher nicht identifiziert werden (Darwin & Miller, 2001). Eine Besonderheit der transkriptionellen Regulation der Phagenschock-Antwort in *Y. enterocolytica* liegt in der kürzlichen Identifizierung zweier σ^{54} -unabhängiger Promotoren, die stromaufwärts sowie stromabwärts von *pspA* lokalisiert sind (Maxson & Darwin, 2006). Es wird vermutet, dass beide Promotoren für die konstitutive Expression von *pspA* und

stromabwärts liegender Gene verantwortlich sind. Unbekannt ist aber, unter welchen Bedingungen diese konstitutive Expression stattfindet (Maxson & Darwin, 2006).

Der Psp-Lokus ist für die Virulenz von *Y. enterocolytica* von essentieller Bedeutung (Darwin & Miller, 2001, Darwin & Miller, 1999). So wurde bereits demonstriert, dass die Phagenschock-Antwort aktiviert ist, wenn das Ysc-Typ III Sekretionssystem exprimiert wird (Darwin & Miller, 2001). Das Ysc-Typ III Sekretionssystem ist zusammen mit Effektorproteinen auf einem Virulenzplasmid kodiert, welches für die Kolonisierung im Darm des Wirtes unabdingbar ist (Cornelis *et al.*, 1998). Die Induktion dieses Virulenzplasmids führt zur Produktion von Sekretinen, die wiederum in einer Aktivierung der Phagenschock-Antwort resultieren. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Proteine PspB und PspC dabei nicht nur für die Induktion der Phagenschock-Antwort von erheblicher Bedeutung sind, sondern auch, während der Expression von (virulenten) Sekretinen, für ein normales Zellwachstum sorgen (Darwin & Miller, 2001, Maxson & Darwin, 2004, Maxson & Darwin, 2006). Neben der Induktion durch Sekretine wird die Phagenschock-Antwort in *Y. enterocolytica* durch die Überexpression von integralen Membranproteinen, z.B. AmpE induziert (Maxson & Darwin, 2004). Auch eine Deletion der F₁F₀ ATPase in *Y. enterocolytica* führt unter alkalischen Wachstumsbedingungen (pH 8) zu einer starken Induktion der Phagenschock-Antwort (Maxson & Darwin, 2004). Ebenso wurde beobachtet, dass eine Inhibition der Zellwandbiosynthese, ausgelöst durch die Deletion von *glmS*, in einer Aktivierung der Phagenschock-Antwort als auch anderer Stressantwort-Systeme (Cpx, RpoE) resultiert (Maxson & Darwin, 2004). GlmS ist ein Enzym, das innerhalb der Glycolyse bei der Generierung von Glucosamin-6-Phosphat aktiv ist. Glucosamin-6-Phosphat wiederum ist ein Ausgangsmolekül für die Synthese von Peptidoglycan und LPS.

Ein weiteres pathogenes Bakterium, bei dem die Phagenschock-Antwort eine wichtige Rolle in der Virulenz ausführt, ist *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium). Hier konnte gezeigt werden, dass das *pspABCDE*-Operon sowie *pspG*, während der Infektion von Makrophagen oder Epithelzellen, stark induziert ist (Darwin & Miller, 2001, Eriksson *et al.*, 2003). Eine Funktion von PspA als Virulenzfaktor bei der Infektion von Balb/c-Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden (Hassani *et al.*, 2009).

Im Allgemeinen wird die Phagenschock-Antwort in *S. enterica* auch ähnlich wie in *E. coli* und *Y. enterocolytica* induziert und reguliert (Darwin, 2005, Model *et al.*, 1997). Außerdem konnte demonstriert werden, dass PspA in *S. enterica* unter Stressbedingungen, die mit dem Verlust der elektronenmotorischen Kraft einhergehen, eine kompensatorische

Funktion übernimmt. Des Weiteren ist bekannt, dass die Phagenschock-Antwort bei Abwesenheit der σ^E -abhängigen Stressantwort (siehe Abschnitt I.6.) in *S. enterica* stark induziert wird (Becker *et al.*, 2005). Ebenso wie in *Y. enterocolytica* führt auch eine Deletion der F_1F_0 ATPase unter alkalischen Wachstumsbedingungen in *S. enterica* zur Induktion der Phagenschock-Antwort (Becker *et al.*, 2005, Darwin, 2005).

1.8.2. Actinobakterien

Während die Phagenschock-Antwort in den Gram-negativen Bakterien bereits sehr gut untersucht ist, ist über die Phagenschock-Proteine sowie die Phagenschock-Antwort in den Gram-positiven Bakterien nur wenig bekannt. Das Actinobakterium *Streptomyces lividans* ist ein Vertreter bei dem die Phagenschock-Antwort bereits gut charakterisiert ist. Dabei wurde herausgefunden, dass nur *pspA* im Genom von *S. lividans* kodiert ist. Homologe weiterer Phagenschock-Proteine konnten bisher nicht identifiziert werden (Vrancken *et al.*, 2008). Begründet in der Tatsache, dass PspA-Homologe jedoch in fast allen Phyla des Lebens (Archeaen, Bakterien, Pflanzen) konserviert sind, lässt darauf schließen, dass PspA, trotz der Abwesenheit von PspBC, eine wichtige zelluläre Funktion zu übernehmen scheint. In *S. lividans* scheint PspA, ähnlich wie in *E. coli*, eine wichtige Rolle beim Überleben der Zellen unter alkalischen Bedingungen (pH 9) zu übernehmen (Vrancken *et al.*, 2008). Auch zeigen $\Delta pspA$ -Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber extrazellulären Stressfaktoren, z.B. Ethanol, hyperosmotischer Schock, Natriumdodecylsulfat. Des Weiteren wird die Expression von *pspA* in *S. lividans* durch Bacitracin, Ethanol, Natriumdodecylsulfat sowie CCCP induziert (Vrancken *et al.*, 2008). Außerdem konnte bereits nachgewiesen werden, dass PspA sowohl im Cytoplasma als auch an der Innenseite der Zellmembran von *S. lividans* lokalisiert ist, was für eine Interaktion mit einem noch unbekanntem Membranprotein spricht (Vrancken *et al.*, 2008). Ein weiterer wichtiger Aspekt der PspA-Antwort in *S. lividans* ist, dass eine Überproduktion von PspA zu einer verstärkten Proteinsekretion über den SecYEG- und Tat-Translokationskomplex führt, jedoch eine Deletion von *pspA* nicht in einer Verminderung der Proteinsekretion resultiert (Vrancken *et al.*, 2007, Vrancken *et al.*, 2008).

1.8.3. Cyanobakterien und Pflanzen

Wie oben angesprochen, sind PspA-Homologe auch in den Cyanobakterien und höheren Pflanzen stark konserviert. Das PspA-Homolog Vipp1 kommt ubiquitär in den

Cyanobakterien (z.B. *Synechocystis*) und den Chloroplasten in z.B. *Arabidopsis thaliana* oder *Chlamydomonas reinhardtii* vor (Kroll *et al.*, 2001, Nordhues *et al.*, 2012, Westphal *et al.*, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass *vipp1* evolutionär durch eine Gen-Duplikation von *pspA* entstanden ist, wobei Vipp1 durch eine C-terminale Verlängerung von etwa 30 Aminosäuren gekennzeichnet ist (Westphal *et al.*, 2001). Eine potentielle Funktion des C-Terminus wird in der Interaktion von Vipp1 mit anderen Proteinen vermutet (Aseeva *et al.*, 2004). In den Eukaryoten ist *vipp1* im Zellkern kodiert. Nach Transkription und Translation, wird Vipp1 über den Toc-Tic-Translokationsweg aus dem Cytoplasma heraus in den Chloroplasten transportiert (Kouranov & Schnell, 1996, Vothknecht *et al.*, 2012). In der Erbse (*pea*) konnte bereits demonstriert werden, dass Vipp1 an der inneren Chloroplastenmembran mit dem Tic-Translokationsweg sowie den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 interagiert (Heide *et al.*, 2009, Jouhet & Gray, 2009, Liu *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2005). Vipp1 bildet, ähnlich wie PspA in *E. coli*, oligomere Proteinringe mit einer 12-17-fachen Rotationsymmetrie, die in den eukaryotischen Chloroplasten an die Thylakoidenmembran, ebenso wie in den Cyanobakterien an die innere Membran assoziiert vorkommen (Aseeva *et al.*, 2004, Bultema *et al.*, 2010, Fuhrmann *et al.*, 2009, Srivastava *et al.*, 2005). Dabei wird vermutet, dass die Chaperone Hsp70 und Hsp40 für die Formation der oligomeren Ringstrukturen von Bedeutung sind (Liu *et al.*, 2007, Vothknecht *et al.*, 2012). Obwohl die exakte Funktion von Vipp1 bisher nicht aufgeklärt werden konnte, äußert sich eine Deletion von Vipp1 in einem Ausbleiben der Thylakoiden-Biogenese, was wiederum in einer Verminderung der photosynthetischen Aktivität resultiert (Kroll *et al.*, 2001, Westphal *et al.*, 2001).

I.9. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Lia-System in *B. subtilis* und das Psp-System in *E. coli* besitzen eine ganze Reihe von Gemeinsamkeiten. Beide Systeme sind wichtige Bestandteile der Zellhüllstressantwort in den jeweiligen Organismen. Eine Überschneidung des Lia- und des Psp-Systems ist nicht nur in der Kodierung der Phagenschock-Homologe LiaH und PspA zu finden, sondern auch im Induktoren-Spektrum beider Systeme. So sind beide Systeme durch Hitzestress, osmotischen Stress oder Substanzen wie Ethanol und Detergenzien induzierbar. Zur Induktion des Lia-Systems sowie des Psp-Systems führt letztlich eine große Anzahl von Substanzen und Stresszuständen, die alle in einer Beeinträchtigung der Zellhüllintegrität resultieren. Auch werden beide Systeme ohne externen Stimulus in der stationären Phase induziert (Jordan *et al.*, 2007, Weiner & Model, 1994). Eine weitere Gemeinsamkeit ist,

dass beide Systeme durch membranständige Proteine Zellhüllstresssignale wahrnehmen und weiterleiten können (siehe Abschnitte I.5.2. und I.7.2.).

Die Grundlagen für die Durchführung der hier vorliegenden Arbeit bilden bereits bekannte Ergebnisse in den Untersuchungen des Psp-Systems in *E. coli* und des Lia-Systems in *B. subtilis*. Ziel dieser Arbeit ist die detaillierte Untersuchung und funktionale Charakterisierung des Phagenschock-Proteins LiaH in *B. subtilis*, wobei auch diskutiert werden soll, ob das Lia-System aufgrund seiner vielfältigen Gemeinsamkeiten mit dem Psp-System in *E. coli* eine Art Phagenschock-Antwort in Gram-positiven Bakterien darstellt.

Im Kapitel II wird dabei zunächst aufgeklärt, welche Gene das LiaR-Regulon umfasst. Anschließend sollen durch eine umfassende phänotypische Analyse von *liaH*-Mutanten erste Einblicke in die funktionale Rolle von LiaH gewonnen werden. Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass LiaH ähnlich wie PspA in *E. coli* ringförmige Strukturen ausbildet (Falk Kalamorz, Diplomarbeit (2005)). Die Untersuchung dieser oligomeren Strukturen von LiaH ist ein weiterer Teil des Kapitels II. Alle Ergebnisse des Kapitel II sind bereits veröffentlicht worden (Wolf *et al.*, 2010) und sind als Originalpaper in diese Arbeit eingebunden.

Kapitel III besteht ebenfalls aus einem Originalpaper (Rietkötter *et al.*, 2008), welches die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wahrnehmung des Antibiotikums Bacitracin durch die bekannten Zellhüllstress-detektierenden Systeme in *B. subtilis* enthält. Diese Untersuchungen wurden mittels β -Galaktosidase-Assay sowie Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass das Bce-System hochspezifisch auf Bacitracin reagiert, wohingegen sich beim Lia-System erst bei sehr hohen Bacitracin-Konzentrationen eine Reaktion auslösen lässt. Außerdem stellt das Bce-System eine Resistenzdeterminante gegenüber Bacitracin dar, was darauf schließen lässt, dass das Bce-System Bacitracin direkt detektieren kann (*drug sensing*). Die Ergebnisse des Lia-Systems deuten dagegen darauf hin, dass dieses System indirekt auf Zellhüllstress-auslösende Substanzen reagiert (*damage sensing*).

Nachdem die in Kapitel II beschriebene detaillierte phänotypische Analyse wenig Hinweise auf die zelluläre Rolle von LiaH erbracht hat, soll in Kapitel IV das Hauptaugenmerk auf die Beziehung zwischen LiaI und LiaH gelegt werden. Beide Gene sind in einem Operon organisiert und werden nach Induktion des *lia*-Lokus stark transkribiert. Es ist daher anzunehmen, dass beide Proteine eine funktionale Einheit in *B.*

subtilis bilden. Die Untersuchung beider Proteine soll dabei sowohl auf biochemischer als auch auf mikroskopischer Ebene stattfinden. Die TIRF-Mikroskopie wurde hierbei von Julia Domínguez-Escobar in Kooperation mit dem MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Durch die mikroskopische Analyse soll vor allem die zelluläre Dynamik sowie Interaktionen zwischen LiaI und LiaH untersucht werden. Die Funktion von Phagenschock-Proteinen geschieht in vielen Fällen über Protein-Protein-Interaktionen (siehe PspA→PspF in *E. coli*, Abschnitt I.7.2). Aus diesem Grund soll eine eingehende Analyse von potentiellen LiaH-Interaktionspartnern mittels *Bacterial-Two-Hybrid-Assays* (BACTH) durchgeführt werden. Durch diese Analyse sollen mögliche Interaktionspartner von LiaH identifiziert werden, die wiederum auf die Funktion von LiaH schließen lassen könnten. Die Ergebnisse des Kapitels IV sind Grundlagen eines Manuskriptes, welches in naher Zukunft fertiggestellt werden soll (Wolf & Domínguez-Escobar et al., 2012, in Vorbereitung).

In Kapitel V soll die zelluläre Funktion von LiaH aus einem anderen Blickwinkel betrachtet werden. Die Grundlage hierfür besteht zum einem aus dem Wissen, dass die Proteinsekretion durch Phagenschock-Proteine beeinflussbar ist (siehe Abschnitt I.7.3.). Analysen des Sekretoms (Gesamtanteil extrazellulärer Proteine) von *B. subtilis* Wildtyp sowie *lia*-Mutanten sollen dabei zunächst Aufschluss darüber geben, ob LiaH einen Einfluss auf die Proteinsekretion ausübt. Anschließend sollen die dabei ermittelten Ergebnisse detaillierter erforscht werden. Ein weiterer Teil des Kapitels V ist die Untersuchung der Rolle von LiaH im Energiestoffwechsel. Wie weiter oben beschrieben, wird die Hauptfunktion der Phagenschock-Antwort in *E. coli* in der Aufrechterhaltung der elektronenmotorischen Kraft der Zelle unter Stressbedingungen vermutet. Diese Funktion soll nun auch für das Lia-System untersucht werden.

In-Depth Profiling of the LiaR Response of *Bacillus subtilis*

Diana Wolf, Falk Kalamorz, Tina Wecke, Anna Juszczak, Ulrike Mäder, Georg Homuth, Sina Jordan, Janine Kirstein, Michael Hoppert, Birgit Voigt, Michael Hecker, und Thorsten Mascher, 2010

Journal of Bacteriology 192: 4680–4693

Mitwirkung der Autoren:

Diana Wolf, Falk Kalamorz, Tina Wecke, Anna Juszczak, Sina Jordan und Janine Kirstein führten die Experimente durch und trugen zur Auswertung dieser bei. Ulrike Mäder und Georg Homuth erstellten die initiale Transkriptom-Analyse. Michael Hoppert unterstützte die Auswertung der elektronenmikroskopischen Daten. Birgit Voigt und Michael Hecker halfen bei der Durchführung sowie Auswertung der Proteom-Analysen. Diana Wolf und Thorsten Mascher entwickelten die erforderlichen Experimente und haben das Paper geschrieben.

In-Depth Profiling of the LiaR Response of *Bacillus subtilis*^{∇†}

Diana Wolf,¹ Falk Kalamorz,^{2#} Tina Wecke,¹ Anna Juszcak,¹ Ulrike Mäder,³ Georg Homuth,³
Sina Jordan,² Janine Kirstein,^{4§} Michael Hoppert,² Birgit Voigt,⁵
Michael Hecker,⁵ and Thorsten Mascher^{1*}

Department of Biology I, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany¹; Department of General Microbiology, University of Göttingen, Göttingen, Germany²; Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, Department for Functional Genomics, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany³; Department of Microbiology, Free University, Berlin, Germany⁴; and Department of Microbial Physiology, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany⁵

Received 11 May 2010/Accepted 2 July 2010

The Lia system, a cell envelope stress response module of *Bacillus subtilis*, is comprised of the LiaRS two-component system and a membrane-anchored inhibitor protein, LiaF. It is highly conserved in the Firmicutes bacteria, and all orthologs investigated so far are activated by cell wall antibiotics. In response to envelope stress, the systems in Firmicutes cocci induce the expression of a number of genes that are involved in conferring resistance against its inducers. In contrast, a complete picture of the LiaR regulon of *B. subtilis* is still missing and no phenotypes could be associated with mutants lacking LiaRS. Here, we performed genome-wide transcriptomic, proteomic, and in-depth phenotypic profiling of constitutive “Lia ON” and “Lia OFF” mutants to obtain a comprehensive picture of the Lia response of *Bacillus subtilis*. In addition to the known targets *liaIH* and *yhcYZ-yhdA*, we identified *ydhE* as a novel gene affected by LiaR-dependent regulation. The results of detailed follow-up gene expression studies, together with proteomic analysis, demonstrate that the *liaIH* operon represents the only relevant LiaR target locus *in vivo*. It encodes a small membrane protein (LiaI) and a phage shock protein homolog (LiaH). LiaH forms large oligomeric rings reminiscent of those described for *Escherichia coli* PspA or *Arabidopsis thaliana* Vipp1. The results of comprehensive phenotype studies demonstrated that the gene products of the *liaIH* operon are involved in protecting the cell against oxidative stress and some cell wall antibiotics. Our data suggest that the LiaFSR system of *B. subtilis* and, presumably, other Firmicutes bacilli coordinates a phage shock protein-like response.

The cell envelope is an essential structure of the bacterial cell, and its integrity is crucial for survival. Accordingly, it is closely monitored in both Gram-negative and Gram-positive bacteria to sense and counteract damages before they can disrupt its functionality. The regulatory networks orchestrating the cell envelope stress response (CESR) have been characterized in detail in the two model organisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (28, 41).

In both organisms, the major regulatory principles coordinating the CESR are two-component systems (TCS) and extracytoplasmic function (ECF) σ factors. In *E. coli*, the key components to counteract damages to the cell envelope are the CpxAR TCS and the ECF σ factor σ^E . Moreover, the BaeRS TCS and the Rcs phosphorelay also contribute to the *E. coli* CESR (41). Another system that has been associated with the CESR of *E. coli* and closely related bacteria is the PspA-dependent phage shock response. But despite two decades of

research, the physiological role of this system is still poorly understood (14, 48). In *B. subtilis*, the regulatory network is even more complex. At least three ECF σ factors (σ^M , σ^W , and σ^X) and four TCS (BceRS, LiaRS, YvcPQ, and YxdJK) have been described to be involved in the response of this organism to the presence of cell wall antibiotics and other envelope-perturbing agents (28).

A unique three-component system orchestrates the cell envelope stress response in most Firmicutes (low-G+C, Gram-positive) bacteria. In *B. subtilis*, it is comprised of the TCS LiaRS and a membrane-anchored negative regulator, LiaF. The latter is invariantly linked to its cognate TCS by function and genomic context in all species harboring LiaRS homologs (28, 29, 44). While the role of LiaF has so far only been investigated in *B. subtilis* and *Streptococcus mutans* (29, 30, 55), LiaRS-like systems have also been described in a number of other Firmicutes species. The best-understood LiaRS homolog is the VraSR system of *Staphylococcus aureus*. This system has initially been identified and described for its contribution to antibiotic resistance in clinical isolates of *S. aureus* (9, 19, 36, 37). More recently, a number of detailed biochemical studies have addressed both the phosphotransfer between the sensor kinase VraS and the response regulator VraR and the phosphorylation-dependent DNA-binding specificity of VraR (5, 6, 15, 39). Other Lia-like systems that have been genetically and physiologically investigated include CesSR of *Lactococcus lactis* and the

* Corresponding author. Mailing address: Ludwig Maximilians University of Munich, Department of Biology I, Microbiology, Großhaderner Str. 2-4, D-82152 Planegg-Martinsried, Germany. Phone: 49-89-218074622. Fax: 49-89-218074626. E-mail: mascher@bio.lmu.de.

† Supplemental material for this article may be found at <http://j.b.asm.org/>.

Present address: Department of Microbiology and Immunology, University of Otago, Dunedin, New Zealand.

§ Present address: Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, IL.

[∇] Published ahead of print on 16 July 2010.

recently described LiaFSR system of *Streptococcus pneumoniae* (16, 43).

In all species but *B. subtilis*, the LiaRS-like TCS regulate a number of target loci, including those that directly contribute to the resistance against envelope-perturbing conditions that function as stimuli. Moreover, the collective data seem to indicate that these systems are the major (and often the only) CESR systems of these bacteria. In contrast, the Lia system of *B. subtilis* (and presumably also other species of the genera *Bacillus* and *Listeria*) is embedded in a complex regulatory network that contains not only other TCS but also ECF σ factors. Interestingly, regulon comparison and physiological data indicate that the Lia systems in *Firmicutes* cocci regulate genes and confer phenotypes that are subject to ECF-dependent regulation in *B. subtilis* (28). In contrast, a direct physiological contribution of the LiaRS system to the CESR of *B. subtilis* has not yet been established. This is especially surprising since the response of the *B. subtilis* LiaFSR system to the presence of lipid II-interacting antibiotics is much stronger and more specific than that of any of the other Lia-homologous systems investigated so far: the expression of the LiaR-dependent *liaIH* operon is induced 100- to 1,000-fold in the presence of sublethal amounts of its specific inducers (46, 59), in contrast to a mere 2- to 5-fold induction of the respective target genes in *L. lactis*, *S. aureus*, and *S. mutans*. Homologs of the *liaIH* operon are absent in all *Firmicutes* cocci, indicating a functional diversification between the two groups of LiaFSR-like systems. These functional differences are also supported by the LiaR binding site of the *Bacillus/Listeria* group, which differs significantly from the consensus sequence determined for the *Firmicutes* cocci (16).

Taken together, the data derived from studies of Lia-like systems in different *Firmicutes* cocci clearly establish their role as the most important CESR system in these bacteria. In contrast, there is still a very limited understanding of the physiological role of LiaFSR in *B. subtilis* and other bacilli. In order to gain a comprehensive overview of the Lia response of *B. subtilis*, we decided to apply a range of "omics" technologies to identify all LiaR-dependent genes and proteins and the associated phenotypes. Using DNA microarrays, we first compared the genome-wide expression profile of a "Lia ON" mutant to that of a "Lia OFF" mutant. We identified three LiaR target loci, including the two known operons *liaIH* and *yhcYZ-yhdA* (29, 45). The promoter upstream from the third target, *ydhE*, was further analyzed and a putative LiaR binding site could be identified. The results of the subsequent expression analysis and proteomic studies strongly suggest that the *liaIH* operon is the only relevant target of LiaR-dependent gene expression in wild-type cells. We therefore performed in-depth phenotyping by comparing a Lia ON mutant to a *liaIH* deletion strain. No influence of LiaR-dependent gene expression on any cellular differentiation could be observed. In contrast, a phenotype microarray analysis combined with follow-up phenotypic profiling established a protective role of the *liaIH* gene products against envelope and oxidative stress. These data, together with the results from oligomerization studies of the primary target protein LiaH, indicate that the LiaFSR system of *B. subtilis* (and, presumably, other *Firmicutes* bacilli) coordinates a phase shock protein-like response, reminiscent of PspA in *E. coli*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Bacillus subtilis* was grown in LB medium or Mueller-Hinton broth at 37°C with aeration. All strains used in this study are derivatives of the laboratory wild-type strains W168 and CU1065 (W168 *trpC attSPβ*) and are listed in Table 1. The antibiotics kanamycin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), chloramphenicol (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), tetracycline (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and erythromycin (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$), plus lincomycin (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance, were used for selection of the *B. subtilis* mutants. Transformation was carried out as described previously (24).

Allelic replacement mutagenesis using LFH-PCR. The long flanking homology PCR (LFH-PCR) technique is derived from a published procedure (58) and was performed as described previously (45). The strains constructed are listed in Table 1, and the corresponding primers are listed in Table 2.

Construction of markerless deletion and insertion mutants. Markerless deletions of the *liaIH* operon (including its promoter) and *liaF*, as well as an insertion mutant introducing an artificial terminator sequence between the 3' ends of *liaR* and *gerAC* (*liaR*-terminator-*gerAC*), were constructed using the vector pMAD (2). The genomic regions approximately 1 kb up- and downstream of the genes were amplified using the primers listed in Table 2, thereby introducing a 26-bp extension to the 3' end of the upstream fragment which is complementary to the 5' end of the downstream fragment. The two fragments were fused in a second PCR, and the resulting fragment was cloned into pMAD via BamHI and EcoRI, generating pSJ102 (*liaF*), pDW103 (*P_{liaR}-liaIH*), and pDW105 (*liaR*-terminator-*gerAC*). The generation of the mutants basically followed the established procedure (2). In brief, *B. subtilis* W168 was transformed with pSJ102 or pDW105 (Table 3) and incubated at 30°C with MLS selection on LB agar plates supplemented with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Blue colonies were selected and incubated for 6 to 8 h at 42°C in LB medium with MLS selection, resulting in the integration of the plasmids into the chromosome. Blue colonies were again picked from LB (X-Gal) plates and incubated at 30°C for 6 h in LB medium without selection. Subsequently, the liquid culture was shifted to 42°C for 3 h, and the cells were then plated on LB (X-Gal) plates, this time without selective pressure. White colonies that had lost the plasmids were picked and checked for MLS sensitivity. The resulting strains, TMB329 (Δ *liaF*), TMB604 (Δ *P_{liaR}-liaIH*), and TMB611 (*liaR*-terminator-*gerAC*), were subsequently analyzed by PCR and sequencing for the integrity of the desired genetic modifications.

Measurement of induction by β -galactosidase assay. Cells were inoculated from fresh overnight cultures and grown in LB medium at 37°C with aeration until they reached an optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.4 . The culture was split; bacitracin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ final concentration) was added to one-half (induced sample), and the other half was left untreated (uninduced control). After incubation for an additional 30 min at 37°C with aeration, 2 ml of each culture was harvested and the cell pellets were stored at -20°C . The pellets were resuspended in 1 ml working buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoethanol) and assayed for β -galactosidase activity, with normalization to cell density, as described in reference 47.

Preparation of total RNA. *B. subtilis* CU1065, TMB002 (*liaF::kan*), and HB0933 (*liaR::kan*) were grown aerobically at 37°C in LB medium to late-log phase (OD_{600} of 0.8; growth rate of the wild type was 0.031 ± 0.001 , of the *liaR* mutant was 0.030 ± 0.001 , and of the *liaF* mutant was 0.026 ± 0.001 [min^{-1}]). Thirty milliliters of each sample was mixed with 15 ml cold killing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 5 mM MgCl_2 , 20 mM NaN_3), harvested by centrifugation, and frozen in liquid nitrogen. For cell disruption, the pellet was resuspended in 200 μl killing buffer, immediately transferred to a Teflon vessel (filled and precooled with liquid nitrogen), and then disrupted with a Mikro-Dismembrator U (Sartorius). The resulting cell powder was resuspended in 3 ml of lysis solution (4 M guanidine thiocyanate, 0.025 M Na acetate, pH 5.2, 0.5% *N*-lauroyl sarcosinate), and the RNA was extracted twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), followed by chloroform-isoamyl alcohol (24:1) extraction and ethanol precipitation. RNA samples were treated with an RNase-free DNase kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and purified using RNeasy mini columns (Qiagen). Quality control of the RNA preparations was performed with an RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies) on an Agilent 2100 Bioanalyzer according to the manufacturer's instructions.

DNA microarray analysis. The RNA samples obtained from three independent cultivations were used for independent cDNA synthesis and DNA microarray hybridization. The generation of the Cy3/Cy5-labeled cDNAs and hybridization to *B. subtilis* whole-genome DNA microarrays (Eurogentec) were performed as described previously (32). The slides were scanned with a ScanArray Express scanner (PerkinElmer). Quantification of the signal and background intensities was carried out using the ScanArray Express image analysis software.

TABLE 1. Strains used in this study

Strain	Relevant genotype ^a	Reference or source
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>relA1 supE44</i> ϕ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Laboratory stock
BL21(DE3)/pLysS TME139	F ⁻ <i>lon ompT</i> r _B m _B <i>hsdS gal</i> (<i>cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>) BL21(DE3)/pLysS, pDW1604	Laboratory stock This study
<i>Bacillus subtilis</i> strains		
W168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
CU1065	W168 <i>att</i> SP β 2 Δ 2 <i>trpC2</i>	Laboratory stock
HB0920	CU1065 <i>liaH::kan</i>	45
HB0933	CU1065 <i>liaR::kan</i>	45
HB0961	CU1065 <i>liaI::pMUTIN</i>	45
TMB002	CU1065 <i>liaF::kan</i>	29
TMB011	CU1065 <i>liaI::pMUTIN liaR::kan</i>	30
TMB016	CU1065 <i>amyE::pTM1</i> (P _{<i>liaI-lacZ</i>})	29
TMB018	CU1065 <i>amyE::pTM1</i> (P _{<i>liaI-lacZ</i>}) <i>liaF::kan</i>	29
TMB071	W168 <i>amyE::pAJ603</i> (P _{<i>yhcy-lacZ</i>})	29
TMB095	W168 <i>amyE::pAJ603</i> (P _{<i>yhcy-lacZ</i>}) <i>liaF::kan</i>	29
TMB211	CU1065 <i>liaH::kan pspA::cat</i>	This study
TMB222	W168 <i>amyE::pSK602</i> (P _{<i>ydHE-lacZ</i>})	This study
TMB224	W168 <i>amyE::pSK602</i> (P _{<i>yhcy-lacZ</i>}) <i>liaF::kan</i>	This study
TMB421	W168 <i>amyE::pSK602</i> (P _{<i>ydHE-lacZ</i>}) <i>liaF</i> clean deletion	This study
TMB329	W168 Δ <i>liaF</i> (clean deletion)	This study
TMB419	W168 <i>liaF::tet amyE::pJR601</i> (P _{<i>ydHE(-57)-lacZ</i>})	This study
TMB420	W168 <i>liaF::tet amyE::pJR602</i> (P _{<i>ydHE(-34)-lacZ</i>})	This study
TMB604	W168 Δ P _{<i>liaI-liaIH</i>} (clean deletion)	This study
TMB611	W168 <i>liaR</i> -terminator- <i>gerAC</i> (termination sequence inserted) <i>liaF::kan</i>	This study
TMB630	W168 Δ P _{<i>liaI-liaIH</i>} (clean deletion) <i>pspA::cat</i>	This study
TMB676	W168 Δ <i>liaF</i> (clean deletion) <i>amyE::pAJu604</i> (P _{<i>ydHE(-74)-lacZ</i>})	This study
TMB721	W168 Δ <i>liaF</i> clean deletion, <i>amyE::pDW602</i> (P _{<i>ydHE(-96)-lacZ</i>})	This study
TMB769	W168 Δ <i>liaF</i> clean deletion, <i>amyE::pDW604</i> (P _{<i>ydHE(-71)-lacZ</i>})	This study

^a Resistance cassettes: *kan*, kanamycin; *cat*, chloramphenicol; *tet*, tetracycline.

Transcriptome data analysis. Data were analyzed using GeneSpring software (Agilent Technologies). The raw signal intensities were first transformed by intensity-dependent LOWESS normalization. The normalized array data were subjected to statistical analysis using Cyber-T, a program based on a *t* test combined with a Bayesian statistical framework (4). The software is accessible through a web interface at <http://cybert.micrarray.ics.uci.edu>. The mRNA abundance was considered to be significantly different between samples obtained from wild-type and mutant strains if (i) the Cyber-T Bayesian *P* value was <0.001 and (ii) the averaged fold change was at least 3.

Northern hybridization analysis. Northern blot analysis was carried out as described previously (25) using equal amounts of total RNA (5 μ g) separated under denaturing conditions on a 1.2% formaldehyde agarose gel. Chemiluminescence was detected with a Lumi-Imager (Roche, Germany) using CDP-Star (Roche, Germany) as the substrate. The transcript sizes were determined by comparison with an RNA size marker (Invitrogen). The digoxigenin-labeled specific-RNA probes were synthesized by *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase from the T7 promoter-containing internal PCR products of *liaIH*, *ydHE*, and *yhcy* using the primers listed in Table 2.

Cloning, expression, and purification of recombinant His₁₀-tagged LiaR and LiaH. The *liaR* and *liaH* genes were amplified from *B. subtilis* W168 genomic DNA by PCR using oligonucleotide pairs TM1045/-0124 and TM0118/-0120, respectively. The PCR product was cloned into the pET-16b expression vector (Novagen, Germany) using the added restriction sites and confirmed by sequencing. For overexpression, *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Novagen, Germany) was transformed with pDW1604 (His₁₀-LiaR) or pFK1601 (His₁₀-LiaH) and grown in LB medium. In mid-log phase (OD₆₀₀ of 0.6 to 0.8), protein expression was induced by the addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cultures were harvested 3 h after induction and washed in ZAP (10 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4). Due to low accessibility of the His tag under native protein folding, His₁₀-LiaH was purified under denaturing conditions in the presence of 2 M urea in the ZAP buffer. Cell pellets were resuspended in 10 ml ZAP, and cells were disrupted by 3 passes through a French press at 1,000 lb/in². The lysate was centrifuged at 11,000 \times *g* and 4°C for 30 min. The supernatant was loaded on a gravity flow column with 1 ml Ni²⁺-nitrilotriacetic acid (NTA) Superflow

matrix (Qiagen, Germany). After washing steps with ZAP and ZAP containing 5 mM and 10 mM imidazole, His₁₀-LiaR was eluted from the column using ZAP with imidazole concentrations of 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, and 500 mM. All fractions were analyzed using SDS-PAGE. Fractions containing purified His₁₀-LiaR were used for gel mobility shift experiments. Fractions containing purified His-tagged LiaH were dialyzed against ZAP to remove imidazole and urea. After this treatment, His₁₀-LiaH was again unable to bind Ni²⁺-NTA, indicating proper refolding (data not shown). This protein was then used for oligomerization studies.

Gel mobility shift assays. DNA fragments of the promoter regions upstream of *liaI* (180 bp), *yhcy* (313 bp), *ydHE* (323 bp), and *bceA* (161 bp, control) were amplified by PCR (primers are listed in Table 2). The products were purified using a PCR purification kit (SLG, Germany) and diluted to a final concentration of 2.5 ng ml⁻¹ with band shift buffer [20 mM HEPES, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dithiothreitol (DTT), 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.9]. Phosphorylation of LiaR was carried out by incubation for 30 min at 37°C in band shift buffer containing 12.5 mM acetyl phosphate (40). Binding of His₁₀-LiaR was carried out in band shift buffer in a 15- μ l reaction mixture containing 5 ng PCR product and various amounts of phosphorylated LiaR. The binding reaction mixtures were incubated at 25°C for 20 min. The samples were loaded onto native 8% polyacrylamide gels in 1 \times TGE buffer (50 mM Tris, 400 mM glycine, 1.73 mM EDTA). Electrophoresis was carried out at 25 mA and room temperature for 1 h. Gels were stained with SYBR green I (Molecular Probes) for 15 min, and DNA was detected by scanning with a Bio-Vision 3000 fluorescence imager (Peqlab, Germany).

Phenotype microarray analysis. Phenotype microarray assays were performed by Biolog (Hayward, CA) according to the published procedure (www.biolog.com/pmTechDesOver.html), using a tetrazolium dye (8). Incubation and recording of phenotypic data were performed in the OmniLog station by capturing digital images of the microarray and storing quantitative color change values in a computer file displayed as a kinetic graph. The OmniLog-PM software generates time course curves for the redox state of the tetrazolium dye and calculates differences in the areas for mutant and control cells. The units are arbitrary. Positive values indicate that the mutant showed greater rates of growth than the

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Primer name and purpose	Sequence ^a
Northern hybridization	
TM0227 <i>yhcY</i> -probe fwd.....	<u>GAGTTGCTGAGTCTGACAAACC</u>
TM0294 <i>yhcY</i> -probe-T7-rev.....	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGATCGTGAAGCTCCTGAGCGAGGC</u>
TM0360 <i>liaIH</i> -probe fwd.....	<u>TTTGAGGAGGAAGCTTCG</u>
TM0361 <i>liaIH</i> -probe-T7-rev.....	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATAGGCAATCGTGTGCTG</u>
TM0758 <i>ydhE</i> -probe-fwd.....	<u>AGCAACGGTCCATCTTCAC</u>
TM0759 <i>ydhE</i> -probe-T7-rev.....	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCTCTTTGGAAAGCTCGGC</u>
Overexpression of LiaH	
TM0118 <i>liaH</i> -fwd (XhoI).....	<u>ATATCTCGAGATGGTATTAATAAAGAATCAGAGACATG</u>
TM0120 <i>liaH</i> -rev (BamHI).....	<u>AGCCGGATCCTTATTCAATTTGCCGCTTTTGTCTGG</u>
Overexpression of LiaR	
TM1045 <i>liaR</i> -fwd (NdeI).....	<u>TCGTCATATGGTGATTCGAGTATTATTGATTGATGATC</u>
TM0124 <i>liaR</i> -rev (BamHI).....	<u>AGCCGGATCCCTAATTCACGAGATGATTTCCG</u>
Check primers	
TM0151 T7-fwd.....	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>
TM0152 T7-rev.....	<u>GCTAGTTATTGCTCAGCGG</u>
LFH-PCR and clean deletions	
1315 <i>pspA</i> -up fwd.....	<u>GGACGCTGTACATGTCGATACCTC</u>
1316 <i>pspA</i> -up rev (<i>cat</i>).....	<u>CTTGATAATAAGGGTAACTATTGCCGGCTAATTCGGTAACCCTTG</u>
1317 <i>pspA</i> -do fwd (<i>cat</i>).....	<u>GGGTAATAGCCTCGCCGGTCCACGCATACATAGGAGGCCGCAGC</u>
1318 <i>pspA</i> -do rev.....	<u>CCGTTCATCGAAAGATATGCTCCGC</u>
TM0457 <i>liaF</i> -upfwd (BamHI).....	<u>AGCCGGATCCAAGGATTTGCCGTCAAGTCC</u>
TM0458 <i>liaF</i> -dorev (NcoI).....	<u>AGCTCCATGGTTCAAGCCGTATGAGGAGGC</u>
TM0574 <i>liaF</i> clean-uprev (XhoI).....	<u>GACTCTCGAGTCCGTGGTGTCCGCCTCCTTTC</u>
TM0575 <i>liaF</i> clean-dofwd (XhoI).....	<u>GACTCTCGAGCGGTGATGTGGATGTGAAGTACG</u>
TM1055 P _{<i>liaR</i>} - <i>liaIH</i> clean-dofwd.....	<u>CCAGACAAAAGCGGCAAATG</u>
TM1056 P _{<i>liaR</i>} - <i>liaIH</i> clean-uprev.....	<u>CATTTGCCGCTTTTGTCTGGCTCGCACCCGACCCATTGGC</u>
TM1057 P _{<i>liaR</i>} - <i>liaIH</i> -upfwd (BamHI).....	<u>AGCCGGATCCGCGGGCTTCTCTCCGCTGTG</u>
TM1058 P _{<i>liaR</i>} - <i>liaIH</i> -dorev (EcoRI).....	<u>CCATGAATTCGAATGCGGACGACGCTCCGCACGC</u>
TM1184 <i>liaR</i> -fwd (Term.-up-BamHI).....	<u>ACGTGGATCCGACGGCAGCGAAGGTGTTCCG</u>
TM1185 <i>liaR</i> -rev (Term.-do-SmaI).....	<u>AGCTCCGGGAAAAAAGCCGTTTCAGGGAAAGGGCTTTTTTTTC</u> <u>TAATTCACGAGATGATTTCCG</u>
TM1186 <i>gerAC</i> -rev (Term.-up-SmaI).....	<u>AGCTCCGGGCTATTTGTTTGCCCTTTCG</u>
TM1187 <i>gerAC</i> -fwd (Term.-do-NcoI).....	<u>ACGTCCATGGGGAGGGCTCTTCATCTGATCCG</u>
Analysis of the <i>ydhE</i> promoter	
TM0480 P _{<i>ydhE</i>} -rev (BamHI).....	<u>CGATGGATCCATCCCGGTGAAGATGGACCG</u>
TM0481 P _{<i>ydhE</i>} -fwd (EcoRI).....	<u>CGATGAATTCGCGAATGTGACAGCTGAGGG</u>
TM0682 P _{<i>ydhE</i>} -57-fwd (EcoRI).....	<u>CGATGAATTCGAATGTTCAATTTGTACCT</u>
TM0683 P _{<i>ydhE</i>} -34-fwd (EcoRI).....	<u>CGATGAATTCGATGGGTTGTGTTCCCA</u>
TM1395 P _{<i>ydhE</i>} -74-fwd (EcoRI).....	<u>CCATGAATTCGAATGTCAGACGACGAGCAGCAATAG</u>
TM1559 P _{<i>ydhE</i>} -96-fwd (EcoRI).....	<u>ATCGGAATTCGCTTGGGTGCTTTTTTTTTG</u>
TM1583 P _{<i>ydhE</i>} -71-fwd (EcoRI).....	<u>ATCGGAATTCGTCAGAGCAGCAGAATAGTTC</u>
Gel mobility shift assay	
TM0632 <i>bceA</i> -fwd.....	<u>GAAGTGCTGAAGGGCATCG</u>
TM0633 <i>bceA</i> -rev.....	<u>CATAGCCGTCATGTCATTTCC</u>
TM0099 P _{<i>liaR</i>} -fwd (EcoRI).....	<u>CCATGAATTCGCGGTGCGAGATACGACTCC</u>
TM0100 P _{<i>liaR</i>} -rev (BamHI).....	<u>CGATGGATCCTCCTCAAAAAAGACGAGATCCC</u>
TM1490 P _{<i>ydhE</i>} -fwd (EcoRI).....	<u>CCATGAATTCAGACACCCAGAGCTTGGGTGTC</u>
TM0480 P _{<i>ydhE</i>} -rev (BamHI).....	<u>CGATGGATCCATCCCGGTGAAGATGGACCG</u>
TM0166 P _{<i>yhcY</i>} -fwd (EcoRI).....	<u>CGATGAATTCGACAGTGAAAAGCGACTTGCC</u>
TM0165 P _{<i>yhcY</i>} -rev (BamHI).....	<u>CGATGGATCCGTTGCTTTGATATCGTGCC</u>

^a The sequences that represent the T7 promoter necessary for *in vitro* transcription are underlined. Restriction sites are in boldface. Linker sequences used for joining reactions are in italic and boldface.

control. The differences are the averages of the values reported for two or more clones of each mutant compared to the average values for the corresponding control strains. All significant hits (as defined by Biolog) are listed in Table S1 in the supplemental material both for the comparison of strain TMB329 (markerless *liaF* deletion; hereinafter Δ *liaF*) and of strain TMB211 (*liaH::kan pspA::cat*) to the wild type (W168).

Determination of the MIC. For determination of MICs, strains W168, TMB329 (Δ *liaF*), and TMB604 (Δ P_{*liaR*}-*liaIH* markerless deletion) were grown in

LB medium overnight at 37°C with aeration. One hundred microliters of each overnight culture was then added to 5 ml Mueller-Hinton broth with different concentrations of the tested substances and a positive control (Mueller-Hinton broth only), respectively. The cultures were incubated for 6 h with aeration at 37°C, and the final OD₆₀₀ values were determined. The concentration of each compound at which no growth was detectable was defined as the MIC.

Serial dilution spot tests. The strains W168, TMB329, and TMB604 (Table 1) were incubated in 3 ml LB medium overnight at 37°C with aeration. One hun-

TABLE 3. Vectors and plasmids

Plasmid	Genotype	Primer pair(s) used for cloning	Reference or source
pAC6	<i>bla lacZ cat amyE' . . . 'amyE'</i>		54
pGEMcat	<i>ori(f1) lacZ'(MCS) bla cat</i>		63
pET-16b	T7 <i>lac</i> promoter, His ₁₀ tag, MCS, T7 terminator; <i>lacI</i> pBR322-Ori <i>bla</i>		Novagen
pMAD	<i>erm ori(pE194-Ts) MCS-P_{clpB}-bgaB ori(pBR322) bla</i>		2
pAJu604	pAC6 P _{YdhE(-74)} - <i>lacZ</i>	TM1395/TM0480	This study
pDW103	pMAD P _{liaI} - <i>liaIH</i> up/down overlap	TM1056/TM1057, TM1055/TM1058	This study
pDW105	pMAD <i>liaR</i> -terminator- <i>gerAC</i> overlap	TM1184/TM1185, TM1186/TM1187	This study
pDW602	pAC6 P _{YdhE(-96)} - <i>lacZ</i>	TM1559/TM0480	This study
pDW604	pAC6 P _{YdhE(-71)} - <i>lacZ</i>	TM1583/TM0480	This study
pDW1604	pET16b- <i>liaR</i>	TM1045/TM0124	This study
pFK1601	pET16b- <i>liaH</i>	TM0118/TM0120	This study
pJR601	pAC6 P _{YdhE(-57)} - <i>lacZ</i>	TM0682/TM0480	This study
pJR602	pAC6 P _{YdhE(-34)} - <i>lacZ</i>	TM0683/TM0480	This study
pSJ102	pMAD <i>liaF</i> up/down overlap	TM0457/TM0574, TM0575/TM0458	This study
pSK602	pAC6 P _{YdhE} - <i>lacZ</i>	TM0480/TM0481	This study

dred microliters of each strain was added to 3 ml of fresh LB medium. After 3 to 4 h at 37°C with aeration, the OD₆₀₀ was determined and the cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.5 (undiluted sample, 10⁹). Five microliters of each dilution (10⁻¹ to 10⁻⁶) of every strain was spotted onto Mueller-Hinton agar plates containing the compounds of interest at different concentrations and incubated at 37°C overnight.

Preparation of cytoplasmic proteins and 2-D PAGE. *B. subtilis* strains CU1065 (wild type), HB0920 (*liaH::kan*), and TMB002 (*liaF::kan*) were grown in LB medium to mid-log phase (OD₆₀₀ of 0.6 to 0.8). The preparation of cytoplasmic proteins and subsequent two-dimensional (2-D) PAGE were performed as described previously (12). The 2-D gels were stained with colloidal Coomassie brilliant blue and analyzed using Delta-2D software (Decodon, Germany). Proteins of interest were excised and identified by matrix-assisted laser desorption-ionization-tandem time-of-flight (MALDI-TOF-TOF) mass spectrometry.

Oligomerization studies of His₁₀-LiaH by transmission electron microscopy. Twenty microliters of purified His₁₀-LiaH (diluted 10-fold in ZAP buffer [pH 8.5] supplemented with 100 μg μl⁻¹ PEG 2000) was applied to a piece of parafilm. A carbon-coated Formvar-nickel grid was incubated for 30 s on the drop. After a brief wash with water, the grid was incubated for 10 s in 4% uranyl acetate and briefly dried on filter paper. Electron microscopy was carried out with a Philips EM 301 instrument at calibrated magnifications. Images were recorded on IMAGO electron-sensitive films (Plano, Germany). Magnifications were calibrated with a cross-lined grating replica. Markham rotational analysis of images of LiaH rings was performed as described previously (42).

Size exclusion chromatography. A Superose 6 column was used on an Äkta fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare). The column was equilibrated with running buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 0.5 mM DTT). LiaH was used at a final concentration of 10 μM, and a sample of 100 μl was applied to the column. Gel filtration experiments were performed at room temperature with a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. The eluted fractions were collected, precipitated with acetone, and subsequently analyzed using SDS-PAGE.

RESULTS

LiaFSR-like three-component systems are highly conserved in *Firmicutes* bacteria. In contrast to the situation in low G+C Gram-positive cocci, where LiaFSR-like three-component systems function as the primary CESR systems, the physiological role of LiaFSR homologs in the *Bacillus* group is less well understood (28). Therefore, the aim of this study was to perform in-depth analyses to identify the LiaR regulon and phenotypes associated with LiaR-dependent gene expression. For this purpose, we used two mutants that were previously described to represent the constitutive Lia ON and Lia OFF states of the system (29). In a *liaR* mutant which lacks the response regulator, no LiaR-dependent gene expression can

occur (Lia OFF). In contrast, *liaF* encodes an inhibitor of the LiaRS TCS; a mutant with a mutation in this gene, therefore, represents the constitutive Lia ON state of the system.

Identification of LiaR-dependent genes. Previously, we had identified two LiaR target promoters, P_{liaI} and P_{YhcY} (29, 45), but a comprehensive picture of the LiaR regulon was still missing. We therefore performed a DNA microarray analysis by comparing the transcriptome patterns of the Lia ON and Lia OFF mutants with that of the wild-type strain to gain specific information on LiaR-dependent gene expression. The corresponding strains W168 (wild type), TMB002 (*liaF::kan*), and HB0933 (*liaR::kan*) (Table 1) were grown in LB medium to mid-logarithmic growth phase (OD₆₀₀ of 0.5). Cells were harvested and snap-frozen. Subsequently, total RNA was prepared, reverse transcribed, labeled, and hybridized to *B. subtilis* microarrays representing the complete set of annotated genes (see Materials and Methods for details). The results from competitive hybridization are shown in Table 4. The genomic organization of putative LiaR target genes is illustrated in Fig. 1A. The complete microarray data set can be found in Table S1 in the supplemental material.

The strongest effects relative to the results for the wild type were observed in the *liaF* mutant. This was to be expected, since deletion of the inhibitor gene *liaF* results in a constitutively active (i.e., phosphorylated) response regulator LiaR. Therefore, all genes that are affected (directly or indirectly) by LiaR-dependent gene expression should be positively or negatively modulated. Only three loci were significantly upregulated (Fig. 1A and B). The strongest effect was observed for the primary target of LiaR-dependent regulation. Compared to the results for the wild type, the *liaIH* operon was induced 200- to 300-fold in the *liaF* mutant, while its expression was reduced about 2.5-fold in the *liaR* mutant (data not shown; also see Table S1 in the supplemental material). Moreover, the expression of *liaG* was also strongly induced. The significantly weaker values were caused by partial termination of transcription after *liaH* (29). While the expression of the complete *liaIHGFSR* operon in antibiotic-induced wild-type cells is well documented, the increased expression values for *liaSR* from this microarray work need to be interpreted with caution, since they are most likely influenced by the strong expression of the

TABLE 4. Results of microarray analysis showing LiaR-dependent marker genes that are induced/repressed more than 3-fold

Gene(s)	Fold change in: ^a		Function, homology, remark ^{b,c}	Reference
	$\Delta liaF$ mutant	$\Delta liaR$ mutant		
Induced				
<i>liaIH</i>	310 ± 49		Membrane protein, phage-shock protein homolog	22
<i>liaGFSR</i>	75 ± 12		Unknown (<i>liaG</i>), negative regulator (<i>liaF</i>), TCS (<i>liaSR</i>)	29
<i>gerAC-gerAB-gerAA</i>	18 ± 3.2	6.7 ± 1.8	Spore germination, polar effect	49
<i>yhcYZ-yhdA</i>	24 ± 2.3		Putative TCS and azoreductase	45
<i>yhdB-yhdC</i>	3.6 ± 0.3		Unknown, polar effect	
<i>ydhE</i>	15 ± 0.8		Putative macrolide glycosyltransferase	
<i>yqiU</i>	6.7 ± 1.5		Unknown	
<i>wapA-yxxG</i>		6.3 ± 0.9	Cell wall-associated protein	13
<i>yxiF-yxzC-yxiG-yxiH-yxzG-yxiI-yxiJ-yxiK-yxiL</i>		6.4 ± 1.1	Unknown	
<i>yxiM-deaD</i>		4.5 ± 0.6	Unknown, ATP-dependent RNA helicase	34
<i>ytrABCDEF</i>		4.1 ± 0.9	Acetoin utilization, stress inducible	62
Repressed				
<i>hag</i>	3.3 ± 0.05		Flagellin protein	18
<i>yvzB</i>	3.3 ± 0.04		Similar to flagellin	21
<i>sfjAA-sfjAB-comS-comAC-comAD</i>		5.3 ± 0.03	Surfactin synthetase, regulation of competence	50, 52
<i>yxkC</i>	4 ± 0.02		Unknown	
<i>pel</i>		5.8 ± 0.03	Pectate lyase	51
<i>catD-catE</i>		4.8 ± 0.04	Catechol catabolism, dioxygenase	56

^a Values (relative to wild-type levels) are averages and standard deviations of the results from three independent biological replicates. All genes listed had a Cyber-T Bayesian *P* value of <0.001 (see Materials and Methods for experimental details).

^b TCS, two-component system that includes histidine kinase and response regulator.

^c Positive polar effect was indicated by strong expression of upstream genes.

kanamycin resistance cassette replacing *liaF*. We also observed a polar effect on the divergently expressed operon downstream of the *lia* operon, *gerAB-gerAC*. This expression pattern was verified by Northern blot analysis using a *liaIH*-specific probe (Fig. 1C). Two major transcripts of about 1.3 kb (*liaIH*) and 5 kb (*liaIHG-kan-liaRS*) can be detected. Moreover, a number of larger but weaker transcripts can also be seen, supporting the read-through countertranscription into the *ger* operon, as indicated by the microarray data. A similar, albeit weaker effect is also observed in the *liaR::kan* mutant, indicating positive polar downstream effects based on the expression of the resistance cassette from its own strong constitutive promoter. The physiological consequence of this effect is further described below.

