

**Molekulare und physiologische Charakterisierung
der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis*
und Untersuchungen zum Efflux und Recycling
von osmotischen Schutzsubstanzen**

DISSERTATION

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Susanne Moses
aus Nievenheim

Marburg/Lahn, 1999

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 1996 bis Oktober 1999 im Fachbereich Biologie im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität in Marburg/Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1999

Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. E. Bremer für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die zahlreichen Ideen, Anregungen und Diskussionen.

Meinen Laborkollegen der AG Bremer und allen Mitgliedern der Mikrobiologie in Marburg möchte ich danken für die technische Hilfestellung und konstruktiven Ratschläge. Mein besonderer Dank gilt Dr. Carsten von Blohn für die gute Unterstützung zu Beginn der Arbeit und Dr. Bettina Kempf für die stete Hilfsbereitschaft und vielen Tips. Außerdem danke ich unserer Badmintongruppe für den erholsamen Ausgleich zum Laboralltag.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Evert Bakker und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Osnabrück, für die Gastfreundschaft und hervorragende Unterstützung bei der Bestimmung des Zellvolumens und der Kaliumkonzentration in *B. subtilis*.

Mein persönlicher und größter Dank gilt meiner Familie und ganz besonders Thomas, die mich in allem unterstützt und motiviert haben.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen erstellt:

Moses, S. and Bremer, E. (2000). Genetics and physiology of proline utilization in *Bacillus subtilis*: Exogenously provided proline is required for induction of the *put* operon. (Manuskript in Vorbereitung)

Moses, S., von Blohn, C., Bakker, E., Bremer, E. (2000). Accumulation, efflux and recycling of osmoprotectants in *Bacillus subtilis*. (Manuskript in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	2
1. Osmotischer Stress in Mikroorganismen	2
2. Osmoregulation nach einem hyperosmotischen Schock	3
2.1 Aufnahme von K ⁺	3
2.2 Akkumulation von osmotisch wirksamen Substanzen	4
2.3 Adaptation von <i>B. subtilis</i> an hochosmolare Umweltbedingungen.....	5
2.3.1 Synthese von Prolin	6
2.3.2 Synthese von Glycin-Betain	8
2.3.3 Transport von osmoprotektiven Substanzen.....	8
2.3.3.1 Transport Glycin-Betain und strukturverwandten Verbindungen	8
2.3.3.2 Transport von Prolin	10
3. Osmoregulation nach einem hypoosmotischen Schock.....	11
3.1 Efflux von osmoprotektiven Substanzen.....	12
3.2 Abbau von osmoprotektiven Substanzen	13
4. Zielsetzung der Arbeit	15
III. MATERIAL UND METHODEN	16
1. Abkürzungen.....	16
2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
3. Bakterienstämme und Plasmide	17
3.1 Bakterienstämme	17
3.2 Plasmide.....	18
4. Medien, Zusätze und Wachstumsbedingungen	20
4.1 Medien	20
4.2 Wachstum	21
4.2.1 Quantifizierung der Wachstumshemmung durch toxische Prolinanaloga.....	21
4.2.2 Kreuzfütterungs-Experimente.....	21
5. Molekularbiologische und genetische Methoden.....	22
5.1 Präparation von Plasmid DNA	22
5.2 Isolierung von chromosomaler DNA und Gesamt-RNA.....	22
5.3 Klonierungstechniken	22
5.4 Polymerase-Kettenreaktion	22
5.5 Bestimmung der Nukleoidsequenz	24
5.6 Computeranalysen	24
5.7 Transformation	24
5.8 Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen.....	25

5.8.1	Konstruktion von Plasmiden	25
5.8.2	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> -Stämmen.....	27
5.9	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot).....	32
5.10	RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot)	32
5.11	Bestimmung des 5'-Endes der mRNA durch "Primer Extension"	33
5.12	Transposonmutagenese.....	33
6.	Biochemische Methoden.....	34
6.1	Proteinbestimmung	34
6.2	Quantifizierung von Prolin mit der Sauren Ninhydrin-Methode.....	34
6.3	Bestimmung der Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase (PutB).....	34
6.4	Bestimmung der TreA-Aktivität.....	35
6.5	Nachweis der Amylase-Aktivität.....	35
6.6	Bestimmung des intrazellulären Volumens von Bakterienzellen.....	36
6.7	Bestimmung der cytoplasmatischen Kaliumkonzentration	36
6.8	Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv markierten Aminosäuren.....	37
6.9	Bestimmung der kinetischen Parameter von OpuE und PutP	37
6.10	Austausch und Efflux von osmoprotektiven Substanzen	37
6.11	Radioaktive Quantifizierung von Glycin-Betain.....	38
6.12	Efflux von Glycin-Betain	38
IV.	ERGEBNIS	39
1.	Akkumulation, Efflux und Recycling von osmoprotektiven Substanzen	39
1.1	Akkumulation von osmoprotektiven Substanzen unter hochosmotischen Bedingungen.....	39
1.1.1	Das cytoplasmatischen Volumen in <i>B. subtilis</i> ist unabhängig von der Osmolarität	39
1.1.2	Die intrazelluläre Kaliumkonzentration in <i>B. subtilis</i> ist abhängig von der Osmolarität	40
1.1.3	Die Akkumulation von Prolin ist proportional zur externen Osmolarität	40
1.1.4	Osmoprotektive Substanzen reprimieren die Prolinakkumulation.....	41
1.1.5	Die Akkumulation von Glycin-Betain ist proportional zur Osmolarität	43
1.2	Efflux und Recycling von Prolin	44
1.3	Efflux und Recycling von Glycin-Betain	47
1.3.1	Wachstumsphänotyp durch Efflux von Glycin-Betain.....	47
1.3.2	Glycin-Betain wird permanent exkretiert	48
1.3.2.1	Glycin-Betain kann im Überstand von RMKB20 detektiert werden.....	48
1.3.2.2	Efflux von Glycin-Betain und Cholin	50
1.3.3	Efflux von Glycin-Betain nach einem hypoosmotischem Schock	52
2.	Charakterisierung des Prolinkatabolismus in <i>B. subtilis</i>	53
2.1	Prolin kann unter hochosmolaren Bedingungen als Kohlenstoffquelle genutzt werden.....	53
2.2	Analyse und Klonierung der Gene für die enzymatische Umsetzung von Prolin zu Glutamat in <i>B. subtilis</i>	54

2.2.1	PutB ist eine Prolin Dehydrogenase	55
2.2.2	PutC ist eine γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase	58
2.2.3	PutP ist eine Prolin Permease	60
2.2.4	Konstruktion chromosomaler <i>putBCP</i> -Deletionsmutanten in <i>B. subtilis</i>	64
2.2.5	Northern-Blot Analyse der <i>putBCP</i> -Gene	65
2.2.6	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>putBCP</i> -Operons	67
2.3	Physiologische Charakterisierung der Prolin katabolisierenden Enzyme PutB und PutC, sowie der Prolin Permease PutP	68
2.3.1	Physiologische Charakterisierung der <i>putBCP</i> - und <i>rocA</i> -Mutanten	68
2.3.2	Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase PutB	69
2.3.3	PutP ist für den Transport von Prolin als C-Quelle essentiell	71
2.3.4	Bestimmung der kinetischen Parameter des Prolintransportes durch PutP und OpuE	72
2.3.5	Transport toxischer Prolinanaloga durch PutP und OpuE	73
2.4	Regulation der Expression des <i>putBCP</i>-Operons	75
2.4.1	Konstruktion der <i>putB-treA</i> Fusionen	75
2.4.2	Die Expression der <i>putB-treA</i> Operonfusion wird durch Prolin induziert	76
2.4.3	Nur externes Prolin induziert die Transkription <i>putBCP</i> -Operons	77
2.4.3.1	Die Transkription des <i>putBCP</i> -Operons erfolgt auch unter hochosmolaren Bedingungen	77
2.4.3.2	Recyceltes Prolin induziert die Transkription <i>putBCP</i> -Operons	78
2.4.4	Der Transport des Induktors Prolin erfolgt durch PutP und OpuE	80
2.4.5	Die Induktion des <i>putBCP</i> -Operons ist unabhängig von PutB oder PutC	81
2.4.6	Charakterisierung der <i>putBCP</i> -Promotorregion	83
3.	Effluxsysteme in <i>B. subtilis</i>	84
3.1	Suche nach dem Prolin-Effluxsystem	84
3.2	Mechanosensitive Kanäle in <i>B. subtilis</i>	85
3.2.1	Konstruktion chromosomaler Deletionsmutanten	87
3.2.2	Sensitivität der Mutanten gegenüber einem hypoosmotischen Schock	87
V.	DISKUSSION	89
1.	Akkumulation von Prolin und Glycin-Betain unter hochosmotischen Bedingungen .	91
2.	Der Prolinkatabolismus in <i>B. subtilis</i>	92
2.1	Der Abbau von Prolin zu Glutamat in <i>B. subtilis</i>	92
2.2	Der Abbau von Prolin zu Glutamat in verschiedenen Organismen	94
2.3	Der Prolin Transporter PutP	96
2.4	Regulation des Prolinabbaus in <i>B. subtilis</i>	99
3.	Efflux und Recycling von osmoprotektiven Substanzen	103
3.1	Efflux und Recycling von osmoprotektiven Substanzen bei konstanter Osmolarität	103
3.2	Efflux von osmoprotektiven Substanzen nach einem hypoosmotischen Schock	104
3.3	Mechanosensitive Kanäle	105

VI. REFERENZEN	109
VILANHANG	126
1. Die DNA-Sequenz des <i>putBCP</i>-Operons.....	126

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

A. ABBILDUNGEN

Abb.1: Struktur der osmoprotektiven Substanzen Glycin-Betain, Prolin und Ectoin	5
Abb.2: Akkumulation von osmoprotektiven Substanzen in <i>B. subtilis</i> durch Synthese und Transport.....	9
Abb.3: Abbau von Prolin in <i>S. typhimurium</i> und <i>E.coli</i>	14
Abb.4: Darstellung und Lage der verwendeten Oligonukleotide	24
Abb.5: Intrazelluläre Konzentration von Prolin in Abhängigkeit von der Osmolarität	41
Abb.6: Glycin-Betain reprimiert die Prolinakkumulation in hochosmolaren Medien	42
Abb.7: Einfluß osmoprotektiver Substanzen auf die Akkumulation von Prolin.....	43
Abb.8: Intrazelluläre Akkumulation von Glycin-Betain unter hochosmolaren Bedingungen .	43
Abb.9: Wachstumsphänotyp im Stamm BLOB9 unter hochosmolaren Bedingungen.....	44
Abb.10: Intra- und extrazelluläre Prolinkonzentration	45
Abb.11: Kreuzfütterungsexperimente: Der Prolinauxotrophe <i>E. coli</i> -Stamm kann in der räumlichen Nähe der <i>B. subtilis</i> Mutante BLOB9 wachsen.	46
Abb.12: Wachstumsphänotyp im Stamm RMKB20 unter hochosmolaren Bedingungen	47
Abb.13: Efflux und Recycling von Glycin-Betain	48
Abb.14: Nachweis von radioaktiv markiertem Cholin und Glycin-Betain	49
Abb.15: Efflux von Cholin und Glycin-Betain.....	51
Abb.16: Efflux von Glycin-Betain nach einem hypoosmotischem Schock	52
Abb.17: Wachstum mit Prolin als C-Quelle unter hochosmotischen Bedingungen.....	54
Abb.18: Genetische Anordnung der <i>putBCP</i> -Region.....	54
Abb.19: Organisation der enzymatisch aktiven Domänen im PutA-Protein von <i>E. coli</i> im Vergleich zu PutB und PutC aus <i>B. subtilis</i>	55
Abb.20: Vergleich der Aminosäuresequenz von PutB aus <i>B. subtilis</i> mit anderen bakteriellen Prolin Dehydrogenasen.....	56
Abb.21: Vergleich der Aminosäuresequenz der <i>B. subtilis</i> -Proteine PutB und YusM	58
Abb.22: Vergleich der Aminosäuresequenz von PutC aus <i>B. subtilis</i> mit anderen bakteriellen γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenasen.....	59
Abb.23: Potentielle Startpunkte des <i>putP</i> -Leserahmens	61

Abb.24: Vergleich der Aminosäuresequenz von PutP aus <i>B. subtilis</i> mit anderen Prolin Transportern.....	62
Abb.25: Hydrophathie-Analyse von PutP aus <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	63
Abb.26: Konstruktion von Deletionsmutanten in <i>putB</i> , <i>putC</i> , <i>putP</i> und <i>putBCP</i>	64
Abb.27: Northern-Blot Analyse der <i>putBCP</i> -Gene	65
Abb.28: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der <i>putBCP</i> -mRNA	68
Abb.29: Wachstumphänotyp der <i>putP</i> -Mutante SMB11.....	71
Abb.30: Sensitivität der <i>putP</i> - und <i>opuE</i> -Deletionstämme gegen toxische Prolinanaloga	74
Abb.31: Integration der <i>putB-treA</i> Operonfusion in das Genom von <i>B. subtilis</i>	75
Abb.32: Abhängigkeit der Expression der <i>putB-treA</i> Fusion von der Prolinkonzentration	76
Abb.33: Induktion der Expression von <i>putBCP</i> nach Zugabe verschiedener Aminosäuren	77
Abb.34: Induktion der Expression von <i>putBCP</i> unter hochosmolaren Bedingungen	78
Abb.35: Regulation der Expression von <i>putBCP</i> nach einem hypoosmotischen Schock	79
Abb.36: Expression des <i>putBCP</i> -Operons in <i>putP</i> - und <i>opuE</i> -Transportermutanten	81
Abb.37: Einfluß von PutB und PutC auf die Induktion des <i>putBCP</i> -Operons	82
Abb.38: Analyse der <i>putBCP</i> -Promotorregion durch sukzessive Deletion.....	83
Abb.39: Vergleich der Aminosäuresequenz von YwpC aus <i>B. subtilis</i> mit anderen bakteriellen MscL-Proteinen	85
Abb.40: Vergleich der Aminosäuresequenz von YggB (MscS) aus <i>E. coli</i> mit potentiellen MscS Kanälen aus <i>B. subtilis</i>	86
Abb.41: Konstruktion von Deletionsmutanten in potentiellen Genen von Mechanosensitiven Kanälen	88
Abb.42: Regulationsmodell für den Prolinabbau in <i>B. subtilis</i>	90
Abb.43: Die Nukleotidsequenz des <i>putBCP</i> -Operons.....	126

B. TABELLEN

Tab.1: Bakterienstämme.....	17
Tab.2: Plasmide	18
Tab.3: Antibiotikazusätze.....	20
Tab.4: Osmolarität der Minimalmedien	21
Tab.5: Verwendete Oligonukleotide	23
Tab.6: Intrazelluläre Kaliumkonzentration und cytoplasmatisches Volumen	39
Tab.7: Wachstum auf Prolin als C- oder N-Quelle	69
Tab.8: Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase PutB.....	70
Tab.9: Kinetische Parameter der Prolin Permeasen PutP und OpuE	72

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von spezifischen Mechanismen, die es dem Bodenmikroorganismus *Bacillus subtilis* ermöglicht, sich an Schwankungen des externen osmotischen Drucks anzupassen, sind fundamental für das Überleben der Zellen. In der Osmoadaptation spielt die variable Zusammensetzung der cytoplasmatischen Solute eine entscheidende Rolle. Steigt die externe Osmolarität infolge der Trockenheit an, so akkumuliert *B. subtilis* osmotische Schutzsubstanzen, durch Transport exogen vorliegender Solute und darüber hinaus durch endogene Synthese von Prolin (Kempf & Bremer, 1998).

Die Aminosäure Prolin erfüllt in *B. subtilis* mehrere Funktionen: Sie wird als osmoprotektive Substanz durch Synthese oder Transport in hohen Konzentrationen akkumuliert und sie dient als ergiebige Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie unter hochosmotischen Bedingungen die Prolinakkumulation reguliert wird, um einen energieaufwendigen „futile cycle“, durch gleichzeitige Synthese und Verwertung von Prolin zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde der Abbau von Prolin zu Glutamat in *B. subtilis* auf molekularer und physiologischer Ebene aufgeklärt. Für den Prolinabbau sind zwei Enzyme (PutB und PutC) verantwortlich, deren Gene zusammen mit dem Prolin-Transportsystem (PutP) in dem *putBCP*-Operon angeordnet sind. Durch Konstruktion von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Enzyme PutB und PutC für den Abbau von Prolin in *B. subtilis* essentiell sind. PutB stellt eine Prolin Dehydrogenase dar, welche die Oxidation von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat synthetisiert, das vermutlich spontan zu Glutamat-semialdehyd hydrolysiert. Das zweite Enzym, PutC, ist eine γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase, die Glutamat-semialdehyd zu Glutamat oxidiert. Die osmotische Regulation des Prolinabbaus wurde mit Hilfe von Reporterfusionen, Enzymassays und Northern-Blot Analysen untersucht. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die *putBCP*-Transkription mit sehr geringen Konzentrationen von exogenem Prolin induziert werden kann, während hohe intrazelluläre Prolinkonzentration keinen Einfluß ausüben. Darüber hinaus führen hohe Osmolaritäten zu keiner Reprimierung der Transkription oder Enzymaktivität. Allein durch die obligatorische Kopplung, von Prolinabbau und Prolintransport, verhindert *B. subtilis* auf elegante Weise, den Abbau der intrazellulär akkumulierten osmoprotektiven Substanz Prolin. Wie *B. subtilis* zwischen exogenem und endogenem Prolin zu unterscheiden vermag, ist bisher nicht geklärt. Dieser Mechanismus versetzt die Zelle jedoch in die Lage, hohe Konzentrationen von Prolin als osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren, ohne gleichzeitig den Abbau von Prolin zu induzieren.

Neben der Charakterisierung der für den Prolinabbau verantwortlichen Enzyme konnte mit PutP eine neue Prolin Permease identifiziert werden. Diese wird, entgegen der osmotisch induzierbaren Prolin Permease OpuE (von Blohn *et al.*, 1997), durch exogenes Prolin induziert und durch hohe Osmolaritäten reprimiert.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der cytoplasmatischen Solute kontinuierlich, durch Efflux und Reimport der osmoprotektiven Substanzen, reguliert wird. Während über die Identität der Effluxsysteme bisher nichts bekannt ist, erfolgt der Reimport über bekannte Transportsysteme (von Blohn *et al.*, 1997; Kempf und Bremer, 1998). Eine Deletion des zugehörigen Transportsystems führt zu einem Nettoefflux der jeweiligen osmotisch aktiven Substanz, wodurch die Zellen eine verringerte Fähigkeit zur Osmoadaptation aufweisen. Der durch einen hypoosmotischen Schock ausgelöste vermehrte Efflux von osmoprotektiven Substanzen konnte auf physiologischer Ebene nachgewiesen werden. Dabei ist die Effluxrate abhängig von der Stärke des hypoosmotischen Schocks. Durch Genom-Sequenzanalyse wurden die potentiellen Mechanosensitiven Kanäle, unter anderen YwpC (MscL) und YhdY (MscS), in *B. subtilis* identifiziert und Deletionsmutanten konstruiert.

II. EINLEITUNG

1. Osmotischer Stress in Mikroorganismen

In ihrem natürlichen Habitat sind Mikroorganismen einer Vielzahl von Wachstumsbegrenzenden Stressfaktoren ausgesetzt (Hecker *et al.*, 1996). Neben Schwankungen des Nährstoffangebotes, des pH-Wertes und der Temperatur, spielt dabei die Osmolarität des Mediums eine bedeutende Rolle. Besonders die Mikroorganismen der oberen Bodenschichten, wie das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis*, unterliegen ständig den durch Austrocknung und Regen verursachten osmotischen Veränderungen (Miller & Wood, 1996).

Verantwortlich für den Einfluß der externen Osmolarität auf die Zelle, ist die Semipermeabilität der cytoplasmatischen Membran, die eine Diffusion von Wasser, nicht aber von Makromolekülen, geladenen Teilchen und den meisten anderen Substanzen erlaubt (Bovell *et al.*, 1963). Das Cytoplasma besteht aus einer wäßrigen Lösung von Salzen, Zuckern, Aminosäuren und vielen anderen löslichen Stoffen, dessen Konzentration meist höher ist, als die der Umgebung. Der durch die Differenz in der Wasseraktivität verursachte Wassereinstrom in die Zelle, führt zu einem hydrostatischen Druck, der die cytoplasmatische Membran gegen die stabile Zellwand drückt. Dieser nach außen gerichtete Druck, der Zellturgor, ist essentiell für das Wachstum und die Zellteilung von Bakterien. Der Turgor von Gram-positiven Bakterien ist mit 15 bis 20 atm deutlich höher als der von Gram-negativen Bakterien mit 3 bis 10 atm (Csonka, 1989; Csonka & Epstein, 1996). Durch die Semipermeabilität der cytoplasmatischen Membran führt eine Änderung der externen Osmolarität zu einem Ein- oder Ausstrom von Wasser, der von einer Erhöhung bzw. Verringerung des cytoplasmatischen Volumens begleitet wird. Darüber hinaus konnten in vielen Organismen Wasserkanäle (Aquaporine) identifiziert werden, die einen selektiven Wasserstrom über die Membran erleichtern (Agre *et al.*, 1993; Chrispeels & Agre, 1994; Calamita *et al.*, 1995). Nach einem hypoosmotischen Schock erfolgt ein Wassereinstrom in das Cytoplasma der Zelle, das sich aufgrund der Zellwand nur geringfügig ausdehnen kann (Csonka, 1989). Obwohl die Zellwände von Gram-positiven Bakterien einen extremen Druck von bis zu 100 atm widerstehen können, steigt der Zellturgor bei fortgesetztem Wassereinstrom so stark an, dass die Zellen lysieren (Carpita *et al.*, 1985). Dagegen kann ein hyperosmotischer Schock, durch die Dehydrierung der Zelle, zu einer Verringerung des cytoplasmatischen Volumens und damit zur Plasmolyse führen. Unter diesen Bedingungen ist die Zelle nicht mehr in der Lage essentielle physiologische Prozesse wie DNA-Replikation und Nährstoffaufnahme durchzuführen (Csonka, 1989). Zur Wiederherstellung des Zellturgors können Mikroorganismen, innerhalb bestimmter Grenzen, die Osmolarität ihres Cytoplasmas aktiv beeinflussen (Kempf & Bremer, 1998). Unter hochosmolaren Bedingungen sind einige Organismen in der Lage, durch Synthese oder Import von osmotisch wirksamen Substanzen, ihre cytoplasmatische Osmolarität zu erhöhen, so dass wieder Wasser in die Zelle einströmt. Ein, nach einem hypoosmotischen Schock, erhöhter Turgor, erfordert dagegen die Reduzierung der osmotisch wirksamen Substanzen mittels Efflux, entweder durch spezifische Transporter, oder durch Mechanosensitive Kanäle (Booth & Louis, 1999; Csonka & Epstein, 1996). Darüber hinaus führt eine veränderte

Osmolarität bei einigen Bakterien zu einer negativen Chemotaxis. Diese gerichtete Bewegung bewirkt, dass die Bakterien aus Bereichen hoher oder niedriger Osmolarität in einen Bereich optimaler Osmolarität gelangen (Wong *et al.*, 1995).

2. Osmoregulation nach einem hyperosmotischen Schock

Als bekanntestes Modellsystem für die Untersuchung der Osmoregulation dient in Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* und in Gram-positiven Bakterien *B. subtilis*. Diese Bakterien zeigen nach einem hyperosmotischen Schock einen zweiphasigen Adaptationsprozess in dem zunächst K^+ -Ionen akkumuliert und diese anschließend durch osmotisch wirksame Substanzen, den „compatible solutes“, ersetzt werden (Csonka & Epstein, 1996).

2.1 Aufnahme von K^+

Kalium ist in der Natur weit verbreitet und mit einer Konzentration von 100 - 150 mM im Cytoplasma von Mikroorganismen das häufigste Kation. Die Hauptfunktion der K^+ -Ionen besteht in der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Turgors unter wechselnden osmotischen Bedingungen (Stumpe *et al.*, 1996; Csonka & Epstein, 1996; Csonka & Hanson, 1991). Als erste Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock akkumuliert die Zelle K^+ -Ionen, wobei schon eine relativ geringe Erhöhung der Osmolarität ausreicht, um den Kalium-Influx zu stimulieren. Die Influxrate ist bei einem osmotischen Schock von mehr als 0.2 osM konstant. In *B. subtilis* steigt die K^+ -Konzentration nach Erhöhung der externen Osmolarität um 400 mM NaCl innerhalb einer Stunde auf 650 mM an (Whatmore *et al.*, 1990).

E. coli enthält die vier K^+ -Aufnahmesysteme TrkG, TrkH, Kdp und Kup (Bakker, 1993; Silver, 1996; Stumpe *et al.*, 1996). Die vorherrschenden Aufnahmesysteme TrkG und TrkH werden konstitutiv expremiert und transportieren K^+ -Ionen mit hoher Transportrate, besitzen aber eine geringe Affinität zu K^+ . Das osmotisch induzierbare hochaffine Kdp-System gehört zur Familie der P-Typ ATPasen. Das Kup-System hat die schlechteste Affinität und Transportrate zu K^+ -Ionen, eine Erhöhung der Osmolarität stimuliert den Influx durch Kup jedoch um das zweifache (Csonka & Epstein 1996; Nakamura *et al.*, 1998). Um eine Alkalisierung des Cytoplasmas durch die Akkumulation von K^+ -Ionen zu verhindern, erfolgt gleichzeitig die Synthese von Glutamat als Gegenion. Die Akkumulation von Glutamat beginnt eine Minute nach Erhöhung der Osmolarität und ist abhängig von der K^+ -Aufnahme (McLaggan *et al.*, 1994). Es ist nicht bekannt, wie der Import von K^+ -Ionen stimuliert wird, jedes Transportsystem ist jedoch für sich allein in der Lage dieses Signal zu empfangen. Homologe Proteine zu TrkK und Kdp wurden unter anderen in *S. typhimurium* identifiziert (Parra-Lopez *et al.*, 1994). In *Vibrio alginolyticus* wurde kürzlich ein weiteres hochaffines Kaliumaufnahme-system, KtrAB, identifiziert. KtrAB besitzt ähnlich hohe Transportraten wie das Trk-System aus *E. coli* (Nakamura *et al.*, 1998). Durch Sequenzvergleiche in der Proteindatenbank (Altschul *et al.*, 1990) konnten in vielen Organismen Homologien zu dem KtrAB-Protein gefunden werden. Auch in *B. subtilis* wurden dadurch zwei Leserahmen identifiziert, dessen abgeleitete

Proteinsequenzen Ähnlichkeiten zu den KtrAB-System aufweisen (Holtmann, 1999). Im Gegensatz zu den Gram-negativen Bakterien synthetisiert *B. subtilis* jedoch kein Glutamat als Gegenion für das Kalium (Whatmore *et al.*, 1990).

Neben seiner bedeutenden Rolle als erste zelluläre Antwort auf osmotischen Stress, wird vermutet, dass Kalium als indirektes Signal die weitere „Stressantwort“ reguliert und koordiniert. Unterstützt wird die Hypothese durch die Abhängigkeit der weiteren Stressantwort von der vorherigen Aufnahme von K^+ (Csonka & Epstein, 1996).

2.2 Akkumulation von osmotisch wirksamen Substanzen

In der ersten Phase der Adaptation an hochosmolare Lebensräume wird K^+ in hohen Konzentrationen akkumuliert und ermöglicht so die Wiederherstellung des Turgors. Diese hohen K^+ -Konzentrationen können kurzfristig toleriert werden. Sie wirken sich auf Dauer jedoch schädlich auf essentielle Prozesse, wie z. B. der Proteinfunktion aus. Ausnahmen hiervon bildet die Gruppe der halophilen Bakterien, die ihre Physiologie an die beständig hohen intrazellulären Ionenkonzentrationen angepaßt haben (Galinski & Trüper, 1994; Martin *et al.*, 1999; Ventosa *et al.*, 1998). Dagegen folgt in den nicht halophilen Bakterien der schnellen Akkumulation von K^+ -Ionen, eine langfristige Akkumulation von niedermolekularen, neutralen organischen Verbindungen, den „compatible solutes“ (Csonka & Epstein 1996). Diese osmotischen Schutzsubstanzen zeichnen sich durch ihre gute Wasserlöslichkeit, ihre Ladungsneutralität bei physiologischen pH und der fehlenden Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen aus. Sie können daher in hohen Konzentrationen akkumuliert werden, ohne dass sie das elektrostatische Gleichgewicht und damit den Energiestoffwechsel der Zelle beeinflussen (Brown, 1976; Galinski, 1995; Timasheff, 1991). Neben ihrer Funktion zur Aufrechterhaltung des Turgors besitzen osmotische Schutzsubstanzen noch weitere protektive Funktionen, indem sie Enzyme und andere Makromoleküle gegen Stressfaktoren wie Temperatur und denaturierende Substanzen wie Harnstoff und Guanidin-HCl schützen (Potts, 1994; Savouré *et al.*, 1997; Qu *et al.*, 1998; Record *et al.*, 1998).

Mit dem Modell der „preferential exclusion“ wird versucht, die Schutzfunktion der kompatiblen Solute und vor allem die fehlende Interaktion mit Proteinen zu erklären (Arakawa & Timasheff, 1985). Dieses Modell besagt, dass kompatible Solute als stabilisierendes Molekül vorzugsweise von der Wasserhülle des Proteins ausgeschlossen sind und sich um diese herum lagern. Dieser thermodynamisch ungünstige Zustand verhindert die noch ungünstigere Situation, dass die Proteine denaturieren, wodurch sich ihre Oberfläche vergrößert und dadurch die Verteilung der Schutzsubstanzen im Cytoplasma noch weiter eingeschränkt wäre. Der präferentielle Ausschluß wird energetisch bevorzugt und bedingt somit eine Gleichgewichtsverlagerung zum nativen Protein (Potts, 1994).

Kompatible Solute wurden bei Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren gefunden und können unterschiedlichen Stoffklassen zugeordnet werden. Man unterscheidet die Aminosäuren und Aminosäurederivate (z.B. Glutamat, Prolin, β -Alanin, Ectoin), Zucker und Zuckerderivate

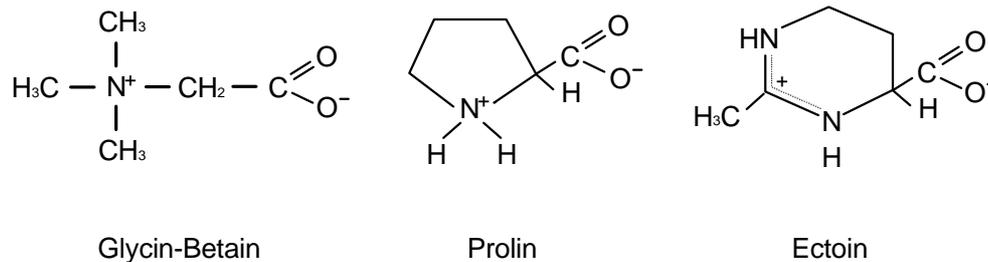


Abb.1: Struktur der osmoprotektiven Substanzen Glycin-Betain, Prolin und Ectoin

(z.B. Trehalose, Glycerol, Glycosylglycerol), Polyole (z.B. Arabitol, Lycerol, Mannitol), Methylamine (z.B. Glycin-Betain, Carnitin, Prolin-Betain, γ -Butyrobetain) und die Methyl-Sulfonium-Verbindungen (z.B. Dimethyl-Sulphoniopropionat) (Csonka, 1989; Galinski & Trüper 1994). Die Akkumulation der osmoprotektiven Substanzen erfolgt zum größten Teil durch den osmotisch regulierten Transport exogen verfügbarer Substanzen. Darüber hinaus sind die meisten Mikroorganismen in der Lage, zumindest eine osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren.

2.3 Adaptation von *B. subtilis* an hochosmolare Umweltbedingungen

B. subtilis ist ein aerobes, sporenbildendes, Gram-positives Bakterium, welches in seinem natürlichen Habitat die oberen Bodenschichten besiedelt. Dieser Lebensraum ist ständigen Veränderungen hinsichtlich der Temperatur und der durch Trockenheit und Nässe verursachten Schwankung der Wasseraktivität unterworfen (Miller & Wood, 1996). *B. subtilis* hat verschiedene Strategien entwickelt, die es ihm ermöglicht in einer Umgebung wechselnder Osmolarität zu überleben.

Nach einer Erhöhung der Osmolarität erfolgt in *B. subtilis* eine Verhaltensänderung, die sich dadurch bemerkbar macht, dass das Bakterium aus Bereichen hoher Osmolarität in Bereiche optimaler Osmolarität schwimmt (Wong *et al.*, 1995). Parallel zu dieser Chemotaxis folgt die Akkumulation von Kalium-Ionen und schließlich deren Austausch durch organische Osmolyte.

Auf genetischer Ebene erfolgt nach einem osmotischen Schock die Induktion eines allgemeinen Stressregulons (Hecker *et al.*, 1996). Die Induktion dieser allgemeinen Stressproteine erfolgt nicht nur durch osmotischen Stress, sondern auch durch andere Wachstumslimitierende Faktoren wie Hitze und Nährstoffmangel. Die meisten dieser Stressgene stehen unter Kontrolle von σ^B -abhängigen Promotoren, deren Aktivität wiederum von einem Netzwerk regulatorischer Proteine bestimmt wird (Völker *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1996; Helmann, 1999). Wie groß der Einfluß dieser allgemeinen Stressproteine auf die Anpassung an wechselnde osmotische Bedingungen ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Neue Untersuchungen von Völker *et al.* (1999) zeigen jedoch, dass *sigB*-Mutanten eine deutlich geringere Überlebensrate nach verschiedenen Stressbedingungen aufweisen als der Wildtyp.

2.3.1 Synthese von Prolin

Die bisher untersuchten Bacillen synthetisieren unter hochosmotischen Bedingungen Ectoin oder aber Ectoin in Kombination mit Prolin. Demgegenüber synthetisiert *B. subtilis* nur Prolin und ersetzt damit die zuvor akkumulierten Kalium-Ionen (Galinski & Trüper, 1994; Galinski, 1995). Whatmore *et al.* (1990) konnte zeigen, dass nach einem hyperosmotischen Schock von 400 mM NaCl die Prolinkonzentration innerhalb von 8 h von 16 mM auf bis zu 700 mM ansteigt und damit 79 % der gesamten freien Aminosäuren ausmacht. Die Konzentration des biosynthetischen Vorläufermoleküls Glutamat steigt dagegen nur von 103 mM auf 167 mM an. Interessanterweise unterliegt die maximale Prolinkonzentration Schwankungen, die vor allem von der Temperatur beeinflusst wird. Die oben angegebene Prolinkonzentration wurde bei einer Wachstumstemperatur von 25°C gemessen, eine Kultivierung bei 37°C resultiert jedoch in einer wesentlich geringeren Prolinkonzentration von 180 mM. Man geht davon aus, dass Prolin auch in der Kryoprotektion eine Rolle spielt, so dass beim Zusammentreffen von beiden Stressfaktoren die Synthese von Prolin gesteigert wird (Warr *et al.*, 1985; Wohlfarth *et al.*, 1990). Für das Wachstum der Bakterienzellen ist das Erreichen der maximalen Prolinkonzentration jedoch nicht essentiell. Schon nach 4 h ist eine leichte Zunahme der Zellzahl zu erkennen. Entscheidend für die Synthese von Prolin ist das Vorhandensein von externem Kalium. Ohne Kalium ist die Synthese inhibiert, kann jedoch durch spätere Zugabe zeitversetzt wieder induziert werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass Kalium als indirektes Signal die Adaptation an osmotischen Stress reguliert (Whatmore *et al.*, 1990).

Prolin wird in den bisher untersuchten Mikroorganismen hauptsächlich aus Glutamat synthetisiert, kann aber auch aus Arginin, Ornithin oder Citrullin gebildet werden. Die Synthese aus Glutamat erfolgt in vier Schritten, von denen drei enzymatisch katalysiert werden und ein Schritt spontan abläuft. Zunächst erfolgt die Phosphorylierung von Glutamat zu γ -Glutamylphosphat durch die γ -Glutamylkinase, als Coenzym dient ATP. Die NADPH-abhängige Glutamat- γ -semialdehyd Dehydrogenase reduziert das γ -Glutamylphosphat zu Glutamat-semialdehyd, welches unter Wasserabspaltung spontan zu Pyrrolin-5-carboxylat zyklisiert. Dieses wird in einem letzten Schritt durch die NADPH-abhängige Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase zu Prolin reduziert.

In *E. coli* ist die Prolinbiosynthese durch eine Feedback-Inhibition der γ -Glutamylkinase (ProB) negativ reguliert, so dass kein Prolin für osmoprotektive Zwecke akkumuliert werden kann (Leisinger, 1996). Diese Endprodukt-Hemmung kann aber durch eine einzige Punktmutation im *proB*-Gen signifikant reduziert werden, was zu einer erhöhten Prolinakkumulation und damit zu einer gesteigerten osmotischen Toleranz führt (Dandekar & Uratsu, 1988; Hu *et al.*, 1992). Proteinsequenzen mit hohen Homologien zu dieser γ -Glutamylkinase wurden aus zwei offenen Leserahmen in *B. subtilis* abgeleitet. Die beiden Proteine ProB und ProJ unterscheiden sich in den Aminosäuresequenzen, die für die Endprodukthemmung durch Prolin erforderlich sind (Dandekar & Uratsu, 1988), vermutlich wird ProJ durch Prolin nicht negativ reguliert. Das Gen *proB* ist mit *proA*, welches für eine Glutamat- γ -semialdehyd-DH kodiert, in einem Operon angeordnet. *proJ* liegt in einem Operon mit *proH*, das für eine Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase

kodiert. Neben diesen beiden Operon-Strukturen wurde ein weiteres Gen gefunden, *yqjO*, dessen abgeleitete Sequenz Homologien zu der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase *proH* aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass in *B. subtilis* zwei Prolinbiosynthesewege existieren, die Prolin in geringen Konzentrationen für biosynthetische Zwecke und in hohen Konzentrationen als osmotische Schutzsubstanz zur Verfügung stellen (Brill, 1998). Die Synthese von Prolin für anabole Zwecke erfolgt durch die Enzyme ProB, ProA und YqjO, wobei ProB vermutlich einer Feedback-Inhibition durch Prolin unterliegt. Die Akkumulation von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen erfolgt durch die Enzyme ProJ, ProA und ProH.

Die Synthese von Prolin nach einem moderaten osmotischen Schock wird in *B. subtilis* durch die Anwesenheit von Glycin-Betain, oder dessen biosynthetischen Vorläufer Cholin reprimiert. Erst ab einer Osmolarität von 400 mM NaCl steigt die Prolinsynthese wieder langsam an (Whatmore *et al.*, 1990; von Blohn, 1997).

Neben *B. subtilis* konnte für eine Reihe von Mikroorganismen und Pflanzen die Akkumulation von Prolin nach einem osmotischen Schock durch *de novo* Synthese gezeigt werden. Das coryneforme, Gram-positive Bakterium *Brevibacterium lactofermentum* synthetisiert Prolin als primäre osmotische Schutzsubstanz und erreicht unter osmotischem Stress Konzentrationen von 35 mg Prolin/g Trockengewicht (Kawahara *et al.*, 1989). Während die Regulation der Prolinsynthese durch die osmotisch induzierbare Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase gezeigt werden konnte, ist über die Regulation des Prolinabbaus bisher nichts bekannt. Weitere Mikroorganismen, die osmotisch induziert Prolin synthetisieren, sind das Gram-positive Bodenbakterium *Streptomyces griseus* (Killham & Firestone, 1984), das Gram-positive marine Bakterium *Planococcus citreus* (Galinski & Trüper, 1994) und das N₂-fixierende Gram-negative Bakterium *Azospirillum brasilense* (Madkour *et al.*, 1990). Die Regulation des Prolinabbaus ist in diesen Organismen bisher nicht untersucht worden. Wie in den vorgestellten Mikroorganismen erfolgt die Prolinsynthese in Pflanzen auch aus Glutamat. Dabei katalysiert die Pyrrolin-5-carboxylat Synthase (P5CS), ein bifunktionelles Enzym, bestehend aus Glutamat Kinase und Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase, die Synthese von Glutamat zu Glutamat semialdehyd. Dieses hydrolysiert spontan zu Pyrrolin-5-carboxylat, das im letzten Schritt, von der zu ProC aus *E. coli* analogen Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase, zu Prolin reduziert wird (Delauney & Verma, 1993).

Da Pflanzen, wie auch *B. subtilis*, in der Lage sind, unter osmotischen Stress hohe Konzentrationen von Prolin zu synthetisieren, ist es erstaunlich, dass die P5CS einer allosterischen Inhibition durch Prolin unterliegt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die P5CS weniger sensitiv gegen eine Feedback-Inhibition durch Prolin ist, als die γ -Glutamylkinase aus *E. coli*. Auch steigt der Level der P5CS-mRNA in Salz-gestressten Wurzeln an (Hu *et al.*, 1992). In *A. thaliana* wurden darüber hinaus zwei P5CS-Gene entdeckt, deren unterschiedliche Expression die Prolinsynthese unter Salzstress reguliert (Strizhov *et al.*, 1997). Die P5CS ist unter osmotischem Stress das limitierende Enzym in der Prolinsynthese (Szoke *et al.*, 1992, LaRosa *et al.*, 1991). Eine Überexpression der P5CS zeigte eine erhöhte Prolinkonzentration in osmotisch gestressten und ungestressten Pflanzen (Kavi Kishor *et al.*, 1995). Eine erhöhte

Prolinsynthese unter hochosmotischen Bedingungen konnte unter anderem für *A. thaliana* (Peng *et al.*, 1996), *Hordeum vulgare* (Stewart *et al.*, 1977), *Lycopersicon esculentum* (Rhodes *et al.*, 1986), und *Nicotiana tabacum* (LaRosa *et al.*, 1991) nachgewiesen werden.

2.3.2 Synthese von Glycin-Betain

Ein hyperosmotischer Schock führt in vielen Pflanzen und Bakterien zur Synthese von Glycin-Betain aus dem Vorläufermolekül Cholin (Rhodes & Hanson, 1993, Galinski & Trüper, 1994; Csonka & Epstein, 1996). Auch in *B. subtilis* wird das osmotisch inerte Cholin zu Glycin-Betain umgesetzt. Der Transport von exogenem Cholin erfolgt über die beiden Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter OpuB und OpuC, die beide eine hohe Affinität zu Cholin besitzen (Kappes *et al.*, 1999). Während OpuC eine breite Substratspezifität besitzt, ist die Transportaktivität des eng verwandten OpuB-Transporters auf Cholin und Glycin-Betain-Aldehyd beschränkt (Kappes *et al.*, 1998).

Die Synthese von Glycin-Betain erfolgt in *E. coli* durch BetA, eine membrangebundene, FAD-abhängige Cholin-Dehydrogenase, die Cholin direkt über Glycin-Betain-Aldehyd zu Glycin-Betain umsetzt (Lamark *et al.*, 1991; Pocard *et al.*, 1997). In *B. subtilis* wird Cholin durch die NAD/NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenase des Typ III (GbsB) zu Glycin-Betain-Aldehyd oxidiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Oxidation durch die NAD-abhängige Betain-Aldehyd-Dehydrogenase (GbsA) zu Glycin-Betain. Die beiden zugehörigen Strukturgene *gbsB* und *gbsA* (glycine betaine synthesis) sind in einem Operon angeordnet (Boch *et al.*, 1996). Vor diesem Operon befindet sich ein divergent angeordneter Leserahmen *gbsR*, dessen Genprodukt GbsR, als Repressor, die Transkription des *gbsAB*-Operons und die des *opuB*-Operons, in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Cholin, reguliert (Nau-Wagner, 1999).

2.3.3 Transport von osmoprotektiven Substanzen

Viele Organismen akkumulieren osmoprotektive Substanzen zur Adaptation an die extrazelluläre Osmolarität (Csonka & Hanson, 1991; Poolmann & Glaasker, 1998). Dabei spielt neben der Synthese von einer, oder selten mehreren osmotischen Schutzsubstanzen, der aktive Transport, von osmoprotektiven Substanzen, eine bedeutende Rolle (Csonka & Epstein, 1996). Die Verfügbarkeit dieser Substanzen im Boden, hängt von der verrottenden Biomasse und der Wurzelexudate ab (Kemble & MacPherson, 1954).

2.3.3.1 Transport Glycin-Betain und strukturverwandten Verbindungen

Viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien akkumulieren die Trimethylammonium-Verbindung Glycin-Betain als eine metabolisch inerte und hoch effektive osmoprotektive Substanz (Kempf & Bremer, 1998; Csonka & Epstein, 1996; Poolmann & Glaasker, 1998). In *B. subtilis* wird Glycin-Betain in hohen Konzentrationen akkumuliert. Eine Erhöhung der Osmolarität um 400 mM NaCl, in einem Medium mit 1 mM Glycin-Betain, führt innerhalb von zwei Stunden zu einer Steigerung der intrazellulären Glycin-Betain Konzentration von 175 mM auf 700 mM (Whatmore *et al.*, 1990).