The second already-known LiaR target, the *yhcYZ-yhdA* operon, was also identified in this study as significantly (12- to 25-fold) induced in the *liaF* mutant. Here again, weakly increased values for two genes further downstream indicate read-through transcription. In addition, one novel potential target gene was identified. The monocistronic *ydhE* gene (Fig. 1A) was induced 15-fold in the Lia ON mutant, while its expression was slightly reduced in the Lia OFF strain. The LiaR-dependent expression of this gene was analyzed in more detail (see below for details). In both cases, transcripts of the expected sizes were also detected in the corresponding Northern blots (Fig. 1C). It should be noted that these two loci were not induced by bacitracin in the wild type, in contrast to the *lia* locus (Fig. 1B). The significance of this observation will be addressed below.

In addition, three genes (*hag*, *yvzB*, and *yxkC*) showed a >3-fold reduced expression level in the *liaF* mutant but also an ~2-fold reduction in the *liaR* mutant relative to the level in the wild-type strain. Moreover, the expression of the *sfj* operon

was repressed more than 5-fold in the *liaR* mutant and about 2-fold in the *liaF* mutant.

Without external stimuli, the Lia system is inactive during mid-logarithmic growth phase (29). Hence, we did not expect to see strong effects in the microarray comparison of the *liaR* mutant (Lia OFF) versus the wild-type strain. Nevertheless, a number of loci were significantly affected in their expression. More than 12 consecutive genes downstream from and including *wapA* were induced 4- to 6-fold, while the expression of this locus was unaffected in the *liaF* mutant (Table 4). Moreover, the expression of the stress-inducible *ytrABCDEF* operon is also increased about 4-fold. The expression of this operon is a very sensitive, albeit nonspecific marker for a diverse set of stress conditions (62), indicating that the inactivation of the Lia system causes some kind of cellular stress. Two loci (*pel* and *catDE*) showed a >5-fold-reduced expression level in the *liaR* mutant without being affected in the Lia ON mutant.

Leaving these minor and presumably nonspecific effects aside, the results of our microarray analysis strongly suggest that an activated Lia system seems to specifically affect the expression of only three target loci, *liaIH-liaGFSR*, *yhcYZ-yhdA*, and the *ydhE* gene.

The *ydhE* gene is a novel target of LiaR-dependent gene regulation. Based on the microarray data, we next analyzed the LiaR-dependent *ydhE* expression in more detail. The initial bioinformatic analysis of the short intergenic region upstream of *ydhE* revealed a suitable ribosome binding site but neither a strong promoter nor an obvious LiaR binding site. Using 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE), we mapped the transcriptional start site to an A 50 nucleotides upstream from the start codon, which allowed us to identify a potential but poorly conserved σ^A -type promoter sequence (Fig. 2A).

Based on this information, we then performed a promoter

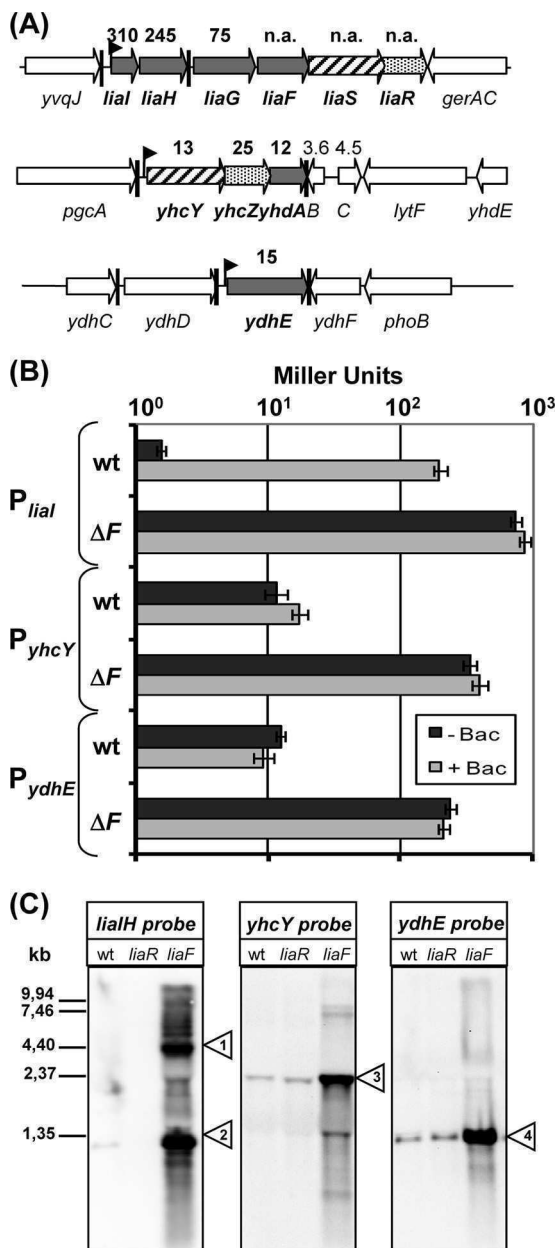


FIG. 1. Identification of LiaR-dependent target genes. (A) Genomic organization of potential LiaR target genes as identified by DNA microarray analysis. Expression of the *liaIHGFSR* operon, *yhcYZ-ydhA* operon, and the *ydhE* gene are strongly induced in a Lia ON mutant relative to their expression in the wild-type strain (see fold-change values above the arrows; n.a., values derived for these genes are an artifact due to replacing the *liaF* gene with the kanamycin resistance cassette). (B) Measurement of the β -galactosidase activity of the P_{liaI} , P_{yhcY} , and P_{ydhE} promoters in the wild type (wt) and the corresponding *liaF::kan* background. Cultures of strains TMB016 (P_{liaI} -*lacZ*), TMB018 (P_{liaI} -*lacZ* *liaF::kan*), TMB071 (P_{yhcY} -*lacZ*), TMB095 (P_{yhcY} -*lacZ* *liaF::kan*), TMB222 (P_{ydhE} -*lacZ*), and TMB224 (P_{ydhE} -*lacZ* *liaF::kan*) were grown in LB medium to mid-log phase and then split. One half was induced by the addition of bacitracin (+ Bac; 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ final concentration), and the other half served as an uninduced control (- Bac). Cells were harvested after 30 min of incubation and assayed as described previously (46). β -Galactosidase activity is expressed in Miller units (47). Error bars show standard deviations. (C) Northern blot analysis. Expression of *liaIHGFSR*, *yhcYZ-ydhA*, and *ydhE* was measured using 5 μg of total RNA from each strain sample (wild type,

deletion analysis. Promoter fragments of decreasing length at the 5' end were cloned into the promoter probe vector pAC6 (54). All fragments had the same 3' end, extending 169 nucleotides into the *ydhE* gene (Fig. 2A shows the exact 5' end of all relevant constructs, and Fig. 2B is a schematic representation). The resulting plasmids, pAJu604, pDW602, pDW604, pJR601-pJR602, and pSK602, were used to transform the *liaF* mutant, resulting in strains TMB419-421 and TMB676/-721/-769 (see Table 1 for details). Subsequent β -galactosidase assays of the initial promoter set showed that all larger fragments down to position -79 showed a strong Lia-dependent expression in the *liaF* mutant (Fig. 2C) but only a basal expression level in the wild type (about 10 Miller units; data not shown). The -57 fragment showed a strongly reduced basal activity, while the -34 fragment, which already lacked parts of the -35 promoter regions, only showed background activity of less than one Miller unit (Fig. 2C).

A closer inspection of the sequence between the -79 and the -57 fragment revealed one potential LiaR binding signature (TAAGtC---GcaGcA) at the 3' end of *ydhD* (Fig. 2A and D). While the four core residues at the ends of the two repeats are conserved (boldface), only two more residues fit to the position weight matrix (capital letters) (16), and no additional complementary bases could be detected. To exactly map the LiaR binding site upstream of *ydhE*, two additional fragments (-74 and -71) were cloned and corresponding reporter strains (TMB676 and TMB679) constructed, and β -galactosidase activities were measured in the *liaF* mutant background. The data support this motif, since the -74 fragment still has the maximum activity, while a further 5' truncation of only three more nucleotides in the -71 fragment already leads to a 10-fold-reduced level of activity (Fig. 2C). Therefore, we conclude that the inverted repeat described above indeed represents the LiaR binding site upstream of *ydhE* (Fig. 2D).

The *liaIH* operon is the only relevant LiaR target *in vivo*. Studies of LiaFSR-like systems in four different *Firmicutes* bacteria allowed the identification of a conserved inverted repeat element as the binding sequence for LiaR-like response regulators (16, 29, 43, 55). While there is some variation between binding sites from *Bacillus/Listeria* species (group I) and *Firmicutes* cocci (group II), a minimal and almost invariant core 6-4-6 motif, TNNNNC---GNNNNA, can be extracted, with normally at least two additional residues having complementary partners in each side of the repeat (16). While this rule certainly applies for the binding site of the *liaI* promoter, the inverted repeats identified upstream of *yhcY* and *ydhE* are poorly conserved (Fig. 2D). Moreover, only P_{liaI} can be induced by bacitracin, a stimulus known to strongly activate the LiaFSR system (46). In contrast, the two other promoters only respond in a LiaR-dependent manner in the absence of the

TMB002 [*liaF::kan*], and HB0933 [*liaR::kan*]) separated on a 1.2% formaldehyde gel. RNA was transferred to a nylon membrane and hybridized with labeled gene-specific RNA probes (see Materials and Methods for details). Small triangles indicate the major transcript(s) for each gene; their sizes correspond to transcripts *liaIH-kan-liaSR* (1), *liaIH* (2), *yhcYZ-ydhA* (3), and *ydhE* (4).

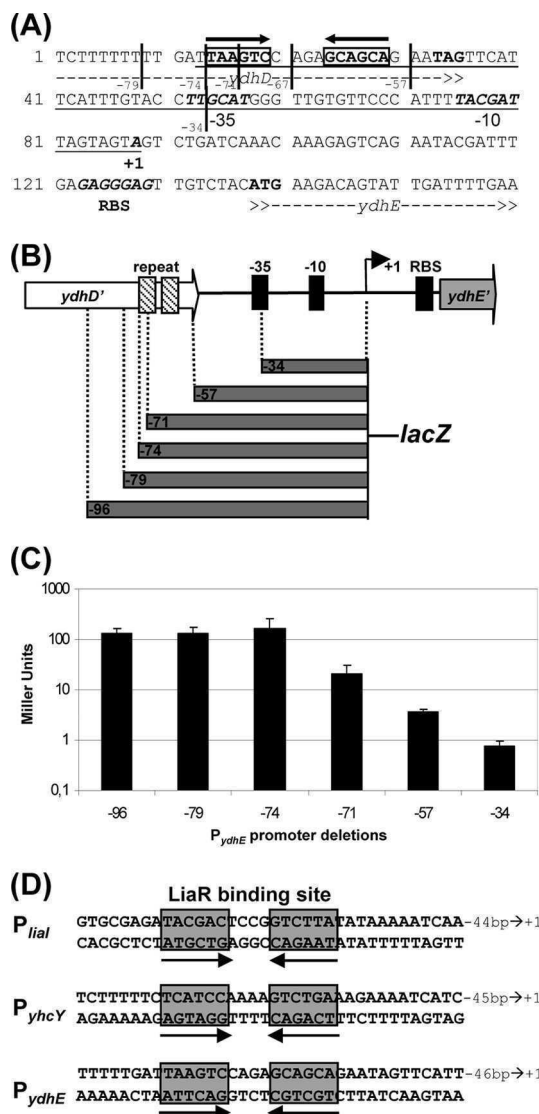


FIG. 2. Characterization of the *ydhE* promoter and determination of LiaR binding sites. (A) Sequence of the *ydhE* promoter region, including the postulated LiaR binding site (black arrows, boldface, and bold boxes), the -35 and -10 promoter regions, transcription start site, and ribosome binding site (RBS) (all in boldface italics), and the start and stop codons (ATG and TAG, respectively; in boldface). The minimal LiaR-dependent promoter fragment is underlined. Note that the labeling of the 5' end of the fragments for the promoter deletion analysis in panels A and B is given relative to the transcription start (+1) for reasons of clarity. This nomenclature differs thereby from the labeling of the fragments for cloning (Tables 1 and 2), which are normalized relative to the start codon of *ydhE*. (B) Overview of the promoter deletion analysis of *P_{ydhE}*. A graphical representation of the intergenic region and outline of the fragments used for promoter deletion are shown. The -35 region, -10 region, and RBS are highlighted. The black arrow indicates the transcription start site (+1). The inverted repeat representing the LiaR binding site is symbolized by hatched boxes. The sizes of the cloned fragments are illustrated by the vertical gray bars below. (C) The corresponding promoter activities in a *liaF* deletion mutant, as determined by β -galactosidase assay as described in the Fig. 1B legend (but without the addition of bacitracin), using strains TMB419-421, TMB676, TMB721, and TMB769. Error bars show standard deviations. (D) Summary of the LiaR binding sites upstream from the promoter regions of the *liaI*, *yhcY*, and *ydhE* genes. The corresponding inverted repeats are boxed in gray and underlined with black arrows. The bp number represents the distance to the transcription start site.

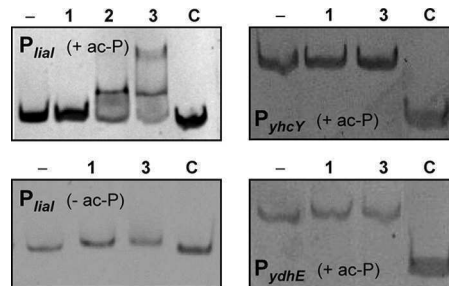


FIG. 3. Gel mobility shift assays with purified response regulator LiaR. For the reactions, LiaR was phosphorylated by acetyl phosphate (ac-P), with the exception of the assay whose results are shown in the lower left panel, as described in Materials and Methods. PCR products of *P_{liaI}* (180 bp), *P_{yhcY}*, and *P_{ydhE}* were incubated with an increasing molar excess of phosphorylated LiaR (lane 1, 50:1; lane 2, 75:1; lane 3, 100:1) followed by gel electrophoresis on native 8% polyacrylamide gels and detection of the DNA with SYBR green I. The first lane in each panel corresponds to free DNA (-). An internal fragment of *bceA* (161 bp) was always included as a negative control (C).

inhibitor protein LiaF but cannot be induced by bacitracin (Fig. 1B).

To investigate the relevance of these two potential LiaR binding sites, we performed gel mobility shift assays with the purified response regulator LiaR to directly study its interaction with the three promoter regions containing the identified LiaR boxes (Fig. 2D) *in vitro*. In the presence of acetyl phosphate as a small-molecule phosphodonator, a clear shift was observed for the *liaI* promoter region, whereas neither the unspecific DNA fragment (*bceA*) nor either of the other two promoters showed any shift (Fig. 3). The shift of the *liaI* promoter was dependent on the phosphorylation of LiaR, since no shift was observed in the absence of acetyl phosphate (Fig. 3). Taken together, these three observations raised doubts about the *in vivo* relevance of the *yhcY* and *ydhE* promoter regions as LiaR target loci of *B. subtilis*.

To further substantiate our findings and to analyze whether the significantly increased mRNA levels for all three targets translate into increased amounts of the corresponding proteins, we next performed a comprehensive proteomics study. Since all gene products but one (LiaI) encoded by these three loci are predicted to be soluble proteins, we only investigated the cytoplasmic proteome, again by comparing the protein signature of a wild-type strain with those of the isogenic *liaF::kan* and *liaR::kan* mutants. The results are shown in Fig. 4 and Fig. S1 in the supplemental material. Overall, the proteome signatures show very few significant differences in spot intensity. The most drastic changes were observed for LiaH, which was found to be the predominant cytoplasmic protein in the *liaF* mutant (see Fig. S1 in the supplemental material). It could be identified in six independent spots, indicative of post-translational modifications (Fig. 4A). A comparably complex pattern of LiaH expression has recently been observed in daptomycin-treated wild-type cells of *B. subtilis* (59), underlining the relevance of our finding. The nature of these posttranslational modifications remains to be identified. But mass spectroscopy analyses of LiaH protein bands isolated from SDS-PAGE gels identified one LiaH-specific peptide with a mass increase corresponding to one phosphate group (data not

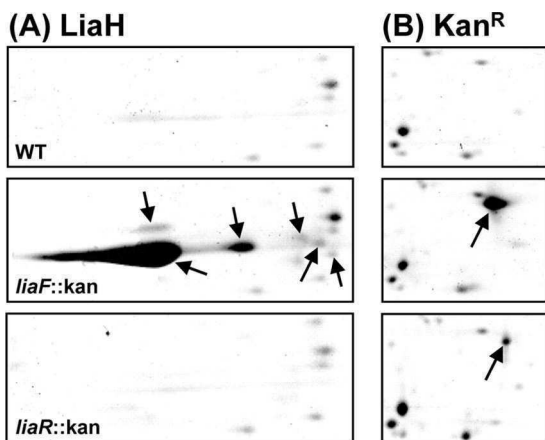


FIG. 4. Analysis of the cytoplasmic proteome by two-dimensional gel electrophoresis of the wild type (WT) and of otherwise isogenic *liaF::kan* and *liaR::kan* mutants. Only selected gel regions are shown. See Materials and Methods for experimental details. (A) The LiaH protein was identified in six independent spots (black arrows) by mass spectroscopy in the Lia ON mutant, indicative of posttranslational modifications. (B) A spot representing the product of the kanamycin resistance cassette (a type III aminoglycoside phosphotransferase derived from the *Streptococcus faecalis* plasmid pJH1; black arrow) was identified in the gels of the *liaF::kan* and *liaR::kan* mutant but not in the gel of the wild type. The larger amount in the *liaF* mutant relative to the amount in the *liaR* mutant strain originates from the LiaR-dependent autoregulation in the Lia ON mutant. See text for details.

shown). This observation, together with the clear pI shift of the spots in the 2-D gels (Fig. 4A), indicates that phosphorylation seems to be at least one type of posttranslational modification for LiaH.

The only other protein that showed a significant difference in its cellular amounts did not match any of the mapped proteins of the *B. subtilis* proteome. It could be detected in both mutants but was completely absent in the wild type. Mass spectroscopy revealed that the spot is comprised of the product of the kanamycin resistance gene. Compared to the basal expression level in the *liaR* mutant, its amount was further increased in the *liaF* mutant because of the autoregulatory feedback loop (Fig. 4B).

Despite significant promoter activity of both P_{yhcY} and P_{ydhE} in the *liaF* mutant (Fig. 1B) and strong signals for the corresponding transcripts (Fig. 1C), we were unable to detect any of the gene products encoded by these two loci. Taken together, our collective data suggest that the *liaIH* operon is the only LiaR target of relevance under natural conditions. Hence, we decided to focus our attention on this operon to understand the physiological role of the Lia response of *B. subtilis*.

The Lia system is not involved in cellular differentiation in *B. subtilis*. We had previously shown that the expression of the *liaIH* operon is embedded in the AbrB-/Spo0A-dependent differentiation cascade, which ultimately leads to the formation of dormant endospores (30). Therefore, we decided to investigate the influence of the Lia system on complex phenotypes associated with this regulatory cascade by comparing the behavior of *liaIH* and *liaF* mutants to that of the wild-type strain. No effects on the development of competence and endospore formation were observed. Moreover, we also moved both alleles into the nondomesticated ancestor strain NCIB3610 by SPP1

transduction to investigate multicellular phenotypes, such as colony differentiation, pellicle formation, and swarming motility, which were lost in the course of propagating the soil isolate in the laboratory environment (10). But again, no differences were observed for the *lia* mutants compared to the isogenic wild type (data not shown). The only identified difference with regard to complex phenotypes was delayed spore germination in the *liaF::kan* mutant relative to that in the wild type. But this turned out to be an experimental artifact, based on the strong read-through transcription from the *lia* locus into the divergently expressed *ger* operon that encodes spore germination proteins (see Fig. S2 in the supplemental material for details).

LiaIH contributes to the protection of cells against envelope and oxidative stress. The initial phenotypic screens failed to provide evidence for a role of LiaH in resistance against cell wall antibiotics that interfere with the lipid II cycle and which also function as strong inducers of the LiaFSR system (data not shown). Since the genome of *B. subtilis* encodes a LiaH paralog, PspA, we wondered if the lack of phenotypes associated with a *liaH* mutant could perhaps be the result of a functional redundancy of these phage shock proteins, as has been observed for a number of other paralogous protein pairs in *B. subtilis* (57). We therefore constructed a *liaH::kan pspA::cat* double mutant (TMB211) which was used in the subsequent physiological screens.

In order to get a comprehensive picture of phenotypes associated with LiaH/PspA of *B. subtilis*, we performed in-depth profiling by using phenotype microarrays. This technique allows the screening of hundreds of stress conditions in parallel, thereby enabling the fast and accurate identification of novel traits linked to genetic alterations (8), here, between the wild type and the isogenic *liaH pspA* and *liaF* mutant strains. The results of this study are summarized in Table S2 in the supplemental material. Overall, a relatively small number of rather diverse phenotypes could be associated with either the Lia ON mutant or the *liaH pspA* double mutant, and many effects were weak (data not shown). Only two types of stresses were represented by a number of compounds each. β -Lactam (cephalexin and cefotaxime) and additional cell wall antibiotics from our own screens (daptomycin, enduracidin, nisin, and fosfomicin) pointed toward a role of the phage shock proteins from *B. subtilis* in maintaining envelope integrity. Moreover, the sensitivity of *lia* mutants was also affected in the case of some compounds causing oxidative stress, such as menadione, plumbagin, sodium selenite, and hydrogen peroxide.

To verify and investigate these phenotypes in more detail, we next performed detailed follow-up studies to determine the MICs for larger panels of cell wall antibiotics and oxidative stress agents. We also performed serial dilution spot tests, using the individual *liaH* and *pspA* mutants to analyze the contribution of each of the two phage shock protein homologs to the observed phenotypes. Importantly, any increased sensitivity in the *liaH pspA* double mutant could be attributed to LiaH alone (data not shown). Therefore, only the results for the *liaH* mutant are shown. The results are summarized in Table 5, as well as in Fig. S3 in the supplemental material. In general, the MIC differences were moderate, rarely exceeding a 2- to 4-fold increased sensitivity of the *liaH* mutants relative to that of the wild type. The effects were more obvious in the serial dilution spot tests: at critical stressor concentrations, the

TABLE 5. Determination of the MICs and survival rates

Type of compound	Compounds	MIC, ^{a,b} survival rate ^c for:		
		Wild type	$\Delta liaF$ mutant	$\Delta liaIH$ mutant
Cell wall antibiotics	Bacitracin	300	300	300
	Cefotaxime	0.1, 10 ⁰	0.1, 10 ⁰	0.05 , 10 ⁻²
	Cephalexin	0.25, 10 ⁰	0.25, 10 ²	0.125 , 10 ¹
	Daptomycin	1.25, 10 ⁰	1.25, 10 ⁰	0.6 , 10 ⁻¹ to 10 ⁻²
	Enduracidin	25, 10 ⁰	12.5 , 10 ⁰	12.5 , 10 ⁻³
	Nisin	10	2.5	10
	Fosfomycin	100, 10 ⁰	200 , 10 ⁰	50 , 10 ⁻³
	Vancomycin	0.5	0.5	0.5
Oxidative stress reagents	Cumene hydroperoxide	0.006, 10 ⁰	0.006, 10 ⁰	0.006, 10 ⁻²
	Hydrogen peroxide	1.5	0.5	1.0
	Menadione	5, 10 ⁰	1.25 , 10 ⁰	2.5 , 10 ⁻¹
	Plumbagin	5, 10 ⁰	2.5 , 10 ⁰	1.25 , 10 ⁻¹
	Sodium selenite	500, 10 ⁰	500, 10 ⁰	125 , 10 ⁻²
	<i>t</i> -Butyl hydroperoxide	1, 10 ⁰	1, 10 ⁰	0.5 , 10 ⁻¹
Others	Cetylpyridinium chloride	0.5	0.5	0.5
	Domiphen bromide	0.125	0.03	0.125
	Phenylarsine oxide	0.1	0.1	0.05

^a MICs are in $\mu\text{g/ml}$ with the exception of cumene hydroperoxide (%), *t*-butylhydroperoxide (mM) and hydrogen peroxide (%).

^b Values indicating explicit sensitivity or resistance of the $\Delta liaF$ and $\Delta liaIH$ mutant strains versus that of the wild-type are highlighted in bold.

^c Survival rates were determined by serial dilution spot tests on Mueller-Hinton agar plates at the following "critical" compound concentrations: fosfomycin, 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$; cefotaxime, 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$; enduracidin, 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$; daptomycin, 0.15 $\mu\text{g ml}^{-1}$; cephalaxin, 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$; plumbagin, 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; menadione, 1.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$; *t*-butyl hydroperoxide, 0.3 mM; cumene hydroperoxide, 0.003%; sodium selenite, 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$. All values are given relative to the result for the wild type as a reference, which was therefore set to 10⁰. See Fig. S3 in the supplemental material for the original data and experimental details.

survival rate of the *liaH* mutant was reduced between one and four orders of magnitude, depending on the compound tested (Table 5; also see Fig. S3 in the supplemental material). Up-regulation of LiaIH expression in the *liaF* mutant hardly ever affected the stress sensitivity, with the exception of sensitivity to the β -lactam antibiotic cephalaxin. Here, the wild type and the *liaH* mutant showed comparable behavior, while 10 to 100 times more cells of the *liaF* mutant survived in the presence of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ cephalaxin (see Fig. S3 in the supplemental material).

Previous studies had identified a number of cell wall antibiotics as strong inducers of the Lia response, most of which interfered with the membrane-anchored lipid II cycle (i.e., bacitracin, daptomycin, enduracidin, ramoplanin, nisin, and vancomycin). In contrast, antibiotics that inhibit early (cytoplasmic; i.e., fosfomycin and D-cycloserine) or late (extracellular; i.e., β -lactams) steps of cell wall biosynthesis did not induce the *liaI* promoter (28, 46). Remarkably, LiaH does not confer any resistance against most of its inducers, with the exception of enduracidin and daptomycin (Table 5). The role of LiaH in counteracting daptomycin damage was recently reported in an independent study (20). On the other hand, LiaH had a significant effect on the viability of *B. subtilis* in the presence of some cell wall antibiotics that do not function as inducers of the Lia response, such as fosfomycin and some β -lactams (Table 5). The significance of this finding remains to be investigated.

LiaH forms large oligomeric rings with a 9-fold rotational symmetry. LiaH and PspA both belong to the phage shock protein family, which is widely conserved in the microbial world. A phylogenomic analysis revealed that members can be found in the *Actinobacteria* and *Firmicutes* (Gram positive) and

Proteo- and *Cyanobacteria* (Gram negative) and also in the *Archaea* and even in the chloroplasts of plants (data not shown). While the exact physiological role of phage shock proteins is still a matter of ongoing studies, one structural feature that seems to be conserved even in distantly related phage shock proteins is the formation of large oligomeric ring-like structures (3, 22).

To verify a functional relationship of LiaH to better-investigated phage shock proteins, we overexpressed and purified LiaH to near homogeneity as a His-tagged fusion protein (see Materials and Methods for details). Oligomerization was studied both by transmission electron microscopy and by gel filtration (Fig. 5). In the presence of 100 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ PEG-2000 (to increase the viscosity of the protein solution in order to simulate the cytoplasmic environment), a LiaH solution readily formed large ring-like complexes of homogenous sizes (Fig. 5A). Close-up views of individual complexes indicate the formation of bagel-shaped oligomers of about 25 nm in diameter, which can be seen at different angles (Fig. 5B). From 400 particles randomly selected and analyzed, 46.2% showed the top-view projection form, 23.8% the tilted-view form at different angles, and 16.0% the side-view form. Fourteen percent of the particles could not be assigned (mostly smaller fragments of the 25-nm complex). The images of the side-view form clearly show an accumulation of negative staining solution along the long axes of the protein complexes, separating the ring into two substructures. This is indicative for an indentation (as shown in the schematic models) but not necessarily for two separate rings. Side-view forms consisting of just one single ring could not be observed in the preparation.

We performed Markham rotations of top-view forms to analyze the symmetry of these complexes (42). This analysis

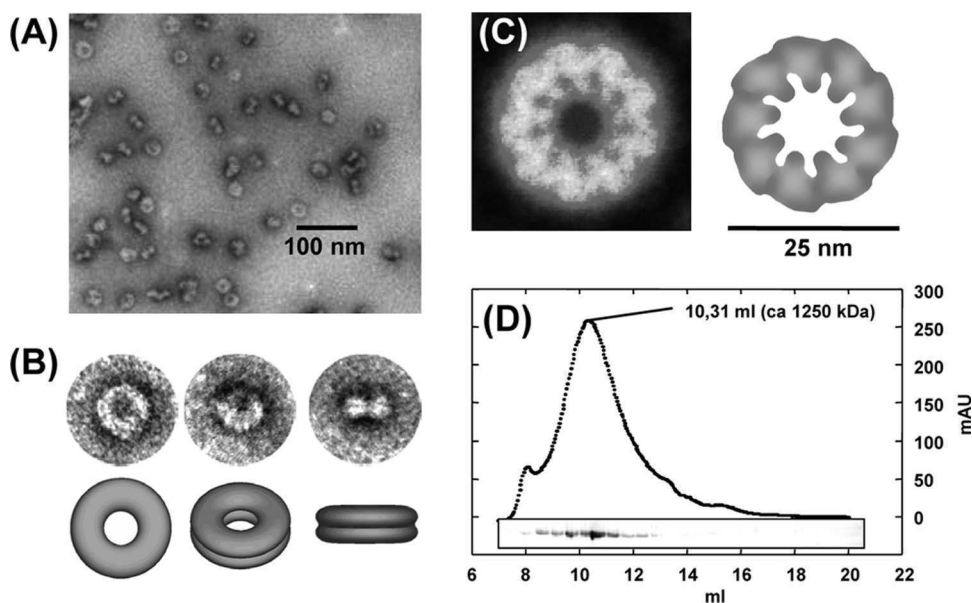


FIG. 5. Oligomeric structure of LiaH (see Materials and Methods for experimental details). (A) Transmission electron micrographs of LiaH rings. (B) Details of individual rings at different angles. Schematic models are shown below for illustrative purposes. (C) Markham rotation reveals a 9-fold rotational symmetry. (D) Size exclusion chromatography reveals a homogenous population of LiaH oligomers with a size of at least 1,250 kDa. The inset shows the respective SDS-PAGE analyses of the collected fractions corresponding to the chromatogram above. mAU, milli-absorbance unit.

clearly revealed a 9-fold rotational symmetry of the LiaH rings (Fig. 5C). The stability and homogeneous size distribution of the LiaH complexes was verified by analytical gel filtration experiments (Fig. 5D). Moreover, these studies also demonstrated that the LiaH complexes have a molecular mass of at least 1,250 kDa, which is in good agreement with the formation of a 36-mer (i.e., a nonamer of tetramers), as has also been suggested for *E. coli* PspA (22).

DISCUSSION

In this work, we have combined transcriptomics, proteomics, and in-depth phenotypic profiling to define the LiaR response of *B. subtilis*. We could demonstrate that three loci, *liaIH-liaGFSR*, *yhcYZ-yhdA*, and *ydhE*, which are preceded by a putative LiaR binding site, are also expressed in a Lia-dependent manner (Fig. 1 and 2). However, subsequent analyses suggested that only the *lia* operon itself is a relevant target locus of LiaR *in vivo* (Fig. 3 and 4). We hypothesize that an important factor contributing to these discrepancies between the wild-type situation and the response in a Lia ON mutant is the autoregulatory feedback loop: in the absence of the inhibitor protein LiaF, the TCS LiaRS is not only fully active, it also strongly (and constitutively) induces its own expression (29). Under these conditions, the accumulated cellular pool of phosphorylated LiaR obviously also mediates enhanced expression from promoters containing weakly conserved LiaR boxes that do not play any role as target loci in the wild-type situation. While the putative LiaR binding sites of P_{yhcY} and P_{ydhE} are located at about the same distance relative to the transcriptional start site, they are significantly more weakly conserved (Fig. 2D) and presumably have a LiaR binding affinity that excludes recognition by this response regulator under normal

physiological conditions. This hypothesis is supported by the results from the *in vitro* gel retardation assays (Fig. 3).

Our collective data argue for the *liaIH-liaGFSR* operon as the only relevant target of LiaFSR-dependent signal transduction. This hypothesis is also supported by the results of a comparative genomics analysis indicating that in the *Bacillus/Listeria* group, homologs of the *liaIH* operon are the primary target(s) of Lia-dependent gene expression (29). This operon encodes a small putative membrane protein with little sequence conservation and a member of the PspA/IM30 protein family, respectively. PspA is the core component of the phage shock response of *E. coli* and other *Gammaproteobacteria*, as mentioned above. It is therefore attractive to hypothesize that the LiaFSR system of *B. subtilis* and other bacilli has adopted the function of the proteobacterial phage shock response.

Comparison of the Psp response of *E. coli* and the Lia response of *B. subtilis*. The core of the Psp response in *E. coli* consists of the stress-inducible *pspABCD* operon, which is regulated by PspF, encoded by a constitutive gene located upstream and inversely oriented from the *psp* operon (Fig. 6A) (31). As a homohexamer, this AAA(+) enhancer protein mediates strong induction from the σ^{54} -dependent *pspA* promoter in the presence of envelope stress conditions (see below for details). The activity of PspF₆ is strictly regulated by PspA. Importantly, recent biochemical analyses have demonstrated that PspA undergoes a shift in its oligomeric structure which affects its activity. Under nonstress conditions, PspA exists in a lower-order oligomer and interacts with PspF to form heterooligomers with a 6:6 stoichiometry (27). In this form, PspA inhibits PspF, resulting in only a very low basal expression level of the *psp* operon. Stress induction somehow affects the PspF-PspA interaction, resulting in a dissociation of the complex. Thereby, PspF is released to activate the expression of the *psp*

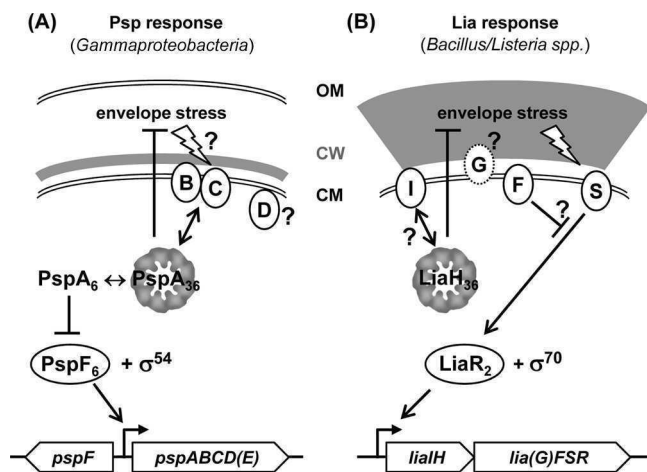


FIG. 6. Comparison between the Psp response of gammaproteobacteria and the Lia response of *Firmicutes* bacilli. All proteins are represented by circles at their known or predicted cellular location, with the letters corresponding to the respective genes, shown below. The phage shock proteins PspA and LiaH are depicted in their oligomeric form, using the model from Fig. 5C for illustrative purposes only. LiaG is represented by a dotted circle because homologs are only present in *B. subtilis* and its closest relatives. Double-ended arrows indicate interactions, normal arrows activation, and T-shaped lines inhibition. CM, cytoplasmic membrane; CW, cell wall; OM, outer membrane. See Discussion for details.

operon, which strongly induces *pspA* expression. The resulting increase in cellular PspA amounts leads to the formation of large 36-mer PspA complexes, which then directly interact with the cytoplasmic membrane to counteract proton leakage (33). A signaling cascade that perceives envelope damage and transduces this information to the PspA-PspF complex presumably exists but has not been characterized so far. Likely candidates for this function would be the two membrane proteins PspB and PspC (Fig. 6A). Their genes are coexpressed with *pspA*, and a protein-protein interaction of both with PspA has been demonstrated (1). Joly et al. therefore proposed that part of the signal transduction mechanism is the decay of the PspABC complex in the absence of stress, which ultimately allows the formation of the PspA₆-PspF₆ repressor complex (27). The role of the fourth gene product of the *psp* operon, PspD, has not been elucidated so far, and PspE, while coexpressed, is not part of the Psp response (14).

The Lia response, which is conserved in all *Firmicutes* *Bacillus* and *Listeria* species, also consists of five genes organized in two transcriptional units (Fig. 6B). While the expression of the regulatory genes *lia(G)FSR* is ensured by a weak constitutive promoter, the inducible and strongly LiaR-dependent promoter upstream of the *liaIH* operon leads to a significant amount of read-through transcription and, therefore, a positive-feedback loop on regulator gene expression (29), as also demonstrated by the results of the microarray analysis (Table 4). LiaF, together with LiaRS, constitutes a cell envelope stress-sensing three-component system that is highly conserved in *Firmicutes* bacteria (44). A LiaG homolog is only found in bacilli closely related to *B. subtilis*; its function is still unclear.

The Psp and Lia responses clearly differ from each other with regard to the mechanism of signal transduction and gene

regulation (Fig. 6). Most importantly, there is no indication that LiaH plays any regulatory role comparable to that of *E. coli* PspA. A potential modulator function of LiaH on LiaR-dependent gene expression, as has been discussed previously (29), could be attributed to a genetic artifact, based again on strong positive polar effects from the inserted kanamycin resistance cassette used to replace *liaH* in the original mutant (data not shown).

The only direct homology between proteins of the Psp and Lia response is of PspA/LiaH, which both belong to the PspA/IM30 protein family. While no additional sequence similarity exists in the remaining proteins involved in both responses, it is noteworthy that *pspB* and *liaI* both encode small putative membrane proteins that are coexpressed with the PspA homologs. It is therefore tempting to postulate an interaction between LiaI and LiaH, similar to that described for PspA and PspB (Fig. 6B), but this needs to be further investigated.

A similar physiological role of PspA and LiaH is supported by the overlap of the inducer spectra of *B. subtilis* LiaH and PspA from *E. coli*. In addition to the strong induction by envelope stress, expression of the *liaIH* operon is induced by alkaline shock, secretion stress, and organic solvents (26, 46, 61). In comparison, expression of the *pspA* operon of *E. coli* is induced by filamentous phage infection (hence the name), misfolded and oversecreted envelope proteins, and other stress conditions, including heat and osmotic shock, exposure to organic solvents, protonophores, and antibiotics that interfere with phospholipid biosynthesis (7, 11, 14, 23, 48). Moreover, both genes are also induced without external stresses at the onset of or during stationary phase (30, 60). The similarity in inducing conditions is also reflected by the relatively diverse but weak phenotypes associated with mutations in the *liaIH* operon (Table 5; also see Fig. S3 in the supplemental material), which is again reminiscent of the Psp response of *E. coli* and related bacteria (3, 14, 22, 48).

The most obvious similarity between *E. coli* PspA and *B. subtilis* LiaH is the formation of large oligomeric ring-like structures with a 9-fold rotational symmetry, possibly consisting of 36-mers (Fig. 5) (22). Comparable bagel-shaped structures have also been observed for the PspA homologs, VIPP1 from *Synechocystis* (*Cyanobacteria*), and chloroplasts from *Chlamydomonas* and *Arabidopsis thaliana* (3, 35, 38). This conservation in both sequence and overall oligomeric structure indicates an evolutionary ancient mechanism of ensuring membrane and envelope integrity which is present in the *Archaea*, many eubacterial phyla, and plants. More recently, structural studies by Standar et al. (53) with detergent-free PspA preparations from membrane fractions demonstrated the formation of even larger clathrin-like so-called "PspA scaffolds" in *E. coli*. The exact function of these super structures is still unclear, but these large scaffolds are thought to contribute to the maintenance of membrane integrity in stressed cells, possibly through multiple PspA-membrane interactions over large surface areas (53). This assumption of an overall PspA layer to support membrane integrity is somewhat contradicted by recent findings that PspA localizes in discrete regions of the cell, such as midcell and the lateral cell wall (17). The localization of these PspA complexes, which are highly dynamic structures, depends on the bacterial cytoskeleton element MreB. In the absence of MreB, the Psp response is still induced, but the cells are no

longer protected against membrane stress. This finding strongly suggests that the protective function of PspA complexes requires the bacterial cytoskeleton (17). These observations demonstrate that despite a number of groundbreaking recent studies and our progress in understanding the Psp response of gammaproteobacteria, the exact physiological role of PspA/IM30 proteins is still not fully understood.

Conclusions and outlook. Taken together, this is the first report on the Psp response in low-G+C Gram-positive bacteria. Based on the clear conservation in the genomic context of the *lia* locus and the identification of putative LiaR binding sites, the overall organization (with the noteworthy exception of *liaG*, which is only present in *Bacillus* spp. closely related to *B. subtilis*) and regulation seem to be conserved in other *Firmicutes* bacilli and, presumably, also in *Listeria* spp. (29). For the latter, the *liaIH* and *liaFSR* operons are in separate genomic locations. However, both are preceded by a LiaR box (29). The work presented in this study was aimed at defining the Lia response of *B. subtilis*. Our data strongly suggest that, in contrast to the large LiaRS regulons identified in *Firmicutes* cocci (16, 36, 43, 55), the Lia response in *Bacillus* and *Listeria* spp. only orchestrates a phage shock protein-like response, encoded by the *liaIH* operon. Future studies now need to unravel the physiological role of the two corresponding proteins. Based on the data from *E. coli* PspA, phage shock proteins seem to exhibit their function through protein-protein and protein-membrane interactions. Accordingly, we first need to investigate the localization and identify potential protein interaction partners of LiaH. The latter will also help to answer the question of whether LiaH, like PspA, also functions as an AAA(+) adaptor protein, despite the lack of a PspF homolog in *B. subtilis*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (MA2837/1-3) and the Fonds der Chemischen Industrie (to T.M.) and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (project 03ZIK012, to G.H. and U.M., and project 0313807A, to M.H. and B.V.). T.W. is the recipient of an FCI Chemiefonds Ph.D. stipend.

We thank Susanne Gebhard for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Adams, H., W. Teertstra, J. Demmers, R. Boesten, and J. Tommassen. 2003. Interactions between phage shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:1174–1180.
- Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6887–6891.
- Aseeva, E., F. Ossenbuhl, L. A. Eichacker, G. Wanner, J. Soll, and U. C. Vothknecht. 2004. Complex formation of Vipp1 depends on its α -helical PspA-like domain. *J. Biol. Chem.* **279**:35535–35541.
- Baldi, P., and A. D. Long. 2001. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* **17**:509–519.
- Belcheva, A., and D. Golemi-Kotra. 2008. A close-up view of the VraSR two-component system. A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage. *J. Biol. Chem.* **283**:12354–12364.
- Belcheva, A., V. Verma, and D. Golemi-Kotra. 2009. DNA-binding activity of the vancomycin resistance associated regulator protein VraR and the role of phosphorylation in transcriptional regulation of the *vraSR* operon. *Biochemistry* **48**:5592–5601.
- Bergler, H., D. Abraham, H. Aschauer, and F. Turnowsky. 1994. Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the *pspA* gene. *Microbiology* **140**(Pt. 8):1937–1944.
- Bochner, B. R. 2003. New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nat. Rev. Genet.* **4**:309–314.
- Boyle-Vavra, S., S. Yin, and R. S. Daum. 2006. The VraS/VraR two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**:163–171.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, and R. Kolter. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:11621–11626.
- Brissette, J. L., M. Russel, L. Weiner, and P. Model. 1990. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:862–866.
- Buttner, K., J. Bernhardt, C. Scharf, R. Schmid, U. Mäder, C. Eymann, H. Antelmann, A. Völker, U. Völker, and M. Hecker. 2001. A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **22**:2908–2935.
- Dartois, V., M. Debarbouille, F. Kunst, and G. Rapoport. 1998. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:1855–1861.
- Darwin, A. J. 2005. The phage-shock-protein response. *Mol. Microbiol.* **57**:621–628.
- Donaldson, L. W. 2008. The NMR structure of the *Staphylococcus aureus* response regulator VraR DNA binding domain reveals a dynamic relationship between it and its associated receiver domain. *Biochemistry* **47**:3379–3388.
- Eldholm, V., B. Gutt, O. Johnsborg, R. Bruckner, P. Maurer, R. Hakenbeck, T. Mascher, and L. S. Havarstein. 2010. The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *J. Bacteriol.* **192**:1761–1773.
- Engl, C., G. Jovanovic, L. J. Lloyd, H. Murray, M. Spitaler, L. Ying, J. Errington, and M. Buck. 2009. In vivo localizations of membrane stress controllers PspA and PspG in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **73**:382–396.
- Estacio, W., S. S. Anna-Arriola, M. Adedipe, and L. M. Marquez-Magana. 1998. Dual promoters are responsible for transcription initiation of the *fla*/che operon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:3548–3555.
- Gardete, S., S. W. Wu, S. Gill, and A. Tomasz. 2006. Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3424–3434.
- Hachmann, A.-B., E. R. Angert, and J. D. Helmann. 2009. Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1598–1609.
- Hamze, K., D. Julkowska, S. Autret, K. Hinc, K. Nagorska, A. Sekowska, I. B. Holland, and S. J. Seror. 2009. Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for *phrC*. *Microbiology* **155**:398–412.
- Hankamer, B. D., S. L. Elderkin, M. Buck, and J. Nield. 2004. Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring. *J. Biol. Chem.* **279**:8862–8866.
- Hardie, K. R., S. Lory, and A. P. Pugsley. 1996. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**:978–988.
- Harwood, C. R., and S. M. Cutting. 1990. *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Homuth, G., S. Masuda, A. Mogk, Y. Kobayashi, and W. Schumann. 1997. The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J. Bacteriol.* **179**:1153–1164.
- Hyryläinen, H. L., M. Sarvas, and V. P. Kontinen. 2005. Transcriptome analysis of the secretion stress response of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:389–396.
- Joly, N., P. C. Burrows, C. Engl., G. Jovanovic, and M. Buck. 2009. A lower-order oligomer form of phage shock protein A (PspA) stably associates with the hexameric AAA(+) transcription activator protein PspF for negative regulation. *J. Mol. Biol.* **394**:764–775.
- Jordan, S., M. I. Hutchings, and T. Mascher. 2008. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:107–146.
- Jordan, S., A. Junker, J. D. Helmann, and T. Mascher. 2006. Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *J. Bacteriol.* **188**:5153–5166.
- Jordan, S., E. Rietkötter, M. A. Strauch, F. Kalamorz, B. G. Butcher, J. D. Helmann, and T. Mascher. 2007. LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **153**:2530–2540.
- Jovanovic, G., L. Weiner, and P. Model. 1996. Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J. Bacteriol.* **178**:1936–1945.
- Jürgen, B., S. Tobisch, M. Wümpelmann, D. Gördes, A. Koch, K. Thurow, D. Albrecht, M. Hecker, and T. Schweder. 2005. Global expression profiling of *Bacillus subtilis* cells during industrial-close fed-batch fermentations with different nitrogen sources. *Biotechnol. Bioeng.* **92**:277–298.
- Kobayashi, R., T. Suzuki, and M. Yoshida. 2007. *Escherichia coli* phage shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol. Microbiol.* **66**:100–109.
- Kossen, K., and O. C. Uhlenbeck. 1999. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by

- 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**:3811–3820.
35. **Kroll, D., K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U. C. Vothknecht, J. Soll, and P. Westhoff.** 2001. VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:4238–4242.
 36. **Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, and K. Hiramatsu.** 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **49**:807–821.
 37. **Kuroda, M., K. Kuwahara-Arai, and K. Hiramatsu.** 2000. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:485–490.
 38. **Liu, C., F. Willmund, J. R. Golecki, S. Cacace, B. Hess, C. Markert, and M. Schroda.** 2007. The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant J.* **50**:265–277.
 39. **Liu, Y. H., A. Belcheva, L. Konermann, and D. Golemi-Kotra.** 2009. Phosphorylation-induced activation of the response regulator VraR from *Staphylococcus aureus*: insights from hydrogen exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **391**:149–163.
 40. **Lukat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:718–722.
 41. **MacRitchie, D. M., D. R. Buelow, N. L. Price, and T. L. Raivio.** 2008. Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**:80–110.
 42. **Markham, R., S. Frey, and G. J. Hills.** 1963. Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology* **20**:88–102.
 43. **Martinez, B., A. L. Zomer, A. Rodriguez, J. Kok, and O. P. Kuipers.** 2007. Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the lactococcal two-component system CesSR. *Mol. Microbiol.* **64**:473–486.
 44. **Mascher, T.** 2006. Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**:133–144.
 45. **Mascher, T., N. G. Margulis, T. Wang, R. W. Ye, and J. D. Helmann.** 2003. Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol. Microbiol.* **50**:1591–1604.
 46. **Mascher, T., S. L. Zimmer, T. A. Smith, and J. D. Helmann.** 2004. Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2888–2896.
 47. **Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 48. **Model, P., G. Jovanovic, and J. Dworkin.** 1997. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol. Microbiol.* **24**:255–261.
 49. **Moir, A., and D. A. Smith.** 1990. The genetics of bacterial spore germination. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**:531–553.
 50. **Nakano, M. M., M. A. Marahiel, and P. Zuber.** 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**:5662–5668.
 51. **Nasser, W., A. C. Awade, S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy.** 1993. Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Lett.* **335**:319–326.
 52. **Ogura, M., L. Liu, M. Lacelle, M. M. Nakano, and P. Zuber.** 1999. Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**:799–812.
 53. **Standar, K., D. Mehner, H. Osadnik, F. Berthelmann, G. Hause, H. Lunsdorf, and T. Bruser.** 2008. PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **582**:3585–3589.
 54. **Stülke, J., I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier, and G. Rapoport.** 1997. Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol. Microbiol.* **25**:65–78.
 55. **Suntharalingam, P., M. D. Senadheera, R. W. Mair, C. M. Levesque, and D. G. Cvitkovitch.** 2009. The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **191**:2973–2984.
 56. **Tam, L. T., C. Eymann, D. Albrecht, R. Sietmann, F. Schauer, M. Hecker, and H. Antelmann.** 2006. Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* **8**:1408–1427.
 57. **Thomaides, H. B., E. J. Davison, L. Burston, H. Johnson, D. R. Brown, A. C. Hunt, J. Errington, and L. Czaplowski.** 2007. Essential bacterial functions encoded by gene pairs. *J. Bacteriol.* **189**:591–602.
 58. **Wach, A.** 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**:259–265.
 59. **Wecke, T., D. Zühlke, U. Mäder, S. Jordan, B. Voigt, S. Pelzer, H. Labischinski, G. Homuth, M. Hecker, and T. Mascher.** 2009. Daptomycin versus friulimicin B: in-depth profiling of *Bacillus subtilis* cell envelope stress responses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1619–1623.
 60. **Weiner, L., and P. Model.** 1994. Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:2191–2195.
 61. **Wiegert, T., G. Homuth, S. Versteeg, and W. Schumann.** 2001. Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon. *Mol. Microbiol.* **41**:59–71.
 62. **Yoshida, K. I., Y. Fujita, and S. D. Ehrlich.** 2000. An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**:5454–5461.
 63. **Youngman, P.** 1990. Use of transposons and integrational vectors for mutagenesis and construction of gene fusions in *Bacillus subtilis*, p. 221–266. In C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*

Eva Rietkötter, Diana Hoyer und Thorsten Mascher, 2008

Molecular Microbiology 68(3): 768-85

Mitwirkung der Autoren:

Eva Rietkötter, Diana Hoyer und Thorsten Mascher entwickelten die erforderlichen Experimente. Eva Rietkötter und Diana Hoyer führten die Experimente durch und trugen zur Auswertung dieser bei. Diana Hoyer untersuchte das Induktionsverhalten des *lia*-Promotors durch die im Paper angegebenen Experimente und führte die Analyse durch Western Blot aus. Des Weiteren war Diana Hoyer am Design von Paper-Abbildungen beteiligt. Eva Rietkötter und Thorsten Mascher haben das Paper geschrieben.

Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*

Eva Rietkötter, Diana Hoyer[†] and
Thorsten Mascher^{†*}

Department of General Microbiology,
Georg-August-University, Göttingen, Germany.

Summary

The extracellular presence of antibiotics is a common threat in microbial life. Their sensitive detection and subsequent induction of appropriate resistance mechanisms is therefore a prerequisite for survival. The bacitracin stress response network of *Bacillus subtilis* consists of four signal-transducing systems, the two-component systems (TCS) BceRS, YvcPQ and LiaRS, and the extracytoplasmic function (ECF) σ factor σ^M . Here, we investigated the mechanism of bacitracin perception and the response hierarchy within this network. The BceRS–BceAB TCS/ABC transporter module is the most sensitive and efficient bacitracin resistance determinant. The ABC transporter BceAB not only acts as a bacitracin detoxification pump, but is also crucial for bacitracin sensing, indicative of a novel mechanism of stimulus perception, conserved in *Firmicutes* bacteria. The Bce system seems to respond to bacitracin directly (drug sensing), whereas the LiaRS TCS and σ^M respond only at higher concentrations and indirectly to bacitracin action (damage sensing). The YvcPQ–YvcRS system is subject to cross-activation via the paralogous Bce system, and is therefore only indirectly induced by bacitracin. The bacitracin stress response network is optimized to respond to antibiotic gradients in a way that maximizes the gain and minimizes the costs of this stress response.

Introduction

Efficient stress response systems are crucial for the bacterial cell's ability to survive and outlast threats from the environment (Storz and Hengge-Aronis, 2000). One important aspect of life in soil, the habitat of *Bacillus*

subtilis, is the ubiquitous presence of antibiotics that target essential cellular structures. These antimicrobial compounds are thought to be synthesized by microbes to suppress the growth of competitors in the daily struggle for available ecological niches. The majority of classical antibiotics are produced by microorganisms of the soil biosphere (Berdy, 2005), such as bacilli (Stein, 2005; Butcher and Helmann, 2006), fungi (Anke, 1997) and – most notably – the actinomycetes (McNeil and Brown, 1994; Champness, 2000). Stress responses and the development of counter strategies, including efficient resistance mechanisms, are therefore widespread survival strategies among soil bacteria to succeed in this habitat (D'Costa *et al.*, 2006).

One essential cellular structure of any bacterial cell that is targeted by many antibiotics is the cell envelope. The presence of antibiotics and other conditions present in the soil that can alter or even destroy this essential cellular structure necessitate that its integrity is closely monitored. The corresponding signal-transducing regulatory systems respond to alterations and dysfunctions of the envelope and induce appropriate counter-measures to repair damages and secure functionality (Ruiz and Silhavy, 2005; Rowley *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2008).