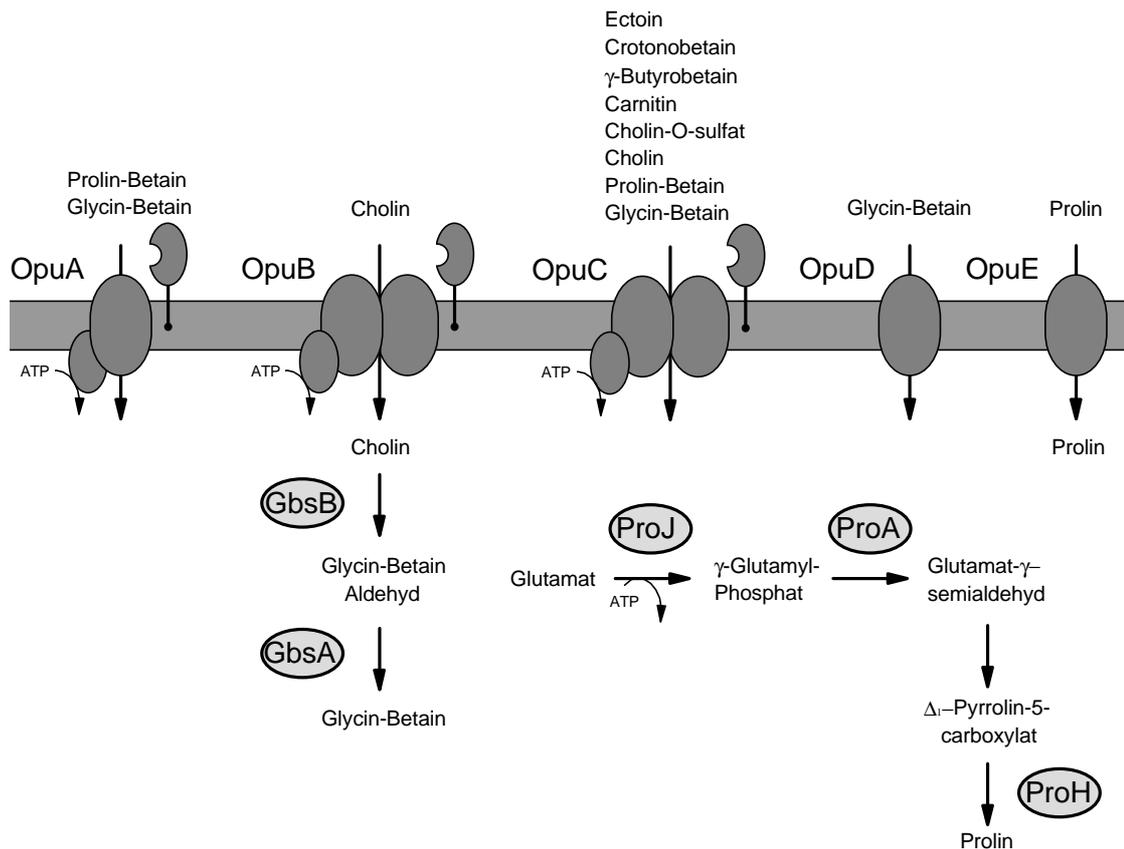


Abb.2: Akkumulation von osmoprotektiven Substanzen in *B. subtilis* durch Synthese und Transport (Verändert nach Kempf & Bremer, 1998)

Die Akkumulation von Glycin-Betain in *B. subtilis* erfolgt durch Synthese aus dem Vorläufermolekül Cholin und dem Import von exogen vorliegendem Glycin-Betain. Für Glycin-Betain stehen in *B. subtilis* drei verschiedene osmotisch regulierte Transportsysteme zur Verfügung: OpuA, OpuC und OpuD (Kempf & Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996). Durch molekulare und genetische Charakterisierung der Systeme konnte gezeigt werden, dass es sich bei OpuA (OpuAA, OpuAB, OpuAC) und bei OpuC (OpuCA, OpuCB, OpuCC) um Mehrkomponentensysteme handelt, die zur Familie der ABC-Transporter gehören. Die Gene des OpuA-Systems sind in einem Operon angeordnet und kodieren für eine ATPase (*opuAA*), eine membranspannende Domäne (*opuAB*) und ein extrazelluläres Substratbindeprotein (*opuAC*). Für OpuAC konnte gezeigt werden, dass es über ein kovalent gebundenes Lipid an einem aminoterminalen Cysteinrest verfügt (Kempf *et al.*, 1997). Das OpuC-System gleicht dem OpuA-System, es enthält jedoch noch eine zweite Membrankomponente. OpuA und OpuC zeigen strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten zu den Bindeprotein-abhängigen Glycin-Betain Transportsystem ProU von *E. coli* (Gowrishankar, 1989; Lucht & Bremer, 1994). OpuD ist ein integrales Membranprotein und besteht aus nur einer Komponente. Es repräsentiert zusammen mit dem Cholin-Transporter BetP (Lamark *et al.*, 1991) und dem Carnitin-Transporter CaiT (Eichler *et al.*, 1994) aus *E. coli*, sowie den beiden Glycin-Betain Transportern BetP und EctP aus *Corynebacterium glutamicum* (Peter *et al.*, 1996, 1998) und BetL aus *Listeria*

monocytogenes (Sleator *et al.*, 1999) eine neue, kleine Familie von Trimethylammonium-Transportern, die zur BCCT-Familie (Betain-, Carnitin-, Cholin- Transporter) zusammengefaßt wurden (Paulsen *et al.*, 1998; Kappes *et al.*, 1996). Eine Erhöhung der Osmolarität führt zu einer verstärkten Expression von *opuD* und zu einer Aktivierung der OpuD-Proteine (Kappes *et al.*, 1996).

Alle drei Glycin-Betain Transportsysteme zeigen eine hohe Substrataffinität, mit K_m -Werten im micromolaren Bereich, so dass eine Aufnahme von Glycin-Betain auch dann erfolgt, wenn die Konzentration im Medium sehr gering ist. Die Transportaktivität ist in den drei Systemen sehr verschieden. Das OpuA-System zeigt die höchste Transportrate und ist damit sicherlich der wichtigste Glycin-Betain Transporter (Kappes *et al.*, 1996).

Neben Glycin-Betain transportieren OpuA und OpuC die osmoprotektiven Substanzen DMSA, DMSP und Prolin-Betain. Darüber hinaus transportiert OpuC noch weitere, dem Glycin-Betain Strukturverwandte Verbindungen, wie Cholin, Carnitin, Crotonobetain, γ -Butyrobetain, Cholin-O-sulfat und Ectoin (Kappes & Bremer, 1998; Jebbar *et al.*, 1997; Nau-Wagner *et al.*, 1999).

Neben OpuC existiert in *B. subtilis* noch ein weiterer Cholin-Transporter OpuB. Durch die hohe Sequenzidentität zu OpuC geht man davon aus, dass diese Systeme durch eine Genduplikation entstanden sind. Erstaunlich ist, dass trotz der engen Verwandtschaft von OpuB und OpuC, diese Systeme eine sehr unterschiedliche Substratspezifität aufweisen, da durch OpuB nur Cholin und Glycin-Betain Aldehyd transportiert wird (Kappes *et al.*, 1999).

2.3.3.2 Transport von Prolin

Nach einem hyperosmotischen Schock akkumulieren viele Pflanzen (Peng *et al.*, 1996), sowie Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Csonka, 1989; Lucht & Bremer, 1994) hohe Konzentrationen von Prolin als osmoprotektive Substanz. Während in vielen Bakterien, unter hochosmolaren Bedingungen, hohe intrazelluläre Prolinkonzentrationen nur durch einen gesteigerten Transport erreicht werden, erfolgt in dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* außerdem eine osmotisch induzierte Steigerung der Prolinsynthese.

In Enterobakterien erfolgt die Aufnahme von Prolin durch die Transportsysteme PutP, ProP und ProU. Die Glycin-Betain Transportsysteme ProP und ProU transportieren Prolin nur mit geringer Affinität, sind jedoch osmotisch induzierbar (Csonka, 1989, Lucht & Bremer, 1994; Wood, 1999). Das PutP-System wird durch hohe Osmolarität reprimiert und dient zur Aufnahme von Prolin als C- oder N-Quelle (Wood, 1988). Dagegen sind in *B. subtilis* die Glycin-Betain Transportsysteme OpuA, OpuC und OpuD, sowie der Cholin-Transporter OpuB nicht an der Aufnahme von Prolin beteiligt. Der Transport von Prolin als osmoprotektive Substanz erfolgt in *B. subtilis* durch das, aus einem integralen Membranprotein bestehende OpuE-Transportsystem (von Blohn *et al.*, 1997). Der hochaffine Transport von Prolin durch OpuE ist abhängig von der Osmolarität des Mediums. Eine erhöhte Osmolarität induziert die Expression von *opuE*, nicht aber die Aktivität des Transporters. Auf Grund seiner hohen Homologie wurde OpuE der SSS-Familie von Sekundärtransportern (sodium/solute symporter) zugeordnet. Diese umfaßt pro- und eukaryotische Proteine, die obligatorisch die Substrataufnahme mit dem Symport von Na^+

koppeln (Reizer *et al.*, 1994, von Blohn *et al.*, 1997). Die Substratspezifität dieser Proteine beinhaltet Pantothersäure und Prolin in Bakterien, und Nukleoside, Glucose und neutrale Aminosäuren in Säugetieren. Zu dieser Familie gehören auch die zu OpuE homologen Prolin Permeasen PutP von *E. coli*, *S. typhimurium* und *Staphylococcus aureus* (Cairny *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985; Myers & Maloy, 1988; Wood, 1988; Wengender & Miller, 1995). Die Topologie dieser Na⁺/Prolin Transporter wurde zunächst durch eine Hydropathie-Profil Analyse der Aminosäuresequenz untersucht. Dies legt nahe, dass OpuE aus 12 α -helikalen Transmembran-Domänen besteht, die untereinander durch hydrophile Loops verbunden sind. Durch die Anwendung der „positive-inside-rule“ (von Heijne, 1992) befindet sich der Carboxy- und der Aminoterminal im Cytoplasma. Dieses Topologiemodell wurde durch neuere Untersuchungen von PutP aus *E. coli* in Frage gestellt (Jung *et al.*, 1998). Darauf basierend besteht PutP aus 13 membranspannenden Domänen mit einem periplasmatischen N-Terminus. Durch die hohe Homologie zu PutP aus *E. coli* ist diese Topologie auch für OpuE sehr wahrscheinlich. Unterstützt wird dieses Strukturmodell durch Experimente von Turk und Wright (1997), die für den zu OpuE strukturell verwandten sekundären Transportern der SLGT Familie aus Säugetieren, Eubakterien, Hefen, Insekten und Nematoden, auch 13 Transmembran-Domänen, mit einem periplasmatischen N-Terminus nachweisen konnten.

Experimente mit einem *opuE*-defizienten Stamm haben gezeigt, dass neben dem osmotisch induzierbaren OpuE-Transporter mindestens noch ein weiterer Prolin Transporter existieren muß (von Blohn *et al.*, 1997). Durch das Genom-Sequenzierungs Projekt konnte ein offener Leserahmen, *ycgO*, gefunden werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 63 % Identität zu dem OpuE-Transporter aufweist (Yamane *et al.*, 1996). Die Beteiligung von YcgO beim Transport von Prolin wird dadurch unterstützt, dass unmittelbar neben *ycgO* die Gene *ycgN* und *ycgM* liegen, die für Proteine kodieren, die eine signifikante Identität zur γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase und Prolin Dehydrogenase Domäne von PutA aus *E. coli* aufweisen (von Blohn *et al.*, 1997). PutA katalysiert den Abbau von Prolin zu Glutamat (Ling *et al.*, 1994).

3. Osmoregulation nach einem hypoosmotischen Schock

Die an eine hochosmotische Umgebung angepaßten Mikroorganismen haben intrazellulär hohe Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen akkumuliert. Ein hypoosmotischer Schock führt in diesem Zustand zu einem starken Wassereinstrom in das Cytoplasma der Zellen, in dessen Folge der Zellturgor ansteigt. Um eine Lyse der Zelle zu verhindern, muß diese den intrazellulären Pool der osmotisch wirksamen Substanzen umgehend reduzieren. Die schnellste Möglichkeit dies zu erreichen besteht im Efflux durch spezifische Transporter und Mechanosensitive (MS) Kanäle. Es wird vermutet, dass die in Bakterien allgegenwärtigen MS Kanäle für die Anpassung an osmotischen Stress, insbesondere an den schnellen Wechsel von hohen zu niedrigen Osmolaritäten verantwortlich, sind (Levina *et al.*, 1999). Eine weitere, wenn auch langsamere Alternative, ist der Abbau der osmoprotektiven Substanzen und Nutzung als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle, zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase, sowie die Polymerisation in eine osmotisch inaktivere Form.

3.1 Efflux von osmoprotektiven Substanzen

Ein Efflux von osmoprotektiven Substanzen erfolgt nach einer moderaten, langsamen Turgoränderung durch spezifische Effluxsysteme, dagegen führt ein hypoosmotischer Schock zur Öffnung von MS Kanälen (Csonka & Epstein, 1996; Glaasker *et al.*, 1996). MS Kanäle werden als Antwort auf hohen cytoplasmatischen Druck geöffnet. Sie sind relativ unspezifisch und von unterschiedlicher Porengröße (Berrier *et al.*, 1992; Blount *et al.*, 1996).

In dem Gram-positiven Bakterium *Lactobacillus plantarum* konnten auf physiologischer Ebene zwei Effluxsysteme für Glycin-Betain charakterisiert werden (Glaasker *et al.*, 1996). Man geht davon aus, dass nach einem hypoosmotischen Schock innerhalb der ersten Sekunden ein rascher Efflux von Glycin-Betain, durch einen osmotisch regulierten MS Kanal erfolgt. Dieser ersten Phase folgt ein langsamer Export durch ein Transportsystem, das auch in Medien gleichmäßiger Osmolarität aktiv ist. Durch neue Untersuchungen von Ajouz *et al.* (1998) konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass nach einem hypoosmotischen Schock, ein Efflux von 1 M Glycin-Betain in weniger als 200 ms erfolgt. Durch die extreme Efflux-Geschwindigkeit ist es höchst wahrscheinlich, dass es sich hierbei um MS Kanäle handelt.

MS Kanälen sind in Pro- und Eukaryonten ubiquitär verbreitet und konnten bisher auf elektrophysiologischer Ebene in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien nachgewiesen werden (Morris, 1990; Sackin, 1995). In Prokaryonten sind die MS Kanäle am besten im *E. coli* untersucht worden. Entsprechend ihrer Leitfähigkeit, Kinetik, Ionenselektivität und Reaktion nach Turgoränderungen, konnten drei verschiedene Kanalaktivitäten charakterisiert werden: MscL (Mechanosensitive channel Large conductance), MscS (Small) und MscM (Mini) (Berrier *et al.*, 1996). Nachdem auf molekularer Ebene in *E. coli* ein MscL Kanal charakterisiert werden konnte (Sukharev *et al.*, 1994), wurden inzwischen über 20 andere MscL Kanäle bei verschiedenen Prokaryonten identifiziert und kloniert (Moe *et al.*, 1998). Durch Entdeckung eines MscS Kanals (KefA) aus *E. coli*, konnten durch Homologiestudien in der Proteindatenbank (Altschul *et al.*, 1990), weitere MscS Kanäle für *E. coli* und andere Prokaryonten gefunden werden (Cui & Adler, 1996; Levina *et al.*, 1999). Es zeigte sich, dass in *E. coli* die Adaptation von hohen zu niedrigen Osmolaritäten essentiell von den beiden Kanälen YggB (MscS) und MscL abhängig ist (Levina *et al.*, 1999). Neben der physiologischen Charakterisierung wurde die Kristallstruktur eines MscL Proteins von *Mycobacterium tuberculosis* aufgedeckt (Chang *et al.*, 1998), wodurch die Funktionsweise von MS Kanälen weiter aufgeklärt werden kann.

Für *B. subtilis* wurde im Rahmen des Genom Sequenzierungsprojektes ein offener Leserahmen *ywpC* gefunden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine hohe Homologie zu dem MscL Protein von *E. coli* zeigt. Die Suche nach MscS Proteinen in *B. subtilis* führte zu den drei Genen *yhdY*, *ykuT* und *yfkC*, sie kodieren für Proteine die eine Homologie zu dem YggB Protein (MscS) von *E. coli* aufweisen.

3.2 Abbau von osmoprotektiven Substanzen

Neben seiner Funktion als osmoprotektive Substanz dient Prolin als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle. Für die Zelle ist es daher besonders interessant, dass unter hochosmotischen Bedingungen in hohen Konzentrationen akkumulierte Prolin, nach einem hypoosmotischen Schock, zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase zu nutzen (Verbruggen *et al.*, 1996). Die unterschiedliche Funktion von Prolin kann in hochosmolaren Medien aber zu einem „futile cycle“ führen, bei dem Prolin als osmoprotektive Substanz akkumuliert und gleichzeitig abgebaut wird. Als Folge daraus, könnte zum einen die Osmoadaptation verzögert werden, zum anderen kann durch die energetisch ungünstige Situation, von gleichzeitiger Prolinsynthese und Abbau, die Proliferation der Zellen beeinträchtigt werden. Die Regulation des Prolinabbaus während und nach osmotischem Stress wird in vielen Organismen untersucht. In Pflanzen erfolgt die Synthese von Prolin nach einem hyperosmolaren Schock im Cytoplasma. Der Prolinabbau findet dagegen an der inneren Mitochondrien Membran statt (Verbruggen *et al.*, 1996). Neben dieser räumlichen Trennung ist die Aktivität, der für die Oxidation von Prolin zu Glutamat verantwortlichen Enzyme, unter hochosmolaren Bedingungen reduziert (Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996). Dagegen erfolgt in Prokaryonten die Synthese und der Abbau von Prolin in nur einem Kompartiment, dem Cytoplasma. Für *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Prolin unter hohen Osmolaritäten auf enzymatischer Ebene inhibiert ist (Ekena & Maloy, 1990). Ob der Abbau von Prolin, analog zu den Pflanzen, bei einem Wechsel in niederosmolares Medium direkt induziert wird, ist bisher nicht bekannt.

Die Oxidation von Prolin zu Glutamat erfolgt in Pro- und Eukaryonten in zwei enzymatisch katalysierten Schritten. In den Enterobakterien *E. coli* und *S. typhimurium* besitzt das Enzym PutA zwei katalytisch aktive Domänen: eine Prolin Dehydrogenase (auch als Prolin Oxidase bezeichnet) und eine γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase (auch als Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase bezeichnet). Die FAD-abhängige Prolin Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat, welches nach der Hydrolyse zu Glutamat-semialdehyd von der NAD-abhängigen γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase zu Glutamat oxidiert wird (Wood & Zadworny, 1980; Wood, 1981 Ling *et al.*, 1994; Maloy *et al.*, 1987). Neben seiner enzymatischen Funktion agiert PutA in Enterobakterien auch als Transkriptionsregulator und reprimiert in Abwesenheit von Prolin die Expression des *putA*-Gens, indem es an die DNA der *put*-Kontrollregion bindet (Wood, 1987; Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993; Brown & Wood, 1993; Muro-Pastor & Maloy, 1995; Muro-Pastor *et al.*, 1997). In Anwesenheit von Prolin ändert sich der Redox-Zustand von PutA, das Enzym löst sich von der DNA und assoziiert mit der Membran (Wood, 1987). Darüber hinaus gehen Surber und Maloy (1998) davon aus, dass die Konformation des PutA-Proteins Änderungen unterworfen ist, um diese verschiedenen Funktionen erfüllen zu können. So soll PutA im Cytoplasma primär als Dimer vorliegen, während bei der Bindung an die DNA, PutA als Tetramer und im Membran-assoziierten Zustand, als Monomer vorliegt.

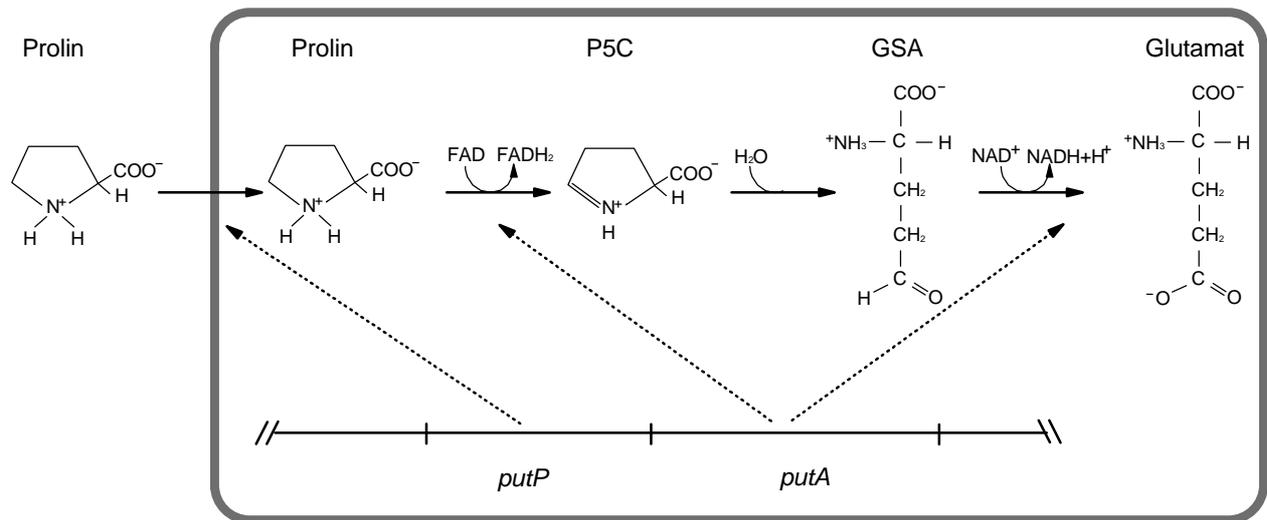


Abb.3: Abbau von Prolin in *S. typhimurium* und *E.coli*

Die Prolin Dehydrogenase (PutA) katalysiert mit Hilfe von FAD die Oxidation von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C). P5C hydrolysiert zu Glutamat-semialdehyd (GSA) und wird dann, bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺, durch die Glutamy-semialdehyd Dehydrogenase (PutA) zu Glutamat oxidiert. Der Transport von exogenem Prolin erfolgt durch die Prolin Permease PutP.

In *Saccharomyces cerevisiae* wird die Oxidation von Prolin durch zwei unabhängige Enzyme PUT1 und PUT2 katalysiert, deren Aktivität durch Prolin induziert und durch das PUT3 Protein reguliert wird (Wang & Brandriss, 1986; Brandriss & Magasanik, 1979; Brandriss, 1983, 1987; des Etages *et al.*, 1996). In Pflanzen konnte bisher nur die Prolin Dehydrogenase auf molekularer Ebene identifiziert werden, sie wird durch exogenes Prolin induziert. Damit gilt es als wahrscheinlich, dass in Pflanzen für die Oxidation von Prolin auch zwei verschiedene Proteine verantwortlich sind (Rayapati & Stewart, 1991; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1993).

Auf molekularer Ebene konnte für *B. subtilis* bisher nur die γ -Glutamy-semialdehyd Dehydrogenase RocA nachgewiesen werden (Gardan *et al.* 1995). Durch die Sequenzierung des *B. subtilis* Genoms wurde aber ein offener Leserahmen, *ycgN*, gefunden, dessen abgeleitetes Protein eine Homologie zu der γ -Glutamy-semialdehyd Dehydrogenase Domäne von PutA aus *Bradorhizobium japonicum* aufweist (Yamane *et al.*, 1996). Unmittelbar neben *ycgN* liegen zwei offene Leserahmen, *ycgM* und *ycgO*, die vermutlich für eine Prolin Dehydrogenase und Prolin Permease kodieren (von Blohn, 1997).

Neben dem Abbau von Prolin konnte für die, unter hochosmotischen Bedingungen akkumulierte osmoprotektive Schutzsubstanz Trehalose nachgewiesen werden, dass sie nach dem Wechsel in niederosmolares Medium, von *E. coli* und *Ectothiorhodospira halochloris*, schnell zum Monomer gespalten wird. Dieses steht dann als osmotisch weniger aktives Speichermaterial, oder für den Baustoffwechsel zu Verfügung (Csonka & Epstein, 1996; Herzog *et al.*, 1990). Das durch osmotischen Stress in *Rhizobium meliloti* akkumulierte Glycin-Betain wird nach dem osmotischen Stress rasch abgebaut und als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle genutzt (Fourgère & Le Rudulier, 1990).

4. Zielsetzung der Arbeit

Der Bodenmikroorganismus *B. subtilis* ist in der Lage in einer Umgebung zu überleben, die verursacht durch Regen oder Trockenheit, immer wieder Schwankungen der Osmolarität ausgesetzt ist. Die Anpassung an die jeweilige osmotische Bedingung erfolgt durch die variable Zusammensetzung der cytoplasmatischen Solute. Steigt die externe Osmolarität, infolge der Trockenheit an, so akkumuliert *B. subtilis* osmotische Schutzsubstanzen, durch den Transport exogen vorliegender Solute und darüber hinaus durch endogene Synthese von Prolin.

Prolin dient neben seiner Funktion als osmotisch aktive Substanz, auch als ergiebige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, wie *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen die gleichzeitige Synthese und den Abbau von Prolin, einen „futile cycle“ vermeidet. Der Abbau von Prolin sollte auf molekularer und physiologischer Ebene charakterisiert und seine Regulation in Abhängigkeit von der Osmolarität analysiert werden.

Da bisher nicht bekannt ist, wie *B. subtilis* nach einem hypoosmotischen Schock die hohen intrazellulären Konzentrationen osmotisch aktiver Substanzen reduziert, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob *B. subtilis* Effluxsysteme für osmotisch aktive Substanzen besitzt.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Abkürzungen

AA	=	Aminoacid (Aminosäure)
Amp, Ap	=	Ampicillin
ATP	=	Adenosintriphosphat
β -Gal	=	β -Galactosidase
Cam, Cm	=	Chloramphenicol
DEPC	=	Diethylpyrocarbonat
DMF	=	N,N-Dimethylformamid
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	Desoxyribonucleid acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	=	desoxy Nukleosid-(Adenosin, Cytosin, Guanin, Thymidin)-triphosphat
dsDNA	=	double stranded DNA (Doppelstrang-DNA)
ssDNA	=	single stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
dpm	=	decays per minute (reele Zerfälle pro Minute)
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	=	Ehtylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
Erm, Em	=	Erythromycin
Ex	=	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
IPTG	=	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Km	=	Kanamycin
Neo	=	Neomycin
Odx	=	Optische Dicht bei einer Wellenlänge von x nm
ONPG	=	2-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid
PCR	=	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	=	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNase	=	Ribonuclease
rpm	=	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	=	Raumtemperatur
SDS	=	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Spc, Sp	=	Spectinomycin
SSA	=	5-Sulfosalicylic acid (5-Sulfosalicylsäure)
Tet, Tc	=	Tetracyclin
TEMED	=	N,N,N',N'-Teramethylethylendiamin
XG	=	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
% (w/v)/(v/v)	=	Gewichtsprozent / Volumenprozent

2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

[1- ¹⁴ C]-Glycin-Betain (55 mCi/mmol)	ARC Inc., St.Louis, MO, USA
[Methyl- ¹⁴ C]-Cholinchlorid (53 mCi/mmol)	Du Pont de Nemour GmbH, NEN
Inulin [¹⁴ C]-Carboxylsäure (100 μ Ci/ml)	Amersham Life Science
L-[¹⁴ C(U)]-Prolin (40mCi/mmol)	Du Pont de Nemour GmbH, NEN

Sofern im Text nicht gesondert aufgeführt, wurden die Chemikalien und Materialien von den Firmen Boehringer Mannheim, Merck, Roth, Serva, Fluka, Qiagen oder Sigma bezogen. Die verwendeten Komplexmedien stammen von der Firma Difco.

3. Bakterienstämme und Plasmide

3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis*-Stämme sind Derivate des *B. subtilis*-Stammes JH642 (BGSC; 1A1). Die *E. coli*-Stämme DH5 α sind Derivate des *E. coli*-Stammes K-12. Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab.1: Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F λ <i>supE44</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
RC7111	<i>proA23 lac-28 his-51 trp-30</i>	CGSC 3456 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>		
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	BGSC 1A96 ^b
BLOB9	JH642 Δ (<i>opuE::tet</i>)1 ^c	von Blohn <i>et al.</i> , 1997
BLOB26	JH642 Δ (<i>opuE::tet</i>)1 (XpBLOB15.2)1	von Blohn, 1997
JBB5	JH642 Δ (<i>gbsAB::neo</i>)2	Boch <i>et al.</i> , 1996
JSB8	JH642 Δ (<i>proHJ::tet</i>)1	Brill, 1998
MBB1	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1	M. Brosius
RMKB20	JH642 Δ (<i>opuA::erm</i>)4 <i>opuC-20::Tn10(spc)</i> Δ (<i>opuD::neo</i>)2	Kappes & Bremer, 1998
RMKB22	JH642 Δ (<i>opuA::erm</i>)4 <i>opuB-20::Tn10(spc)</i> Δ (<i>opuD::neo</i>)2	Kappes & Bremer, 1998
RMKB30	JH642 <i>opuC-20::Tn10(spc)</i> Δ (<i>opuD::neo</i>)2	Kappes, 1997)
QB5521	Δ (<i>rocA::cam</i>)1	M. Débarbouillé
SMB3	JH642 Δ (<i>opuA::erm</i>)4 <i>opuC-20::Tn10(spc)</i> Δ (<i>opuD::neo</i>)2 Δ (<i>gbsAB::neo</i>)2	diese Arbeit
SMB10	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB^d-treA</i> , γ <i>ycgL^e</i>)1 ^f	diese Arbeit
SMB11	JH642 Δ (<i>putP^d::spc</i>)1	diese Arbeit
SMB12	JH642 Δ (<i>putP::spc</i>)1 Δ (<i>opuE::tet</i>)	diese Arbeit
SMB13	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i> , γ <i>ycgL</i>)1 Δ (<i>proHJ::tet</i>)1	diese Arbeit
SMB14	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i> , γ <i>ycgL</i>)1 Δ (<i>putP::spc</i>)1	diese Arbeit
SMB15	JH642 Δ (<i>treA::erm</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i> , γ <i>ycgL</i>)1	diese Arbeit
SMB18	JH642 Δ (<i>rocA::cam</i>)1	diese Arbeit
SMB27	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i> , γ <i>ycgL</i>)1 Δ (<i>putP::spc</i>)1 Δ (<i>opuE::tet</i>)	diese Arbeit
SMB28	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i> , γ <i>ycgL</i>)1 Δ (<i>opuE::tet</i>)	diese Arbeit
SMB32	JH642 Δ (<i>putC^d::neo</i>)2	diese Arbeit
SMB34	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i> , γ <i>ycgL</i>)1 Δ (<i>putC::neo</i>)2	diese Arbeit
SMB36	JH642 Δ (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::</i> Φ (<i>putB'-treA</i>)4	diese Arbeit
SMB37	JH642 Δ (<i>putC::neo</i>)2 Δ (<i>rocA::cam</i>)	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 1

Stamm	Beschreibung	Referenz
SMB40	JH642 $\Delta(treA::neo)1$ $amyE::\Phi(putB'-treA, 'ycgL)3$	diese Arbeit
SMB41	JH642 $\Delta(putP::spc)1$ $\Delta(rocA::cam)$	diese Arbeit
SMB42	JH642 $\Delta(putB::spc)3$	diese Arbeit
SMB45	JH642 $\Delta(putBCP::tet)2$	diese Arbeit
SMB46	JH642 $\Delta(treA::neo)1$ $amyE::\Phi(putB'-treA, 'ycgL)1$ $\Delta(putBCP::tet)2$	diese Arbeit
SMB49	JH642 $\Delta(treA::neo)1$ $amyE::\Phi(putB'-treA, 'ycgL)1$ $\Delta(putB::spc)3$	diese Arbeit
SMB51	JH642 $\Delta(putB::spc)3$ $\Delta(rocA::cam)$	diese Arbeit
SMB52	JH642 $\Delta(putBCP::tet)2$ $\Delta(rocA::cam)$	diese Arbeit
SMB53	JH642 $(ywpC::spc)1$	diese Arbeit
SMB54	JH642 $amyE::\Phi(putB'-lacZ, ycgL)$	diese Arbeit
SMB56	JH642 $amyE::\Phi(putB'-lacZ, ycgL)$ $\Delta(putBCP::tet)2$	diese Arbeit
SMB58	JH642 $\Delta(yhdY::erm)1$	diese Arbeit
SMB59	JH642 $\Delta(yhdZ::neo)1$	diese Arbeit
SMB60	JH642 $\Delta(yhdYZ::erm)1$	diese Arbeit
SMB61	JH642 $\Delta(yfkBC::tet)1$	diese Arbeit
SMB62	JH642 $\Delta(yfkC::tet)1$	diese Arbeit
SMB63	JH642 $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB64	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(yhdY::erm)1$	diese Arbeit
SMB65	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(yfkC::tet)1$	diese Arbeit
SMB66	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB67	JH642 $\Delta(yhdY::erm)1$ $\Delta(yfkC::tet)1$	diese Arbeit
SMB68	JH642 $\Delta(yhdY::erm)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB69	JH642 $\Delta(yfkC::tet)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB76	JH642 $\Delta(yhdY::erm)1$ $\Delta(yfkC::tet)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB77	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(yfkC::tet)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB78	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(yhdY::erm)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit
SMB79	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(yhdY::erm)1$ $\Delta(yfkC::tet)1$	diese Arbeit
SMB80	JH642 $\Delta(ywpC::spc)1$ $\Delta(yhdY::erm)1$ $\Delta(yfkC::tet)1$ $\Delta(ykuT::cam)1$	diese Arbeit

^a CGSC: *E. coli* Genetic Stock Center, Department of Biology 355 OML, Yale University, New Haven, USA;

^b BGSC: *Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio, USA, ^c $\Delta(opuE::tet)1$: eine Deletion des *opuE*-Gens wurde durch eine Tetracyclin-Kassette ersetzt ^d Die potentiellen Gene *ycgM*, *ycgN* und *ycgO* wurden in *putB*, *putC* und *putP* umbenannt, ^e *ycgL*: y bezeichnet Leserahmen, die für potentielle Gene mit unbestimmter Funktion kodieren (Kunst *et al.*, 1997), ^f $amyE::\Phi(putB'-treA, 'ycgL)1$: in das *amy*-Gen wurde eine Operonfusion (Φ) des Promotorbereichs von *putB* mit dem promotorlosen *treA*-Strukturgen inseriert.

3.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab.2: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBKB21	Derivat von pUCBM20, trägt Km ^r -Kassette	B. Kempf
pBKB80	Derivat von pUCBM20, trägt Em ^r -Kassette	B. Kempf
pBKB143	Derivat von pJMB1 mit <i>lacZ</i> -Gen ohne Promotor flankiert von 5' und 3' Fragmenten des <i>amy</i> -Gens, Cm ^r , Em ^r , Ap ^r	B. Kempf

Fortsetzung Tabelle 2

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBSK- pDG783	pBluescript® II SK- Phagemid, ColEI-Derivat, Ap ^r Derivat von pSB118, trägt Km ^r -Kassette	Stratagene GmbH A. Guérout- Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG1515	Derivat von pBSK+, trägt Tc ^r -Kassette	A. Guérout- Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG1726	Derivat von pSB119, trägt Sp ^r -Kassette	A. Guérout- Fleury <i>et al.</i> , 1995
pIC333	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle Vektor mit mini-Tn10 (Sp ^r) und temperatursensitiven Origin	Steinmetz & Richter 1994
pJMB1	Derivat von pMD476 mit <i>treA</i> -Gen ohne Promotor flankiert von 5' und 3' Fragmenten des <i>amy</i> -Gens, Cm ^r , Ap ^r	M. Jebbar
pOB26	Derivat von pBSK-, Tc ^r	O. Schmidt- Kittler, 1997
pPD100	Derivat von pHSG575, T7φ10-Promotor, Cm ^r	Dersch <i>et al.</i> , 1994
pRB373	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle Vektor, Ap ^r , Km ^r	Brückner, 1992
pSM4	Derivat von pBKB21 mit 'ycgP'	diese Arbeit
pSM6	Derivat von pPD100 mit 'ycgL putBCP ycgP'	diese Arbeit
pSM7	Derivat von pBSK- mit 'ycgL putB'	diese Arbeit
pSM8	Derivat von pJMB1 mit 'ycgL putB'- <i>treA</i> ^a	diese Arbeit
pSM9	Derivat von pSM6 mit Δ(<i>putP::spc</i>)1	diese Arbeit
pSM11	Derivat von pBSK- mit 'putP'	diese Arbeit
pSM12	Derivat von pBSK- mit 'ycgL putBCP'	diese Arbeit
pSM13	Derivat von pRB373 mit 'ycgL putB'	diese Arbeit
pSM15	Derivat von pSM12 mit Δ(<i>putC::neo</i>)2	diese Arbeit
pSM18	Derivat von pBSK- mit <i>putB'</i>	diese Arbeit
pSM20	Derivat von pJMB1 mit <i>putB'-treA</i> ^a	diese Arbeit
pSM21	Derivat von pJMB1 mit 'ycgL <i>putB'-treA</i> ^a	diese Arbeit
pSM23	Derivat von pBSK- mit 'ycgL <i>putBC'</i>	diese Arbeit
pSM24	Derivat von pBSK- mit 'ycgL <i>putBCP ycgP'</i>	diese Arbeit
pSM26	Derivat von pSM23 mit Δ(<i>putB::spc</i>)3	diese Arbeit
pSM30	Derivat von pSM24 mit Δ(<i>putBCP::tet</i>)2	diese Arbeit
pSM31	Derivat von pBSK- mit <i>ywpB' ywpC' ywpD</i>	diese Arbeit
pSM33	Derivat von pSM31 mit (<i>ywpC::spc</i>)1	diese Arbeit
pSM34	Derivat von pBSK- mit 'putC'	diese Arbeit
pSM35	Derivat von pBSK- mit 'putB'	diese Arbeit
pSM36	Derivat von pBKB143 mit 'ycgL <i>putB'-lacZ</i> ^b	diese Arbeit
pSM37	Derivat von pBSK- mit 'yhdX yhdY yhdZ' <i>yheN'</i>	diese Arbeit
pSM38	Derivat von pBSK- mit <i>yfkB yfkC' yfkD</i>	diese Arbeit
pSM39	Derivat von pPD100 mit 'yhdX yhdY yhdZ' <i>yheN</i>	diese Arbeit
pSM40	Derivat von pBSK- mit <i>ykuU' ykuT' ykuS</i>	diese Arbeit
pSM41	Derivat von pSM38 mit Δ(<i>yfkC::tet</i>)1	diese Arbeit
pSM42	Derivat von pSM38 mit Δ(<i>yfkBC::tet</i>)1	diese Arbeit
pSM44	Derivat von pSM39 mit Δ(<i>yhdY::erm</i>)1	diese Arbeit
pSM45	Derivat von pSM37 mit Δ(<i>yhdZ::neo</i>)1	diese Arbeit
pSM46	Derivat von pSM39 mit Δ(<i>yhdYZ::erm</i>)1	diese Arbeit
pSM47	Derivat von pSM40 mit Δ(<i>ykuT::cam</i>)1	diese Arbeit

^aOperonfusion mit *treA*; ^bOperonfusion mit *lacZ*; ^rAntibiotika-Resistenzen (Ap, Cm, Em, Sp, Tc) gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Spectinomycin und Tetracyclin.

4. Medien, Zusätze und Wachstumsbedingungen

4.1 Medien

Minimalmedien

Für *B. subtilis* wurde SMM (Spizizen's Minimalmedium; 1958) mit zusätzlichen Spurenelementen (Harwood & Cutting, 1990) verwendet. Es enthält folgende Bestandteile: 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6 g/l KH_2PO_4 ; 14 g/l K_2HPO_4 ; 1 g/l Na_3 -Citrat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 0,2 \text{g/l } 7 \text{H}_2\text{O}$, sowie eine Spurenelementlösung aus 5.5 mg/l CaCl_2 ; 13.5 mg/ml $\text{FeCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 1 mg/ml $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0.6 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 1.7 mg/l ZnCl_2 ; 0.6 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.43 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Zur Komplementation der Auxotrophien der Derivate des *B. subtilis*-Stammes JH642 wurde L-Tryptophan (20 mg/l) und L-Phenylalanin (18 mg/l) zugesetzt. Als Kohlenstoffquelle diente 0.5 % (w/v) Glucose oder 0.6 % (w/v) L-Prolin.

Für *E. coli* wurde Minimalmedium A (MMA, Miller, 1992) mit 0.2 % (w/v) Glucose verwendet. L-Histidin und L-Tryptophan wurden zur Komplementation der Auxotrophiemarker für den Stamm RC711 zugegeben.

Vollmedien

Die Vollmedien (DYT: Double Yeast tryptone; LB: Luria-Bertani Broth) wurden nach der Vorschrift von Miller (Miller, 1992) und Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt.

Festmedien enthielten zusätzlich 1.5 % Agar. Um LacZ^+ -Kolonien auf Agarplatten identifizieren zu können, wurden 4 ml einer XG-Lösung (10 mg/ml) zugegeben.

Transformationsmedium

Für die Transformation von *B. subtilis* wurde HS („High-salt“-Medium und LS („Low-salt“-Medium verwendet. Für das HS-Medium wurden 66.5 ml H_2O , 10 ml 10 x S-Base (2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6 % KH_2PO_4 ; 14 % K_2HPO_4 ; 1 % Na_3 -Citrat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 77 % H_2O , nach dem Autoklavieren 0.1 ml 1 M Mg_2SO_4), 2.5 ml 20 % Glucose, 1 ml 5 mg/ml Tryptophan, 1.5 ml 3 mg/ml L-Phenylalanin, 1 ml 2 % Caseinhydrolysat, 5 ml 2 % Hefeextrakt, 10 ml 8 % Arginin, 0,4 % Histidin getrennt autoklaviert, bzw. sterilfiltriert und zusammengegeben. Für das LS-Medium wurden 80 ml H_2O , 10 ml 10 x S-Base, 2.5 ml Glucose, 0.5 ml 1 mg/ml Tryptophan, 0.5 ml 2 % Caseinhydrolysat, 5 ml 2 % Hefeextrakt, 0.25 ml 1 M MgCl_2 , 0.05 ml 1 M CaCl_2 getrennt autoklaviert, bzw. sterilfiltriert und zusammengegeben.

Antibiotikakonzentrationen

Selektivmedien enthielten je nach Bedarf die in der folgenden Tabelle aufgeführten Antibiotikazusätze.

Tab.3: Antibiotikazusätze

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	100 mg /ml H_2O	-	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	30 mg/ml Ethanol	5 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$
Erythromycin	1 mg/ml Ethanol	0.4 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	50 mg/ml H_2O	5 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicin	20 mg/ml Methanol	-	100 $\mu\text{g/ml}$
Spectinomycin	50 mg/ml H_2O	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	5 mg/ml Ethanol	12 $\mu\text{g/ml}$	-

Osmolarität

Die Osmolarität von Wachstumsmedien wurde mit Hilfe eines Dampfdruckosmometers (Modell 5.500; Wescor Inc., Logab, Utah, USA) bestimmt und die Osmolarität durch Zugabe unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen erhöht.

Tab.4: Osmolarität der Minimalmedien

Medium	Osmolarität [mOsm]
SMM	340
SMM + 0.2 M NaCl	720
SMM + 0.4 M NaCl	1100
SMM + 0.6 M NaCl	1480
SMM + 0.8 M NaCl	1860
SMM + 1.0 M NaCl	2240

Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 120°C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert, Glaswaren mindestens 3 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

4.2 Wachstum

Wachstumsbedingungen

Die Bakterienkulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert. Agarplatten wurden im Brutschrank, Flüssigkulturen auf dem Reagenzglasroller, oder bei größeren Volumina in Erlenmeyerkolben bei 220 rpm inkubiert.

Wachstumskurven und TreA-Aktivitätsbestimmungen wurden in 80 ml Zellkultur in einem 500 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Die Bestimmung des Wachstumsertrages bzw. der Akkumulation von L-Prolin oder Glycin-Betain in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums erfolgte mit 20 ml Zellkultur in 100 ml Erlenmeyerkolben nach 16 h Inkubation.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt (Pharmacia LKB, Ultraspec III). Dabei entspricht eine OD von 1 ca. 1×10^9 Zellen/ml (Miller, 1992).

4.2.1 Quantifizierung der Wachstumshemmung durch toxische Prolinanaloga

Zur Quantifizierung der toxischen Wirkung der Prolinanaloga Azetidin-2-carbonsäure (AC) und 3,4-Dehydro-DL-prolin (DHP) wurden Kulturen der *B. subtilis* Stämme JH642, BLOB9, SMB11 und SMB12 bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{578}=2$) in SMM angezogen. Aliquots von 200 µl wurden anschließend auf SMM-Agarplatten, ohne bzw. mit 0.4 M NaCl plattiert. Auf diese Platten wurden sterile Filterpapiere (Whatman 3MM, Durchschnitt 5 mm) aufgebracht, die mit 10 µl einer Lösung der toxischen Prolinanaloga (25 mg/ml) getränkt waren (Csonka, 1982; Grothe *et al.*, 1986).