The regulatory network orchestrating cell envelope stress response in the Gram-positive model bacterium *B. subtilis* is well investigated. It is orchestrated by two regulatory principles and consists of at least three extracytoplasmic function (ECF) σ factors and four two-component systems (TCS) (Jordan *et al.*, 2008). The most complex response elicited by a single-cell wall antibiotic is that to bacitracin, which specifically induces four signalling systems, the ECF σ factor σ^M , and the TCS LiaRS, BceRS and YvcPQ (Mascher *et al.*, 2003). Moreover, the σ^B -dependent general stress response and the CzrA-dependent zinc-shock response are also transiently induced. Among the genes induced in response to extracellular bacitracin are two bacitracin resistance determinants: (i) the ABC transporter BceAB, regulated by the BceRS TCS (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a), and (ii) the undecaprenyl pyrophosphate phosphatase BcrC, regulated by the ECF σ factors σ^M and σ^X (Cao and Helmann, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003b; Bernard *et al.*, 2005). The genes most strongly induced by bacitracin are *liaIH*, which are regulated by the LiaRS–LiaF three-component system (Mascher *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2006). A comparably complex regulatory

Accepted 1 March, 2008. *For correspondence. E-mail thorsten.mascher@bio.uka.de; Tel. (+49) 721 6083473; Fax (+49) 721 6088932. [†]Current address: Institute of Applied Life Science, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Germany.

network was also recently described for a close relative, *Bacillus licheniformis* (Wecke *et al.*, 2006).

Bacitracin is a cyclic dodecylpeptide antibiotic, non-ribosomally synthesized by *B. licheniformis* and some strains of *B. subtilis* (Azevedo *et al.*, 1993; Ishihara *et al.*, 2002). It is produced as a mixture of up to 50 different closely related congeners (Kang *et al.*, 2001), and requires a divalent metal ion for its biological activity (Ming and Epperson, 2002). It binds very tightly to undecaprenyl pyrophosphate (UPP) (Stone and Strominger, 1971; Storm and Strominger, 1973), the lipid carrier responsible for the translocation of cell envelope precursors from the cytosol to the extracellular side of the cytoplasmic membrane, where they are incorporated in the macromolecular network of the envelope (Delcour *et al.*, 1999; Foster and Popham, 2002). Bacitracin prevents the dephosphorylation of UPP necessary for the recycling of the lipid carrier, thereby ultimately inhibiting cell wall polymer biosynthesis.

Four different mechanisms of bacitracin resistance have been described so far: (i) expression of bacitracin-specific ABC transporters (Podlesek *et al.*, 1995; Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a; Manson *et al.*, 2004), (ii) *de novo* synthesis of undecaprenyl monophosphate (Cain *et al.*, 1993; Chalker *et al.*, 2000), (iii) expression of alternative undecaprenyl pyrophosphate phosphatases (Cao and Helmann, 2002; Ohki *et al.*, 2003b; Bernard *et al.*, 2005), and (iv) exopolysaccharide production (Pollock *et al.*, 1994; Tsuda *et al.*, 2002). Of these possibilities, induction of bacitracin-specific ABC transporters is the most efficient resistance mechanism. The direction of bacitracin transport for detoxification is still a matter of debate, due to the uncertainty of the site of bacitracin action (i.e. extracytoplasmic or cytoplasmic surface of, or even within the cytoplasmic membrane). While BceAB has been classified and hence described as a bacitracin efflux pump (Ohki *et al.*, 2003a; Bernard *et al.*, 2007), its architecture argues in favour of its function as a bacitracin importer, based on the structures of other ABC transporters (van der Heide and Poolman, 2002; Davidson and Chen, 2004; Dawson *et al.*, 2007).

Here, we report new insights into the mechanism of bacitracin perception and the response hierarchy within the regulatory systems orchestrating the bacitracin stress response of *B. subtilis*. We demonstrate that transcription from the *bceA* promoter, which is controlled by the BceRS TCS, is the first to be detected as the extracellular bacitracin concentration increases in the growth medium, i.e. BceRS is the most sensitive bacitracin sensor. It requires its target genes, the bacitracin resistance ABC transporter BceAB, for stimulus perception. Moreover, the Bce system also affects the activity of the paralogous YvcPQ–YvcRS system, which therefore responds only indirectly to bacitracin. The implications of these new findings on the

physiological role of bacitracin and the Bce system are discussed.

Results

Bacitracin-inducible regulatory systems differ in their induction thresholds and the overall strength of their responses

Five signal-transducing systems were previously shown by genome-wide transcriptional profiling to be induced by the extracellular presence of bacitracin: three TCS, BceRS, YvcPQ and LiaRS, the ECF σ factor σ^M and the σ^B -dependent general stress response (Mascher *et al.*, 2003). While the bacitracin concentration used in this study (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was sublethal, the experimental set-up nevertheless represented a sudden antibiotic shock with relatively high amounts of bacitracin, most likely provoking an all-at-once response of all systems induced by bacitracin. This approach, while allowing the identification of signal-transducing systems capable of sensing bacitracin, does not reflect the natural situation (i.e. in the soil), where the cells are confronted with antibiotic gradients increasing over time.

This realization provoked the question of the absolute sensitivities of bacitracin-responsive regulatory systems in *B. subtilis*. For that purpose, the primary target promoters of the three TCS (P_{bceA} for BceRS, P_{yvcR} for YvcPQ and P_{liaI} for LiaRS) (Mascher *et al.*, 2003; 2004; Ohki *et al.*, 2003a; Jordan *et al.*, 2006) and σ^M (P_{bcrC}) (Cao and Helmann, 2002; Ohki *et al.*, 2003b) were transcriptionally fused to *lacZ*, using the vector pAC6 (Stülke *et al.*, 1997), and integrated at the *amyE* locus of the *B. subtilis* wild-type strain 168. The resulting reporter strains, TMB279, TMB299, TMB016 and TMB134, respectively (Table 2), were incubated to mid-logarithmic growth phase, split in 2 ml portions and challenged for 30 min with increasing bacitracin concentrations (ranging from 0.03 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$). An uninduced sample was included as a reference. The cells were harvested, lysed and β -galactosidase assays were performed as described in *Experimental procedures*. The results are shown in Fig. 1.

The target promoters of all four systems responded in a dose-dependent manner to bacitracin, albeit with a different behaviour. While the activity of P_{bceA} or P_{yvcR} gradually increases over a relatively large range of bacitracin concentrations, the response curve of P_{bcrC} and P_{liaI} is much steeper, i.e. increases over a smaller range (Fig. 1). The systems also differ in both the threshold concentration at which significant induction (more than twofold) is first observed, as well as the overall strength of induction, expressed as fold changes relative to the uninduced reference sample in Fig. 1. While P_{bceA} or P_{liaI} are induced up to ~150-fold, P_{yvcR} is only induced to about a tenth (15- to

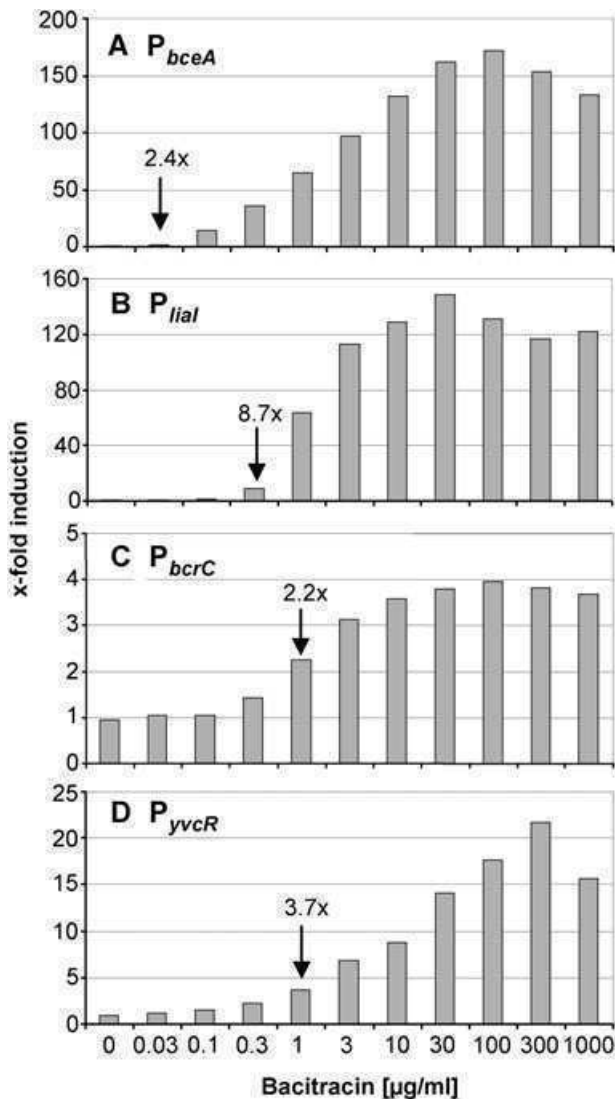


Fig. 1. Induction of bacitracin-responsive promoters as a function of the bacitracin concentration. The bacitracin concentration (in $\mu\text{g ml}^{-1}$) on the x-axis is plotted against fold induction values of the induced samples versus the uninduced control culture, shown on the y-axis. For induction experiments, LB medium was inoculated from a fresh overnight culture and incubated at 37°C with aeration. At mid-logarithmic growth phase ($\text{OD}_{600} \sim 0.4$), the culture was split and challenged with increasing bacitracin concentrations for 30 min, with one sample remaining as the uninduced control. The cells were harvested and β -galactosidase assays were performed as described in *Experimental procedures*. The values shown are exemplarily for at least three independent measurements with two independent mutants per reporter strain. The arrow indicates the sensitivity threshold concentration, at which the promoter activity was induced more than twofold. The strains used for the promoter-*lacZ* fusions are (A) TMB279 (P_{bceA} -*lacZ*), (B) TMB016 (P_{liaI} -*lacZ*), (C) TMB134 (P_{bcrC} -*lacZ*) and (D) TMB299 (P_{yvcR} -*lacZ*).

20-fold), and P_{bcrC} expression hardly reaches a meager fourfold induction. The slight decrease of β -galactosidase activities observed for all reporter strains at the highest bacitracin concentrations is due to beginning lysis of the

cultures, as has been observed previously (Mascher *et al.*, 2004).

Importantly, the systems are induced at different minimal threshold concentrations, thereby clearly demonstrating the presence of a response hierarchy, and therefore – in the presence of antibiotic gradients in the soil – also a temporal hierarchy. BceRS is the first system to respond, inducing the activity of its target promoter P_{bceA} already at bacitracin concentrations as low as $0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 1A), i.e. about four orders of magnitude below the minimal inhibitory concentration (MIC) of this antibiotic in *B. subtilis*. This result is important in the light of the physiological role that its target genes play: the ABC transporter BceAB has been shown to be the most efficient bacitracin resistance determinant of *B. subtilis* (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a), and its deletion results in a 50-fold increased bacitracin sensitivity (Table 1).

The next system to respond is LiaRS, with significant induction of its target promoter being observed at about 10 times the bacitracin concentration compared with the Bce system (Fig. 1B and Table 1). The remaining two systems are induced at about another three times higher bacitracin concentration (Fig. 1C and D and Table 1). So far, these results demonstrate that in the presence of bacitracin gradients, the first system to respond is BceRS, resulting in the strong induction of BceAB expression, and therefore bacitracin resistance. Only if this system alone is not sufficient to confer bacitracin resistance, the remaining regulators are induced in a step-wise fashion, ultimately inducing, among other genes, a second bacitracin-resistant determinant, the undecaprenyl pyrophosphate phosphatase BcrC (Cao and Helmann, 2002; Ohki *et al.*, 2003b; Bernard *et al.*, 2005).

The cellular bacitracin susceptibility affects the regulatory sensitivity

Next, we addressed the question if the regulatory sensitivity of the four signalling systems is influenced by the cellular sensitivity of *B. subtilis* towards bacitracin. For that purpose, we repeated the experiments as described above in strains harbouring deletions in *bcrC* and *bceAB*, the known bacitracin resistance determinants. The results are summarized in Table 1. Deletion of *bcrC* reduces the MIC by a factor of 20, from 500 to $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ bacitracin (Mascher *et al.*, 2003). With the exception of P_{bceA} , which appeared to be almost unaffected, the other three target promoters responded at about 3- to 10-fold lower bacitracin concentrations. The most significant change was observed for the bacitracin concentration necessary for full induction of P_{liaI} , which dropped from 10–30 to about $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ bacitracin, i.e. was comparable to the effect the *bcrC* deletion had on the MIC. This effect was further

Table 1. Promoter threshold sensitivities and saturation concentrations for bacitracin-dependent induction.

Genetic background ^a	MIC ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	P_{liaI}	P_{bceA}	P_{bcrC}	P_{yvcR}
wild type	500	0.3–1/10–30	0.03/30–100	1–3/30–100	1/300
$\Delta bcrC$	25	0.1–0.3/1	0.01–0.03/30–100	0.3–1/10–30	0.1/100
$\Delta bceAB$	10	0.1–0.3/1	no induction	0.3/1	no induction
$\Delta bcrC/bceAB$	2.5	0.1/0.1	no induction	0.1–0.3/0.3	no induction

a. The strains used to generate the promoter–*lacZ* fusion reporter strains are TMB297 (*bcrC::tet*) and TMB035 (*bceAB::kan*).

b. Values for the minimal inhibitory concentrations (MIC) for bacitracin are taken from Mascher *et al.* (2003).

All values (in $\mu\text{g ml}^{-1}$) are based on three independent measurements with two independent mutants. The first value is the minimal threshold concentration necessary for a promoter induction more than twofold. The second value indicates the approximate saturation concentration at which the maximal promoter activity is reached.

enhanced for both P_{bcrC} and P_{liaI} in the *bceAB* and especially the *bceAB/bcrC* mutant, in which both promoters behaved as ON–OFF switches (Table 1). Surprisingly, neither P_{bceA} nor P_{yvcR} was inducible any longer by bacitracin in the two *bceAB* mutants, indicating a crucial role of the ABC transporter for bacitracin perception (see further below), as has already been suggested before (Mascher *et al.*, 2006).

The biological potency/metal-binding affinity of bacitracin affects signal transduction within the regulatory network

To gain a deeper insight into the link between the antimicrobial potency of bacitracin and its inducing capabilities, we next investigated the effect of chelators on the induction of the two primary bacitracin-dependent promoters, P_{bceA} and P_{liaI} . As mentioned in *Introduction*, bacitracin co-ordinates a divalent metal ion, which is crucial for its biological potency (Ming and Epperson, 2002). As a consequence, addition of chelating agents, such as EDTA, negatively affects its activity (Stone and Strominger, 1971). We therefore analysed the effect of titrating the Zn^{2+} ions out of bacitracin by increasing EDTA concentrations in induction experiments. For that purpose, cultures of the reporter strains TMB016 (P_{liaI} –*lacZ*) and TMB279 (P_{bceA} –*lacZ*) were grown to mid-logarithmic growth phase, split, and challenged with bacitracin (final concentration $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) supplemented with increasing amounts of EDTA (from equimolar to 128-fold molar excess). The results are in good agreement with the observations described above. At a fixed bacitracin concentration, P_{liaI} is significantly more affected by EDTA treatment than P_{bceA} (Fig. 2), again demonstrating that P_{bceA} is more sensitive towards bacitracin.

We subsequently analysed the response of σ^M , BceRS- and LiaRS-dependent signal transduction to synthetic bacitracin A derivatives. The YvcPQ system was not included, as it does not respond directly to bacitracin, as will be described later. The structure of bacitracin A, the predominant and biologically most active form, is shown

in Fig. 3A. The heterocyclic thiazoline ring (shaded in grey in Fig. 3A) is mainly responsible for the metal binding activity of bacitracin (Ming and Epperson, 2002). Recently, a number of bacitracin A derivatives were synthesized with selectively altered metal binding moieties (Wagner *et al.*, 2006). The structures of these altered heterocycles are given in Fig. 3B. Determination of the inhibitory potency of these compounds against *B. subtilis* demonstrated that altering the heterocycle indeed affects the MIC. While BacThia₂ has the same MIC as purified bacitracin A, the MICs of BacThaz₂ and BacOxS₂ are reduced by a factor of 3 and 10 respectively (Wagner *et al.*, 2006).

We used these compounds to study the response of σ^M , and the TCS BceRS and LiaRS by measuring the induction of their target promoters in β -galactosidase assays (Fig. 3C–E). The σ^M -dependent *bcrC* promoter responded in a manner reminiscent of the results shown in Fig. 1C:

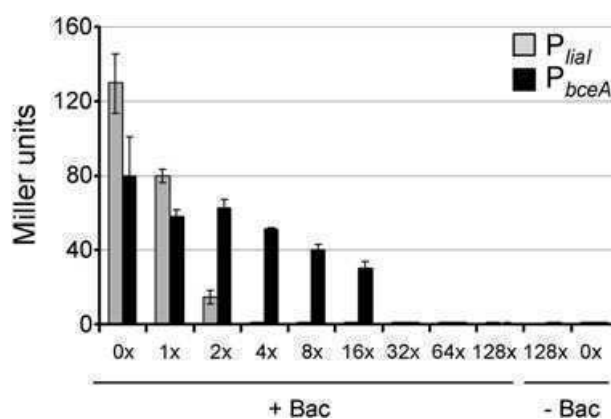


Fig. 2. Effect of EDTA on the bacitracin-dependent induction of P_{liaI} (grey bars) and P_{bceA} (black bars). Basically, induction experiments and β -galactosidase assays were performed as described in the legend to Fig. 1. Here, a fixed bacitracin ('Bac') concentration of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ was used (which gives full induction of both promoters, see Fig. 1, without affecting the viability of the culture) together with increasing concentrations of EDTA, shown as fold molar excess, relative to bacitracin, on the x-axis. '128x' in the absence of bacitracin indicates the same EDTA concentration as used in the presence of bacitracin.

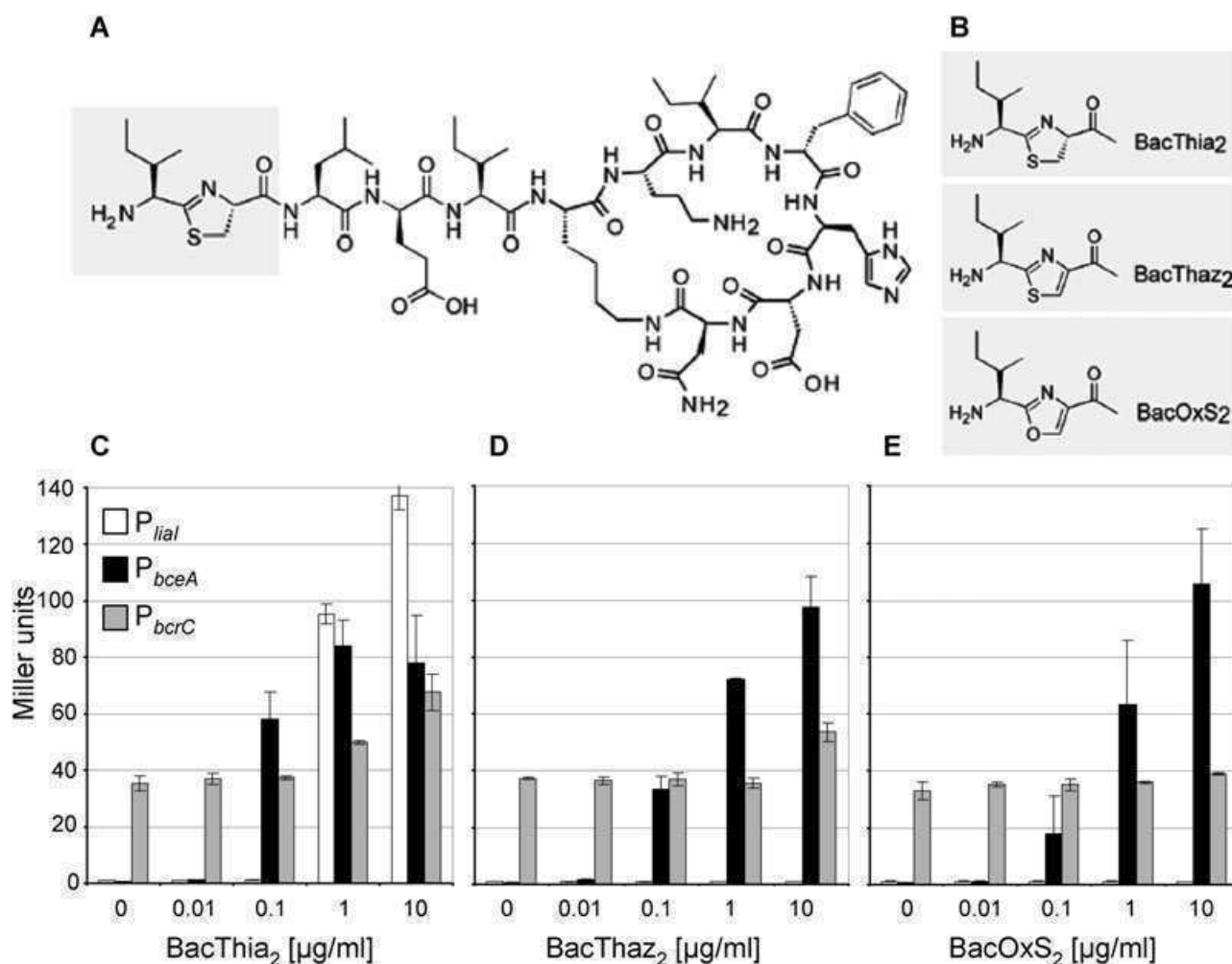


Fig. 3. Effect of bacitracin A derivatives with altered thiazoline side groups on induction of bacitracin-responsive promoters. A. Structure of bacitracin A. The thiazoline side group is highlighted by grey shading. B. Structure of the heterocyclic metal binding moiety – corresponding to the thiazoline side group – of the bacitracin A derivatives BacThia₂, BacThaz₂ and BacOxS₂. C–E. Inducing strength of chemically synthesized BacThia₂ (identical to natural bacitracin A), BacThaz₂ and BacOxS₂. Induction of P_{liaI} (white bars), P_{bceA} (black bars) and P_{bcrC} (grey bars) by increasing concentrations of the three compounds is shown below. Induction experiments were performed as described in the legend to Fig. 1 and *Experimental procedure*.

the reduced biological potency of bacitracin A derivatives resulted in a less sensitive response, i.e. induction was observed at higher antibiotic concentrations for BacThaz₂, and no significant induction occurred even at the highest concentration of BacOxS₂. The sensitivity of the BceRS system was not affected, and the minimal threshold concentration (0.1 µg ml⁻¹) remained unchanged for BacThaz₂ and BacOxS₂ (Fig. 3C–E). Surprisingly, the most dramatic effect was observed for P_{liaI} , which was no longer inducible by either BacThaz₂ or BacOxS₂. The reason for this stringent dependence of LiaRS on an intact thiazoline moiety for bacitracin induction remains obscure at the moment.

Taken together, the results from both the EDTA titration and the induction with bacitracin A derivatives demon-

strate that the metal-binding affinity, and therefore the biological potency, of bacitracin affects LiaRS- and σ^M -dependent signal transduction much more strongly than the BceRS TCS.

Both domains of the ABC transporter BceAB are necessary for bacitracin sensing by the BceRS TCS

As described above, P_{bceA} did no longer respond to the extracellular presence of bacitracin in a *bceAB* mutant. Therefore, we next investigated the role of the ABC transporter BceAB for bacitracin perception. Its two functional domains, namely the motor or nucleotide-binding domain (NBD) and the permease or membrane-spanning domain (MSD), are encoded by two separate genes, *bceA* and

Table 2. Bacterial strains used in this study.

Strains	Genotype or characteristic(s)	Reference or source
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	<i>F'</i> <i>endA1 hsdR17(rK⁻ mK⁺) gln V44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>) <i>U169 deoR</i> [Φ_{80} <i>dLac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15]	Laboratory stock
CC118	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA20 galE galk thi rpsE rpoB argE(am) recA1</i>	Laboratory stock
TME027	CC118 pER401	This study
TME028	CC118 pER402	This study
TME029	CC118 pER403	This study
<i>B. subtilis</i> strains		
W168	Wild type, <i>trpC2</i>	Laboratory stock
TMB016	W168 <i>amyE</i> ::pTM1	Jordan <i>et al.</i> (2006)
TMB035	W168 <i>bceAB</i> ::kan	This study
TMB134	W168 <i>amyE</i> ::pIG601	This study
TMB279	W168 <i>amyE</i> ::pER603	This study
TMB280	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceAB</i> ::kan	This study
TMB294	W168 <i>yvcRS</i> ::kan	This study
TMB295	W168 <i>bceA</i> ::kan	This study
TMB296	W168 <i>bceB</i> ::kan	This study
TMB297	W168 <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB299	W168 <i>amyE</i> ::pER605	This study
TMB300	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceA</i> ::kan	This study
TMB301	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceB</i> ::kan	This study
TMB303	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>yvcRS</i> ::kan	This study
TMB325	W168 <i>amyE</i> ::pTM1 <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB326	W168 <i>amyE</i> ::pIG601 <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB327	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB328	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB373	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>bceR</i> ::spec	This study
TMB375	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceA</i> ::kan <i>thrC</i> ::pXT	This study
TMB376	W168 <i>bceR</i> ::spec	This study
TMB378	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceB</i> ::kan <i>thrC</i> ::pER703	This study
TMB379	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceB</i> ::kan <i>thrC</i> ::pER704	This study
TMB380	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceB</i> ::kan <i>thrC</i> ::pXT	This study
TMB384	W168 <i>amyE</i> ::pTM1 <i>bceAB</i> ::kan	This study
TMB385	W168 <i>amyE</i> ::pIG601 <i>bceAB</i> ::kan	This study
TMB386	W168 <i>amyE</i> ::pTM1 <i>bceAB</i> ::kan <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB387	W168 <i>amyE</i> ::pIG601 <i>bceAB</i> ::kan <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB388	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bcrC</i> ::tet <i>bceAB</i> ::kan	This study
TMB392	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>yvcPQ</i> ::mls	This study
TMB393	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>bceAB</i> ::kan	This study
TMB394	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>bceAB</i> ::kan <i>bcrC</i> ::tet	This study
TMB429	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceA</i> ::kan <i>thrC</i> ::pDH701	This study
TMB433	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceA</i> ::kan <i>thrC</i> ::pER707	This study
TMB435	W168 <i>amyE</i> ::pER603 <i>bceA</i> ::kan <i>thrC</i> ::pER709	This study
TMB450	W168 <i>amyE</i> ::pER605 <i>yvcQ</i> ::kan	This study

bceB respectively. To investigate if one of the two domains alone is sufficient for bacitracin sensing, two allelic-replacement mutations, harbouring insertions of the kanamycin resistance cassette in *bceA* or *bceB*, were constructed by long flanking homology (LFH)-PCR, as described previously (Mascher *et al.*, 2003) and subsequently introduced in the P_{bceA} -*lacZ* reporter strain TMB279, resulting in strains TMB300 and TMB301 respectively (Table 2). For subsequent induction assays, an optimal bacitracin concentration of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was used. The wild-type P_{bceA} -*lacZ* reporter strain TMB279 showed the expected behaviour under those conditions, i.e. is strongly inducible by bacitracin. In contrast, none of the three *bce* mutant strains (including TMB280, *bceAB*::kan, see Table 2) responded to bacitracin

(Fig. 4A), emphasizing the importance of this ABC transporter for bacitracin perception. These results were independently confirmed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in both the wild-type strain 168 and the isogenic *bceB* mutant TMB296, measuring *bceA* expression with and without addition of bacitracin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), as described in *Experimental procedures*. In the wild type, a 632 ± 109 -fold induction of *bceA* expression was observed, while no induction was detectable in the *bceB* mutant (Fig. 5B).

The *bceAB* genes are expressed as an operon (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a), and replacement of *bceA* by a kanamycin resistance cassette might have polar effects on the downstream *bceB* gene. To rule out that the lack of P_{bceA} induction in the *bceA*::kan strain

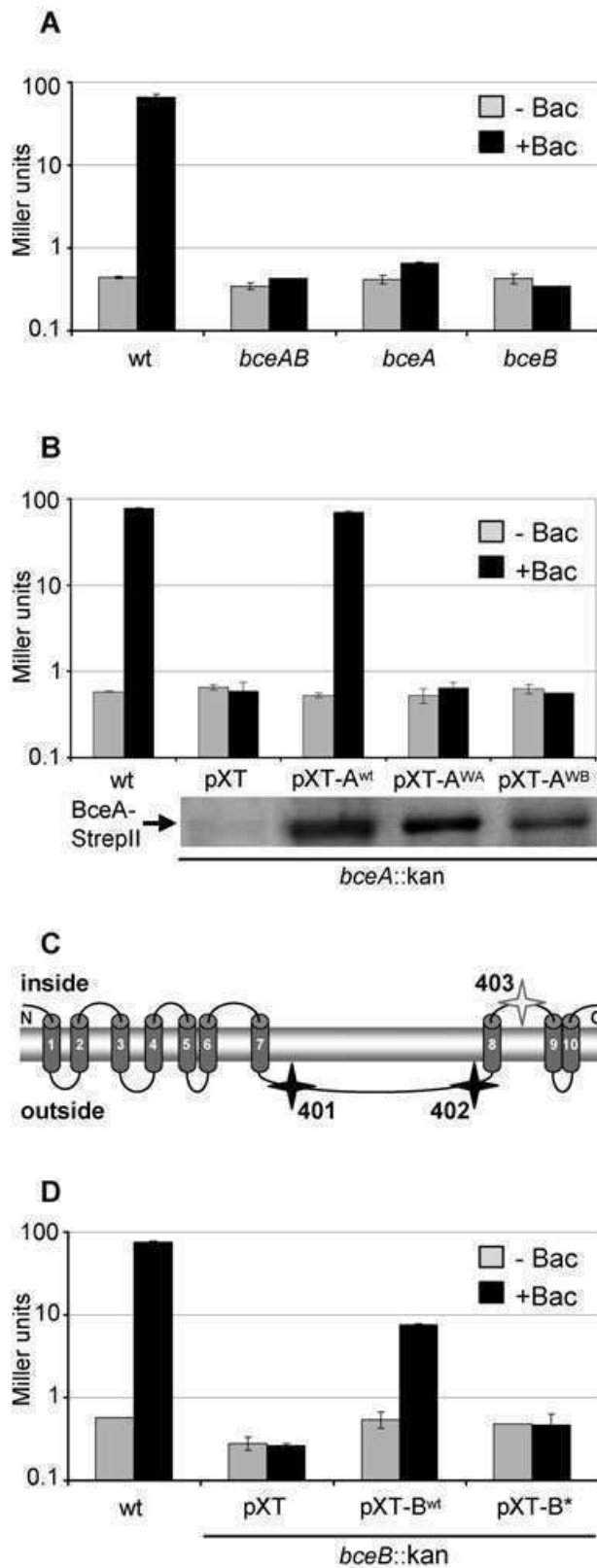


Fig. 4. Role of the ABC transporter BceAB for bacitracin sensing. All induction experiments and β -galactosidase assays shown in (A), (B) and (D) were performed as described in the legend to Fig. 1, using a bacitracin concentration of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. The β -galactosidase activities on the y-axis, expressed as Miller units, are given in log-scale for reasons of clarity. Uninduced control (grey bars) and induced samples (black bars) are shown.

A. Effect of deletions in *bceA* and *bceB* on P_{bceA} activity. Strains used: wt, TMB279; *bceAB*, TMB280; *bceA*, TMB300; *bceB*, TMB301.

B. Complementation of a *bceA* deletion and effect of mutations in the Walker A and Walker B motifs of BceA. The strains were grown in the presence of 0.1% xylose and induced as described above: wt, TMB279; pXT, TMB375, complementation with empty vector (negative control); A^{wt}, TMB429, complementation with *bceA-strepII*; A^{WA}, TMB433, Walker A mutations in BceA (G_{40A}, K_{46A}); A^{WB}, TMB435, Walker B mutation in BceA (E_{169Q}). The inset below demonstrates expression of the three BceA-StrepII derivatives by Western hybridization, using the same strains and conditions as shown above.

C. Membrane topology of BceB. The graphical representation of the membrane topology prediction is based on TMHMM prediction, performed at <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>. The extracytoplasmic loop between the predicted membrane-spanning helices 7 and 8 has a length of 202 amino acids (S313–D515). The stars indicate the positions of the C-terminal PhxA fusions constructed to verify the membrane topology. The numbers correspond to the pER plasmids listed in Table 3. Filled and empty stars indicate PhxA activity, i.e. extracellular location of PhxA, or a lack thereof, i.e. cytoplasmic location respectively.

D. Complementation of a *bceB* deletion and role of the periplasmic loop for bacitracin sensing. *bceB*^{wt}, complementation with wild-type *bceB*; *bceB*^{*}, expression of a BceB allele lacking the large periplasmic loop. Again, pXT is used as a negative control, and the wild-type (wt) values are shown as positive control.

was due to altered *bceB* expression, we cloned the *bceA* gene (with a 3'-end extension encoding a StrepII-tag, see *Experimental procedures*) into pXT (Derre *et al.*, 2000), and integrated the resulting plasmid, pDH701, at the *thrC* locus. This construct allows the xylose-dependent *bceA* complementation of the *bceA::kan* mutant (strain TMB429, Table 2). Moreover, expression of the BceA protein can be monitored by Western analysis, based on the C-terminally fused StrepII-tag. The empty pXT vector was also integrated as a negative control (strain TMB375). As shown in Fig. 4B, the latter behaved just like the *bceA* mutant strain, i.e. neither did it show any bacitracin-dependent induction of P_{bceA} activity, nor was any StrepII-tag-specific signal detectable in this strain (inset below the graph of Fig. 4B). In contrast, the bacitracin-dependent P_{bceA} induction was fully restored in the *bceA* complementation strain TMB429 (Fig. 4B), and BceA expression could be detected by Western blot in both the soluble and membrane fractions (data not shown), demonstrating that sufficient amounts of complemented BceA were associated with the cognate MSD to form an intact ABC transporter.

Likewise, we were able to complement the *bceB::kan* allele by the same strategy in strain TMB378 (Fig. 4D). As all constructed epitope-tagged BceB alleles were dysfunctional and unable to complement the *bceB* mutant,

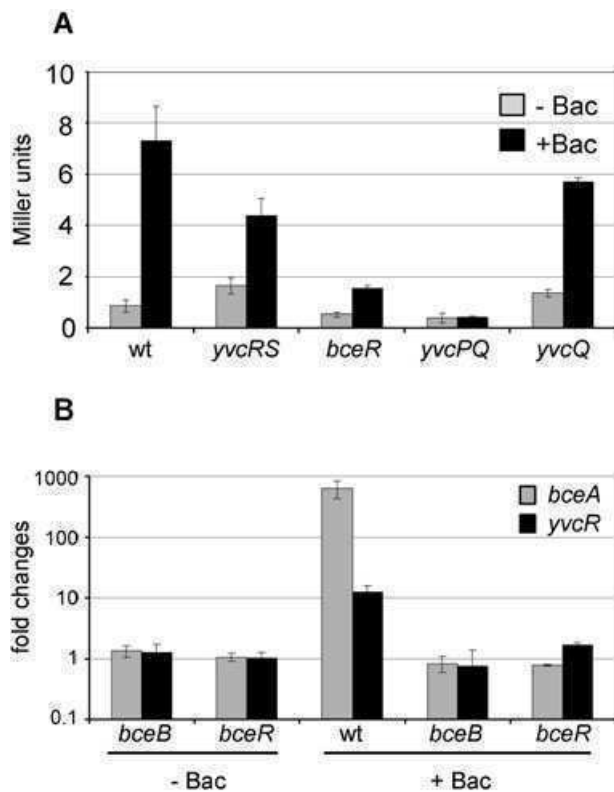


Fig. 5. Bacitracin induction of P_{yvcR} and cross-regulation by the BceRS–BceAB system.

A. Results from β -galactosidase assays, performed as described before. Both the uninduced (grey bars) and bacitracin-induced ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) values (black bars) are shown. The strains used are (from left to right): TMB299 (wt), TMB303 (*yvcRS::kan*), TMB373 (*bceR::spec*), TMB392 (*yvcPQ::mls*), TMB450 (*yvcQ::kan*). See Table 2 for details.

B. Verification of the effect of *bceB* and *bceR* deletions on *yvcR* and *bceA* expression by real-time RT-PCR. Cultures were grown to mid-log and split. One half was induced with $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ bacitracin (Bac) for 10 min, and the other half was kept as uninduced negative control. RNA preparation and real-time RT-PCR were performed as described in *Experimental procedures*. Relative induction values are given as fold changes (relative to the uninduced wild type), calculated by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Talaat *et al.*, 2002). The primers used are listed in Table S1. Strains: 168 (wt), TMB296 (*bceB::kan*), TMB376 (*bceR::spec*). See Table 2 for details.

verification of BceB expression/localization by Western blot was not possible. Xylose-dependent expression of either *bceA* or *bceB* alone in the *bceAB* mutant failed to restore its ability to respond to extracellular bacitracin (data not shown). These data demonstrate that both NBD and MSD of BceAB are necessary for bacitracin sensing, as neither domain alone is sufficient.

ATP binding and hydrolysis by BceA is necessary for bacitracin perception, suggesting that bacitracin is sensed during transport

The finding that the NBD BceA is crucial for bacitracin sensing led to the question, if its catalytic activity is

required or if its presence alone is already sufficient to mediate bacitracin sensing. For that purpose a mutated allele of *strepll*-tagged *bceA* was generated by site-directed mutagenesis, applying a PCR-based strategy (see *Experimental procedure* for details). The resulting mutant allele, again cloned into the complementation vector pXT, expressed a BceA derivative with two amino acid exchanges in the Walker A motif, G₄₀A and K₄₆A, that are predicted to prevent ATP binding, based on in-depth studies of the histidine permease of *Salmonella typhimurium* (Shyamala *et al.*, 1991). The integrity of the resulting construct and the expression of the corresponding proteins were verified by DNA sequencing and Western blots respectively. As shown in Fig. 4B, this BceA allele (in strain TMB433, Table 2) renders the BceRS system irresponsive to the presence of bacitracin.

For some ABC transporters, ATP binding (but not its hydrolysis) is required for substrate recognition. As a Walker A mutant abolishes both, and hence does not allow distinguishing whether bacitracin binding alone, or its transport is required for sensing, a second mutant was constructed in a similar fashion. The resulting mutant, strain TMB435, expressed a BceA allele with a single-point mutation in the Walker B motif, E₁₆₉Q. This mutation has been described for two different NBDs from *Methanococcus jannashii* to abolish ATP hydrolysis, while simultaneously stabilizing the NBD dimer and maintaining the native ATP-bound structure (Moody *et al.*, 2002). Again, as for the Walker A mutant, no bacitracin response was detectable in β -galactosidase assays in strain TMB435, despite a detectable expression of the corresponding protein (Fig. 4B). Taken together, these results strongly suggest that bacitracin is sensed by the ABC transporter BceAB during its ATP-driven transport.

The extracytoplasmic loop of BceB is necessary for bacitracin sensing

We then took a closer look at the permease domain BceB. *In silico* hydrophobicity profiling indicated the presence of 10 putative transmembrane regions (TMR), with a large, presumably extracytoplasmic loop of about 210 amino acids length located between TMR7 and TMR8 (Fig. 4C). This large domain is only conserved in bacitracin resistance transporters from *Bacillus* and *Staphylococcus* species (Fig. S1), but is absent in the bacitracin efflux pump of the producing strain *B. licheniformis* ATCC10716. We speculated that this conserved domain might play an important role for sensing extracellular bacitracin.

To investigate the membrane topology for the region of interest, three translational C-terminal PhoA fusions were constructed (Manoil, 1991), using the vector pHA-4 (Rapp *et al.*, 2004; Daley *et al.*, 2005). Two fusions were generated at the beginning and end of the predicted extracyto-

Table 3. Vectors and plasmids used in this study.

Plasmid	Genotype or characteristic features	Primers used for cloning	Reference or source
pAC6	Transcriptional <i>lacZ</i> fusion vector, integrates at <i>amyE</i> , chloramphenicol resistance		Stülke <i>et al.</i> (1997)
pXT	Vector for xylose-inducible gene expression, integrates at <i>thrC</i> , pDG1731 derivative, spectinomycin resistance		Derre <i>et al.</i> (2000)
pHA-4	C-terminal <i>phoA</i> fusion vector, arabinose-inducible promoter, ampicillin resistance		Rapp <i>et al.</i> (2004); Daley <i>et al.</i> (2005)
pTM1	pAC6 P _{liaI(-83-72)} - <i>lacZ</i>	0099/0100	Jordan <i>et al.</i> (2006)
pER401	pHA-4 BceB(M1-F ₃₅₁)-PhoA ^a	0634/0635	This study
pER402	pHA-4 BceB(M1-D ₄₉₁)-PhoA ^a	0634/0636	This study
pER403	pHA-4 BceB(M1-E ₅₅₇)-PhoA ^a	0634/0637	This study
pIG601	pAC6 P _{bcrC(-174-32)} - <i>lacZ</i> ^b	0334/0335	This study
pER603	pAC6 P _{bceA(-122-81)} - <i>lacZ</i> ^b	0554/0555	This study
pER605	pAC6 P _{yvcR(-110-30)} - <i>lacZ</i> ^b	0599/0600	This study
pDH701	pXT P _{xyI} - <i>bceA-strepII</i>	0011/0764	This study
pER703	pXT P _{xyI} - <i>bceB</i>	0621/0622	This study
pER704	pXT P _{xyI} - <i>bceB</i> (BceB ΔY ₃₁₄ -Q ₅₂₀) ^a	0621/0622	This study
pER707	pXT P _{xyI} - <i>bceA</i> (G ₄₀ A, K ₄₆ A)- <i>strepII</i> ^a	0011/0764	This study
pER709	pXT P _{xyI} - <i>bceA</i> (E ₁₆₉ Q)- <i>strepII</i> ^a	0011/0764	This study

a. For reasons of clarity, the fragments cloned for the membrane topology studies are given at the protein level. Likewise, the loss-of-function mutations in the Walker A (pER707/pER709) and Walker B (pER704) motif are indicated at the protein level.

b. The position is given relative to the 'A' of the ATG start codon.

plasmic domain, resulting in plasmid pER401 and pER402 respectively. The third plasmid, pER403, contained a PhoA fusion located in the predicted cytoplasmic loop between TMR8 and TMR9 (Table 3; Fig. 4C). Three independent clones for each plasmid were subsequently used in PhoA assays (Manoil, 1991), as described in *Experimental procedures*. Only pER401 and pER402 resulted in a detectable PhoA activity (indicated by the solid stars in Fig. 4C), while pER403 was inactive (open star). These results verified the extracytoplasmic location of the domain located between TMR7 and TMR8, as shown in Fig. 4C.

Next, we constructed a *bceB* allele expressing a truncated MSD lacking the extracytoplasmic loop. This allele was not able to complement the *bceB* deletion (Fig. 4D), demonstrating the importance of the extracytoplasmic loop to BceB function. This result is consistent with our speculation regarding the role of this loop in bacitracin perception. However, as Western analysis of BceB levels and localization was not possible (see *Experimental procedures*), we have to acknowledge the possibility that this observation could also be due to the lack of expression or improper folding/localization of this truncated MSD. Given the conservation of the extracytoplasmic loop of BceB in related bacitracin resistance transporters (Fig. S1) and its importance for BceB function (Fig. 4), we favour a model, in which extracellular bacitracin is recognized by the large extracytoplasmic domain of BceB and induces BceRS-dependent signal transduction during its subsequent ATP-driven transport by the ABC transporter BceAB.

The YvcPQ–YvcRS system responds weakly and indirectly, via BceRS–BceAB, to the extracellular presence of bacitracin

Bacillus subtilis harbours two BceRS–BceAB paralogues, encoded by the *yxdJKLM* and *yvcPQRS* loci (Joseph *et al.*, 2002). The YxdJK–YxdLM system specifically responds to some cationic antimicrobial peptides (Pietikäinen *et al.*, 2005), while the YvcPQ–YvcRS system is also induced by bacitracin (Mascher *et al.*, 2003). We reasoned that a similar mechanism of bacitracin perception as described above for the BceRS–BceAB module should hold true for the YvcPQ–YvcRS system as well.

To address this question, we constructed a *yvcRS* mutant and introduced it into the P_{yvcR}-*lacZ* reporter strain, resulting in strain TMB303 (Table 2). To our surprise, the promoter activity of this strain was only mildly affected by the lack of the cognate ABC transporter, and the promoter was still inducible by bacitracin (Fig. 5A). Moreover, the maximal activity of P_{yvcR} to the presence of extracellular bacitracin was very low, compared with P_{bceA} (~7 versus ~100 Miller units respectively). As the Yvc system is paralogous to BceRS–BceAB, we wondered whether cross-induction by the activated Bce system might have occurred. Indeed, the P_{yvcR} activity was strongly affected in a *bceR* mutant, but still responded weakly to bacitracin (Fig. 5A).

Previously, we had demonstrated that the bacitracin-inducible *yvcRS* expression is dependent on its cognate TCS, YvcPQ (Mascher *et al.*, 2003). We verified our earlier findings by introducing a *yvcPQ* mutant, lacking the

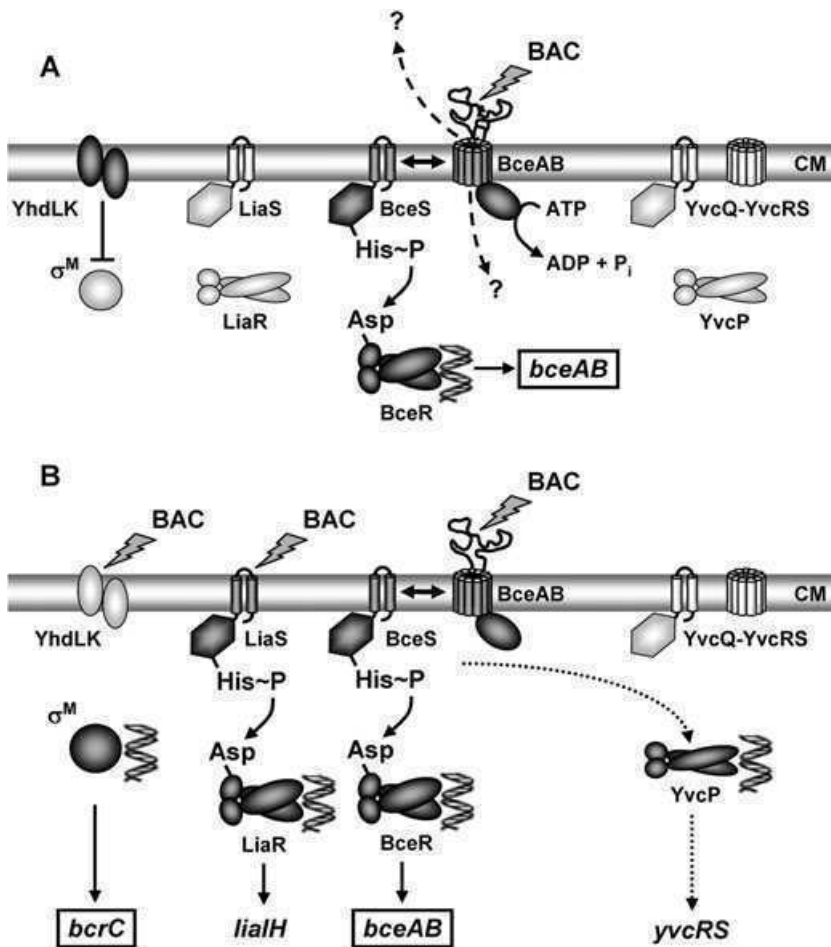


Fig. 6. Model illustrating the hierarchy and mode of stimulus perception for the regulatory network orchestrating the bacitracin stress response in *B. subtilis*. For reasons of simplicity, only the two extreme situations are represented, i.e. low ($\sim 0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$) and high ($> 3 \mu\text{g ml}^{-1}$) extracellular bacitracin concentrations.

A. Low bacitracin concentrations. Only the BceRS–BceAB module is induced. Details on its mode of signal transduction are given. Solid lines (signal transduction), striped lines (bacitracin transport), boxes (genes encoding known bacitracin resistance determinants). Note that the direction of bacitracin transport, i.e. import or export, has not yet been unequivocally clarified, as indicated by the question marks. Arrows indicate activation, and the T-shaped line indicates inhibition. B. High extracellular bacitracin concentrations. σ^M , and the LiaRS and BceRS TCS are directly induced by bacitracin. The YvcPQ system responds indirectly, via the BceRS–BceAB module (indicated by the dotted lines). Note that some details from (A) were omitted in (B) for reasons of clarity. See Discussion for details.

TCS, into the P_{yvcR} -*lacZ* reporter strain, resulting in strain TMB392 (Table 2). Subsequent β -galactosidase assays demonstrated that the P_{yvcR} activity is indeed strictly dependent on the presence of the cognate TCS (Fig. 5A). On the other hand, a mutant lacking only the histidine kinase YvcQ was again inducible by bacitracin almost to wild-type level, further supporting the idea that P_{yvcR} activity, while being strictly YvcP-dependent, is based on a cross-activation by the Bce system (Fig. 5A).

To independently verify the data derived from β -galactosidase assays in a less complex genetic background, we also performed quantitative real-time RT-PCR, using the wild-type strain 168, and isogenic *bceB* and *bceR* deletion mutants (strains TMB296 and TMB376 respectively; Table 2). Without addition of bacitracin, no difference in *yvcR* expression was detected between the wild type and the two mutant strains (Fig. 5B). Addition of bacitracin resulted in an about 15- to 20-fold induction of *yvcR* expression in the wild type, comparable to the data obtained by β -galactosidase assay, shown above. Likewise, a *bceR* deletion reduced the bacitracin induction of *yvcR* expression to about twofold, as already demonstrated by β -galactosidase

assay (Fig. 5A). Importantly, a *bceB* deletion alone completely abolishes the bacitracin-dependent induction of *yvcR* expression, comparable to the behaviour of P_{yvcR} in the *yvcPQ* mutant.

In summary, the bacitracin-dependent induction of P_{yvcR} activity absolutely requires both, the BceAB transporter and the response regulator YvcP, whereas neither the cognate sensor kinase, YvcQ, nor the corresponding ABC transporter YvcRS is necessary. These observations strongly support the hypothesis of an indirect induction of *yvcRS* expression via a cross-activation of YvcP by the paralogous Bce system, possibly by cross-phosphorylation of YvcP by BceS (indicated by the dotted lines in Fig. 6B).

Discussion

In this report, we have investigated the known regulatory systems of the bacitracin stress response of *B. subtilis* with regard to their bacitracin specificity, sensitivity and their mechanism of stimulus perception. We were able to demonstrate that a response hierarchy exists, when confronted with extracellular bacitracin gradients rather than

a sudden bacitracin shock. The BceRS TCS is the first system to be induced, i.e. the most sensitive regulatory system (Fig. 1). It already responds to a bacitracin concentration as low as $0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$, which is about four orders of magnitude below the MIC of *B. subtilis*. In the presence of extracellular bacitracin, the BceRS system induces the expression of the BceAB ABC transporter, which is the most efficient bacitracin resistance determinant of *B. subtilis* (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a). Moreover, we demonstrated that this ABC transporter is also crucial for the mechanism of bacitracin perception (Fig. 4). The YvcPQ–YvcRS module, a paralogue of the BceRS–BceAB system (Joseph *et al.*, 2002; Mascher, 2006), is only indirectly induced at higher bacitracin concentrations in a Bce-dependent manner (Fig. 5). Of the two remaining systems, the LiaRS–LiaF three-component system responds at intermediate bacitracin concentrations, while the ECF σ factor σ^M shows the weakest and least sensitive response (Fig. 1). The latter mediates an additional layer of bacitracin resistance through the regulation of the *bcrC* gene, encoding an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (Cao and Helmann, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003b; Bernard *et al.*, 2005), while the physiological role of the Lia system still remains to be elucidated. Our findings on the response hierarchy and mechanism of stimulus perception within the bacitracin stress response network are summarized in a model in Fig. 6.

Bacitracin stress response: antibiotic shock versus gradual adaptation

The study of cell envelope stress responses and the underlying regulation so far usually involved DNA microarrays, i.e. comparison of global transcript levels from an uninduced reference culture with a test culture, grown under the same conditions but challenged for a defined period of time by the addition of (sublethal) amounts of the cell wall antibiotic to be investigated (Jordan *et al.*, 2008). This approach helped to identify both target genes involved in counteracting this stress and their regulators. Nevertheless, this sudden antibiotic shock represents an artificial situation that differs strongly from the natural situation both in the soil environment and in the host, where antimicrobials are gradually released by the producing cell and reach the target cells by diffusion. Therefore, it stands to reason to expect that the corresponding antibiotic stress systems have evolved to respond to antibiotic gradients, increasing over time.

The present study clearly demonstrated a response hierarchy within the bacitracin stress network. When confronted with gradients of increasing bacitracin concentrations instead of a sudden antibiotic shock, the individual signalling systems respond at different threshold concen-

tration, i.e. the output of the signalling systems differ in their sensitivities towards the extracellular presence of bacitracin. Therefore, the response hierarchy results in a temporal hierarchy with more sensitive systems being activated earlier than less sensitive regulators, i.e. the cells gradually adapt to the bacitracin challenge in a concentration-dependent manner.

Importantly, the most efficient bacitracin resistance determinant, the ABC transporter BceAB, is also regulated by the most sensitive regulatory system, the TCS BceRS (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a) (Fig. 6A). This regulatory network therefore seems to be optimized in a way that in most cases activation of BceRS, i.e. induction of BceAB expression alone, will be sufficient to cope with the bacitracin challenge. The remaining bacitracin-responsive regulatory systems will only be induced under the prevailing presence of high bacitracin concentration, to confer increased bacitracin resistance (Fig. 6B). In light of the underlying energy consumption, this gradual behaviour therefore maximizes the gain, while simultaneously minimizing the costs of adaptation and hence survival.

Bacitracin perception: drug sensing versus damage sensing

Cell envelope stress, i.e. a condition that affects the composition and functionality of, and ultimately damages the envelope, is a rather diffuse term (Jordan *et al.*, 2008). The use of cell wall antibiotics as inducers, while helpful for the experimental work, does not give a direct clue on the nature of the stimulus sensed by a stress-responsive signalling system. Bacitracin, for example, could be detected directly (as a chemical molecule present in the environment, i.e. 'drug sensing'), through the interaction with and resulting alteration of its primary target structure, or indirectly through the damage it causes ('damage sensing'). The plethora of potential stimuli that are linked to the addition of a single antibiotic might account for the overall complexity of the response and the number of regulatory systems involved.

With regard to bacitracin, our data suggest that the BceRS–BceAB module senses this compound directly, presumably by BceAB as the primary sensor during transport (see below for details). This idea seems to be supported by its gradual response over a large range of bacitracin concentrations ($0.03\text{--}30 \mu\text{g ml}^{-1}$; Fig. 1A). This behaviour does not change in a more bacitracin susceptible background, i.e. a *bcrC* mutant (Table 1), nor is it affected by the induction with biologically less potent bacitracin A derivatives (Fig. 3).

In contrast, both the LiaRS TCS and σ^M seem to be damage-sensing systems. This hypothesis is based on a number of observations. In contrast to the bacitracin-

specific Bce system, both LiaRS and σ^M respond to a large variety of cell wall antibiotics (e.g. vancomycin, cationic antimicrobial peptides or ramoplanin) and other envelope stress conditions, such as alkaline shock, secretion stress, detergents or organic solvents (Horsburgh and Moir, 1999; Petersohn *et al.*, 2001; Wiegert *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002; Thackray and Moir, 2003; Mascher *et al.*, 2004; Hyyryläinen *et al.*, 2005; Pietiäinen *et al.*, 2005; Tam le *et al.*, 2006). σ^M is also induced by heat shock, high salinity, phosphate starvation and superoxide stress (Horsburgh and Moir, 1999; Thackray and Moir, 2003). Moreover, the 'steeper' response over a relatively short range of bacitracin concentrations (Fig. 1), the strong influence of the cellular susceptibility on the sensitivity of bacitracin perception (Fig. 2 and Table 1), and the negative effect that biologically less potent bacitracin A derivatives exerted on LiaRS and σ^M (Fig. 3) indicate a damage-sensing mechanism for both systems.

BceAB: bacitracin transport versus bacitracin detection

A central finding of our analysis is the crucial role of the ABC transporter BceAB for bacitracin sensing (Fig. 4). BceRS–BceAB is the best-understood example of a whole family of detoxification modules conserved in the genomes of many *Firmicutes* bacteria (Joseph *et al.*, 2002; Ohki *et al.*, 2003a; Mascher, 2006). Both operons, *bceRS* and *bceAB*, are constitutively expressed at low level to ensure the presence of the signal transduction system. If bacitracin is present in the environment (at concentration far below it can cause any damage, even in the absence of any resistance determinant, see Table 1), it is sensed at the same time that detoxification starts, as both processes are functionally linked to bacitracin transport.

To ensure resistance even at increasing and much higher concentrations, the expression of *bceAB* is strongly induced and responds in a concentration-dependent manner (Fig. 1). This detoxification process simultaneously removes the stimulus, thereby automatically shutting the system down once the action of the ABC transporter decreases the extracellular concentration below the sensory threshold of the BceRS–BceAB module. Subsequently, expression of *bceAB* returns to basal level. The coupling of transport and stimulus perception therefore makes perfect sense from an energetic point of view, while also ensuring 'instant' resistance (Fig. 6A).

The direction of bacitracin transport by BceAB is still a matter of debate. Based on our preliminary data, we favour a model in which BceAB acts as a bacitracin importer: the large extracytoplasmic domain is conserved in bacitracin resistance transporters (Fig. S1), but not in the known efflux pump of the bacitracin producer *B. licheniformis* ATCC10716. Its localization and importance for BceB function (Fig. 4C and D) might indicate a role of this domain for

substrate recognition. Moreover, the architecture of BceAB also suggests its function as an ABC importer rather than an efflux pump (van der Heide and Poolman, 2002; Davidson and Chen, 2004; Dawson *et al.*, 2007).

The important role of BceAB for bacitracin sensing by the TCS BceRS has recently also been observed independently by another research group (Bernard *et al.*, 2007). While their experimental data are in very good agreement with the results presented in Fig. 4A and B, these authors favour the hypothesis that BceAB acts as an exporter, and suggest that the UPP–bacitracin complex is the transported substrate. They base their assumption on the lack of a substrate-binding protein for any of the members of the ABC transporter family that BceAB has been assigned to (Bernard *et al.*, 2007).

Both the direction and the substrate of BceAB-mediated transport are crucial, but technically challenging questions that need to be answered, in order to finally unravel the molecular mechanism of ABC transporter-mediated bacitracin perception in *B. subtilis*.

BceS-like intramembrane-sensing histidine kinases and stimulus perception

BceAB is only one part of the sensory unit of the Bce system that also includes the histidine kinase. BceS (like YvcQ and LiaS) was classified as an intramembrane-sensing histidine kinase, based on the architecture of its N-terminal input domain, consisting solely of two TMR with only a few amino acids (less than 10 for most proteins) in between. It was therefore suggested that these kinases detect their stimuli from within or at the membrane interface (Mascher, 2006; Mascher *et al.*, 2006).

The identification of the crucial role of accessory membrane proteins for both LiaS-like (Jordan *et al.*, 2006) and BceS-like sensor kinases (this report) challenges this model. Moreover, recent work on ApsS, a close homologue of BceS, demonstrated that a similarly short extracellular loop of eight amino acids was crucial for sensing cationic antimicrobial peptides in *Staphylococcus epidermidis* (Li *et al.*, 2007). While the negatively charged amino acids identified as crucial for peptide sensing are absent in BceS (data not shown), a potential role of such short extracellular loops for stimulus perception can no longer be ruled out.

While the role of BceAB for stimulus perception represents a novel mechanism for activating TCS-mediated signal transduction, a number of histidine kinases harbour permease-like N-terminal putative input domains (Mascher *et al.*, 2006). The best-studied example is the UhpABC system of *Escherichia coli*, which regulates the expression of a glucose 6-phosphate transporter, UhpT, in response to the extracellular presence of glucose 6-phosphate (Kadner, 1995). The membrane-associated sensor

(MASE) domain (Nikolskaya *et al.*, 2003) of the histidine kinase UhpB consists of eight TMR with one large extracellular loop, reminiscent of the BceB topology (Fig. 4C). The input domains of a number of additional sensor kinases consist of 12–20 TMR that bear significant sequence similarity in both the TMR and the connecting loops to Na⁺/solute symporters (so-called SSSF proteins) (Jung, 2001; 2002).

Taken together, BceS/BceAB-like sensory modules, and other sensor kinases with fused transporter-like domains, might represent a unique functional class of 'transmembrane-sensing' histidine kinase modules that sense their stimulus, a solute, during transport, as suggested in a recent review article (Mascher *et al.*, 2006). In case that BceAB functions as a bacitracin importer, an alternative mechanism of stimulus perception could involve a direct interaction between bacitracin (after uptake) and the cytoplasmic kinase domain of BceS. Future research will hopefully unravel the molecular mechanism of stimulus perception mediated by BceS/BceAB-like sensory modules, which are conserved in *Firmicutes* bacteria.

Experimental procedure

Bacterial strains and growth conditions

Bacillus subtilis was routinely grown in LB medium at 37°C with aeration. All strains used in this study are derivatives of the wild-type strain W168 and are listed in Table 2. Kanamycin (10 µg ml⁻¹), chloramphenicol (5 µg ml⁻¹), spectinomycin (100 µg ml⁻¹), tetracycline (10 µg ml⁻¹) and erythromycin (1 µg ml⁻¹) plus lincomycin (25 µg ml⁻¹) for macrolide-lincosamide-streptogram ('MLS') resistance were used for the selection of the *B. subtilis* mutants used in this study. Transformation was carried out as described (Harwood and Cutting, 1990).

Allelic replacement mutagenesis using LFH-PCR

This technique is derived from the published procedure (Wach, 1996) and was performed as described previously (Mascher *et al.*, 2003). In brief: resistance cassettes were amplified from a suitable vector as template (Youngman, 1990; Guerout-Fleury *et al.*, 1995). Two primer pairs were designed to amplify ~1000 bp DNA fragments flanking the region to be deleted. The resulting fragments are here called 'up' and 'do' fragment. The 3'-end of the up-fragment and the 5'-end of the do-fragment extended into the gene(s) to be deleted so that all expression signals of the flanking genes remained intact. Extensions of ~25 nucleotides were added to the 5'-end of the 'up-reverse' and the 'do-forward' primers that were complementary (opposite strand and inverted sequence) to the 5'- and 3'-end of the amplified resistance cassette. All

obtained fragments were purified using the PCR purification kit from Qiagen. One hundred to 150 ng of the up- and do-fragments and 250–300 ng of the resistance cassette were used together with the specific up-forward and do-reverse primers at standard concentrations in a second PCR reaction. In this reaction the three fragments were joined by the 25-nucleotide overlapping complementary ends and simultaneously amplified by normal primer annealing. The PCR products were directly used to transform *B. subtilis*. Transformants were screened by colony PCR, using the up-forward primer with a reverse check-primer annealing inside the resistance cassette (Table S1). The integrity of the regions flanking the integrated resistance cassettes was verified by sequencing PCR products of ~1000 bp amplified from chromosomal DNA of the resulting mutants. Sequencing was performed in house by the GenoMIK centre (Göttingen). All PCR reactions were performed in a total volume of 50 µl (10 µl for colony PCR) using the HotStar DNA-Polymerase Mastermix (Qiagen) or TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf) according to the manufacturer's procedure. The constructed strains are listed in Table 2, the primers are listed in Table S1.

Construction of transcriptional promoter-lacZ fusions

An ectopic integration of a P_{bcrC}-lacZ fusion was constructed based on the vector pAC6 (Table 3) (Stülke *et al.*, 1997). This vector carries a chloramphenicol resistance cassette for selection in *B. subtilis*, and integrates into the *amyE* locus by double crossing-over, resulting in stable integrations of promoter-lacZ fusions (Perego, 1993). The promoter fragment was amplified, using the primers #334 and #335, thereby introducing *EcoRI* and *BamHI* sites respectively (Table S1). Standard cloning techniques were applied (Sambrook and Russell, 2001). The insert was verified by DNA sequencing at the GenoMIK centre (Göttingen). The resulting pAC6-derived plasmid, pIG601 (Table 3), was linearized with *Scal* and used to transform *B. subtilis* 168 with chloramphenicol selection, resulting in strain TMB134 (Table 2). Subsequently, individual genes of the *bce* and the *bcr* locus were replaced with a kanamycin or a tetracyclin resistance cassette by transforming TMB134 with chromosomal DNA from strains TMB035 and TMB297, resulting in strains TMB326, TMB385 and TMB387 (see Table 2 for details). The pAC6 vector was also used to construct P_{bceA}- and P_{yvcF}-lacZ fusions, applying the same cloning strategy (Table 3). Primers used are listed in Table S1, and the resulting strains are given in Table 2.

Complementation of *bceA* and *bceB* deletion mutants

An ectopic integration of a P_{xyI}-*bceA* fusion was constructed based on the vector pXT (Derre *et al.*, 2000). This

vector is a pDG1731 derivative (Guerout-Fleury *et al.*, 1996) that carries a spectinomycin resistance cassette for selection in *B. subtilis*, a xylose-inducible promoter for gene expression, and integrates into the *thrC* locus by double crossing-over, again resulting in stable integrations. We amplified *bceA* with primers #11 and #764, thereby introducing the coding sequence of the StrepII-tag (WSHPQFEK, resulting in the expression of a C-terminally StrepII-tagged BceA) and *Bam*HI and *Hind*III sites respectively (Table S1). Cloning and verification of DNA sequence was performed as described above. The resulting pXT-derived plasmid, pDH701 (Table 3), was linearized with *Sca*I and used to transform *B. subtilis* TMB300 with spectinomycin selection, resulting in strain TMB429 (Table 2). For *bceA-strepII* expression, 0.1% xylose was added to the medium. The pXT vector was also used to construct P_{xyI}-*bceA*(G₄₀A, K₄₆A)-*strepII*, P_{xyI}-*bceA*(E₁₆₉Q)-*strepII*, P_{xyI}-*bceB* and P_{xyI}-*bceB*(BceB ΔY₃₁₄-Q₅₂₀) fusions (Table 3; see also next paragraph). In the case of the latter two constructs, all epitope-tagged alleles were dysfunctional and therefore only untagged alleles could be used.

Site-directed mutagenesis of *bceA* and *bceB*

A mutated *bceA* allele with two amino acid exchanges in the Walker A motif (G₄₀A and K₄₆A) was constructed using a PCR-based strategy similar to the LFH-PCR described above. Two fragments of the gene, here called 'up'- and 'down'-fragment, were amplified using the primer pairs #011/#623 and #624/#764 (Table S1). Primers #623 and #624 carried the designated base exchanges and overlapped by 27 nucleotides. The two resulting fragments were purified using the PCR-purification kit from Qiagen. One hundred and fifty to 200 ng of the up- and down-fragments were used together with the flanking primers (#011 and #764) in a second PCR reaction. Here, the two fragments were joined by the overlapping complementary ends (incorporating the desired nucleotide exchanges) and simultaneously amplified by normal primer annealing, thereby introducing *Bam*HI and *Hind*III sites respectively (Table S1). The PCR products were purified again, and subsequently cloned into the complementation vector pXT, as described above. The same strategy was used to construct a *bceA* allele with a single amino acid exchange (E₁₆₉Q) in the Walker B motif, and a *bceB* mutant lacking the extracytoplasmic loop. The primers are listed in Table S1.

Construction of C-terminal PhoA fusions for membrane topology studies

Three translational *bceB*-PhoA fusions, expressing N-terminal BceB fragments of increasing length (M₁-F₃₅₁, M₁-D₄₉₁ and M₁-E₅₅₇), were constructed based on the

vector pHA-4 (Rapp *et al.*, 2004). This vector is a pING1 derivative (Johnston *et al.*, 1985) that carries an ampicillin resistance cassette for selection in *E. coli* and an arabinose-inducible promoter. *Xho*I and *Bam*HI sites were introduced during PCR amplification, using the primers #0634-#0637 (Table S1). The resulting pHA-4 derivatives, pER401-pER403 (Table 3), were used to transform *E. coli* CC118. The resulting strains, TME027-029 (Table 2), were assayed for PhoA activity (Manoil, 1991), as described below.

Measurement of promoter induction by β-galactosidase assay

Cells were inoculated from fresh overnight cultures and grown in LB medium at 37°C with aeration until they reached an OD₆₀₀ ~ 0.4. The culture was split, adding bacitracin (50 μg ml⁻¹ final concentration, or as stated in figure legends of figures 1 and 3) to one half (induced sample), and leaving the other half untreated (uninduced control). After incubation for an additional 30 min at 37°C with aeration, 2 ml of each culture was harvested and the cell pellets were frozen and kept at -20°C. The pellets were re-suspended in 1 ml of working buffer and assayed for β-galactosidase activity as described with normalization to cell density (Miller, 1972).

Measurement of membrane topology by alkaline phosphatase assay

The alkaline phosphatase activity assay was performed in the *E. coli* CC118 strain transformed with the pHA-4 derivatives carrying the appropriate PhoA fusion constructs. Cells were inoculated in 5 ml of LB medium supplemented with 100 μg ml⁻¹ ampicillin and grown overnight at 37°C. Overnight cultures were diluted 1:100 into 5 ml of fresh medium with antibiotics and grown at 37°C. When the OD₆₀₀ reached 0.13-0.18 cells were induced with 0.2% arabinose and grown until the bacteria had reached a final density of 0.3-0.6. To prevent the spontaneous activation of PhoA that is localized to the cytoplasm, 1 mM iodacetamide was added to the cultures 10 min prior to harvesting and to all buffers used subsequently (Derman and Beckwith, 1995). The activity assay was carried out as described previously (Manoil, 1991).

Western blotting

Total cytoplasmatic proteins were prepared from 15 ml of culture per time point by using a French press. Proteins (20 μg per lane) were separated by SDS-PAGE, according to the standard procedure (Sambrook and Russell, 2001). After electrophoresis the gels were equilibrated in transfer buffer [15.2 g of Tris; 72.1 g of glycine; 750 ml of

methanol (100%) in a final volume of 5 l with deionized water] for 30 s. A PVDF membrane was activated with methanol (100%) and subsequently incubated in transfer buffer for 5 min. The proteins were blotted to this membrane using a mini-trans blot apparatus (Bio-Rad). After transfer (1 h at 100 V) the membrane was incubated in blocking buffer [1× PBS (6.4 g of NaCl; 0.16 g of KCl; 1.44 g of Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 0.192 g of KH₂PO₄; pH 7.4 in a final volume of 800 ml with deionized water), 5% BSA (bovine serum albumin) and 0.5% TWEEN20] overnight to prevent non-specific binding. The StreptII-tag antibody [polyclonal rabbit antiserum raised against purified StreptII-tagged GlpK from *Mycoplasma pneumoniae*, which was demonstrated to be also specific for StreptII-tags of other proteins (C. Hames, unpublished)] was diluted 1:1000 in 1× PBS. After incubation for 1 h, the membrane was washed three times for 10 min with wash buffer (1× PBS and 0.1% TWEEN20). The secondary antibody [anti-rabbit IgG, coupled with alkaline phosphatase (Roche Diagnostics)] was diluted 1:100 000 in 1× PBS and the membrane was incubated for 30 min. After three more 10 min washing steps, the membrane was washed with deionized water and incubated in buffer III (0.1 M Tris; 0.1 M NaCl; pH 9.5) for 5 min to adjust the pH. For StreptII Tag detection, 10 µl of CDP-Star chemiluminescence substrate (Roche Diagnostics) in 1 ml buffer III was used. The signal was documented with a Chemi-Smart Lumilimager (peqlab).

Preparation of total RNA

Total RNA was extracted from 20 ml of culture with and without bacitracin (50 µg ml⁻¹ final concentration). Bacitracin was added to the culture at OD₆₀₀ of 0.3–0.4 (mid-log phase) and the cultures were incubated for 10 min at 37°C with aeration before the cells were harvested and rapidly frozen at –70°C. RNA was prepared using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The RNA was treated with DNase (using the on-column RNase-free DNase kit from Qiagen) to remove remaining traces of chromosomal DNA that would interfere with the subsequent reaction. The success of this treatment was verified by a lack of product in a standard PCR reaction, using the same primers as for the real-time RT-PCR.

Quantitative real-time RT-PCR

Transcript abundance was determined by quantitative real-time RT-PCR, using the iScript One-Step RT-PCR kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's procedure, with minor modifications: in brief, 100 ng of DNA-free total RNA was used in a total reaction volume of 20 µl with 0.5 µM of each primer (see Table S1). The amplifi-

cation reaction was carried out in an iCycler (Bio-Rad), using the following programme: initial incubation 50°C for 10 min, followed by a 95°C step for 5 min, followed by 45 cycles [95°C (10 s), 60°C (30 s)]. After two subsequent incubation steps [95°C (1 min), 55°C (1 min)], the set-point temperature was increased in 81 cycles (10 s each) by 0.5°C per cycle, starting from 55°C, to determine the melting temperatures of the PCR products. Expression of *rpsE* and *rpsJ*, encoding ribosomal proteins, was monitored as constitutive reference genes. Expression of *bceA* and *yvcR* was calculated as fold changes using the formula: Fold change = 2^{-ΔΔCt}; with $-\Delta\Delta Ct = (Ct_{(gene\ x)} - Ct_{(constitutive\ gene)})_{condition\ I} - (Ct_{(gene\ x)} - Ct_{(constitutive\ gene)})_{condition\ II}$ (Talaat *et al.*, 2002).

Acknowledgements

We are indebted to Mohamed Marahiel and Björn Wagner for their generous gift of bacitracin A derivatives, and for providing the graphic files of the bacitracin structures shown in Fig. 3. We would also like to acknowledge Tina Wecke and Sina Jordan for critically reading of the manuscript. Furthermore, we would like to thank Ieva Gailitė for plasmid construction, Claudine Hames for providing us with antibodies, and Jörg Stülke, in whose department this research was conducted. Work in the author's lab was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant MA2837/2-1) and the Fonds der Chemischen Industrie (to T.M.).

References

- Anke, T. (ed.) (1997) *Fungal Biotechnology*. Weinheim: Chapman & Hall.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., and Campos-Takaki, G.M. (1993) Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* **42**: 1–7.
- Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **58**: 1–26.
- Bernard, R., El Ghachi, M., Mengin-Lecreux, D., Chippaux, M., and Denizot, F. (2005) BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* **280**: 28852–28857.
- Bernard, R., Guiseppi, A., Chippaux, M., Fogliano, M., and Denizot, F. (2007) Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J Bacteriol* **189**: 8636–8642.
- Butcher, B.G., and Helmann, J.D. (2006) Identification of *Bacillus subtilis* σ^W-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by *Bacilli*. *Mol Microbiol* **60**: 765–782.
- Cain, B.D., Norton, P.J., Eubanks, W., Nick, H.S., and Allen, C.M. (1993) Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 3784–3789.
- Cao, M., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of the *Bacillus*

- subtilis* *bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function σ factors. *J Bacteriol* **184**: 6123–6129.
- Cao, M., Wang, T., Ye, R., and Helmann, J.D. (2002) Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* σ^W and σ^M regulons. *Mol Microbiol* **45**: 1267–1276.
- Chalker, A.F., Ingraham, K.A., Lunsford, R.D., Bryant, A.P., Bryant, J., Wallis, N.G., *et al.* (2000) The *bacA* gene, which determines bacitracin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, is also required for virulence. *Microbiology* **146**: 1547–1553.
- Champness, W. (2000) Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. In *Prokaryotic Development*. Brun, Y.V., and Shimkets, L.J. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 11–31.
- D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**: 374–377.
- Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melen, K., Drew, D., and von Heijne, G. (2005) Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* **308**: 1321–1323.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241–268.
- Dawson, R.J., Hollenstein, K., and Locher, K.P. (2007) Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol* **65**: 250–257.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., and Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 159–184.
- Derman, A.I., and Beckwith, J. (1995) *Escherichia coli* alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. *J Bacteriol* **177**: 3764–3770.
- Derre, I., Rapoport, G., and Msadek, T. (2000) The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded *in vivo* at 37°C. *Mol Microbiol* **38**: 335–347.
- Foster, S.J., and Popham, D.L. (2002) Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acid, S-layers and capsules. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives. From Genes to Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 21–41.
- Guerout-Fleury, A.M., Shazand, K., Frandsen, N., and Stragier, P. (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**: 335–336.
- Guerout-Fleury, A.M., Frandsen, N., and Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**: 57–61.
- Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester: John Wiley & Sons.
- van der Heide, T., and Poolman, B. (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep* **3**: 938–943.
- Horsburgh, M.J., and Moir, A. (1999) σ^M , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol Microbiol* **32**: 41–50.
- Hyyryläinen, H.L., Sarvas, M., and Kontinen, V.P. (2005) Transcriptome analysis of the secretion stress response of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 389–396.
- Ishihara, H., Takoh, M., Nishibayashi, R., and Sato, A. (2002) Distribution and variation of bacitracin synthetase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis*. *Curr Microbiol* **45**: 18–23.
- Johnston, S., Lee, L.H., and Ray, D.S. (1985) High-level expression of M13 gene II protein from an inducible polycistronic messenger RNA. *Gene* **34**: 137–145.
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J.D., and Mascher, T. (2006) Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *J Bacteriol* **188**: 5153–5166.
- Jordan, S., Hutchings, M.I., and Mascher, T. (2008) Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 107–146.
- Joseph, P., Fichant, G., Quentin, Y., and Denizot, F. (2002) Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 503–513.
- Jung, H. (2001) Towards the molecular mechanism of Na(+)/solute symport in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1505**: 131–143.
- Jung, H. (2002) The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *FEBS Lett* **529**: 73–77.
- Kadner, R.J. (1995) Expression of the Uhp sugar-phosphate transport system of *Escherichia coli*. In *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A., and Silhavy, T.J., (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 263–274.
- Kang, J.W., De Reymaeker, G., Van Schepdael, A., Roets, E., and Hoogmartens, J. (2001) Analysis of bacitracin by micellar electrokinetic capillary chromatography with mixed micelle in acidic solution. *Electrophoresis* **22**: 1356–1362.
- Li, M., Lai, Y., Villaruz, A.E., Cha, D.J., Sturdevant, D.E., and Otto, M. (2007) Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 9469–9474.
- McNeil, M.M., and Brown, J.M. (1994) The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* **7**: 357–417.
- Manoil, C. (1991) Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and β -galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol* **34**: 61–75.
- Manson, J.M., Keis, S., Smith, J.M.B., and Cook, G.M. (2004) Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3743–3748.
- Mascher, T. (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 133–144.

- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2003) Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* **50**: 1591–1604.
- Mascher, T., Zimmer, S.L., Smith, T.A., and Helmann, J.D. (2004) Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2888–2896.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Unden, G. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **90**: 910–938.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ming, L.-J., and Epperson, J.D. (2002) Metal binding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorganic Biochem* **91**: 46–58.
- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F., and Thomas, P.J. (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* **277**: 21111–21114.
- Nikolskaya, A.N., Mulkidjanian, A.Y., Beech, I.B., and Galperin, M.Y. (2003) MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 11–16.
- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003a) The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 1135–1144.
- Ohki, R., Tateno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., *et al.* (2003b) A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol* **185**: 51–59.
- Perego, M. (1993) Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 615–624.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Völker, U., and Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617–5631.
- Pietiäinen, M., Gardemeister, M., Mecklin, M., Leskela, S., Sarvas, M., and Kontinen, V.P. (2005) Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* **151**: 1577–1592.
- Podlessek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R., and Grabnar, M. (1995) *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* **16**: 969–976.
- Pollock, T.J., Thorne, L., Yamazaki, M., Mikolajczak, M.J., and Armentrout, R.W. (1994) Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J Bacteriol* **176**: 6229–6237.
- Rapp, M., Drew, D., Daley, D.O., Nilsson, J., Carvalho, T., Melen, K., *et al.* (2004) Experimentally based topology models for *E. coli* inner membrane proteins. *Protein Sci* **13**: 937–945.
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., and Roberts, M. (2006) Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 383–394.
- Ruiz, N., and Silhavy, T.J. (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol* **8**: 122–126.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., and Ames, G. (1991) Structure–function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* **266**: 18714–18719.
- Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**: 845–857.
- Stone, K.J., and Strominger, J.L. (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 3223–3227.
- Storm, D.R., and Strominger, J.L. (1973) Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid–peptide interactions. *J Biol Chem* **248**: 3940–3945.
- Storz, G., and Hengge-Aronis, R. (2000) *Bacterial Stress Response*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Klier, A., and Rapoport, G. (1997) Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* **25**: 65–78.
- Talaat, A.M., Howard, S.T., Hale, I.V.W., Lyons, R., Garner, H., and Johnston, S.A. (2002) Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **30**: e104–e109.
- Tam le, T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M., and Antelmann, H. (2006) Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* **8**: 1408–1427.
- Thackray, P.D., and Moir, A. (2003) SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J Bacteriol* **185**: 3491–3498.
- Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y., and Koga, T. (2002) Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3756–3764.
- Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259–265.
- Wagner, B., Schumann, D., Linne, U., Koert, U., and Marahiel, M.A. (2006) Rational design of bacitracin A derivatives by incorporating natural product derived heterocycles. *J Am Chem Soc* **128**: 10513–10520.

- Wecke, T., Veith, B., Ehrenreich, A., and Mascher, T. (2006) Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J Bacteriol* **188**: 7500–7511.
- Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., and Schumann, W. (2001) Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon. *Mol Microbiol* **41**: 59–71.
- Youngman, P. (1990) Use of transposons and integrational vectors for mutagenesis and construction of gene fusions in *Bacillus subtilis*. In *Molecular Biological Methods for Bacillus* Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (eds). Chichester: John Wiley & Sons, pp. 221–266.

Supplementary material

This material is available as part of the online article from:
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2008.06194.x>
(This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Zelluläre Lokalisation und Interaktion der Stress-induzierbaren Proteine LiaIHG in *Bacillus subtilis*

IV.1. Einleitung

In einer detaillierten Untersuchung des LiaR-Regulons in *B. subtilis* (siehe Kapitel II) wurde gezeigt, dass das Lia-System das Hauptziel der LiaR-abhängigen Regulation ist (Wolf *et al.*, 2010). Wird das LiaRS-Zweikomponentensystem (2KS) durch Zellhüllstress-auslösende Substanzen, z.B. Bacitracin aktiviert, so führt dies letztendlich zur Induktion des *lia*-Promoters und zur Expression des Haupttranskriptes *liaIH*. Die Funktionen der beiden Gene *liaIH* sind noch völlig unbekannt. Detaillierte phänotypische Analysen ergaben keine Hinweise auf eine Rolle beider Gene in der Resistenzbildung gegen Zellhüllstress-verursachende Substanzen (Wolf *et al.*, 2010). Mutationen in den Genen *liaIH* führen, im Vergleich zum Wildtyp W168, lediglich zu einer schwach ausgeprägten Sensitivität gegenüber einigen Antibiotika (Daptomycin, Cephalexin), sowie Stoffen, die oxidativen Stress verursachen, z.B. Natrium-Selenit, Plumbagin. Es ist daher möglich, dass LiaI und LiaH in Schutzmechanismen, die die Zellhülle betreffen, involviert ist. Eine bioinformatische und strukturelle Analyse von LiaH hat ergeben, dass dieses Protein zur Familie der Phagenschock-Proteine (Psp) gehört, die in fast allen Phyla des Lebens hoch konserviert ist. Außer in *B. subtilis* werden die Phagenschock-Proteine auch in *E. coli*, *Y. enterocolytica* und *S. lividans* intensiv erforscht (Darwin, 2005, Maxson & Darwin, 2004, Model *et al.*, 1997, Vrancken *et al.*, 2008). Die Phagenschock-Proteine dieser Organismen haben alle eine Rolle in der Zellhüllstressantwort gemeinsam, jedoch konnte die exakte Funktion der jeweiligen Proteine bisher nicht bestimmt werden. In diesem Kapitel wird das Hauptaugenmerk auf das *liaIH*-Operon gelegt, da beide Gene unter Zellhüllstress stark exprimiert werden. Eine detaillierte Analyse beider Proteine mittels biochemischer und mikroskopischer Experimente soll Aufschluss über die zelluläre Lokalisation und eine potentielle Interaktion beider Proteine geben. Des Weiteren wird durch BACTH und SPINE-Analysen nach potentiellen LiaH-Interaktionspartnern gesucht, die nähere

Hinweise auf die Funktion von LiaH in *B. subtilis* erbringen könnten. Zusätzlich soll auch LiaG näher betrachtet werden, welches ein potentiell Membranprotein mit unbekannter Funktion darstellt. Hier sollen Topologie-Analysen, mikroskopische Untersuchungen und Interaktionsstudien erste funktionelle Auskünfte über LiaG geben.

IV.2. Material und Methoden

IV.2.1. Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide

Alle in diesem Kapitel verwendeten Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide sind in den Tabellen IV.1-3 aufgeführt.

Tabelle IV.1: In diesem Kapitel verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp ^a	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
BTH101	F ⁻ <i>cyo-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 (str^r) hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	Laborsammlung
CC118	F- Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139</i> Δ (<i>lac</i>)X74 <i>phoA</i> Δ 20 <i>galE glaK thi rpsE rpoB argE recA1</i>	Laborsammlung
DH5 α	<i>ecA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 rK⁺ mK⁺ relA1 supE44 Φ80ΔlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169</i>	Laborsammlung
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (tet^r)</i>	Laborsammlung
<i>Bacillus subtilis</i>		
W168	<i>trpC2</i>	Laborsammlung
TMB143	W168 pDG148StuI (control)	Diese Arbeit
TMB688	W168 pDW3802 (cyt. <i>liaI</i>) mls	Diese Arbeit
TMB841	W168 pGP380 (control) mls	Diese Arbeit
TMB1328	W168 Ω <i>liaH</i> ::pDW5101 (<i>liaH</i> -GFP) Ω cm	Diese Arbeit
TMB1394	W168 Δ <i>liaI</i>	Diese Arbeit
TMB1395	W168 pDW1401 (<i>yvlB</i>) kan	Diese Arbeit
TMB1421	W168 Ω <i>liaI</i> ::pDW5102 (<i>liaI</i> -GFP) Ω cm	Diese Arbeit
TMB1407	W168 Δ <i>liaI</i> Ω <i>liaH</i> ::pDW5101 (<i>liaH</i> -GFP) Ω cm	Diese Arbeit
TMB1439	W168 Ω <i>liaG</i> ::pDW5102RFP (<i>liaG</i> -mRFP _{ruby}) Ω cm	Diese Arbeit
TMB1441	W168 <i>amyE</i> ::pSJ5401 (<i>liaI</i> -GFP) spec, Ω <i>liaH</i> ::pDW6401mRFP _{ruby} (RFP- <i>liaH</i>) Ω cm	Diese Arbeit

^aResistenzen: kan, Kanamycin; cm, Chloramphenicol; tet, Tetracyclin; str, Streptomycin; mls, Macrolid-Lincomycin; spec, Spectinomycin

Tabelle IV.2: In diesem Kapitel verwendete Oligonukleotide

Nummer und Verwendung	Sequenz
Markerlose <i>liaI</i> Deletion^a	
TM1188 <i>liaI</i> up fwd (<i>Bam</i> HI)	AGTCGGATCCCTACAATCCCGCCTCTATCGC
TM2218 <i>liaI</i> clean up rev2 (<i>Sal</i> I)	AGTCGTCGACCGTTTCCTTGTCTTCATCTTATAC
TM1193 <i>liaI</i> do fwd (<i>Sal</i> I)	AGTCGTCGACATATTAGGAGGAATCAGGTATGG
TM1191 <i>liaI</i> do rev (<i>Eco</i> RI)	AGTCGAATTCGTAAGTTCTGTGCCGGCTTCC
Topologie von <i>LiaI</i> und <i>LiaG</i>^{a,b}	
TM0856 P _{veg} fwd2 (<i>Sma</i> I)	GACTCCCGGGTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGG TACAATAAATGTAGTGA
TM1397 P _{veg} <i>liaI</i> fusion fwd	TCGTGTGTGACAATAAATGTAGTGACGAAAGGAGGATCTGCAT
TM1398 <i>liaI</i> (1-126) rev (<i>Bam</i> HI)	CCATGGATCCGATGCGTATGTCATCAAGCTCCCGATG

Nummer und Verwendung	Sequenz
TM1399 <i>liaI</i> (1-338) rev (<i>Bam</i> HI)	CCATGGATCCTCAGATTGGTAGGCAGCAGAAGC
TM0215 <i>liaI</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCAGATTGGTAGGCAGCAGAAGCC
TM0407 <i>liaI</i> fwd (<i>Xho</i> I)	AGCTCTCGAGCATGAAAATAAACAAGAAAACAATAGGC
TM0409 <i>liaI</i> rev2 (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCTGCGTATGTCATCAAGC
TM1817 <i>liaG</i> PhoA fwd (<i>Xho</i> I)	ACGCTCGAGAATGAAAAAATGCTTGGCAAAC
TM1818 <i>liaG</i> PhoA rev (<i>Bam</i> HI)	ACGGGATCCCCGTATCGCTAGATCCCCGC
TM2155 <i>liaG</i> PhoA rev2 (<i>Bam</i> HI)	ACGGGATCCTGATGCCTTCACTTTCAGATCTTG
TM2156 <i>liaG</i> PhoA rev3 (<i>Bam</i> HI)	ACGGGATCCTGCTGTCAATGTCCCGCGGCGATG
Crosslink –Experimente (SPINE)^{a,b,c}	
TM1466 cyt. <i>liaI</i> fwd (<i>Bam</i> HI)	AGTCGGATCCATCGCATTGGCGGCCGCTATGGTG
TM1467 <i>liaI</i> rev (<i>Xba</i> I)	AGTCTCTAGATTATTTTTTCTTCAAAAATTCTTCCCATTTCG
TM2216 Strep <i>yvlB</i> fwd	AAGGAGGAAGCAGGTATGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAT GAAGCAAGAAAAGGAACG
TM2217 <i>yvlB</i> rev	GACACGCACGAGGTTACCTCTGTGAGTACTTTAG
Kontroll-Primer	
TM1488 pGP380 check fwd	GATCAAATACCTAGGACTCG
TM1489 pGP380 check rev	GCTATGACCATGATTACGCC
TM2244 pDG148Stu check fwd	CATCCAGAACAACCTCTGC
TM2245 pDG148Stu check rev	GGTACGTACGATCTTTCAGC
TM1220 pUT18 fwd	AGCTCACTCATTAGGCACCC
TM1221 pUT18 rev	CCGTCGTAGCGGAACTGGCG
TM1222 pUT18C fwd	TCGACGATGGGCTGGGAGCC
TM1223 pUT18C rev	AGCAGACAAGCCCCTCAGGG
TM1224 pKT25 fwd	GGCGGATATCGACATGTTTCG
TM1225 pKT25 rev	ATCGGTGCGGGCCTCTTCGC
TM1226 pKT25N fwd	GCTCACTCATTAGGCACCC
TM1227 pKT25N rev	GGCGAACATCAATGTGGCG
Bacterial Two Hybrid Assays^a	
TM1233 <i>liaH</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCGTCTAGAGATGGTATTA AAAAAGAATCAG
TM1234 <i>liaH</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCAGTTCATTGCGCGTTTTGTCTGGTC
TM1235 <i>yjoB</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCGTCTAGAGATGACTAACATAACCTTTCATTTATCAGTAC
TM1236 <i>yjoB</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCGAGTGAAAACCGACTTTGTTTTCTTCCATCC
TM1323 <i>pspA</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGAGATGAGTATAAATTGGAAG
TM1324 <i>pspA</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCCTCTTATCGAGCATCATTTCGC
TM1924 <i>yvlA</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGACTTGAACCGTAATCAAGC
TM1925 <i>yvlA</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCGATGCTGCACGCAGGACCTTAATG
TM1926 <i>yvlB</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGACATGAAGCAAGAAAAGGAACGAATCC
TM1927 <i>yvlB</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCAACCTCTGTGAGTACTTTAG
TM1928 <i>yvlC</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGACATGAATAAGCTTTATCGCTCAG
TM1929 <i>yvlC</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCAGTTTCATATCCCTTCTGACGG
TM1930 <i>yvlD</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGACATGGTAAAATGGGCAGTCAGC
TM1931 <i>yvlD</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCGGTTTTTTTCTAAGCGGCTCTAAAATGCC
TM1932 <i>dnaK</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGACGTGAGTAAAGTTATCGGAATCG
TM1933 <i>dnaK</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCGGTTTTTTGTTTTGGTCGTCGTTTACTTC
TM1934 <i>htpG</i> fwd (<i>Xba</i> I)	AGCTTCTAGACGTGGCGAAAAAAGAGTTTTAAAGCAG
TM1935 <i>htpG</i> rev (<i>Bam</i> HI)	AGCTGGATCCGTCACCATGACCTTGCAAATATTGTTTCG
TM2149 <i>liaG</i> TM fwd (<i>Xba</i> I)	TCGATCTAGACATGAAAAAATGCTTGGCAAACCTG
TM2150 <i>liaG</i> TM rev (<i>Bam</i> HI)	TCGAGGATCCATGCTGTCAATGTCCCGCGGCGATG
TM2151 <i>liaG</i> COG fwd (<i>Xba</i> I)	TCGATCTAGACATGGTCATTGAGTCGGATAGCAAG
TM2152 <i>liaG</i> COG rev (<i>Bam</i> HI)	TCGAGGATCCCGTATCGCTAGATCCCCGCTGTCCGTTTTG
TM2153 <i>liaI</i> TM fwd (<i>Xba</i> I)	TCGATCTAGACATGAAAATAAACAAGAAAACAATAGGCCG
TM2154 <i>liaI</i> TM rev (<i>Bam</i> HI)	TCGAGGATCCTTCCAGCCGTAATACCCATAGC
Fluoreszenz-Mikroskopie^a	
TM0558 <i>liaI</i> -GFP fwd (<i>Kpn</i> I)	GACTGGTACCAAAAATAAACAAGAAAACAATAGGC
TM0559 <i>liaI</i> -GFP rev (<i>Xho</i> I)	GACTCTCGAGTTTTTTCTTCAAAAATTCTTCCCATTTCG
TM2159 <i>liaH</i> -GFP fwd (<i>Hind</i> III)	ACGAAGCTTCAGGACGTAAAGGATAAAAAACAGGCG
TM2160 <i>liaH</i> -GFP rev (<i>Pst</i> I)	ACGCTGCAAGTTTCAATTTGCGGCTTTTGTCTGGTCTG
TM2264 <i>liaI</i> -GFP fwd (<i>Xho</i> I)	ATGCCTCGAGCCATCACGGGAATCATCGTG
TM2265 <i>liaI</i> -GFP rev (<i>Hind</i> III)	ATGCAAGCTTTTTTTCTTCAAAAATTCTTCCCATTTCGTC
TM2266 <i>liaG</i> -GFP fwd (<i>Xho</i> I)	ATGCCTCGAGGGTAACCGGTCCCCTATCTGTACG
TM2267 <i>liaG</i> -GFP rev (<i>Hind</i> III)	ATGCAAGCTTCCGATCGCTAGATCCCCGCTG

^aRestriktionsschnittstellen sind kursiv/fett hervorgehoben

^bLinker Sequenzen für Joining PCR-Reaktionen sind unterstrichen und kursiv/fett hervorgehoben

^cStrep-Tag Sequenz ist kursiv/unterstrichen hervorgehoben

Tabelle IV.3: In diesem Kapitel verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp ^a	Primer für Klonierung	Referenz
pMAD	<i>erm^r</i> , ori(pE194-Ts), MCS-Pclp <i>B-bgaB</i> , ori(pBR322), <i>bla^r</i>		(Stülke <i>et al.</i> , 1997)
pHA-4	<i>araC bla^r phoA</i> pNGbackbone		(Youngman, 1990)
pAC7	<i>bla^r amyE3⁺ kan^r lacZ amyE5⁺</i>		(Weinrauch <i>et al.</i> , 1991)
pGP380	<i>erm^r bla^r Strep-tagPdegQ36</i>		(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pDG148StuI	<i>bla^r kan^r ble^r/phle^r Pspac</i>		(Joseph <i>et al.</i> , 2001)
pUT18	<i>Plac T18</i> (AA 225 to 399 of <i>ccaA</i>) <i>bla^r Ori-ColE1</i>		(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18C	<i>Plac T18</i> (AA 225 to 399 of <i>ccaA</i>) <i>bla^r Ori-ColE1</i>		(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pKT25	<i>Plac T25</i> (first 224 AA of <i>ccaA</i>) <i>kan^r Ori-p15A</i>		(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pKT25N	<i>Plac T25</i> (first 224 AA of <i>ccaA</i>) <i>kan^r Ori-p15A</i>		(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pSG1151	<i>gfpmut1 cat^r bla^r ori-ColE1 ori-fl</i>		(Feucht & Lewis, 2001)
RWB2	pSG1151 Derivat, <i>gfpmut1</i> ersetzt durch <i>mrfpruby</i>		(Dominguez-Escobar <i>et al.</i> , 2011)
pSG1154	<i>gfpmut1 spec^r bla^r ori-ColE1 amyE'...'amyE P_{xyl}</i>		(Lewis & Marston, 1999)
pSG1164	<i>gfpmut1 cat^r bla^r ori-ColE1 P_{xyl}</i>		(Lewis & Marston, 1999)
pSG1164RFP	<i>rfp</i> pSG1164 Derivat		Roland Wedlich
	pUT18 <i>liaG</i>		R.Emmins, Newcastle
	pUT18C <i>liaG</i>		R.Emmins, Newcastle
	pKT25 <i>liaG</i>		R.Emmins, Newcastle
	pKT25N <i>liaG</i>		R.Emmins, Newcastle
	pUT18 <i>liaI</i>		R.Emmins, Newcastle
	pUT18C <i>liaI</i>		R.Emmins, Newcastle
	pKT25 <i>liaI</i>		R.Emmins, Newcastle
	pKT25N <i>liaI</i>		R.Emmins, Newcastle
	pUT18 <i>liaIH</i>		R.Emmins, Newcastle
	pUT18C <i>liaIH</i>		R.Emmins, Newcastle
	pKT25 <i>liaIH</i>		R.Emmins, Newcastle
	pKT25N <i>liaIH</i>		R.Emmins, Newcastle
pSD1808	pUT18 <i>yjoB</i>	TM1235/TM1236	Diese Arbeit
pSD18C08	pUT18C <i>yjoB</i>	TM1235/TM1236	Diese Arbeit
pSD2508	pKT25 <i>yjoB</i>	TM1235/TM1236	Diese Arbeit
pSD25N08	pKT25N <i>yjoB</i>	TM1235/TM1236	Diese Arbeit
pSD1809	pUT18 <i>liaH</i>	TM1233/TM1234	Diese Arbeit
pSD18C09	pUT18C <i>liaH</i>	TM1233/TM1234	Diese Arbeit
pSD2509	pKT25 <i>liaH</i>	TM1233/TM1234	Diese Arbeit
pSD25N09	pKT25N <i>liaH</i>	TM1233/TM1234	Diese Arbeit
pDW1801	pUT18 <i>pspA</i>	TM1323/TM1324	Diese Arbeit
pDW18C01	pUT18C <i>pspA</i>	TM1323/TM1324	Diese Arbeit
pDW2501	pKT25 <i>pspA</i>	TM1323/TM1324	Diese Arbeit
pDW25N01	pKT25N <i>pspA</i>	TM1323/TM1324	Diese Arbeit
pDW1802	pUT18 <i>yvlA</i>	TM1924/TM1925	Diese Arbeit
pDW18C02	pUT18C <i>yvlA</i>	TM1924/TM1925	Diese Arbeit
pDW2502	pKT25 <i>yvlA</i>	TM1924/TM1925	Diese Arbeit
pDW25N02	pKT25N <i>yvlA</i>	TM1924/TM1925	Diese Arbeit
pDW1803	pUT18 <i>yvlB</i>	TM1926/TM1927	Diese Arbeit
pDW18C03	pUT18C <i>yvlB</i>	TM1926/TM1927	Diese Arbeit
pDW2503	pKT25 <i>yvlB</i>	TM1926/TM1927	Diese Arbeit
pDW25N03	pKT25N <i>yvlB</i>	TM1926/TM1927	Diese Arbeit
pDW1804	pUT18 <i>yvlC</i>	TM1928/TM1929	Diese Arbeit
pDW18C04	pUT18C <i>yvlC</i>	TM1928/TM1929	Diese Arbeit
pDW2504	pKT25 <i>yvlC</i>	TM1928/TM1929	Diese Arbeit
pDW25N04	pKT25N <i>yvlC</i>	TM1928/TM1929	Diese Arbeit
pDW1805	pUT18 <i>yvlD</i>	TM1930/TM1931	Diese Arbeit
pDW18C05	pUT18C <i>yvlD</i>	TM1930/TM1931	Diese Arbeit

Plasmid	Genotyp ^a	Primer für Klonierung	Referenz
pDW2505	pKT25 <i>yvID</i>	TM1930/TM1931	Diese Arbeit
pDW25N05	pKT25N <i>yvID</i>	TM1930/TM1931	Diese Arbeit
pDW1806	pUT18 <i>dnaK</i>	TM1932/TM1933	Diese Arbeit
pDW18C06	pUT18C <i>dnaK</i>	TM1932/TM1933	Diese Arbeit
pDW2506	pKT25 <i>dnaK</i>	TM1932/TM1933	Diese Arbeit
pDW25N06	pKT25N <i>dnaK</i>	TM1932/TM1933	Diese Arbeit
pDW1807	pUT18 <i>htpG</i>	TM1934/TM1935	Diese Arbeit
pDW18C07	pUT18C <i>htpG</i>	TM1934/TM1935	Diese Arbeit
pDW2507	pKT25 <i>htpG</i>	TM1934/TM1935	Diese Arbeit
pDW25N07	pKT25N <i>htpG</i>	TM1934/TM1935	Diese Arbeit
pEG1801	pUT18 <i>liaG</i> TM	TM2149/TM2150	Diese Arbeit
pEG18C01	pUT18C <i>liaG</i> TM	TM2149/TM2150	Diese Arbeit
pEG2501	pKT25 <i>liaG</i> TM	TM2149/TM2150	Diese Arbeit
pEG25N01	pKT25N <i>liaG</i> TM	TM2149/TM2150	Diese Arbeit
pEG1802	pUT18 <i>liaI</i> TM	TM2153/TM2154	Diese Arbeit
pEG18C02	pUT18C <i>liaI</i> TM	TM2153/TM2154	Diese Arbeit
pEG2502	pKT25 <i>liaI</i> TM	TM2153/TM2154	Diese Arbeit
pEG25N02	pKT25N <i>liaI</i> TM	TM2153/TM2154	Diese Arbeit
pEG1803	pUT18 <i>liaG</i> COG	TM2151/TM2152	Diese Arbeit
pEG18C03	pUT18C <i>liaG</i> COG	TM2151/TM2152	Diese Arbeit
pEG2503	pKT25 <i>liaG</i> COG	TM2151/TM2152	Diese Arbeit
pEG25N03	pKT25N <i>liaG</i> COG	TM2151/TM2152	Diese Arbeit
pDW3802	pGP380 <i>cyt. liaI mls^f</i>	TM1466/TM1467	Diese Arbeit
pDW1401	pDG148StuI Strep-tag <i>yvIB</i> kan ^f	TM2216/TM2217	Diese Arbeit
pDW1001	pAC7 P _{veg} <i>liaI</i> (1-338)	TM1397/TM1399+TM856/TM1399	Diese Arbeit
pDW1002	pAC7 P _{veg} <i>liaI</i> (1-126)	TM1397/TM1398+TM856/TM1398	Diese Arbeit
pDW401	pHA-4 <i>liaI</i> (1-338)	TM0407/TM0215	Diese Arbeit
pDW402	pHA-4 <i>liaI</i> (1-126)	TM0407/TM0409	Diese Arbeit
pJSc1616	pHA-4 <i>liaG</i>	TM1817/TM1818	Diese Arbeit
pEG401	pHA-4 <i>liaG</i> (1-168)	TM1817/TM2155	Diese Arbeit
pEG402	pHA-4 <i>liaG</i> (1-50)	TM1817/TM2156	Diese Arbeit
pDW106	pMAD <i>liaI</i> up + down	TM2218/TM1188+TM1193/TM1191	Diese Arbeit
pDW5101	pSG1151 <i>liaH</i>	TM2159/TM2160	Diese Arbeit
pDW5102	pSG1151 <i>liaI</i>	TM2264/TM2265	Diese Arbeit
pDW5102RF	pSG1151RF <i>liaG</i>	TM2266/TM2267	Diese Arbeit
P			
pSJ5401	pSG1154 <i>liaI</i>	TM0558/TM0559	Diese Arbeit

^aResistenzen: kan, Kanamycin; amp/bla, Ampicillin; erm, Erythromycin; ble, Bleomycin; phl, Phleomycin

IV.2.2. Allgemeine Anzucht- und Wachstumsbedingungen

B. subtilis und *E. coli* wurden in LB-Medium oder auf Agar-Platten bei 37°C unter Sauerstoffzufuhr angezogen. Die Antibiotika Kanamycin (10 mg ml⁻¹), Chloramphenicol (5 mg ml⁻¹), Tetracyclin (10 mg ml⁻¹), Erythromycin (1 mg ml⁻¹) plus Lincomycin (25 mg ml⁻¹) (Macrolid-Lincosamid-Streptgramin Resistenz) dienen zur Selektion von *B. subtilis*-, sowie Ampicillin (100 µg ml⁻¹) von *E. coli*-Stämmen.

IV.2.3. DNA-Manipulation und Klonierung

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Zur Untersuchung der Topologie von *LiaI* und *LiaG* wurden die Vektoren pHA-4 (Youngman, 1990) und pAC7 (Weinrauch *et al.*, 1991) genutzt (Tabelle IV.3). Hierbei wurden zunächst die Gene *liaI* und *liaG* (Primer, siehe Tabelle

IV.2) in unterschiedlichen Längen amplifiziert und anschließend mittels Restriktion in den Vektor pHA-4 kloniert (PhoA-Fusionen). Auf diese Weise wurden die Plasmide pDW401/402, pEG401/402 und pJSc1616 generiert. Des Weiteren wurden unterschiedlich lange Fragmente von *liaI* mit dem Promoter P_{veg} fusioniert (Primer TM856, Tabelle IV.2) und in den promoterlosen Vektor pAC7 kloniert (*lacZ*-Fusionen, Plasmide pDW1001/1002, Tabelle IV.3). Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Die replikativen Vektoren pGP380 und pDG148Stu wurden für Proteinüberexpression und *Crosslink*-Experimente in *B. subtilis* genutzt (Herzberg *et al.*, 2007, Joseph *et al.*, 2001). Der cytoplasmatische Teil des Gens *liaI* wurde amplifiziert (Primer, Tabelle IV.2), verdaut und in pGP380 kloniert. Das daraus entstandene Plasmid pDW3802 wurde sequenziert und anschließend wurde *B. subtilis* W168 mit diesem Plasmid transformiert, wobei der Stamm TMB688 generiert wurde (Tabelle IV.1). Als Kontrollstamm diente W168, der mit dem Leervektor pGP380 transformiert wurde (TMB841). Der Stamm TMB1395 wurde konstruiert, indem das PCR-Produkt von *yvlB* mit einer StrepII-Tag Sequenz fusioniert wurde (Primer TM2216/TM2217, Tabelle IV.2) und mittels T4-DNA-Polymerase in den Vektor pDG148Stu kloniert wurde. Zu Kontrollzwecken wurde auch hier W168 mit dem Leervektor pDG148Stu transformiert (TMB143).