4.2.2 Kreuzfütterungs-Experimente

Um den Efflux von Prolin in verschiedenen *B. subtilis*-Stämmen nachweisen zu können wurden Kreuzfütterungs-Experimente durchgeführt. Dabei nutzte man den Umstand, dass der verwendete *E. coli*-Stamm RC711 aufgrund einer Mutation im Prolinsynthese-Gen (*proA*) nicht auf Minimalagarplatten ohne zusätzliches Prolin wachsen kann, und somit auf das vom

prolinprototrophen *B. subtilis* exportierte Prolin angewiesen ist. Um die Prolinsynthese in *B. subtilis* zu steigern wurden die Versuche auf MMA-Platten mit 0.8 M NaCl durchgeführt. Dazu wurden zunächst exponentiell wachsende Kulturen des *E. coli*-Stammes RC711 auf MMA-Platten mit 0.8 M NaCl plattiert und anschließend auf dieselben Platten entsprechende Verdünnungen der jeweiligen *B. subtilis*-Stämme JH642, BLOB9 und BLO26. Die Platten wurden mehrere Tage bei 37°C inkubiert.

5. Molekularbiologische und genetische Methoden

5.1 Präparation von Plasmid DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die von Birnboim und Doly (1979) eingeführte alkalische Lysismethode verwendet. Das Ausgangsvolumen der Zellkulturen betrug dabei 2 ml bzw. 250 ml. Plasmid-DNA für Sequenzreaktionen wurde mit Hilfe von Quia-Quick Säulen nach Vorschrift der Hersteller gereinigt (Qiagen, Düsseldorf).

5.2 Isolierung von chromosomaler DNA und Gesamt-RNA

Genomische DNA aus *B. subtilis* wurde mit Hilfe der DNA bindenden Säulen der Firma Qiagen (Quiatip 20) nach Vorschrift der Hersteller gereinigt. Die gewonnene chromosomale DNA wurde in 200 µl H₂O aufgenommen.

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte nach Vorschrift des „Total RNA Midi Kits“ (Qiagen). Die gewonnene RNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen.

Die Konzentration und die Reinheit der DNA und der RNA wurden photometrisch (Pharmacia LKB, Ultrospec III) bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA oder 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der DNA bzw. der RNA errechnet sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) (Sambrock *et al.*, 1989).

5.3 Klonierungstechniken

DNA-Restriktionen wurden mit den entsprechenden Enzymen nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über Agarosegele in TAE-Puffer (Sambrock *et al.*, 1989). Als Größenstandard diente mit *Bst*EII geschnittene λ-DNA. Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des GeneClean-Kits (Biorad). Das Auffüllen 5'-überhängender Enden, die Dephosphorylierung von Vektorenden und die Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Standardmethoden (Sambrock *et al.*, 1989) durchgeführt.

5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-Methode (Polymerase chain reaction) diente zur Amplifikation von DNA. Die Durchführung erfolgte nach dem Standard PCR-Protokoll von White (1993) in einem Trio Thermoblock-Cycler (Biometra). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Position der Primer ist in Abbildung 4 dargestellt.

Tab.5: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Bemerkungen	Sequenz
amyE1	Bindet im 5'-Bereich von <i>amyE</i>	5'-AAATGTGTGCAGCCGC-3'
amyE2	Bindet im 3'-Bereich von <i>amyE</i>	5'-TCACTTGAAATGAACCC-3'
M13 Forward Primer	Bindet in pBSK- und liest in Richtung <i>SacI</i>	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Reverse Primer	Bindet in pBSK- und liest in Richtung <i>KpnI</i>	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
SM12-ycgP5		5'-GGATGAAGAGCTCGAC-3'
SM13-ycgP3	Führt <i>SacI</i> -Schnittstelle ein	5'-AGATAGAGCTCGCAC-3'
SM19-ycgOSeq	5'IRD 41 Modifikation	5'-CATTAGCAGCCAGCCGC-3'
SM20-ycgMNO5	Führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein	5'-GTCATTGAGGATCCGATTCACG-3'
SM21-ycgMNO3		5'-ATTTTCCCGACATGGAAGGAG-3'
SM22-ycgO5	Führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle ein	5'-CGACTATCTAGATGACCATCCG-3'
SM23-ycgM3	Führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein	5'-GTTTCAGCTCCGGATCCGCG-3'
SM24-ycgM5	Führt <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein	5'-AACTGGGGAATTCGGGTAGC-3'
SM25-ycgM3	Führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein	5'-GTAGCCGTACGGATCCTCGC-3'
SM26-ycgO3		5'-GCCAGTTCGCCCAGGATCCAAGGC-3'
SM27-ycgOSeq	5'IRD 41 Modifikation	5'-CAGGTGCTATCGTCGGC-3'
SM28-PE1IRD	5'IRD 41 Modifikation	5'-CGCCATTTTATTGAGAAAGCCGC-3'
SM29-ycgM5	Führt <i>EcoRV</i> -Schnittstelle ein	5'-ACTTTCTAGATATCTGATTGTGGC-3'
SM30-ycgM5	Führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein	5'-TCTCTTGGGATCCCTTCCAACCTC-3'
SM35-ywpC5		5'-GTAGAGGATAACGGTCCCGGG-3'
SM36-ywpC3		5'-TGAAATCATTCGTGCCCGCGGC-3'
SM37-yhdY5	Führt <i>HindIII</i> -Schnittstelle ein	5'-GATGTACAAGCTTAGTCAGCTCC-3'
SM38-yhdZ3		5'-TTTTTTATGCTGTCACCGCGG-3'
SM39-ykuT5	Führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein	5'-ATATCCCGGATCCATGTTCTGGC-3'
SM40-ykuT3		5'-CAGTTTGATATTGAAGCTCCCC-3'
SM41-yfk5	Führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein	5'-CGGCGTTCAGCGGATCCACGCG-3'
SM42-yfk3	Führt <i>XhoI</i> -Schnittstelle ein	5'-CAGCCGCACGCTCGAGGATGCCG-3'
SM43-yhdZ5		5'-TCCAGACAGCAGCTTGTCCG-3'
SM44-yhdZ3		5'-ACCGATCTTGTCAGAACGCC-3'
SM45-ykuT5		5'-TCACTGACAAGCCCTTGGGC-3'
SM47-yfkD3		5'-GAACCGGAATCCACGCGCCG-3'

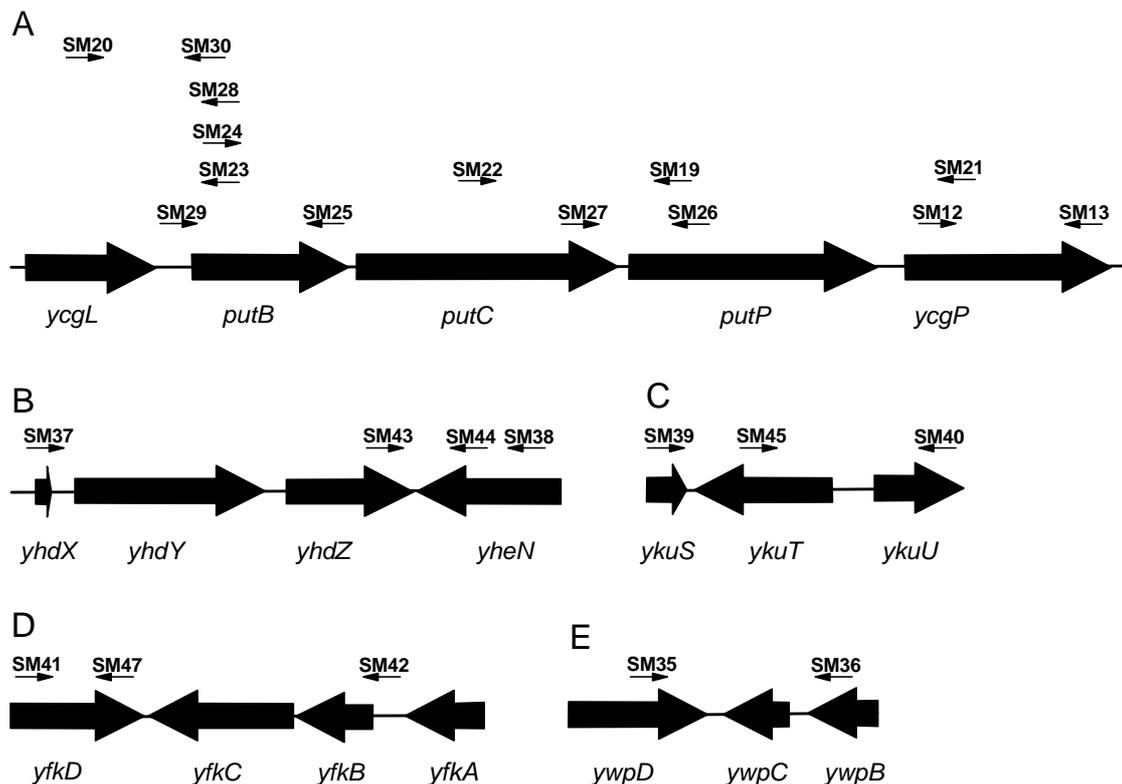


Abb.4: Darstellung und Lage der verwendeten Oligonukleotide

Die Abbildung gibt die Lage und die Orientierung der für die Sequenzierung und die Amplifikation (PCR) von Fragmenten der (A) *putBCP*-Region (B) *yhdYZ*-Region (C) *ykuT*-Region (D) *yfkCB*-Region (E) *ywpC*-Region verwendeten Oligonukleotide wieder. Die Länge der Oligonukleotide ist nicht maßstabsgetreu dargestellt, der korrekte Startpunkt wurde durch den Beginn des Pfeils gekennzeichnet.

5.5 Bestimmung der Nukleoidsequenz

Zur Sequenzanalyse wurde die Didesoxy-Kettenabbruchmethode angewendet (Sanger *et al.*, 1977; Biggin *et al.*, 1983). Die Sequenzreaktion wurde nach Anleitung mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit“ mit „7-Deaza-dGTP“ (Amersham Life Science) durchgeführt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte mit einem LI-COR DNA Sequenzer (Modell 4000, MWG).

5.6 Computeranalysen

Die Aufarbeitung und Analyse der Sequenzdaten, sowie der Ableitung von primären Aminosäuresequenzen und die Vergleiche mit homologen Proteinen wurden mit dem Lasergene-Programmpaket der Firma DNASTar (DNASTar Ltd, London, U.K.) durchgeführt. Die Suche nach bekannten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) in der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

5.7 Transformation

Transformation von *B. subtilis*

5 ml HS-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *B. subtilis*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 20 ml LS-Medium mit 1 ml der HS-Kultur angeimpft und drei bis vier Stunden bei 30°C inkubiert. Pro Transformationsansatz wurde 1 ml Kultur entnommen und mit 10 µl 0.1 M EGTA 5 min bei RT

inkubiert. Nach Zugabe der DNA wurden die Transformationsansätze zwei Stunden bei 37°C geschüttelt und auf Selektivmedien ausplattiert.

Transformation von *E. coli*

Plasmide und Ligationsansätze wurden durch Elektroporation (Gene-Pulser, BioRaf) auf *E. coli* übertragen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (“Bacterial electrotransformation and pulse controller instruction manual. Version 1.0”)

5.8 Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen

5.8.1 Konstruktion von Plasmiden

pSM4: Unter Verwendung der Primer SM12 und SM13, der eine *SacI*-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 833 bp Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet den intergenen Bereich des *ycgP*-Gens. Das PCR-Fragment wurde mit *SacI* verdaut und das entstandene Fragment in den mit *SacI* verdauten pBKB21-Vektor ligiert.

pSM6: Unter Verwendung der Primer SM20, der eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt, und SM21 wurde ein 5.4 kb Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das gesamte *putBCP*-Operon und schließt die flankierenden Bereiche *ycgL* und *ycgP'* mit ein. Das PCR-Fragment wurde mit *SacI* und *BamHI* verdaut und das entstandene 5.3 kb Fragment in den mit *SacI* und *BamHI* verdauten pPD100-Vektor ligiert.

pSM7: Unter Verwendung der Primer SM20 und SM23, der eine *BamHI*-Schnittstelle einführt, wurde ein 1.01 kb Fragment mittels PCR aus dem Genom von *B. subtilis* amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das 5'-Ende des *ycgL*-Gens, den intergenen Bereich und 270 bp des 3'-Endes des *putB*-Gens. Das PCR-Fragment wurde mit *EcoRV* und *BamHI* verdaut und in den mit *EcoRV* und *BamHI* geschnittenen pBSK-Vektor ligiert.

pSM8: Aus dem Plasmid pSM7 wurde das 1.01 kb *EcoRV*-*BamHI* Fragment mit dem Bereich *ycgL putB'* ausgeschnitten und in den mit *SmaI*-*BamHI* linearisierten pJMB1-Vektor ligiert. Das Plasmid pJMB1, trägt ein 768 bp Fragment des 5'-Endes („*amyE* back“) und ein 534 bp Fragment des 3'-Endes (*amyE* front) des *amyE*-Gens von *B. subtilis*. Zwischen diesen *amyE*-Fragmenten befindet sich ein *cat*-Gen und ein promotorloses *treA*-Gen, vor dem in gleicher Orientierung die Promotorregion des *putB*-Gens kloniert wurde. Das konstruierte Plasmid pSM8 trägt die Promotorfusion [*amyE*:: Φ (*ycgM'*-*treA*, *ycgL*)1].

pSM9: Das Plasmid trägt eine Deletion des *putP*-Gens. Hierfür wurde die Spectinomycin-Kassette mit *EcoRV*-*HincII* aus dem Plasmid pDG1726 in das mit *NaeI* linearisierte Plasmid pSM6 kloniert.

pSM11: Unter Verwendung der Primer SM24 und SM25, die eine *EcoRI*- bzw. eine *BamHI*-Schnittstelle einführen, wurde ein 0.71 kb Fragment mittels PCR aus dem Genom von *B. subtilis* amplifiziert. Das Fragment beinhaltet den mittleren Teil des *putB*-Gens. Das PCR-Fragment wurde mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in den mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen pBSK-Vektor ligiert.

pSM12: Unter Verwendung der Primer SM20 und SM26, der eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 3.6 kb Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet den Bereich *ycgL putB putC putP'*. Das PCR-Fragment wurde mit *EcoRV* und *BamHI* verdaut und das entstandene 3.56 kb Fragment in den mit *EcoRV* und *BamHI* verdauten pBSK-Vektor ligiert

pSM13: Aus dem Plasmid pSM7 wurde mit *HindIII* und *BamHI* das 1.02 kb Fragment mit `ycgL putB´ ausgeschnitten und in das mit *HindIII* und *BamHI* linearisierte *E. coli-B. subtilis* shuttle Plasmid pRB373 ligiert.

pSM15: Das Plasmid trägt eine Deletion des *putC*-Gens. Hierfür wurde die Kanamycin-Kassette mit *EcoRI* aus dem Plasmid pDG783 in das mit *EcoRI* linearisierte Plasmid pSM12 kloniert

pSM18: Unter Verwendung der Primer SM29 und SM23, die eine *EcoRV*- bzw. eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugen, wurde ein 493 bp Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet den intergenen Bereich zwischen dem *ycgL*- und *putB*-Gen und 270 bp des 3´-Endes des *putB*-Gens. Das PCR-Fragment wurde mit *EcoRV* und *BamHI* verdaut und in den mit *EcoRV* und *BamHI* geschnittenen pBSK-Vektor ligiert.

pSM20: Aus dem Plasmid pSM18 wurde das 469 bp *EcoRV*-*BamHI* Fragment mit dem Bereich *putB´* ausgeschnitten und in den mit *SmaI*-*BamHI* linearisierten pJMB1-Vektor ligiert. Das konstruierte Plasmid pSM20 trägt die Promotorfusion [*amyE::Φ(ycgM´-treA)*4].

pSM21: Unter Verwendung der Primer SM20 und SM30, der eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 807 bp Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das 5´-Ende des *ycgL*-Gens und den intergenen Bereich zwischen dem *ycgL*- und dem *putB*-Gens. Das PCR-Fragment wurde mit *EcoRV* und *BamHI* verdaut und in den mit *SmaI* und *BamHI* geschnittenen pJMB1-Vektor ligiert. Das konstruierte Plasmid pSM21 trägt die Promotorfusion [*amyE::Φ(ycgM´-treA)*3].

pSM23: Aus dem Plasmid pSM9 wurde mit *EcoRI* das 2.6 kb Fragment mit `ycgL putB putC´ ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* linearisierten pBSK- Vektor kloniert.

pSM24: Aus dem Plasmid pSM6 wurde mit *EcoRV* das 5.3 kb Fragment mit `ycgL putB putC putP ycgP´ ausgeschnitten und in den mit *EcoRV* linearisierten pBSK-Vektor kloniert.

pSM26: Das Plasmid trägt eine Deletion des *putB*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM23 mit *StyI* geschnitten und die überstehenden Enden mit Klenow aufgefüllt. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *EcoRV* und *HincII* aus dem Plasmid pDG1726 ausgeschnittene Spectinomycin-Kassette kloniert.

pSM30: Das Plasmid trägt eine Deletion des *putBCP*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM24 mit *StyI* geschnitten und die überstehenden Enden mit Klenow aufgefüllt. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *SmaI* und *HindIII* aus dem Plasmid pOB26 ausgeschnittene Tetracyclin-Kassette kloniert.

pSM31: Unter Verwendung der Primer SM35 und SM36 wurde ein 847 bp Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das *ywpC*-Gen und schließt die flankierenden Bereiche `ywpD und `ywpB mit ein. Das PCR-Fragment wurde mit *SmaI* und *SacII* verdaut und das entstandene 813 bp Fragment in den mit *SmaI* und *SacII* verdauten pBSK-Vektor ligiert.

pSM33: Das Plasmid trägt eine Unterbrechung des *ywpC*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM31 mit *StuI* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *EcoRV* und *HincII* aus dem Plasmid pDG1726 ausgeschnittene Spectinomycin-Kassette kloniert.

pSM34: Aus dem Plasmid pSM12 wurde mit *EcoRI* das 1.4 kb Fragment mit dem mittleren Teil des *putC*-Gens ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* linearisierten pBSK-Vektor kloniert.

pSM35: Aus dem Plasmid pSM6 wurde mit *NaeI* das 1.3 kb Fragment mit dem mittleren Teil des *putP*-Gens ausgeschnitten und in den mit *EcoRV* linearisierten pBSK-Vektor kloniert.

pSM36: Aus dem Plasmid pSM7 wurde mit *EcoRV* und *BamHI* das 1.01 kb Fragment mit dem Bereich `ycgL putB´ ausgeschnitten und in den mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten pBKB143-

Vektor kloniert. Das konstruierte Plasmid pSM8 trägt die [*amyE*:: Φ (*ycgM*'-lacZ, 'ycgL)]-Fusion.

pSM37: Unter Verwendung der Primer SM37, der eine *HindIII*-Schnittstelle erzeugt und SM38 wurde ein 2.9 kb Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das *yhdY*- und das *yhdZ*-Gen und schließt die flankierenden Bereiche *yhdX* und *yheN* mit ein. Das PCR-Fragment wurde mit *HindIII* und *SacII* verdaut und das entstandene 2.9 kb Fragment in den mit *HindIII* und *SacII* verdauten pBSK-Vektor ligiert.

pSM38: Unter Verwendung der Primer SM41 und SM42, die eine *BamHI*- und eine *XhoI*-Schnittstelle erzeugen, wurde ein 2.2 kb Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das *yfkB*- und das *yfkC*-Gen und schließt den flankierenden Bereich *yfkD* mit ein. Das PCR-Fragment wurde mit *BamHI* und *XhoI* verdaut und das entstandene 2.9 kb Fragment in den mit *BamHI* und *XhoI* verdauten pBSK-Vektor ligiert.

pSM39: Unter Verwendung der Primer SM37, der eine *HindIII*-Schnittstelle erzeugt und SM38 wurde ein 2.9 kb Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das *yhdY*- und das *yhdZ*-Gen und schließt die flankierenden Bereiche *yhdX* und *yheN* mit ein. Das PCR-Fragment wurde mit *HindIII* und *SacII* verdaut und das entstandene 2.9 kb Fragment in den mit *HindIII* und *SacII* verdauten pPD100-Vektor ligiert.

pSM40: Unter Verwendung der Primer SM39, der eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt und SM40 wurde ein 1.9 kb Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Das Fragment beinhaltet das *ykuT*-Gen und schließt die flankierenden Bereiche *ykuU*' und *ykuS* mit ein. Das PCR-Fragment wurde mit *BamHI* und *SmaI* verdaut und das entstandene 1.87 kb Fragment in den mit *BamHI* und *EcoRV* verdauten pPD100-Vektor ligiert.

pSM41: Das Plasmid trägt eine Deletion des *yfkC*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM38 mit *EcoRI* und *HincII* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *SmaI* und *EcoRI* aus dem Plasmid pDG1515 ausgeschnittene Tetracyclin-Kassette kloniert.

pSM42: Das Plasmid trägt eine Deletion des *yfkB*- und des *yfkC*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM38 mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *EcoRI* und *PstI* aus dem Plasmid pOB26 ausgeschnittene Tetracyclin-Kassette kloniert.

pSM44: Das Plasmid trägt eine Deletion des *yhdY*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM39 mit *HincII* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *SmaI* und *EcoRV* aus dem Plasmid pBKB80 ausgeschnittene Erythromycin-Kassette kloniert.

pSM45: Das Plasmid trägt eine Deletion des *yhdZ*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM37 mit *SphI* und *BamHI* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *SphI* und *BamHI* aus dem Plasmid pDG783 ausgeschnittene Kanamycin-Kassette kloniert.

pSM46: Das Plasmid trägt eine Deletion des *yhdY*- und des *yhdZ*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM39 mit *HincII* und *SphI* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *SmaI* und *SphI* aus dem Plasmid pBKB80 ausgeschnittene Erythromycin-Kassette kloniert.

pSM47: Das Plasmid trägt eine Deletion des *ykuT*-Gens. Hierfür wurde das Plasmid pSM40 mit *HincII* und *EcoRV* geschnitten. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit *SmaI* und *EcoRV* aus dem Plasmid pJMB1 ausgeschnittene Chloramphenicol-Kassette kloniert.

5.8.2 Konstruktion von *B. subtilis*-Stämmen

Um bestimmte Gene auf dem Chromosom von *B. subtilis* JH642 auszuschalten, wurden plasmidcodierte Deletionsmutanten konstruiert, in denen die Gene durch Antibiotika-Resistenzkassetten zerstört sind. Diese Plasmide wurden linearisiert und in *B. subtilis*

transformiert. Durch doppelte homologe Rekombination wurden die intakten Gene, auf dem Chromosom gegen den jeweiligen Resistenzmarker ausgetauscht.

SMB3: Durch Transformation von RMKB20 [$\Delta(\text{opuA}::\text{erm})4 \text{ opuC-20}::\text{Tn10}(\text{spc}) \Delta(\text{opuD}::\text{neo})2$] mit chromosomaler DNA von GNW16 [$\Delta(\text{gbsAB}::\text{neo})2$] wurde der Stamm SMB3 [$\Delta(\text{opuA}::\text{erm})4 \text{ opuC-20}::\text{Tn10}(\text{spc}) \Delta(\text{opuD}::\text{neo})2 \Delta(\text{gbsAB}::\text{neo})2$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Spectinomycin- auch eine Kanamycinresistenz aufwiesen.

SMB9: Zur Konstruktion des Stammes SMB9 ($\text{ycgP}::\text{pSM4}$)1 wurde das Plasmid pSM4 in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Kanamycin selektiert.

SMB10: Zur Konstruktion des Stammes SMB10 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] wurde das Plasmid pSM8 mit *XhoI-PstI* linearisiert und in den Stamm MBB1 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1$] transformiert. Die Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektiert und im Amylase-Test verifiziert. Zur weiteren Kontrolle wurde ein Southern-Blot mit einer *amyE*-spezifischen Sonde durchgeführt. Die Sonde besteht aus einem 972 bp PCR-Fragment des *amyE*-Gens, das mit den Primern *amyE1* und *amyE2* amplifiziert wurde.

SMB11: Zur Konstruktion des Stammes SMB11 [$\Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1$] wurde das Plasmid pSM9 mit *SmaI* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Spectinomycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 1.06 kb PCR-Fragment, das mit den Primern SM22 und SM19 amplifiziert wurde.

SMB12: Durch Transformation von SMB11 [$\Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1 \Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] mit chromosomaler DNA von BLOB9 [$\Delta(\text{opuE}::\text{tet})$] wurde der Stamm SMB12 [$\Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1 \Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Spectinomycin- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB13: Durch Transformation von SMB10 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] mit chromosomaler DNA von JSB8 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1$] wurde der Stamm SMB13 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Chloramphenicol- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB14: Zur Konstruktion des Stammes SMB14 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1$] wurde das Plasmid pSM9 mit *SmaI* verdaut und in den Stamm SMB10 transformiert. Die Transformanden wurden auf Spectinomycin und Chloramphenicol selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Hier wurde die zur Überprüfung von SMB11 genutzte Sonde verwendet.

SMB15: Zur Konstruktion des Stammes SMB15 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] wurde das Plasmid pSM8 mit *XhoI-PstI* verdaut und in den Stamm GNB37 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1$] transformiert. Die Transformanden wurden auf Erythromycin selektiert und im Amylase-Test verifiziert. Zur weiteren Kontrolle wurde ein Southern-Blot, mit der zur Überprüfung von SMB10 genutzten Sonde durchgeführt.

SMB18: Durch Transformation von JH642 mit chromosomaler DNA von QB5521 ($\text{rocA}::\text{cam}$) wurde der Stamm SMB18 [$(\text{rocA}::\text{cam})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die eine Chloramphenicolresistenz aufwiesen.

SMB27: Durch Transformation von SMB14 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1$] mit chromosomaler DNA von BLOB9 [$\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] wurde der Stamm SMB27 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1 \Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Chloramphenicol- auch eine Spectinomycin- und Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB28: Durch Transformation von SMB10 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] mit chromosomaler DNA von BLOB9 [$\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] wurde der Stamm SMB27 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Chloramphenicol- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB32: Zur Konstruktion des Stammes SMB32 [$\Delta(\text{ycgN}::\text{neo})2$] wurde das Plasmid pSM15 [$\Delta(\text{ycgN}::\text{neo})2$] mit *EcoRV* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Kanamycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 468 bp PCR-Fragment, das mit den Primern SM26 und SM27 amplifiziert wurde.

SMB34: Durch Transformation von SMB15 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] mit chromosomaler DNA von SMB32 [$\Delta(\text{ycgN}::\text{neo})2$] wurde der Stamm SMB34 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{ycgN}::\text{neo})2$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Erythromycin- auch eine Kanamycinresistenz aufwiesen.

SMB36: Zur Konstruktion des Stammes SMB36 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA})4$] wurde das Plasmid pSM20 mit *XhoI-PstI* linearisiert und in den Stamm MBB1 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1$] transformiert. Die Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektiert und im Amylase-Test verifiziert. Zur weiteren Kontrolle wurde ein Southern-Blot, mit der zur Überprüfung von SMB10 genutzten Sonde durchgeführt.

SMB37: Durch Transformation von SMB32 [$\Delta(\text{ycgN}::\text{neo})2$] mit chromosomaler DNA von QB5521 [$(\text{rocA}::\text{cam})1$] wurde der Stamm SMB37 [$\Delta(\text{ycgN}::\text{neo})2 (\text{rocA}::\text{cam})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Kanamycin- auch eine Chloramphenicolresistenz aufwiesen.

SMB40: Zur Konstruktion des Stammes SMB36 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA})3, \text{ycgL}$] wurde das Plasmid pSM21 mit *XhoI-PstI* linearisiert und in den Stamm MBB1 [$\Delta(\text{treA}::\text{neo})1$] transformiert. Die Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektiert und im Amylase-Test verifiziert. Zur weiteren Kontrolle wurde ein Southern-Blot, mit der zur Überprüfung von SMB10 genutzten Sonde durchgeführt.

SMB41: Durch Transformation von SMB11 [$\Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1$] mit chromosomaler DNA von QB5521 [$(\text{rocA}::\text{cam})1$] wurde der Stamm SMB41 [$\Delta(\text{ycgO}::\text{spc})1 (\text{rocA}::\text{cam})1$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Spectinomycin- auch eine Chloramphenicolresistenz aufwiesen.

SMB42: Zur Konstruktion des Stammes SMB42 [$\Delta(\text{ycgM}::\text{spc})3$] wurde das Plasmid pSM26 mit *HindIII* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Spectinomycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 1.01 kb PCR-Fragment, das mit den Primern SM20 und SM23 amplifiziert wurde.

SMB45: Zur Konstruktion des Stammes SMB45 [$\Delta(\text{ycgMNO}::\text{tet})2$] wurde das Plasmid pSM30 mit *HindIII* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Tetracyclin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Hier wurde die zur Überprüfung von SMB42 genutzte Sonde verwendet.

SMB46: Durch Transformation von SMB15 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] mit chromosomaler DNA von SMB45 [$\Delta(\text{ycgMNO}::\text{tet})2$] wurde der Stamm SMB46 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1 \Delta(\text{ycgMNO}::\text{tet})2$] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Erythromycin- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB49: Durch Transformation von SMB15 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1 \text{ amyE}::\Phi(\text{ycgM}'\text{-treA}, \text{ycgL})1$] mit chromosomaler DNA von SMB42 [$\Delta(\text{ycgM}::\text{spc})3$] wurde der Stamm SMB46 [$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1$]

amyE::Φ(ycgM'-treA,ycgL)1 Δ(ycgM::spc)3] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Erythromycin- auch eine Spectinomycinresistenz aufwiesen.

SMB51: Durch Transformation von SMB42 [*Δ(ycgM::spc)3*] mit chromosomaler DNA von QB5521 [*(rocA::cam)1*] wurde der Stamm SMB51 [*Δ(ycgM::spc)3 (rocA::cam)1*] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Spectinomycin- auch eine Chloramphenicolresistenz aufwiesen.

SMB52: Durch Transformation von SMB45 [*Δ(ycgMNO::tet)2*] mit chromosomaler DNA von QB5521 [*(rocA::cam)1*] wurde der Stamm SMB52 [*Δ(ycgMNO::tet)2 (rocA::cam)1*] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Tetracyclin- auch eine Chloramphenicolresistenz aufwiesen.

SMB53: Zur Konstruktion des Stammes SMB53 [*(ywpC::spc)1*] wurde das Plasmid pSM33 mit *HindIII* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Spectinomycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 847 bp PCR-Fragment, das mit den Primern SM35 und SM36 amplifiziert wurde.

SMB54: Zur Konstruktion des Stammes SMB54 [*amyE::Φ(ycgM'-lacZ,ycgL)1*] wurde das Plasmid pSM36 mit *XhoI* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Hier wurde die zur Überprüfung von SMB10 genutzte Sonde verwendet.

SMB56: Durch Transformation von SMB54 [*amyE::Φ(ycgM'-lacZ,ycgL)1*] mit chromosomaler DNA von SMB45 [*Δ(ycgMNO::tet)2*] wurde der Stamm SMB56 [*amyE::Φ(ycgM'-lacZ,ycgL)1 Δ(ycgMNO::tet)2*] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Chloramphenicol- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB58: Zur Konstruktion des Stammes SMB58 [*Δ(yhdY::erm)1*] wurde das Plasmid pSM44 mit *HindIII* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Erythromycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 725 bp PCR-Fragment, das mit den Primern SM43 und SM44 amplifiziert wurde.

SMB59: Zur Konstruktion des Stammes SMB59 [*Δ(yhdZ::erm)1*] wurde das Plasmid pSM45 mit *EcoRI* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Kanamycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Hier wurde die zur Überprüfung von SMB58 genutzte Sonde verwendet.

SMB60: Zur Konstruktion des Stammes SMB60 [*Δ(yhdYZ::erm)1*] wurde das Plasmid pSM46 mit *PvuII* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Erythromycin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Hier wurde die zur Überprüfung von SMB58 genutzte Sonde verwendet.

SMB61: Zur Konstruktion des Stammes SMB61 [*Δ(yfkBC::tet)1*] wurde das Plasmid pSM42 mit *XbaI* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Tetracyclin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 692 bp PCR-Fragment, das mit den Primern SM41 und SM47 amplifiziert wurde.

SMB62: Zur Konstruktion des Stammes SMB62 [*Δ(yfkC::tet)1*] wurde das Plasmid pSM41 mit *XbaI* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Tetracyclin selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Hier wurde die zur Überprüfung von SMB61 benutzte Sonde verwendet.

SMB63: Zur Konstruktion des Stammes SMB63 [*Δ(ykuT::cam)1*] wurde das Plasmid pSM47 mit *BamHI* verdaut und in den Stamm JH642 transformiert. Die Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektiert und mittels Southern-Blot verifiziert. Die Sonde besteht aus einem 640 bp PCR-Fragment, das mit den Primern SM40 und SM45 amplifiziert wurde.

SMB64: Durch Transformation von SMB53 [(*ywpC::spc*)1] mit chromosomaler DNA von SMB58 [Δ (*yhdY::erm*)1] wurde der Stamm SMB64 [(*ywpC::spc*)1 Δ (*yhdY::erm*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Spectinomycin- auch eine Erythromycinresistenz aufwiesen.

SMB65: Durch Transformation von SMB53 [(*ywpC::spc*)1] mit chromosomaler DNA von SMB62 [Δ (*yfkC:tet*)1] wurde der Stamm SMB65 [(*ywpC::spc*)1 Δ (*yfkC:tet*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Spectinomycin- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB66: Durch Transformation von SMB63 [Δ (*ykuT:cam*)1] mit chromosomaler DNA von SMB53 [(*ywpC::spc*)1] wurde der Stamm SMB66 [Δ (*ykuT:cam*)1 (*ywpC::spc*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Chloramphenicol- auch eine Spectinomycinresistenz aufwiesen.

SMB67: Durch Transformation von SMB58 [Δ (*yhdY::erm*)1] mit chromosomaler DNA von SMB62 [Δ (*yfkC:tet*)1] wurde der Stamm SMB67 [Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*yfkC:tet*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Erythromycin- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB68: Durch Transformation von SMB58 [Δ (*yhdY::erm*)1] mit chromosomaler DNA von SMB63 [Δ (*ykuT:cam*)1] wurde der Stamm SMB68 [Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*ykuT:cam*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Erythromycin- auch eine Chloramphenicolresistenz aufwiesen.

SMB69: Durch Transformation von SMB63 [Δ (*ykuT:cam*)1] mit chromosomaler DNA von SMB62 [Δ (*yfkC:tet*)1] wurde der Stamm SMB69 [Δ (*ykuT:cam*)1 Δ (*yfkC:tet*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die neben einer Chloramphenicol- auch eine Tetracyclinresistenz aufwiesen.

SMB76: Durch Transformation von SMB67 [Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*yfkC:tet*)1] mit chromosomaler DNA von SMB63 [Δ (*ykuT:cam*)1] wurde der Stamm SMB76 [Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*yfkC:tet*)1 Δ (*ykuT:cam*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die Resistenzen gegen Erythromycin, Tetracyclin und Chloramphenicol aufwiesen.

SMB77: Durch Transformation von SMB66 [Δ (*ykuT:cam*)1 (*ywpC::spc*)1] mit chromosomaler DNA von SMB62 [Δ (*yfkC:tet*)1] wurde der Stamm SMB77 [Δ (*ykuT:cam*)1 (*ywpC::spc*)1 Δ (*yfkC:tet*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die Resistenzen gegen Chloramphenicol, Spectinomycin und Tetracyclin aufwiesen.

SMB78: Durch Transformation von SMB64 [(*ywpC::spc*)1 Δ (*yhdY::erm*)1] mit chromosomaler DNA von SMB63 [Δ (*ykuT:cam*)1] wurde der Stamm SMB78 [(*ywpC::spc*)1 Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*ykuT:cam*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die Resistenzen gegen Spectinomycin, Erythromycin und Chloramphenicol aufwiesen.

SMB79: Durch Transformation von SMB65 [(*ywpC::spc*)1 Δ (*yfkC:tet*)1] mit chromosomaler DNA von SMB58 [Δ (*yhdY::erm*)1] wurde der Stamm SMB79 [(*ywpC::spc*)1 Δ (*yfkC:tet*)1 Δ (*yhdY::erm*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die Resistenzen gegen Spectinomycin, Tetracyclin und Erythromycin aufwiesen.

SMB80: Durch Transformation von SMB76 [Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*yfkC:tet*)1 Δ (*ykuT:cam*)1] mit chromosomaler DNA von SMB53 [(*ywpC::spc*)1] wurde der Stamm SMB80 [Δ (*yhdY::erm*)1 Δ (*yfkC:tet*)1 Δ (*ykuT:cam*)1 (*ywpC::spc*)1] konstruiert. Es wurden Transformanden selektiert, die Resistenzen gegen Erythromycin, Tetracyclin, Chloramphenicol und Spectinomycin aufwiesen.

5.9 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot)

Durch Southern-Blot-Analyse wurden die in dieser Arbeit hergestellten Mutationen im Genom von *B. subtilis* verifiziert. Die Herstellung der DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim) nach Vorgaben des Herstellers. Die Konstruktion der Sonden ist unter der Beschreibung des jeweiligen *B. subtilis*-Stammes beschrieben.

Zur Southern-Blot-Analyse wurden 5 bis 10 µg chromosomale DNA mit Restriktionsendonucleasen geschnitten und die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde mit Hilfe eines Vakuumblyot-Systems (VacuGene™XL, Pharmacia LKB, Freiburg) bei 80 mbar Unterdruck auf eine Nylonmembran (Nytran 13N, Schleicher & Schnell) transferiert und UV-quervernetzt (UV-Stratalinker® 2400, Stratagene, Heidelberg). Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wurde ca. 3 h bei 68°C im Hybridisierungssofen (Mini 10, MWG-Biotech) mit Hybridisierungslösung [5 x SSC; 0.5 % „Blocking Reagenz“ (Boehringer Mannheim); 0.1 % N-Laurylsarcosin; 0.2 % SDS] prähybridisiert und über Nacht bei 68°C mit der DIG-markierten Sonde in Hybridisierungslösung hybridisiert. Danach wurde die Membran 3 x 10 min bei RT in Waschlösung 1 (2 x SSC; 0.1 % SDS) und 2 x 30 min bei 68 °C in Waschlösung 2 (0.1 x SSC; 0.1 % SDS) gewaschen. Die Membran wurde dann bei RT in Puffer 1 (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7.5) äquilibriert, 1 h in Puffer 2 (Puffer 1 + 1 % „Blocking Reagenz“) abgesättigt und die DIG-markierte DNA immunologisch durch 30 min Inkubation in Puffer 2 + 1/10.000 Vol. Anti-DIG-Antikörper-Konjugat nachgewiesen. Der enzymatische Nachweis der Markierung erfolgte, nachdem die Membran 2 x 30 min in Puffer 1 + 0.3 % Tween 20 gewaschen und in Puffer 3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) äquilibriert wurde. Die chemilumineszente Detektion (Lumigen™ PPD) erfolgte mit Autoradiographiefilmen (Fuji RX). Als Größenstandard diente der DIG-DNA Molecular Weight Marker VII (Boehringer Mannheim).

5.10 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot)

Zur Detektion von *putB*, *putC* und *putP*-Transkripten wurden RNA-Sonden mit dem Boehringer DIG RNA-Labeling Kit SP6/T7 hergestellt. Die Herstellung der Sonden erfolgte über *in vitro* Transkription mit der T3-Polymerase nach Vorgaben des Herstellers. Als Template der T3-Polymerase diente für die *putB*-Sonde das Plasmid pSM11, für die *putC*-Sonde pSM34 und für die *putC*-Sonde pSM35. Die Präparation der mRNA erfolgte aus Kulturen von JH642, die in Minimalmedium (SMM und SMM mit 0.6 M NaCl) mit und ohne Zugabe von Prolin gezogen wurden. Die Zugabe von 1 mM Prolin (Endkonzentration) erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.3, nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen geerntet.

Für die Northern-Blot Analyse wurden 8 µg RNA (9 µl) mit 21 µl Probenpuffer [15 µl Formamid, 3 µl 37%iges Formaldehyd, 3 µl 10 x MOPS (200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat, 10 mM EDTA, pH 7.0), Bromphenolblau] 15 min bei 65°C denaturiert und sofort auf ein Agarosegel [1 % Agarose, 1 % Formaldehyd, 1 µl Ethidiumbromid in 1 x MOPS-Puffer] aufgetragen. Die Gelektrophorese erfolgte mit 1 x MOPS-Puffer für 10 min bei 30 V und anschließend 2.5 h bei 70 V. Der Transfer auf die Membran (Nytran® 13N, Schleicher & Schnell) erfolgte für mindestens 4 h mit 10 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat, pH 7). Durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Stratalinker® 2400, Stratagene, Heidelberg) wurde die RNA auf der Membran fixiert. Zur Prähybridisierung wurde die Membran 2 h in der Prähybridisierungslösung (7 % SDS, 50 % Formamid, 5 x SSC, 2 % „Blocking-Reagenz“, 0.1 % N-Laurylsarcosin) bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert und anschließend über Nacht in der DIG-markierten Sonde in Hybridisierungslösung hybridisiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min bei RT in 2 x SSC, 0.1 % SDS und 2 x 15 min bei 68°C in 0.2 x SSC, 0.1 % SDS gewaschen. Nach dem Äquilibrieren in Puffer 1 (11.6 g Maleinsäure, 8.8 g NaCl, pH 7.5), wurde die Membran 1 h in Puffer 2 (Puffer 1 + 1 % „Blocking-Reagenz“) abgesättigt und die

DIG-markierte RNA immunologisch durch 30 min Inkubation in Puffer 2 + 1/10.000 Vol. Anti-DIG-Antikörper-Konjugat nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min mit Puffer 1 gewaschen und schließlich in 0.1 M Tris-Puffer pH 9.5 äquilibriert. Für die Detektion wurde die Membran durch einen Tropfen Attophos (ECF-Vistra) gezogen und auf dem Phosphorimager gescannt.

5.11 Bestimmung des 5'-Endes der mRNA durch "Primer Extension"

Der Startpunkt der *putBCP*-mRNA wurde über die reverse Transkription des 5'-Endes der *putBCP*-mRNA in cDNA und die anschließende Bestimmung der Länge dieser cDNA ermittelt. Die mRNA wurde aus Kulturen von JH642 (pSM13) (pSM13 trägt die Promotorregion des *putBCP*-Operons) isoliert, die in Minimalmedium (SMM) beziehungsweise in Minimalmedium mit 1 mM L-Prolin gezogen wurden. Die Synthese der cDNA erfolgte in einem 20 µl Reaktionansatz mit 10 µg RNA, 2 pmol Primer (SM28 synthetisches Oligonucleotid komplementär zum 5'-Ende des *putP*-Gens) in AMV-RT-Puffer (50 mM Tris, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCL, 1 mM DTT, pH 8.5; Boehringer Mannheim) (AMV, avian myeloblastosis virus). Die Hybridisierung erfolgte für 2 min bei 70°C mit anschließender Abkühlung auf 42°C. Für die Synthese der cDNA wurde dem Reaktionsansatz 1 µl dNTP Mix (je 8 mM in AMV-RT-Puffer) und 10 units AMV Reverse Transkriptase zugegeben und 1 h bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurden 175 µl TES (50 mM Tris, pH 8.0; 10 mM EDTA, 150 mM NaCl) zur Erhöhung der Salzkonzentration zur Reaktionslösung zugegeben und diese durch Extraktion mit 200 µl CPI (Chlorform:Phenol:Isoamylalkohol, 49:50:1) gestoppt. Das mit Ethanol gefällte Pellet wurde in 6 µl Stopplösung (63 % (v/v) Formamid, 13 mM EDTA, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau 0.03 % (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und vor der elektrophoretischen Auftrennung auf einen Sequenziergel für 2 min bei 94°C denaturiert.

5.12 Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese wurde zur Identifizierung des für den Efflux von Prolin verantwortlichen Genortes durchgeführt. Für die Transposonmutagenese wurde das *E. coli*-*B. subtilis* Shuttle Plasmid pIC333 (Steinmetz & Richter, 1994) verwendet. Dieses Plasmid trägt ein Mini-Tn10 Transposon, auf dem sich das Gen für eine Spectinomycinresistenz befindet. Für die Replikation in *E. coli* besitzt dieses Plasmid einen pUC-Origin und für die Replikation in *B. subtilis* einen temperatursensitiven Origin. Durch diese Temperatursensitivität ist das Plasmid in *B. subtilis* bei 28°C stabil ist, während es bei 37°C nicht mehr repliziert werden kann. Das Gen für die Transposase befindet sich außerhalb des Transposons, so dass chromosomale Transposoninsertionen stabil sind.

Für die Transformation in kompetente *B. subtilis* Zellen des Stammes BLOB9 wurde jeweils 1 – 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt und die Transformanden auf LB-Agarplatten mit Erythromycin bei 28°C selektiert. Die Transformanden wurden in 5 ml LB-Medium mit Spectinomycin inokuliert und bei 28°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen 1 : 100 in 5 ml LB-Medium mit Spectinomycin inokuliert und 3 h bei 28°C inkubiert und schließlich weitere 4 h bei der nicht permissiven Temperatur von 37°C. Von diesen Kulturen wurden 100 µl von Verdünnungen (10⁻⁵ und 10⁻⁶) auf LB-Spc-Platten und zur Bestimmung der Lebendzellzahl 100 µl einer 10⁻⁷-Verdünnung auf LB-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. LB-Spc-Platten auf denen eine geeignete Anzahl von Kolonien gewachsen waren, wurden auf verschiedene Medien replikaplattiert. Auf LB-Platten mit Spectinomycin und Erythromycin konnte der Anteil der Transformanden bestimmt werden, bei denen das gesamte Plasmid inseriert ist. Auf SMM-Platten konnte das Maß für die erfolgreiche Transposonmutagenese anhand des Anteils auxotropher Mutanten bestimmt werden. Von drei verschiedenen Ansätzen, in denen eine erfolgreiche Transposonmutagenese stattgefunden hat, wurden die Zellen von den LB-Spc-Platten mit je 3 ml LB-Medium ab gespült, vereinigt, mit 15% (v/v) Glycerin versetzt

und bei -20°C eingefroren. Diese Zellen dienten als Transposonbank, von der aus entsprechende Mutanten im Prolin-Effluxsystem durch Kreuzfütterungs-Experimente selektiert werden sollten.

6. Biochemische Methoden

6.1 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit Hilfe des Protein-Assay-Kit-II (BioRad, München) bestimmt. Die Bestimmung beruht auf der Methode von Bradford (1976). Geeignete Verdünnungen der Probe wurden 5 min bei RT mit dem Farbstoff inkubiert und die Absorption bei einer Extinktion von 595 nm bestimmt, als Referenz diente BSA .

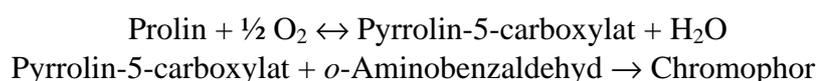
6.2 Quantifizierung von Prolin mit der Sauren Ninhydrin-Methode

Die Quantifizierung des Prolins beruht auf einem kolorimetrischen Test, der von Bates *et al.* (1973) beschrieben, und hier in abgewandelter Form durchgeführt wurde. Das Prinzip der Quantifizierung besteht darin, dass Aminogruppen mit Hilfe von Ninhydrin im sauren Milieu zu einem farbigen Derivat umgesetzt werden, dessen Extinktion bei 520 nm bestimmt werden kann. Die bei dieser Wellenlänge am stärksten interferierende Aminosäure ist Glutamat, der Farbertrag ist jedoch kleiner als 1.5 % bei einer zu Prolin äquivalenten Konzentration (Whatmore *et al.*, 1990), der Farbertrag der interferierenden Substanzen ist demnach zu vernachlässigen.

Die zu testenden *B. subtilis*-Kulturen wurden aus einer Vorkultur auf eine OD₅₇₈ von 0.05 angeimpft (20 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben) und für 16 h bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Neben der Bestimmung der optischen Dichte (OD₅₇₈) wurden 8 ml Zellsuspension durch Zentrifugation geerntet. Das Zellsediment wurde in 1 ml SSA-Lösung (3 % 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat (w/v) in H₂O) aufgenommen und in ca. 4 h bei RT durch wiederholtes starkes Schütteln aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert und die Zelltrümer abzentrifugiert (13.000 rpm). Ein Aliquot des Überstandes wurde in ein fest verschließbares Reaktionsröhrchen überführt und mit 1 ml Ninhydrin-Lösung (1.25 g Ninhydrin, 80 ml Eisessig, 20 ml 6 M H₃PO₄) versetzt. Der Ansatz wurde eine Stunde im Wasserbad gekocht und die Reaktion anschließend im Eisbad gestoppt. Nach Zugabe von 2 ml Toluol, mischen und anschließender Zentrifugation wurde das farbige Endprodukt in die Toluolphase extrahiert. Die Extinktion der Toluolphase wurde gegen Toluol als Blindwert bei 520 nm bestimmt. Eine Eichgerade wurde mit L-Prolin in SSA-Lösung erstellt.

6.3 Bestimmung der Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase (PutB)

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase (PutB) beruht auf einem kolorimetrischen Test, der von Dendinger & Brill (1970) beschrieben und hier in abgewandelter Form durchgeführt wurde. Bei der enzymatisch katalysierten Oxidation von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat wird FAD zu FADH₂ reduziert. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase wurde die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat in einem gekoppelten Enzymtest über die Zunahme der Extinktion bei 443 nm gemessen:



Dazu wurden die entsprechenden *B. subtilis*-Stämme in 500 ml SMM und SMM mit 0.6 M NaCl bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0.2 wurde zur Induktion der Prolin Dehydrogenase einigen Kulturen L-Prolin in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und weitere 80 min inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, die induzierten Zellen einmal mit einer MOPS-Lösung gleicher Osmolarität gewaschen, erneut

zentrifugiert und das Pellet in 4 ml MOPS-Lösung (ohne NaCl) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe der French-Press aufgeschlossen, abzentrifugiert und der Überstand im Enzymtest eingesetzt. Für den Enzymtest wurde pro Reaktionsansatz 500 µl 1 M L-Prolin, 100 µl Zellextrakt, 220 µl 50 mM NAD⁺ und 180 µl H₂O vorgelegt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 50 mM *o*-Aminobenzaldehyd (in 20 % Ethanol) bei 37°C und unter starkem Schütteln bis zu 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0.2 ml TCA (20 %) gestoppt, abzentrifugiert und der Überstand bei 443 nm gemessen. Die Absorption wurde gegen einen Blindwert (Reaktionsmix mit H₂O anstelle des Substrats Prolin) korrigiert. Der Extinktionskoeffizient des P5C/*o*-Aminobenzaldehyd-Komplexes beträgt 2.71 (Strecker, 1965).

6.4 Bestimmung der TreA-Aktivität

Mit Hilfe der *treA*-Fusionsstämme konnte die Regulation des *putBCP*-Operons näher charakterisiert werden. Das hier verwendete *treA*-Reportergen kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glucosidase (TreA) von *B. subtilis* (Gotsche & Dahl, 1996; Schöck *et al.*, 1996). Die Expression des Reportergens *treA* unter der Kontrolle der Promotorregion des *putBCP*-Operons wurde nach Zugabe von Aminosäuren bei unterschiedlichen Osmolaritäten und nach einem hypo- und hyperosmotischen Schock untersucht.

Um die Induktion durch Aminosäuren zu untersuchen wurde 80 ml SMM mit einer Vorkultur des jeweiligen *B. subtilis*-Stammes auf eine OD₅₇₈ von 0.05 angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0.3 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die erste Probe von 1.6 ml entnommen und gleichzeitig den Kulturen die entsprechende Aminosäure zugesetzt. Anschließend wurde alle 15 min eine weitere Probe gezogen und die OD₅₇₈ bestimmt. Zur Durchführung eines hypo- oder hyperosmotischen Schocks wurden bei einer OD₅₇₈ von etwa 0.4 die Osmolarität der Kulturen durch die Zugabe von vorgewärmten SMM mit der entsprechenden NaCl-Konzentration verändert.

Für den Enzymtest wurden die Proben 2 min bei 14.000 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 – 400 µl Z-Puffer (100 mM NaH₂PO₄, 1 mM KCl, 1 mM MgSO₄ x 7 H₂O, pH 6.0) mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 20 min bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümer durch Zentrifugation entfernt und 200 µl des Überstandes im TreA-Assay eingesetzt. Nach Zugabe von 600 µl Z-Puffer wurde die Reaktion mit 200 µl α -PNPG-Lösung (4 mg/ml para-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5) bei 28°C gestartet. Die Reaktion wurde nach Auftreten einer Gelbfärbung, jedoch spätestens nach 2 Stunden, durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Extinktion bei 420 nm gegen einen Blindwert ohne Zellextrakt gemessen. Die TreA-Aktivität ist in Miller-Units pro mg Protein angegeben (Gotsche & Dahl, 1996; Helfert *et al.*, 1995) und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{MU/mg Protein} = \frac{1500}{V \times T \times P} \times \text{OD}_{420}$$

dabei entspricht V dem eingesetzten Volumen der Kultur in ml, T entspricht der Reaktionszeit in min und P der Proteinkonzentration des Zellextraktes in mg/ml. Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine OD₅₇₈ von 1 einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml entspricht.

6.5 Nachweis der Amylase-Aktivität

Zur Kontrolle von *B. subtilis* Klonen auf ihren *amyE*-Genotyp wurde ein Amylase-Aktivitätstest durchgeführt. Dazu wurden die Klone auf LB-Platten mit 1 % Stärke ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden anschließend von den Platten gespült, und diese für einige Minuten mit Grams Jodlösung überschichtet (0.5 % (w/v) Jod, 1 % (w/v) Kaliumiodid in H₂O).

Stärke in den Agarplatten färbt dich dunkelblau an. Helle Höfe in dem sonst schwarz gefärbten Agar zeigen an, dass die dort gewachsenen Kolonien die Stärke mittels der Amylase abgebaut haben. *B. subtilis*-Kolonien mit unterbrochenem *amyE*-Gen zeigen dagegen keinen hellen Hof, hier färbt sich der Hof so dunkel wie der Rest der Platte.

6.6 Bestimmung des intrazellulären Volumens von Bakterienzellen

Die Bestimmung des intrazellulären Volumens von Bakterienzellen wurde nach einer Anleitung von Prof. Dr. E. Bakker (Universität Osnabrück) durchgeführt. Mit einer Vorkultur der zu testenden *B. subtilis*-Stämme wurde Minimalmedium (20 ml SMM in 100 ml Erlenmeyerkolben) unterschiedlicher Osmolarität auf eine OD₅₇₈ von 0.5 angeimpft und 16 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Je 4 ml jeder Kultur wurde mit 8 µl ³H₂O (500µCi/ml) versetzt und 3 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Inulin [¹⁴C]Carboxylsäure (100µCi/ml) wurden nach 50 sec, 100 sec und nach 200 sec eine Probe von 1 ml entnommen und zur Trennung der Bakterienzellen von dem Medium schnell (5000 rpm, 20 sec.) durch Silikonöl (200 µl) zentrifugiert. Mit der Zentrifugation bildet sich durch die unterschiedlichen Dichten der Bakterienzellen, des Öls und des Mediums ein mehrphasiges System, wobei sich in der oberen Phase das Medium, in der Mitte das Öl und am Boden des Zentrifugengefäßes die Bakterienzellen befinden. Von der wäßrigen Phase wurde ein Aliquot von 50 µl entnommen und zum Bestimmen der Radioaktivität mit 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit (ECOLUME, ICN) versetzt. Der Boden des Zentrifugengefäßes wurde mit dem Zellpellet durch eine Rasierklinge abgetrennt und in ein Szintillationsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0.75 ml einer 0.4 N NaOH-Lösung wurde mehrmals stark geschüttelt, bis sich das Zellpellet gelöst hatte. Anschließend wurde 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und abermals geschüttelt. Das intrazelluläre Volumen läßt sich nun aus dem Verhältnis der Radioisotope im Kulturüberstand zu dem Zellsediment wie folgt ermitteln:

$$\frac{{}^3\text{H}_2\text{O} - \text{DPM im Sediment}}{{}^3\text{H}_2\text{O} - \text{DPM im Überstand}} \times 50 = \text{Wasserraum im Sediment in } \mu\text{l}$$

$$\frac{{}^{14}\text{C} - \text{DPM im Sediment}}{{}^{14}\text{C} - \text{DPM im Überstand}} \times 50 = \text{Außenraum im Sediment in } \mu\text{l}$$

Cytoplasmatisches Volumen im Sediment = Wasserraum - Außenraum

Die Inulin-[¹⁴C]Carboxylsäure kann von *B. subtilis* nicht aufgenommen werden. Um Verunreinigungen zu beseitigen, die in das Cytoplasma der Bakterien gelangen könnten wurde die Lösung vor Gebrauch gereinigt. Dazu wurde von einer *B. subtilis* Kultur (JH642) 1 ml Kultur abgenommen, zentrifugiert und in 200 µl Minimalmedium (SMM) mit 0.6 M NaCl resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Inulin [¹⁴C]Carboxylsäure wurde die Kultur 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde 150 µl Überstand abgenommen und im Versuch eingesetzt. Als Silikonöl wurde bei Kulturen unter 1 M NaCl im Medium das Silikonöl-DC550 (Dichte 1.07 g/ml) (SERVA) und bei 1 M NaCl im Medium eine Mischung von zwei Ölen benutzt: 2 Teile Silikonöl-DC550 (Dichte 1.07 g/ml) und 1 Teil Silikonöl-DC710 (Dichte 1.11 g/ml). Bei der Zentrifuge handelte es sich um eine Beckmann Mikrofuge E.

6.7 Bestimmung der cytoplasmatischen Kaliumkonzentration

Die Bestimmung der cytoplasmatischen Kaliumkonzentration wurde parallel zur Volumenbestimmung durchgeführt. Von den Kulturen wurde eine Probe von 1 ml entnommen und durch Silikonöl abzentrifugiert. Der Boden des Zentrifugengefäßes wurde mit dem Zellsediment abgetrennt und in 1 ml TCA (5 %) aufgenommen und konnte so bei -20°C

aufbewahrt werden. Zur Extraktion des Kaliums wurden die Sedimente für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend gemischt. Nach Zugabe von 3 ml CsCl₂-Lösung (6.77 mM) und erneutem durchmischen wurde 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, gegebenenfalls verdünnt (1.25 % TCA, 5 mM CsCl₂) und schließlich die Kaliumkonzentration im Flammenphotometer (Eppendorf ELEX6361) bestimmt.

6.8 Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv markierten Aminosäuren

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnte radioaktiv markiertes Glycin-Betain und dessen biosynthetischer Vorläufer Cholin voneinander getrennt nachgewiesen werden. Je 10 µl der Zellüberstände und 5 µl der Zellextrakte wurden auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platte (Polygram SILG; Machery-Nagel, Düren) aufgetragen und die löslichen Bestandteile durch das Laufmittel (75 ml Methanol, 1.5 ml Ammoniak (30 %), 23.5 ml H₂O) getrennt. Die radioaktiv markierten Substanzen wurden durch einen Phosphorimager (Storm 880, Molecular Dynamics) detektiert.

6.9 Bestimmung der kinetischen Parameter von OpuE und PutP

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter V_{\max} und K_m der einzelnen Transportsysteme wurde die initiale Transportrate für L-Prolin bei verschiedenen Substratkonzentrationen (1 - 70 µM) bestimmt. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 0.3 bis 0.6 in Minimalmedium mit NaCl (SMM bzw. SMM mit 0.4, 0.6 und 0.8 M NaCl) bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Zur Induktion der PutP-Permease wurde den jeweiligen Kulturen in das Wachstumsmedium 1 mM L-Prolin zugegeben. Da es sich bei dem radioaktiven Substrat zur Bestimmung der kinetischen Parameter ebenfalls um L-Prolin handelt, mußten diese Kulturen erst mit vorgewärmten Medium gleicher Osmolarität zweimal gewaschen werden.

Für den Transportversuch wurde ein Aliquot von 2 ml entnommen und die Reaktion durch Zugabe von L-[¹⁴C(U)]-Prolin (40 mCi/mmol) gestartet. Nach 40 sec, 80 sec und 120 sec wurde eine Probe von 300 µl entnommen und schnell durch einen Zellulosefilter (0.45 µm, Schleicher & Schnell, Dassel) filtriert, und der Filter unmittelbar danach zweimal mit demselben Medium gespült. Die Filter wurden in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Als Referenz für die eingesetzte Menge an Radioaktivität dienten 300 µl unfiltrierte Probe. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (Packard, Liquid Scintillation Analyser 1900CA) quantifiziert. Die ermittelte dpm-Werte wurden mit folgender Formel in nmol aufgenommenes Substrat/mg Zellprotein umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen:

$$\text{nmol Substrat/mg Protein} = \frac{\text{dpm in 0.3 ml} \times \text{nmol Substrat in 0.3 ml}}{\text{OD}_{578} \times 0.03 \text{ mg Protein} \times \text{dpm der Referenz in 0.3 ml}}$$

Für jede Substratkonzentration wurde nun die Transportrate v [nmol Prolin mg Protein⁻¹ min⁻¹] errechnet und zur Bestimmung der V_{\max} und K_m -Werte nach Hanes-Woolf aufgetragen. Bei dieser Auftragungsmethode wird der Quotient aus Substratkonzentration und Transportrate gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Der reziproke Wert der Steigung einer Ausgleichsgeraden gibt die maximale Transportrate V_{\max} an, der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Abszisse gibt den K_m -Wert an.

6.10 Austausch und Efflux von osmoprotektiven Substanzen

Der Efflux von osmoprotektiven Substanzen aus *B. subtilis*-Zellen wurde untersucht, indem den Kulturen zunächst die zu testende radioaktiv markierte osmoprotektive Substanz zugegeben wurde und anschließend die weitere Aufnahme durch die Zugabe hoher Konzentrationen nicht markierter Substanz kompetitiv gehemmt wurde. Durch die Höhe der verbliebenen

Radioaktivität im Zellpellet konnte der Efflux von osmoprotektiven Substanz untersucht werden. Dazu wurden *B. subtilis* Vorkulturen auf die OD_{578} von 0.25 in SMM mit 0.4 M NaCl (20 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben) überimpft und bis zu einer OD_{578} von 1 bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Für den Versuch wurden 2 ml dieser Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, das radioaktiv markierte Substrat in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Kulturen bei 37°C geschüttelt. Nach 10, 20, 30 und 40 min wurde eine Probe von 100 µl entnommen und schnell über einen Zellulosefilter (0.45 µm) filtriert und mit Medium gespült. Danach wurde 177 µl frisches, auf 37°C temperiertes SMM mit 0.4 M NaCl und je nach Versuch 100 mM L-Prolin, Cholin, Glycin-Betain oder Glycin zugegeben. Anschließend wurden in kurzen Zeitabständen weitere Proben entnommen, abfiltriert und gespült. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (Packard, Liquid Scintillation Analyser 1900CA) quantifiziert. Um das Wachstum der Kulturen zu verfolgen wurden parallel Kulturen unter den gleichen Bedingungen inkubiert, anstelle des radioaktiven Substrates wurde hier nichtradioaktives Substrat zugegeben.

6.11 Radioaktive Quantifizierung von Glycin-Betain

Die Konzentration von Glycin-Betain wurde über die Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin-Betain bestimmt. Dazu wurde eine Vorkultur von *B. subtilis* JH642 in SMM bzw. SMM mit 0.4, 0.6, 0.8 und 1.0 M NaCl mit 1 mM Glycin-Betain (Endkonzentration) inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden morgens in Medien gleicher Osmolarität überimpft, das radioaktiv markierte Glycin-Betain in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Kulturen bei 37°C geschüttelt, bis sie eine OD_{578} von ca. 1.5 erreicht hatten. Anschließend wurden Proben von je 1 ml entnommen und zur Trennung der Bakterienzellen von dem Medium schnell (5000 rpm, 20 sec) durch Silikonöl (200 µl) zentrifugiert. Die weitere Behandlung der Proben, bzw. die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte konform zur Bestimmung des intrazellulären Bakterienvolumens (Abschnitt 6.6). Bei der Berechnung der Glycin-Betain Konzentration wurde von einem cytoplasmatischen Raum bei OD_{578} von 1 von 0.65 µl/ml Kultur ausgegangen.

6.12 Efflux von Glycin-Betain

Der Efflux von Glycin-Betain aus dem Cytoplasma wurde an dem *B. subtilis*-Stamm RMKB20 (*opuA*, *opuB*⁺, *opuC*, *opuD*) untersucht, der durch Mutationen in den Transportsystemen nur noch Cholin, jedoch kein Glycin-Betain mehr transportieren kann. Da Cholin in *B. subtilis* zu Glycin-Betain umgesetzt wird, kann in diesen Kulturen durch die Zugabe von ¹⁴C-Cholin der Efflux von ¹⁴C-Glycin-Betain durch dessen Akkumulation im Kulturüberstand detektiert werden. Dafür wurde der *B. subtilis* Stamm RMKB20 und der Kontrollstamm JH642 in 8 ml SMM mit 0.4 M NaCl und 10 µM ¹⁴C-Cholin inkubiert. Unmittelbar vor und alle 30 min nach der Zugabe von Cholin wurden 500 µl Probe entnommen, 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 50 µl TE-Puffer mit 150 µg Lysozym für 10 min bei 37°C aufgeschlossen. Nach Zugabe von 2 µl 10 % SDS wurden die Zelltrümmer 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Für die Messung der radioaktiven Kulturüberstände wurde 200 µl Probe mit 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler (Packard, Liquid Scintillation Analyser 1900CA) gemessen. Die Auftrennung der Proben über Dünnschichtchromatographie ist in Abschnitt 6.8 beschrieben.

IV. ERGEBNIS

1. Akkumulation, Efflux und Recycling von osmoprotektiven Substanzen

Die Entwicklung von spezifischen Mechanismen, die es Mikroorganismen ermöglicht sich an wechselnde osmotische Bedingungen anzupassen, ist essentiell für das Überleben der Zellen. Ein Wechsel der externen Osmolarität führt zu veränderten Wasserströmen über der cytoplasmatischen Membran. Um nun eine Lyse der Zelle unter niedrigen Osmolaritäten, oder eine Dehydrierung unter hohen Osmolaritäten zu vermeiden, muß die Zelle Mechanismen besitzen, die eine schnelle und effektive Anpassung an schwankende Osmolaritäten ermöglichen.

1.1 Akkumulation von osmoprotektiven Substanzen unter hochosmotischen Bedingungen

1.1.1 Das cytoplasmatischen Volumen in *B. subtilis* ist unabhängig von der Osmolarität

Whatmore *et al.* (1990) konnte zeigen, dass in exponentiell wachsenden *B. subtilis* Zellen das cytoplasmatische Volumen mit zunehmender Osmolarität abnimmt. Um genaue Angaben über die Konzentration von intrazellulär akkumulierten osmoprotektiven Substanzen in stationären Zellen zu erhalten, war es notwendig das cytoplasmatische Volumen in stationären *B. subtilis* Zellen unter verschiedenen Osmolaritäten zu bestimmen.

Tab.6: Intrazelluläre Kaliumkonzentration und cytoplasmatisches Volumen

Stamm	Relevanter Genotyp	Medium	Intrazelluläre Kaliumkonz. (mM)	Zellvolumen ($\mu\text{l/ml}$ Kultur $\text{OD}_{578}=1$)
JH642	Wildtyp	SMM	705 ± 2	0.621
		SMM + 0.4 M NaCl	744 ± 9	0.686
		SMM + 0.6 M NaCl	871 ± 40	0.682
		SMM + 0.8 M NaCl	904 ± 50	0.599
BLOB9	$\Delta(\text{opuE}::\text{tet})$	SMM	696 ± 82	0.697
		SMM + 0.4 M NaCl	761 ± 43	0.624
		SMM + 0.6 M NaCl	833 ± 75	0.684
		SMM + 0.8 M NaCl	964 ± 98	0.688

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. E. Bakker (Universität Osnabrück) wurde das Zellvolumen des *B. subtilis*-Wildtyp-Stammes JH642 und der OpuE-Mutante BLOB9 in SMM mit 0.4 M, 0.6 M und 0.8 M NaCl bestimmt. Die hier angewandte Methode macht sich zu Nutze, dass $^3\text{H}_2\text{O}$ frei über die Membran diffundieren kann, während ^{14}C -Inulin, [Makromolekül aus $\beta(1,2)$ -glycosidisch verknüpften D-Fructosemolekülen] von *B. subtilis* nicht aufgenommen werden kann. Werden beide radioaktiven Substanzen den Kulturen zugegeben, so präsentiert $^3\text{H}_2\text{O}$ den gesamten Wasserraum des Zellpräzipitates und ^{14}C -Inulin den Raum außerhalb der Zellen. Aus der Differenz läßt sich das cytoplasmatische Volumen der Zellen pro ml einer Kultur mit einer OD_{578} von 1 berechnen. Zur Durchführung des Versuchs wurden die Kulturen in SMM

entsprechender Osmolarität für 16 h inkubiert. Die an die jeweilige Osmolarität adaptierten Kulturen wurden im Test eingesetzt, und die Radioaktivität im Szintillationszähler detektiert. Die in Tabelle 6 aufgeführten Daten zeigen, dass in den stationären Zellen keine Veränderung des cytoplasmatischen Volumens, in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums, festzustellen ist. In den untersuchten Stämmen JH642 und BLOB9 beträgt das cytoplasmatische Zellvolumen bei einer OD_{578} von 1 durchschnittlich $0.65 \mu\text{l/ml}$ Kultur.

1.1.2 Die intrazelluläre Kaliumkonzentration in *B. subtilis* ist abhängig von der Osmolarität

Nach einem hyperosmotischen Schock akkumuliert *B. subtilis* Kalium-Ionen im Cytoplasma. Hier soll untersucht werden, ob die Kaliumkonzentration auch in Zellen, die an hohe Osmolaritäten adaptiert sind, erhöht ist. Die Bestimmung der intrazellulären Kaliumkonzentration wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. E. Bakker (Universität Osnabrück) parallel zur Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens in *B. subtilis* durchgeführt. Die Kulturen wurden in 20 ml SMM mit 0.4 M, 0.6 M und 0.8 M NaCl an die jeweilige Osmolarität über 16 h adaptiert. Aliquots wurden zentrifugiert und der Kaliumgehalt nach Aufschluß der Zellen im Flammenphotometer bestimmt.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich nimmt der Gehalt der Kalium-Ionen in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums von durchschnittlich 700 mM in SMM auf 934 mM in SMM mit 0.8 M NaCl zu. Demnach erfolgt die Akkumulation von Kalium-Ionen nicht nur nach einem hyperosmotischen Schock, sondern auch in Zellen, die an hohe Osmolaritäten adaptiert sind.

1.1.3 Die Akkumulation von Prolin ist proportional zur externen Osmolarität

Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass nach einem hyperosmotischen Schock mit 400 mM NaCl, die intrazelluläre Konzentration von Prolin, innerhalb von 8 h, von 16 mM auf 180 mM, bei Wachstumstemperaturen von 37°C , bzw. auf 520 mM, bei Temperaturen von 25°C ansteigt (Whatmore *et al.*, 1990). Darüber hinaus konnte von Blohn (1997) zeigen, dass die Konzentration von Prolin pro mg Protein proportional zur Osmolarität des Mediums zunimmt. Durch die Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens einer *B. subtilis* Zelle kann nun die genaue Prolinkonzentration, in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums, innerhalb einer Zelle bestimmt werden. Dafür wurden, an die entsprechende Osmolarität adaptierte Kulturen, des *B. subtilis*-Stammes JH642 in 100 ml Erlenmeyerkolben, mit 20 ml SMM steigender NaCl-Konzentrationen, bis zu einer OD_{578} von 2 inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Konzentration von Prolin nach einer von Bates *et al.* (1973) beschriebenen Methode bestimmt. Diese beruht auf einem kolorimetrischen Test, in dem durch Derivatisierung primärer und sekundärer Aminosäuren mit Ninhydrin ein farbiges Produkt gebildet wird, das sich photometrisch quantifizieren läßt. Zur Berechnung der cytoplasmatischen Prolinkonzentration wurde die daraus berechnete Menge von Prolin pro mg Zellprotein mit dem in Abschnitt 1.1.1. berechneten cytoplasmatischen Volumen der *B. subtilis* Zellen ins Verhältnis gesetzt.

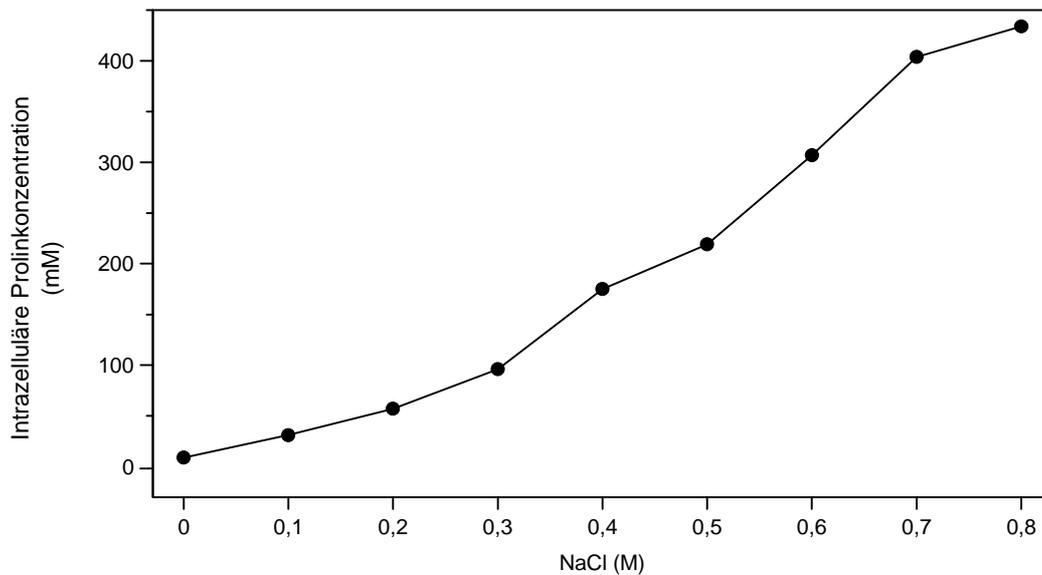


Abb.5: Intrazelluläre Konzentration von Prolin in Abhängigkeit von der Osmolarität

Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde bis zu einer OD_{578} von 2 bei 37°C in SMM steigender Osmolarität inkubiert und die Prolinkonzentration durch einen kolorimetrischen Test bestimmt.

Die in Abbildung 5 dargestellte intrazelluläre Prolinkonzentration wurde in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums aufgetragen. Die Konzentration des intrazellulären Prolins steigt proportional zur Osmolarität des Mediums von 9 mM in SMM auf 404 mM in SMM mit 0.8 M NaCl an. Dabei ist zu beachten, dass diese Werte Schwankungen unterworfen waren. Abhängig von der Wachstumsdichte, der Temperatur und der Tagesform der kultivierten Bakterienzellen sind z. B. eine Kultur, in SMM mit 0.8 M NaCl, Prolinkonzentrationen von 276 mM bis 503 mM gemessen worden, wobei die zur Osmolarität proportionale Zunahme immer klar zu erkennen war (Daten nicht gezeigt).

1.1.4 Osmoprotektive Substanzen reprimieren die Prolinakkumulation

Der reprimierende Einfluß von Glycin-Betain auf die Akkumulation von Prolin wurde zuerst durch Whatmore *et al.* (1990) untersucht. Dabei zeigte er, dass die Zugabe von 1 mM Glycin-Betain bewirkt, dass es nach einem hyperosmotischen Schock von 400 mM NaCl zu keiner Erhöhung der Prolinkonzentration kommt. Von Blohn (1997) erweiterte diese Beobachtungen indem er die Prolinakkumulation bei Zugabe von 1 mM Glycin-Betain in SMM steigender Osmolarität bestimmte. Es zeigte sich, dass bei für *B. subtilis* moderaten Osmolaritäten von bis zu 0.5 M NaCl, die Prolinakkumulation vollständig reprimiert wurde, bei höheren Osmolaritäten steigt diese jedoch wieder proportional zur Osmolarität des Mediums. Dabei wurde gezeigt, dass Glycin-Betain direkt die Transkription der Prolinsynthesegene *proHJ* inhibiert (Brill, 1998). In diesem Versuch sollte nun untersucht werden, ob die Konzentration von Glycin-Betain entscheidend für die Reprimierung der Prolinakkumulation ist, und ob auch andere osmoprotektive Substanzen einen solchen Einfluß aufweisen. Dafür wurden zunächst Kulturen des *B. subtilis*-Stammes JH642 in 20 ml SMM steigender Osmolarität mit 0.5 mM, 1 mM und 5 mM Glycin-Betain versetzt und die Prolinkonzentration, nach Bates *et al.* (1973) bestimmt.

In Abbildung 6 wird deutlich, dass die Reprimierung der Prolin Akkumulation nicht nur von der Osmolarität des Mediums sondern auch von der Glycin-Betain Konzentration abhängig ist, so dass mit zunehmender Konzentration die Prolinsynthese immer weiter abnimmt. Dabei kommt der Osmolarität von 0.5 M NaCl eine besondere Bedeutung bei, da unabhängig von der Glycin-Betain Konzentration erst ab diesem Punkt die Prolinakkumulation wieder proportional zunimmt.

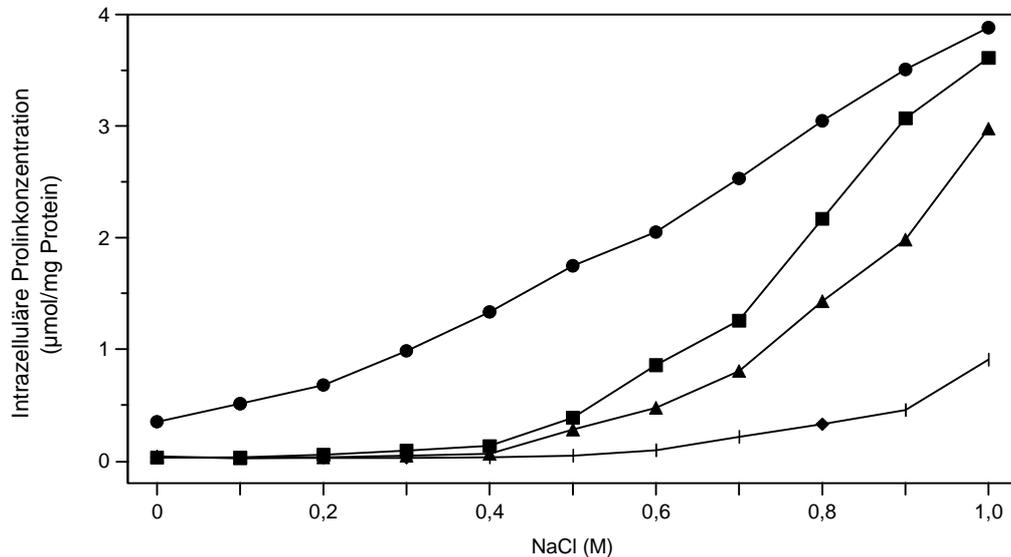


Abb.6: Glycin-Betain reprimiert die Prolinakkumulation in hochosmolaren Medien

Untersucht wurde der Einfluß von 0.5 mM (■), 1 mM (▲) und 5 mM (◆) Glycin-Betain auf die Prolinakkumulation in *B. subtilis* JH642, als Negativ-Kontrolle fungierte eine SMM-Kultur (●). Die Kulturen wurden 16 h bei 37°C inkubiert.

Um den Einfluß anderer osmoprotektiver Substanzen auf die Prolinakkumulation zu untersuchen, wurden diese in Konzentrationen von 1 mM und 5 mM den SMM-Kulturen mit 1.0 M NaCl zugegeben. Die aus diesem Versuch resultierenden Prolinkonzentrationen sind in Abbildung 7A aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Prolinsynthese generell von osmoprotektiven Substanzen reprimiert wird. Dabei ist die Höhe der Reprimierung wieder abhängig von der externen Konzentration, die Zugabe von 5 mM osmoprotektiver Substanz führt zu einem verstärkten Effekt (Daten nicht gezeigt). Einige Substanzen wie z.B. Carnitin und Crotonobetain zeigten jedoch einen wesentlich geringeren Einfluß auf die Prolinakkumulation, obwohl sie als osmoprotektive Substanz ebenso wirksam sind wie Glycin-Betain. Der Verdacht lag nahe, dass dies mit der unterschiedlichen Transportrate zusammenhängt, mit der die osmoprotektiven Substanzen in die Zelle gelangen (Kappes & Bremer, 1998). Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurde ein analoger Versuch mit dem Stamm RMKB22 (*OpuC*⁺) durchgeführt (Abb. 7B). Dieser Stamm besitzt nur noch das Transportsystem *OpuC*, und hat daher vergleichbare Transportraten für Glycin-Betain, Carnitin, Crotonobetain und Butyrobetain, die in diesem Stamm nur noch durch *OpuC* transportiert werden. Vergleicht man hier den Prolingehalt, so stellt man eine gleichmäßige Konzentration fest. Wie erwartet ist demnach die Reprimierung der Prolinakkumulation durch osmoprotektive Substanzen auch von der Transportrate ins Cytoplasma der Zellen abhängig.

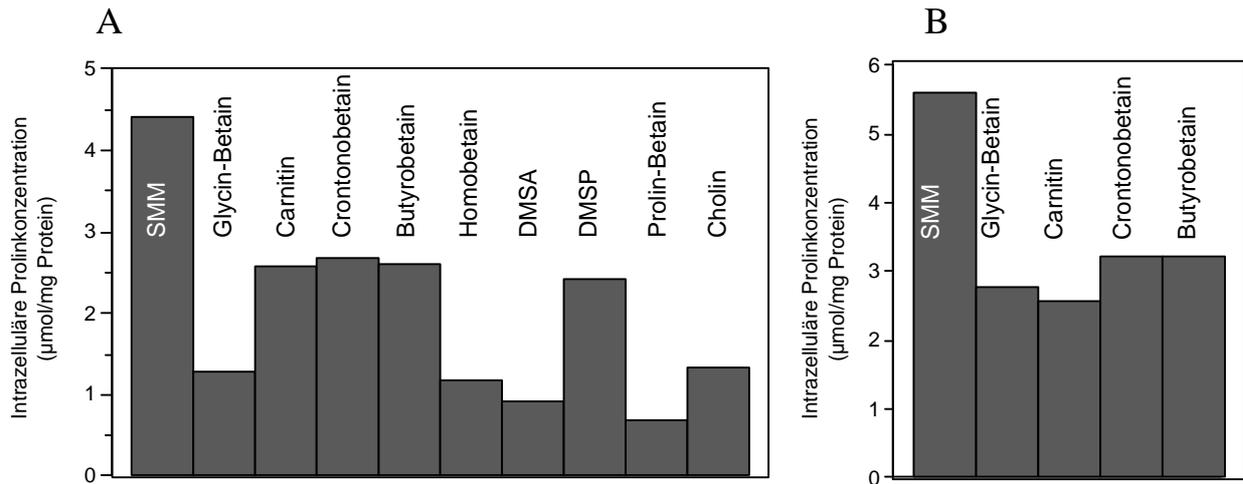


Abb.7: Einfluß osmoprotektiver Substanzen auf die Akkumulation von Prolin

Kulturen der Stämme (A) JH642 und (B) RMKB22 (*opuA*, *opuB*, *opuC*⁺, *opuD*) wurde in 20 ml SMM mit 1.0 M NaCl und 1 mM unterschiedlicher osmoprotektiver Substanzen 16 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Konzentration von Prolin bestimmt. DMSA: Dimethylsulfoniumacetat DMSP: Dimethylsulfoniumpropionat

1.1.5 Die Akkumulation von Glycin-Betain ist proportional zur Osmolarität

Für *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Konzentration von endogen synthetisiertem Prolin proportional mit der Osmolarität des Mediums ansteigt. Eine weitere von *B. subtilis* genutzte osmotische Schutzsubstanz ist Glycin-Betain. Zur *de novo* Synthese von Glycin-Betain ist *B. subtilis* nicht in der Lage, die Zelle besitzt jedoch mehrere effektive Transportsysteme für diese Substanz.

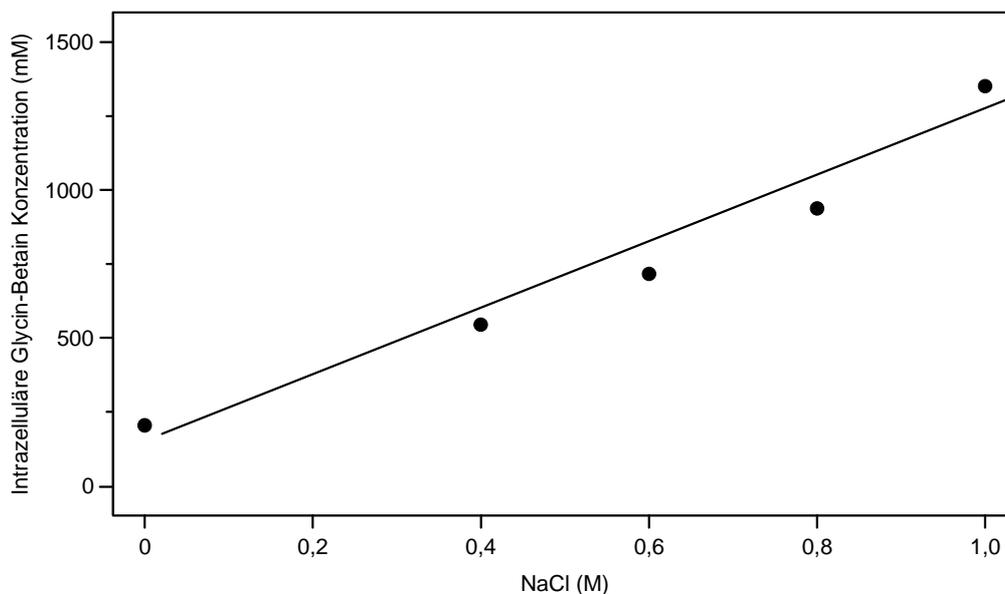


Abb.8: Intrazelluläre Akkumulation von Glycin-Betain unter hochosmolaren Bedingungen

Der Stamm JH642 wurde in SMM steigender Osmolarität mit 1 mM radioaktiv markiertem Glycin-Betain bis zu einer OD₅₇₈ von 1.5 bei 37°C inkubiert und die Aufnahme von Glycin-Betain bestimmt.

Um die Konzentration von Glycin-Betain in hochosmolaren Medien zu untersuchen wurde die Akkumulation von radioaktiv markiertem Glycin-Betain bestimmt. Dafür wurde der Stamm JH642 in SMM und in SMM steigender Osmolarität (0.4 M, 0.6 M, 0.8 M und 1.0 M NaCl) mit 1 mM ^{14}C -Glycin-Betain bis zu einer OD_{578} von 1.5 inkubiert. Die verwendeten Kulturen waren zuvor an die entsprechende Osmolarität mit 1 mM Glycin-Betain adaptiert worden. Zur Bestimmung der Glycin-Betain Konzentration wurde die Radioaktivität der Zellen und des Kulturüberstandes im Szintillationszähler gemessen, daraus die Menge an Glycin-Betain berechnet und diese mit dem cytoplasmatischen Volumen der Zellen ins Verhältnis gesetzt.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich besteht zwischen der Osmolarität des Mediums und der Konzentration von Glycin-Betain eine proportionale Abhängigkeit. Die Glycin-Betain Konzentration steigt von 200 mM in SMM linear auf 1.35 M in SMM mit 1.0 M NaCl.

1.2 Efflux und Recycling von Prolin

B. subtilis akkumuliert in hochosmolaren Medien Prolin in hohen Konzentrationen, sowohl durch Synthese aus Glutamat, als auch bei Vorhandensein von externem Prolin durch Import. Der Import erfolgt durch das osmotisch induzierbare Transportsystem OpuE (von Blohn *et al.*, 1997). Mit Hilfe der *opuE*-Mutante BLOB9 konnte der Efflux von Prolin und das hochaffine Recycling durch OpuE demonstriert werden.

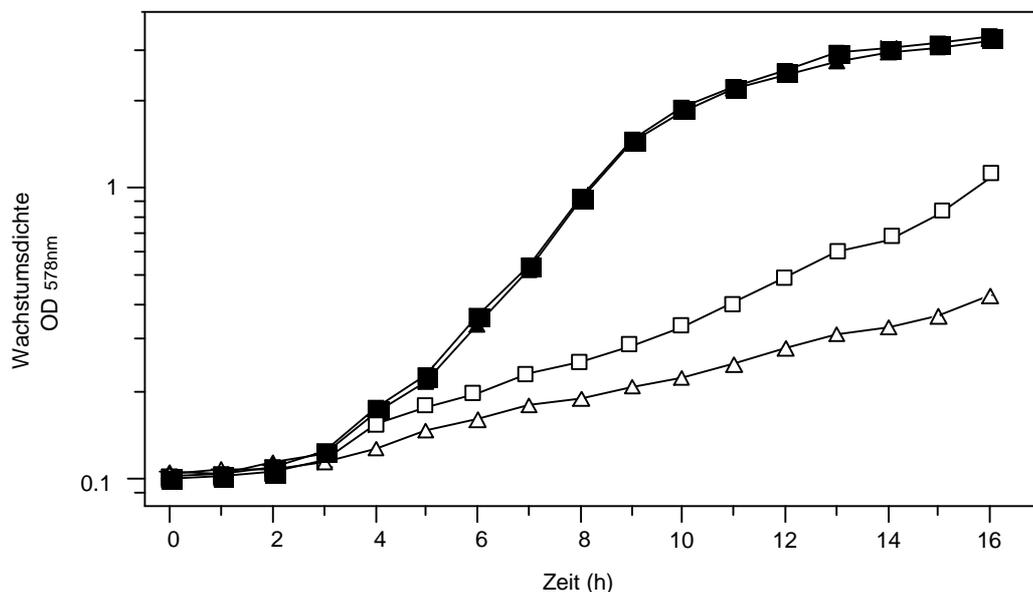


Abb.9: Wachstumsphänotyp im Stamm BLOB9 unter hochosmolaren Bedingungen

Die *B. subtilis* Stämme JH642 (*opuE*⁺, ■, □) und BLOB9 (*opuE*⁻, △, ▲) wurden in 80 ml SMM (■, ▲) und SMM mit 1 M NaCl (□, △) bei 37°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen die OD_{578} bestimmt

Für die *opuE*-Mutante BLOB9 konnte von Blohn (1997) einen Wachstumsphänotyp unter hochosmolaren Bedingungen beobachten. Da es nicht gelungen war dieses Experiment zu reproduzieren wurde in dieser Arbeit erneut versucht diesen Phänotyp zu charakterisieren. Dabei sollte das Wachstum der Kulturen JH642 und BLOB9 in SMM und in SMM mit 1 M NaCl verglichen werden. Es zeigte sich, dass für eine Aufnahme einer Wachstumskurve in SMM mit

1 M NaCl die Kulturen zuvor unbedingt an eine für *B. subtilis* moderaten Osmolarität von 0.4 M NaCl adaptiert werden müssen. Die Aufnahme der Wachstumskurve erfolgte in 80 ml SMM bzw. SMM mit 1 M NaCl durch das Messen der OD_{578} .