Zur Durchführung von *Bacterial-Two-Hybrid*-Analysen (BACTH) wurden ausgewählte Gene von *B. subtilis* per PCR amplifiziert (Tabelle IV.2), anschließend in die Vektoren pUT18, pUT18C, pKT25 und pKT25N kloniert (Karimova *et al.*, 1998) und auf ihre Richtigkeit hin sequenziert (Plasmide, siehe Tabelle IV.3). *Green-fluorescent protein* (GFP) und *monomeric-red-fluorescent-protein-ruby* (mRFPruby, Fischer *et al.*, 2006) Fusionsprodukte wurden für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von LiaI, LiaH und LiaG konstruiert. Fragmente und Vollängenprodukte der Gene *liaI*, *liaH* und *liaG* wurden per PCR amplifiziert, verdaut und in pSG1151-GFP/RFP (C-terminales GFP/RFP, endogene Rekombination), pSG1154 (C-terminales GFP, integriert in *amyE*, unter P_{xyl} -Kontrolle) und pSG1164-GFP/RFP (C-terminales GFP/RFP, endogene Rekombination, unter P_{xyl} -Kontrolle) kloniert (Lewis & Marston, 1999, Feucht & Lewis, 2001). Anschließend wurde *B. subtilis* W168 mit den aus dieser Klonierung resultierenden, sequenzierten Plasmiden pDW1501 (Primer TM2159/TM2160), pDW5102 (TM2264/TM2265), pDW5102RFP (TM2266/TM2267), pDW5103 (TM2266/2267) und pSJ5401 (TM558/559) transformiert (Stämme, siehe Tabelle IV.1).

IV.2.4. Konstruktion einer markerlosen *liaI*-Deletionsmutante

Eine markerlose *liaI*-Deletionsmutante wurde unter Zuhilfenahme des Vektors pMAD konstruiert (Arnaud *et al.*, 2004). Hierbei wurde jeweils ca. 1 kb stromauf- und stromabwärts von *liaI* per PCR amplifiziert, durch überlappende Bereiche fusioniert, verdaut und in pMAD kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pDW106 (Tabelle IV.3) wurde mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde *B. subtilis* W168 mit diesem Plasmid (pDW106) transformiert. Die Selektion von gewünschten Mutanten wurde wie in Kapitel II (*Materials and Methods*) beschrieben durchgeführt.

IV.2.5. Bestimmung der Topologie durch PhoA/LacZ-Aktivitäts-Analysen

Mittels PhoA/LacZ-Aktivitäts-Analysen wurde die Topologie von LiaI und LiaG untersucht. Der Stamm *E. coli* CC118 wurde mit den Plasmiden, die *phoA*-Fusionen trugen (pDW401/pDW402, pEG401/402, pJSc1616; Tabelle IV.3) transformiert. Kolonien der Transformation wurden auf LB-Agar-Platten mit dem Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP, 50 µg ml⁻¹), Ampicillin (100 µg ml⁻¹) als Selektionsmarker, sowie Arabinose (0,2% w/v) als Induktor ausgestrichen. *B. subtilis* W168 wurde mit den Plasmiden, die *lacZ*-Fusionen innehatten (pDW1001/1002) transformiert und anschließend auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (10 µg ml⁻¹) und dem Substrat X-Gal (100 µg ml⁻¹) ausgestrichen. Alle Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf blaue und weiße Kolonien überprüft (Daley *et al.*, 2005, Weinrauch *et al.*, 1991).

IV.2.6. *in vivo* Crosslink-Experimente (SPINE)

SPINE (*Strep-protein interaction experiment*) diente der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und wurde mit Formaldehyd (0,6% v/v Endkonzentration) als *Crosslinker* nach der Methode von Herzberg (Herzberg *et al.*, 2007) durchgeführt. Dazu wurden *B. subtilis* Zellen zunächst in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen. Nun wurde Formaldehyd (0,6% v/v) dazugegeben und die Kultur für weitere 20 min geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet. Das Pellet wurde einmal in Zellaufschluss-Puffer (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 7,5) gewaschen (6000 x g, 4°C, 10 min) und dann in 3 ml resuspendiert. Nach Zugabe des Proteinase-Hemmers PMSF (1 mM Endkonzentration) wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (2 min, Intervall: 10 sec, Amplitude: 25%) aufgeschlossen. Die Aufreinigung des Zelllysats über Strep-Tactin Säulen (Strep-Tactin® Sepharose, Fa. IBA) geschah nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 x g, 4°C, 15 min), gemäß des

Protokolls für Strep-Tag Aufreinigungen des Herstellers (Fa. IBA). Alle Proteinfractionen wurden durch 12,5 %ige SDS-PAGE überprüft. Potentiell interagierende Proteine wurden mittels Western Blot detektiert und analysiert.

IV.2.7. Zell-Fraktionierung

Zell-Fraktionierungen wurden durchgeführt, um zwischen Cytoplasma- und Membran-Proteinen zu unterscheiden. Das Trennen von Cytoplasma- und Membran-Komponenten aus *B. subtilis* Zellen, die in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen wurden, geschah nach der von Schöbel (Schöbel *et al.*, 2004) beschriebenen Methode. Die Zellen wurden geerntet und das Pellet in Zellaufschluss-Puffer (siehe IV.2.6.) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (1 min, Intervall: 10 sec, Amplitude: 20%). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 x g, 20 min, 4°C), wurde der Überstand für 1 Stunde ultrazentrifugiert (30000 x g, 4°C). Danach wurde der Überstand abgenommen und gesammelt (= Cytoplasma-Fraktion). Das Membran-Pellet wurde mit Zellaufschluss-Puffer gewaschen und erneut für 30 min ultrazentrifugiert. Anschließend wurde das Membran-Pellet in einer minimalen Menge Zellaufschluss-Puffer resuspendiert (= Membran-Fraktion). Die Proteinkonzentrationen beider Fraktionen wurden mit BCA (*Bicinchoninic acid*, Fa. Pierce) und bovines Serumalbumin (BSA) als Standard nach Protokoll des Herstellers bestimmt.

IV.2.8. Western Blot

Die Western Blot Analyse mit α -Strep-Tactin-HRP (*horse-radish peroxidase*) wurde gemäß des Protokolls des Herstellers (Fa. IBA) durchgeführt. Der Nachweis von LiaH geschah mit α -LiaH (1:5000) als Primär- und α -Rabbit-HRP (1:7500) als Sekundär-Antikörper nach der Beschreibung von (Jordan *et al.*, 2007). Die Chemilumineszenz-Reaktion mit AceGlow® als Substrat wurde in einem Lumi-Imager detektiert (Fa. Peqlab).

IV.2.9. Bacterial-Two-Hybrid-Analyse (BACTH)

Die BACTH-Analyse ist eine weitere Methode, um potentielle Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen und wurde nach der Beschreibung von (Karimova *et al.*, 1998) durchgeführt. Hierfür wurde *E. coli* BTH101 mit zwei Plasmiden, die jeweils das Fragment T18 oder T25 besitzen, kotransformiert und auf Agar-Platten mit Kanamycin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), Ampicillin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), X-Gal (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) und IPTG (0,5 mM) gespottet. Anschließend wurden die Platten für 40 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurde die

Farbe der Kolonien überprüft und mit Kontroll-Kolonien verglichen. Blaue Kolonien sind eine Indikation für Protein-Protein-Interaktionen. Weiße Kolonien bedeuten, dass keine Interaktion vorliegt.

IV.2.10. Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie wurde angewandt, um die zelluläre Lokalisation von Proteinen zu bestimmen, sowie Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Dabei wurden zunächst Übernachtskulturen in LB-Medium mit Selektion und Xylose (0,05% w/v Endkonzentration) angezogen. Am folgenden Tag wurden diese Kulturen zu einer $OD_{600} = 0,01-0,05$ erneut in LB-Medium inokuliert und bei 30°C kultiviert. Die Expression von GFP und/oder RFP wurde wiederum durch Zugabe von 0,05% Xylose induziert. Nach Eintritt der Kulturen in die exponentielle Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3-0,6$), sowie nach Erreichen der stationären Phase ($OD_{600} = 1,7-2,0$) wurden Proben entnommen. Um die Expression von in den *lia*-Lokus endogen rekombinierten GFP/RFP zu induzieren, wurden die Kulturen auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt, 1 ml dieser Verdünnung abzentrifugiert und das Pellet schließlich in LB-Medium mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$ Endkonzentration) resuspendiert und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bei 30°C kultiviert. Danach wurden auch hier Proben für die mikroskopische Untersuchung genommen. Alle Proben wurden auf mit 1,2 % (w/v) Agarose überzogenen Objektträgern immobilisiert und anschließend mikroskopiert. Der Farbstoff FM4-64 ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$ Endkonzentration) wurde genutzt, um die Zellmembranen der mikroskopierten Zellen anzufärben. Alle mikroskopischen Bilder wurden in einer TIRFM (*total internal reflection fluorescence microscopy*) Vorrichtung (Fa. Till Photonics), bestehend aus einem vollautomatisierten iMIC-Gestell mit einer klimatisierten Kontrollkammer und einem 1.45 NA 100 X Objektiv (Fa. Olympus), von einer DU-897 EM CCD Kamera (Fa. AndoriXON) aufgenommen. Als Lichtquellen dienten DPSS Laser mit einer 75 mW Leistung und einer Wellenlänge von 488 nm (*Coherent Sapphire*) bzw. 561 nm (*Cobalt Jive*). Die Erfassung der Bildaufnahmen wurde durch die *Life-Acquisition* Software (Fa. Till Photonics) kontrolliert. Für die Aufnahme von zweifarbigem (GFP/RFP) TIRFM Bildern wurde ein Doppel-Farben-Filter benutzt. Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software Metamorph v7.1.2 (Fa. Molecular Devices) bearbeitet und ausgewertet. Die Quantifizierung der Anzahl bestimmter Protein-Foci wurde mittels des Programms ImageJ 1.43 (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) durchgeführt. Alle mikroskopischen Untersuchungen

und Aufnahmen, die im Ergebnissteil dieses Kapitels gezeigt werden, wurden von Julia Domínguez-Escobar, AG Wedlich-Söldner, in Kooperation durchgeführt.

IV.2.11. Vergleichende genomische Analysen

Die Analyse von Proteinsequenzen wurde mittels der Datenbanken SMART (Schultz *et al.*, 1998) und *MicrobesOnline* <http://www.microbesonline.org/> (Alm *et al.*, 2005) durchgeführt. Vorhersagen zur Sekundär-, sowie Tertiärstruktur von LiaG konnten durch die Nutzung der JPred3 Datenbank <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/> (Cole *et al.*, 2008) und der SMURF (*structural motifs using random fields*) Software gemacht werden (Menke *et al.*, 2010).

IV.3. Ergebnisse

VI.3.1. LiaI ist ein kleines Membranprotein

Nachdem bereits bekannt war, dass die Gene *liaIH* als Operon transkribiert werden, jedoch bisher nur LiaH biochemisch und strukturell näher untersucht wurde, sollte nun im Rahmen dieser Arbeit zunächst LiaI näher analysiert werden. Eine erste Analyse von LiaI in SMART ergab, dass es sich um ein Membranprotein mit zwei Transmembranhelices handelt. Um diese Vorhersage zu bestätigen, wurde eine topologische Analyse des Proteins durchgeführt. Zunächst wurde *liaI* in zwei unterschiedlich großen Fragmenten per PCR amplifiziert (1.Fragment: 1-338 bp (Volllänge), 2.Fragment: 1-126 bp). Diese Fragmente wurden anschließend mit *phoA* (Vektor pAH-4) und *lacZ* (Vektor pAC7 + P_{veg}) fusioniert (Abb.IV.1).

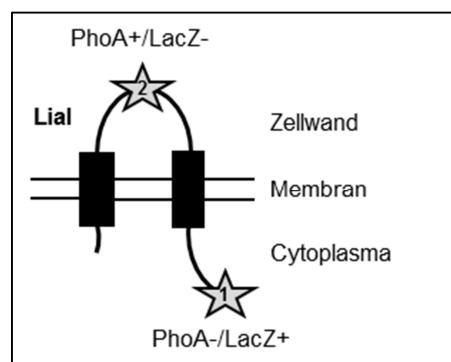


Abb.IV.1: Topologie von LiaI. Amplifikate zwei unterschiedlicher Längen (hervorgehoben durch Sterne) wurden mit *phoA* und *lacZ* fusioniert. PhoA-Aktivität (PhoA+/LacZ-), die durch blaue Kolonien auf BCIP-Platten gekennzeichnet ist, bedeutet, dass das Fragment-Ende extrazellulär lokalisiert ist. LacZ-Aktivität (PhoA-/LacZ+), die durch blaue Kolonien auf X-Gal-Platten gekennzeichnet ist, bedeutet, dass das Fragment-Ende im intrazellulären Raum liegt. Schematische Darstellung von Zellmembran, Intra- und Extrazellulären Raum. Transmembranhelices von LiaI (schwarze Balken).

Wurden *E. coli* CC118 Klone, die die *phoA*-Fusionen trugen auf Agar-Platten mit BCIP (50 µg ml⁻¹ Endkonzentration) ausgestrichen, so zeigten sich blaue Kolonien für die Klone mit dem kurzen *liaI*-Fragment (1-126 bp, Fusionspunkt 2, Abb.IV.1 + Anhang, Abb.A1(A)). Die Blaufärbung der Kolonien deutet auf PhoA-Aktivität hin und somit kann geschlussfolgert werden, dass sich das Ende des *liaI*-Fragments außerhalb der Zelle befindet. Die Klone mit dem Vollständigprodukt von *liaI* (1-338 bp, Fusionspunkt 1, Abb.IV.1) blieben auf BCIP-Agar-Platten weiß. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass PhoA nicht aktiv ist und dass sich der C-Terminus von LiaI im Cytoplasma befindet. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse mit *B. subtilis* W168, der die *lacZ*-Fusionen enthielt, bestätigte die Beobachtungen. Da LacZ intrazellulär aktiv ist, konnten nun blaue Kolonien mit Klonen, die das Vollständig-Fusionsprodukt von *liaI* enthielten, auf X-Gal-Agarplatten beobachtet werden. Weiße Kolonien zeigten sich mit Klonen, bei denen das kurze *liaI*-Fragment an *lacZ* fusioniert war. Abschließend kann durch diese Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass sich der N- und C- Terminus von LiaI im Cytoplasma befindet und beide Transmembranhelices durch einen extrazellulären Loop miteinander verbunden sind. Des Weiteren ist die cytoplasmatische Lokalisation des N- und C-Terminus eine ideale Voraussetzung für Interaktionen mit potentiellen Zielproteinen, z.B. LiaH.

IV.3.2. Zelluläre Lokalisation von LiaI und LiaH in *B. subtilis*

Da es sich bei LiaI um ein kleines Membranprotein handelt und LiaH ein cytoplasmatisches Protein ist, lag die Vermutung nahe, dass beide Proteine miteinander interagieren könnten und dass LiaI dabei als Membran-Anker für LiaH fungiert. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde zunächst die zelluläre Lokalisation beider Proteine aufgeklärt. Dafür wurden LiaI und LiaH durch endogene Rekombination am C-Terminus mit GFP fusioniert (Tabelle IV.1), so dass die Expression beider Gene weiterhin durch den *lia*-Promoter kontrolliert und mittels Bacitracin induziert werden konnte. Zunächst wurden exponentiell wachsende Kulturen der Stämme TMB1328 (LiaH-GFP) und TMB1421 (LiaI-GFP) unter nicht-induzierenden Bedingungen untersucht (Abb.IV.2A).

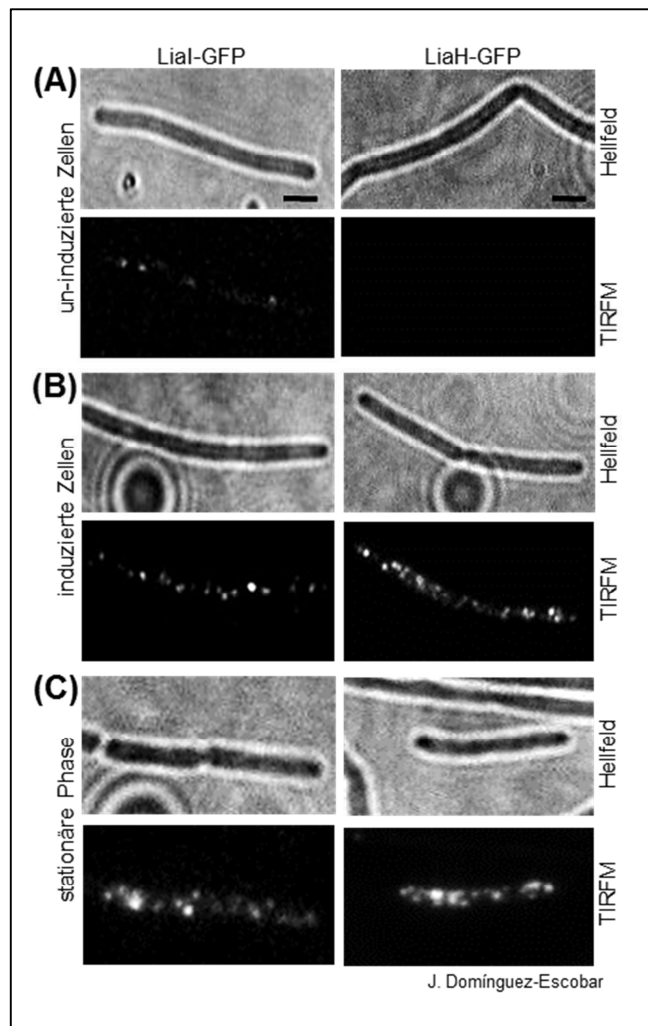


Abb.IV.2: Zelluläre Lokalisation von LiaI-GFP (TMB1421) und LiaH-GFP (TMB1328) in *B. subtilis*. (A) Uninduzierte Zellen in exponentieller Wachstumsphase. (B) Mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) induzierte Zellen in exponentieller Wachstumsphase. (C) Zellen in stationärer Phase. Hellfeld-Aufnahmen in oberer Reihe, TIRFM-Aufnahmen jeweils darunter. Maßstab: $2 \mu\text{m}$

In TIRFM-Aufnahmen zeigt sich, dass in uninduzierten Zellen bereits eine geringe Menge von LiaI-GFP in der Membran von *B. subtilis* lokalisiert ist (Abb.IV.2A). Mittels mikroskopischer *Time lapse*-Aufnahmen ließ sich gleichzeitig auch eine Bewegung dieser Proteine entlang der Membran beobachten. Im Gegensatz dazu war LiaH-GFP in uninduzierten Zellen nicht zu sehen. Nachdem exponentiell wachsende Zellen mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) induziert wurden sind, nahm die Menge von LiaI- und LiaH-GFP in den Zellen zu (Abb.IV.2B). Dies war zu erwarten, denn es ist bekannt, dass Bacitracin ein starker Induktor des Lia-Systems ist. LiaI-GFP konnte hierbei wiederum in der Zellmembran lokalisiert werden (Abb.IV.2B). LiaH-GFP hingegen zeigte in induzierten Zellen eine Lokalisationsänderung. Es konnte beobachtet werden, wie zunächst cytoplasmatisch lokalisiertes LiaH-GFP wenig später an der Zellmembran lokalisiert. Ein ähnliches Bild zeigte sich in Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden.

In dieser Phase ist das Lia-System ohne einen äußeren künstlichen Reiz induziert (Jordan *et al.*, 2007). Die Menge an exprimiertem LiaI- und LiaH-GFP war mit der Menge in induzierten Zellen vergleichbar und beide Proteine ließen sich in der Membran (LiaI-GFP), sowie an die Membran assoziiert (LiaH-GFP) detektieren (Abb.IV.2C).

IV.3.3. Dynamik von LiaH unter induzierenden Bedingungen

Die schon anfänglich beobachtete Lokalisationsänderung von LiaH-GFP in *B. subtilis* Zellen, die mit Bacitracin induziert wurden, sollte nun mittels *Time lapse*-Mikroskopie detaillierter untersucht werden. Hierbei wurde eine exponentiell wachsende Kultur (TMB1328), der zuvor eine Probe entnommen wurde, mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) induziert. Anschließend wurden nach 3, 7, 15 und 30 Minuten Proben entnommen und mikroskopisch untersucht. Die uninduzierte Probe wurde auch mikroskopiert und diente als Negativkontrolle. Die Ergebnisse der TIRFM-Analyse sind in Abbildung IV.3 dargestellt.

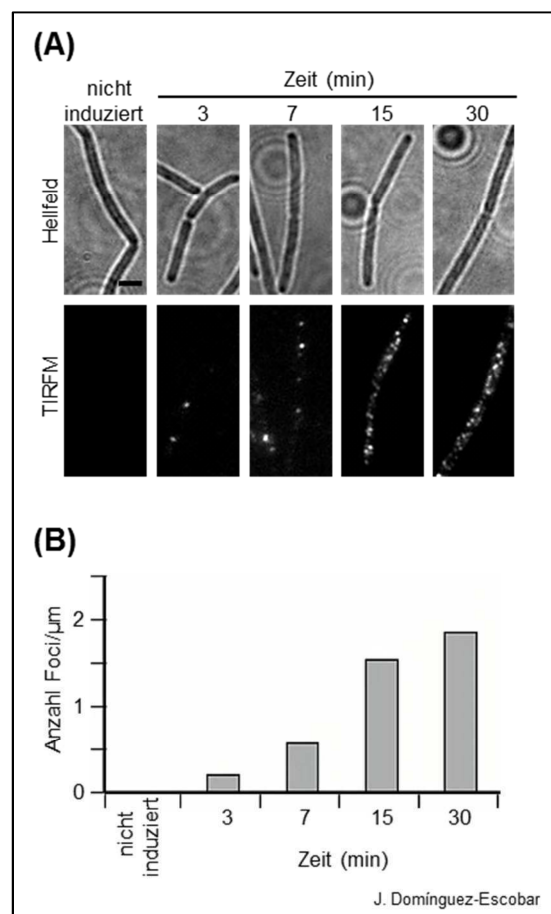


Abb.IV.3: Dynamik von LiaH-GFP nach Induktion mit Bacitracin. **(A)** *Time lapse*-Mikroskopie von *B. subtilis* Zellen (TMB1328) im uninduzierten und im mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) induzierten Zustand. Hellfeld-Aufnahmen in der oberen Reihe, TIRFM-Aufnahmen darunter. Maßstab: $2 \mu\text{m}$. **(B)** Anzahl der LiaH-GFP Foci pro μm zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Zelle.

Drei Minuten nach der Induktion mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) konnte LiaH-GFP in geringer Menge sowohl als mobile Foci im Cytoplasma, als auch als feststehende Foci an die Membran assoziiert beobachtet werden. Die Anzahl der LiaH-GFP Foci nahm mit der Zeit nach Zugabe von Bacitracin stetig zu (Abb.IV.3B). Nach 15 Minuten war die Zellmembran vollständig mit LiaH-GFP überzogen, wobei immer noch flottierendes LiaH-GFP im Cytoplasma beobachtet werden konnte (Abb.IV.3A). Eine vollständige Immobilität der zuvor noch mobilen LiaH-GFP Foci konnte nach 30 Minuten festgestellt werden (Abb.IV.3A). Alle beobachteten LiaH-GFP Foci befanden sich nun feststehend an der Membran assoziiert.

Zusammenfassend geben diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass LiaH unter Stress oder bei natürlicher Induktion des Lia-Systems aus dem Cytoplasma heraus an die Membran assoziiert wird, um mit potentiellen Interaktionspartnern interagieren zu können. Es liegt außerdem die Vermutung nahe, dass LiaH durch LiaI an der Membran in *B. subtilis* verankert wird.

IV.3.4. LiaH interagiert mit LiaI

Die oben beschriebenen Experimente weisen darauf hin, dass LiaI mit LiaH interagieren könnte. Aus diesem Grund sollte dies im Nachfolgenden näher untersucht werden. Zunächst wurde eine LiaI-LiaH-Proteininteraktion mittels *Bacterial-Two-Hybrid*-Analyse (BACTH) getestet. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle IV.4). Des Weiteren sind im Anhang photographische Aufnahmen der BACTH-Kolonien zu finden (Abb.A2). Die *E. coli* BTH Klone, die mit *liaI* und *liaH* kotransformiert wurden, wuchsen als blaue gefärbte Kolonien auf BACTH-Agarplatten (Abb.A2), die in ihrer Farbintensität stark der Positivkontrolle ähnelten. Somit konnte festgestellt werden, dass LiaI und LiaH miteinander interagieren (Tabelle IV.4). Es wurde außerdem untersucht, ob LiaI mit sich selbst interagiert und wie das Interaktionsverhalten zwischen LiaI und LiaH geprägt ist, wenn der cytoplasmatische C-Terminus von LiaI entfernt wird (LiaI-TM).

Tabelle IV.4: BACTH-Analyse zur LiaI-LiaH-Interaktion

		pUT18 oder pUT18C		
		LiaI	LiaI-TM	LiaH
pKT25 oder pKT25N	LiaI	+	+	+
	LiaI-TM	+	+	-
	LiaH	+	-	-

Interaktion (+), keine Interaktion (-)

LiaI interagiert dabei sowohl mit sich selbst, als auch mit LiaI ohne C-Terminus (Tabelle IV.4 + Abb.A2). Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Interaktion von LiaI mit LiaI wahrscheinlich über die Transmembrandomänen der Proteine stattfindet. Die Interaktion der Transmembrandomänen von LiaI konnte mittels BACTH-Analyse bestätigt werden. Überraschenderweise zeigte sich, dass verkürztes LiaI (ohne C-Terminus) nicht mehr in der Lage ist mit LiaH zu interagieren (Tabelle IV.4 + Abb.A2). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass der im Cytoplasma befindliche C-Terminus von LiaI essentiell für die Interaktion mit LiaH ist (Tabelle IV.4). Entgegen der Beobachtung, dass LiaH große Proteinkomplexe bildet (siehe Kapitel II), was letztlich eine LiaH-Selbstinteraktion voraussetzt, konnte im BACTH keine direkte Interaktion von LiaH mit sich selbst beobachtet werden. Die Ursache dafür ist nicht eindeutig erklärbar, denn es ist bereits für das Phagenschock-Protein A (PspA) in *E.coli* gezeigt worden, dass dieses Protein im BACTH mit sich selbst interagiert und auch, ähnlich wie LiaH, große Proteinkomplexe bildet (Hankamer *et al.*, 2004, Jovanovic *et al.*, 2009).

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion zwischen LiaI und LiaH näher untersucht. Zunächst sollte diese Interaktion *in vitro* mittels SPINE mit dem *Crosslinker* Formaldehyd überprüft werden. Dazu wurde der Stamm TMB688 (Tabelle IV.1) in LB-Medium mit Selektion und Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 1,0$ angezogen. Der Kontrollstamm TMB841 (Tabelle IV.1) wurde auch in LB-Medium mit Selektion, aber ohne Bacitracin bei gleichen Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten OD_{600} , wurde Formaldehyd (0,6 % v/v) zugegeben und die Kulturen nochmals 20 min geschüttelt. Danach wurden die Zellen geerntet, in Zellaufschluss-Puffer gewaschen, per Ultraschall aufgebrochen und über eine mit Strep-Tactin® Sepharose (Fa. IBA) beladene Säule aufgereinigt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus ausgewählten Aufreinigungsfractionen schloss sich die Analyse per Western-Blot an. Ein spezifischer StrepII-Tag Antikörper, der bereits mit HRP gekoppelt vorlag (Fa. IBA), wurde zur Detektion von LiaI-StrepII eingesetzt. Für die Analyse von LiaH wurde Anti-LiaH-Primärantikörper und ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper genutzt.

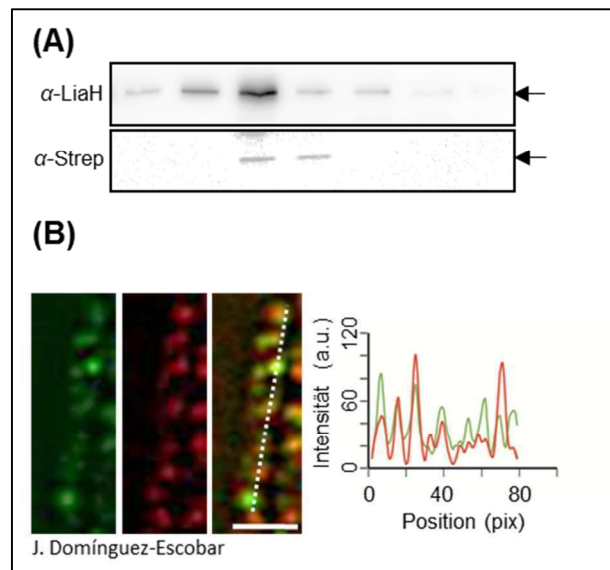


Abb.IV.4: Interaktion und Kolokalisierung von LiaI und LiaH. **(A)** Western Blot Analyse der Proteine aus Elutionsfraktionen nach Protein-Aufreinigung aus dem Stamm TMB688. LiaH wurde mit LiaH-Antikörper (1:5000) nachgewiesen. StrepII-markiertes LiaI wurde mit spezifischen StrepII Antikörper detektiert. **(B)** Kolokalisierung von LiaH-mRFP/LiaI-GFP (TMB1441). Kolokalisationsanalyse erfolgte anhand eingetragener Linie (gestrichelt). Maßstab: 2 μm

Abbildung IV.4A zeigt die Ergebnisse des Western Blots für den Stamm TMB688. Sowohl LiaH als auch StrepII-markiertes LiaI konnte in den Elutionsfraktionen der vorher durchgeführten Protein-Aufreinigung von TMB688 mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb.IV.4A). In der Western Blot Analyse des Kontrollstamms TMB841 ließen sich weder LiaH noch ein StrepII-Tag nachweisen. Ein Nachweis des StrepII-Tag im Kontrollstamm ist sehr schwierig, da das Protein sehr klein ist und dadurch wahrscheinlich schon während der Elektrophorese aus dem Gel gelaufen ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die schon im BACTH beobachtete Interaktion zwischen LiaI und LiaH durch SPINE und anschließenden Western Blot bestätigt werden konnte.

Begründet darin, dass *liaI* und *liaH* unter Induktion des *lia*-Promoters exprimiert und translatiert werden sowie erste mikroskopische Analysen vermuten lassen, dass LiaH unter P_{liaI} -induzierenden Bedingungen aus dem Cytoplasma heraus an die Membran assoziiert wird, wurde im nächsten Schritt die Möglichkeit der Kolokalisation beider Proteine in *B. subtilis* Zellen untersucht. Für diese Untersuchung wurde der Stamm TMB1441 konstruiert, bei dem LiaI-GFP in den *amyE*-Lokus integriert ist und durch P_{xyI} kontrolliert wird. Des Weiteren enthält dieser Stamm ebenfalls LiaH-RFP, das endogen in den *lia*-Lokus rekombiniert wurde und unter der Kontrolle von P_{liaI} steht. Somit konnte die Expression beider Fusionsproteine (LiaI-GFP und LiaH-RFP) durch die Zugabe von Xylose (0,05% w/v) und Bacitracin (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) induziert werden. Unter induzierenden

Bedingungen wurden mittels eines Doppelfilters beide Proteine in einer Einzelzelle als feststehende membran-assoziierte Foci beobachtet (Abb.IV.4B). Bei Überlagerung beider Bilder zeigte sich eine klare Kolokalisation von LiaI und LiaH (Abb.IV.4B). Mittels eines *line scan* (gestrichelte Linie) kann anschließend eine genauere graphische Analyse durchgeführt werden (Abb.IV.4B-Graphik). Diese Analyse ergab eine gute aber nicht vollständige Überlagerung beider Proteine. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass nach der Induktion von P_{liaI} mit Bacitracin nicht nur LiaH-RFP gebildet wird, sondern auch LiaI ohne *Tag*. Unmarkiertes LiaI ist natürlich genau wie LiaI-GFP in der Lage mit LiaH-RFP zu interagieren und zu kolokalisieren. Eine vollständig übereinstimmende Kolokalisation zwischen LiaI und LiaH war deshalb nicht möglich, da es sich um „Protein-Mischungen“ handelt, die aus LiaH-RFP + LiaI-GFP und LiaH-RFP + LiaI bestehen. Des Weiteren ist ebenso möglich, dass LiaH an der Membran nicht nur mit LiaI, sondern noch mit weiteren unbekannt Proteinen interagiert. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aber eindeutig, dass LiaI und LiaH an der Zellmembran kolokalisieren und durch Interaktion einen Proteinkomplex bilden (Abb.IV.4B).

IV.3.5. Die Membran-Lokalisierung von LiaH ist zum größten Teil LiaI-abhängig

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob LiaI essentiell für die Assoziation von LiaH an die Zellmembran ist. Dies wurde zunächst mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden der Wildtyp W168 und der Stamm TMB1407 (markerlose $\Delta liaI$ Deletion) in LB-Medium unter nicht induzierenden und induzierenden (Bacitracin $20 \mu\text{g ml}^{-1}$) Bedingungen angezogen. Anschließend wurde eine Zell-Fraktionierung durchgeführt, bei der das Cytoplasma- und das Membran-Proteom beider Stämme präpariert wurden. Nach Bestimmung der Protein-Konzentration beider Fraktionen wurden anschließend jeweils 30 mg Protein pro Protein-Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt. Danach schlossen sich Western Blots mit LiaH-Antikörper an. Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung IV.5A zu sehen. In uninduzierten Zellen ließ sich LiaH weder im Cytoplasma noch in der Membran detektieren. Dies wurde erwartet, da das Lia-System nicht induziert war und LiaH somit nicht exprimiert wurde (Abb.IV.5A). In den Zellen, die mit Bacitracin induziert wurden, ist das Lia-System aktiviert. Dies konnte anhand des Nachweises von LiaH sowohl in der Cytoplasma- wie auch in der Membran-Fraktion der Zellen gezeigt werden. Wurden jedoch die Intensitäten der LiaH-Banden zwischen Wildtyp und $\Delta liaI$ -Mutante verglichen, zeigten sich deutliche Unterschiede (Abb.IV.5A). Im Wildtyp befand sich die Hauptmenge von LiaH in der Membran-Fraktion. Ein geringer Teil von LiaH ist

im Cytoplasma detektiert worden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den mikroskopischen Resultaten im Abschnitt IV.3.3. Hier wurde beobachtet, dass LiaH unter induzierenden Bedingungen seine Lokalisation vom Cytoplasma an die Membran verändert.

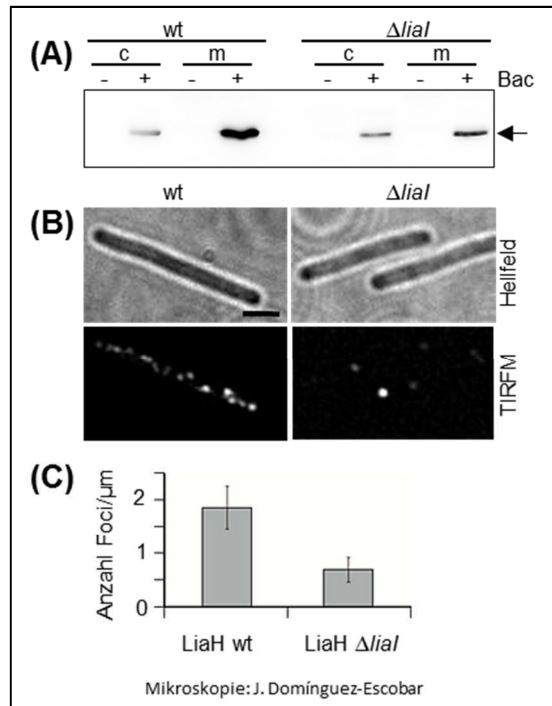


Abb.IV.5: Lokalisation von LiaH an der Zellmembran ist LiaI-abhängig. (A) Western Blot mit LiaH-Antikörper. Analysiert wurden Cytoplasma (c)- und Membran (m)-Proteom aus uninduzierten (-) und mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) induzierte Zellen (+) des Wildtyp W168 und einer $\Delta liaI$ -Mutante (TMB1394). (B) Lokalisierung von LiaH-GFP im Wildtyp (TMB1328) und in einer $\Delta liaI$ -Mutante (TMB1407). Mikroskopische Hellfeld-Aufnahmen in oberer Reihe, TIRFM-Aufnahmen darunter. Maßstab: 2 μm . (C) Quantifizierung der Anzahl der LiaH-GFP Foci im Wildtyp (W168) und einer $\Delta liaI$ -Mutante (TMB1407)

Des Weiteren war in einer $\Delta liaI$ -Mutante eine starke Abnahme der Menge an LiaH in der Membran zu beobachten (vgl. Membran-Fraktion W168 und $\Delta liaI$, Abb.IV.5A). In der Mutante schien außerdem mehr cytoplasmatisches LiaH vorhanden zu sein. Um diese Ergebnisse zu reproduzieren, erfolgten mikroskopische Untersuchungen der zellulären Lokalisation von LiaH, sowie eine Quantifizierung der Anzahl von LiaH Foci unter induzierenden Bedingungen im Wildtyp und einer $\Delta liaI$ -Mutante (Abb.IV.5B+C). Mittels TIRFM konnte beobachtet werden, dass die Lokalisation von LiaH an der Membran in einer $\Delta liaI$ -Mutante unter induzierenden Bedingungen drastisch verringert ist (Abb.IV.5B). Auch die Anzahl der LiaH-Foci in der Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp um das Zweifache gesunken, $1,9 \text{ Foci } \mu\text{m}^{-1}$ im Wildtyp und $0,7 \text{ Foci } \mu\text{m}^{-1}$ in der $\Delta liaI$ -Mutante (Abb.IV.5C). Es scheint, als sei die Stabilität von LiaH-Proteinen oder die Translation von *liaH*-mRNA durch eine Deletion von *liaI* deutlich beeinträchtigt. Diese Vermutung müsste

aber durch weitere Experimente belegt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verminderte Menge von LiaH in der Membran der Mutante eindeutig durch den fehlenden „Membran-Anker“ LiaI begründet ist. LiaI scheint unter Zellhüllstress-Bedingungen ein wichtiger Interaktionspartner und „Richtungsgeber“ für LiaH zu sein. Da LiaH unter induzierenden Bedingungen letztlich dennoch in der Membran (Western Blot/TIRFM) detektiert werden kann, lässt darauf schließen, dass LiaI nicht der einzige Interaktionspartner von LiaH an der Membran ist.

IV.3.6. Identifizierung weiterer funktionell relevanter potentieller LiaH-Interaktionspartner

Nachdem gezeigt werden konnte, dass LiaI und LiaH nach stressbedingter Induktion des Lia-Lokus an der Zellmembran interagieren und kolokalisieren, sollte nun die zelluläre Funktion von LiaH untersucht werden. Die Transkription von *liaH* nach der Induktion von P_{liaI} durch Zellhüllstress-verursachende Substanzen, sowie die, wenn auch schwach ausgeprägte, Sensitivität einer $\Delta liaH$ -Mutante gegenüber einigen Antibiotika (z.B. Daptomycin) und oxidativen Stress-auslösenden Stoffen (z.B. Menadion, Natrium-Selenit), lässt vermuten, dass LiaH eine Zellhüll-stabilisierende Funktion ausübt.

Da durch vorhergehende Analysen auch bekannt war, dass die Assoziation von LiaH an die Zellmembran in *B. subtilis* nicht gänzlich von LiaI abhängig ist, wurde im nächsten Schritt nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern von LiaH gesucht. Zur Unterstützung der Suche nach Interaktionspartnern wurde das intensiv erforschte Psp-System aus *E. coli* herangezogen. Da das Psp- und das Lia-System teilweise in ihrem Induktorenspektrum, z.B. osmotischer Stress, Sekretionsstress, Phagen-Infektion überlappen, wird angenommen, dass beide Systeme eine ähnliche zelluläre Funktion besitzen könnten. Ein Unterschied zwischen Psp-System in *E. coli* und Lia-Lokus in *B. subtilis* liegt jedoch darin, dass im Lia-Lokus, neben LiaH, keine weiteren Phagenschock-Homologe kodiert sind. Somit wurde auf der Suche nach der Funktion von LiaH, zunächst eine detaillierte vergleichende Analyse des Genoms von *B. subtilis* vorgenommen, bei der nach weiteren Phagenschock-Homologen gesucht wurde. Durch Analyse des *B. subtilis* Genoms mittels der *MicrobesOnline* Datenbank wurde, neben dem schon bekannten Paralog von LiaH, PspA (schwarz unterlegte Gene, Abb.IV.6), ein weiteres Phagenschock-Homolog gefunden. Es handelt sich dabei um das PspC-Homolog YvIC (grau unterlegte Gene, Abb.IV.6). YvIC ist im *yvIABCD*-Operon kodiert. Dieses Operon enthält bemerkenswerterweise auch noch ein Paralog von LiaG, YvIB (gestreifte Gene, Abb.IV.6). Über die Funktion der im *yvI*-Operon kodierten Gene ist nichts bekannt.

Proteinsequenzanalysen der Yvl-Proteine in SMART ergaben, dass es sich bei YvlA, YvlC und YvlD um Membranproteine handelt und YvlB ein cytoplasmatisches Protein ist. Hervorzuheben ist allerdings, dass das *yvl*-Operon, genau wie *pspA* in *B. subtilis* unter der Kontrolle des ECF σ^W steht (grün hervorgehobene Gene, Abb.IV.6) (Cao *et al.*, 2002a, Wiegert *et al.*, 2001). σ^W ist, genau wie das Lia-System, Bestandteil der Zellhüllstressantwort in *B. subtilis* und wird beispielsweise durch alkalischen Schock (NaOH), Detergenzien oder das Antibiotikum Vancomycin induziert (siehe Abschnitt I.4.) (Mascher *et al.*, 2003, Wiegert *et al.*, 2001, Kingston *et al.*, 2011). Alle identifizierten Proteine in *B. subtilis* wurden nachfolgend in einer umfangreichen BACTH-Analyse auf ihr Interaktionsverhalten getestet.

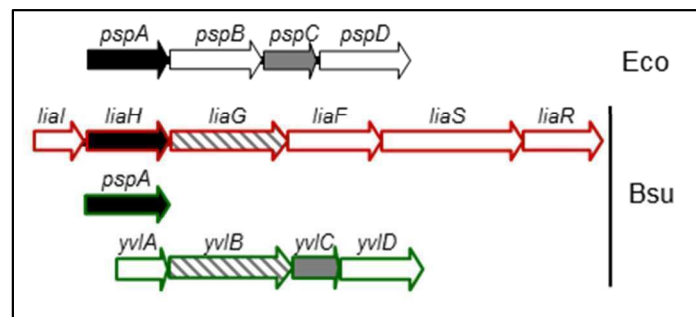


Abb.IV.6: Vergleichende genomische Analyse. Genetische Organisation des *psp*-Operons in *E. coli* (Eco), des *lia*-operons und *yvlABCD*-operons in *B. subtilis* (Bsu). PspA in *B. subtilis* ist als Einzelgen organisiert. Homologe von PspA sind schwarz hervorgehoben. PspC-Homologe sind grau hervorgehoben. Paraloge LiaG und YvlB sind gestreift gekennzeichnet. LiaR-abhängige Expression des *lia*-Operons (Rot umrahmt), ECF σ^W -abhängige Expression von *pspA* und *yvl*-Operon (Grün umrahmt).

Neben den schon genannten Proteinen wurden auch die Proteine YjoB, DnaK und HtpG in die BACTH-Analysen mit einbezogen. Dabei handelt es sich um eine Protease (YjoB) und zwei Chaperone (DnaK/HtpG), die aus folgenden Gründen ausgewählt worden sind. DnaK und HtpG sind Homologe von Hsp (*heat shock protein*)70 und Hsp90 aus *Arabidopsis thaliana*. Es ist beschrieben worden, dass Vipp1 (pflanzliches LiaH-Homolog) direkt mit beiden Chaperonen in den Chloroplasten von *A. thaliana* interagiert (Jouhet & Gray, 2009). Es wurde daher vermutet, dass DnaK und HtpG potentielle Interaktionspartner für LiaH darstellen könnten. Im Zuge einer Analyse aller ATPasen (AAA⁺-Proteine) in *B. subtilis* wurde YjoB, aufgrund seiner Homologie zu PspF, als möglicher Interaktionspartner von LiaH identifiziert (Diplomarbeit von D. Hoyer (Wolf), 2007). Die Expression von *yjoB* steht auch unter der Kontrolle von σ^W , jedoch ist über die zelluläre Funktion von YjoB wenig bekannt (Huang *et al.*, 1999, Wiegert *et al.*, 2001, Kotschwar *et al.*, 2004). Anhand der durchgeführten BACTH-Analyse (Photos der Platten, siehe

Abb.A2) konnte ein Protein-Protein-Interaktionsmodell erstellt werden, das in der Abbildung IV.7 dargestellt ist.

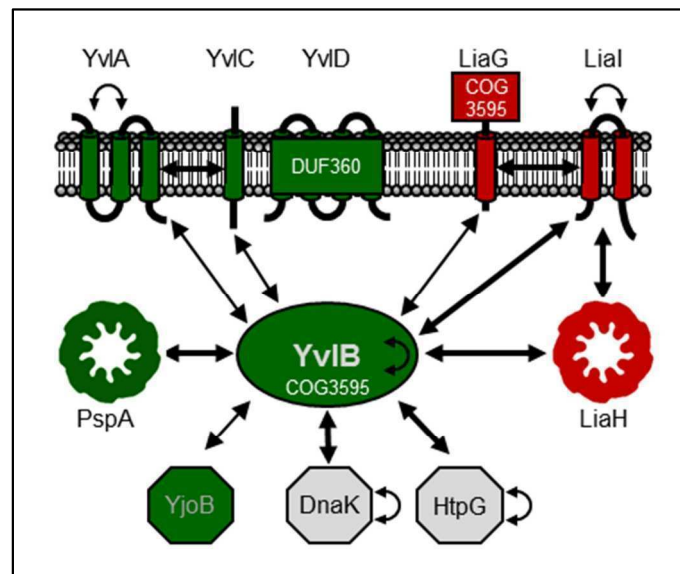


Abb.IV.7: Analyse potentieller Protein-Protein-Interaktionen durch BACTH. Modell zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Starke Interaktionen (dicke Pfeile), schwache Interaktionen (dünne Pfeile), „Selbst“-Interaktionen (gebogene Pfeile), σ^W -abhängige Expression (Grün), LiaR-abhängige Expression (Rot), Chaperone (Grau), COG3595 + DUF360 (Proteindomänen)

In diesem Modell hat YvIB eine Schlüsselposition inne, das u.a. mit beiden Phagenschock-Proteinen LiaH und PspA interagiert. Im Interaktionsmodell in Abb.IV.7 ist weiterhin zu erkennen, dass YvIB auch mit YjoB, DnaK, HtpG und dem PspC-Homolog YvIC interagiert. Diese Proteine galten als potentielle direkte Interaktionspartner für LiaH, jedoch interagieren diese Proteine hier nur über das „Vermittler-Protein“ YvIB mit LiaH. Somit scheint YvIB der Haupt-Interaktionspartner zwischen den Phagenschock-Proteinen und deren Zielproteinen zu sein (Abb.IV.7). Innerhalb der Proteine des *yvl*-Operons konnten Interaktionen zwischen YvIA, YvIB und YvIC nachgewiesen werden, wohingegen YvID mit keinem anderen in der BACTH-Analyse getesteten Protein interagiert (Abb.IV.7). Durch die Interaktion von LiaI mit YvIB kann spekuliert werden, dass LiaI unter Stressbedingungen hier auch als Membrananker fungieren könnte. Auch lässt sich anhand des Modells erkennen, dass YvIB das Verbindungsprotein zwischen LiaR-abhängiger und σ^W -abhängiger Zellhüllstressantwort in *B. subtilis* zu sein scheint. Dies wird zusätzlich noch durch die Interaktion von YvIB und LiaG untermauert (Abb.IV.7).

Die Interaktion zwischen LiaH und YvIB konnte auch *in vitro* mittels SPINE verifiziert werden. Hierzu wurde der Stamm TMB1395 (pDG148Stu-*yvlB*) in LB-Medium mit Selektion und dem Induktoren Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) und IPTG (0,5 mM) angezogen. Der

Kontrollstamm TMB143 (pDG148Stu-Leervektor) wurde unter gleichen Bedingungen, ohne Bacitracin angezogen. Nachdem die Kulturen eine $OD_{600} = 1,0$ erreicht hatten, wurde Formaldehyd als *Crosslinker* (0,6 % v/v) dazugegeben und die Kulturen für weitere 20 min inkubiert. Danach schloss sich eine Aufreinigung und Analyse der Proteine der Kulturen mit Strep-Tactin®Sephrose (Fa. IBA) an, die wie unter Abschnitt IV.2.4 beschrieben wurde. In Abbildung IV.8 ist der Western Blot der Elutionsfraktionen von TMB1395 dargestellt. Wie in Abb.IV.8 zu sehen, konnte im Western Blot mit geeigneten Antikörpern sowohl LiaH als auch StrepII-YvIB nachgewiesen werden. Da aber im Western Blot mit StrepII-HRP-Antikörper neben der Bande, die als StrepII-YvIB identifiziert wurde, viele weitere unspezifische Banden zu sehen waren, sollte die mögliche Interaktion zwischen LiaH und YvIB in naher Zukunft durch ein anderes Experiment (z.B. β -Galaktosidase-Assay der BACTH-*Spots*) verifiziert werden.

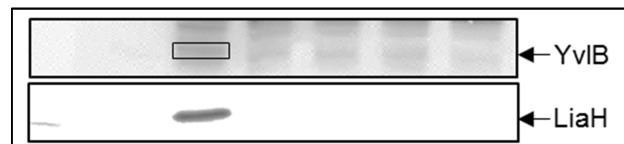


Abb.IV.8: Western Blot Analyse der Elutionsfraktionen nach Protein-Aufreinigung aus TMB1395. Anti-LiaH (Verdünnung 1:5000) diente zum Nachweis von LiaH. Strep-markiertes YvIB wurde mit StrepII-Tag-HRP gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Die YvIB Bande ist schwer erkennbar und deshalb durch einen Rahmen hervorgehoben.

Die beiden paralogen Proteinen LiaG und YvIB bestehen strukturell zum größten Teil aus der Domäne COG3595. In *B. subtilis* sind dies die einzigen Proteine, die solch eine Domäne tragen. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels soll deshalb die Struktur, das Interaktionsverhalten und die zelluläre Lokalisation von LiaG aufgeklärt, sowie eine mögliche Funktion von LiaG und YvIB erörtert werden.

IV.3.7. LiaG ist ein Membranprotein mit einem extrazellulären β -Propeller-Motiv

Das in Abb.IV.7 gezeigte Interaktionsnetzwerk lässt das funktionell unbekanntes Protein LiaG als einen weiteren wichtigen Interaktionspartner erscheinen, obwohl das Gen *liaG* außer in *B. subtilis* nur noch in *B. licheniformis* und *B. halodurans* konserviert ist (Jordan *et al.*, 2006). Eine Analyse von LiaG mittels der SMART Datenbank ergab, dass dieses Protein neben der C-terminalen COG3595-Domäne noch eine N-terminale Transmembran-Domäne besitzt. Zur Feststellung der Membrantopologie von LiaG, wurde *liaG* in drei unterschiedlichen Längen amplifiziert und mit *phoA* fusioniert (Plasmide pEG402 (1-50 bp), pEG401 (1-168 bp) und pJSc1616 (LiaG-Volllänge), Tabelle IV.3). *E. coli* CC118, der mit diesen Plasmiden transformiert und auf BCIP-Agarplatten ausgestrichen wurde,

zeigte nach Inkubation für alle drei Plasmide blaue Kolonien (photographische Aufnahme der Platte, siehe Anhang Abb.A1(B)). Dies bedeutet, dass der C-terminale Teil des Proteins inklusive der COG3595-Domäne im extrazellulären Raum lokalisiert ist (Abb.IV.9). Da eine Fusionierung der drei *liaG*-Fragmente an *lacZ* (Vektor pAC7) nicht gelang, wurden Kontrollstämme auf ihre PhoA-Aktivität hin untersucht, z.B. *E. coli* CC118 + pDW401 (*liaI*-lang) oder pDW402 (*liaI*-kurz), um falschpositive Ergebnisse für die PhoA-Fusionsplasmide auszuschließen (Tabelle IV.3 und Abschnitt IV.3.1). Bei gleichzeitigen Ausstreichen der *E. coli* CC118 mit den *liaG-phoA*-Konstrukten und der Kontrollstämme auf BCIP-Platten zeigte sich, wie erwartet eine Blaufärbung des „kurzen“ *liaI-phoA* Konstrukts (LiaI-Loop extrazellulär), sowie aller drei *liaG-phoA* Konstrukte. Kolonien mit dem „langen“ *liaI-phoA* Konstrukt blieben weiß.

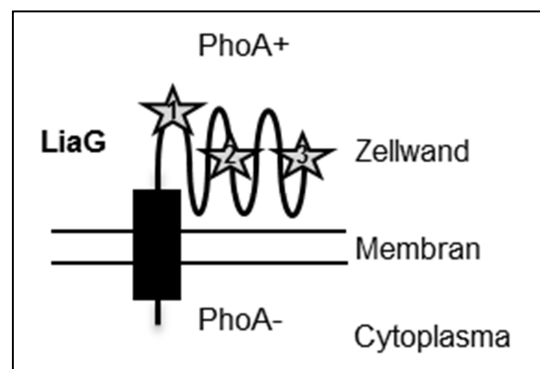


Abb.IV.9: Topologie von LiaG. LiaG-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden mit *phoA* fusioniert (Fusionspunkte: Sterne 1, 2 und 3). Der C-Terminus von LiaG liegt extrazellulär, begründet in PhoA-Aktivität (blaue Kolonien = PhoA+) auf BCIP-Agarplatten. Innerhalb der Zelle ist PhoA nicht aktiv (weiße Kolonien = PhoA-).

Nach Aufklärung der LiaG-Topologie wurde die zelluläre Lokalisation dieses Proteins mittels TIRFM untersucht. Da LiaG ein Membranprotein ist, das konstitutiv unter der Kontrolle von P_{liaG} exprimiert wird (Jordan *et al.*, 2006), wurde vermutet, dass LiaG in der Membran von *B. subtilis* sowohl unter uninduzierten, als auch unter Bacitracin-Induktion der Zellen mikroskopisch zu beobachten ist. Hierbei wurde zunächst RFP (mRFP_{pruby}) endogen an den C-Terminus von LiaG rekombiniert, wodurch der Stamm TMB 1439 (Tab.IV.1) generiert wurde. Anschließend wurde TMB1439 mikroskopisch untersucht. Hierzu wurden uninduzierte und induzierte (Bacitracin 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) exponentiell wachsende Kulturen, sowie Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, analysiert (Abb.IV.10).