Wie aus Abbildung 9 zu entnehmen, zeigt die *opuE*-Mutante unter hochosmolaren Bedingungen ein deutliches Wachstumsdefizit, während in Minimalmedien ohne erhöhte Osmolarität kein Unterschied zwischen der *opuE*-Mutante und dem Wildtyp zu beobachten ist. Um die Ursache für den Wachstumsphänotyp von BLOB9 unter hochosmolaren Bedingungen zu untersuchen, wurde die Prolinkonzentration im Cytoplasma und im Kulturüberstand, in SMM steigender Osmolarität gemessen. Dafür wurden 20 ml Kulturen der Stämme JH642 und BLOB9 in SMM steigender Osmolarität für 16 h inkubiert und die Prolinkonzentration im Zellsediment und Überstand durch einen kolorimetrischen Test nach Bates *et al.* (1973) bestimmt.

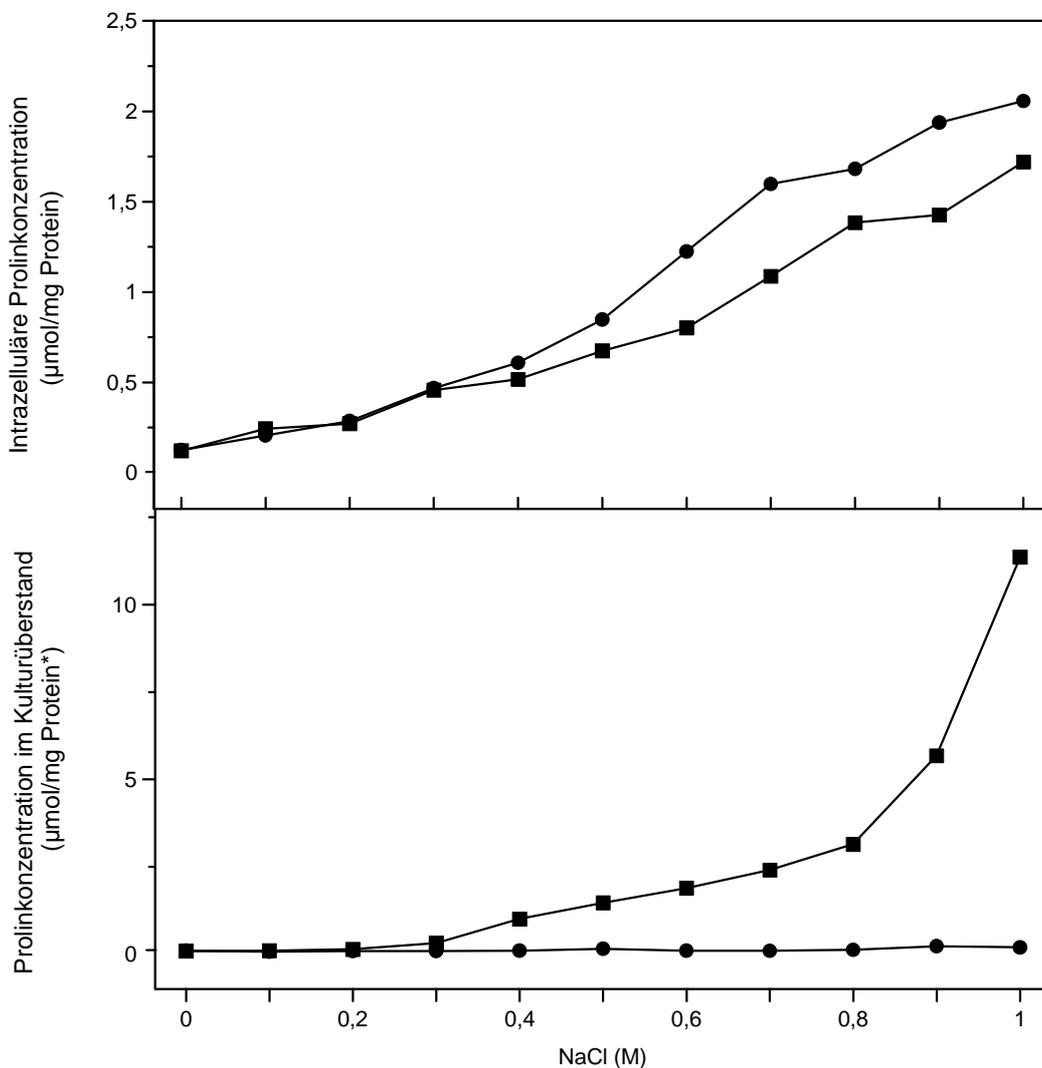


Abb.10: Intra- und extrazelluläre Prolinkonzentration

Die *B. subtilis* Stämme JH642 (*opuE*⁺, ●) und BLOB9 (*opuE*, ■) wurden in 20 ml SMM steigender Osmolarität inkubiert und die Prolinkonzentration im Cytoplasma und im Kulturüberstand bestimmt. * Die Berechnung der Prolinkonzentration im Überstand erfolgte mit der zuvor durch die OD_{578} bestimmten Proteinmenge des Zellsediments.

Die intrazelluläre Prolinkonzentration ist im Stamm BLOB9, ab einer Osmolarität von 0.3 M NaCl geringer, als die des Wildtyp-Stammes JH642 (Abb. 10). Dagegen nimmt die Prolinkonzentration des Kulturüberstandes im Stamm BLOB9 ab einer Osmolarität von 0.3 M NaCl stetig auf 11 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein (Die Berechnung der Prolinkonzentration erfolgte mit der zuvor durch die OD_{578} bestimmte Proteinmenge des Zellsediments) in SMM mit 1 M NaCl zu. Im Kulturüberstand von JH642 ist dagegen kein Prolin nachweisbar. Die Existenz von Prolin im Kulturüberstand ist ein Beweis dafür, dass das unter hohen Osmolaritäten akkumulierte Prolin aus dem Cytoplasma der Zelle gelangt. Im Wildtypstamm JH642 wird dieses exkretierte Prolin umgehend über das hochaffine Prolin-Transportsystem OpuE wieder aufgenommen. Demgegenüber erfolgt in der *opuE*-Mutante keine osmotisch induzierte Aufnahme von Prolin, es kommt zu einer Anhäufung von Prolin im Kulturüberstand, gleichzeitig ist ein signifikant verringertes Wachstumsvermögen unter hochosmolaren Bedingungen zu beobachten.

Durch Kreuzfütterungsexperimente (Abb. 11) konnte gezeigt werden, dass der Prolinauxotrophe *E. coli*-Stamm RC7111 (*proA*) in der räumlichen Nähe der *opuE*-Mutante BLOB9 wächst, und so seine Auxotrophie durch das von *B. subtilis* exkretierte Prolin kompensieren kann. Demgegenüber wird im Stamm JH642 Prolin durch das hochaffine OpuE-Transportsystem so effektiv recycelt, dass kein Wachstum von *E. coli*-Kulturen ermöglicht wird. Zur Durchführung des Versuches wurden exponentiell wachsende Kulturen des *E. coli*-Stammes RC711 auf eine Minimalagarplatte mit 0.8 M NaCl ausgestrichen. Auf diese Platten wurden Einzelkulturen der Stämme JH642, BLOB9 und BLOB26 abgestempelt. (In dem Stamm BLOB26 ist die *opuE*-Deletion komplementiert).

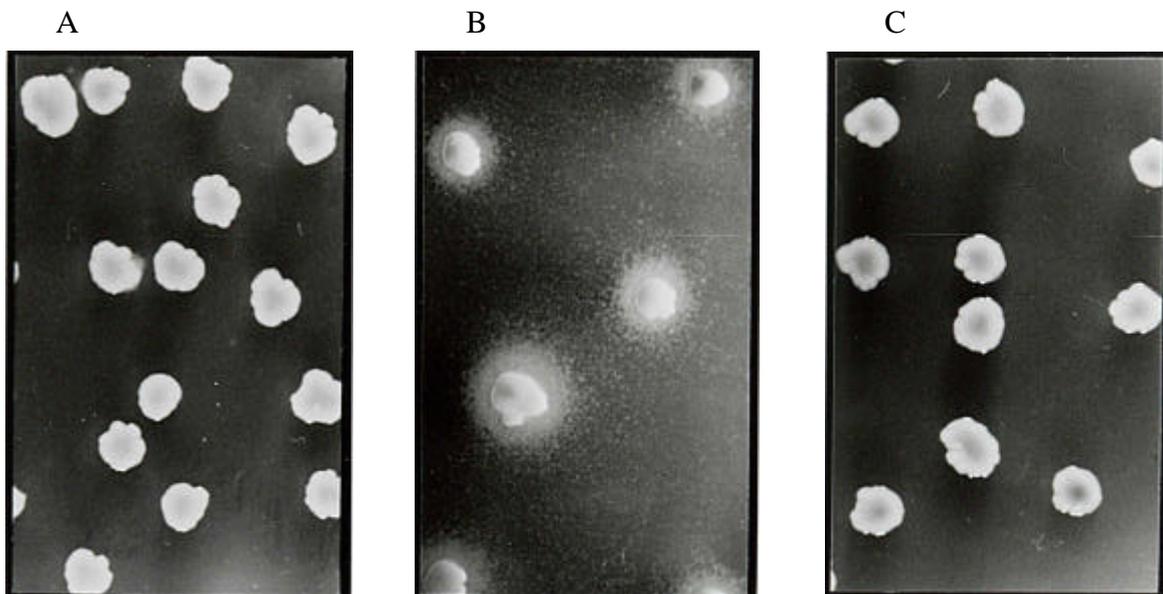


Abb.11: Kreuzfütterungsexperimente: Der Prolinauxotrophe *E. coli*-Stamm kann in der räumlichen Nähe der *B. subtilis* Mutante BLOB9 wachsen.

B. subtilis-Kulturen der Stämme (A) JH642 (*opuE*⁺), (B) BLOB9 (*opuE*) und (C) BLOB26 (*opuE*⁺; *opuE* komplementiert durch XpBLPB15,2) wurden auf eine mit dem Prolinauxotrophen *E. coli*-Stamm RC711 ausgestrichene Minimalagarplatte (MMA mit 0.8 M NaCl) abgestempelt.

1.3 Efflux und Recycling von Glycin-Betain

1.3.1 Wachstumsphänotyp durch Efflux von Glycin-Betain

B. subtilis akkumuliert die osmoprotektive Substanz Glycin-Betain in molaren Konzentrationen. Da *B. subtilis* nicht zur *de novo* Synthese von Glycin-Betain fähig ist, erfolgt die Akkumulation durch den Transport von exogen vorhandenem Glycin-Betain, oder durch Synthese aus dem Vorläufermolekül Cholin. Für den Transport von Glycin-Betain sind die Transportsysteme OpuA, OpuC und OpuD verantwortlich, während Cholin über OpuB und OpuC transportiert wird (Kappes *et al.*, 1999).

Der Transport von Glycin-Betain und Cholin durch verschiedene Transportsysteme ermöglicht die Untersuchung des Glycin-Betain Efflux und Recyclings unter hochosmolaren Bedingungen. Der Stamm RMKB20 besitzt nur noch das OpuB-Transportsystem, kann also Cholin, aber kein Glycin-Betain transportieren. Der Kontrollstamm RMKB30 besitzt die Transportsysteme OpuA und OpuB, kann also Cholin und Glycin-Betain transportieren. Beide Stämme sind somit in der Lage exogenes Cholin zu importieren und dieses im Cytoplasma zu Glycin-Betain umzusetzen. Wenn die Hypothese stimmt, dass Glycin-Betain ständig aus dem Cytoplasma exkretiert und wieder recycelt wird, so entsteht für den Stamm RMKB20 unter hochosmolaren Bedingungen ein Wachstumsnachteil, da er durch ein fehlendes Transportsystem für Glycin-Betain nicht in der Lage ist das zuvor exkretierte Glycin-Betain zu recyceln.

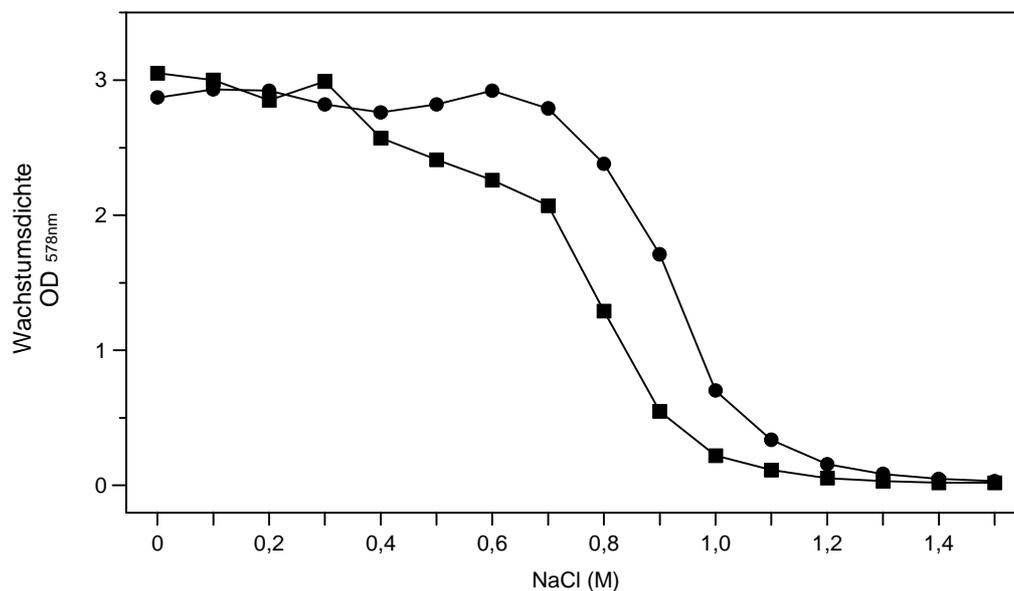


Abb.12: Wachstumsphänotyp im Stamm RMKB20 unter hochosmolaren Bedingungen

Die *B. subtilis* Stämme RMKB30 (*opuA*⁺, *opuB*⁺; ●) und RMKB20 (*opuB*⁺; ■) wurden in 20 ml SMM mit 1 mM Cholin bei steigender Osmolarität inkubiert. Nach 16 h bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Wachstumsdichte.

Um dies zu untersuchen wurden die Stämme RMKB20 und RMKB30 in 20 ml SMM mit 1 mM Cholin bei steigender Osmolarität inkubiert, und das Wachstum nach 16 h verglichen. Wie in

Abbildung 12 ersichtlich zeigt der Stamm RMKB20 ein deutliches Wachstumsdefizit gegenüber dem Stamm RMKB30. Bis zu einer Osmolarität von 0.4 M NaCl ist die Wachstumsdichte beider Stämme noch gleich, bei höheren Osmolaritäten wächst der Stamm RMKB20 jedoch deutlich schlechter.

1.3.2 Glycin-Betain wird permanent exkretiert

1.3.2.1 Glycin-Betain kann im Überstand von RMKB20 detektiert werden

Um die Vermutung zu bestätigen, dass das Wachstumsdefizit des Stammes RMKB20, darauf zurückzuführen ist, dass Glycin-Betain über die Membran exkretiert wird, wurde der Überstand von Kulturen untersucht, die in hochosmolaren Medien mit exogenem Cholin inkubiert wurden. Die Stämme JH642 und RMKB20 wurden in SMM mit 0.4 M NaCl überimpft und radioaktiv markiertes Cholin in einer Endkonzentration von 10 μM zugegeben. Unmittelbar vor und alle 30 min nach Zugabe von Cholin wurden Proben genommen, abzentrifugiert und das Zellsediment mit Lysozym aufgeschlossen. Die Radioaktivität der Zellüberstände wurde im Szintillationszähler gemessen und zusätzlich, zusammen mit den Proben des Zellsediments, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Wie in Abbildung 13 deutlich zu erkennen ist, nimmt die Radioaktivität des Überstandes beider Stämme innerhalb der ersten 30 min von ungefähr 4×10^4 dpm auf 1000 dpm ab. Danach steigt die Radioaktivität des Überstandes in dem Stamm RMKB20 wieder stetig auf 3×10^4 an,

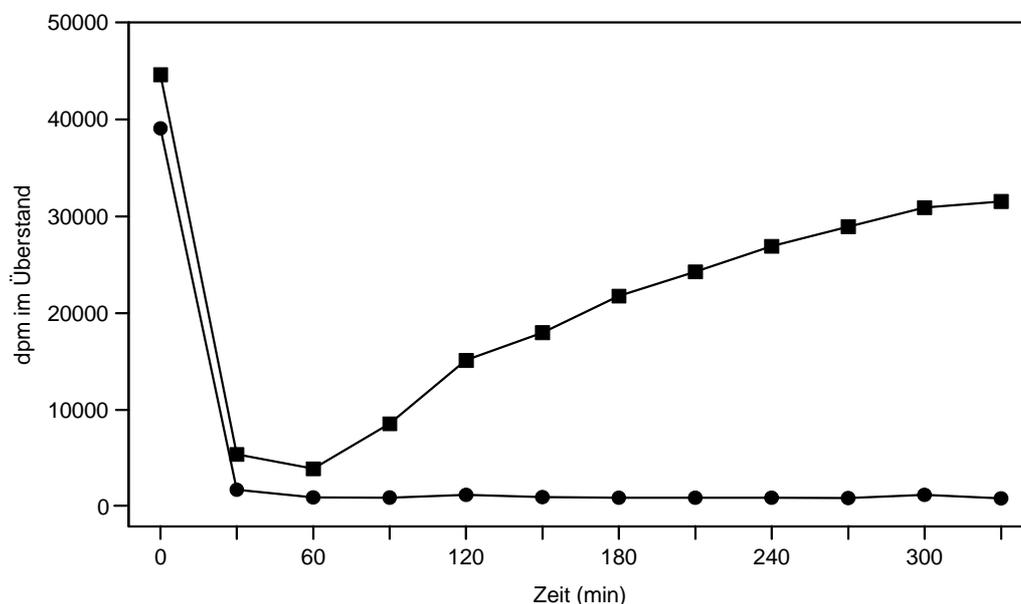


Abb.13: Efflux und Recycling von Glycin-Betain

Die *B. subtilis* Stämme JH642 (●) und RMKB20 (*opuA*, *opuB*⁺, *opuC*, *opuD*; ■) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl und 10 mM radioaktiv markiertes [Methyl-¹⁴C]-Cholin inkubiert. Unmittelbar vor und alle 30 min nach Zugabe des radioaktiven Cholins wurden Proben genommen, abzentrifugiert und die Radioaktivität des Kulturüberstandes gemessen.

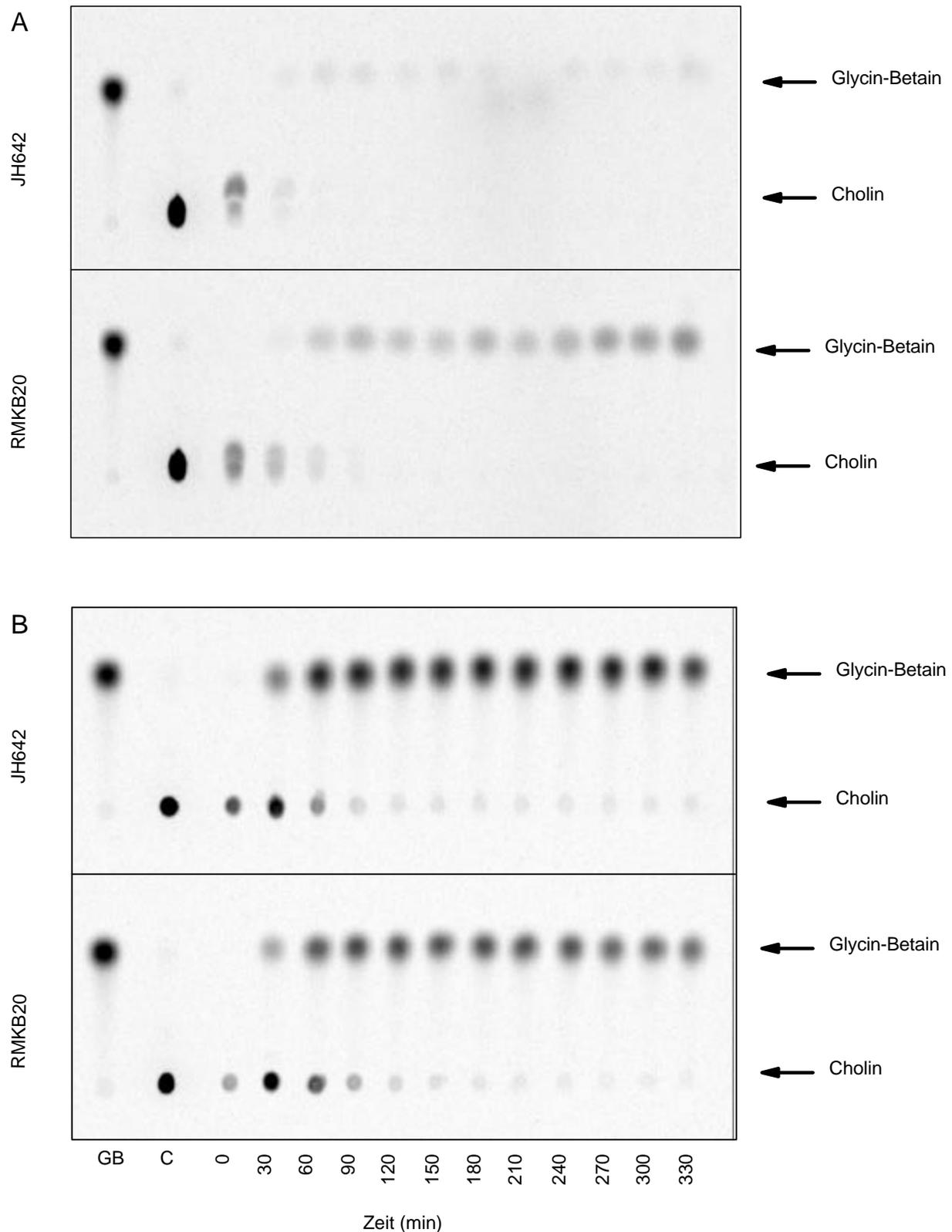


Abb.14: Nachweis von radioaktiv markiertem Cholin und Glycin-Betain

Die *B. subtilis* Stämme JH642 und RMKB20 (*opuA*, *opuB*⁺, *opuC*, *opuD*) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl und 10 μ M radioaktiv markiertem [Methyl-¹⁴C]-Cholin inkubiert. Unmittelbar vor und alle 30 min nach Zugabe von Cholin wurden Proben genommen. Proben vom **(A)** Kulturüberstand und vom **(B)** Zellsediment wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die radioaktiven Signale durch einen Phosphorimager detektiert.

während im Wildtyp Stamm JH642 nur eine geringe Radioaktivität von 1000 dpm gemessen werden kann. Man kann daraus schließen, dass in beiden Stämmen das radioaktive Cholin schnell aufgenommen und im Cytoplasma zu der osmoprotektiven Substanz Glycin-Betain umgesetzt wurde. Da die Radioaktivität im Überstand der für Glycin-Betain Transport defekten Mutante RMKB20 wieder ansteigt, ist davon auszugehen Glycin-Betain aus dem Cytoplasma exkretiert wird und nicht wieder aufgenommen werden kann.

Diese Beobachtung läßt sich durch die Auftrennung der Proben durch eine Dünnschichtchromatographie bestätigen. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, wird das radioaktive Cholin von beiden Stämmen innerhalb der ersten 30 min vollständig aufgenommen und im Cytoplasma zu Glycin-Betain umgesetzt. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Stämmen besteht jedoch bei der Verteilung von Glycin-Betain. Im Überstand des Wildtyp Stammes JH642 ist kaum Glycin-Betain nachzuweisen, während in der Mutante RMBK20 die Glycin-Betain Konzentration in dem gemessenen Zeitraum von 330 min stetig zunimmt. Auch ist die intrazelluläre Glycin-Betain Konzentration im Wildtyp konstant, während sie bei der Mutante innerhalb der 330 min langsam abnimmt. Der Unterschied ist dadurch zu erklären, dass die Mutante RMKB20 kein Glycin-Betain mehr importieren kann, wodurch es zu einer Anreicherung von Glycin-Betain im Überstand kommt. Der in Abbildung 12 dokumentierte Wachstumsphänotyp beruht demnach auf einer im Vergleich zum Wildtyp geringeren intrazellulären Konzentration von Glycin-Betain. Damit wurde die Hypothese bestätigt, dass das unter hochosmolaren Bedingungen durch Synthese aus Cholin akkumulierte Glycin-Betain über einen nicht bekannten Mechanismus aus dem Cytoplasma exkretiert und durch die hochaffinen Transportsysteme OpuA, OpuC und OpuD wieder recycelt wird.

1.3.2.2 Efflux von Glycin-Betain und Cholin

Zur weiteren Analyse des Efflux von osmoprotektiven Substanzen, sollte der Austausch von radioaktiv markierten Substanzen aus dem Cytoplasma, gegen nicht radioaktive Substanzen im Medium beobachtet werden. Dafür erhielten die Kulturen, in hochosmolarem Medium, zunächst die Möglichkeit ausreichend radioaktiv markiertes Glycin-Betain bzw. Cholin aufzunehmen, bis durch die Zugabe eines 100-fachen Überschusses von nicht radioaktivem Substrat die weitere Aufnahme kompetitiv gehemmt wurde. Aufgrund der Veränderung der Radioaktivität in den Zellen kann auf die Existenz eines Effluxsystems für die entsprechende Substanz geschlossen werden. Ist ein Effluxsystem vorhanden, so nimmt die Radioaktivität mit der Zeit ab, das radioaktive Substrat gelangt nach außen, kann dort aber wegen des 100-fachen Überschusses an nicht radioaktivem Substrat nur noch in geringen Mengen importiert werden. Ohne Effluxsystem gelangt das radioaktive Substrat nicht nach außen, die Radioaktivität bleibt konstant.

Um zu untersuchen ob für Cholin ein Effluxsystem besteht, wurde der Stamm SMB3 [*opuB*⁺, $\Delta(gbsAB::neo)2$] benutzt. Dieser Stamm besitzt nur ein Transportsystem für Cholin, und kann Cholin nicht mehr enzymatisch zu Glycin-Betain umsetzen. Der Stamm wurde in SMM an eine Osmolarität von 0.4 M NaCl adaptiert und bis zu einer OD₅₇₈ von 0.5 inkubiert. Aliquots dieser Kultur wurden mit 1 mM radioaktiv markiertem [Methyl-¹⁴C]-Cholin versetzt und, da die

Aufnahmerate für Cholin in dem *OpuC*-defizienten Stamm verlangsamt ist, weitere 50 min kultiviert. Anschließend wurde Cholin und Glycin zu einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben. Die Radioaktivität wurde, vor und nach Zugabe, des nicht radioaktiven Substrat gemessen, und mit der parallel bestimmten OD_{578} zur Berechnung der Konzentration von radioaktivem Cholin in der Zelle eingesetzt.

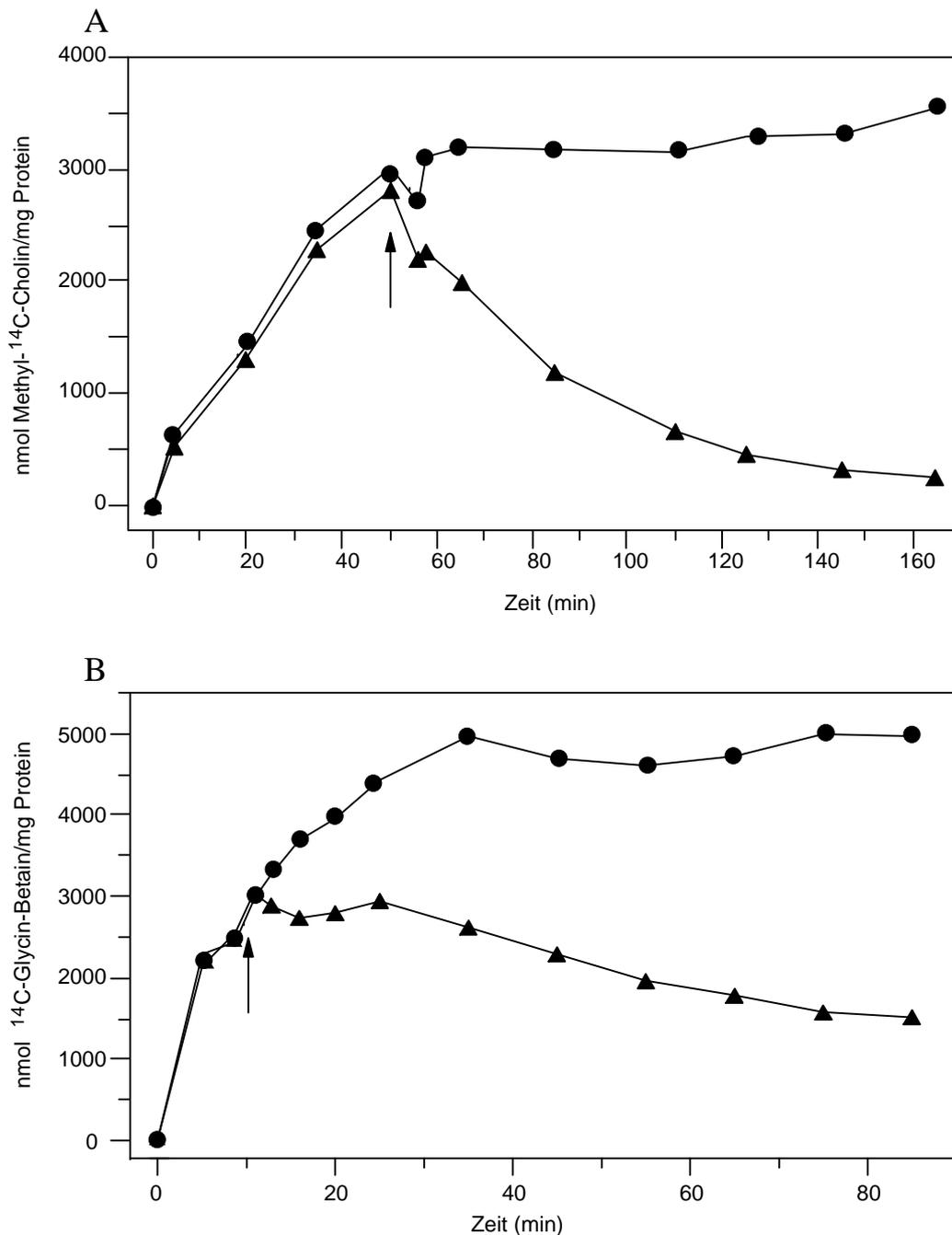


Abb.15: Efflux von Cholin und Glycin-Betain

Die *B. subtilis* Kulturen wurden an eine Osmolarität von 0.4 M NaCl in SMM adaptiert und bis zu einer OD_{578} von 0.5 mit 1 mM radioaktiv markiertem Cholin und Glycin-Betain inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt (Pfeil) wurde 100 mM nicht radioaktiv markiertes Substrat zugegeben und die Veränderung der Radioaktivität in den Zellen vorher und nachher gemessen. Zur Berechnung der Konzentration des radioaktiven Substrats in der Zelle wurde parallel dazu die OD_{578} bestimmt. (A) Der Stamm SMB3 [*opuB*⁺, Δ (*gbsAB::neo*)2] wurde mit [Methyl-¹⁴C]-Cholin inkubiert und ein Überschuss von 100 mM Cholin (▲) und Glycin (●) zugegeben. (B) Der Stamm JH642 wurde mit ¹⁴C-Glycin-Betain inkubiert und ein Überschuss von 100 mM Glycin-Betain (▲) und Glycin (●) zugegeben.

Wie aus Abbildung 15A ersichtlich existiert für Cholin ein Effluxsystem. Die Zugabe von nicht radioaktivem Cholin führt zu einer deutlichen Verringerung der Konzentration von radioaktivem Cholin in den Zellen, während nach der Zugabe der osmotisch unwirksamen Kontrollsubstanz Glycin die Konzentration konstant bleibt.

Eine weitere Bestätigung eines Effluxsystems für Glycin-Betain konnte bei dem Versuch mit Glycin-Betain als radioaktive Substanz erhalten werden. Dafür wurde der *B. subtilis* Wildtyp JH642 für einen Zeitraum von 10 min mit 1 mM ^{14}C -Glycin-Betain inkubiert, und anschließend mit 100 mM nicht radioaktivem Glycin-Betain und Glycin versetzt. Aus Abbildung 15B wird deutlich, dass die Konzentration des radioaktiven Glycin-Betain bei Zugabe von 100-fachen Glycin-Betain abnimmt, während sie nach Zugabe von Glycin weiter ansteigt und schließlich auf konstantem Niveau bleibt.

1.3.3 Efflux von Glycin-Betain nach einem hypoosmotischen Schock

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass Glycin-Betain in hochosmolaren Medien ständig, langsam über die Membran exkretiert wird. Wenn man die Kulturen jedoch einem hypoosmotischen Schock aussetzt, so erfolgt ein extrem schneller und massiver Efflux von zuvor akkumulierten osmoprotektiven Substanzen wie Glycin-Betain. Dafür wurde der Stamm JH642 an eine Osmolarität von 0.8 M NaCl in SMM adaptiert und bis zu einer OD_{578} von etwa 0.6 inkubiert. Die Kultur wurde aliquotiert, 1 mM radioaktiv markiertes Glycin-Betain zugesetzt und weitere 80 min inkubiert. Der hypoosmotische Schock erfolgte zu

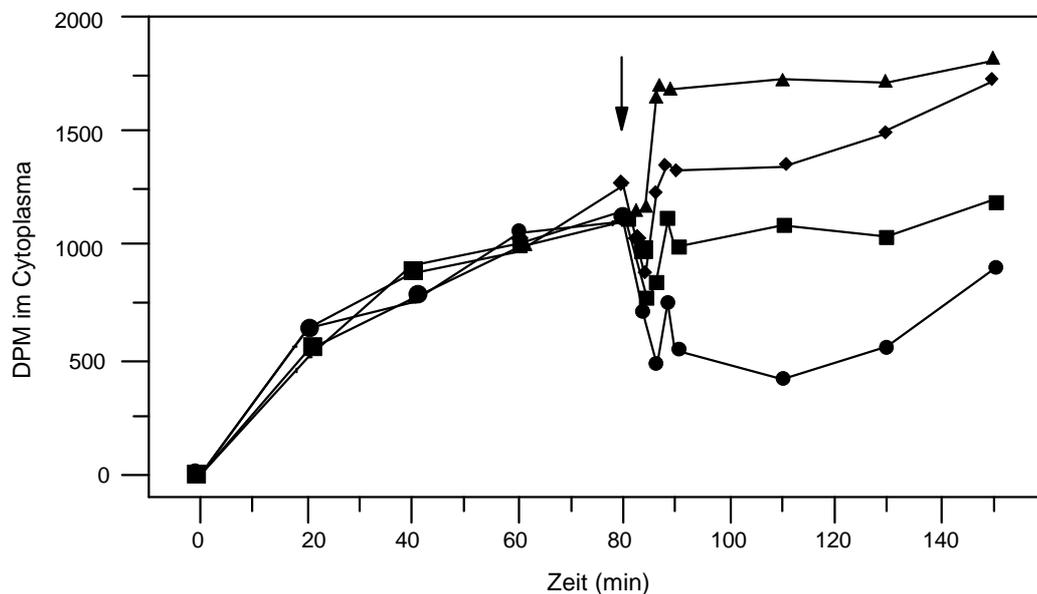


Abb.16: Efflux von Glycin-Betain nach einem hypoosmotischen Schock

Die *B. subtilis* Kultur JH642 wurde in SMM mit 0.8 M NaCl bis zu einer OD_{578} von etwa 0.6 inkubiert. Aliquots zu je 1.3 ml Kultur wurden mit 1 mM radioaktiv markiertem Glycin-Betain auf einem 37°C Schüttler weitere 80 min kultiviert und schließlich durch Zugabe von 1.5 ml SMM unterschiedlicher Osmolarität (Pfeil) einem hypoosmotischen Schock von 0.8 M NaCl auf 0.6 M (◆), 0.4 M (■) und 0.2 M (●) ausgesetzt. Zur Kontrolle wurde eine Kultur mit isoosmotischem Medium von 0.8 M NaCl verdünnt (▲). Zur Bestimmung der Glycin-Betain Konzentration in den Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, diese filtriert und mit Medium gleicher Osmolarität gewaschen. Die Radioaktivität der Filter wurde in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

diesem Zeitpunkt durch Zugabe von SMM unterschiedlicher Osmolarität, so dass die Osmolarität plötzlich von 0.8 M NaCl auf 0.6 M, 0.4 M und 0.2 M NaCl gesenkt wurde. Zur Bestimmung der Glycin-Betain Konzentration in den Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und die Radioaktivität bestimmt.

Zum Zeitpunkt des hypoosmotischen Schocks waren die Zellen, durch die Akkumulation von hohen Glycin-Betain Konzentrationen auf eine Osmolarität von 0.8 M NaCl adaptiert. Durch den plötzlichen Abfall des osmotischen Drucks käme es unweigerlich zum Einstrom von Wasser und damit zum Platzen der Bakterienzelle, wenn diese keinen Mechanismus besitzen würde, die osmoprotektiven Substanzen sehr schnell unwirksam zu machen, oder aber durch Effluxsysteme zu entfernen. Hier konnte gezeigt werden (Abb. 16), dass sich die Zelle ihrer osmoprotektiven Substanzen durch raschen Efflux entledigt, wobei das Ausmaß des Efflux abhängig ist von der Höhe des hypoosmotischen Schocks. Der nach dem Efflux zu beobachtende Anstieg der Radioaktivität in den Zellen, ist wahrscheinlich durch eine Gleichgewichtseinstellung der cytoplasmatischen Solute, durch Import des zuvor exkretierten Glycin-Betains begründet.

2. Charakterisierung des Prolinkatabolismus in *B. subtilis*

Die Aminosäure Prolin erfüllt in *B. subtilis* mehrere Funktionen: Sie kann als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff und Energiequelle dienen, in Proteine eingebaut werden und spielt als osmoprotektive Substanz eine bedeutende Rolle. Exogen vorliegendes Prolin wird durch hochaffine Transporter importiert, und darüber hinaus unter hochosmolaren Bedingungen in hohen Konzentrationen *de novo* synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Abbauweg von Prolin in *B. subtilis* aufgeklärt und untersucht, auf welche Weise die Zelle unter hochosmotischen Bedingungen einen Energieaufwendigen „futile cycle“ vermeidet, bei dem Prolin zur Osmoadaptation akkumuliert und gleichzeitig abgebaut wird.

2.1 Prolin kann unter hochosmolaren Bedingungen als Kohlenstoffquelle genutzt werden

Es konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* mit Prolin als alleinige C-Quelle wachsen kann. Im Folgenden wurde untersucht, ob Prolin diese Funktion auch unter hochosmolaren Bedingungen erfüllen kann, oder ob hier ein Regulationsmechanismus greift, der den Abbau von Prolin und die gleichzeitige Akkumulation als osmoprotektive Substanz verhindert. Dafür wurde der Stamm JH642 in 80 ml SMM und SMM mit 0.2 M, 0.4 M und 0.6 M NaCl kultiviert, als C-Quelle diente Prolin. Die Zunahme der Wachstumsdichte wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung der OD₅₇₈ bestimmt. Aus Abbildung 17 wird deutlich, dass *B. subtilis* Prolin auch unter hochosmolaren Bedingungen als C-Quelle nutzen kann. Die langsamere Wachstumsrate in höheren Osmolaritäten ergibt sich aus der Anpassung der Zellen an die jeweilige Osmolarität. Unter hochosmolaren Bedingungen erfolgt somit keine generelle Reprimierung des Prolinabbaus in der Zelle.

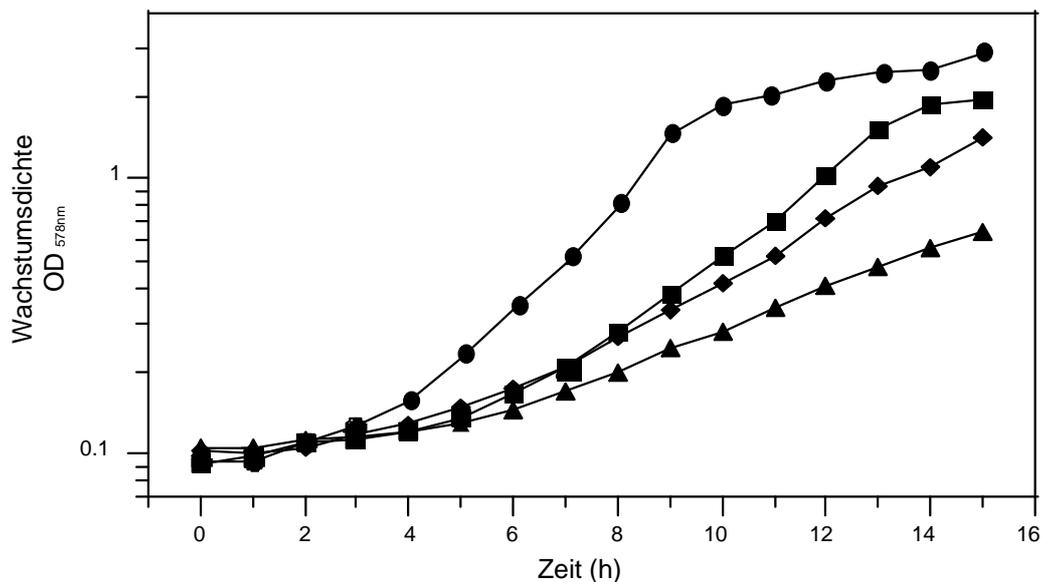


Abb.17: Wachstum mit Prolin als C-Quelle unter hochosmotischen Bedingungen

Dargestellt ist das Wachstum von *B. subtilis* JH652 in SMM (●) und SMM mit 0.2 M (■), 0.4 M (◆) und 0.6 M NaCl (▲) mit Prolin als alleinige C-Quelle.

2.2 Analyse und Klonierung der Gene für die enzymatische Umsetzung von Prolin zu Glutamat in *B. subtilis*

Durch das Genom-Sequenzierprojektes von *B. subtilis* wurde ein offener Leserahmen (*ycgO*) gefunden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 63 % Identität zu der osmotisch induzierbaren Polin-Permease OpuE zeigt (Yamane *et al.*, 1996; von Blohn *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass YcgO für den Transport von Prolin in Medien niedriger Osmolarität verantwortlich ist. Unmittelbar vor diesem Gen befinden sich zwei Leserahmen (Abb. 18), die als die kodierenden Regionen für eine Prolin Dehydrogenase (*ycgM*) und eine γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase (*ycgN*) identifiziert werden konnten. Die Prolin Dehydrogenase, auch Prolin Oxidase genannt, katalysiert die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C). Bisher wurde davon ausgegangen, dass P5C von der Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase zu Glutamat umgesetzt wird. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass P5C erst zu γ -Glutamat-semialdehyd hydrolysiert und im zweiten Schritt von der γ -Glutamyl-

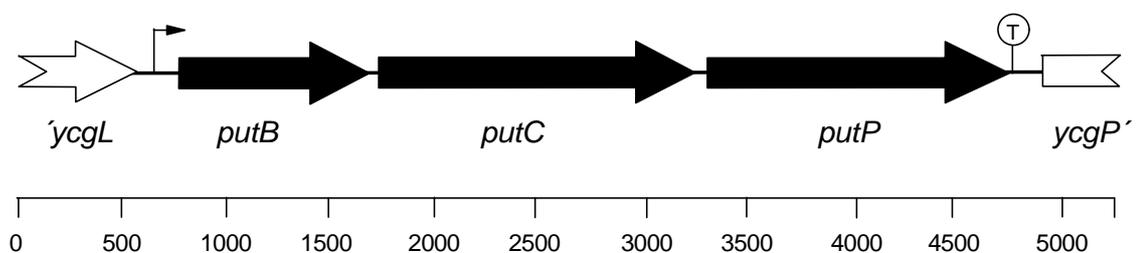


Abb.18: Genetische Anordnung der *putBCP*-Region

Dargestellt ist die genetische Organisation der *putBCP*-Region aus *B. subtilis*. (↗) Promotor (T) Transkriptionsterminator.

semialdehyd Dehydrogenase zu Glutamat umgesetzt wird (Ling *et al.*, 1994; Perozich *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Enzym als γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase (GGSALDH) bezeichnet. Die Umsetzung von Prolin zu Glutamat wird in *B. subtilis* von zwei Enzymen katalysiert (Abb. 19), während in anderen Prokaryonten wie *E. coli*, *S. typhimurium* und *B. japonicum* ein Enzym mit einer Prolin Dehydrogenase- und einer γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase Domäne die Reaktion katalysiert (Wood & Zadworny, 1980; Menzel & Roth, 1981; Straub *et al.*, 1996). Die enge räumliche Anordnung der *ycgMNO*-Gene, sowie das Vorhandensein einer mutmaßlichen Promotorregion vor und einer Terminatorsequenz nach den *ycgMNO*-Genen spricht für eine Organisation der Gene in einem gemeinsamen Operon. Die Gene *ycgM*, *ycgN* und *ycgO* wurden in *putB*, *putC* und *putP* umbenannt, wobei *put* für „proline ut^{il}ization“ steht.