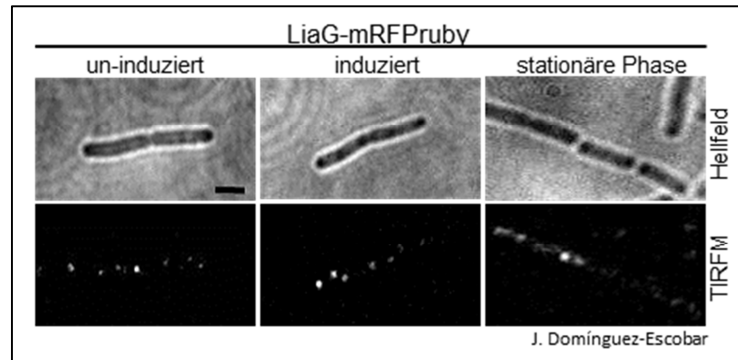


Abb.IV.10: Zelluläre Lokalisation von LiaG. Untersucht wurden uninduzierte und mit Bacitracin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) induzierte mid-logarithmische Zellen des Stamms TMB1439 (liaG-mRFPruby), sowie Zellen in der stationären Wachstumsphase. Hellfeld-Aufnahmen in oberer Reihe, TIRFM-Aufnahmen darunter. Maßstab: $2 \mu\text{m}$

In exponentiell wachsenden Zellen war LiaG-RFP in der Membran lokalisiert. Es wurden jedoch auch bewegliche LiaG-RFP Foci beobachtet. Diese Art der Lokalisierung von LiaG-RFP änderte sich weder bei Induktion der Zellen mit Bacitracin, noch in den Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden. Diese Ergebnisse wurden erwartet, da wie weiter oben schon genannt, LiaG Zellstress-unabhängig konstitutiv exprimiert wird. Um einen ersten Einblick in die Funktion von LiaG zu erhalten, wurde zunächst die bereits genannte COG3595-Domäne näher betrachtet.

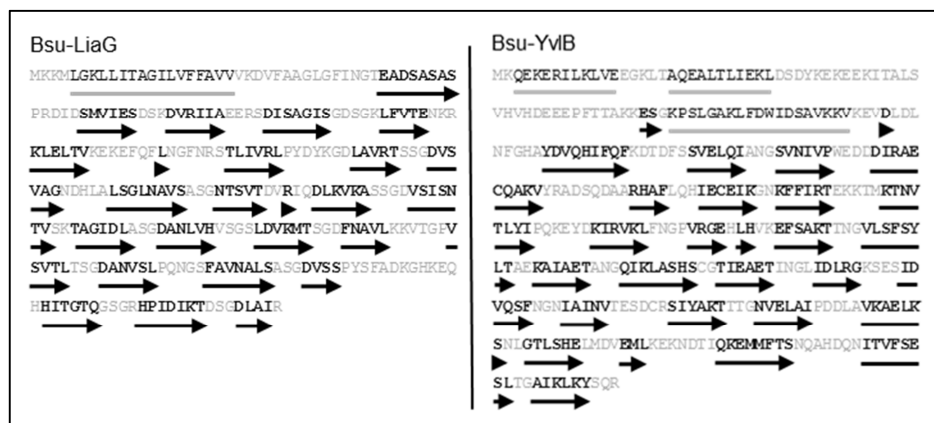


Abb.IV.11: Analyse der Sekundärstruktur von LiaG und YvlB in *B. subtilis* mittels der JPred3 Datenbank. Aminosäuren, die β -Faltblätter repräsentieren, sind schwarz/fett hervorgehoben und mit Pfeil unterstrichen. Sequenzen, die aus α -Helices bestehen, sind schwarz und grau unterstrichen.

Die Analyse der Sekundärstruktur von LiaG und dessen Paralog YvlB ergab, dass diese Domäne durch eine hohe Anzahl von β -Faltblättern gekennzeichnet ist (Abb.IV.11). Mittels der Software SMURF (Menke *et al.*, 2010) konnte ein β -Propeller-Motive identifiziert werden, das sich im Fall von LiaG außerhalb der Zelle befindet. Über die Funktion eines solchen Motives kann bisher allerdings nur spekuliert werden. Eine Vermutung besteht darin, dass β -Propeller-Motive in die zelluläre Signal-Transduktion

involviert sind oder an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Fülöp & Jones, 1999, Menke *et al.*, 2010). Es könnte sich bei LiaG um eine Art Sensorprotein handeln, welches Signale wahrnimmt und diese direkt an die potentiellen Zielproteine LiaI oder YvIB weiterleitet. Die Frage welche Domänen von LiaG an solchen postulierten Protein-Protein-Interaktionen teilhaben, konnte durch eine BACTH-Analyse geklärt werden. Hierzu wurde Vollängen-LiaG, die C-terminale COG-Domäne von LiaG (LiaG-COG), sowie nur die Transmembranhelix von LiaG (LiaG-TM) mit LiaH, LiaI und YvIB getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV.5, sowie als photographische Abbildung im Anhang (Abb.A2) dargestellt. Die BACTH-Analyse ergab, dass die Interaktion zwischen LiaI und LiaG, sowie zwischen YvIB und LiaG über die Transmembrandomäne von LiaG stattfindet (Tabelle IV.5). Auch die Transmembrandomäne von LiaI geht eine Interaktion mit YvIB ein. Die COG3595-Domäne von LiaG hingegen interagiert mit keinem der hier getesteten Proteine. Dieses Ergebnis ist jedoch schlüssig, denn bei der Untersuchung der Topologie von LiaG ergab sich, dass die COG-Domäne von LiaG im extrazellulären Raum lokalisiert ist.

Tabelle IV.5: BACTH-Analyse von LiaG und potentiellen Interaktionspartnern

		pUT18 oder pUT18C			
		LiaG	LiaI	LiaH	YvIB
pKT25 oder pKT25N	LiaG-TM	-	+	-	+
	LiaG-COG	-	-	-	-
	LiaI-TM	-	+	-	+

Interaktion (+), keine Interaktion (-)

Abschließend ergibt sich das Bild, dass unter Zellhüllstress LiaH in einem Komplex mit LiaI, LiaG und YvIB an der Zellmembran in *B. subtilis* funktional aktiv ist. Somit ist es auch möglich, dass LiaH bei einer Deletion von *liaI* unter Stressbedingungen durch Interaktion mit YvIB und LiaG an die Membran assoziiert wird. Letztlich sind aber noch weitere Untersuchungen nötig, die diese Vermutungen aufklären und so zu einer funktionalen Analyse von LiaH beitragen.

Rolle von LiaH in der Proteinsekretion und im Energistoffwechsel von *Bacillus subtilis*

V.1. Einleitung

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Gene *liaIH* die primären Zielgene des RR LiaR sind und nach Induktion des *lia*-Promotors stark exprimiert werden. Eine detaillierte phänotypische Analyse (Kapitel II) ließ darauf schließen, dass LiaI und LiaH eine Rolle im Schutz der Zellhülle (Zellwand und Zellmembran) vor Schäden durch verschiedene Antibiotika und oxidativen Stress-verursachende Substanzen innehaben. Detaillierte mikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass LiaI und LiaH unter Stressbedingungen und bei natürlicher Induktion des *lia*-Systems in der stationären Phase an der Zellmembran interagieren und kolokalisieren (Abschnitt IV.3.4). Des Weiteren ist die Lokalisation von LiaH im überwiegenden Maße von LiaI abhängig, denn es konnte auch gezeigt werden, dass die Menge von LiaH an der Zellmembran abnahm, wenn *liaI* deletiert wurde (Abschnitt IV.3.5). Da im Fall einer Deletion von *liaI*, LiaH dennoch in reduzierter Menge an die Membran assoziiert vorkam, wurde geschlossen, dass LiaI nicht der einzige Interaktionspartner für LiaH ist. Eine umfassende BACTH-Studie (Abschnitt IV.3.6), bei der potentielle LiaH-Interaktionspartner getestet wurden, ergab, dass LiaH Bestandteil eines Interaktionsnetzwerkes ist, in dem das LiaG-Paralog, YvIB, eine zentrale Rolle spielt. YvIB scheint das Verbindungsprotein zwischen LiaH und anderen Proteinen, z.B. Chaperone DnaK und HtpG zu sein. Eine zelluläre Funktion von LiaH konnte aus diesen vorangegangenen Untersuchungen allerdings nicht abgeleitet werden. Da LiaH zur Familie der Phagenschock-Proteine gehört, sollten Proteine aus Arbeiten an dieser Familie in anderen Organismen, z.B. *E. coli*, neue Ansätze anbieten, die Funktion von LiaH zu bestimmen.

So ist bereits bekannt, dass in *S. lividans* und *E. coli* die Überexpression von PspA zu einer Erhöhung der Proteinsekretion führt (DeLisa *et al.*, 2004, Vrancken *et al.*, 2007). Auch wurde bei Defekten der Tat- und Sec-abhängigen Sekretionsmaschinerie in *E. coli*

eine Induktion des *psp*-Systems beobachtet (DeLisa *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2003). Es stellt sich also die Frage, ob das Lia-System allgemein oder LiaH im Speziellen in Zusammenhang mit der Proteinsekretion in *B. subtilis* steht. Zur Beantwortung dieser Frage sollte eine Untersuchung der sekretierten Proteine im *B. subtilis* WT und zwei Mutanten ($\Delta liaF$, $\Delta P_{liaI-liaIH}$) durchgeführt werden. Da die Sekretion von Proteinen einen energieaufwendigen Vorgang darstellt und aus *E. coli* bereits bekannt ist, dass das *psp*-System auch durch eine Blockade/Zerstörung der elektronenmotorischen Kraft (*proton motive force*) induziert wird, wurden auch Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Energiehaushalt und der Lia-Antwort in *B. subtilis* durchgeführt, die im zweiten Teil des Kapitels dargestellt werden.

V.2. Material und Methoden

V.2.1. Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide

Alle in diesem Kapitel verwendeten Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide sind in den Tabellen V1.-3. aufgelistet.

Tabelle V.1: In diesem Kapitel verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp^a	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17rK- mK+relA1 supE44</i> $\Phi 80 \Delta lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169$	Laborsammlung
<i>Bacillus subtilis</i>		
W168	<i>trpC2</i>	Laborsammlung
TMB219	W168 <i>amyE::pSK601(P_{wapA}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB329	W168 $\Delta liaF$ (<i>clean deletion</i>)	Diese Arbeit
TMB488	W168 <i>amyE::pTM1 (P_{liaI}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB604	W168 $\Delta P_{liaI-liaIH}$ (<i>clean deletion</i>)	Diese Arbeit
TMB925	W168 <i>amyE::pSK601(P_{wapA}-lacZ)</i> , <i>liaH::kan</i> , <i>thrC::pDW706 (liaH-pXT)</i> spec	Diese Arbeit
TMB1123	W168 $\Delta liaF$, <i>amyE::pSK601 (P_{wapA}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1124	W168 $\Delta liaR$ (<i>clean deletion</i>), <i>amyE::pSK601 (P_{wapA}-lacZ)</i> cm, <i>thrC::pDW701 (liaR-pXT)</i> spec	Diese Arbeit
TMB1160	W168 $\Delta liaF$, <i>amyE::pDW613 (P_{wapA(-89)}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1161	W168 $\Delta liaF$, <i>amyE::pDW614 (P_{wapA(-57)}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1162	W168 $\Delta liaF$, <i>amyE::pDW615 (P_{wapA(-29)}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1180	W168, <i>amyE::pDW613 (P_{wapA(-89)}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1181	W168, <i>amyE::pDW614 (P_{wapA(-57)}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1182	W168, <i>amyE::pDW615 (P_{wapA(-29)}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit
TMB1290	W168 $\Delta wapA$ (<i>clean deletion</i>), <i>amyE::pTM1 (P_{liaI}-lacZ)</i> cm	Diese Arbeit

^a Resistenzen: kan, Kanamycin; cat, Chloramphenicol; erm, Erythromycin; spec, Spectinomycin

Tabelle V.2: In diesem Kapitel verwendete Oligonukleotide

Nummer + Verwendung	Sequenz
Markerlose Deletionen^{a,b}	
TM2017 <i>wapA</i> -up fwd (<i>Bam</i> HI)	AGTCGGATCCCGTAATCAAATGGTCATCTC
TM2018 <i>wapA</i> -up rev	<u>GCCATATTTCTCTCATTAAAGTATTTGTTCAATATCCGTA</u> CCCTCAG
TM2019 <i>wapA</i> -do fwd	CTTTAAATGAGGAGGAAATATGGC
TM2020 <i>wapA</i> -do rev (<i>Eco</i> RI)	AGTCGAATTCGCTCAAGCAATTGCCTGCTTTGC
TM1059 <i>liaR</i> clean-dofwd	CGCACACCGAAATCATCTCG
TM1060 <i>liaR</i> -upfwd(<i>Bam</i> HI)	AGCCGGATCCGACAACGGGAATCAGCCTGC
TM1061 <i>liaR</i> -dorev(<i>Nco</i> I)	TATACCATGGGCTGACACAGCAAATTCTCG
TM1120 <i>liaR</i> clean-uprev	<u>CGAGATGATTTCCGGTGTGCGCTGACCATTTTCATGATCATC</u>
LFH-PCR^b	
TM0137 <i>kan</i> -fwd	CAGCGAACCATTGAGGTGATAGG
TM0138 <i>kan</i> -rev	CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGG
TM0225 <i>liaH</i> -up fwd	CTTGTTATTCGTCACTGCC
TM0226 <i>liaH</i> -up rev (<i>kan</i>)	<u>CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGTCCTTCATGA</u> ACTGACGC
<i>liaH</i> -do fwd	<u>CGAGCGCTACGAGGAATTTGTATCGCAGACCAGACAAAAGCG</u> GC
<i>liaH</i> -do rev	CGCTAGATCCCCGCTGTCC
Klonierung in pXT^a	
TM1068 <i>liaR</i> -fwd (<i>Bam</i> HI)	ACGGGATCCCCGGAAGAAAAAGGAGAGAACG
TM1106 <i>liaR</i> -rev (<i>Hind</i> III)	ATCGAAGCTTCTAATTCACGAGATGATTTTCG
TM0521 <i>liaH</i> -fwd (<i>Bam</i> HI)	ACGGGATCCATTAGGAGGAATCAGGTATGG
TM0522 <i>liaH</i> -rev (<i>Bsa</i> I)	GATCGAGGCTCCAATTGCTTGCGAATTGATACGTGCG
<i>wapA</i> Promotor Analyse^a	
TM0482 P _{<i>wapA</i>} -rev (<i>Bam</i> HI)	CGATGGATCCTTGCTAGTACATCGGCTGGC
TM0483 P _{<i>wapA</i>} -fwd (<i>Eco</i> RI)	CGATGAATTCGCGAATGTGACAGCTGAGGG
TM2014 P _{<i>wapA</i>(-89)} -fwd (<i>Eco</i> RI)	AGTCGAATTCGGTCAATTGACTCTCGTAATCC
TM2015 P _{<i>wapA</i>(-57)} -fwd (<i>Eco</i> RI)	AGTCGAATTCGATAAATTTCTAGAAAAATATTG
TM2016 P _{<i>wapA</i>(-29)} -fwd (<i>Eco</i> RI)	AGTCGAATTCGATATTTTCAGTCTAGTTAAG

^a Restriktionsschnittstellen sind kursiv/fett hervorgehoben^b Linker Sequenzen für *Joining* PCR-Reaktionen sind unterstrichen

Tabelle V.3: In diesem Kapitel verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp ^a	Primer für Klonierung	Referenz
pAC6	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> , <i>cat</i> , <i>amyE</i> '...'amyE		(Stülke <i>et al.</i> , 1997)
pDG783	<i>pSB118</i> , <i>kan</i>		(Youngman, 1990)
pMAD	<i>erm</i> , ori(pE194-Ts), MCS-P <i>clpB</i> - <i>bgab</i> , ori(pBR322), <i>bla</i>		(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pXT	<i>thrC</i> '...'thrC, P _{<i>xyI</i>} , MCS, <i>spc</i> , <i>erm</i> , <i>bla</i>		(Guerout-Fleury <i>et al.</i> , 1996)
pTM1	pAC6 P _{<i>liaI</i>} - <i>lacZ</i>	TM0099/TM0100	(Jordan <i>et al.</i> , 2006)
pDW103	pMAD P _{<i>liaI</i>} - <i>liaH</i> up/down overlap	TM1056/TM1057;TM1055/TM1058	Diese Arbeit
pDW104	pMAD <i>liaR</i> up/down overlap	TM1060/TM1120;TM1059/TM1061	Diese Arbeit
pDW105	pMAD <i>wapA</i> up/down overlap	TM2017/TM2018;TM2019/TM2020	Diese Arbeit
pDW701	pXT P _{<i>xyI</i>} - <i>liaR</i>	TM1068/TM1106	Diese Arbeit
pDW706	pXT P _{<i>xyI</i>} - <i>liaH</i>	TM0521/TM0522	Diese Arbeit
pDW613	pAC6 P _{<i>wapA</i>(-89)} - <i>lacZ</i>	TM0482/TM2014	Diese Arbeit
pDW614	pAC6 P _{<i>wapA</i>(-57)} - <i>lacZ</i>	TM0482/TM2015	Diese Arbeit
pDW615	pAC6 P _{<i>wapA</i>(-23)} - <i>lacZ</i>	TM0482/TM2016	Diese Arbeit
pSK601	pAC6 P _{<i>wapA</i>} - <i>lacZ</i>	TM0482/TM0483	Diese Arbeit

^a Resistenzen: *cat*, Chloramphenicol; *bla*, Ampicillin; *erm*, Erythromycin; *spc*, Spectinomycin

V.2.2. Anzucht- und Wachstumsbedingungen

B. subtilis und *E. coli* wurden in LB-Medium oder auf Agar-Platten bei 37°C unter Sauerstoffzufuhr angezogen. Die Ionophore Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und Valinomycin wurden genutzt, um die elektronenmotorische Kraft der Zellmembran in *B. subtilis* zu zerstören. Zur Analyse der Wirkung von Valinomycin wurden die entsprechenden Stämme in YT-Medium (1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt) mit 50 mM HEPES-HCl pH 7,5 und 300 mM KCl angezogen. Die Antibiotika Kanamycin (10 mg ml⁻¹), Chloramphenicol (5 mg ml⁻¹), Erythromycin (1 mg ml⁻¹) und Spectinomycin (100 mg ml⁻¹) dienten zur Selektion von *B. subtilis*. Ampicillin (100 µg ml⁻¹) wurde zur Selektion von *E. coli*-Stämmen verwendet.

V.2.3. DNA-Manipulation und Klonierung

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Die Technik der *long flanking homology* PCR (LFH-PCR) nach der Methode von Wach (Wach, 1996) wurde angewandt, um das Gen *liaH* durch Insertion einer Resistenzkassette ins Genom von *B. subtilis* zu deletieren. Dabei wurden jeweils 1 kb stromauf (*up*)- und stromabwärts (*down*) von *liaH*, sowie die Resistenzkassette Kanamycin aus dem Plasmid pDG783 (Tabelle V.2 und V.3) amplifiziert. Durch überlappende Bereiche konnten die *up*- und *down*-Fragmente von *liaH* anschließend mit der Resistenzkassette durch eine *Joining*-PCR miteinander fusioniert werden. Danach wurde ein ausgewählter *B. subtilis* Stamm (siehe Tabelle V.1) direkt mit dem Fusionsprodukt transformiert. Transformanten wurden durch die insertierte Resistenzkassette selektiert und zusätzlich mittels PCR überprüft.

Der Vektor pXT (Guerout-Fleury *et al.*, 1996) wurde genutzt, um die Gene *liaR* und *liaH* Xylose-abhängig zu exprimieren. Hierbei wurden die Gene einschließlich der Ribosomenbindestellen durch geeignete Primer (Tabelle V.2) amplifiziert, verdaut und in pXT kloniert. Die auf diese Weise konstruierten Plasmide pDW701 und pDW706 (Tabelle V.3) wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft, mit dem Restriktionsenzym *ScaI* linearisiert und anschließend zur Transformation von *B. subtilis* eingesetzt. Die Transformanten wurden auf Spectinomycin-Platten selektiert und die Integration der Plasmide in den *thrC*-Lokus wurde mittels PCR überprüft.

Zur Promotordeletionsanalyse von *wapA* wurde der promotorlose *lacZ*-Fusionsvektor pAC6 (Stülke *et al.*, 1997) für die Fusion der *wapA* Promotor-Fragmente mit *lacZ* verwendet. Dazu wurde P_{*wapA*} in voller Länge (Dartois *et al.*, 1998), sowie in drei

unterschiedlich stark verkürzten Fragmenten amplifiziert (Primer, Tabelle V.2). Die PCR-Produkte wurden verdaut, anschließend in pAC6 ligiert und somit mit *lacZ* fusioniert. Die auf diese Weise konstruierten Plasmide pSK601, pDW613, pDW614 und pDW615 (Tabelle V.3) wurden sequenziert und mit *ScaI* verdaut. *B. subtilis* wurde mit den durch *ScaI* linearisierten Plasmiden transformiert. Die erfolgreiche Integration der Konstrukte in den *amyE*-Lokus und damit der Verlust der Fähigkeit zum Stärkeabbau wurde durch Ausstreichen der Transformanten auf Stärkeplatten (7,5 g l⁻¹ Nährbouillon; 5 g l⁻¹ Stärke; 15 g l⁻¹ Agar) und anschließender Überschichtung mit einer Kalium-Jodidlösung überprüft.

V.2.4. Markerlose Deletionen von *liaR* und *wapA*

Die markerlosen *liaR*- und *wapA*-Deletionsmutanten wurden unter Zuhilfenahme des Vektors pMAD konstruiert (Arnaud *et al.*, 2004), wie unter II.2.3. detailliert beschrieben. Hierbei wurden jeweils ca. 1 kb Fragmente stromauf- und stromabwärts von *liaR* und *wapA* per PCR amplifiziert, durch überlappende Bereiche fusioniert, verdaut und in pMAD ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pDW104 und pDW105 (Tabelle IV.3) wurden mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde *B. subtilis* W168 mit diesen Plasmiden transformiert. Die Selektion und Isolation gewünschter Mutanten wurde wie in Kapitel II (*Materials and Methods*) beschrieben durchgeführt.

V.2.5. Chronotranskriptom-Analyse

Mittels der Chronotranskriptom-Analyse wurde die Expression aller Gene in *B. subtilis* während des Wachstums (exponentielle Phase, Übergangsphase, stationäre Phase) untersucht. Dabei kann die Änderung der Expression ausgewählter Gene mit der anderer Gene verglichen werden. Die Chronotranskriptom-Analyse wurde im Labor von Oscar Kuipers (Universität Groningen, Niederlande) durchgeführt (Blom *et al.*, 2011). Die Expressionsniveaus von *liaI*, *liaH* und *wapA* wurden genutzt, um die Veränderung der Expression dieser Gene während des Wachstums graphisch darzustellen.

V.2.6. Bestimmung der Promotor-Aktivität durch β -Galaktosidase-Assays

Hierzu wurden die zu untersuchenden Stämme, abhängig von den zu testenden Substanzen, in LB Medium oder YT-Medium mit HEPES und KCl bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 auf einem Schüttler inkubiert. Um die Aktivität des *liaI*-Promotors unter der Wirkung der Substanzen CCCP und Valinomycin zu untersuchen, wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen versetzt und variabel (2-30

Minuten) bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle verblieb ein Teil der Kulturen uninduziert und ein Teil wurde als Positivkontrolle mit Bacitracin (50 µg ml⁻¹ Endkonzentration) versetzt und 30 min inkubiert. Anschließend wurden 2 ml jeder Kultur zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20°C gelagert oder sofort weiter verwendet. Dazu wurden die Zell-Pellets in jeweils 1 ml Arbeitspuffer resuspendiert und die Promotoraktivität mittels β-Galaktosidase-Assays nach der Beschreibung von Miller (Miller, 1972) bestimmt.

V.2.7. Präparation extrazellulärer Proteine (Sekretom)

Zur Präparation extrazellulärer Proteine wurden Kulturen in LB Medium auf einem Schüttler bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 2,0 (stationäre Wachstumsphase) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (6000 x g, 4°C, 10 min), der Überstand in frische Zentrifugenbecher überführt und mit Trichloressigsäure (TCA, 10% (v/v)) versetzt. Das Ausfällen der extrazellulären Proteine im Überstand geschah über Nacht bei 4°C. Die gefällten Proteine wurden dann durch Zentrifugierung (6000 x g, 4°C, 1 Stunde) sedimentiert. Anschließend wurden die sedimentierten Proteine in einer minimalen Menge Ethanol (100%) aufgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugierung (6000 x g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die Pellets wieder mit Ethanol (100%) gewaschen. Dieser Waschschrift wurde sechs Mal durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Pellets in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Es erfolgte wiederum ein zweimaliger Waschschrift mit 70% Ethanol und Zentrifugierung (6000 x g, 4°C, 10 min). Die Proben wurden nun für 30 min in einer Univapo 150 H Vakuum-Zentrifuge (Fa. Zirbus) getrocknet. Anschließend wurden die Pellets über Nacht in 400 µl einer Lösung aus 8 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff gelöst und dann zweimal für 30 min bei 4°C und 6500 x g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Roti-Nanoquant (Fa. Roth) und Rinderserumalbumin als Standard nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Danach wurden die Proben für die 2D-Gelelektrophorese genutzt.

V.2.8. Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese beruht auf einer Auftrennung der Proteine in zwei Stufen und wurde basierend auf der Beschreibung von Klose (Klose, 1975) und O'Farrell (O'Farrell, 1975) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine zunächst gemäß ihrem isoelektrischen Punktes durch isoelektrische Fokussierung und anschließend nach Größe mittels SDS-

PAGE aufgetrennt. 2D-Gele wurden in kolloidaler Coomassie Brilliant Blau-Lösung gefärbt und unter Verwendung der Delta-2D Software (Fa. Decodon) analysiert. Interessante Protein-*Spots* wurden aus den Gelen ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-TOF identifiziert.

V.2.9. Sequenzanalysen

Die Analyse der Gen- und Proteinsequenz sowie der Domänenarchitektur von WapA wurde mittels der Datenbanken MicrobesOnline (<http://www.microbesonline.org/>) (Alm *et al.*, 2005) und SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schultz *et al.*, 1998) durchgeführt.

V.3. Ergebnisse

V.3.1. Untersuchung des extrazellulären Proteoms von *B. subtilis*

In Kapitel II und IV wurden bereits detaillierte Untersuchungen zur zellulären Rolle des Phagenschock-Homologs LiaH durchgeführt. Die Funktion von LiaH in der Zellhüllstressantwort von *B. subtilis* konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Klar demonstriert werden konnte jedoch, dass LiaH eine Zellhüllschutzfunktion besitzt und dass dieses Protein in ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk eingebettet ist. Da bereits bekannt war, dass Phagenschock-Proteine auch einen Einfluss auf die Sekretion von Proteinen haben können (DeLisa *et al.*, 2004, Vrancken *et al.*, 2007), sollte durch vergleichende Untersuchungen des Sekretoms der Zusammenhang zwischen LiaH und der Proteinsekretion näher analysiert werden. Um die extrazellulären Proteine zu isolieren, wurden die Stämme W168 (Wildtyp), TMB604 (ΔP_{liaI} -*liaIH*) und TMB329 ($\Delta liaF$) in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 2 angezogen. Nach Zentrifugation der Kulturen wurden die Überstände mit 10% (v/v) TCA versetzt. Die ausgefällten sekretierten Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert und mit 100% sowie 70% Ethanol gewaschen (methodische Details, siehe Abschnitt V.2.7.). Die Proteinpellets wurden getrocknet und in 8 M Harnstoff/2 M Thioharnstoff resuspendiert. Die Konzentration der Proteine wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Anschließend wurde die 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden die Proteine zunächst auf ihren isoelektrischen Punkt fokussiert und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt, gefärbt und analysiert. Interessante Protein-*Spots* wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie

(MALDI-TOF-TOF) identifiziert. Abbildung V.1 zeigt Gelausschnitte der 2D-Gelelektrophorese mit extrazellulären Proteinen des Wildtyps sowie einer ΔP_{liaI} - $liaIH$ - und einer $\Delta liaF$ -Mutante. Falschfarbenabbildungen der 2D-Gele sowie eine Übersicht aller identifizierten Proteine sind im Anhang (Abb.A3+A4) dargestellt. Bei der Analyse der 2D-Gele stellte sich heraus, dass im extrazellulären Proteom der ΔP_{liaI} - $liaIH$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp das Protein WapA signifikant erhöht vorhanden war (siehe Anhang Abb.A3). WapA konnte in 11 Protein-Spots mittels Massenspektrometrie identifiziert werden (Abb.V.1). Im Sekretom der $\Delta liaF$ -Mutante wurde keiner der ausgeschnittenen Protein-Spots als WapA identifiziert (siehe Anhang, Abb.A4). Bei Betrachtung der 2D-Gelausschnitte in Abb.V.1 ist auch deutlich zu erkennen, dass die in der ΔP_{liaI} - $liaIH$ -Mutante als WapA identifizierten Protein-Spots nicht oder nur sehr schwach in den Gelen des Wildtyps und der $\Delta liaF$ -Mutante zu sehen sind (Abb.V.1). Die Ergebnisse zeigen, dass LiaH einen Effekt auf die Zusammensetzung des Sekretoms in *B. subtilis* hat. Es wird vermutet, dass LiaH in Beziehung zu WapA steht. Es ist bereits beschrieben worden, dass WapA im Wildtyp durch die extrazelluläre Serin-Protease Epr abgebaut wird und somit im extrazellulären Proteom in der stationären Phase nur noch stark reduziert vorhanden ist (Antelmann *et al.*, 2002). Da nicht bekannt ist, dass LiaH sekretiert wird, könnte somit auch angenommen werden, dass LiaH in Beziehung zur Sekretion von Epr steht, wodurch die Degradierung von WapA gewährleistet werden könnte.

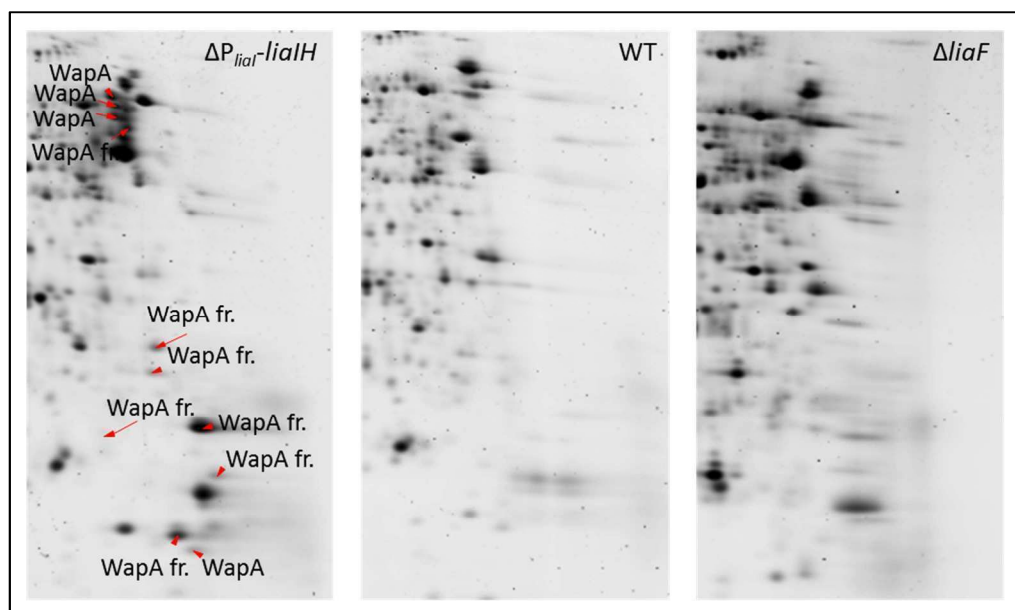


Abb.V.1: Analyse extrazellulärer Proteine durch 2D-Gelelektrophorese. Verwendete Stämme: *B. subtilis* W168, TMB329 ($\Delta liaF$) und TMB604 (ΔP_{liaI} - $liaIH$). Es sind nur Gel-Ausschnitte dargestellt. WapA sowie Fragmente von WapA (fr.) konnten in 11 Spots des extrazellulären Proteoms der ΔP_{liaI} - $liaIH$ -Mutante (TMB604) durch MALDI-TOF-TOF identifiziert werden (rote Pfeile). Im extrazellulären Proteom des Wildtyps und der $\Delta liaF$ -Mutante konnten diese Spots nicht identifiziert werden. Eine Farbdarstellung der 2D-Gele ist im Anhang zu finden.

V.3.2. WapA ist ein Zellwand-assoziiertes Protein

Bei einer Analyse des genomischen Kontext von *wapA* in *B. subtilis* wurde festgestellt, dass *wapA* zusammen mit zehn weiteren unbekanntem Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, in einem Operon organisiert ist (Abb.V.2).

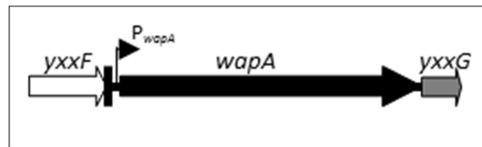


Abb.V.2: Genomische Organisation von *wapA* in *B. subtilis* (Ausschnitt). Um *wapA* liegende Gene sind in weiß (*yxxF*) und grau (*yxxG*) dargestellt. Die Terminationstruktur zwischen *yxxF* und *wapA* ist durch schwarzen Balken hervorgehoben. P_{wapA} ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Gene sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Quelle: <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>

Der Promotor von *wapA* wurde bereits beschrieben (Dartois *et al.*, 1998). Der stromaufwärts liegende Terminator grenzt *wapA* deutlich von dem Gen *yxxF* ab. Stromabwärts ist *wapA* durch einen kurzen intergenischen Bereich (60 bp) vom Gen *yxxG* getrennt. Das ca. 7000 bp große Gen *wapA* kodiert für ein Zellwand-assoziiertes Protein, welches zur Familie der Oberflächen-assoziierten Proteine mit hohem Molekulargewicht (WapA hat ein Molekulargewicht von ca. 230 kDa) gehört. Mitglieder dieser Familie sind meist in Prozesse, die den Metabolismus der Zellwand, die Sekretion von Proteinen oder die Zell-Adhäsion betreffen, involviert (Dartois *et al.*, 1998). Da die Analyse der Proteinsequenz von WapA in SMART ergab, dass dieses Protein ein Signalpeptid besitzt und aus mehreren funktionell unbekanntem Domänen besteht, wird angenommen, dass WapA in den extrazellulären Raum sekretiert, dann prozessiert und schließlich durch Proteasen (z.B. Epr) degradiert wird (Antelmann *et al.*, 2002). Über die Funktion von WapA in *B. subtilis* ist bisher nichts bekannt.

V.3.3. Chronotranskriptom-Analyse bestätigt den Zusammenhang zwischen LiaH und WapA

Da durch den Vergleich des extrazellulären Proteoms vom Wildtyp und einer ΔP_{liaH} -*liaIH*-Mutante bereits ein Zusammenhang zwischen LiaH und WapA gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage, ob solch eine Beziehung zwischen beiden Proteinen auch auf der Ebene der Genexpression zu beobachten ist. Diese Vermutung konnte durch eine Chronotranskriptom-Analyse untermauert werden, welche im Labor von Oscar Kuipers (Universität Groningen, Niederlande) durchgeführt wurde (Blom *et al.*, 2011). Hierbei wird das Expressionsniveau aller Gene in hoher zeitlicher Auflösung über den gesamten

Wachstumszyklus erfasst. Abbildung V.3 zeigt die Expressionsniveaus der Gene *liaI*, *liaH* und *wapA* von *B. subtilis*.

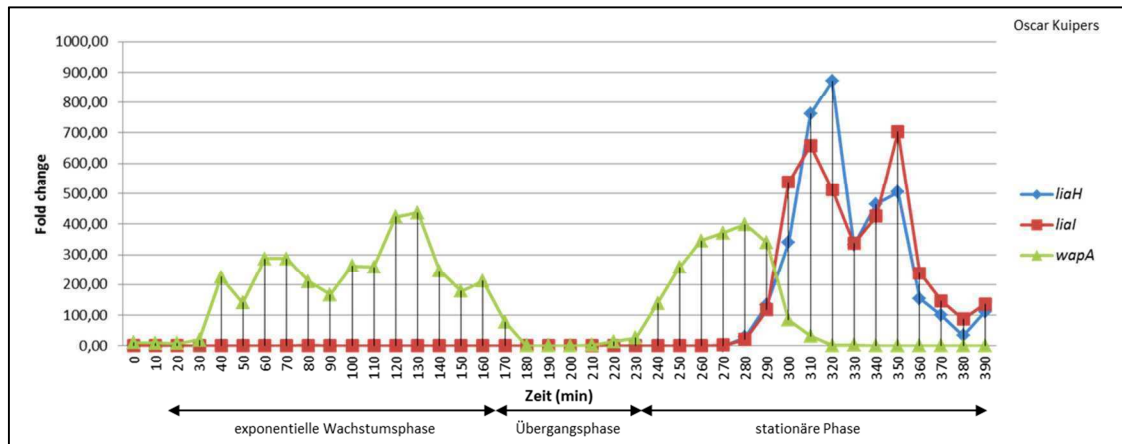


Abb.V.3: Chronotranskriptom-Analyse. Die Expressionsniveaus (in *Fold changes*) der Gene *liaI* (blau), *liaH* (rot) und *wapA* (grün) während exponentieller Wachstumsphase, Übergangsphase und stationärer Phase sind dargestellt. Die Chronotranskriptom-Analyse wurde im Labor von Oscar Kuipers durchgeführt (Blom *et al.*, 2011).

Eine starke Expression von *wapA* konnte während der exponentiellen Wachstumsphase sowie am Anfang der stationären Phase beobachtet werden. Innerhalb der Übergangsphase kommt die Expression von *wapA* vollständig zum Erliegen (Abb.V.3). Über die Regulation der Expression von *wapA* während der exponentiellen Wachstumsphase und der Übergangsphase ist nichts bekannt. Die Induktion der *liaIH*-Expression während der stationären Phase ist bereits beschrieben worden (Jordan *et al.*, 2007) und konnte mittels dieses Experiments bestätigt werden. Bei einem Vergleich der Expression von *wapA* und *liaIH* während der stationären Phase fällt auf, dass die Expression von *liaIH* zeitgleich mit einer Repression von *wapA* einhergeht. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass zwischen LiaH und WapA ein Zusammenhang besteht. Die Beobachtung, dass das *lia*-System in der stationären Phase induziert ist und dass gleichzeitig die Expression von *wapA* reprimiert wird, führt zu der Hypothese, dass der RR LiaR regulierend in die Expression von *wapA* eingreift. So wäre es vorstellbar, dass LiaR neben seiner bekannten Rolle als Aktivator, im Falle des *wapA*-Promotors auch als Inhibitor wirken kann. Diese Hypothese scheint durch die Ergebnisse der in Kapitel II beschriebenen *Microarrays* unterstützt zu werden, bei der die Expression von *wapA* in einer Δ *liaR*-Mutante um das Sechsfache erhöht vorlag. Um die Regulation von *wapA* detaillierter zu untersuchen, wurde im Nachfolgenden die Aktivität des P_{wapA} Promotors in verschiedenen Mutanten untersucht.

V.3.4. Untersuchung der Regulation von P_{wapA} durch β -Galaktosidase-Assays

Initial wurde untersucht, wie sich die Aktivität des P_{wapA} in einer $\Delta liaF$ -Mutante verhält und ob die Inhibition der Expression von $wapA$ durch LiaH oder LiaR ausgelöst ist. Dazu wurden die Stämme TMB219 (P_{wapA} - $lacZ$), TMB925 (P_{wapA} - $lacZ$, $liaH::kan$, pXT - $liaH$), TMB1123 (P_{wapA} - $lacZ$, $\Delta liaF$) und TMB1124 (P_{wapA} - $lacZ$, $\Delta liaR$, pXT - $liaR$) in LB-Medium angezogen. Zur Expression von $liaH$ (TMB925) und $liaR$ (TMB1124) wurde 0,1% Xylose zum Medium gegeben, da beide Gene unter der Kontrolle eines Xylose-abhängigen Promotors stehen. Nachdem die Kulturen eine OD_{600} von 0,4-0,6 erreicht hatten, wurden jeweils 2 ml Proben entnommen und zentrifugiert. Die Zell-Pellets wurden zur Durchführung des β -Galaktosidase-Assays genutzt (Miller, 1972). Die Ergebnisse dieses Assays sind in Abbildung V.4 dargestellt.

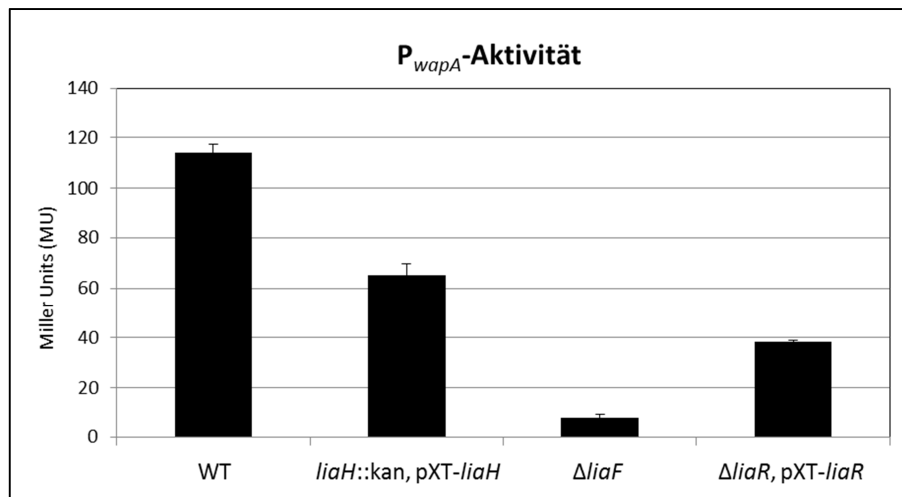


Abb.V.4: Bestimmung der Promotor-Aktivität von P_{wapA} durch β -Galaktosidase-Assays. Die Stämme TMB219 (P_{wapA} - $lacZ$), TMB925 (P_{wapA} - $lacZ$, $liaH::kan$, pXT - $liaH$), TMB1123 (P_{wapA} - $lacZ$, $\Delta liaF$) und TMB1124 (P_{wapA} - $lacZ$, $\Delta liaR$, pXT - $liaR$) wurden verwendet. 0,1% Xylose diente zur Induktion der P_{xyI} -abhängigen Gene $liaR$ und $liaH$ in pXT . Die Promotoraktivität ist in Miller Units angegeben (Miller, 1972). Methodische Details siehe Text. Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt.

In exponentiell wachsenden Kulturen des Wildtyps zeigte sich eine P_{wapA} -Aktivität von >100 MU (Abb.V.4, WT). Im Gegensatz war die Aktivität des P_{wapA} -Promotors in einer $\Delta liaF$ -Mutante deutlich erniedrigt (<10 MU, Abb.V.4, $\Delta liaF$). Das bedeutet, dass sich eine starke Induktion und Expression des lia -Systems, die durch die Deletion von $liaF$ hervorgerufen werden, stark reprimierend auf die Aktivität des $wapA$ -Promotors auswirken. Der Vergleich der P_{wapA} -Aktivität zwischen den Stämmen TMB925 (P_{wapA} - $lacZ$, $liaH::kan$, pXT - $liaH$) und TMB1124 (P_{wapA} - $lacZ$, $\Delta liaR$, pXT - $liaR$) deutet an, dass der $wapA$ -Promotor in negativer Weise (Repression) durch den RR LiaR reguliert werden könnte. Wurde LiaH in einer $liaH::kan$ -Mutante (TMB925) durch Zugabe von Xylose

überexprimiert, so nahm die Aktivität des P_{wapA} -Promotors um etwa das Zweifache ab (Abb.V.4). Bei Xylose-abhängiger Überexpression von LiaR in einer $\Delta liaR$ -Mutante (TMB1124) verringerte sich die P_{wapA} -Aktivität sogar um etwa das Dreifache.

Wie schon bekannt, resultiert die Überexpression von LiaR in einer starken Induktion des *lia*-Systems und damit auch in der Expression von LiaI und LiaH. Da aber nicht bekannt ist, dass LiaH regulierend auf die Gen-Expression einwirkt, stellt sich die Frage, ob LiaR in der Transkriptionsregulation von *wapA* eine Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der *wapA*-Promotor durch eine Promotordeletionsanalyse auf eine potentielle Bindestelle für LiaR untersucht (Abb.V.5). Dazu wurden drei unterschiedlich lange Fragmente von P_{wapA} mittels PCR amplifiziert und durch die Klonierung in pAC6 (Stülke *et al.*, 1997) mit *lacZ* fusioniert. Die 3'Enden aller Promotor-Fragmente ragten 97 bp in *wapA* hinein. In Abbildung V.5A sind die Längen der 5'Enden der Fragmente, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt, schematisch dargestellt. Bei dem Fragment -172 handelt es sich um den vollständigen P_{wapA} -Promotor, dessen beinhalten Stamm (TMB219) bereits für vorangegangene β -Galaktosidase-Assays eingesetzt wurde. Die aus der Klonierung hervorgegangenen Plasmide pDW613, pDW614 und pDW615 (Tabelle V.3) wurden genutzt um den Wildtyp sowie eine $\Delta liaF$ -Mutante (TMB329) zu transformieren. Die auf diese Weise generierten Stämme TMB1160-1162 und TMB1180-1182 sowie die Stämme TMB219 und TMB1123 (Tabelle V.1) wurden im β -Galaktosidase-Assay hinsichtlich ihrer Promotor-Aktivität untersucht. Wie erwartet, zeigte P_{wapA} in Volllänge im Wildtyp eine Aktivität von ca. 100 MU sowie eine auf ca. 20 MU reduzierte Aktivität in der $\Delta liaF$ -Mutante (Abb.V.5B). Schon das auf 89 Basenpaare verkürzte *wapA*-Promotorfragment zeigte im Wildtyp keine Aktivität mehr. Das bedeutet, dass die positive Regulation (Transkriptionsinitiation) von P_{wapA} innerhalb der 89. und 172. Base der Promotorregion stattfindet. Durch welchen Transkriptionsregulator die Transkription von *wapA* initiiert wird, ist unklar. Basierend auf Literaturangaben könnten dafür die *Response*-Regulatoren DegU und YvrHb in Frage kommen (Dartois *et al.*, 1998, Serizawa *et al.*, 2005). Eine Beteiligung des Lia-Systems an der positiven Regulation von P_{wapA} kann ausgeschlossen werden, da dieses System in der mid-logarithmischen Wachstumsphase nicht induziert ist. Außerdem weisen die Ergebnisse der Chronotranskriptionsanalyse (Abb.V.3) sowie der P_{wapA} -Aktivität in einer $\Delta liaF$ -Mutante (Abb.V.4) darauf hin, dass eine Induktion des Lia-Systems in einer Repression der Transkription von *wapA* resultiert. Aufgrund dieser vorangegangenen Beobachtungen wurde im Folgenden, die Aktivität der *wapA*-Promotorfragmente in einer $\Delta liaF$ -Mutante untersucht. Im Fall, dass die *wapA*-

Promotorfragmente eine potentielle LiaR-Bindestelle enthalten, wurde angenommen, dass P_{wapA} reprimiert wird. Sobald jedoch durch die Eingrenzung des $wapA$ -Promotors die potentielle Bindestelle für LiaR entfernt wird, wurde eine P_{wapA} -Aktivität auf Wildtyp-Niveau (ca. 100 MU) erwartet.

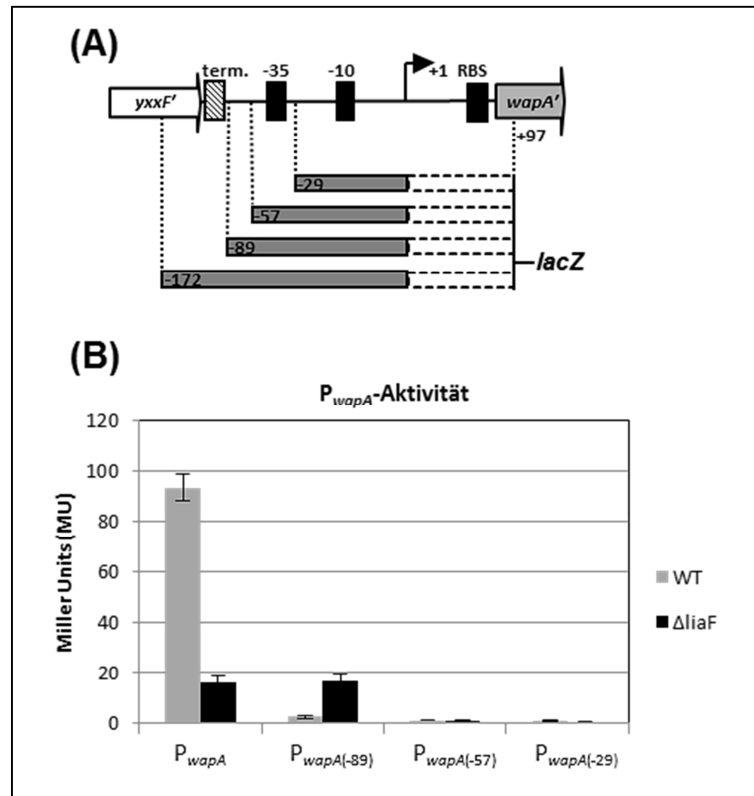


Abb.V.5: Charakterisierung des P_{wapA} -Promotors durch eine Promotordeletionsanalyse. (A) Schematischer Überblick über die in pAC6 klonierten Promotor-Fragmente (Größen, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt +1, sind durch vertikale graue Balken illustriert; 3'Enden sind durch gestrichelte Balken dargestellt). Regionen -35, -10 und RBS sind hervorgehoben. Der Transkriptionsstartpunkt +1 ist gekennzeichnet (schwarzer Pfeil). Der Terminator nach dem Gen $yxxF'$ ist betont. (B) P_{wapA} -Aktivitäten im Wildtyp (graue Balken) und in einer $\Delta liaF$ -Mutante (schwarze Balken), bestimmt durch β -Galaktosidase-Assays. Aktivität des P_{wapA} -Promotors ist in Miller Units (MU) angegeben (Miller, 1972). Verwendete Stämme: TMB219, TMB1123, TMB1160-TMB1162, TMB1180-TMB1182 (siehe Tabelle IV.1). Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

In Abbildung V.5 kann klar demonstriert werden, dass keines der $wapA$ -Promotorfragmente in einer $\Delta liaF$ -Mutante eine Aktivität auf Wildtypniveau aufweist. Die Promotorfragmente -57 und -29 besitzen sowohl in der $\Delta liaF$ -Mutante als auch im Wildtyp keine Aktivität mehr. Ein Grund hierfür könnte in Wegfall der -35 Region im -29-Promotorfragment liegen. Die Gründe für den Aktivitätsverlust des -57-Promotorfragmentes liegen im Unklaren. Letztlich kann nur vermutet werden, dass sich eine potentielle Bindestelle für eine erfolgreiche Repression des $wapA$ -Promotors durch LiaR innerhalb der Fragmente -89 und -172 (Volllänge) befindet, da diese Fragmente in einer $\Delta liaF$ -Mutante eine stark reduzierte Aktivität aufweisen (ca. 20 MU). Eine Sequenz-

Analyse der *wapA*-Promotorregion erbrachte jedoch keinerlei Hinweise auf eine potentielle Bindestelle für LiaR.

Ein weiteres β -Galaktosidase-Assay bei dem getestet wurde, wie sich eine Deletion von *wapA* auf die Aktivität von P_{liaI} auswirkt, ergab dass P_{liaI} in mid-logarithmischen Zellen einer $\Delta wapA$ -Mutante (TMB1290, siehe Tabelle V.1) nicht induziert ist (Daten nicht gezeigt). Ein wichtiges Folgeexperiment wäre die P_{liaI} -Aktivität in einer $\Delta wapA$ -Mutante zu untersuchen, die sich in der stationären Wachstumsphase befindet.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Frage, ob LiaR an der Regulation der Aktivität des *wapA*-Promotors beteiligt ist oder ob LiaH eine wichtige Rolle bei der Degradation von WapA spielt, mit den hier präsentierten Ergebnissen nicht eindeutig geklärt werden konnte. Neben der Annahme, dass eines der beiden Proteine in die Regulation von WapA involviert ist, kann ebenso spekuliert werden, dass es für eine Regulation auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene beider Proteine bedarf. Es sollten demnach in naher Zukunft weitere Experimente (z.B. Protein-Protein-Interaktionsstudien, *Pull down*-Experimente mit den Proteinen LiaH und Epr, Effekt der Überexpression von WapA auf P_{liaI}) durchgeführt werden, um die funktionale Rolle des *lia*-Systems, im genaueren LiaH, in der Regulation der Expression von WapA zu klären.

V.3.5. P_{liaI} wird nicht durch die Ionophore CCCP und Valinomycin induziert

Ein weiterer wichtiger Hinweis, der zur Aufklärung der zellulären Funktion von LiaH beitragen könnte, kommt ebenfalls aus der Untersuchung der Phagenschock-Antwort in *E. coli*. Hier wurde bei Störung des Membranpotentials durch das Ionophor CCCP eine starke Induktion des *psp*-Operons beobachtet (Weiner & Model, 1994). Es wurde auch festgestellt, dass in der stationären Phase, wenn der zelluläre Energiestatus stark reduziert ist, das *psp*-Operon sowie auch das *lia*-System induziert sind (Jordan *et al.*, 2007, Weiner & Model, 1994). Eine genaue Funktion des *psp*-Systems in Bezug auf den Energiestoffwechsel in *E. coli* ist jedoch nicht bekannt. Hätte das *lia*-System in *B. subtilis* dieselbe Funktion wie das *psp*-System in *E. coli*, wäre es naheliegend, dass das *lia*-System auch durch Ionophore wie CCCP induziert werden könnte. Daher wurde initial mittels β -Galaktosidase-Assays die Aktivität von P_{liaI} nach Zugabe von CCCP untersucht. Hierbei wurde der Stamm TMB488 (P_{liaI} -*lacZ*) in LB-Medium angezogen und nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit unterschiedlichen Konzentrationen von CCCP (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) versetzt. Eine uninduzierte sowie eine Kultur, die mit Bacitracin (50 μ g ml^{-1}) induziert wurde, dienten als Kontrollen. Hierbei wurde festgestellt, dass

CCCP den Promotor P_{liaI} nicht induziert, die Aktivität des $liaI$ -Promotors verblieb auf Basalniveau (Abb.V.6A). Die Kultur, die mit Bacitracin induziert wurde, zeigte, wie erwartet, eine Aktivität von etwa 80 MU.