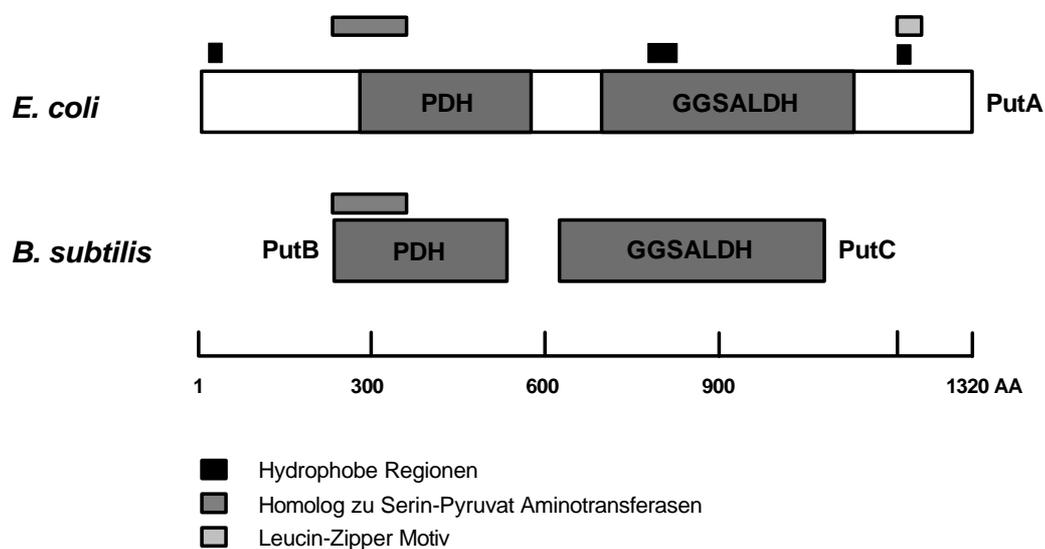


Abb.19: Organisation der enzymatisch aktiven Domänen im PutA-Protein von *E. coli* im Vergleich zu PutB und PutC aus *B. subtilis*

Die Prolin Dehydrogenase- (PDH) und die γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase (GGSALD) Domänen bzw. Proteine sind grau gekennzeichnet. Die Anordnung von PutB und PutC zu PutA entspricht der Homologie der Aminosäuresequenz. Den hydrophoben Regionen wird eine Beteiligung bei der Assoziation von PutA an die Membran zugesprochen. Die zu Serin-Pyruvat Aminotransferasen homologe Region, stellt eine potentielle Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) Hydrolyse Domäne dar, die P5C zu γ -Glutamat-semialdehyd hydrolysiert. Das Leucin-Zipper Motiv ist möglicherweise an der Interaktion von PutA mit der intergenen *put*-Kontrollregion involviert (Ling *et al.*, 1994).

2.2.1 PutB ist eine Prolin Dehydrogenase

Das erste Gen des *putBCP*-Genortes, *putB*, kodiert für ein Protein bestehend aus 303 Aminosäuren und einem daraus abgeleiteten Molekulargewicht von 33.391 Da. Eine Hydrophathie-Analyse nach Kyte & Doolittle (1982) weist PutB-Protein als ein hydrophiles Protein aus. Mit Hilfe des BLAST-Servers (Altschul *et al.*, 1990) am National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurden bei der Suche in den Proteindatenbanken Homologien zu einer Vielzahl von Prolin Dehydrogenasen von Pro- und Eukaryonten gefunden. Damit handelt es sich bei dem PutB-Protein vermutlich um eine Prolin Dehydrogenase. Prolin

Dehydrogenasen katalysieren die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) unter Reduktion von FAD. Zu den bakteriellen Prolin Dehydrogenasen zählt die Prolin Dehydrogenase Domäne der PutA-Proteine unter anderem aus *E. coli* (Wood & Zadworny, 1980), *S. typhimurium* (Menzel & Roth, 1981), *B. japonicum* (Straub *et al.*, 1996), *Agrobacterium tumefaciens* (Cho & Winans, 1996) und *Rhodobacter capsulatus* (Keuntje *et al.*, 1995). Zu den potentiellen Prolin Dehydrogenasen gehört das YusM-Protein aus *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) und das Rv1188-Protein aus *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Zu den eukaryotischen Prolin Dehydrogenasen gehört das PUT1-Protein aus *S. cerevisiae* (Wang & Brandriss, 1986), SlgA aus *Drosophila melanogaster* (Hayward *et al.*, 1993), AtPDH aus *A. thaliana* (Peng *et al.*, 1996) und *Zea Mays* (Rayapati & Stewart, 1991; Elthon & Stewart, 1981).

1	V I T - - - - - R D - F F L F L S K S G S F L N K M A R N W G - S R V A A G K I I G G N D F N S	<i>B. subtilis</i>
1	M A G W F A H T L R P - A M L L A A G R S D R L G R I V E R S P L T R G V V R R F V P G D T L D D	<i>M. tuberculosis</i>
135	T P D - - - - - G T I G R L V K R L G A P A V R T A T R Q A - M R L M G N H F V L G G E T I E Q	<i>B. japonicum</i>
227	S L S - - - - - R S L N R I I G K S G E P L I R K G V D M A - M R L M G E Q F V T G E T I A E	<i>E. coli</i>
227	N L S - - - - - R S L N R I I G K S G E P L I R K G V D M A - M R L M G E Q F V T G E T I A Q	<i>S. typhimurium</i>
41	S I P T I R Q L N S Q G L S V T V D H L G E F V N S A E V A R E R T E E C I Q T I A T I A D Q E	<i>B. subtilis</i>
48	V V D I V T A L R D S G R Y L S I D Y L G E N V T D A D D A A A A V R A Y L G L L D V L G R R G	<i>M. tuberculosis</i>
176	A L E R G K P R S G Q K T R Y S F D M L G E G A R T A A D A R R Y F D A Y A S A I E T I G K A A	<i>B. japonicum</i>
268	A L A N A R K L E E K G F R Y S Y D M L G E A A L T A A D A Q A Y M V S Y Q Q A I H A I G K A S	<i>E. coli</i>
268	A L A N A R K L E E K G F R Y S Y D M L G E A A L T A A D A Q A Y M V S Y Q Q A I H A I G K A S	<i>S. typhimurium</i>
89	L N S - - - - - H V - - - - - S L K M T S L G - - - - - L D I D M D - - - - - L V Y E N M T K I L	<i>B. subtilis</i>
96	D I A C D G V R P L E V - - - - - S L K L S A L G - - - - - Q A L D R D G Q K I A L D N A R A I C	<i>M. tuberculosis</i>
224	G N H - - - - - A L P D R P G I S V K L S A L H P R F E A I S R A - - - - - R V M V E L V P Q L	<i>B. japonicum</i>
316	N G R - - - - - G I Y E G P G I S I K L S A L H P R Y S R A Q Y D - - - - - R V M E E L Y P R L	<i>E. coli</i>
316	N G R - - - - - G I Y E G P G I S I K L S A L H P R Y S R A Q Y D - - - - - R V M E E L Y P R L	<i>S. typhimurium</i>
118	- - - - - Q T A E K H K I M V T I D M E D E V R C Q K T L D I F K D F R K K Y E H V S T - - - - -	<i>B. subtilis</i>
135	- - - - - E R A E R V G A W V T V D A E D H T T T D S T L S I S G D L R V D F P W L G T - - - - -	<i>M. tuberculosis</i>
262	L D L A Q R G K A H D L N F T V D A E E A D R L E L S L D V I A A T L A D - P S L K G W D G F G	<i>B. japonicum</i>
354	K S L T L L A R Q Y D I G I N I D A E E S D R L E I S L D L L E K L C F E - P E L A G W N G I G	<i>E. coli</i>
354	K S L T L L A R Q Y D I G I N I D A E E A D R L E I S L D L L E K L C F E - P E L A G W N G I G	<i>S. typhimurium</i>
157	- V L Q A Y L Y R T E K D I D D L D S L N P F - - - - - L R L V K G A Y - - - - - K E S E	<i>B. subtilis</i>
174	- V V Q A Y L R R T L A D C A E L A A V G A R - - - - - V R L C K G A Y - - - - - D E P A	<i>M. tuberculosis</i>
309	L A I Q A Y Q K R A S A V I D Y V D A L A R A H D R K L M V R L V K G A Y W D T E I K R A Q E R	<i>B. japonicum</i>
401	F V I Q A Y Q K R C P L V I D Y L I D L A T R S R R L M I R L V K G A Y W D S E I K R A Q M D	<i>E. coli</i>
401	F V I Q A Y Q K R C P L V I D Y L V D L A S R S R R L M I R L V K G A Y W D S E I K R A Q M E	<i>S. typhimurium</i>
191	K V A - - - - - F P E K S D V D E N Y K K I I R K Q L L N G H - - - - - Y T A I A T H D D K M I D F T K	<i>B. subtilis</i>
208	S V A - - - - - Y R D A A Q V T D S Y L R C L R V L T A G R G - - - - - Y P M V A T H D P V I I A A V P	<i>M. tuberculosis</i>
357	G L D G Y P V F T R K A M T D L N Y V A C A S K L L A L R P R I F P Q F A T H N A L T V A T V L	<i>B. japonicum</i>
449	G L E G Y P V Y T R K V Y T D V S Y L A C A K K L L A V P N L I Y P Q F A T H N A H T L A A I Y	<i>E. coli</i>
449	G L E G Y P V Y T R K V Y T D V S Y L A C A K K L L A V P N L I Y P Q F A T H N A H T L A A I Y	<i>S. typhimurium</i>
233	Q L A K E H - - - - - G I A N D K F E F Q M L Y G M R S Q - - - - - T Q L S L V K E G Y N M - - - - - R V Y	<i>B. subtilis</i>
250	G I T R E S - - - - - G R S Q G D F E Y Q M L Y G V R D D - - - - - E Q R R L T G A G N H V - - - - - R V Y	<i>M. tuberculosis</i>
405	E M A E G S - - - - - S - - - - - G F E F Q R L H G M G E A L Y E Q L A K D H A D I A Y - - - - - R T Y	<i>B. japonicum</i>
497	Q L A G Q N Y Y P G - - - - - Q Y E F Q C L H G M G E P L Y E Q V T G K V A D G K L N R P C R I Y	<i>E. coli</i>
497	H L A G Q N Y Y P G - - - - - Q Y E F Q C L H G M G E P L Y E Q V T G K V A D G K L N R P C R I Y	<i>S. typhimurium</i>
272	L P Y G E D W Y - - - - - G Y F M R R L A E R P S N I A F A F K G M T	<i>B. subtilis</i>
289	V P F G T R W Y - - - - - G Y F L R R L A E R P A N I A F F L R A L T D R R R R A R G C A E R	<i>M. tuberculosis</i>
442	A P V G S H R D L A Y L V R R L L E N G A N T S F V A Q A A D Y R V P V P A L L Q R - - - - -	<i>B. japonicum</i>
541	A P V G T H E T L A Y L V R R L L E N G A N T S F V N R I A D T S L P L D E L V A D - - - - -	<i>E. coli</i>
541	A P V G T H E T L A Y L V R R L L E N G A N T S F V N R I A D A T L P L D E L V A D - - - - -	<i>S. typhimurium</i>

Abb.20: Vergleich der Aminosäuresequenz von PutB aus *B. subtilis* mit anderen bakteriellen Prolin Dehydrogenasen

Die Aminosäuresequenz des *B. subtilis* PutB-Proteins (Accession-Nummer: D50453) wurde verglichen mit Rv1188 von *M. tuberculosis* (AL010186), PutA-Regionen von *B. japonicum* (X90401), *E. coli* (P09546) und *S. typhimurium* (P10503). Konservierte Aminosäuren, die in dem PutC-Protein, sowie in mindestens einem der anderen Proteine vorkommen sind schwarz unterlegt. Die potentielle P5C Hydrolyse Domäne wurde mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet, das potentielle P5C Bindemotiv wurde eingerahmt (Pos. 42 bis 54, PutB). Bereiche die in Pro- und Eukaryonten stark konserviert sind wurden mit einer durchgezogenen Linie markiert. Das potentielle FAD-Bindemotiv in *E. coli* und *S. typhimurium* (Pos. 317 bis 323) wurde eingerahmt.

Ein Sequenzvergleich zwischen dem PutB-Protein aus *B. subtilis* und anderen prokaryotischen Prolin Dehydrogenasen ist in Abbildung 20 und 21 dargestellt. Die höchste Homologie besteht zu der potentiellen Prolin Dehydrogenase YusM aus *B. subtilis*. Desweiteren bestehen

Homologien zu einer mutmaßlichen Prolin Dehydrogenase aus *M. tuberculosis* (Rv1188) und den Prolin Dehydrogenase Domänen von *B. japonicum* (PutA), *E. coli* (PutA) und *S. typhimurium* (PutA). Die Sequenzidentitäten in dem dargestellten Bereich liegen zwischen 33 % zu der potentiellen Prolin Dehydrogenase Rv1188 aus *M. tuberculosis* und 26 % zu der Prolin Dehydrogenase Domäne von PutA aus *B. japonicum*. Innerhalb der Aminosäuresequenz verschiedener Prolin Dehydrogenasen besitzen die Regionen +LV+GAY (+ entspricht hier K oder R) und YLxRRxxEN eine hohe Identität. Diese Sequenz ist für Bakterien, *S. cerevisiae* und auch für *D. melanogaster* identisch, den in ihnen enthaltenen Aminosäureresten wird eine funktional wichtige Rolle zugesprochen (Straub *et al.*, 1996).

Da in anderen Organismen die Oxidation von Prolin durch eine Prolin Dehydrogenase mit der Reduktion von FAD gekoppelt ist, wurde im PutB-Protein nach konservierten FAD-Bindemotiven gesucht. Durch die Analyse der Kristallstruktur verschiedener Enzyme konnte für die Bindung des ADP-Anteils von FAD oder NAD ein $\beta\alpha\beta$ -Motiv charakterisiert werden (Baker *et al.*, 1992). Eine Glycin-reiche Region in der Nähe des Carboxy-terminus mit der Sequenz GxGxxG wurde als mögliches Coenzym-Bindemotiv beschrieben (Hempel *et al.*, 1993). Obwohl sie kein $\beta\alpha\beta$ -Motiv aufweist wird darüber hinaus auch die Sequenz GxGxxxG als Coenzym-Bindestelle diskutiert (Hempel *et al.*, 1993, Ling *et al.*, 1994). Für *E. coli* konnte eine mögliche FAD-Bindestelle mit der Sequenz GxGxxxG zwischen Position 317 und 323 gefunden werden (Ling *et al.*, 1994). Im PutB-Protein, sowie für *B. japonicum*, *M. tuberculosis*, *D. melanogaster* und *S. cerevisiae* wurde kein FAD-Bindemotiv innerhalb der Prolin Dehydrogenase gefunden. Dies läßt vermuten, dass noch andere bisher nicht identifizierte FAD-Bindemotive existieren.

Ling *et al.* (1994) entdeckte im PutA-Protein aus *E. coli* in der Aminosäureregion 228 bis 358 eine schwache Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der Serin-Pyruvat Aminotransferasen von verschiedenen Organismen, wobei diese Region ungefähr 36 % der durchschnittlichen Länge der Aminotransferasen entspricht. Aminotransferasen katalysieren Schiffsche Base Hydrolysen. Da die Umsetzung von P5C zu γ -Glutamat-semialdehyd (GSA) ebenfalls eine Schiffsche Base Hydrolyse ist, wurde vermutet, dass die Aminosäureregion 228 bis 358 von PutA in der Hydrolyse von P5C zu GSA involviert ist. Darüber hinaus zeigt die Aminosäureregion 269 bis 288 Ähnlichkeiten zu einem konservierten Sequenzmotiv einer Gruppe von P5C-Reduktasen. Diese Region könnte das P5C-Bindemotiv innerhalb der potentiellen P5C-Hydrolase Domäne darstellen. Die Entdeckung dieser möglichen katalytischen Domäne für die Hydrolyse von P5C im PutA-Protein von *E. coli* läßt vermuten, dass das Substrat für die Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase in der offenkettigen Form des GSA und nicht in der zyklisierten Form des P5C besteht (Ling *et al.*, 1994; Abb. 3). Die N-terminale Region von PutB aus *B. subtilis* weist eine 20 %ige Identität zu der potentiellen P5C-Hydrolyse Region von PutA aus *E. coli* auf (Abb. 19, 20). Da GSA vermutlich auch das Substrat für das PutC-Protein aus *B. subtilis* darstellt, wird im Rahmen dieser Arbeit die Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase, PutC, als γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase (GGsALDH) bezeichnet.

Im Rahmen des Genom-Sequenzierprojektes von *B. subtilis* wurde ein offener Leserahmen (*yusM*) identifiziert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine 49 % Identität zu dem PutB-Protein besitzt (Abb. 21) Die hohe Identität läßt vermuten, daß es sich bei YusM um eine weitere Prolin Dehydrogenase handelt.

1	V I T R D F F L F L S K S G F L N K M A R N W G S R V A A G K I I G G N D F N S S I P T I R Q L N S	PutB
1	M L - R H V F L F L S Q N K T L T K F A K A Y G T R L G A R R F V A G D T I E S A V K T V K R L N R	YusM
51	Q G L S V T V D H L G E F V N S A E V A R E R T E E C I Q T I A T I A D Q E L N S H V S L K M T S L	PutB
50	S G L C A T I D Y L G E Y A A S E K E A N Q V A E E C K K A I Q A I A E H Q L N S E L S L K L T S I	YusM
101	G L D I D M D L V Y E N M T K I L Q T A E K H K I M V T I D M E D E V R C Q K T L D I F K D F R K K	PutB
100	G L D L S E E L A L T H L R A I L S V A K Q Y D V A V T I D M E D Y S H Y E Q T L S I Y R Q C K Q E	YusM
151	Y E H V S T V L Q A Y L Y R T E K D I D D L D S L N P F L R L V K G A Y K E S E K V A F P E K S D V	PutB
150	F E K L G T V I Q A Y L Y R A A E D I R K M R D L K P N L R L V K G A Y K E S A A V A F P D K R G T	YusM
201	D E N Y K K I I R K Q L L N G H Y T A I A T H D D K M I D F T K Q L A K E H G I A N D K F E F Q M L	PutB
200	D L H F Q S L I K L Q L L S G N Y T A V A T H D D D I I A F T K Q L V A E H Q I P A S Q F E F Q M L	YusM
251	Y G M R S Q T Q L S L V K E G Y N M R V Y L P Y G E D W Y G Y F M R R L A E R P S N I A F A F K G M	PutB
250	Y G I R P E R Q K E L A K E G Y R M R V Y V P Y G T D W F S Y F M R R I A E R P A N A A F V L K G I	YusM
301	- - T	PutB
300	L K K	YusM

Abb.21: Vergleich der Aminosäuresequenz der *B. subtilis*-Proteine PutB und YusM

Die Aminosäuresequenzen der *B. subtilis* Proteine PutB (Accession-Nummer: D50453) und YusM (BG14025) wurden verglichen. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

2.2.2 PutC ist eine γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase

Das zweite Gen des *putBCP*-Genortes, *putC*, kodiert für ein Protein von 515 Aminosäuren Länge und einem abgeleiteten Molekulargewicht von 56.320 Da. Eine Hydrophathie-Analyse nach Kyte & Doolittle (1982) weist PutC-Protein als ein hydrophiles Protein aus. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz mit der Proteindatenbank wurden hohe Homologien zu Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenasen (P5CDH) von Pro- und Eukaryonten gefunden. Dieses legt nahe, dass es sich bei dem PutC-Protein ebenfalls um eine P5CDH handelt. Innerhalb der Aminosäuresequenz der Aldehyd Dehydrogenasen (ALDH's) von Pro- und Eukaryonten und den P5CDH aus *B. subtilis* (RocA), *S. cerevisiae* (PUT2) und *E. coli* (PutA; P5CDH Domäne) wurden Regionen mit hoher Sequenzhomologie gefunden. Neben der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen potentiellen P5C Hydrolyse Domäne, führte auch ein in allen ALDH's hochkonservierter, potentiell katalytisch aktiver Cystein- und Glutamatrest zu der Zuordnung der P5CDH zu der ALDH Superfamilie (Hempel & Jornvall, 1987; Hempel *et al.*, 1993; Ling *et al.*, 1994; Perozich *et al.*, 1999). Das bedeutet, dass γ -Glutamat-semialdehyd, von dem man annimmt, dass es spontan zu P5C hydrolysiert, das Substrat für die P5CDH Domäne von PutA, und damit aller P5CDH ist (Ling *et al.*, 1994). Die P5CDH-Domänen und die P5CDH repräsentieren eine neue Gruppe von ALDH, die γ -Glutamat-semialdehyd Dehydrogenasen (GGSALDH). Diese Enzyme katalysieren mit Hilfe von NAD^+ die Oxidation von Glutamat-semialdehyd (GSA) zu Glutamat.

Diese ALDH Superfamilie umfaßt 13 Familien, die sich in zwei Untergruppen teilen, den zumeist Substratspezifischen und den Substratvariablen Aldehyd Dehydrogenasen. Die

GGSALDH gehören zu den Substratspezifischen GGSALDH, bestehend aus einem Dimer und mit NAD als Coenzym. In den meisten Organismen wird die Oxidation von GSA durch eine „freie“ GGSALDH katalysiert. Dieser TypI von GGSALDH unterscheidet sich von den TypII GGSALDH, die bisher nur in Bakterien entdeckt wurden und aus einem multifunktionalen Fusionsprotein mit einer Prolin Dehydrogenase- und GGSALDH-Domäne bestehen. Somit gehört das PutA-Protein aus *E. coli* (Ling *et al.*, 1994), *S. typhimurium* (Menzel & Roth, 1981) *B. japonicum* (Straub *et al.*, 1996), *Synechocystis sp.* (Kaneko *et al.*, 1996), *A. tumefaciens* (Cho & Winans, 1996) und *R. capsulatus* (Keuntje *et al.*, 1995) zu dem Typ II von GGSALDH, während PutC und RocA (Gardan *et al.*, 1995) aus *B. subtilis*, sowie Put2 aus *S. cerevisiae* (Krzywicki & Brandriss, 1984) zu den TypI GGSALDH gehören.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz verschiedener GGSALDH (Abb. 22), so besteht die höchste Homologie zu der GGSALDH RocA aus *B. subtilis*. Weitere Homologien existieren zu der GGSALDH Domäne von PutA aus *Synechocystis sp.*, *E. coli*, *S. typhimurium* und *B. japonicum*. Die Sequenzidentität des ProC-Proteins reicht von 68 % zu dem RocA-Protein aus *B. subtilis* bis zu 30 % bei PutA aus *B. japonicum*.

Das PutC-Protein weist innerhalb der Superfamilie von Aldehyd Dehydrogenasen hochkonservierte Bereiche auf. Einem konservierten Bereich mit der Sequenz FxxxGQxC wird eine Beteiligung am katalytischen Reaktionsmechanismus der GGSALDH zugesprochen. Es wird vermutet, dass das Cystein zusammen mit dem Glutamat an Position 286 ein integraler Teil des aktiven Zentrums ist und eine kovalente Bindung mit dem Substrat ausbildet (Straub *et al.*, 1996, Hempel *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 1994). Dieses Sequenzmotiv konnte in PutC und allen anderen aufgeführten GGSALDH nachgewiesen werden. Für die Enzymaktivität der GGSALDH konnte eine Abhängigkeit vom Coenzym NAD⁺ gezeigt werden (Menzel & Roth, 1981). Die genaue Identifizierung der NAD⁺-Bindestelle ist bisher jedoch nicht erfolgt. Neben GxGxxG und GxGxxxG wird hier FTGSTVEVG/A als mögliche Coenzym-Bindestelle diskutiert (Hempel *et al.*, 1993, Ling *et al.*, 1994). Für PutC und andere GGSALDH konnten zwei mögliche NAD⁺-Bindestellen mit den Sequenzmotiven FTGSxEVG/A und GxGxxxG im intergenen Bereich identifiziert werden. Außer PutC wiesen die anderen GGSALDH noch drei mögliche C-terminale GxGxxxG Bindemotive auf.

2.2.3 PutP ist eine Prolin Permease

Die Suche nach Proteinen in der Proteindatenbank, die eine Homologie zu der Aminosäuresequenz des PutP-Proteins aufweisen, ergab eine hohe Sequenzidentität zu spezifischen Prolin Permeasen von Bakterien. Dabei wurde deutlich, dass bis auf PutP aus *B. subtilis*, mit 449 Aminosäuren, alle Prolin Permeasen mit etwa 490 Aminosäuren von gleicher Größe sind. Vergleicht man die Aminosäuresequenz vor dem potentiellen Proteianfang von PutP, so wird eine hohe Homologie zu dem N-terminalen Bereich der anderen Prolin Permeasen offensichtlich. Wenn man darüber hinaus von einer Operonstruktur bei den Genen *putBCP* ausgeht, so ist der Abstand zwischen den Genen *putC* und *putP* mit 196 bp relativ groß. Es ist

wahrscheinlich, dass der im Genomprojekt (Yamane *et al.*, 1996) vorgeschlagene Leserahmen im N-terminalen Bereich erweitert werden muß. Unterstützt wird diese Hypothese durch Arbeiten von Turk und Wright (1997), die für PutP aus *B. subtilis* eine Proteinelänge von 488 Aminosäuren vorgeschlagen. Betrachtet man die DNA-Sequenz in diesem N-terminalen Bereich genau, so fällt auf, dass ein simpler Basenaustausch zwischen zwei benachbart liegenden Basen den Leserahmen für PutP um 120 bp also 40 Aminosäuren erweitert würde (Abb. 23). Um auszuschließen, dass es sich hier um einen Sequenzierfehler handelt, wurde die Region vor dem *putP*-Gen mit Hilfe der Primer SMB27 und SMB19 vom 5'- und 3'-Ende her sequenziert (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich jedoch heraus, dass die aus der Sequenzierung erhaltenen Daten mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen übereinstimmten, so dass ein Sequenzierfehler ausgeschlossen werden konnte. In dieser N-terminalen Region existieren aber im gleichen Leserahmen noch ein ATG-Codon und ein CTG-Codon, die den Leserahmen um 27 bzw. 35 Aminosäuren erweitern würden. Während 78 % der *B. subtilis* Gene ein ATG, 13 % ein TTG und 9 % ein GTG als Startcodon aufweisen wird CTG als weiteres, neues Startcodon diskutiert, das auf experimenteller Ebene jedoch noch nicht bestätigt werden konnte (Kunst *et al.*, 1997). Es erscheint aber unwahrscheinlich, dass einer der beiden Codons als Startcodon der *put*-mRNA dient, da keine ribosomale Bindestelle vor dem ATG-Codon existiert und eine potentielle ribosomale Bindestellen 22 bp von dem CTG-Codon entfernt ist.



Abb.23: Potentielle Startpunkte des *putP*-Leserahmens

Dargestellt ist die N-Terminus des *putP*-Gens mit den potentiellen Startpunkten 1 bis 5 (Grau unterlegt). (1) Startcodon aus Genomprojekt (Yamane *et al.*, 1996), (2) Vermuteter Sequenzierfehler, ATG anstelle von ATA, (3 und 4) potentielle Startcodons (Kunst *et al.*, 1997), (5) Möglicher Startpunkt, des von Turk und Wright (1997) vorgeschlagenen 488 Aminosäuren großen PutP-Permease.

Auf Grund der hohen N-terminalen Homologie, zwischen den Prolin Permeasen und PutP aus *B. subtilis* (Abb. 24), wurde für die weitere Analyse der Aminosäuresequenz die kodierende Region von PutP um 120 bp auf 1467 bp verlängert. Dieser erweiterte Leserahmen kodiert für ein 489 Aminosäuren großes Protein mit einem daraus abgeleitetem Molekulargewicht von 52.543 Da. PutP ist nach Kyte & Doolittle (1982) ein hydrophobes Protein, mit alternierenden hydrophoben und hydrophilen Segmenten.

In Abbildung 24 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen PutP und OpuE (von Blohn *et al.*, 1997) aus *B. subtilis*, sowie den PutP-Proteinen von *Bacillus halodurans* (Takami *et al.*, 1999), *Pseudomonas fluorescens* (Hosoya & Nakamura, 1994), *S. aureus* (Wengender & Miller, 1995; Schwan *et al.*, 1998), *E. coli* (Nakao *et al.*, 1987; Wood, 1988), *Heliobacter pylori*

(Alm *et al.*, 1999), *S. typhimurium* (Wood, 1988) und *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1997) aufgeführt. Die Identität erstreckt über den gesamten Bereich und reicht von 63 % für OpuE aus *B. subtilis* bis zu 53 % für PutP aus *S. typhimurium*.

Die homologen Prolin Permeasen gehören zur Familie der Natrium/Solute Symporter (SSF), die von Reizer *et al.* (1994) definiert wurde. Diese Superfamilie umfaßt pro- und eukaryotische Proteine, die ein spezifisches Substrat im Symport mit Natrium in die Zelle transportieren. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die verschiedenen Proteine der SSF zueinander Homolog sind, dabei haben jedoch die prokaryotischen bzw. die eukaryotischen Proteine untereinander die höchste Homologie. Die in der SSF zusammengefaßten Proteine besitzen zehn hoch konservierte Aminosäuren (Reizer *et al.*, 1994), die auch im PutP-Protein aus *B. subtilis* vorkommen: Arginin (Pos. 41,118), Glycin (64,67,73,158,179,180), Threonin (110) und Isoleucin (132, anstelle von Leucin). Die von Deguchi (1990) beschriebene mögliche Natrium-Bindestelle $GX_nAX_4LX_3GR$ (X steht für jede Aminosäure, X_n ist eine unspezifische Sequenz von 35-45 Resten), ist wie in den meisten SSF Proteinen auch in PutP aus *B. subtilis* konserviert. Für *E. coli* und *S. typhimurium* wurde der Symport von Na^+ (Li^+) -Ionen mit Prolin nachgewiesen (Cairny *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985; Wengender & Miller, 1995).

Neue Untersuchungen von Quick und Jung (1997) zeigen, dass in PutP von *E. coli* ein Aspartat an Position 55 essentiell für die Na^+ -gekoppelte Prolin Aufnahme ist. Während diese Aminosäure in PutP von *B. subtilis* (Position 56) und den anderen prokaryotischen Prolin Permeasen existiert, befindet sich in eukaryotischen SSF Proteinen an dieser Stelle ein Asparagin. In den prokaryotischen SSF Proteinen befindet sich neben dem Aspartat ein Serin, von dem angenommen wird, dass es in oder in unmittelbarer Nähe zur Prolin Bindedomäne lokalisiert ist (Quick *et al.*, 1996). Im PutP-Protein von *B. subtilis* liegt dieser Serinrest an Position 58.

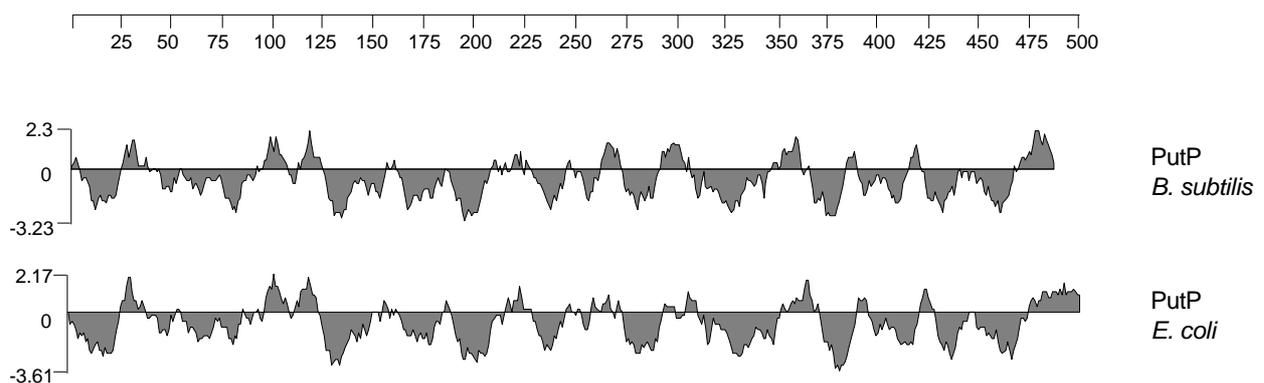


Abb.25: Hydrophathie-Analyse von PutP aus *B. subtilis* und *E. coli*

Darstellung des Kyte-Doolittle-Plots (Fensterbreite 9 Aminosäuren) des PutP-Proteins aus *B. subtilis* und *E. coli*. Positive Werte zeigen hydrophile Aminosäuren und negative Werte hydrophobe Aminosäuren an.

Das PutP Protein von *E. coli* ist ein mittlerweile sehr genau untersuchtes Protein der inneren Membran, das die Translokation von Prolin über die Zellmembran vermittelt (Jung *et al.*, 1998). Mit Hilfe von *phoA*- und *lacZ*-Fusionen konnte die topologische Organisation des Proteins in der Membran charakterisiert werden. Danach besitzt PutP 13 transmembrane Domänen mit einem

periplasmatischen N-terminus und einem cytoplasmatischen C-Terminus. Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, besitzt auch PutP aus *B. subtilis* lange hydrophobe Bereiche, die von kurzen hydrophilen Abschnitten unterbrochen sind.

2.2.4 Konstruktion chromosomaler *putBCP*-Deletionsmutanten in *B. subtilis*

Um die physiologische Bedeutung der Gene *putB*, *putC* und *putP* für den Prolinkatabolismus näher zu charakterisieren, wurden chromosomale Deletionsmutanten in *B. subtilis* hergestellt (Abb. 26). Zur Konstruktion dieser chromosomalen Deletionen wurden auf verschiedenen Plasmiden Teile der Gene deletiert, und durch Insertion von in *B. subtilis* selektierbaren Resistenz-Kassetten unterbrochen. Die linearisierten Plasmide wurden in *B. subtilis* transformiert, wo es durch doppelte Rekombination zu einem Markeraustausch des Resistenzgens, gegen das intakte chromosomale Gen kam. Die so entstandenen Stämme wurden auf ihre entsprechende Resistenz getestet und im Southern-Blot überprüft (Daten nicht gezeigt).

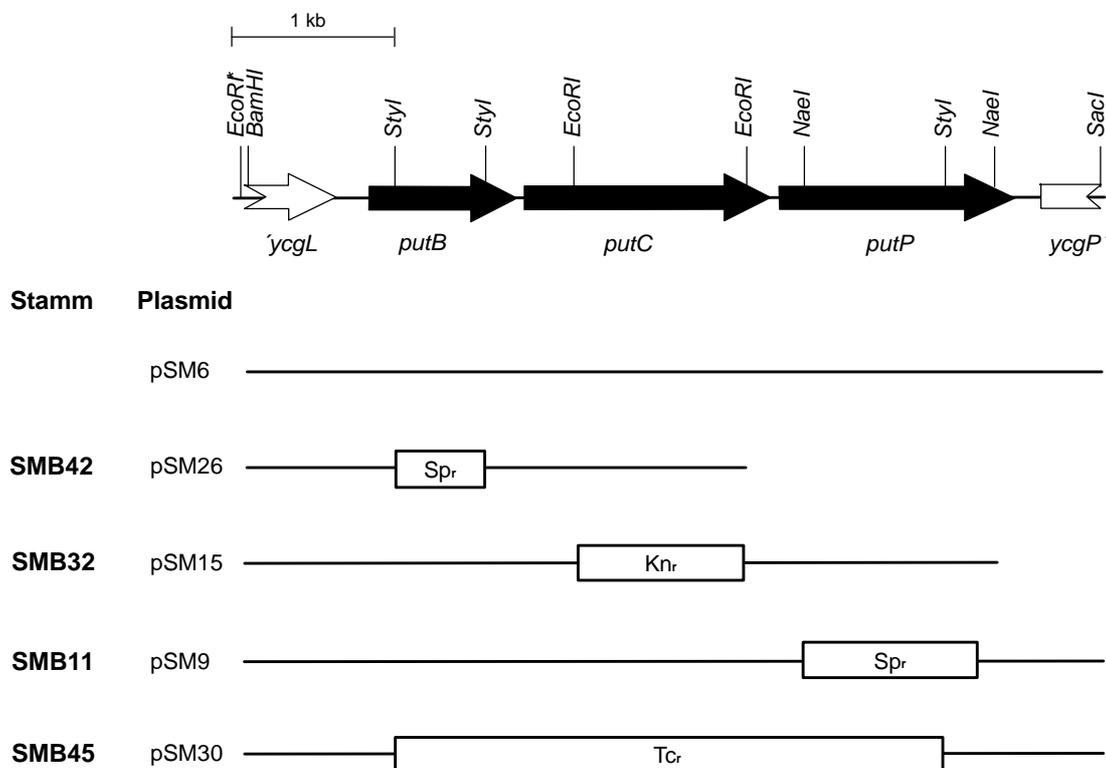


Abb.26: Konstruktion von Deletionsmutanten in *putB*, *putC*, *putP* und *putBCP*

Dargestellt sind die konstruierten Plasmide, mit den Positionen der Resistenz-Kassetten in den verschiedenen Genen, und die daraus abgeleiteten *B. subtilis*-Stämme. Die Darstellung der Resistenz-Kassetten ist nicht maßstabsgetreu. Es wurden nur die Restriktionsschnittstellen aufgeführt, die für die jeweilige Klonierung relevant waren. Die aus dem Vektor stammende Schnittstelle *EcoRI* ist mit einem Stern gekennzeichnet

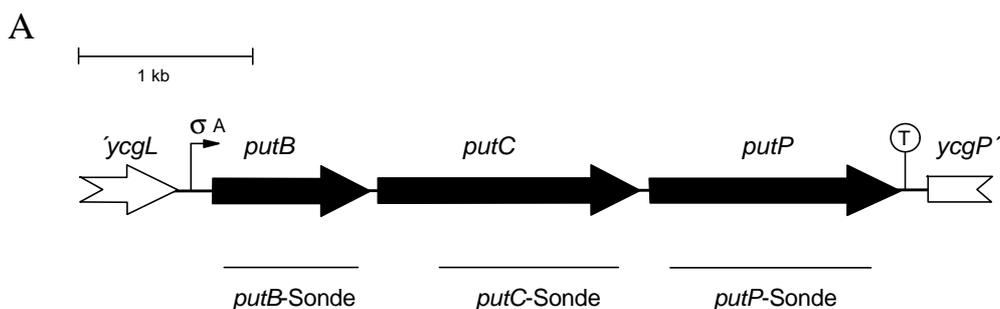
2.2.5 Northern-Blot Analyse der *putBCP*-Gene

Durch einen Northern-Blot sollte die Hypothese überprüft werden, ob die drei Gene *putB*, *putC* und *putP* in einem Operon angeordnet sind und ob die Regulation des Prolinabbaus über die Expression der *putBCP*-Gene erfolgt.

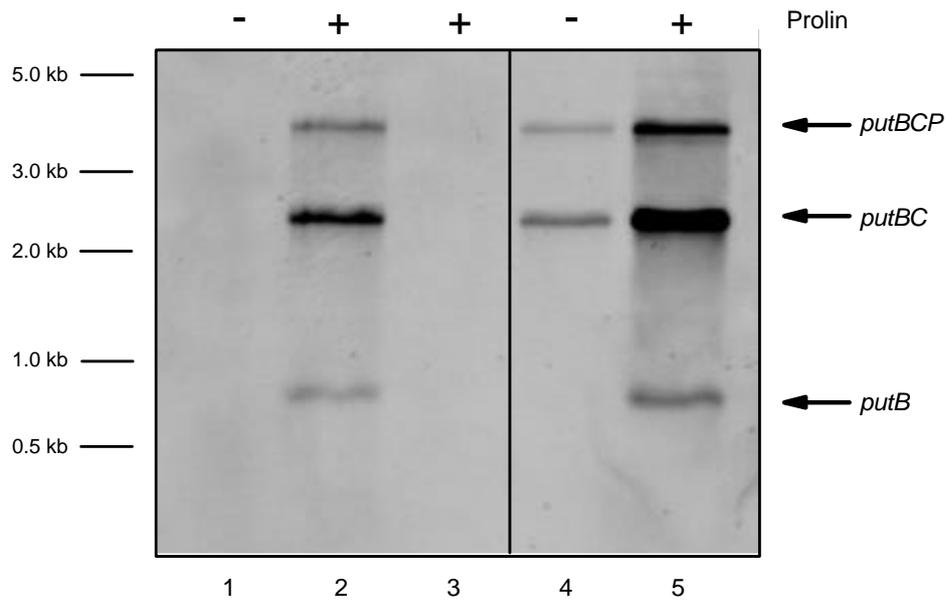
Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte aus den *B. subtilis*-Kulturen JH642 und SMB45 (*putBCP::tet*), die in uninduzierten und induzierten (1 mM Prolin) SMM und SMM mit erhöhter Osmolarität (0.6 M NaCl) bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert wurden. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einzelsträngigen RNA-Sonden gegen *putB*, *putC* und *putP* (Abb. 27A).

Wie in Abbildung 27B dargestellt, detektierte die *putB*-Sonde in der Gesamt-RNA von mit Prolin induzierten JH642-Kulturen drei Transkripte, die in uninduzierten Zellen nicht nachweisbar sind. Dass es sich hier um spezifische Transkripte der *putBCP*-Gene handelt wird dadurch gezeigt, dass sie in der Gesamt-RNA des *PutBCP*-defizienten Stammes SMB45 nicht detektiert werden können. Das größte Transkript entspricht der Länge einer polycistronischen mRNA eines *putBCP*-Operons mit 4020 bp. Neben diesem großen Transkript ist ein wesentlich stärkeres Signal von einem 2.4 kb und ein schwaches Signal eines 900 bp großen Transkriptes zu beobachten. Wie in Abbildung 27C gezeigt, handelt es sich bei den kleineren Transkripten um Abbauprodukte der 4 kb großen polycistronischen mRNA. Durch Hybridisierung mit für *putC* und *putP* spezifischen Sonden konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Transkript der *putBC*-mRNA mit 2475 bp und ein Transkript der *putB*-mRNA mit 909 bp handelt. Neben diesen drei Transkripten kann durch die Hybridisierung mit einer *putP*-spezifischen Sonde, ein weiteres Transkript beobachtet werden, dass mit 1467 bp der mRNA von *putP* entspricht (Abb. 27C).

Da Prolin als osmoprotektive Substanz von *B. subtilis* genutzt wird ist anzunehmen, dass unter erhöhter Osmolarität die Expression der Prolin-abbauenden Gene reduziert wird. Zur Untersuchung der Expression des *putBCP*-Operons unter erhöhter Osmolarität, wurde die RNA aus Zellen präpariert, die in SMM mit 0.6 M NaCl inkubiert wurden. Wie aus Abbildung 27B ersichtlich, erfolgt erstaunlicherweise bei erhöhter Osmolarität, auch ohne die exogene Zugabe von Prolin, eine Induktion der *putBCP*-Transkription, die durch die Zugabe von Prolin noch weiter gesteigert werden kann.



B



C

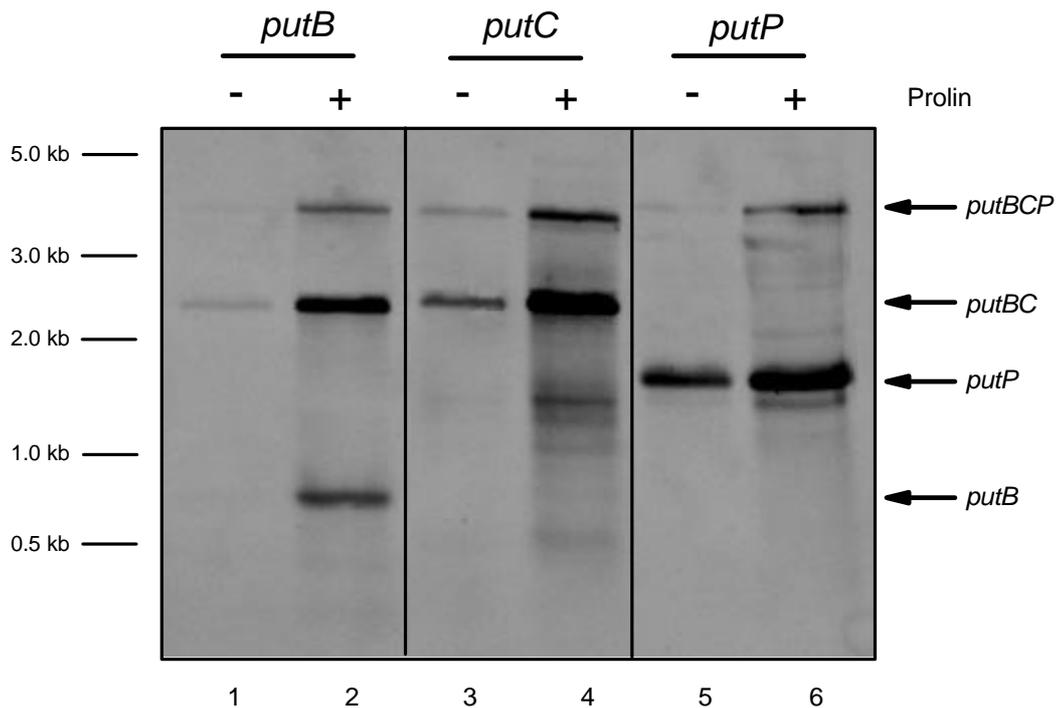


Abb.27: Northern-Blot Analyse der *putBCP*-Gene

(A) Schematische Darstellung der genetischen Organisation des *putBCP*-Genortes in dem *B. subtilis*-Stamm JH642. Markiert ist potentielle Position des σ^A -abhängigen Promotors und des Transkriptionsterminators (T). Die Positionen der zur Hybridisierung verwendeten Sonden sind durch Balken angegeben. (B) Dargestellt ist ein Northern-Blot mit einer *putB*-Sonde. Die Gesamt-RNA wurde aus den *B. subtilis* Kulturen JH642 (Spur 1, 2, 4, 5) und SMB45 [$\Delta(\textit{putBCP}::\textit{tet})2$] (Spur 3) isoliert, die in uninduzierten (-) und mit 1 mM Prolin induzierten (+) SMM (Spur 1 bis 3) und SMM mit erhöhter Osmolarität (0.6 M NaCl) (Spur 4 und 5) bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert wurden. (C) Dargestellt sind Northern-Blots mit den Sonden *putB* (Spur 1 und 2), *putC* (Spur 3 und 4) und *putP* (Spur 5 und 6). Die Kulturen des *B. subtilis* Stammes JH642 wurden in uninduzierten (-) und mit 1 mM Prolin (+) induzierten SMM mit 0.6 M NaCl kultiviert.

Zur Bestimmung der Expressionsraten wurden die Transkriptmengen, durch Quantifizierung der Banden mit Hilfe des ImageQuant-Programms des Phosphorimagers, bestimmt. Vergleicht man in Abbildung 27B die Expression des *putBCP*-Operons in uninduzierten und in mit Prolin induzierten SMM-Kulturen, so ist eine 30-fache Steigerung der Transkription zu erkennen (Spur 1 und 2). Zur Quantifizierung wurde das 2.4 kb große Transkript, mit dem Hintergrund verglichen, da in den uninduzierten Zellen kein Transkript nachweisbar war.

Bei erhöhter Osmolarität erfolgt dagegen bei Zugabe von Prolin nur noch eine 8-fache Steigerung der Expression (Spur 4 und 5). Das bedeutet, dass die Regulation des Prolinkatabolismus auf Transkriptionsebene erfolgt. Die exogene Zugabe von Prolin führt zu einer starken Induktion der *putBCP*-Transkription, während das unter erhöhter Osmolarität synthetisierte intrazelluläre Prolin zu einer wesentlich schwächeren Induktion führt. Es ist davon auszugehen, dass nur exogenes Prolin induzierend wirkt, da die in SMM mit 0.6 M NaCl synthetisierten hohen Prolinkonzentrationen sonst zu einer vollständigen Induktion führen müßten, die aber erst durch die exogene Zugabe von nur 1 mM Prolin erreicht wird. Der erhöhte Transkriptionslevel in uninduzierten Kulturen, die unter erhöhter Osmolarität inkubiert wurden, ist demnach auf exkretiertes und wieder recyceltes Prolin zurückzuführen.

2.2.6 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *putBCP*-Operons

Um den Transkriptionsstartpunkt und den Promotor des *putBCP*-Operons zu bestimmen wurde ein Primer Extension-Experiment durchgeführt. Zur Erhöhung des mRNA-Levels der *putBCP*-Regulatorregion, wurde das Plasmid pSM13 in *B. subtilis* JH642 transformiert und die Gesamt-RNA aus uninduzierten (SMM) und induzierten (SMM + 1 mM Prolin) exponentiell wachsenden Zellen präpariert. Die RNA wurde mit dem zum 5'-Endes des *putB*-Gens komplementären Oligonucleotid SM28 hybridisiert und mit Reverser-Transkriptase transkribiert. Die Reaktionsprodukte wurden neben einer Sequenzreaktion, mit demselben Primer als Größenstandard, elektrophoretisch aufgetrennt. Wie aus der Abbildung 28 ersichtlich, konnte bei der induzierten Probe ein deutliches Transkript nachgewiesen werden, wobei der Startpunkt der Transkription auf einem Adenin liegt. Die Analyse der DNA-Sequenz im 5'-Bereich des *putB*-Gens ergab einen möglichen Promotor, dessen -35 und -10 Region jeweils Homologien von 67 % bzw. 83 % zu den entsprechenden Konsensussequenzen für σ^A -abhängige Promotoren zeigen (Haldenwang, 1995). Der Abstand zwischen der -35- und der -10-Region beträgt 18 bp und entspricht somit dem Standard. Eine weitere Bande stellt ein etwas kürzeres Transkript dar, der potentielle Startpunkt liegt hier auf einem Thymin. Da die zugehörige Promotorregion nur eine geringfügige Homologie zu σ^A -abhängigen Promotoren aufweist, und die Ribosomenbindestelle hinter dem Startpunkt liegt, ist auszugehen, dass es sich bei dieser Bande um ein Abbauprodukt handelt.

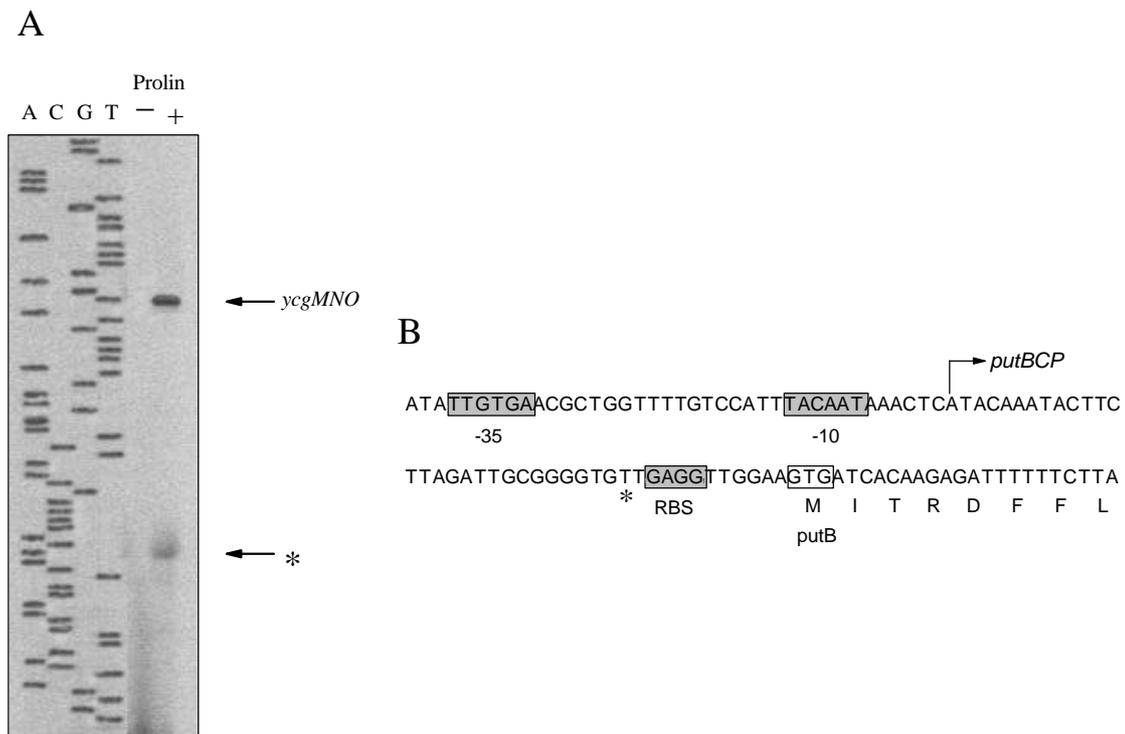


Abb.28: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der *putBCP*-mRNA

(A) Primer Extension Reaktion. Neben der Sequenzreaktion wurde erst die uninduzierte Probe und daneben die mit 1 mM Prolin induzierte Probe aufgetragen. Die Pfeile geben den Startpunkt der *ycgMNO*-mRNA an, sowie dem dazugehörigen Abbauprodukt (*). (B) DNA-Sequenz der *putBCP*-Promotorregion. Die mögliche -35- und -10-Region, sowie die Ribosomenbindestelle (RBS) ist markiert, der Transkriptionsstartpunkt der *putBCP*-mRNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

2.3 Physiologische Charakterisierung der Prolin katabolisierenden Enzyme PutB und PutC, sowie der Prolin Permease PutP

2.3.1 Physiologische Charakterisierung der *putBCP*- und *rocA*-Mutanten

Um die physiologische Bedeutung der *putBCP*-Gene zu analysieren, wurde die Fähigkeit der chromosomalen *putBCP*-Mutanten auf Prolin als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zu wachsen untersucht. Dafür wurde das Wachstum der Mutanten in SMM mit Glucose als C-Quelle und NH_4 als N-Quelle verglichen mit dem Wachstum von Kulturen, die nur Prolin als C-Quelle und NH_4 als N-Quelle, oder aber Glucose als C-Quelle und Prolin als einzige N-Quelle zur Verfügung haben. Wie schon gezeigt existiert in *B. subtilis* neben PutC eine weitere mögliche γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase, RocA. Zur besseren phänotypischen Charakterisierung der *putBCP*-Gene wurden Doppelmutanten der *putBCP*-Gene und dem *rocA*-Gen, durch Transformation von chromosomaler DNA von QB521 in die *putBCP*-Mutanten hergestellt.

Der Wachstumsversuch mit Prolin als C-Quelle führt zu folgendem Ergebnis (Tab. 7): Die *B. subtilis*-Stämme mit Deletionen in einem der Gene des *putBCP*-Operons waren nicht in der Lage mit Prolin als C-Quelle zu wachsen, während der Stamm JH642 und die *rocA*-Mutante auf Prolin oder Glucose als C-Quelle gleich gut wächst. Testet man das Wachstum mit Prolin als N-

Quelle, so findet man bei den Mutationen im *rocA*-, *putC*- oder *putP*-Gen keinen Wachstumsnachteil, nur für die *putB*- bzw. die *putBCP*-Mutante ist ein Wachstum unter diesen Bedingungen nicht mehr möglich. Es zeigt sich auch, dass eine Doppelmutante von *putC* und *rocA* mit Prolin als N-Quelle nicht mehr wachsen kann, während die jeweiligen Einzelmutanten kein Wachstumsdefizit aufweisen.

Tab.7: Wachstum auf Prolin als C- oder N-Quelle

Stamm	Relevanter Genotyp	SMM mit Glucose	Prolin als C-Quelle	Prolin als N-Quelle
JH642	Wildtyp	+	+	+
SMB45	$\Delta(\textit{putBCP}::\textit{tet})2$	+	-	-
SMB52	$\Delta(\textit{putBCP}::\textit{tet})2, \Delta(\textit{rocA}::\textit{cam})1$	+	-	-
SMB42	$\Delta(\textit{putB}::\textit{spc})3$	+	-	-
SMB51	$\Delta(\textit{putB}::\textit{spc})3, \Delta(\textit{rocA}::\textit{cam})1$	+	-	-
SMB32	$\Delta(\textit{putC}::\textit{neo})2$	+	-	+
SMB37	$\Delta(\textit{putC}::\textit{neo})2, \Delta(\textit{rocA}::\textit{cam})1$	+	-	-
SMB11	$\Delta(\textit{putP}::\textit{spc})1$	+	-	+
SMB41	$\Delta(\textit{putP}::\textit{spc})1, \Delta(\textit{rocA}::\textit{cam})1$	+	-	+
SMB18	$\Delta(\textit{rocA}::\textit{cam})1$	+	+	+

Das Wachstum der Stämme in SMM mit Prolin als C- oder N-Quelle wurde nach 16 h Inkubation bestimmt. (+ Wachstum, $OD_{578} > 1.5$; - Kein Wachstum, $OD_{578} < 0.3$).

Damit bestätigt sich die Hypothese, dass RocA und PutC für die γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase in *B. subtilis* kodieren und sich unter bestimmten Umständen gegenseitig komplementieren können. Es konnte weiter gezeigt werden, dass PutB für die einzige Prolin Dehydrogenase in *B. subtilis* kodiert, da sie keinerlei Wachstum auf Prolin als N-Quelle zeigt.

2.3.2 Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase PutB

In *B. subtilis* wurde durch Atkinson *et al.* (1990) eine spezifische Prolin Dehydrogenase Aktivität nachgewiesen, welche die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) katalysiert. Um die Hypothese zu unterstützen, dass es sich bei dem Genprodukt von *putB* um diese Prolin Dehydrogenase handelt, wurde ein Enzymtest durchgeführt. Dafür wurden Zellen des *B. subtilis*-Stammes JH642, sowie die Deletionsmutanten SMB32 (*putC*), SMB42 (*putB*), SMB11 (*putP*) und SMB45 (*putBCP*) in SMM angezogen und bei einer OD_{578} von 0.4, zur Steigerung der *putB*-Expression mit 1 mM Prolin induziert. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase, wurde die Umsetzung von Prolin zu P5C in einem kolorimetrischen Test, durch die Bildung des Chromophors P5C/*o*-Aminobenzaldehyd bestimmt. Die Bildung des Chromophors konnte durch die Zugabe von 10 mM NAD^+ zu dem Reaktionsansatz, um das 1.8-

fache gesteigert werden. Wurde der Zellextrakt zuvor durch eine Säule (Sephadex[®] G-25M, Pharmacia Biotech) gereinigt, die NAD⁺ von Proteinen trennt, so zeigte dieser Zellextrakt nur noch ein Drittel der Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt). Damit wird deutlich, dass NAD⁺ direkt, oder indirekt als Reduktionsmittel für FADH₂, für die Umsetzung von Prolin zu P5C, als Oxidationsmittel essentiell ist.

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, handelt es sich bei dem *putB*-Genprodukt um eine Prolin Dehydrogenase, dessen Aktivität in SMM, durch die Zugabe von 1 mM Prolin von 0,4 auf 5,5 U/mg Protein gesteigert werden kann, was einer Induktionsrate von 13,8 entspricht. Im Gegensatz dazu wird in dem *putB*- und *putBCP*-Deletionsstamm keine Erhöhung der Enzymaktivität durch Induktion mit Prolin erreicht. P5C wird im Wildtyp zu Glutamat-semialdehyd (GSA) hydrolysiert. Eine Deletion in dem *putC*-Gen, dessen Genprodukt die Umsetzung von GSA zu Glutamat katalysiert, führt zu einer Zunahme der Enzymaktivität von 1,3 auf 19 U/mg Protein, was einer Induktionsrate von 14,6 entspricht. Die im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Enzymaktivität in der *putC*-Mutante, ist ein Beweis dafür, dass es sich bei PutC tatsächlich um die γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase (GGSALDH) handelt. Die Deletion im *putC*-Gen führt durch den fehlenden Abbau von GSA zu einer Erhöhung der GSA Konzentration in der Zelle, welches als Induktor für die Transkription der *putBCP*-Gene wirken könnte. Der Stamm SMB11, mit einer Deletion im *putP*-Gen, zeigt mit 4 U/mg Protein eine etwas geringere Aktivität als der Wildtyp, was wahrscheinlich mit dem fehlenden Transport durch die PutP-Permease zusammenhängt.

Tab.8: Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase PutB

Stamm	Relevanter Genotyp	Medium	Prolin Dehydrogenase Aktivität (U/mg Protein) ^a		Induktionsrate ^c
			- Prolin	+ Prolin ^b	
JH642	Wildtyp	SMM	0,4	5,5	13,8
JH642	Wildtyp	SMM + 0.6 M NaCl	0,7	6,0	8,6
JH642	Wildtyp	SMM + 0.9 M NaCl	0,7	7,6	10,9
SMB42	$\Delta(\textit{putB}::\textit{spc})3$	SMM	0,4	0,6	1,4
SMB32	$\Delta(\textit{putC}::\textit{neo})2$	SMM	1,3	19,0	14,6
SMB11	$\Delta(\textit{putP}::\textit{spc})1$	SMM	0,5	4,0	8,3
SMB45	$\Delta(\textit{putBCP}::\textit{tet})2$	SMM	0,4	0,3	

^a U = 1 nmol *o*-Aminobenzaldehyd/min; ^b 1 mM Prolin; ^c Induzierte Aktivität geteilt durch uninduzierte Aktivität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem *putB*-Genprodukt um eine Prolin Dehydrogenase handelt, wurde in einem weiteren Ansatz untersucht, ob die PutB-Enzymaktivität von der Osmolarität des Mediums abhängig ist. Da Prolin, als osmoprotektive Substanz, unter hochosmolaren Bedingungen in molaren Konzentrationen synthetisiert wird, stellt sich die Frage, ob und wie die Zelle eine gleichzeitige Synthese und Abbau von Prolin vermeidet. Zur näheren

Untersuchung der Regulation der Prolin Dehydrogenase wurden dafür Kulturen des *B. subtilis* Stammes JH642 in SMM mit 0.6 M NaCl und 0.9 M NaCl inkubiert.

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, ist der Abbau von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen nicht auf enzymatischer Seite reguliert. Induziert man die unter hochosmolaren Bedingungen wachsenden Zellen mit 1 mM Prolin, so erfolgt eine Zunahme der Enzymaktivität auf 6 bzw. 7.6 U/mg Protein, gegenüber 5.5 U/mg Protein in der SMM-Kultur. Dagegen ist in uninduzierten, hochosmolaren Medien die Enzymaktivität um das 1.8-fache gegenüber der Aktivität der SMM-Kulturen gesteigert. Erstaunlich ist, dass unter hochosmolaren Bedingungen, die Induktion durch die Zugabe von nur 1 mM Prolin zu einer etwa 10-fachen Steigerung der Enzymaktivität führt. Demgegenüber haben die in uninduzierten, hochosmolaren Kulturen vorhandenen hohen Prolinkonzentrationen, nur eine geringfügige Steigerung der Enzymaktivität zur Folge. Damit wird deutlich, dass eine Steigerung der Enzymaktivität nur durch externes Prolin erfolgt, während intrazelluläres Prolin keine induzierende Wirkung aufweist.

2.3.3 PutP ist für den Transport von Prolin als C-Quelle essentiell

Zur physiologischen Charakterisierung der Prolin Permeasen PutP und OpuE wurde das Wachstum des Wildtyp-Stammes JH642 mit den Stämmen SMB11 (*putP*), BLOB9 (*opuE*) und SMB12 (*putP*, *opuE*) in SMM mit Prolin als C-Quelle verglichen. Dafür wurden 80 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben, mit einer Vorkultur des entsprechenden Stammes, auf eine OD₅₇₈ von 0.1 inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die Bestimmung der OD₅₇₈ erfolgte jede Stunde.

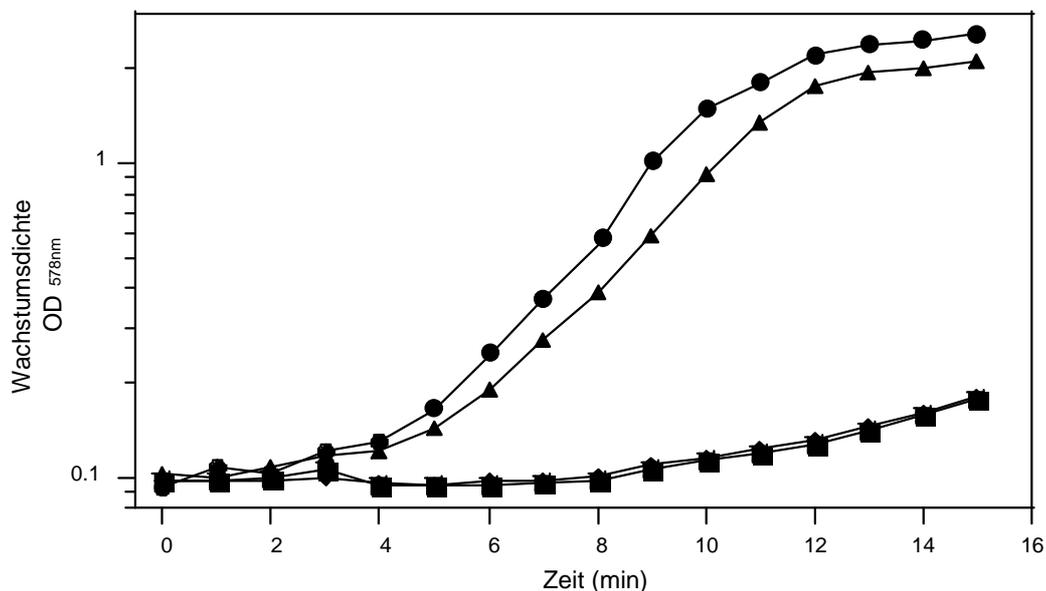


Abb.29: Wachstumphänotyp der *putP*-Mutante SMB11

Die Stämme JH642 (●), SMB11 (*putP*, *opuE*⁺, ■), SMB12 (*putP*, *opuE*, *) und BLOB9 (*putP*⁺, *opuE*, ▲) wurden in Ansätzen von 80 ml SMM mit 0.6 % Prolin bei 37°C im Wasserbad inkubiert und das Wachstum durch Messung der OD₅₇₈ verfolgt.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, zeigt die *opuE*-Mutante BLOB9, mit Prolin als C-Quelle, fast die gleiche Wachstumsrate wie der Wildtyp JH642. Dagegen führt eine Deletion des *putP*-Gens in SMB11 und in der *putP/opuE*-Doppelmutante SMB12 zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Wachstums. Dieses Experiment zeigt deutlich die essentielle Bedeutung von PutP für den Transport von Prolin für anabole Zwecke, die Prolin Permease OpuE spielt hier nur eine untergeordnete Rolle.

2.3.4 Bestimmung der kinetischen Parameter des Prolintransportes durch PutP und OpuE

Obwohl die beiden Prolin Permeasen PutP und OpuE mit 63 % eine hohe Identität aufweisen unterscheiden sie sich in ihrem Aktivitätsprofil. Zur genaueren Analyse ihrer speziellen Funktion in *B. subtilis*, wurde die Transportrate (V_{\max}) und die Affinität (K_m), für die Aufnahme von L- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -Prolin bestimmt. Untersucht wurden die kinetischen Parameter in den Stämmen BLOB9 (*opuE*), SMB11 (*putP*), die jeweils nur noch ein Transportsystem besitzen und SMB12 (*putP, opuE*), in dem beide Transportsysteme deletiert sind. Die Aufnahmerate wurde bei Prolinkonzentrationen von 1 μM bis 40 μM an Kulturen gemessen, die in SMM und SMM mit 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 M NaCl gezogen wurden. Um eine maximale Stimulierung der PutP-Transportaktivität zu erreichen wurden Kulturen mit 1 mM Prolin induziert und vor der Verwendung im Transporttest mit Prolin-freiem Medium gewaschen. Die Michaeliskonstanten (K_m) und die maximalen Transportraten (V_{\max}) sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab.9: Kinetische Parameter der Prolin Permeasen PutP und OpuE

Stamm	Relevanter Genotyp	Medium ^a	K _m (μM)	V _{max} (nmol/min×mg)
BLOB9	Δ (<i>opuE::tet</i>)1	SMM	8 ± 2	29 ± 2
		SMM + 1 mM Prolin	8 ± 2	158 ± 5
		SMM + 0,4 M NaCl	6 ± 1	28 ± 2
		SMM + 0,4 M NaCl + 1 mM Prolin	8 ± 2	68 ± 1
		SMM + 0,6 M NaCl + 1 mM Prolin	11 ± 1	22 ± 2
SMB11	Δ (<i>putP::spc</i>)1	SMM	12 ± 1	27 ± 3
		SMM + 1 mM Prolin	12 ± 4	19 ± 3
		SMM + 0,4 M NaCl	12 ± 1	104 ± 14
		SMM + 0,6 M NaCl	23 ± 3	252 ± 10
		SMM + 0,8 M NaCl	22 ± 6	227 ± 6
SMB12	Δ (<i>putP::spc</i>)1 Δ (<i>opuE::tet</i>)1	SMM	Kein Transport	
		SMM + 0,4 M NaCl	Kein Transport	

^a Kulturen mit 1 mM Prolin im Wachstumsmedium wurden vor der Verwendung im Transporttest mit Prolin-freiem Medium gleicher Osmolarität gewaschen.

Beide Transportsysteme zeigen mit K_m -Werte im mikromolaren Bereich eine hohe Affinität zu Prolin, die sich auch durch eine Erhöhung der Osmolarität nicht ändert. Die maximale Transportrate (V_{max}) ist dagegen abhängig von der Verfügbarkeit von exogenem Prolin und von der Osmolarität des Wachstumsmediums. Im Stamm BLOB9, welcher nur das PutP-Transportsystem besitzt ist die Transportrate in erster Linie vom Vorhandensein von Prolin im Wachstumsmedium abhängig. Ohne Zugabe von exogenem Prolin findet nur ein sehr geringer Transport von radioaktiv markiertem Prolin statt. Die maximale Transportrate von 158 nmol/mg Protein min wird in SMM mit 1 mM Prolin ohne Zugabe von NaCl erreicht, sie nimmt bei Erhöhung der Osmolarität auf 0.6 M NaCl auf 22 nmol/mg Protein ab. Damit konnte gezeigt werden, dass die Prolin Permease PutP durch externes Prolin induziert und durch höhere Osmolarität reprimiert wird. Im Gegensatz dazu nimmt im Stamm SMB11, mit der osmotisch induzierbaren Prolin Permease OpuE, die Transportrate mit steigender Osmolarität zu und erreicht ihr Maximum von 252 nmol/mg Protein, bei einer Osmolarität von 0.6 M NaCl. Eine Erhöhung der Osmolarität auf 0.8 M NaCl führt zu etwas geringeren Transportraten. In Minimalmedium ist nur ein geringer Prolintransport über das OpuE-System nachzuweisen, auch läßt sich dieser nicht durch Zugabe von Prolin im Wachstumsmedium steigern. In der Doppelmutante SMB12, die weder das PutP noch das OpuE-Transportsystem besitzt ist kein Prolintransport nachweisbar, andere Prolin-Transportsysteme wie z.B. RocR sind somit für die weiteren physiologischen Untersuchungen zu vernachlässigen.

2.3.5 Transport toxischer Prolinanaloga durch PutP und OpuE

Die unterschiedliche Funktion der Prolin-Transportsysteme PutP und OpuE wurde hier durch einen Test mit den toxischen Prolinalanaloga 3,4 Dehydro-DL-prolin und L-Azetidin-2-carbonsäure weiter untersucht. Beide Substanzen besitzen eine zum Prolin analoge Struktur, die von vielen Prolin-Transportsystemen als Substrat erkannt und transportiert wird (Csonka, 1982; Grothe *et al.*, 1986). Die toxische Wirkung der Prolinanaloga entsteht dadurch, dass sie anstelle von Prolin in Proteine eingebaut werden, wodurch es zu fehlerhaften Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine kommt (Leisinger, 1996).

Zur Durchführung des Versuchs wurden die Stämme JH642, BLOB9 (*opuE*), SMB11 (*putP*) und SMB12 (*putP*, *opuE*) bis zur mittleren exponentiellen Phase in SMM und SMM mit 0.4 M NaCl inkubiert. Anschließend wurde 300 µl dieser Kulturen auf SMM-Minimalagarplatten entsprechender Osmolarität (SMM und SMM mit 0.4 M NaCl) ausgestrichen. In das Zentrum dieser Platten wurde ein Filterpapier aufgelegt, auf das eine definierte Menge der entsprechenden toxischen Prolinanaloga aufgebracht wurde. Die Agarplatten wurden danach bei 37°C inkubiert, bis die *B. subtilis*-Kulturen zu einem Bakterienrasen herangewachsen waren. Ein um das Filterpapier aufgetretener Hemmhof war das Maß für den Transport durch die in den Stämmen vorhandenen Prolin-Transportsysteme.

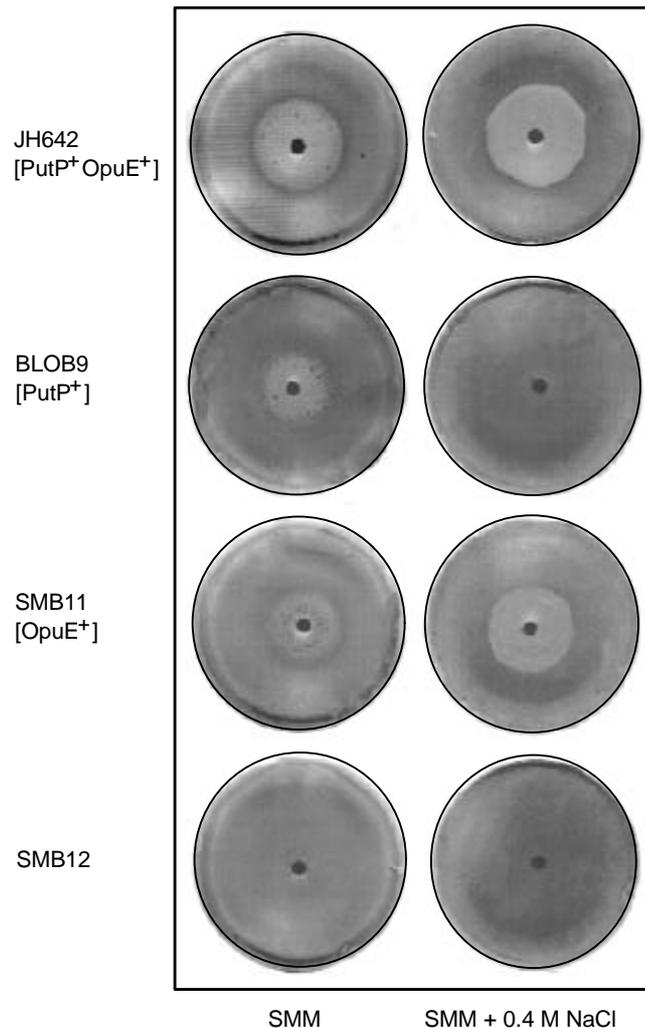


Abb.30: Sensitivität der *putP*- und *opuE*-Deletionstämmen gegen toxische Prolinanaloga

Dargestellt ist die Wirkung der toxischen Prolinanalogs L-Azetidin-2-carbonsäure (AC). Die Hemmhofgröße entspricht der durch den Transport durch die Prolin-Transportsysteme PutP und OpuE verursachte Sensitivität gegenüber AC. Die *B. subtilis* Kulturen JH642, BLOB9 (*opuE*), SMB11 (*putP*) und SMB12 (*putP*, *opuE*) wurden in SMM und SMM mit 0.4 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Phase inkubiert, und 300 μ l dieser Kulturen auf SMM-Agarplatten mit und ohne 0.4 M NaCl plattiert. In die Mitte der Platten wurde ein Filterpapier mit 10 μ l AC (25 mg/ml) aufgebracht und die Platten bei 37°C inkubiert.

Für das toxische Prolinanalogen L-Azetidin-2-carbonsäure zeigt sich in Medien niedriger Osmolarität eine hohe PutP-Transportaktivität und damit ein kleiner Hemmhof in der *putP*-Mutante SMB11 (Abb. 30). Der Hemmhof der *opuE*-Mutante BLOB9 ist dagegen wesentlich größer als in SMB11, jedoch kleiner als im Wildtyp JH642. Das unter niedrigen Osmolaritäten ein geringer Transport durch OpuE stattfindet wird in der *putP/opuE*-Doppelmutante SMB12 deutlich, der Transport ist hier nochmals geringer als in der *putP*-Einzelmutante SMB11. In Medium hoher Osmolarität erfolgt der Transport hauptsächlich durch OpuE, so dass in der *opuE*-Mutante BLOB9 nur noch ein kleiner Hemmhof zu erkennen ist. Der Transport durch PutP ist hier wesentlich geringer als unter niedrigen Osmolaritäten. Das toxische Prolinanalogen 3,4 Dehydro-DL-prolin wird nicht durch PutP transportiert (Daten nicht gezeigt), was sich in einem zum Wildtyp gleich großen Hemmhof zeigt. Im Stamm BLOB9 zeigt sich dagegen unter

hoher Osmolarität ein Transport durch einen verkleinerten Hemmhof. Die Funktion des PutP-Transportsystems besteht demnach in dem Transport von Prolin unter geringen Osmolaritäten, während OpuE erst bei höheren Osmolaritäten seine volle Aktivität aufweist.

2.4 Regulation der Expression des *putBCP*-Operons

2.4.1 Konstruktion der *putB-treA* Fusionen

Um die Regulation des Prolinkatabolismus auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden Operonfusionen mit dem Reporter gen *treA* konstruiert. Dabei sollte untersucht werden, ob die Expression des *putBCP*-Operons durch verschiedene Aminosäuren induziert werden kann, und ob diese Induktion von der Osmolarität der Umgebung beeinflusst wird.

Das *putB*-Gen ist das erste Gen im *putBCP*-Operon. Da sich vor diesem Gen der Promotor für das gesamte Operon befindet, wurden Operonfusionen mit verschiedenen 5'-Bereichen des *putB*-Gens und dem promotorlosen *treA*-Gen in dem Plasmid pJMB1 konstruiert. Das *treA*-Gen kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glucosidase aus *B. subtilis*, dessen Aktivität durch die Umsetzung des Substratanalogons para-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid (PNPG) kolorimetrisch gemessen werden kann. Die Operonfusionen, auf den konstruierten Plasmiden pSM8, pSM20 und pSM21, wurde mittels doppelter Rekombination (Abbildung 31) in das *amyE*-Gen des *B. subtilis* Stammes MBB1 (*treA*) integriert.

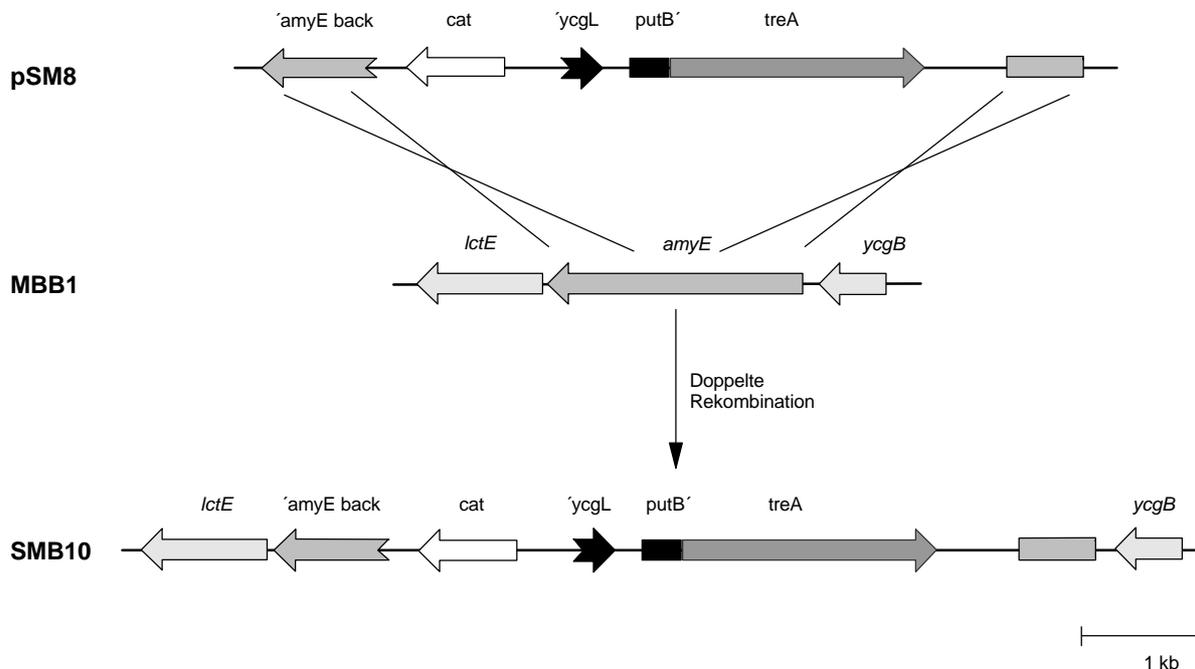


Abb.31: Integration der *putB-treA* Operonfusion in das Genom von *B. subtilis*

Durch doppelte homologe Rekombination des linearisierten Plasmids pSM8, mit dem *amyE*-Gen auf dem Chromosom von MBB1, wird die Operonfusion in den *B. subtilis*-Stamm integriert. „*amyE*“-front und „*amyE*“-back stellen die 5'- bzw. 3'-Fragmente des *amyE*-Gens von *B. subtilis* dar; *treA*, Phospho- α -(1,1)-Glucosidase; *cat*, Chloramphenicol-Acetyltransferase.

2.4.2 Die Expression der *putB-treA* Operonfusion wird durch Prolin induziert

Für den *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 konnte im Northern-Blot gezeigt werden, dass die Expression des *putBCP*-Operons von exogenem Prolin abhängig ist (Abb. 27). Um den Einfluß von Prolin auf die Operonfusion *putB-treA* näher zu untersuchen wurde der Fusionsstamm SMB10 in SMM kultiviert und mit steigenden Prolinkonzentrationen von 0 bis 5 mM versetzt. Die Expression der *putB-treA* Fusion konnte schon mit sehr geringen Prolinkonzentrationen von 10 µM induziert werden und erreichte mit 500 µM Prolin ihr Maximum (Abb. 32).

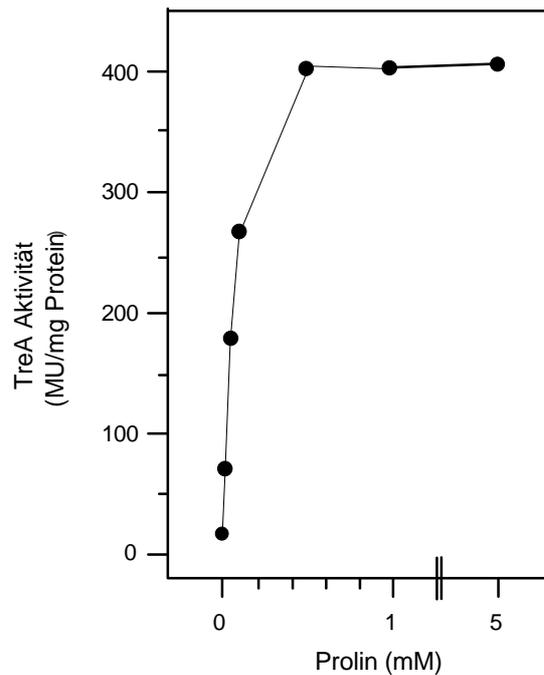


Abb.32: Abhängigkeit der Expression der *putB-treA* Fusion von der Prolinkonzentration

Der *B. subtilis* Stamm SMB10, der eine *putB-treA* Fusion trägt wurde in SMM bis zu einer OD_{578} von 0.3 angezogen und anschließend mit Prolinkonzentrationen von 10 µM bis 5 mM versetzt. Die TreA-Aktivität wurde 60 min nach Zugabe von Prolin bestimmt.

Im Folgenden wurde untersucht, wie der zeitliche Verlauf der Induktion durch Prolin auf die *putBCP*-Transkription aussieht, und ob auch andere Aminosäuren in der Lage sind die Expression zu induzieren. Dafür wurden die Aminosäuren Ornithin und Arginin verwendet, die durch die Enzyme RocD bzw. RocF zu Glutamat-semialdehyd (GSA) umgesetzt werden können. GSA kann durch PutC und RocA und schließlich zu Glutamat umgesetzt werden. Zusätzlich wurde die Aminosäure Histidin eingesetzt, die in keinen der durch PutB oder PutC katalysierenden Reaktionen involviert ist.

Die Kulturen des *putB-treA* Fusionsstammes SMB10 wurden in SMM bis zu einer OD_{578} von 0.3 inkubiert und zu diesem Zeitpunkt mit je 1 mM der entsprechenden Aminosäure induziert. Die TreA-Aktivität wurde vor und alle 15 min nach Zugabe der Aminosäuren bestimmt. Die Expression der *putB-treA* Fusion konnte nach Zugabe von 1 mM Prolin rasch gesteigert werden, so dass die Aktivität innerhalb einer Stunde um das 30-fache anstieg und auf diesem Niveau aufrecht erhalten blieb (Abb. 33). Damit entspricht die hier gemessene Expressionsteigerung der

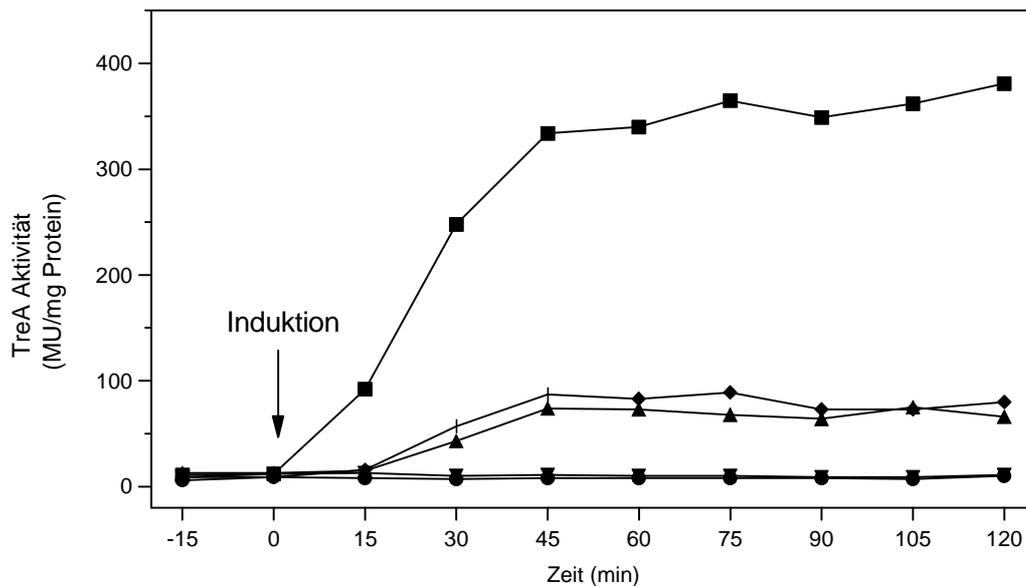


Abb.33: Induktion der Expression von *putBCP* nach Zugabe verschiedener Aminosäuren

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Trehalase-Aktivität des *B. subtilis*-Stammes SMB10, der eine *putB-treA* Operonfusion trägt. Die Kulturen wurden in SMM inkubiert und zum angegebenen Zeitpunkt (Pfeil) durch Zugabe von 1 mM Prolin (■), Arginin (▲), Ornithin (◆), Histidin (▼) induziert, als Negativ-Kontrolle diente SMM (●).

putB-treA Fusion, auch der im Northern-Blot beobachteten Zunahme der *putBCP*-mRNA (Abb. 27). Die Zugabe von Histidin zeigte keine Veränderung der TreA-Aktivität und entsprach somit dem Niveau der Negativ-Kontrolle der uninduzierten SMM-Kultur. Die Aminosäuren Arginin und Ornithin waren in der Lage die Expression der *putBCP*-Gene langsam um das 6-fache zu steigern. Es stellt sich die Frage, ob die Induktion direkt durch Arginin und Ornithin erfolgte, oder ob ein Zwischenprodukt wie Pyrrolin-5-carboxylat dafür verantwortlich war.

2.4.3 Nur externes Prolin induziert die Transkription *putBCP*-Operons

2.4.3.1 Die Transkription des *putBCP*-Operons erfolgt auch unter hochosmolaren Bedingungen

Prolin spielt in *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen als osmotische Schutzsubstanz eine entscheidende Rolle. Es ist die einzige osmoprotektive Substanz, die von *B. subtilis de novo* synthetisiert werden kann, wobei wie schon gezeigt, ein linearer Zusammenhang zwischen externer Osmolarität und interner Prolinkonzentration klar zu erkennen ist (Abb. 5). Da die Genexpression der Prolin-abbauenden Enzyme PutB und PutC durch externes Prolin stark induziert wird, stellt sich die Frage, wie der Abbau von Prolin für anabole Zwecke unter hochosmolaren Bedingungen, mit molaren internen Prolinkonzentrationen, reguliert wird.

Um dieser Frage nachzugehen sollte im *putB-treA* Stamm SMB10 die Expression des *putBCP*-Operons unter uninduzierten und induzierten Bedingungen in hochosmolaren Medien bestimmt werden. Die Kulturen wurden in SMM und SMM mit 0.6 M NaCl über Nacht an die entsprechenden Osmolarität adaptiert, so dass die Synthese von Prolin vollständig induziert war.