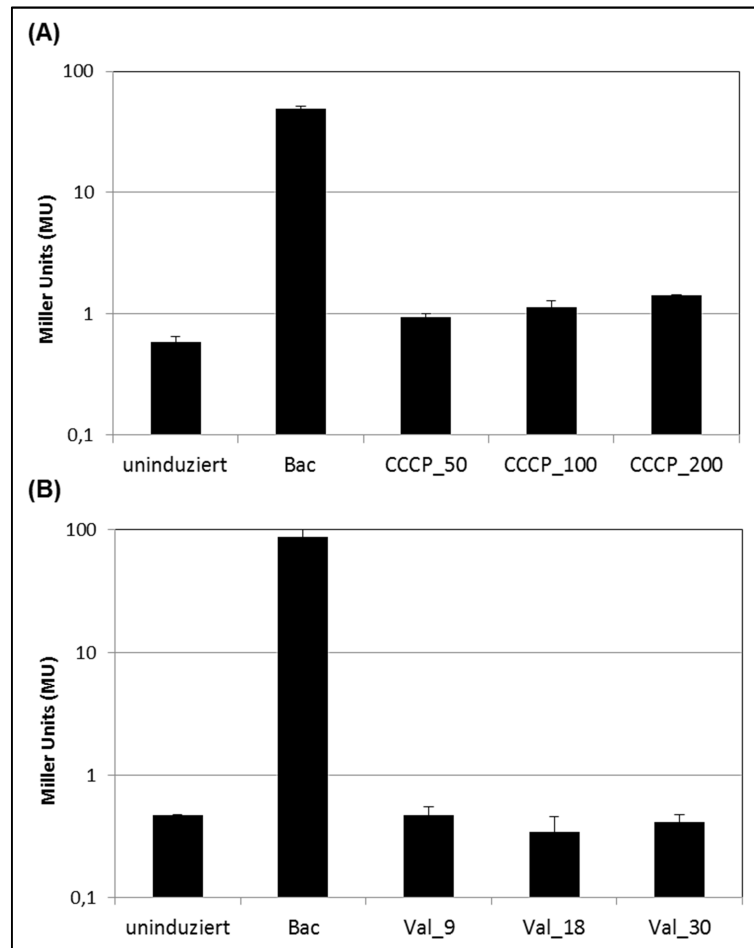


Abb.V.6: Untersuchung der P_{liaI} -Aktivität durch β -Galaktosidase-Assay. Der Stamm TMB488 (P_{liaI} - $lacZ$) wurde bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 in (A) LB-Medium oder (B) YT-Medium+50 mM HEPES+300 mM KCl angezogen. LB-Kulturen wurden geteilt und mit CCCP (50 μ M CCCP_50, 100 μ M CCCP_100 und 200 μ M CCCP_200 (A)) induziert. Teile der YT-Kulturen wurden mit Valinomycin versetzt (9 μ M Val_9, 18 μ M Val_18 und 30 μ M Val_30 (B)). Außerdem wurde zur Kontrolle jeweils eine Probe beider Kulturen mit Bacitracin (Bac, 50 μ g ml^{-1}) versetzt sowie eine uninduzierte Probe entnommen. Alle Proben wurden anschließend 15 min inkubiert. Die Aktivität von P_{liaI} ist in Miller Units (MU) angegeben. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

Die elektronenmotorische Kraft (*proton motive force*) einer Zelle setzt sich aus dem Elektronenpotential ($\Delta\Psi$) und dem Protonen-Gradienten (ΔH^+) zusammen. CCCP erhöht die Durchlässigkeit der Membran für Protonen und wirkt somit zerstörend auf den H^+ -Gradienten, der während der Atmungskette entsteht. Gleichzeitig führt CCCP aber auch zu einer Beeinträchtigung der F_1F_0 ATPase, was letztlich sehr schnell zum Erliegen des gesamten Membranpotentials und zum rapiden Abfall von zellulären ATP führt (Strahl & Hamoen, 2010, Engl *et al.*, 2011). Zusätzlich zu CCCP wurde noch ein weiteres Ionophor, Valinomycin, in Bezug auf die Aktivität von P_{liaI} getestet. Valinomycin gehört zu den

Macrolid-Antibiotika und zerstört das Elektronenpotential ($\Delta\psi$) der Zelle in spezifischer Weise, indem es als Kalium-Transporter (K^+ in die Zelle/ e^- aus der Zelle) wirkt (Shapiro, 1994). Um die Aktivität von P_{liaI} unter Einfluss von Valinomycin zu testen, wurde der Stamm TMB488 in YT-Medium angezogen, welchem Kaliumchlorid sowie der Puffer HEPES zugegeben wurden. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Kultur wieder geteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Valinomycin (9 μ M, 18 μ M, 30 μ M) versetzt. Kontroll-Proben wurden wie oben beschrieben behandelt. In Abbildung V.6B ist zu erkennen, dass auch Valinomycin nicht zu einer Induktion von P_{liaI} führt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Zerstörung des Elektronenpotentials durch Valinomycin oder der elektronenmotorischen Kraft durch CCCP nicht direkt zur Induktion des *lia*-Systems in *B. subtilis* führt.

Diskussion

VI.1. Die LiaR-vermittelte Zellhüllstressantwort in *B. subtilis*

Die in Kapitel II gezeigten Ergebnisse vereinen Analysen des Transkriptoms, des Proteoms sowie des Phänotyps verschiedener *lia*-Mutanten, mittels derer die LiaR-vermittelte Zellhüllstressantwort in *B. subtilis* detailliert untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die drei Ziel-Loci *liaIHGFSR*, *yhcYZ-yhdA* und *ydhE* eine LiaR-Bindestelle aufweisen, wodurch deren Expression über das Lia-System reguliert werden kann. Tiefer gehende Analysen zeigten aber recht schnell, dass das *lia*-Operon das einzig relevante Ziel der LiaR-vermittelten Zellhüllstressantwort *in vivo* darstellt. Die Tatsache, dass in einer Δ *liaF*-Mutante die Loci *yhcYZ-yhdA* sowie *ydhE* durch LiaR induziert werden können, liegt vermutlich darin begründet, dass sich unter der Bedingung eines stark konstitutiv exprimierten Lia-Lokus, wie es in einer Δ *liaF*-Mutante geschieht, in der Zelle ein Pool von phosphorylierten LiaR anhäuft. Dieser artifizielle Zustand führt dazu, dass LiaR auch an schlecht konservierte Bindestellen im Promotorbereich weiterer Gene (*yhcYZ-yhdA* und *ydhE*) bindet und die Expression dieser induziert. Diese Situation würde im Wildtyp durch die *Feedback*-Regulation zwischen LiaF und dem LiaRS-2KS jedoch nicht auftreten. Gelretardierungsexperimente belegen, dass phosphoryliertes LiaR unter Wildtyp-Bedingungen *in vitro* nur an den *lia*-Promotor bindet. Gleichzeitig konnte eine Bindung von LiaR an P_{yhcY} oder P_{ydhE} im Wildtyp *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse in Kapitel II deuten stark darauf hin, dass das *liaIHGFSR*-Operon das einzig relevante Ziel der LiaFSR-abhängigen Signaltransduktion in *B. subtilis* ist. Dies wurde weiterhin durch vergleichende genomische Analysen belegt, bei denen herausgefunden wurde, dass die Gene *liaI* und *liaH* das Hauptziel der LiaR-Regulation darstellen (Jordan *et al.*, 2006). Hierbei kodiert das Gen *liaI* für ein kleines Membranprotein und *liaH* für ein cytoplasmatisches Protein, welches zu Familie der Phagenschock-Proteine gehört.

VI.2. Das Lia-System in *B. subtilis* im Vergleich mit dem Psp-System in *E. coli*

Das Ergebnis, dass es sich bei LiaH um ein Protein der Phagenschock-Familie handelt, lässt eine erste Vermutung aufkommen, dass es sich beim Lia-System in *B. subtilis* eventuell um ein ähnliches System wie die Phagenschock-Antwort in *E. coli* handeln könnte. Tatsächlich lässt sich diese Hypothese durch weitere Untersuchungen und Ergebnisse belegen, die im Folgenden erörtert werden sollen.

Die Phagenschock-Antwort in *E. coli* besteht aus dem Stress-induzierbaren *pspABCDE*-Operon sowie dem Gen *pspG*. Beide werden durch PspF reguliert, welches konstitutiv exprimiert wird und genetisch in gegenläufiger Richtung vor dem *psp*-Operon organisiert ist (Jovanovic *et al.*, 1996) (Abb.VI.1A, Abschnitt I.7.). PspF ist ein AAA⁺-Protein, welches als Homohexamer zusammen mit dem Sigmafaktor σ^{54} und der RNA-Polymerase als Transkriptionsaktivator in der Induktion des *psp*-Operons fungiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität von PspF durch das AAA⁺-Adapterprotein PspA negativ reguliert wird (Abb.VI.1A).

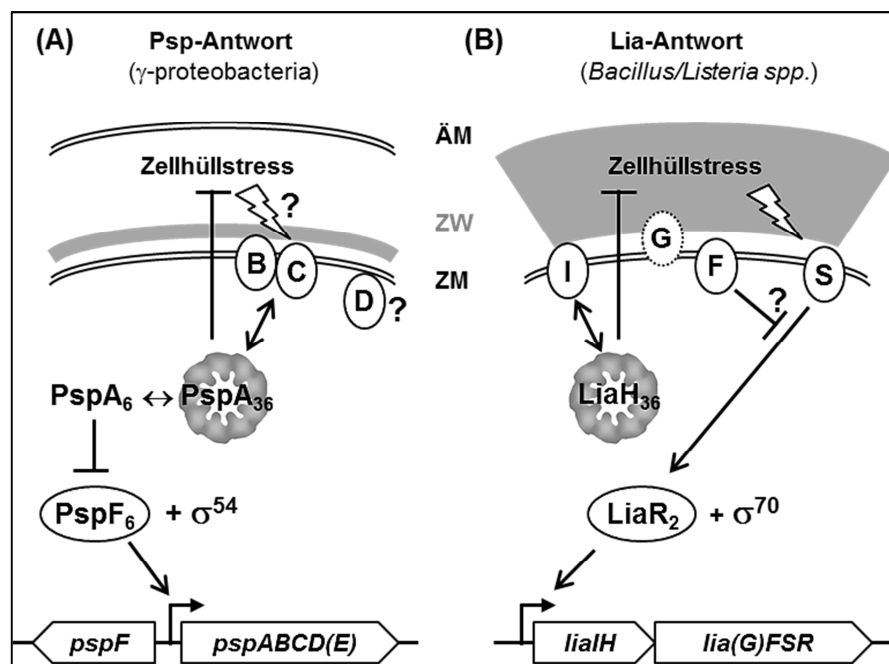


Abb.VI.1: Vergleich der Psp-Antwort in den γ -Proteobakterien (A) mit der Lia-Antwort in den Bacilli/Listerien (B). ÄM (äußere Membran), ZW (Zellwand), ZM (Zellmembran)

Das Phagenschock-Protein A ist die Hauptkomponente der Phagenschock-Antwort in *E. coli* (siehe Abschnitt I.7.) und anderen Bakterien, z.B. *Y. enterocolytica*, *S. enterica*, *S. lividans* (Becker *et al.*, 2005, Brissette *et al.*, 1990, Darwin, 2005, Model *et al.*, 1997, Seo *et al.*, 2007, Vrancken *et al.*, 2008). Unter nicht induzierenden Bedingungen, interagiert

PspA, welches aus einem Oligomer von sechs Proteinen besteht, mit einem Hexamer aus PspF-Proteinen. Diese Interaktion führt zu einer Hemmung von PspF und einer daraus resultierenden Inhibition der Expression des *psp*-Operons (Joly *et al.*, 2009). Unter Stress-Bedingungen dissoziiert der PspA₆-PspF₆-Komplex, wodurch nun freies PspF die Transkription des *psp*-Operons initiieren kann. Die Expression des *psp*-Operons lässt wiederum die Konzentration von PspA in der Zelle ansteigen, wodurch große oligomere Proteinkomplexe (36-mer) gebildet werden. Diese Protein-Komplexe assoziieren an die Zellmembran und fungieren dort vermutlich als Schutz vor Protonenverlust (Kobayashi *et al.*, 2007). Der genaue Ablauf der Signaltransduktion, von der Detektion des verursachenden Stresses bis zur Weitergabe des Signals an den PspA₆-PspF₆-Komplex, liegt jedoch im Unklaren. Erste Untersuchungen haben ergeben, dass die Membranproteine PspB und PspC bei der Wahrnehmung der Signale eine wichtige Rolle übernehmen (Abb.VI.1A). Beide Gene werden unter Stress-Bedingungen mit *pspA* und *pspD* koexprimiert und interagieren mit PspA (Joly *et al.*, 2009).

Das Lia-System, welches in *Bacillus spp.* und *Listeria spp.* stark konserviert ist, ist ähnlich wie das Psp-System auch in zwei Transkriptionseinheiten organisiert (Abb.VI.1B). Die Expression der regulatorischen Gene *lia(G)FSR* wird durch den konstitutiven Promotor, P_{liaG} , sichergestellt. Nach der LiaR-abhängigen Induktion des stromaufwärts von *liaI* liegenden Promotors, P_{liaI} , werden die Gene *liaIH* sehr stark transkribiert. Durch die Aktivierung von P_{liaI} kommt es aber, neben der Transkription von *liaIH*, auch zu einer signifikanten *read-through* Transkription der Gene *liaGFSR* (Mascher *et al.*, 2004), was durch *Microarray*-Analysen bereits demonstriert werden konnte (siehe Kapitel II). Das ebenfalls in den Firmicuten hoch konservierte Inhibitor-Protein LiaF bildet zusammen mit LiaRS ein 3KS (Jordan *et al.*, 2006, Mascher *et al.*, 2006). Das funktionell unbekanntes Protein LiaG hingegen ist nur in *B. subtilis* sowie seinen nahen Verwandten *B. halodurans* und *B. licheniformis* kodiert (Jordan *et al.*, 2006).

Eine Gemeinsamkeit zwischen Psp-System und Lia-System besteht in der Überlagerung der Induktoren-Spektren. Beide Systeme werden durch Zellhüllstress-Signale sowie in der stationären Phase, ohne die Anwesenheit eines externen Stress-Stimulus, induziert (Abb. VI.1) (Jordan *et al.*, 2007, Weiner & Model, 1994). Neben der starken Induktion des Lia-Systems durch Antibiotika (z.B. Bacitracin, Daptomycin) wird dieses auch durch alkalischen Schock, Sekretionsstress oder durch organische Lösungsmittel wie Ethanol induziert (Hachmann *et al.*, 2009, Hyyryläinen *et al.*, 2005, Mascher *et al.*, 2004, Wiegert

et al., 2001). Zur Induktion des Psp-Systems in *E. coli* führen Infektionen der Zellen mit dem Phagen f1, missgefaltete oder übersekretierte Zellhüllproteine sowie Hitze- und osmotischer Stress, organische Lösungsmittel, Ionophore und auch antibiotische Substanzen, welche die Phospholipid-Synthese inhibieren (Bergler *et al.*, 1994, Brissette *et al.*, 1990, Darwin, 2005, Model *et al.*, 1997).

Das Ausbleiben von starken Phänotypen bei Deletionen von Genen des *psp*- oder des *lia*-Lokus zeigt eine weitere Gemeinsamkeit beider Systeme. So weisen Δ *psp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beispielsweise keine Veränderung im Wachstum auf (Weiner & Model, 1994).

Mutanten, die Deletionen der Gene *pspA-C* besitzen, überleben während der stationären Phase bei alkalischen pH deutlich schlechter als der Wildtyp. Des Weiteren ist in diesen Mutanten die Proteinsekretion eingeschränkt und unter Stressbedingungen konnte nachgewiesen werden, dass die elektronenmotorische Kraft der Zellmembran in den Mutanten nur schwer aufrechterhalten werden konnte (Kleerebezem *et al.*, 1996, Kleerebezem & Tommassen, 1993, Weiner & Model, 1994). Eine Deletion von PspF, dem Regulator des *pspABCDE*-Operons, resultiert in einem Defekt der Biofilmbildung in *E. coli*. Es wird angenommen, dass PspF, neben dem *psp*-Lokus, noch einen weiteren für die Generierung von Biofilmen wichtigen Lokus reguliert (Beloin *et al.*, 2004). In *Y. enterocolytica* wurde so beispielsweise gezeigt, dass PspF noch einen weiteren Lokus positiv reguliert, der bei der Virulenz des Bakteriums eine Rolle spielt (Darwin & Miller, 2001). Stark ausgeprägte eindeutige Phänotypen von Δ *liaIH*-Mutanten, die idealerweise auf die zelluläre Funktion von LiaI und LiaH hinweisen könnten, ließen sich auch in *B. subtilis* nicht beobachten. Die in Kapitel II dargestellten Ergebnisse einer detaillierten phänotypischen Analyse von Δ *liaH*/ Δ *liaIH*-Mutanten weisen auf eine leicht erhöhte Sensitivität dieser Stämme gegenüber einigen Antibiotika, z.B. Cephalosporin, Daptomycin, Enduracidin und Fosfomycin sowie gegenüber Substanzen, die oxidativen Stress verursachen (z.B. Menadion, Plumbagin, Natriumselenit, Cumenhydroperoxid) hin (Wolf *et al.*, 2010). In Kapitel V wird außerdem gezeigt, dass sich eine Deletion von *liaIH* auf die Komposition des extrazellulären Sekretoms in *B. subtilis* auswirkt. Es zeigte sich, dass WapA, ein Protein, dessen Funktion noch nicht aufgeklärt ist, in gehäufte Anzahl im Sekretom einer Δ *liaIH*-Mutante identifiziert werden konnte. Dieses Protein ließ sich jedoch nicht im extrazellulären Proteom des Wildtyps oder einer Δ *liaF*-Mutante nachweisen (siehe auch Abb.V.1.).

Wie bereits weiter oben geschrieben, ist sowohl im Psp-System als auch im Lia-System ein Homolog der Phagenschock-Protein A/IM30 Familie kodiert. Dies stellt eine weitere bedeutende Gemeinsamkeit beider Systeme dar. Untersuchungen zur Struktur von LiaH in *B. subtilis* (siehe Kapitel II) zeigten, dass dieses Protein, ähnlich wie PspA aus *E. coli*, oligomere Ringstrukturen mit einer 9-fachen Rotationsymmetrie bildet (Hankamer *et al.*, 2004, Wolf *et al.*, 2010). Solch eine Ringstruktur ist auch für Vipp1, ein Phagenschock-Homolog in *Synechocystis* (Cyanobakterium) und den Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* sowie in der *Clamydomonas*-Alge beschrieben worden (Aseeva *et al.*, 2004, Kroll *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2007). Kürzlich wurde ebenfalls beobachtet, dass PspA in *E. coli* unter Stress an der Zellmembran Clathrin-ähnliche Superkomplexe bildet. Clathrine sind Vesikel-Proteine von außergewöhnlicher Struktur, die an die Oberfläche von Erdnussschalen erinnert. Diese großen Superkomplexe könnten physiologisch bei der Stabilisierung der „gestressten“ Zellmembran hilfreich sein, indem diese Komplexe breitflächig mit der Zellmembran interagieren und somit Löcher oder Lecks verschließen könnten (Standar *et al.*, 2008). Untersuchungen der Phagenschock-Homologe in Cyanobakterien und höheren Pflanzen (z.B. *A. thaliana*) demonstrieren, dass Vipp1 an die innere Membran der Zelle oder des Chloroplasten assoziiert ist und eine essentielle Rolle bei der Thylakoidenbiogenese spielt (Kroll *et al.*, 2001, Westphal *et al.*, 2001).

Auffällig ist auch, dass die Phagenschock-Homologe PspA in *E. coli* und LiaH in *B. subtilis* zusammen mit kleinen Membranproteinen PspB (*E. coli*) und LiaI (*B. subtilis*) kotranskribiert werden (Abb.V.1). Das lässt vermuten, dass die Phagenschock-Homologe durch Interaktion mit den Membranproteinen an die Zellmembran assoziieren. In *E. coli* konnte eine Interaktion zwischen PspB und PspA an der Zellmembran bereits gezeigt werden (Adams *et al.*, 2003). Basierend auf der Erkenntnis, dass PspA in *E. coli* durch Protein-Protein-Interaktionen funktional aktiv ist, bestand ein Teil der hier vorliegenden Arbeit darin, die potentielle Interaktion zwischen LiaI und LiaH zu untersuchen. Dabei konnten detaillierte mikroskopische und biochemische Untersuchungen eine Interaktion sowie Kolo-kalisation von LiaI und LiaH an der Zellmembran in *B. subtilis* Zellen bestätigen (Kapitel IV, Abschnitt IV.3.4+IV.3.5). Eine ausführlichere Betrachtung der Beziehung zwischen LiaI und LiaH bezüglich der zellulären Funktion beider Proteine erfolgt im nächsten Abschnitt dieses Kapitels.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der phänotypischen Analyse, der Strukturaufklärung von LiaH sowie die vermutliche Beteiligung von LiaIH an der

Proteinsekretion in *B. subtilis* Hinweise darauf geben, dass das Lia-System in den Bacilli (und den Listerien (Fritsch *et al.*, 2011)) zellulär die Rolle der Phagenschock-Antwort übernimmt. Diese Annahme steht dabei jedoch im Kontrast zu anderen Firmicuten, z.B. *S. aureus*, *Lactococcus lactis*, bei denen keine Homologe von LiaI und LiaH identifiziert werden konnten (Jordan *et al.*, 2006). In diesen Organismen fungieren das LiaFSR-System und dessen Homologe (z.B. VraSR, CesSR) als Hauptkomponenten der Zellhüllstressantwort, die eine Vielzahl von Genen regulieren. In *B. subtilis* hingegen, werden die entsprechenden Regulons der Lia-Homologe anderer Firmicuten, durch die ECF σ Faktoren reguliert. Somit scheint das LiaFSR-System in den Firmicuten (exklusive Bacilli und Listerien) funktional eine andere Rolle zu spielen, die per se mit der Phagenschock-Antwort nicht zu vergleichen ist (Eldholm *et al.*, 2010, Kuroda *et al.*, 2003, Martinez *et al.*, 2007, Schrecke *et al.*, 2011, Suntharalingam *et al.*, 2009).

VI.3. Die zelluläre Lokalisation und Interaktion von LiaI und LiaH

In einer detaillierten Untersuchung der Beziehung zwischen LiaI und LiaH durch mikroskopische sowie biochemische Methoden, konnte festgestellt werden, dass LiaI und LiaH an der Cytoplasmamembran in *B. subtilis* interagieren und kolokalisieren (Kapitel IV, Abschnitt IV.3.4.). Eine topologische Analyse von LiaI ergab dabei zunächst, dass es sich bei LiaI um ein Membranprotein mit zwei Transmembranhelices handelt, wobei sich der N- und C-terminale Teil des Proteins im Cytoplasma befindet (siehe Abb.IV.1). Erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von LiaI und LiaH haben gezeigt, dass LiaI in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und LiaH unter Stressbedingungen die Lokalisierung vom Cytoplasma an die Zellmembran-assoziert verändert (Abb.IV.2+IV.3). Diese Beobachtungen sind konform mit der zellulären Lokalisation von PspA in *E. coli*. PspA ist hier ebenfalls sowohl cytoplasmatisch als auch an die Membran-assoziert lokalisiert (Brissette *et al.*, 1990, Dworkin *et al.*, 2000). Des Weiteren bestätigten nachfolgende mikroskopische Untersuchungen sowie BACTH-Analysen eine Interaktion sowie zelluläre Kolokalisation zwischen LiaI und LiaH (Abb.IV.4+Tab.IV.4). Die BACTH-Analyse ergab auch, dass der C-Terminus von LiaI als Interaktionsdomäne für LiaH essentiell ist, denn bei Deletion des C-Terminus von LiaI war keine Interaktion mit LiaH mehr beobachtbar.

Ein weiteres Ergebnis der Analyse der Beziehung zwischen LiaI und LiaH war, dass unter Stressbedingungen die Lokalisation von LiaH an die Zellmembran nicht allein von LiaI abhängt. So war mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sowie Western Blot zu beobachten, dass

in einer $\Delta liaI$ -Deletionsmutante unter Stressbedingungen LiaH, wenn auch in geringerer Proteinmenge, dennoch an die Membran assoziiert vorlag (Abb.IV.5). Das bedeutet, dass LiaH neben LiaI noch mit anderen Membranproteinen oder sogar direkt mit der Zellmembran interagiert. Die Hypothese, dass LiaH in direkter Weise mit der Zellmembran interagiert, wird durch Untersuchungen in *E. coli* sowie *A. thaliana* unterstützt. Für beide Organismen wurde eine direkte Assoziation der Phagenschock-Homologe PspA (*E. coli*) und Vipp1 (*A. thaliana*+*Synechocystis sp.*) mit Membranlipiden nachgewiesen (Fuhrmann *et al.*, 2009, Kobayashi *et al.*, 2007); S. Otters, Dissertation, 2011). Es ist jedoch ebenfalls beobachtet worden, dass PspA in *E. coli* unter einigen Stressbedingungen (z.B. Phageninfektion, osmotischer Schock, Ethanol) mit den Membranproteinen PspB und PspC interagiert (Adams *et al.*, 2003, Weiner *et al.*, 1991). Daraus kann geschlossen werden, dass PspA in *E. coli* zwei Funktionen ausführen könnte. Die Feststellung, dass LiaH im Wildtyp an der Membran mit LiaI interagiert sowie die Beobachtung, dass LiaH in einer $\Delta liaI$ -Deletionsmutante ebenfalls an der Zellmembran lokalisiert, lässt vermuten, dass LiaH in *B. subtilis* auch zwei verschiedene zelluläre Funktionen besitzen könnte. So könnte LiaH unter Stressbedingungen, ähnlich wie PspA, in großen oligomeren Komplexen an die Zellmembran assoziieren und dort Schäden entgegenwirken (Kobayashi *et al.*, 2007), als auch mit LiaI interagieren und dadurch eine weitere noch unbekannt Funktion ausführen. Die Ergebnisse der Untersuchung von LiaH in einer $\Delta liaI$ -Mutante deuten auch darauf hin, dass LiaH in einem starken Zusammenhang mit LiaI steht, denn die Menge von LiaH, die in der Mutante gebildet wird und an der Membran assoziiert ist, ist deutlich geringer als im Wildtyp (Abb.IV.5). Diese Beobachtung müsste allerdings durch weitere Untersuchungen näher erforscht werden.

Ebenso in Betracht gezogen werden kann die Möglichkeit, dass LiaH, neben LiaI noch mit anderen (Membran)Proteinen interagiert und somit unter Stressbedingungen an der Membran assoziiert. Dies soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

VI.4. Identifizierung weiterer potentieller Interaktionspartner von LiaH

Da die Untersuchung der Interaktion zwischen LiaI und LiaH keine direkten Hinweise auf die zelluläre Funktion des Phagenschock-Proteins LiaH ergab und des Weiteren vermutet wird, dass LiaH noch mit anderen Proteinen interagiert, wurde nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern gesucht. Dabei ergab eine umfassende BACTH-Analyse, dass LiaH in ein Interaktionsnetzwerk involviert ist, bei dem das Protein YvIB eine Schlüsselrolle übernimmt (Kapitel IV, Abb.IV.7).

YvlB ist im *yvlABCD*-Operon kodiert, welches unter der regulatorischen Kontrolle von σ^W steht (Wiegert *et al.*, 2001). Über die zelluläre Funktion dieses Operons ist nichts bekannt. Die Analyse der Proteinsequenzen der Gene des *yvlABCD*-Operons mittels der SMART-Datenbank ergab, dass es sich bei YvlA, YvlC und YvlD um potentielle Membranproteine handelt, wobei *yvlC* für ein Homolog des Phagenschock-Proteins C kodiert. Die Membranproteine YvlA und YvlC interagieren mit YvlB (Abb.IV.7). YvlB ist ein cytoplasmatisches Protein, welches durch eine COG3595-Domäne charakterisiert ist. In *B. subtilis* konnte lediglich ein weiteres Protein mit solch einer Domäne identifiziert werden, LiaG.

Die Funktion der COG3595-Domäne ist unklar, jedoch zeigt eine Analyse der Sekundärstruktur von YvlB und LiaG, dass diese Domäne aus einer multiplen Anzahl von β -Faltblättern besteht (Abb.IV.11). Eine Vorhersage der potentiellen Tertiärstruktur der beiden Proteine mittels der SMURF-Software erbrachte den Hinweis, dass es sich bei der Vielzahl von β -Faltblättern um ein β -Propeller Motiv handeln könnte. β -Propeller fungieren u.a. in der Signaltransduktion und bei Protein-Protein-Interaktionen, die genaue Funktion ist aber unklar (Fülöp & Jones, 1999, Menke *et al.*, 2010). Die topologische Untersuchung von LiaG ergab, dass die COG3595-Domäne, die einen potentiellen β -Propeller enthält, im extrazellulären Raum lokalisiert ist (Abb.IV.9). Durch die BACTH-Analyse konnte festgestellt werden, dass YvlB mit der Transmembranhelix von LiaG, aber nicht mit der COG3595-Domäne interagiert. YvlB interagiert auch mit LiaI sowie den beiden Phagenschock-Proteinen LiaH und PspA (Abb.IV.7). Die direkte Interaktion zwischen LiaH und YvlB konnte ebenfalls durch ein *Crosslink*-Experiment verifiziert werden (Abb.IV.8). Das bedeutet, dass LiaH durch Interaktion mit YvlB, welches wiederum mit weiteren Membranproteinen, z.B. LiaG, YvlA, YvlC interagiert, an die Membran assoziiert werden kann, ohne dass es einer Interaktion mit LiaI bedarf. PspA, welches ebenfalls mit YvlB interagiert, wird auch durch σ^W reguliert (Pietiäinen *et al.*, 2005, Wiegert *et al.*, 2001). Somit stellt YvlB nicht nur einen zentralen Punkt bei der Interaktion der Phagenschock-Homologe mit weiteren Interaktionspartnern dar, sondern bringt auch die durch σ^W -regulierte Zellhüllstressantwort mit dem Lia-System in Verbindung.

Eine Gemeinsamkeit beider Systeme besteht darin, dass diese durch Stress induziert werden, der die Integrität der Zellhülle beeinträchtigt. So wird sowohl das σ^W -Regulon als auch das Lia-System beispielsweise durch alkalischen Schock, Detergenzien und antibiotische Substanzen (KAP's, Vancomycin) sowie in der stationären Phase induziert

(Cao *et al.*, 2002a, Huang *et al.*, 1999, Pietiäinen *et al.*, 2005, Wiegert *et al.*, 2001). Eine Infektion von *B. subtilis* Zellen mit dem Phagen SPP1 hingegen führt zu einer Induktion der σ^W -abhängigen Stressantwort (z.B. PspA), aber nicht zu einer Expression des Lia-Systems (Wiegert *et al.*, 2001). Eine direkte σ^W -abhängige Induktion des *yvIABCD*-Operons bei einer Phageninfektion (SPP1) konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Jedoch wird z.B. in *L. lactis* das *ythABC*-Operon durch Infektion der Zellen mit dem Phagen c2 induziert. YthC aus *L. lactis* ist zu 24% identisch mit YvIB aus *B. subtilis* und ist ebenso ein cytoplasmatisches Protein, welches eine COG3595-Domäne besitzt. Die Gene *ythA* und *ythB* aus *L. lactis* kodieren, ebenso wie *yvIC* aus *B. subtilis*, für PspC-Homologe (Fallico *et al.*, 2011).

In seiner Rolle als zentrales Protein innerhalb des Interaktionsnetzwerkes von LiaH, interagiert YvIB noch mit drei weiteren Proteinen (Abb.IV.7). Hierbei handelt es sich um die Protease YjoB, die auch durch σ^W reguliert wird, und die Chaperone DnaK und HtpG, welche Homologe der Hitzeschock-Proteine (Hsp) 70 und 90 aus z.B. *A. thaliana* darstellen. YjoB gehört zur Familie der AAA⁺-ATPasen, die eine große Anzahl verschiedener Funktionen, z.B. Faltung und Degradierung von Proteinen, Assemblierung von Proteinkomplexen sowie Proteintransport ausführen (Kotschwar *et al.*, 2004, Ogura & Wilkinson, 2001). Die Expression von *yjoB* wird gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase induziert und ist absolut σ^W -abhängig (Kotschwar *et al.*, 2004). Die genaue Funktion von YjoB in *B. subtilis* ist unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass YjoB eine spezifische Rolle während der Übergangsphase einnimmt (Kotschwar *et al.*, 2004).

In *A. thaliana* interagieren Hsp70 und Hsp90 direkt mit dem Phagenschock-Homolog Vipp1 im Chloroplasten (Jouhet & Gray, 2009). Die Interaktion von Hsp70 und Vipp1 in der Grünalge *C. reinhardtii* resultiert in der Bildung von oligomeren Vipp1-Ringstrukturen, die wiederum an die Chloroplastenmembran assoziiert lokalisiert sind (Liu *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2005). Im Cyanobakterium *Synechococcus sp.* wird vermutet, dass das Hsp70-Homolog DnaK als Chaperon sowohl an der Ringformation von Vipp1 als auch an der Biogenese der Thylakoidenmembran beteiligt sein könnte (Nimura *et al.*, 1996). In den Chloroplasten von *C. reinhardtii* komplexiert Hsp90 zusammen mit Hsp70, Vipp1 und einem weiteren Hitzeschock-Protein, Hsp40 (Heide *et al.*, 2009). In *A. thaliana* scheint Hsp90 außerdem durch Interaktion mit Vipp1 an der Chloroplastenentwicklung sowie Thylakoidenbiogenese beteiligt zu sein (Cao *et al.*, 2003). Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Interaktion von Vipp1 mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 sowohl für die Oligomerisierung von Vipp1 als auch für die Assemblierung/Faltung von Proteinen

während der Thylakoidenbiogenese in den Cyanobakterien und höheren Pflanzen essentiell zu sein scheint.

In *B. subtilis* wäre es ebenso möglich, dass die Chaperone DnaK und HtpG über eine Interaktion mit YvlB an der Oligomerisierung von LiaH/PspA beteiligt sind. Es ist bisher nichts darüber bekannt, wie die Komplexierung von LiaH/PspA von statten geht. Auch ein Zusammenspiel der Chaperone sowie der Protease YjoB mit YvlB und den Phagenschock-Homologen LiaH und PspA als Reaktion auf Zellhüllstress kann nicht ausgeschlossen werden. So wäre es möglich, dass LiaH/PspA und HtpG, DnaK, YjoB über YvlB an die Zellmembran assoziiert werden, um dort Schäden durch Zellhüllstress entgegenzuwirken oder akkumulierte Proteine, die wiederum Stress auslösen, zu degradieren. Letztendlich sind jedoch noch weitere Experimente nötig, um Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion von LiaH im Zusammenhang mit YvlB und den Proteinen YjoB, DnaK sowie HtpG zu ziehen.

Ein anderer Aspekt bei der Suche nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern für LiaH ergab sich, nachdem kürzlich gezeigt wurde, dass PspA in *E. coli* Zellen sowohl polar als auch lateral lokalisiert ist. Diese dynamische Lokalisierung unterliegt dabei dem bakteriellen MreB-Cytoskelett, denn bei Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor von MreB (A22) oder bei einer Deletion von *mreB*, verschwand die Dynamik von PspA (Engl *et al.*, 2009). Eine direkte Interaktion von PspA und/oder weiteren Proteinen des Psp-Systems mit MreB konnte somit nicht ausgeschlossen werden. Eine BACTH-Analyse sowie *Crosslink*-Experimente ergaben, dass PspA mit MreB assoziiert, jedoch nicht direkt interagiert (Engl *et al.*, 2009). Im Falle von LiaH wurde, durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, ebenfalls eine Dynamik des Proteins in *B. subtilis* Zellen festgestellt (Abb.IV.3). Eine Assoziation von LiaH an das Cytoskelett wäre also praktisch auch hier denkbar, was jedoch durch weitere Untersuchungen belegt werden müsste. Ebenfalls zeigen bereits durchgeführte BACTH-Analysen, dass LiaH nicht mit MreB interagiert (R. Emmins (Universität Newcastle upon Tyne, 2007), persönliche Mitteilung). Es kann aber auch hier nicht ausgeschlossen, dass LiaH, ähnlich wie PspA in *E.coli*, über einen weiteren Interaktionspartner mit MreB interagiert. Auch diese Vermutung müsste detaillierter untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Beziehung von LiaH oder des Lia-Systems im Allgemeinen mit dem cytoskelettbildenden MreB besteht darin, dass MreB in Beziehung zur Zellwandbiosynthese steht. Sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien wurde ein Zusammenhang zwischen der zellulären Dynamik von MreB und der Zellwandbiosynthese gefunden (Dominguez-Escobar *et al.*,

2011, Garner *et al.*, 2011, van Teeffelen *et al.*, 2011). Eine Interaktion zwischen MreB und Transmembrankomponenten der Peptidoglycansynthese kann auf direkte oder indirekte Weise stattfinden (Mattei *et al.*, 2010). Eine Inhibition von Enzymen, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, führt zu einem Stopp der Dynamik von MreB (van Teeffelen & Gitai, 2011). In *E. coli* wurde auch gezeigt, dass durch die Inhibition von MreB durch A22 die Peptidoglycansynthese zu Erliegen kommt (Park & Uehara, 2008). Dieser Zustand könnte zur Anhäufung von Intermediaten der Peptidoglycansynthese in der Zellmembran führen, wodurch schließlich Stress entsteht, der wiederum zur Induktion der Phagenschock-Antwort führt (Engl *et al.*, 2009). Das Lia-System reagiert, genau wie das Psp-System auf Stressfaktoren, die die Integrität der Zellhülle beeinflussen. Außerdem wird das Lia-System zu Beginn der stationären Phase ohne einen externen Stimulus induziert (Jordan *et al.*, 2007). Während der Übergangsphase von der exponentiellen Wachstumsphase zur stationären Phase unterliegt die Zelle großen Veränderungen im Zell- sowie Energiestoffwechsel, um sich an die Umweltbedingungen der stationären Phase anzupassen (Msadek, 1999, Phillips & Strauch, 2002). Diese Veränderungen betreffen u.a. die Zellwandbiosynthese, denn die Zellen stoppen das Wachstum und daraus resultiert ein Stopp der Zellwandbiosynthese. Die Folge wäre auch hier eine Anhäufung von Intermediaten, die als Stressfaktoren zu einer Induktion des Lia-Systems führen könnten. Dabei könnte LiaH das Cytoskelett nutzen, um eine Stressantwort zu generieren. Begründet werden kann dies dadurch, dass in einer $\Delta mreB$ -Mutante in *E. coli* das *psp*-Operon zwar induziert werden kann, eine Phagenschock-Antwort, die zur Stabilisierung der elektronenmotorischen Kraft führt, jedoch nicht ausgelöst werden konnte (Engl *et al.*, 2009). Diese Beobachtung ist ein deutlicher Hinweis auf eine indirekte Interaktion zwischen Phagenschock-Antwort und bakteriellem Cytoskelett.

VI.5. Rolle von LiaH in der Proteinsekretion

Die Ergebnisse der Untersuchung des extrazellulären Proteoms in Kapitel V weisen eindeutig auf eine Rolle von LiaH als auch LiaI in der Proteinsekretion von *B. subtilis* hin. Hierbei konnte demonstriert werden, dass LiaH in Beziehung zu WapA steht (Abschnitte V.3.1. und V.3.3.). WapA (*w*all-*a*ssociated *p*rotein A) ist ein Protein mit einer Größe von ca. 230 kDa und gehört zur Familie der Oberflächen-assoziierten Proteine mit einem hohen Molekulargewicht. Mitglieder dieser Familie können unterschiedliche Funktionen in zellulären Prozessen, z.B. Zell-Adhäsion, Zellwand-Metabolismus, Pathogenität besitzen (Dartois *et al.*, 1998, Ferretti *et al.*, 1989).

Eine Analyse der Proteinsequenz mittels der SMART Datenbank ergab, dass WapA ein Signalpeptid besitzt und außerdem aus mehreren unbekanntem Domänen aufgebaut ist, die vermutlich in der Nährstofferschließung fungieren. Das Signalpeptid enthält ein potentiell *Twin-Arginine* Motiv, so dass WapA wahrscheinlich als bereits gefaltetes Protein über den Tat-Translokationsweg in den extrazellulären Raum transportiert wird (Antelmann *et al.*, 2001, Hirose *et al.*, 2000). Des Weiteren enthält die Sequenz von WapA sogenannte *wall-binding repeats*, die für eine Bindung des Proteins an die Zellwand wichtig sind (Antelmann *et al.*, 2001, Foster, 1993, Hirose *et al.*, 2000). Nach dem Export wird WapA in drei Moleküle der Größen 220, 109 und 58 kDa prozessiert (Antelmann *et al.*, 2001, Antelmann *et al.*, 2002, Foster, 1993, Hirose *et al.*, 2000). Die Funktion von WapA ist unklar. Eine Deletion von *wapA* wirkt sich im Vergleich zum Wildtyp nicht in einer veränderten Wachstumsrate, Sporulations- und Sporenkeimungsfähigkeit, Mobilisierung der Zellen (Schwärmen) oder in der Produktion von extrazellulären Proteasen und Amylasen aus (Foster, 1993).

Analysen des Sekretoms von *B. subtilis* zeigen, dass WapA sowohl in der exponentiellen als auch stationären Phase produziert wird (Antelmann *et al.*, 2001, Antelmann *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen sind mit den Ergebnissen des Chronotranskriptoms (Abb.IV.3) konform. In einer $\Delta degU32(hy)$ -Mutante (konstitutive Expression von *degU*) konnte WapA im Proteom nicht mehr identifiziert werden, was für eine negative Regulation der Expression von *wapA* durch den RR DegU spricht (Antelmann *et al.*, 2001). Des Weiteren wird die Expression von *wapA* unter Salz-Stress (0,7 M Dinatriumsuccinat) ebenfalls durch DegU negativ reguliert. Das DegSU-2KS spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Prozessen, die unter wachstumslimitierenden Bedingungen (post-exponentielle Wachstumsphase) stattfinden (Dartois *et al.*, 1998). So ist dieses 2KS beispielsweise an Vorgängen der Osmoregulation beteiligt (Mäder *et al.*, 2002, Msadek *et al.*, 1990).

Es wird spekuliert, dass WapA eventuell zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran führen könnte (Dartois *et al.*, 1998). Bei Betrachtung des Chronotranskriptoms von WapA ist zu sehen, dass *wapA* innerhalb der Wachstumsphasen zu zwei Zeitpunkten stark exprimiert wird, in der exponentiellen sowie in der stationären Phase (Abb.IV.3). Die exponentielle Wachstumsphase ist durch eine hohe zelluläre Stoffwechselaktivität gekennzeichnet (Antelmann *et al.*, 2002). Hier könnte WapA zu einem schnellen Austausch von Molekülen durch die Zellmembran beitragen. Die Expression von WapA in der stationären Phase wiederum könnte für die Aufnahme von freier DNA während der

Kompetenz von *B. subtilis* förderlich sein, denn eine $\Delta wapA$ -Mutante war auf natürliche Weise nicht mehr transformierbar (persönliche Beobachtung).

Wie oben bereits geschrieben, belegen Analysen des Sekretoms sowie des Chronotranskriptoms eine Verbindung zwischen WapA und dem Lia-System. WapA wird im Wildtyp während der exponentiellen Phase sekretiert. In der stationären Phase hingegen ist kein oder nur noch eine geringe Menge von WapA in Sekretom nachweisbar (Antelmann *et al.*, 2002). Das Sekretom einer $\Delta P_{liaI}liaIH$ -Mutante in der stationären Phase wies jedoch eine Vielzahl von Proteinen auf, die als prozessiertes WapA identifiziert werden konnten (Abb.V.1). Im extrazellulären Proteom des Wildtyps oder einer $\Delta liaF$ -Mutante („ON“-Mutante) hingegen, stellte sich keines der identifizierten Proteine als WapA heraus (Abb.V.1 und Anhang). Das bedeutet, dass WapA im Sekretom einer $\Delta P_{liaI}liaIH$ -Mutante stabilisiert zu sein scheint. Ein ähnliches Bild mit stabilen prozessierten WapA zeigte das Sekretom einer Mutante mit Deletionen extrazellulärer Proteasen ($\Delta aprE$, Δepr , $\Delta nprB$, $\Delta nprE$, Δmpr , Δbpr , Δvpr) (Antelmann *et al.*, 2002). Folgende Untersuchungen ergaben, dass prozessiertes WapA durch die Protease Epr degradiert wird (Antelmann *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass prozessiertes WapA im Sekretom einer $\Delta P_{liaI}liaIH$ -Mutante als auch in einer Δepr -Mutante stabil ist, lässt vermuten, dass LiaIH über die Protease Epr in Zusammenhang mit WapA zu stehen scheint. Die Protease Epr sowie das Lia-System werden in der stationären Phase exprimiert (Antelmann *et al.*, 2002, Jordan *et al.*, 2007). Hier kann spekuliert werden, dass LiaH möglicherweise als Adapterprotein für Chaperone fungieren könnte, die an der Translokation von Epr durch die Zellmembran beteiligt sind oder eventuell direkt mit Epr interagiert.

Die Daten des Chronotranskriptoms deuten aber auch darauf hin, dass das Lia-System auf transkriptioneller Ebene die Expression von *wapA* regulieren könnte. Ergebnisse von β -Galaktosidase-Assays zeigen eine starke Repression der Aktivität von P_{wapA} in einer $\Delta liaF$ -Mutante (Abb.V.4). Eine Deletion von *liaF* resultiert in einer starken konstitutiven Induktion des Lia-Lokus, so dass neben LiaIH auch der RR LiaR einen Einfluß auf die Transkription von *wapA* haben könnte. Bisher ist nur bekannt, dass LiaR als Induktor die Transkription des Lia-Lokus reguliert (Jordan *et al.*, 2006, Wolf *et al.*, 2010). Eine Funktion von LiaR als negativer Regulator ist bisher nicht beschrieben worden. Untersuchungen des Einflusses von *liaR*-Mutanten auf die Expression von P_{wapA} ergaben keine eindeutigen Hinweise (Abb.IV.4). Eine Promotordeletionsanalyse von P_{wapA} , die zur Bestimmung einer potentiellen LiaR-Bindestelle dienen sollte, verlief bisher erfolglos. Somit konnte letztlich nicht eindeutig aufgeklärt werden, ob LiaIH oder LiaR an der

negativen Regulation von *wapA* beteiligt sind und welchen Einfluss LiaH auf die Degradierung von prozessierten WapA im extrazellulären Proteom von *B. subtilis* hat.

VI.6. Rolle von LiaH im Energiestoffwechsel

Die Phagenschock-Antwort in *E. coli* wird auch durch das Ionophor CCCP induziert, welches die elektronenmotorische Kraft der Zellmembran zerstört (Weiner & Model, 1994). Da das Psp- und das Lia-System in ihren Induktionspektren überlappen (siehe Abschnitt VI.2.), wurde das Lia-System hinsichtlich der Induktion durch Defekte im Energiehaushalt untersucht. Generell ist die elektronenmotorische Kraft aus dem elektrischen Potential ($\Delta\psi$) und dem Protonengradienten (ΔH^+) aufgebaut. Das Ionophor CCCP führt zu einem Einstrom von H^+ ins Cytoplasma, was in einer Depolarisierung von $\Delta\psi$ als auch ΔH^+ entlang der Zellmembran resultiert (Engl *et al.*, 2011). Mittels β -Galaktosidase-Assays wurde überprüft, ob Ionophore auch zu einer Induktion von P_{liaI} führen. Da bereits bekannt war, dass P_{liaI} nicht durch CCCP induzierbar ist (Mascher *et al.*, 2004), wurde zu Vergleichszwecken Valinomycin getestet. Valinomycin, ein von *Streptomyces fulvissimus* gebildetes Makrolid-Antibiotika, führt in Anwesenheit von K^+ -Ionen zur Zerstörung des elektrischen Potentials ($\Delta\psi$) der Zellmembran, wobei der Protonengradient (ΔH^+) unangetastet bleibt (Engl *et al.*, 2011, Paul *et al.*, 2008). Die Untersuchungen der Aktivität von P_{liaI} unter Einfluss von CCCP und Valinomycin ergaben, dass keines der getesteten Ionophore zur Induktion des Lia-Lokus führt (Abschnitt V.3.5.). In *E. coli* führt nur CCCP und nicht etwa Valinomycin oder Acetat (zerstört ΔH^+) zur Induktion der Phagenschock-Antwort (Engl *et al.*, 2011, Weiner & Model, 1994). Somit stellt die Zerstörung des Protonengradienten oder des Elektronenpotentials per se nicht das induzierende Signal für das Psp-System dar (Engl *et al.*, 2011). Ebenso könnte ein Zusammenspiel sekundärer Effekte, die aus der Beeinträchtigung oder dem Verlust der protonenmotorischen Kraft resultieren, zur Induktion der Phagenschock-Antwort führen. Die elektronenmotorische Kraft wird an der Zellmembran generiert. Eine Induktion des Psp-Systems, ausgelöst durch physikalische und chemische Änderungen in der Zellmembran sowie Modifikation der Zell-Physiologie, kann also auch nicht ausgeschlossen werden (Engl *et al.*, 2011). Diese Vermutung kann durch folgende Beobachtungen untermauert werden: Deletionen der F_1F_0 ATPase in *Y. enterocolytica*, *S. enterica* und *E. coli* führen zur Induktion der Phagenschock-Antwort und einer damit einhergehenden starken Expression von PspA (Becker *et al.*, 2005, Maxson & Darwin, 2004). Ebenso ist in *E. coli* auch in einer $\Delta yidC$ -Mutante eine starke Aktivität des Psp-

Systems zu beobachten (van der Laan *et al.*, 2003). YidC ist eine Insertase, die essentiell für die Insertion von Membranproteinen des SecYEG-Tanslokationsweges sowie für die Assemblierung der F₁F₀ ATPase und der Cytochrom-*o*-Oxidase ist (van der Laan *et al.*, 2003). In beiden Fällen können sich bei einer Deletion von *yidC*, Proteine in der Zellmembran anhäufen, die letztlich in zellulären physiologischen Veränderungen resultieren. Diese Veränderungen wiederum können als Induktoren des Psp-Systems fungieren.

Diese Hypothese kann auch auf das Lia-System übertragen werden. In *B. subtilis* führt eine Deletion der YidC-Homologe SpoIIIJ und YqjG zu einer starken Induktion des Lia-Systems (Saller *et al.*, 2009). Beide Proteine sind für die Insertion der F₀c-Untereinheit der F₁F₀ ATPase in die Zellmembran und damit für eine funktionale ATPase verantwortlich. Eine Akkumulierung von missgefalteten Proteinen in der Zellmembran ist in der $\Delta spoIIIJ/\Delta yqjG$ -Mutante also ebenfalls denkbar und dies könnte zur Induktion des Lia-Systems führen. Somit könnte die Frage, welches Signal zur Induktion des Lia-Systems führt, mit drei Möglichkeiten beantwortet werden: eine Akkumulierung von missgefalteten Proteinen und damit einhergehender Stress, eine nicht funktionsfähige F₁F₀ ATPase oder der daraus resultierende niedrige Energiestatus der Zelle. Die Möglichkeit der nicht funktionsfähigen F₁F₀ ATPase als Signal für das LiaRS-2KS wurde untersucht, indem die Rotationsfähigkeit der F₁F₀ ATPase und damit die Bildung von ATP durch die Chemikalie Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) gehemmt wurden. DCCD führte nicht zur Induktion des Lia-Systems, womit die Hemmung der F₁F₀ ATPase als Signal für das LiaRS-2KS ausscheidet. Sekundäre Effekte (z.B. starke Schwankungen im Energiehaushalt der Zelle), die sich aufgrund der nicht funktionierenden F₁F₀ ATPase ergeben, könnten jedoch als Signal fungieren. Dies sollte in naher Zukunft getestet werden, um einen weiteren Teil zur Aufklärung der zellulären Funktion des Lia-Systems (im speziellen LiaH) beizutragen.

VI.7. Ausblick

Aus den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen ergibt sich eine Reihe von Einblicken in die zelluläre Funktion des Lia-Systems und im Speziellen des Phagenschock-Proteins LiaH in *B. subtilis*. Die LiaR-vermittelte Zellhüllstressantwort wird stark durch antibiotische Substanzen, die in den Lipid II-Zyklus eingreifen (z.B. Bacitracin, Mersacidin, Vancomycin, Enduracidin) als auch die Integrität der Zellmembran stören (z.B. Daptomycin), induziert. Im Gegensatz zu anderen Zellhüllstressantwort-Systemen in *B. subtilis*, z.B. BceRS-AB, PsdRS-AB, vermittelt das Lia-System jedoch keine Resistenz

gegen spezifische Antibiotika. Da bekannt ist, dass das Lia-System zu Beginn der stationären Phase ohne einen externen Stimulus induziert wird, stellt sich die Frage, welche Gemeinsamkeiten die durch Antibiotika gestressten Zellen mit Zellen besitzen, die sich in der stationären Phase befinden. Eine Antwort darauf wäre, dass sich *B. subtilis* Zellen in der stationären Phase ebenfalls in einem Zellhüllstress-Zustand befinden. In der stationären Phase wird dieser Stress ausgelöst durch z.B. Veränderung des pH-Wertes, Ausscheidung von sekundären Stoffwechselendprodukten. In der Vielzahl der Fälle sind diese Stoffwechselendprodukte antimikrobiell wirksam und können sich auch gegen Zellen der gleichen Art richten. So produziert *B. subtilis* beispielsweise antimikrobielle Peptide, die sich gegen andere Zellen innerhalb einer Population richten (Kannibalismus) und einen Selektionsvorteil darstellen (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003). Gleichzeitig haben kannibalische Zellen Immunitätsmechanismen entwickelt, um einer Attacke ihrer eigens produzierten antimikrobiellen Peptide zu entgehen. Die Immunitätsentwicklung sowie die Toxinproduktion sind eng an die Sporulation und den Regulator Spo0A gekoppelt. Nichtsporulierende Zellen stellen somit ein primäres Ziel dieser antimikrobiellen Toxine dar (Gonzalez-Pastor, 2011). Die stationäre Phase-Induktion der σ^W -abhängigen Stressantwort in nichtsporulierenden Zellen stellt einen Resistenzmechanismus dar, der in der Abwehr der antimikrobiellen Peptide von kanibalischen *B. subtilis* Zellen fungiert (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003).

Generell kommt es in den Zellen, die sich in der stationären Phase befinden, zu großen physiologischen Veränderungen. So werden beispielsweise Stoffwechselprozesse der exponentiellen Wachstumsphase stark reprimiert; bei Sauerstofflimitierung wird die Zelle auf anaerobe Atmung umgestellt; die Zellen werden kompetent, um freie DNA aufzunehmen oder sie beginnen zu sporulieren. Des Weiteren wird die Zellwandbiosynthese gestoppt, wodurch sich Peptidoglycan-Vorläufer im Cytoplasma als auch in der Zellmembran anhäufen und wiederum Zellhüll- als auch Sekretionsstress auslösen können. Der physiologische Stopp der Zellwandbiosynthese in der stationären Phase ist mit der Wirkung der Antibiotika, die das Lia-System induzieren, vergleichbar. In beiden Fällen kommt es zur Aggregation von Zellwand-Vorläufern in der Zellmembran. Des Weiteren resultieren viele dieser zellulären Veränderungen in einem Absinken des Energielevels und des Membranpotentials der Zelle, was ebenfalls zu Stress führt. Ein weiterer Aspekt ist die Bildung von sekundären Stoffwechselendprodukten, die eine antibiotische Wirkung besitzen. Das Hauptangriffsziel dieser antimikrobiellen Sekundärprodukte ist die Zellhülle, wodurch Zellhüllstress ausgelöst wird. Das Lia-System

scheint also direkt als eine Art homöostatisches System in die zellulären Veränderungen während der stationären Phase involviert zu sein. Dabei könnten Veränderungen der Membranintegrität sowie der Komposition der Zellmembran (*membrane trafficking*), die beispielsweise durch das Stoppen der Zellwandbiosynthese entstehen, als Signale dienen, die neben der Regulation des Lia-Systems durch AbrB/Spo0A zur Induktion des Lia-Systems führen könnten. Die Zielfunktion des Lia-Systems liegt vermutlich im Schutz der Zellhülle, eventuell auch nur der Zellmembran, wenn die Zelle aus der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Ruhephase übertritt. Die Feststellung, dass LiaH als Zielprotein der LiaR-abhängigen Regulation des Lia-Systems, in ein großes Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk eingebettet ist, verdeutlicht die potentielle Funktion des Lia-Systems während der Homöostase von *B. subtilis* auf anschauliche Weise. Von dieser vermuteten Zielfunktion des Lia-Systems und des Phagenschock-Proteins LiaH ausgehend, sollte daher in naher Zukunft das Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk näher betrachtet und analysiert werden. Da die Stressfaktoren, die zur Induktion des Lia-Systems führen, letztlich alle die Gemeinsamkeit besitzen, dass diese zu einer Akkumulierung von Proteinen führen oder in einer Beeinträchtigung der Membran-Komposition resultieren, sollte diese Veränderungen als mögliches Induktionssignal für das Lia-System ebenso detaillierter untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der umfangreicher analysiert werden sollte, ist die Rolle von LiaH in der Proteinsekretion von *B. subtilis*. Hier könnten weitere Untersuchungen, tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen, die diesem Einfluß zugrunde liegen, gewähren.

Referenzen

- Adams, H., W. Teertstra, J. Demmers, R. Boesten & J. Tommassen, (2003) Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 1174-1180.
- Adams, H., W. Teertstra, M. Koster & J. Tommassen, (2002) PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. *FEBS Lett* **518**: 173-176.
- Alba, B. M. & C. A. Gross, (2004) Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**: 613-619.
- Alm, E. J., K. H. Huang, M. N. Price, R. P. Koche, K. Keller, I. L. Dubchak & A. P. Arkin, (2005) The MicrobesOnline web site for comparative genomics. *Genome Res* **15**: 1015-1022.
- Antelmann, H., H. Tjalsma, B. Voigt, S. Ohlmeier, S. Bron, J. M. van Dijl & M. Hecker, (2001) A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res* **11**: 1484-1502.
- Antelmann, H., H. Yamamoto, J. Sekiguchi & M. Hecker, (2002) Stabilization of cell wall proteins in *Bacillus subtilis*: a proteomic approach. *Proteomics* **2**: 591-602.
- Arnaud, M., A. Chastanet & M. Debarbouille, (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.
- Aseeva, E., F. Ossenbuhl, L. A. Eichacker, G. Wanner, J. Soll & U. C. Vothknecht, (2004) Complex formation of Vipp1 depends on its α -helical PspA-like domain. *J Biol Chem* **279**: 35535-35541.
- Baldi, P. & A. D. Long, (2001) A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* **17**: 509-519.
- Becker, L. A., I.-S. Bang, M.-L. Crouch & F. C. Fang, (2005) Compensatory role of PspA, a member of the phage shock protein operon, in *rpoE* mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* **56**: 1004-1016.
- Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille & J. M. Ghigo, (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* **51**: 659-674.
- Bergler, H., D. Abraham, H. Aschauer & F. Turnowsky, (1994) Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the *pspA* gene. *Microbiology* **140** (Pt 8): 1937-1944.
- Blom, E. J., A. N. Ridder, A. T. Lulko, J. B. Roerdink & O. P. Kuipers, (2011) Time-resolved transcriptomics and bioinformatic analyses reveal intrinsic stress responses during batch culture of *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **6**: e27160.
- Bochner, B. R., P. Gadzinski & E. Panomitros, (2001) Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* **11**: 1246-1255.
- Bos, M. P., V. Robert & J. Tommassen, (2007) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**: 191-214.
- Bosch, D. & J. Tommassen, (1987) Effects of linker insertions on the biogenesis and functioning of the *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE. *Mol Gen Genet* **208**: 485-489.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick & R. Kolter, (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11621-11626.
- Brass, J. M., C. F. Higgins, M. Foley, P. A. Rugman, J. Birmingham & P. B. Garland, (1986) Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 787-795.
- Breukink, E., I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. Sahl & B. de Kruijff, (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **286**: 2361-2364.
- Brissette, J. L., M. Russel, L. Weiner & P. Model, (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 862-866.
- Brissette, J. L., L. Weiner, T. L. Ripmaster & P. Model, (1991) Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Mol Biol* **220**: 35-48.
- Brötz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum & H. G. Sahl, (1998) Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol* **30**: 317-327.
- Brown, E. D., E. I. Vivas, C. T. Walsh & R. Kolter, (1995) MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 4194-4197.
- Bultema, J. B., E. Fuhrmann, E. J. Boekema & D. Schneider, (2010) Vipp1 and PspA: Related but not twins. *Commun Integr Biol* **3**: 162-165.
- Butcher, B. G. & J. D. Helmann, (2006) Identification of *Bacillus subtilis* s^W -dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Mol Microbiol* **60**: 765-782.
- Büttner, K., J. Bernhardt, C. Scharf, R. Schmid, U. Mäder, C. Eymann, H. Antelmann, A. Völker, U. Völker & M. Hecker, (2001) A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **22**: 2908-2935.
- Cao, D., J. E. Froehlich, H. Zhang & C. L. Cheng, (2003) The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant cr88 encodes a chloroplast-targeted HSP90. *Plant J* **33**: 107-118.
- Cao, M., B. A. Bernat, Z. Wang, R. N. Armstrong & J. D. Helmann, (2001) FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of s^W , an extracytoplasmic-function s factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 2380-2383.
- Cao, M. & J. D. Helmann, (2004) The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function s^X factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **186**: 1136-1146.
- Cao, M., P. A. Kobel, M. M. Morshedi, M. F. Wu, C. Paddon & J. D. Helmann, (2002a) Defining the *Bacillus subtilis* s^W regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/macroarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* **316**: 443-457.
- Cao, M., T. Wang, R. Ye & J. D. Helmann, (2002b) Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* s^W and s^M regulons. *Mol Microbiol* **45**: 1267-1276.
- Cole, C., J. D. Barber & G. J. Barton, (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **36**: W197-W201.
- Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory & I. Stainier, (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315-1352.
- Daley, D. O., M. Rapp, E. Granseth, K. Melen, D. Drew & G. von Heijne, (2005) Global Topology Analysis of the *Escherichia coli* Inner Membrane Proteome. *Science* **308**: 1321-1323.

- Danese, P. N., L. A. Pratt & R. Kolter, (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**: 3593-3596.
- Dartois, V., M. Debarbouille, F. Kunst & G. Rapoport, (1998) Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 1855-1861.
- Darwin, A. J., (2005) The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol* **57**: 621-628.
- Darwin, A. J. & V. L. Miller, (1999) Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **32**: 51-62.
- Darwin, A. J. & V. L. Miller, (2001) The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth *in vitro* when the Ysc type III secretion system is produced. *Mol Microbiol* **39**: 429-445.
- Delcour, J., T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo & P. Hols, (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 159-184.
- DeLisa, M. P., P. Lee, T. Palmer & G. Georgiou, (2004) Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *J Bacteriol* **186**: 366-373.
- DiGiuseppe, P. A. & T. J. Silhavy, (2003) Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *J Bacteriol* **185**: 2432-2440.
- Dijkstra, A. J. & W. Keck, (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J Bacteriol* **178**: 5555-5562.
- Doerrler, W. T., H. S. Gibbons & C. R. Raetz, (2004) MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 45102-45109.
- Dominguez-Escobar, J., A. Chastanet, A. H. Crevenna, V. Fromion, R. Wedlich-Soldner & R. Carballido-Lopez, (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**: 225-228.
- Driessen, A. J. & N. Nouwen, (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* **77**: 643-667.
- Duguay, A. R. & T. J. Silhavy, (2004) Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 121-134.
- Dworkin, J., G. Jovanovic & P. Model, (2000) The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. *J Bacteriol* **182**: 311-319.
- Eiamphungporn, W. & J. D. Helmann, (2008) The *Bacillus subtilis* s^M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol Microbiol* **67**: 830-848.
- Eldholm, V., B. Gutt, O. Johnsborg, R. Bruckner, P. Maurer, R. Hakenbeck, T. Mascher & L. S. Havarstein, (2010) The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *J Bacteriol* **192**: 1761-1773.
- Engl, C., A. T. Beek, M. Bekker, J. T. de Mattos, G. Jovanovic & M. Buck, (2011) Dissipation of proton motive force is not sufficient to induce the phage shock protein response in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **62**: 1374-1385.
- Engl, C., G. Jovanovic, L. J. Lloyd, H. Murray, M. Spitaler, L. Ying, J. Errington & M. Buck, (2009) In vivo localizations of membrane stress controllers PspA and PspG in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**: 382-396.
- Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen & J. C. D. Hinton, (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103-118.

- Estacio, W., S. S. Anna-Arriola, M. Adedipe & L. M. Marquez-Magana, (1998) Dual promoters are responsible for transcription initiation of the *fla*/*che* operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 3548-3555.
- Fallico, V., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald & O. McAuliffe, (2011) Genetic response to bacteriophage infection in *Lactococcus lactis* reveals a four-strand approach involving induction of membrane stress proteins, D-alanylation of the cell wall, maintenance of proton motive force, and energy conservation. *J Virol* **85**: 12032-12042.
- Ferretti, J. J., R. R. Russell & M. L. Dao, (1989) Sequence analysis of the wall-associated protein precursor of *Streptococcus mutans* antigen A. *Mol Microbiol* **3**: 469-478.
- Feucht, A. & P. J. Lewis, (2001) Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **264**: 289-297.
- Foster, S. J., (1993) Molecular analysis of three major wall-associated proteins of *Bacillus subtilis* 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein. *Mol Microbiol* **8**: 299-310.
- Foster, S. J. & D. L. Popham, (2002) Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acid, S-layers and capsules. In: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives From Genes to Cells*. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 21-41.
- Fritsch, F., N. Mauder, T. Williams, J. Weiser, M. Oberle & D. Beier, (2011) The cell envelope stress response mediated by the LiaFSR_{Lm} three-component system of *Listeria monocytogenes* is controlled via the phosphatase activity of the bifunctional histidine kinase LiaS_{Lm}. *Microbiology* **157**: 373-386.
- Fuhrmann, E., J. B. Bultema, U. Kahmann, E. Rupprecht, E. J. Boekema & D. Schneider, (2009) The vesicle-inducing protein 1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 organizes into diverse higher-ordered ring structures. *Mol Biol Cell* **20**: 4620-4628.
- Fülöp, V. & D. T. Jones, (1999) Beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 715-721.
- Garner, E. C., R. Bernard, W. Wang, X. Zhuang, D. Z. Rudner & T. Mitchison, (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**: 222-225.
- Gonzalez-Pastor, J. E., (2011) Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 415-424.
- Gonzalez-Pastor, J. E., E. C. Hobbs & R. Losick, (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**: 510-513.
- Gottesman, S., P. Trisler & A. Torres-Cabassa, (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* **162**: 1111-1119.
- Green, R. C. & A. J. Darwin, (2004) PspG, a new member of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein regulon. *J Bacteriol* **186**: 4910-4920.
- Guariglia-Oropeza, V. & J. D. Helmann, (2011) *Bacillus subtilis* sigma(V) confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan O-acetylation and D-alanylation of teichoic acids. *J Bacteriol* **193**: 6223-6232.
- Guerout-Fleury, A. M., N. Frandsen & P. Stragier, (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**: 57-61.
- Hachmann, A.-B., E. R. Angert & J. D. Helmann, (2009) Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1598-1609.
- Hamze, K., D. Julkowska, S. Autret, K. Hinc, K. Nagorska, A. Sekowska, I. B. Holland & S. J. Seror, (2009) Identification of genes required for different stages of dendritic

- swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for *phrC*. *Microbiology* **155**: 398-412.
- Hankamer, B. D., S. L. Elderkin, M. Buck & J. Nield, (2004) Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring. *J Biol Chem* **279**: 8862-8866.
- Harwood, C. R. & S. M. Cutting, (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Hassani, A. S., N. Amirmozafari & A. Ghaemi, (2009) Virulence increasing of *Salmonella typhimurium* in Balb/c mice after heat-stress induction of phage shock protein A. *Curr Microbiol* **59**: 446-450.
- Heide, H., A. Nordhues, F. Drepper, S. Nick, M. Schulz-Raffelt, W. Haehnel & M. Schroda, (2009) Application of quantitative immunoprecipitation combined with knockdown and cross-linking to *Chlamydomonas* reveals the presence of vesicle-inducing protein in plastids 1 in a common complex with chloroplast HSP90C. *Proteomics* **9**: 3079-3089.
- Helmann, J. D., (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Helmann, J. D., (2006) Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* σ^W protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Sci Prog* **89**: 243-266.
- Herzberg, C., L. A. Weidinger, B. Dörrbecker, S. Hübner, J. Stülke & F. M. Commichau, (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* **7**: 4032-4035.
- Hirakawa, H., K. Nishino, J. Yamada, T. Hirata & A. Yamaguchi, (2003) b-Lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **52**: 576-582.
- Hirose, I., K. Sano, I. Shioda, M. Kumano, K. Nakamura & K. Yamane, (2000) Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* **146** (Pt 1): 65-75.
- Homuth, G., S. Masuda, A. Mogk, Y. Kobayashi & W. Schumann, (1997) The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J Bacteriol* **179**: 1153-1164.
- Huang, X., A. Gaballa, M. Cao & J. D. Helmann, (1999) Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function σ factor, σ^W . *Mol Microbiol* **31**: 361-371.
- Hyryläinen, H. L., M. Sarvas & V. P. Kontinen, (2005) Transcriptome analysis of the secretion stress response of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 389-396.
- Joly, N., P. C. Burrows, C. Engl, G. Jovanovic & M. Buck, (2009) A lower-order oligomer form of phage shock protein A (PspA) stably associates with the hexameric AAA(+) transcription activator protein PspF for negative regulation. *J Mol Biol* **394**: 764-775.
- Joly, N., C. Engl, G. Jovanovic, M. Huvet, T. Toni, X. Sheng, M. P. Stumpf & M. Buck, (2010) Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 797-827.
- Jones, S. E., L. J. Lloyd, K. K. Tan & M. Buck, (2003) Secretion defects that activate the phage shock response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 6707-6711.
- Jordan, S., M. I. Hutchings & T. Mascher, (2008) Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 107-146.
- Jordan, S., A. Junker, J. D. Helmann & T. Mascher, (2006) Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: Identification of inhibitor proteins, regulator

- binding sites and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *J Bacteriol* **188**: 5153-5166.
- Jordan, S., E. Rietkötter, M. A. Strauch, F. Kalamorz, B. G. Butcher, J. D. Helmann & T. Mascher, (2007) LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **153**: 2530-2540.
- Joseph, P., J. R. Fantino, M. L. Herbaud & F. Denizot, (2001) Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 91-97.
- Joseph, P., A. Guiseppi, A. Sorokin & F. Denizot, (2004) Characterization of the *Bacillus subtilis* YxdJ response regulator as the inducer of expression for the cognate ABC transporter YxdLM. *Microbiology* **150**: 2609-2617.
- Jouhet, J. & J. C. Gray, (2009) Is chloroplast import of photosynthesis proteins facilitated by an actin-TOC-TIC-VIPP1 complex? *Plant Signal Behav* **4**: 986-988.
- Jovanovic, G., C. Engl & M. Buck, (2009) Physical, functional and conditional interactions between ArcAB and phage shock proteins upon secretin-induced stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **74**: 16-28.
- Jovanovic, G., L. J. Lloyd, M. P. H. Stumpf, A. J. Mayhew & M. Buck, (2006) Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 21147-21161.
- Jovanovic, G., L. Weiner & P. Model, (1996) Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol* **178**: 1936-1945.
- Jürgen, B., S. Tobisch, M. Wümpelmann, D. Gördes, A. Koch, K. Thurow, D. Albrecht, M. Hecker & T. Schweder, (2005) Global expression profiling of *Bacillus subtilis* cells during industrial-close fed-batch fermentations with different nitrogen sources. *Biotechnol Bioeng* **92**: 277-298.
- Kahan, F. M., J. S. Kahan, P. J. Cassidy & H. Kropp, (1974) The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* **235**: 364-386.
- Kahne, D., C. Leimkuhler, W. Lu & C. Walsh, (2005) Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev* **105**: 425-448.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann & D. Ladant, (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.
- Kimura, K. & T. D. Bugg, (2003) Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis. *Nat Prod Rep* **20**: 252-273.
- Kingston, A. W., C. Subramanian, C. O. Rock & J. D. Helmann, (2011) A sigmaW-dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity. *Mol Microbiol* **81**: 69-79.
- Kleerebezem, M., W. Crielaard & J. Tommassen, (1996) Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *Embo J* **15**: 162-171.
- Kleerebezem, M. & J. Tommassen, (1993) Expression of the *pspA* gene stimulates efficient protein export in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **7**: 947-956.
- Klose, J., (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**: 231-243.
- Kobayashi, R., T. Suzuki & M. Yoshida, (2007) *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol Microbiol* **66**: 100-109.
- Koebnik, R., K. P. Locher & P. Van Gelder, (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**: 239-253.

- Kossen, K. & O. C. Uhlenbeck, (1999) Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Res* **27**: 3811-3820.
- Kotschwar, M., S. Diermeier & W. Schumann, (2004) The *yjoB* gene of *Bacillus subtilis* encodes a protein that is a novel member of the AAA family. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 241-249.
- Kouranov, A. & D. J. Schnell, (1996) Protein translocation at the envelope and thylakoid membranes of chloroplasts. *J Biol Chem* **271**: 31009-31012.
- Krojer, T., J. Sawa, E. Schafer, H. R. Saibil, M. Ehrmann & T. Clausen, (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**: 885-890.
- Kroll, D., K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U. C. Vothknecht, J. Soll & P. Westhoff, (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4238-4242.
- Kuehn, M. J. & N. C. Kesty, (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**: 2645-2655.
- Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori & K. Hiramatsu, (2003) Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **49**: 807-821.
- Laubacher, M. E. & S. E. Ades, (2008) The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 2065-2074.
- Leblanc, S. K. D., C. W. Oates & T. L. Raivio, (2011) Characterization of the Induction and Cellular Role of the BaeSR Two-Component Envelope Stress Response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**: 3367-3375.
- Lewis, P. J. & A. L. Marston, (1999) GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **227**: 101-110.
- Liu, C., F. Willmund, J. R. Golecki, S. Cacace, B. Hess, C. Markert & M. Schroda, (2007) The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant J* **50**: 265-277.
- Liu, C., F. Willmund, J. P. Whitelegge, S. Hawat, B. Knapp, M. Lodha & M. Schroda, (2005) J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids 1. *Mol Biol Cell* **16**: 1165-1177.
- Lloyd, L. J., S. E. Jones, G. Jovanovic, P. Gyaneshwar, M. D. Rolfe, A. Thompson, J. C. Hinton & M. Buck, (2004) Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG). *J Biol Chem* **279**: 55707-55714.
- Lovering, A. L., L. H. de Castro, D. Lim & N. C. Strynadka, (2007) Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* **315**: 1402-1405.
- Lukat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock & J. B. Stock, (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 718-722.
- Mäder, U., H. Antelmann, T. Buder, M. K. Dahl, M. Hecker & G. Homuth, (2002) *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol Genet Genomics* **268**: 455-467.
- Markham, R., S. Frey & G. J. Hills, (1963) Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology* **20**: 88-102.

- Martinez, B., A. L. Zomer, A. Rodriguez, J. Kok & O. P. Kuipers, (2007) Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the lactococcal two-component system CesSR. *Molecular Microbiology* **64**: 473-486.
- Mascher, T., J. D. Helmann & G. Uden, (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **90**: 910-938.
- Mascher, T., N. G. Margulis, T. Wang, R. W. Ye & J. D. Helmann, (2003) Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* **50**: 1591-1604.
- Mascher, T., S. L. Zimmer, T. A. Smith & J. D. Helmann, (2004) Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2888-2896.
- Mattei, P. J., D. Neves & A. Dessen, (2010) Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 749-755.
- Maxson, M. E. & A. J. Darwin, (2004) Identification of inducers of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein system and comparison to the regulation of the RpoE and Cpx extracytoplasmic stress responses. *J Bacteriol* **186**: 4199-4208.
- Maxson, M. E. & A. J. Darwin, (2006) Multiple promoters control expression of the *Yersinia enterocolitica* phage-shock-protein A (*pspA*) operon. *Microbiology* **152**: 1001-1010.
- McBroom, A. J., A. P. Johnson, S. Vemulapalli & M. J. Kuehn, (2006) Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol* **188**: 5385-5392.
- McBroom, A. J. & M. J. Kuehn, (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* **63**: 545-558.
- McCallum, N., P. S. Meier, R. Heusser & B. Berger-Bachi, (2011) Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 1391-1402.
- Menke, M., B. Berger & L. Cowen, (2010) Markov random fields reveal an N-terminal double beta-propeller motif as part of a bacterial hybrid two-component sensor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4069-4074.
- Miller, J. H., (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Model, P., G. Jovanovic & J. Dworkin, (1997) The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol Microbiol* **24**: 255-261.
- Moir, A. & D. A. Smith, (1990) The genetics of bacterial spore germination. *Annu Rev Microbiol* **44**: 531-553.
- Msadek, T., (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* **7**: 201-207.
- Msadek, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport & R. Dedonder, (1990) Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J Bacteriol* **172**: 824-834.
- Muthaiyan, A., J. A. Silverman, R. K. Jayaswal & B. J. Wilkinson, (2008) Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 980-990.
- Nakano, M. M., M. A. Marahiel & P. Zuber, (1988) Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**: 5662-5668.

- Narita, S. & H. Tokuda, (2006) An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett* **580**: 1164-1170.
- Nasser, W., A. C. Awade, S. Reverchon & J. Robert-Baudouy, (1993) Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Lett* **335**: 319-326.
- Neuhaus, F. C. & J. Baddiley, (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 686-723.
- Neuhaus, F. C. & W. P. Hammes, (1981) Inhibition of cell wall biosynthesis by analogues and alanine. *Pharmacol Ther* **14**: 265-319.
- Nimura, K., H. Yoshikawa & H. Takahashi, (1996) DnaK3, one of the three DnaK proteins of cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC7942, is quantitatively detected in the thylakoid membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 334-340.
- Nordhues, A., M. A. Schottler, A. K. Unger, S. Geimer, S. Schonfelder, S. Schmollinger, M. Rutgers, G. Finazzi, B. Soppa, F. Sommer, T. Muhlhaus, T. Roach, A. Krieger-Liszky, H. Lokstein, J. L. Crespo & M. Schroda, (2012) Evidence for a Role of VIPP1 in the Structural Organization of the Photosynthetic Apparatus in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*.
- O'Farrell, P. H., (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021.
- Ogura, M., L. Liu, M. Lacelle, M. M. Nakano & P. Zuber, (1999) Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 799-812.
- Ogura, T. & A. J. Wilkinson, (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**: 575-597.
- Ohki, R., Giyanto, K. Tateno, W. Masuyama, S. Moriya, K. Kobayashi & N. Ogasawara, (2003a) The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 1135-1144.
- Ohki, R., K. Tateno, Y. Okada, H. Okajima, K. Asai, Y. Sadaie, M. Murata & T. Aiso, (2003b) A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol* **185**: 51-59.
- Paetzel, M., A. Karla, N. C. Strynadka & R. E. Dalbey, (2002) Signal peptidases. *Chem Rev* **102**: 4549-4580.
- Park, J. T. & T. Uehara, (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 211-227.
- Paul, K., M. Erhardt, T. Hirano, D. F. Blair & K. T. Hughes, (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**: 489-492.
- Perego, M., P. Glaser, A. Minutello, M. A. Strauch, K. Leopold & W. Fischer, (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J Biol Chem* **270**: 15598-15606.
- Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Völker & M. Hecker, (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.
- Phillips, Z. E. & M. A. Strauch, (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* **59**: 392-402.
- Pietäinen, M., M. Gardemeister, M. Mecklin, S. Leskela, M. Sarvas & V. P. Kontinen, (2005) Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* **151**: 1577-1592.

- Raetz, C. R. H. & C. Whitfield, (2002) LIPOPOLYSACCHARIDE ENDOTOXINS. *Annu Rev Biochem* **71**: 635-700.
- Raffa, R. G. & T. L. Raivio, (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **45**: 1599-1611.
- Raivio, T. & T. Silhavy, (1997) Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol* **179**: 7724-7733.
- Raivio, T. L., (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Molecular Microbiology* **56**: 1119-1128.
- Raivio, T. L. & T. J. Silhavy, (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**: 591-624.
- Rietkötter, E., D. Hoyer & T. Mascher, (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**: 768-785.
- Ruiz, N., L. S. Gronenberg, D. Kahne & T. J. Silhavy, (2008) Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5537-5542.
- Ruiz, N. & T. J. Silhavy, (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol* **8**: 122-126.
- Rukmana, A., T. Morimoto, H. Takahashi, Giyanto & N. Ogasawara, (2009) Assessment of transcriptional responses of *Bacillus subtilis* cells to the antibiotic enduracidin, which interferes with cell wall synthesis, using a high-density tiling chip. *Genes Genet Syst* **84**: 253-267.
- Sahl, H. G. & G. Bierbaum, (1998) Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**: 41-79.
- Sailer, F. C., B. M. Meberg & K. D. Young, (2003) beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 245-249.
- Saller, M. J., F. Fusetti & A. J. Driessen, (2009) *Bacillus subtilis* SpoIIIJ and YqjG function in membrane protein biogenesis. *J Bacteriol* **191**: 6749-6757.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular Cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schäffer, C. & P. Messner, (2005) The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology* **151**: 643-651.
- Schneider, T., K. Gries, M. Josten, I. Wiedemann, S. Pelzer, H. Labischinski & H. G. Sahl, (2009) The lipopeptide antibiotic friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1610-1618.
- Schneider, T. & H.-G. Sahl, (2010) An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 161-169.
- Schöbel, S., S. Zellmeier, W. Schumann & T. Wiegert, (2004) The *Bacillus subtilis* s^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol Microbiol* **52**: 1091-1105.
- Schrecke, K., A. Staron & T. Mascher, (2011) Two-component signaling in the Gram-positive envelope stress response: intramembrane-sensing histidine kinases and accessory membrane proteins. In: Two component systems in bacteria. R. Gross & D. Beier (eds). Hethersett, Norwich, UK: Horizon Scientific Press, pp. in press.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork & C. P. Ponting, (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5857-5864.
- Seo, J., D. C. Savitzky, E. Ford & A. J. Darwin, (2007) Global analysis of tolerance to secretin-induced stress in *Yersinia enterocolitica* suggests that the phage-shock-

- protein system may be a remarkably self-contained stress response. *Mol Microbiol* **65**: 714-727.
- Serizawa, M., K. Kodama, H. Yamamoto, K. Kobayashi, N. Ogasawara & J. Sekiguchi, (2005) Functional analysis of the YvrGHb two-component system of *Bacillus subtilis*: identification of the regulated genes by DNA microarray and northern blot analyses. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 2155-2169.
- Shapiro, H. M., (1994) Cell membrane potential analysis. *Methods Cell Biol* **41**: 121-133.
- Silhavy, T. J., D. Kahne & S. Walker, (2010) The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**.
- Sklar, J. G., T. Wu, L. S. Gronenberg, J. C. Malinverni, D. Kahne & T. J. Silhavy, (2007) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6400-6405.
- Sleytr, U. B., P. Messner, D. Pum & M. Sara, (1993) Crystalline bacterial cell surface layers. *Mol Microbiol* **10**: 911-916.
- Sperandeo, P., F. K. Lau, A. Carpentieri, C. De Castro, A. Molinaro, G. Deho, T. J. Silhavy & A. Polissi, (2008) Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 4460-4469.
- Srivastava, R., T. Pisareva & B. Norling, (2005) Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Proteomics* **5**: 4905-4916.
- Standar, K., D. Mehner, H. Osadnik, F. Berthelmann, G. Hause, H. Lunsdorf & T. Bruser, (2008) PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **582**: 3585-3589.
- Staroń, A., D. E. Finkeisen & T. Mascher, (2011) Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 515-525.
- Stein, T., (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**: 845-857.
- Stone, K. J. & J. L. Strominger, (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 3223-3227.
- Stout, V., (1996) Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **178**: 4273-4280.
- Strahl, H. & L. W. Hamoen, (2010) Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12281-12286.
- Studholme, D. J. & R. Dixon, (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185**: 1757-1767.
- Stülke, J., I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier & G. Rapoport, (1997) Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* **25**: 65-78.
- Suntharalingam, P., M. D. Senadheera, R. W. Mair, C. M. Levesque & D. G. Cvitkovitch, (2009) The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **191**: 2973-2984.
- Tam le, T., C. Eymann, D. Albrecht, R. Sietmann, F. Schauer, M. Hecker & H. Antelmann, (2006) Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* **8**: 1408-1427.
- Thackray, P. D. & A. Moir, (2003) SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J Bacteriol* **185**: 3491-3498.

- Thomaides, H. B., E. J. Davison, L. Burston, H. Johnson, D. R. Brown, A. C. Hunt, J. Errington & L. Czaplowski, (2007) Essential bacterial functions encoded by gene pairs. *J Bacteriol* **189**: 591-602.
- Tipper, D. J. & J. L. Strominger, (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 1133-1141.
- Toni, T., G. Jovanovic, M. Huvet, M. Buck & M. P. Stumpf, (2011) From qualitative data to quantitative models: analysis of the phage shock protein stress response in *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol* **5**: 69.
- Turner, J., Y. Cho, N.-N. Dinh, A. J. Waring & R. I. Lehrer, (1998) Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2206-2214.
- van der Laan, M., M. L. Urbanus, C. M. Ten Hagen-Jongman, N. Nouwen, B. Oudega, N. Harms, A. J. Driessen & J. Luirink, (2003) A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5801-5806.
- van Teeffelen, S. & Z. Gitai, (2011) Rotate into shape: MreB and bacterial morphogenesis. *EMBO J* **30**: 4856-4857.
- van Teeffelen, S., S. Wang, L. Furchtgott, K. C. Huang, N. S. Wingreen, J. W. Shaevitz & Z. Gitai, (2011) The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15822-15827.
- Vidgren, G., I. Palva, R. Pakkanen, K. Lounatmaa & A. Palva, (1992) S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *J Bacteriol* **174**: 7419-7427.
- Vollmer, W., D. Blanot & M. A. de Pedro, (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 149-167.
- Vothknecht, U. C., S. Otters, R. Hennig & D. Schneider, (2012) Vipp1: a very important protein in plastids?! *J Exp Bot* **63**: 1699-1712.
- Vrancken, K., S. De Keersmaeker, N. Geukens, E. Lammertyn, J. Anne & L. Van Mellaert, (2007) *pspA* overexpression in *Streptomyces lividans* improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 1150-1157.
- Vrancken, K., L. Van Mellaert & J. Anne, (2008) Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response. *J Bacteriol* **190**: 3475-3481.
- Wach, A., (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-265.
- Wecke, T., T. Bauer, H. Harth, U. Mäder & T. Mascher, (2011) The rhamnolipid stress response of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*: n/a-n/a.
- Wecke, T., D. Zühlke, U. Mäder, S. Jordan, B. Voigt, S. Pelzer, H. Labischinski, G. Homuth, M. Hecker & T. Mascher, (2009) Daptomycin versus friulimicin B: In-depth profiling of *Bacillus subtilis* cell envelope stress responses. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1619-1623.
- Weidel, W. & H. Pelzer, (1964) Bagshaped Macromolecules--a New Outlook on Bacterial Cell Walls. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **26**: 193-232.
- Weiner, L., J. L. Brissette & P. Model, (1991) Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes Dev* **5**: 1912-1923.
- Weiner, L. & P. Model, (1994) Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2191-2195.
- Weinrauch, Y., T. Msadek, F. Kunst & D. Dubnau, (1991) Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 5685-5693.

-
- Westphal, S., L. Heins, J. Soll & U. C. Vothknecht, (2001) Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4243-4248.
- Wiegert, T., G. Homuth, S. Versteeg & W. Schumann, (2001) Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* s^W regulon. *Mol Microbiol* **41**: 59-71.
- Wolf, D., F. Kalamorz, T. Wecke, A. Juszczak, U. Mader, G. Homuth, S. Jordan, J. Kirstein, M. Hoppert, B. Voigt, M. Hecker & T. Mascher, (2010) In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**: 4680-4693.
- Yoshida, K. I., Y. Fujita & S. D. Ehrlich, (2000) An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**: 5454-5461.
- Youngman, P., (1990) Use of transposons and integrational vectors for mutagenesis and construction of gene fusions in *Bacillus subtilis*. In: Molecular biological methods for *Bacillus*. C. R. Harwood & S. M. Cutting (eds). Chichester: John Wiley & sons, pp. 221-266.

Anhang

Zu Kapitel II

Alle zusätzlichen Informationen und Abbildungen zur Originalpaper Wolf *et al.*, 2010 in Kapitel II befinden sich als elektronische Dateien auf der beiliegenden CD.

1. Text-Datei mit den Rohdaten der Transkriptom-Analyse durch *Microarrays*
2. PDF-Datei mit zusätzlichen Abbildungen und Tabellen zur phänotypischen Analyse der LiaR-vermittelten Zellhüllstressantwort, zur Untersuchung von polaren Effekten sowie zur Untersuchung der cytoplasmatischen Proteoms

Zu Kapitel III

Ebenfalls befinden sich auf der beigefügten CD auch die zusätzlichen Informationen zum Originalpaper Rietkötter *et al.*, 2008.

1. PDF-Datei mit zusätzlichen Abbildungen zur Sequenzanalyse von BceB sowie eine tabellarische Übersicht über die bei den Untersuchungen verwendeten Primer

Kapitel IV

1. PhoA/LacZ-Topologie Agarplatten (zu Abschnitt IV.3.1 und IV.3.7.)

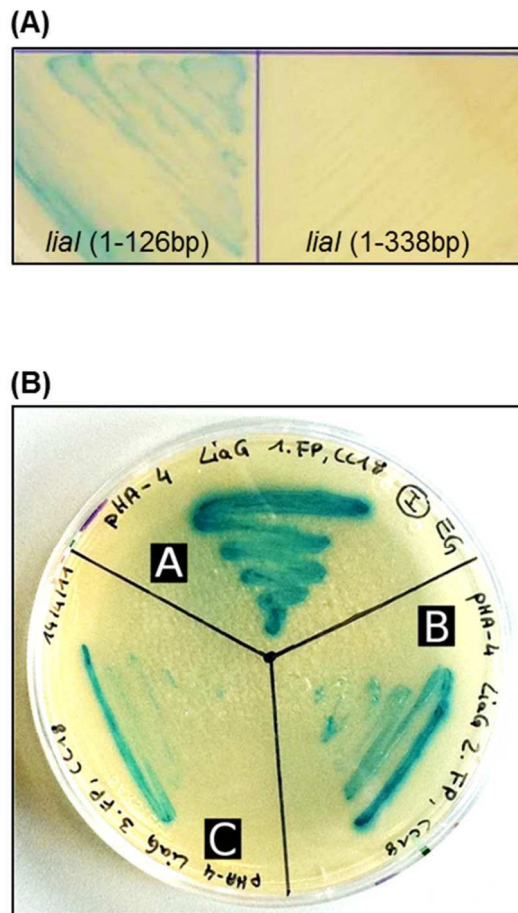


Abb.A1: Analyse der Topologie von LiaI und LiaG auf BCIP-Agarplatten. **(A)** *E. coli* CC118-Kolonien mit kurzen *lial* (1-126 bp)-*phoA* Konstrukt (linke Seite) und langem *lial* (1-338 bp)-*phoA* Konstrukt (rechte Seite). **(B)** *E. coli* CC118-Kolonien mit *liaG*-*phoA* Konstrukten. *liaG* (1-50 bp)-PhoA (A), *liaG* (1-168 bp)-PhoA (B), *liaG* (Volllänge)-PhoA (C)

2. BACTH Agarplatten (zu Abschnitt IV.3.4, IV.3.6, IV.3.7.)

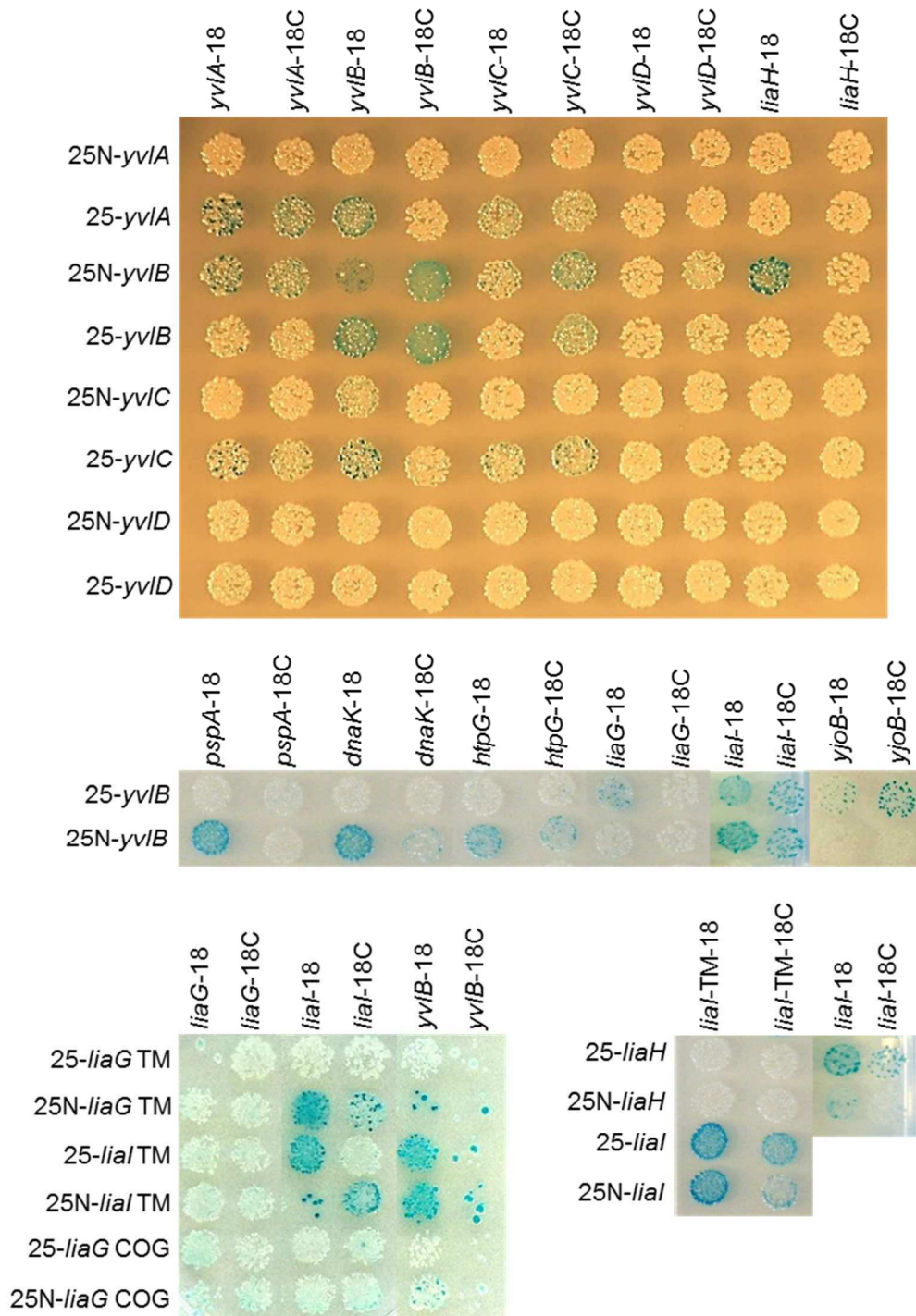


Abb.A2: BACTH-Analyse. *E. coli* BTH101 wurde mit gewünschten Plasmiden, die die zu testenden Gene, sowie die Fragmente T25 und T18 enthielten, transformiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf Agarplatten mit Kanamycin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$), Ampicillin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), X-Gal ($40 \mu\text{g ml}^{-1}$) und IPTG ($0,5 \text{ mM}$) gespottet.

Zu Kapitel V

1. 2D-Gele und identifizierte Proteinspots (zu Abschnitt V.3.1.)

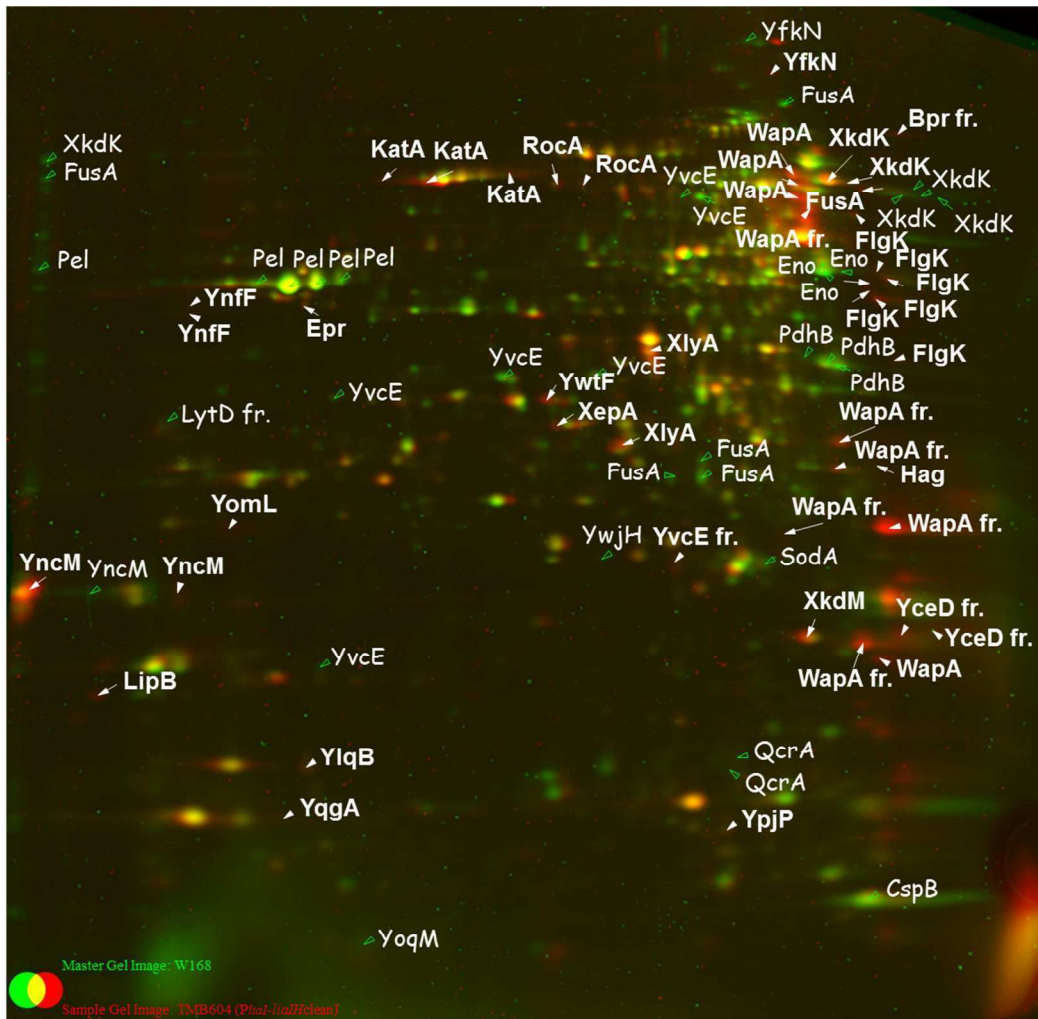


Abb.A3: Zwei-Farben-Bilder der 2D-Gele mit extrazellulärem Proteom von *B. subtilis* W168 (Grün) im direkten Vergleich mit einer $\Delta P_{\text{liaI-liaIH}}$ -Mutante (Rot). Übereinstimmende Spots sind in Gelb dargestellt. Zur Analyse der 2D-Gele wurde die Decodon Delta 2D Software genutzt. Identifizierte Protein-Spots sind benannt und durch Pfeile markiert (grüne Pfeile: >2-fach reprimierte Proteine in der $\Delta P_{\text{liaI-liaIH}}$ -Mutante; weiße Pfeile: >2-fach exprimierte Proteine in der $\Delta P_{\text{liaI-liaIH}}$ -Mutante (beide im Vergleich zum Wildtyp)).

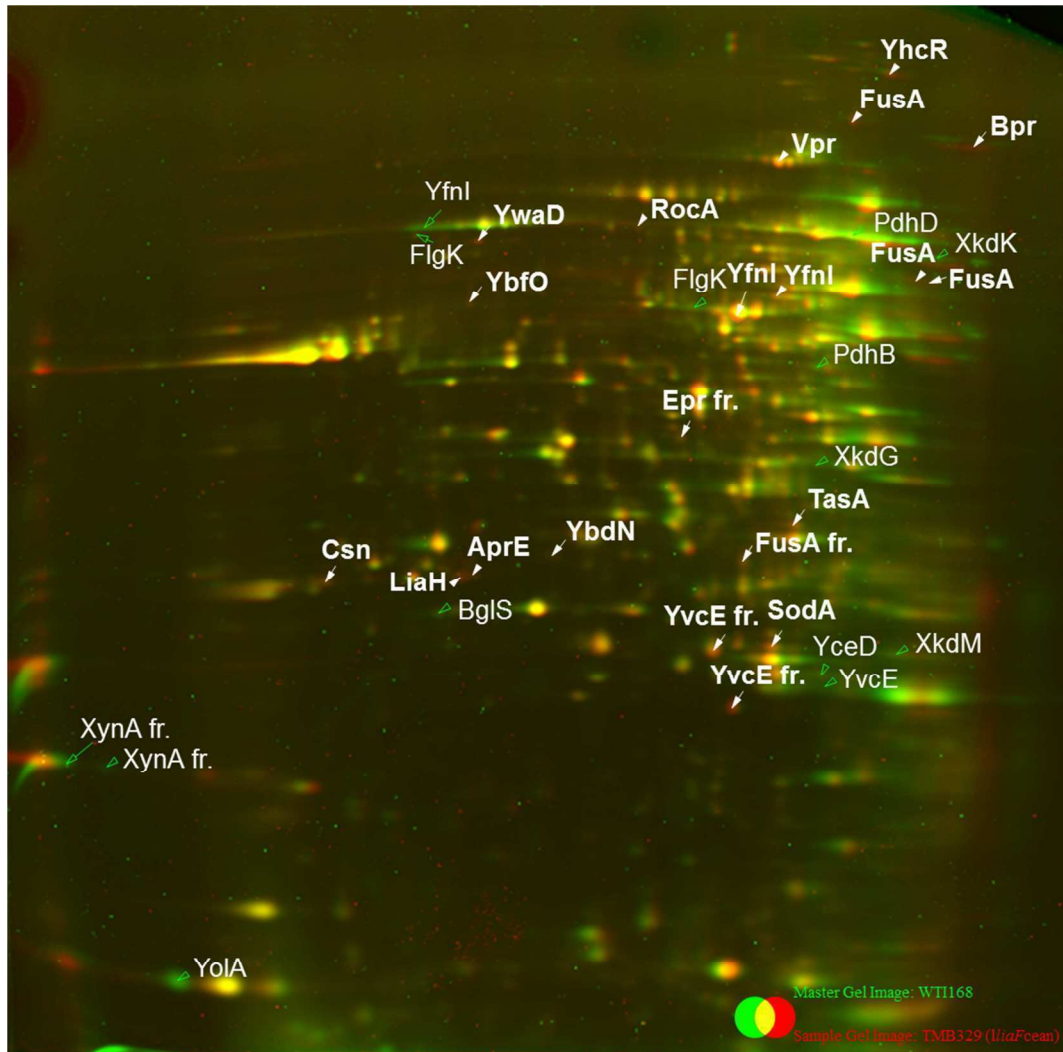


Abb.A4: Zwei-Farben-Bilder der 2D-Gele mit extrazellulärem Proteom von *B. subtilis* W168 (Grün) im direkten Vergleich mit einer $\Delta liaF$ -Mutante (in Rot). Übereinstimmende Spots sind in Gelb dargestellt. Zur Analyse der 2D-Gele wurde die Decodon Delta 2D Software genutzt. Identifizierte Protein-Spots sind benannt und durch Pfeile markiert (grüne Pfeile: >2-fach reprimierte Proteine in der $\Delta liaF$ -Mutante; weiße Pfeile: >2-fach exprimierte Proteine in der $\Delta liaF$ -Mutante (beide im Vergleich zum Wildtyp)).

Danksagung

Vier Jahre Doktorarbeit sind nun vorbei und es ist Zeit mich bei einigen Menschen zu bedanken.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Thorsten danken. Thorsten, ich danke dir, dass du mich als Doktorandin eingestellt hast, obwohl dir ein äußerst „kompetenter“ männlicher Mitarbeiter eines großen Forschungsgeldgebers davon abgeraten hat, eine Schwangere einzustellen und ich im Folgenden neben meiner Arbeit noch eine „gewisse Familienproblematik“ ☺ am Hals hatte. Ich denke aber, du hast es nicht bereut! Deine fachliche Kompetenz und deine lockere Art machten das Arbeiten bei dir sehr angenehm. Ich fand es super und ich werde mich immer wieder sehr gern an diese Zeit erinnern.

An zweiter Stelle möchte ich mich auch sogleich bei allen Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken, die mit dem Schreiben von Gutachten und dem Bewerten meiner Prüfungsleistung ihren Beitrag zur Beendigung meiner Dissertation leisten. Danke!

Und nun das Lab: Anna, Tina, Karen und Susanne-Danke! Um es auf den Punkt zu bringen, ich hätte mir keine besseren Kollegen als euch vorstellen können. Kein Zickenkrieg, keine Intrigen, keine üble Nachrede...aber dafür ganz viel Kollegialität, Teamwork und nette Kaffeekränzchen in der Küche, bei denen man sich auch mal auskotzen konnte. Außerdem noch ganz wichtig...Danke, dass ihr (vor allem Susanne) mir während des Schreibens dieser Arbeit ein Obdach geboten habt, wenn ich in München war. Ich wünsche jedem von euch nur das Allerbeste! Ein besonderer Dank geht auch an meinen „Lieblingspraktikanten“ Sebastian. Die PCR-Ansätze in 96-well Platten, die ohne Polymerase gelaufen sind sowie das Arbeiten an einigen Freitag-Abenden konnten dich nicht abschrecken. Ich finde es schön, dass ich dich während deines Praktikums in Karlsruhe, das mir sehr viel Spaß gemacht hat, mit dem Mascher-Virus infizieren konnte. Ich wünsche dir alles Gute und eine weiterhin hohe Frustrtoleranz für deine Promotion. Auch meiner anderen Praktikantin Mona und meiner Bachelorstudentin Elisa möchte ich dafür danken, dass sie durch ihren vollen Laboreinsatz wertvolle Ergebnisse zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz im Speziellen möchte ich mich auch bei den Kollaborationspartnern Dr. B. Voigt von der Uni Greifswald und Julia Domínguez-Escobar vom MPI bedanken für alle Daten, die in diese Dissertation eingeflossen sind. Julia, danke auch dafür, dass wir es bei der Tagung in Italien zusammen geschafft haben, Jeff Errington anzusprechen©.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Helge und Amélie, ihr seid das Beste was mir im Leben passiert ist und ich möchte euch nie mehr missen! Danke auch an meine Eltern, die mich immer in dem, was ich tue oder getan habe, voll und ganz unterstütz(t)en.