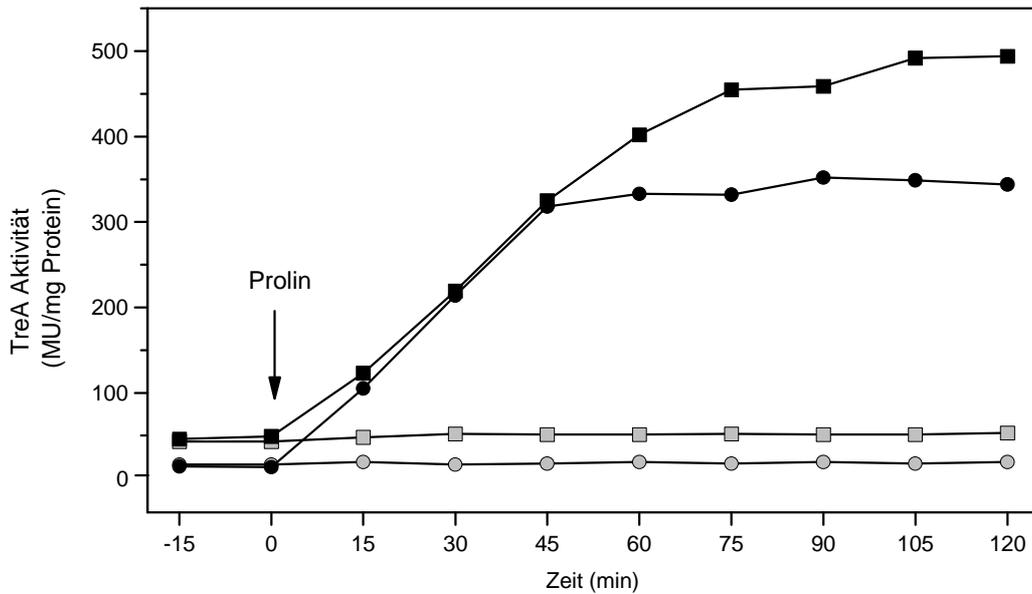


Abb.34: Induktion der Expression von *putBCP* unter hochosmolaren Bedingungen

Die Trehalase-Aktivität wurde im *putB-treA* Stamm SMB10 unter induzierten (●, ■) und uninduzierten (○, □) Bedingungen in SMM (●, ○) und SMM mit 0.6 M NaCl (■, □) bestimmt. Die Kulturen wurden in Medien der entsprechenden Osmolarität über Nacht adaptiert und in frisches Medium gleicher Osmolarität inokuliert. Nach dem Erreichen einer OD_{578} von 0.3 erfolgte die Induktion mit 1 mM Prolin (Pfeil). Die Bestimmung der TreA-Aktivität erfolgte vor und alle 15 min nach der Induktion.

Mit diesen Kulturen wurde frisches Medium gleicher Osmolarität inokuliert und bei einer OD_{578} von 0.3 mit 1 mM Prolin induziert. Die TreA-Aktivität wurde unmittelbar vor und in regelmäßigen Abständen nach der Induktion bestimmt.

Die TreA-Aktivität ist, wie aus Abbildung 34 ersichtlich, in SMM-Kulturen niedrig und steigt nach der Induktion mit Prolin schnell um das 30-fache auf 340 MU/mg Protein an. Dagegen liegt in uninduzierten Zellen, die in SMM mit 0.6 M NaCl gewachsen, sind das Basalniveau um das 3-fache höher, als in den in SMM gewachsenen Zellen. Die TreA-Aktivität steigt nach der Induktion schnell um das 9-fache des Basiswertes auf 450 MU/mg Protein an und liegt damit um das 1.3-fache höher, als in den in SMM gewachsenen Zellen. Das bedeutet, dass das *putBCP*-Operon, sowohl unter niedrigen, als auch unter hochosmolaren Bedingungen, durch externes Prolin induziert werden kann. Interessant ist die Entdeckung, dass unter uninduzierten, hochosmolaren Bedingungen die Expression relativ gering ist, obwohl sich hohe Konzentrationen von Prolin in den Zellen befinden.

2.4.3.2 Recycltes Prolin induziert die Transkription *putBCP*-Operons

Wird eine an hochosmotische Umweltbedingungen angepaßte *B. subtilis*-Kultur einem hypoosmotischen Schock ausgesetzt, so kommt es zu einem Efflux von osmoprotektiven Substanzen (Abb. 16). Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Induktion des *putBCP*-Operons unter hochosmolaren Bedingungen durch exkretiertes und wieder importiertes Prolin erfolgt, wurde die Transkription nach einem hypoosmotischen Schock bestimmt.

Als Kontrolle wurde in dem *putB-treA* Stamm SMB10 (*proHJ*⁺), das für die Synthese von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen verantwortliche *proHJ*-Operon deletiert (SMB13, *proHJ*). Die Kulturen wurden in SMM und SMM mit 0.6 M NaCl angezogen und bis zu einer OD₅₇₈ von 0.4 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Osmolarität der hochosmolaren Kulturen (SMM mit 0.6 M NaCl) durch die Zugabe von SMM auf SMM mit 0.3 M NaCl reduziert. Die TreA-Aktivität wurde unmittelbar vor und in regelmäßigen Abständen nach dem osmotischen Schock bestimmt.

Wie aus Abbildung 35 ersichtlich ist die TreA-Aktivität der *proHJ*-Mutante (SMB13) erwartungsgemäß sowohl in SMM (Daten nicht gezeigt), als auch in SMM mit 0.6 M NaCl auf Basisniveau und ändert sich auch durch einen osmotischen Schock nicht. In Zellen des Stammes SMB10 ist die TreA-Aktivität in hochosmolaren Medium, gegenüber den SMM Kulturen (Daten nicht gezeigt) erhöht und steigt nach einem hypoosmotischen Schock kontinuierlich an. Der Anstieg erfolgt unmittelbar nach dem osmotischen Schock und erreicht nach 45 min sein Maximum. Zur Kontrolle wurden parallele Kulturen mit Medium gleicher Osmolarität verdünnt, ein Einfluß auf die TreA-Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Mit diesem Experiment konnte die Hypothese bestätigt werden, dass das in hohen Konzentrationen synthetisierte Prolin erst dann eine induzierende Wirkung aufweist, wenn es aus dem im Cytoplasma exkretiert und dann wieder reimportiert wird.

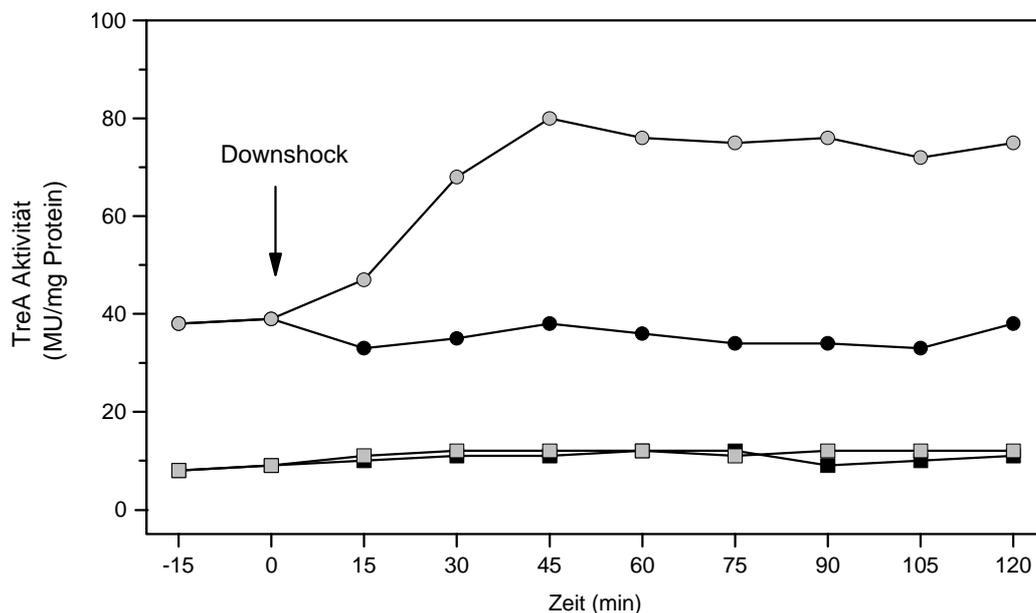


Abb.35: Regulation der Expression von *putBCP* nach einem hypoosmotischen Schock

Dargestellt ist die Expression der *putB-treA* Fusion im Stamm SMB10 (*proHJ*⁺, ●, ○) und seinem Derivat SMB13 (*proHJ*, ■, □). Die Kulturen wurden in SMM mit 0.6 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ von inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt (Pfeil) wurde die Osmolarität der Kulturen durch Zugabe von SMM (○, □) verringert, bzw. zur Kontrolle durch Zugabe von SMM mit 0.6 M NaCl (●, ■) konstant gehalten.

2.4.4 Der Transport des Induktors Prolin erfolgt durch PutP und OpuE

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass die Induktion des *putBCP*-Operons nur durch externes Prolin erfolgt. Eine Möglichkeit, wie die Zelle es schafft zwischen internem und externem Prolin zu unterscheiden besteht darin, dass der Transport von Prolin durch PutP oder OpuE eine Reaktion auslöst, die dann das *putBCP*-Operon induziert. Um zu untersuchen, welche Prolin-Transportsysteme für die Induktion durch Prolin notwendig sind, wurden *putB-treA* Fusionsstämme konstruiert, mit Deletionen in *putP*- (SMB14), *opuE*- (SMB28) und *putP*- und *opuE*-Gen (SMB27). Die Kulturen wurden in SMM und SMM mit 0.6 M NaCl inkubiert und bei einer OD_{578} von 0.3 mit 1 mM Prolin induziert. Proben zur Bestimmung der TreA-Aktivität wurden vor und in regelmäßigen Abständen nach der Induktion genommen.

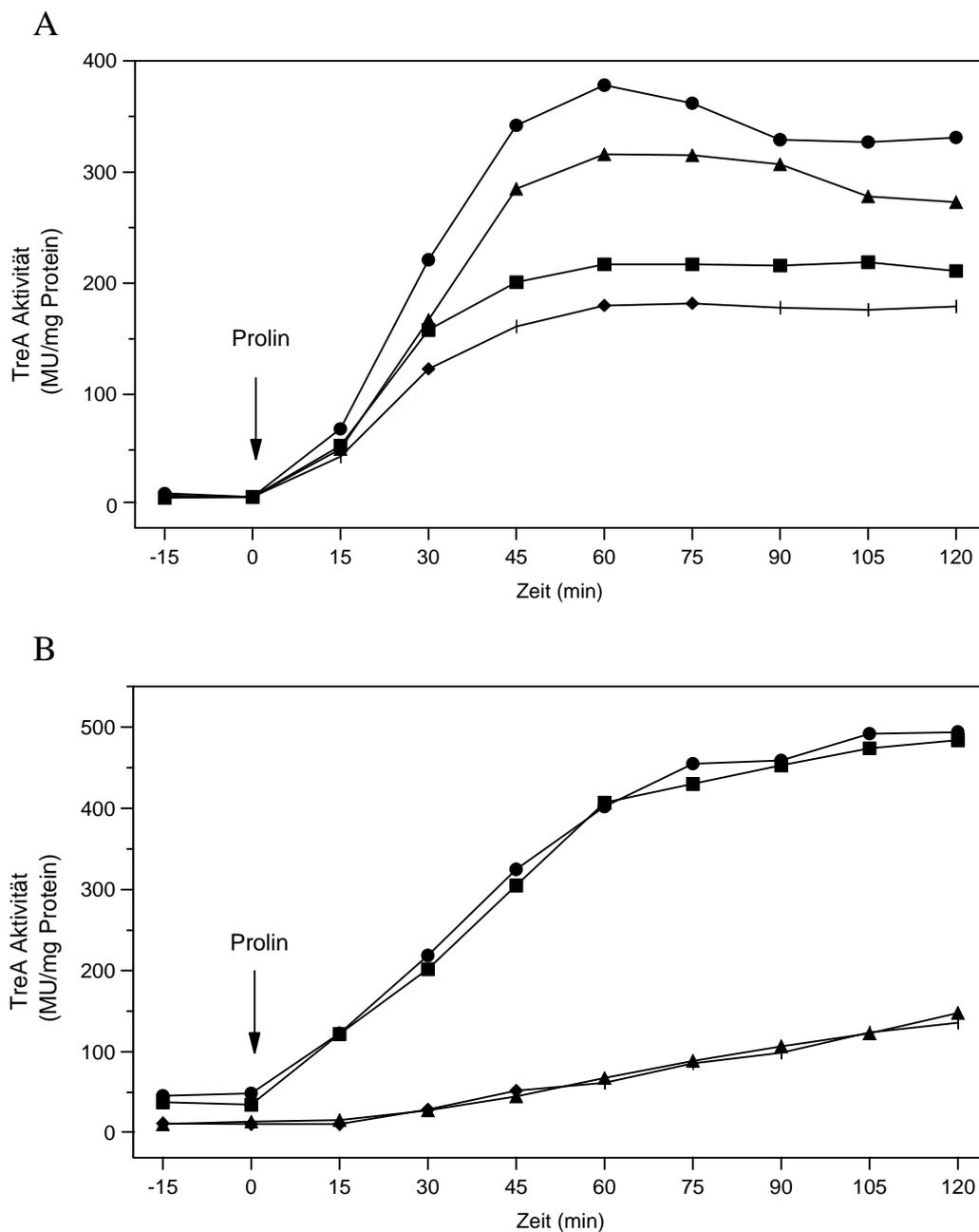


Abb.36: (Seite 80) Expression des *putBCP*-Operons in *putP*- und *opuE*-Transportermutanten

Die Trehalase-Aktivität des *putB-treA* Fusionsstammes SMB10 (●) und seiner Derivate SMB14 (*putP*, *opuE*⁺ ■), SMB28 (*putP*⁺, *opuE*, ▲) und SMB27 (*putP*, *opuE*, ◆) wurde in (A) SMM und (B) SMM mit 0.6 M NaCl bestimmt. Beim Erreichen einer OD₅₇₈ von 0.3 wurden die Kulturen mit 1 mM Prolin induziert (Pfeil). Die Bestimmung der TreA-Aktivität erfolgte vor und alle 15 min nach der Induktion.

Wie aus Abbildung 36A ersichtlich, erfolgt in SMM Kulturen die Induktion des *putBCP*-Operons, durch den Transport von Prolin durch beide Transportsysteme, PutP und OpuE. Die höhere Induktion durch die PutP-Permease ist wahrscheinlich darin begründet, dass die OpuE-Permease in Minimalmedium geringer Osmolarität nicht ihre volle Aktivität erreicht. Das wird auch durch die TreA-Aktivität der Transporter-Mutanten unter hochosmolaren Bedingungen bestätigt (Abbildung 36B). Hier spielt der Transport durch PutP nur eine untergeordnete Rolle, was sich auch mit den kinetischen Parametern der PutP-Permease deckt. So wird in der *putP*-Deletionsmutante (SMB14), in Medium höherer Osmolarität, dass für die vollständige Induktion notwendige Prolin durch OpuE transportiert. Eine Deletion von *opuE* (SMB28) führt genauso wie die *putP/opuE*-Doppelmutante (SMB27) zu einem fast vollständigen Erliegen des Prolintransportes. In Minimalmedium geringer Osmolarität ist auch bei der *putP/opuE*-Doppelmutante noch eine reduzierte TreA-Aktivität zu beobachten. Das für die Induktion notwendige Prolin wird vermutlich über Transportsysteme wie RocR transportiert, die nur geringe Mengen an Prolin transportieren, die jedoch schon ausreichen, die Transkription zu induzieren (Abb. 32). Damit zeigt sich, dass die Induktion des *putBCP*-Operons allein von der Menge des transportierten Prolins abhängig ist, nicht jedoch von einem bestimmten Transportsystem.

2.4.5 Die Induktion des *putBCP*-Operons ist unabhängig von PutB oder PutC

In *S. typhimurium* ist die Transkription des *putPA*-Operons, welches für eine Prolin Permease (PutP) und eine Prolin-Dehydrogenase (PutA) kodiert, durch PutA reguliert (Ostrovsky de Spicer *et al.*, 1993). In Abwesenheit von Prolin wird die Transkription des *putPA*-Operons durch PutA reprimiert, indem PutA an die *put*-Kontrollregion auf der DNA bindet. In Anwesenheit von Prolin assoziiert PutA mit der Membran, katalysiert dort den Abbau von Prolin, so dass gleichzeitig die Induktion der *put*-Gene durch Prolin ermöglicht wird. Um festzustellen, ob eine ähnliche Regulation auch für das *putBCP*-Operon existiert, wurde der Einfluß von PutB und PutC auf die Induktion des *putBCP*-Operons durch Prolin untersucht. Dafür wurden Derivate des *treA-putB* Fusionsstammes SMB10 mit Deletionen im *putB*-Gen (SMB49), *putC*-Gen (SMB34) und im *putBCP*-Operon (SMB46) konstruiert. Die Stämme wurden in SMM bis zu einer OD₅₇₈ von 0.3 inkubiert und mit 1 mM Prolin induziert. Zur Bestimmung der TreA-Aktivität wurden vor und nach der Induktion Proben genommen.

Beim *putB-treA* Fusionsstamm SMB10 (*putBCP*⁺) führte die Induktion mit Prolin zu einen raschen Anstieg der TreA-Aktivität, die nach 60 min einen konstanten Wert von 340 MU/mg Protein erreicht (Abb. 37). Die *putB*- und *putC*-Einzelmutanten, sowie die *putBC*-Doppelmutante

zeigen nach der Induktion einen ebenso raschen Anstieg der TreA-Aktivität, diese erreicht aber nach 60 min nicht ihr Maximum, sondern steigt bis zum Ende der Probennahme, nach 120 min, weiter linear an. Dabei ist zu beachten, dass die Deletionen in den *putB*- und *putC*-Genen wahrscheinlich einen polaren Effekt auf die Transkription des *putP*-Gens haben. Betrachtet man die in einer *putP*-Deletion (SMB14) reduzierte TreA-Aktivität, so ist anzunehmen, dass sich der Effekt einer *putB*- oder *putC*-Deletion noch viel stärker auf die TreA-Aktivität auswirken würde, wenn *putP* vollständig expremiert wäre. In jedem Fall ist festzustellen, dass weder PutB noch PutC an der Regulation der Transkription des *putBCP*-Operons beteiligt sind. So zeigen die Daten, dass PutB und PutC keine induzierende Wirkung auf die Transkription ausüben, da eine Expression der *putB-treA* Fusion auch in den PutB/PutC-Deletionsstämmen erfolgt. Würde PutB oder PutC reprimierend auf die Expression des *putBCP*-Operons wirken, müßte bei einer Deletion in besagten Genen, durch die konstitutive Expression der *putB-treA* Fusion, das Basalniveau der TreA-Aktivität auf den Wert von über 340 MU/mg Protein ansteigen, was hier jedoch nicht beobachtet werden kann. Der nach der Induktion mit Prolin beobachtete erhöhte Anstieg der TreA-Aktivität, in den *putB*- und *putC*-Deletionen, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Induktor Prolin oder ein Derivat durch den fehlenden Abbau ständig in hoher Konzentration in den Zellen vorliegt.

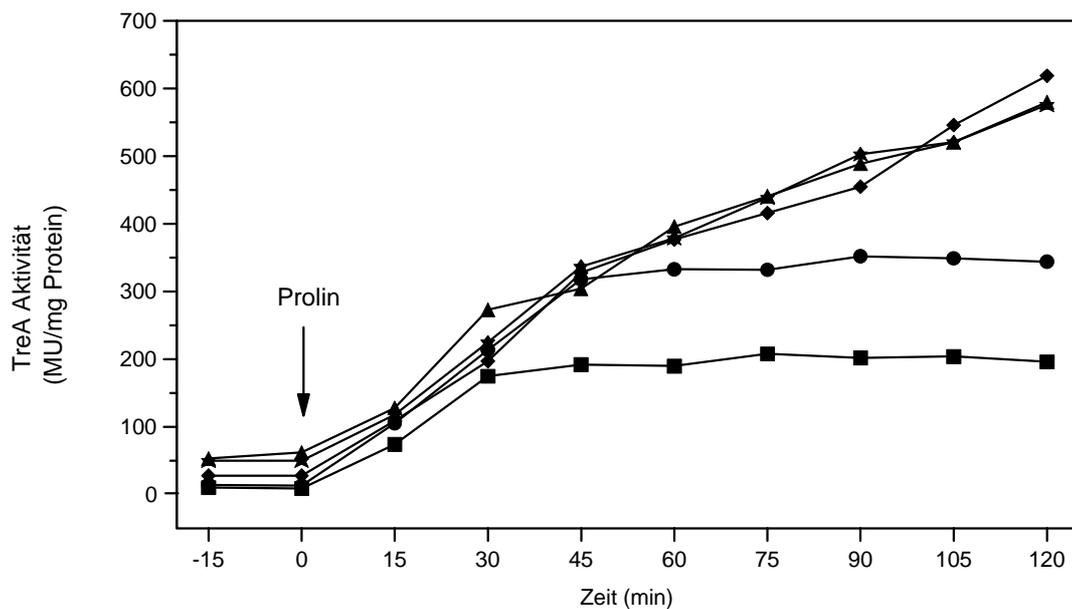


Abb.37: Einfluß von PutB und PutC auf die Induktion des *putBCP*-Operons

Dargestellt ist die Trehalase-Aktivität des *putB-treA* Fusionsstammes SMB10 (●) und seiner Derivate mit Deletionen im *putBCP*-Operon: SMB49 [$\Delta(\textit{putB}::\textit{spc})3$, ▲], SMB34 [$\Delta(\textit{putC}::\textit{neo})2$, ◆] SMB14 [$\Delta(\textit{putP}::\textit{spc})1$, ■] und SMB46 [$\Delta(\textit{putBCP}::\textit{tet})2$, *]. Die Kulturen wurden in SMM inkubiert und beim Erreichen einer OD_{578} von 0.3 mit 1 mM Prolin induziert (Pfeil). Die Bestimmung der TreA-Aktivität erfolgte vor und alle 15 min nach der Induktion.

2.4.6 Charakterisierung der *putBCP*-Promotorregion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transkription des *putBCP*-Operons durch die Zugabe von Prolin induziert wird, sollte ermittelt werden, welche DNA-Sequenz *in cis* für die Funktion des *putBCP*-Promotors erforderlich ist. Dafür wurde die in dem Stamm SMB10 vorhandene *putB-treA* Fusion mit dem 1.01 kb *putB*-Fragment vom 5'- und 3'-Ende her verkürzt (Abb. 38A). In dem Stamm SMB36 ist das Promotor-Fragment auf 807 bp verkürzt und liegt mit seinem 3'-Ende im ersten Codon des *putB*-Leserahmens, während das 5'-Ende dem verwendeten Fragment von SMB10 entspricht. Die Verkürzung des in SMB40 verwendeten 493 bp-Fragmentes erfolgte vom 5'-Ende her und beginnt in der intergenen Region nach dem Leserahmen des *ycgL*-Gens und beinhaltet den gleichen 3'-Fusionspunkt wie das in SMB10 verwendete Fragment.

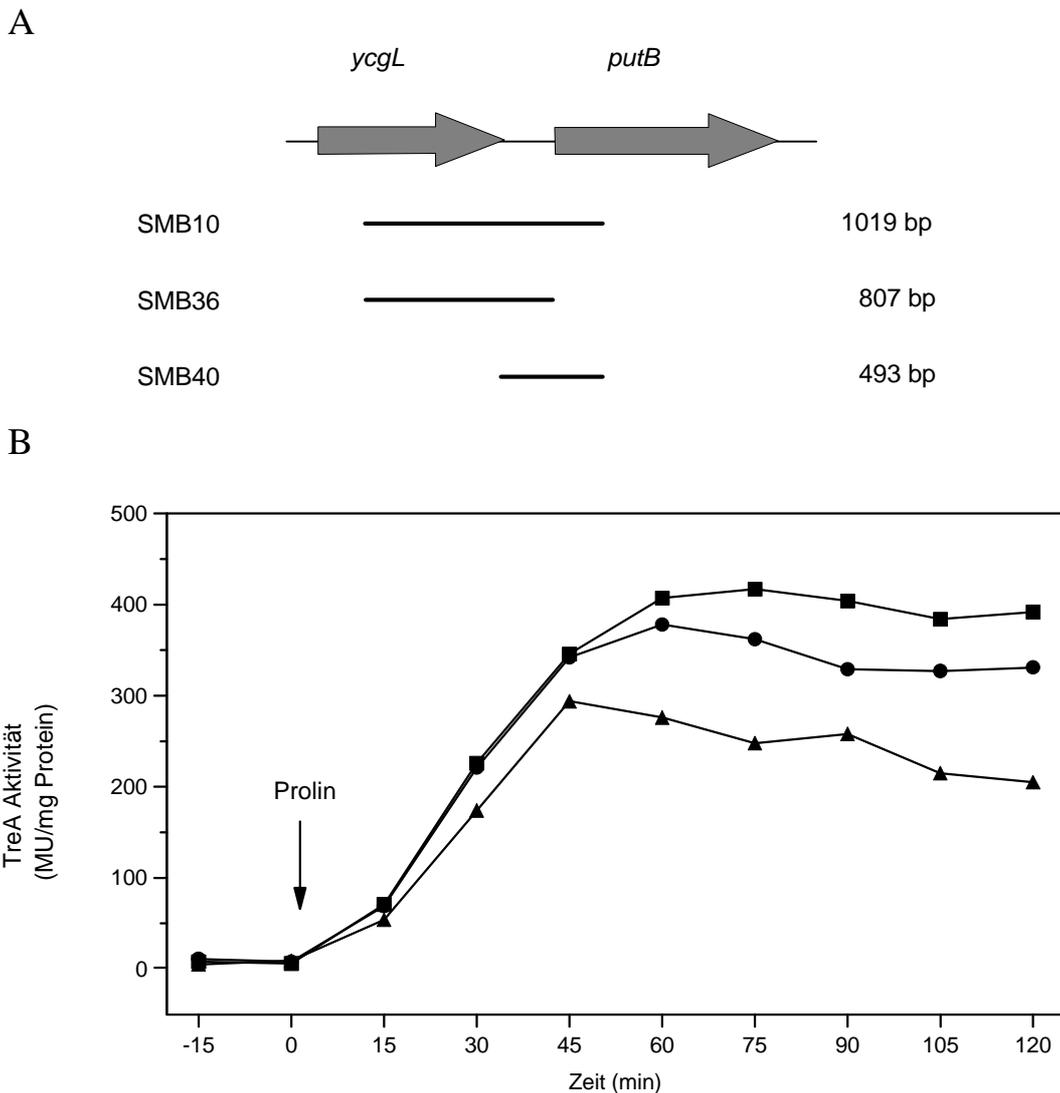


Abb.38: Analyse der *putBCP*-Promotorregion durch sukzessive Deletion

(A) Verschiedene DNA-Fragmente aus dem 5'-Bereich von *putB* wurden mit dem promotorlosen *treA*-Gen fusioniert und zur Konstruktion der Stämme SMB10, SMB36 und SMB40 in das *amyE*-Gen des *B. subtilis*-Stammes MBB1 [(*treA::neo*)1] integriert. Die Balken stellen die Größe und Position der Promotor-Fragmente dar. (B) Dargestellt ist die Expression der verschiedenen *putB-treA* Fusionen in SMB10 (●), SMB36 (■) und SMB40 (▲) vor und nach einer Induktion mit 1 mM Prolin.

Die verkürzten Promotor-Fragmente konnten beide durch die Zugabe von 1 mM Prolin induziert werden (Abbildung 38B) und zeigten den gleichen zeitlichen Verlauf der Reporterexpression wie SMB10, jedoch auf einem höheren Niveau beim Stamm SMB36 und einem niedrigeren im Stamm SMB40. Demnach umfaßt der 190 bp große intergene Bereich zwischen den Genen *ycgL* und *putB*, alle erforderlichen DNA-Elemente für die Induktion durch Prolin.

3. Effluxsysteme in *B. subtilis*

Für *B. subtilis* konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass unter isoosmotischen Bedingungen ein kontinuierlicher, geringer Efflux von osmoprotektiven Substanzen, wie Prolin und Glycin-Betain existiert. Darüber hinaus erfolgt nach einem hypoosmotischem Schock ein schneller massiver Efflux von Glycin-Betain. Um die Effluxsysteme auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde mit Hilfe des Kreuzfütterungs-Experimentes ein „Screening“ auf diese Effluxsysteme durchgeführt. In einem weiteren Ansatz wurden mögliche Mechanosensitive Kanäle gezielt deletiert und physiologisch getestet.

3.1 Suche nach dem Prolin-Effluxsystem

Um ein Prolin-Effluxsystem in *B. subtilis* zu identifizieren wurde das in Abschnitt 1.2 beschriebene Kreuzfütterungs-Experiment genutzt. Dafür wurde zunächst eine Transposonmutagenese in dem Stamm BLOB9 (*opuE*) durchgeführt, um die Gene, die für ein solches Effluxsystem kodieren zu unterbrechen. In dem folgenden Experiment sollte nach den Mutanten gesucht werden, die kein Prolin mehr exkretieren, so dass der Prolinauxotrophe *E. coli*-Stamm RC711 seine Auxotrophie nicht mehr komplementieren kann. Während um den Wildtypstamm JH642, durch die ständige Exkretion von Prolin, ein Wachstum von *E. coli* beobachtet werden kann, müßten Stämme, die eine Mutation im Prolin-Effluxsystem tragen, keinen *E. coli*-„Hof“ um ihre Kolonien aufweisen.

Die Transposonmutagenese wurde mit dem Shuttleplasmid pIC333 durchgeführt (Steinmetz & Richter, 1994), das in *E. coli* und *B. subtilis* repliziert werden kann. Neben einem Temperatursensitiven Origin für *B. subtilis* befindet sich auf dem Plasmid ein Mini-Tn10-Transposon, aus den äußeren Enden des Tn10-Transposons. Dieses Transposon trägt neben einer Spectinomycinresistenz auch das pUC-Origin für *E. coli*, was die spätere Lokalisierung der Mutation ermöglicht. Das Gen für die Transposase und eine Erythromycin-Resistenz liegen außerhalb des Transposons, so dass ein ins Chromosom inseriertes Transposon stabil ist. Nach der Transposonmutagenese wurden die Mutanten auf LB-Spc-Agarplatten selektiert. Auf SMM-Platten konnte der Anteil auxotropher Mutanten und damit ein Maß für die erfolgreiche Mutagenese bestimmt werden. Von drei Ansätzen in denen eine erfolgreiche Mutation stattgefunden hatte, wurden die Zellen von den Platten gespült und vereinigt. Von dieser Transposonbank wurden 100 µl einer 10⁻⁶ Verdünnung auf LB-Spc-Agarplatten plattiert und am nächsten Tag auf eine MMA-Agarplatte mit 0.8 M NaCl, auf die zuvor der *E. coli*-Stamm RC711 ausgestrichen worden war, replika plattiert. Mit dieser Methode wurden 12.000 Kolonien untersucht um diejenigen zu identifizieren, um die sich kein *E. coli*-„Hof“ bildet. Dabei

gestaltete es sich sehr schwierig, das Wachstum der *E. coli* Zellen einzelnen *B. subtilis*-Kolonien zuzuordnen, da sich die *E. coli*-„Höfe“ gegenseitig etwas überschneiden. Bei 60 *B. subtilis*-Kolonien konnte zunächst kein *E. coli* Wachstum beobachtet werden, was bei einer weiteren Überprüfung jedoch revidiert werden mußte. Es zeigte sich, dass es nicht möglich ist, mit dieser Methode, das für den Efflux von Prolin verantwortliche Gen zu finden. Wachstum oder Nicht-Wachstum der *E. coli* Zellen war zu sehr von der jeweiligen Kondition der einzelnen *B. subtilis*-Kolonien abhängig.

3.2 Mechanosensitive Kanäle in *B. subtilis*

Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass nach einem hypoosmotischem Schock, die in hohen Konzentrationen akkumulierten osmoprotektiven Substanzen, durch ein bisher nicht identifiziertes Effluxsystem aus dem Cytoplasma gelangen (Abb. 16). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesem Effluxsystem um Mechanosensitive (MS) Kanäle handelt. Durch Homologievergleich der MscL und MscS (*yggB*) Kanäle in *E. coli* mit der *B. subtilis* Datenbank wurden mögliche MS Kanäle in *B. subtilis* identifiziert.

Das *B. subtilis* Gen *ywpC* kodiert für ein Protein, welches hohe Homologien zu MscL Proteinen verschiedener Organismen aufweist (Abbildung 39). Die Sequenzidentität erstreckt sich über den gesamten Bereich der MscL Proteine und reicht von 53 % bei *S. aureus* bis zu 64 % bei *Clostridium histolyticum*. YwpC besteht aus 130 Aminosäuren mit einem daraus kalkulierten Molekulargewicht von 14.139 Da. Die Hydrophathie-Analyse weist YwpC als ein sehr hydrophobes Protein mit zwei membranspannenden Segmenten auf.

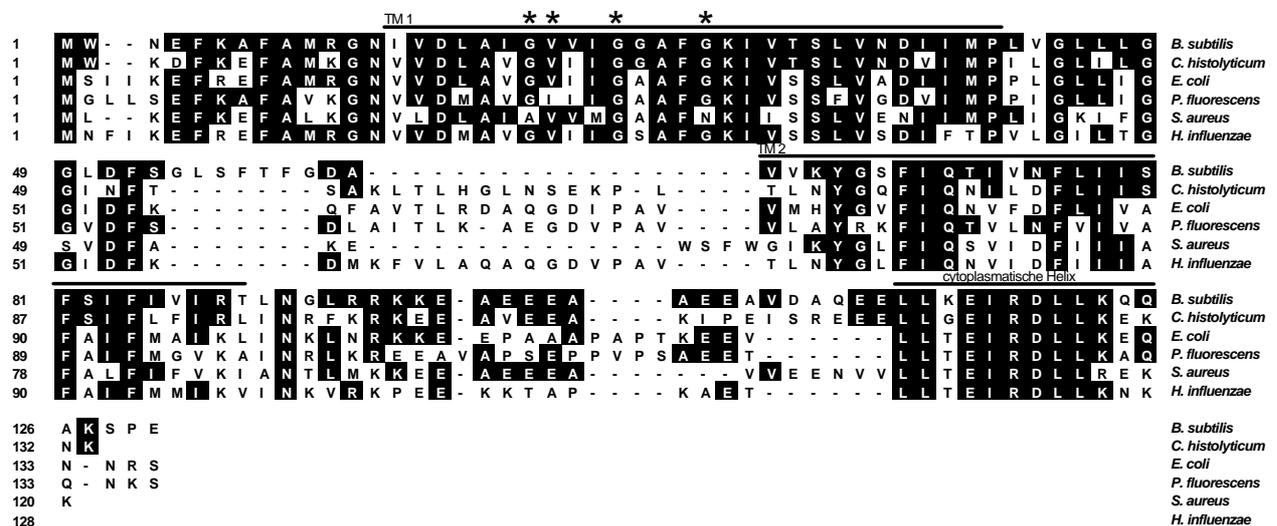


Abb.39: Vergleich der Aminosäuresequenz von YwpC aus *B. subtilis* mit anderen bakteriellen MscL-Proteinen

Die Aminosäuresequenz des YwpC-Proteins aus *B. subtilis* wurde verglichen mit MscL-Proteinen von *C. histolyticum* (D87215), *E. coli* (Z83337), *P. fluorescens* (AF029732), *S. aureus* (AF029731), *Haemophilus influenzae* (P44789). Konservierte Aminosäuren, die in dem YwpC-Protein, sowie in mindestens einem der anderen Proteine vorkommen sind schwarz unterlegt. Die potentiellen Transmembrandomänen TM1 und TM2, sowie die cytoplasmatische α -Helix wurden durch schwarze Balken markiert. Die mit einem (*) versehenen Aminosäuren sind möglicherweise an der Kanalöffnung beteiligt.

(Tsang & Escalante-Semerena, 1996, 1998; Brachmann *et al.*, 1995). Eine geringere Sequenzidentität besteht zu dem Genprodukt von *ykut*. Ykut besteht aus 267 Aminosäuren, mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 29.877 Da. YfkC zeigt die geringste Sequenzidentität zu dem MscS Protein von *E. coli* auf und besteht aus 280 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 35.054 Da. Das Gen *yfkC* ist wahrscheinlich mit *yfkB* in einem Operon angeordnet. YfkB besteht aus 153 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17.400 Da und weist keine Homologie zu einem bekannten Protein auf.

3.2.1 Konstruktion chromosomaler Deletionsmutanten

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Proteinen YwpC, YhdY, YkuT und YfkC um MS Kanäle handelt und welche Einflüsse die Proteine YhdZ und YfkB haben, wurden chromosomale Deletionsmutanten in *B. subtilis* hergestellt (Abb. 41). Die in verschiedenen Plasmiden klonierten Gene wurden durch Insertion einer Resistenz-Kassette unterbrochen bzw. teilweise deletiert. Die Transformation der linearisierten Plasmide in *B. subtilis*, führte zu einer doppelten homologen Rekombination und damit zu einem Markeraustausch des Resistenzgens gegen das intakte chromosomale Gen. Die Stämme wurden auf ihre entsprechende Resistenz selektiert und im Southern-Blot überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Sensitivität der Mutanten gegenüber einem hypoosmotischen Schock

Um die physiologische Bedeutung dieser potentiellen MS Kanäle zu untersuchen, sollte die Überlebensrate der Zellen nach einem hypoosmotischen Schock bestimmt werden. Dafür wurden zunächst, neben den zuvor beschriebenen Einzelmutanten, auch Doppel-, bzw. Mehrfachmutanten durch Transformation chromosomaler DNA eines Deletionsstammes in einen anderen Deletionsstamm erzeugt (Stämme siehe Tab. 1). Die Stämme wurden in SMM mit 0.9 M NaCl über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen in frisches Medium auf eine OD₅₇₈ von 0.1 angeimpft. Diese Kulturen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 0.35 inkubiert und schließlich 1 : 20 in vorgewärmtes SMM (Hypoosmotischer Schock) und SMM mit 0.9 M NaCl (Kontrolle) verdünnt. Um die Überlebensrate der Zellen zu bestimmen wurden Proben dieser Kulturen in isoosmolaren Medium schrittweise verdünnt und jeweils 5 µl Aliquots auf LB-Agarplatten aufgebracht. Es zeigte sich aber, dass unter diesen Versuchsbedingungen keine reduzierte Überlebensrate der Deletionsmutanten, nach einem hypoosmotischen Schock, von 0.9 M NaCl auf nahezu 0 M NaCl, beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

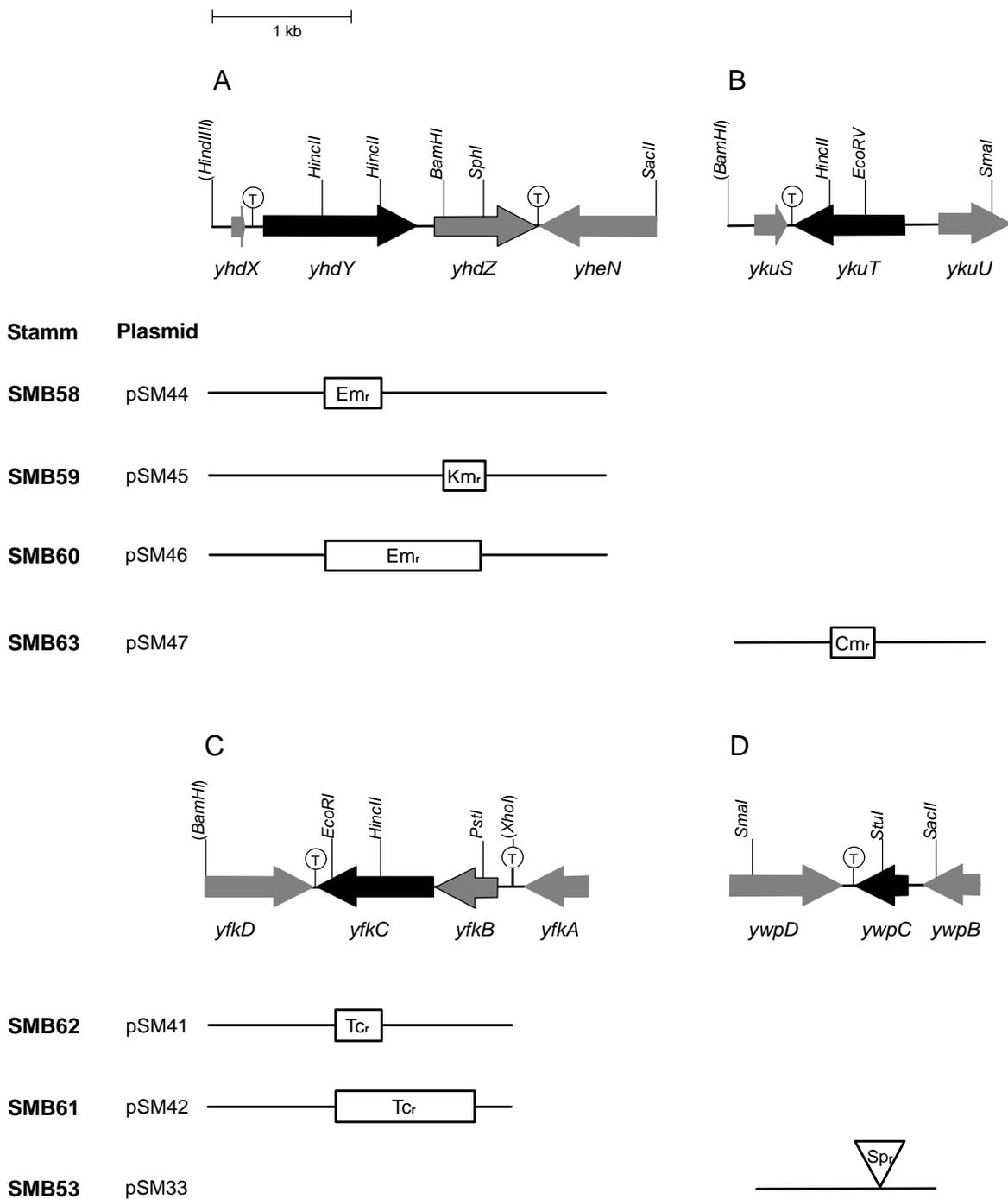


Abb.41: Konstruktion von Deletionsmutanten in potentiellen Genen von Mechanosensitiven Kanälen

Dargestellt sind die konstruierten Plasmide, mit den Positionen der Resistenzkassetten in den Bereichen (A) *yhdYZ*, (B) *ykuT*, (C) *yfkBC* und (D) *ywpC*, und den daraus abgeleiteten *B. subtilis*-Stämmen. Die Größe der Resistenz-Kassetten ist nicht maßstabsgetreu. Es wurden nur die Restriktionsschnittstellen aufgeführt, die für die jeweilige Klonierung relevant waren. Eingeklammerte Schnittstellen wurden über einen PCR-Primer eingeführt.

V. DISKUSSION

Das Überleben von Mikroorganismen in ihren natürlichen Habitat ist abhängig von Mechanismen, welche die Zelle in die Lage versetzen sich auf extreme Schwankungen von Temperatur, pH-Wert und osmotischen Druck einzustellen. Die Osmolarität der Umgebung ist eins der wichtigsten physikalischen Parameter, die das Wachstum der Organismen beeinflussen. Die Bedeutung der Osmolarität ist durch die Semipermeabilität der biologischen Membranen begründet, die für Wasser, nicht aber für die meisten gelösten Substanzen wie Makromoleküle, Ionen oder organische Verbindungen, frei permeabel ist. Darüber hinaus konnten in tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Zellen, Wasserkanäle (Aquaporine) auf molekularer Ebene identifiziert werden (Agre *et al.*, 1993; Chrispeels & Agre, 1994; Calamita *et al.*, 1995). Aquaporine erleichtern den selektiven Wasserstrom über die Zellmembran, so dass sich Schwankungen der Wasseraktivität, verursacht durch Regen oder Trockenheit, direkt auf den für viele physiologische Prozesse essentiellen Zellurgor auswirken. Die Anpassung an die jeweiligen osmotischen Bedingungen und damit die Aufrechterhaltung des Zellurgors, erfolgt durch die variable Zusammensetzung cytoplasmatischer Solute. Diese Art der Osmoadaptation erfolgt nicht nur bei den Prokaryonten, auch in Hefen, Pilzen, Pflanzen, Tieren und menschlichen Zellen ist eine solche Stressreaktion zu beobachten (Rhodes & Hanson, 1993; Blomberg, 1997; Burg *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999).

Das Gram-positive Bodenbakterium *B. subtilis* akkumuliert nach einem hypoosmotischem Schock hohe Konzentrationen von osmoprotektiven Substanzen, von denen Prolin und Glycin-Betain eine besondere Bedeutung zukommt. Glycin-Betain besitzt die größte osmoprotektive Wirkung, da es mit höchster Effizienz durch verschiedene Transportsysteme aufgenommen werden kann (Boch *et al.*, 1994; Kappes *et al.*, 1996; von Blohn *et al.*, 1997). Die cytoplasmatische Anreicherung von Prolin erfolgt, neben dem Transport, als einzige osmoprotektive Substanz durch eine *de novo* Synthese (Kempf & Bremer, 1998). Neben seiner Funktion als osmoprotektive Substanz dient Prolin auch als ergiebige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle. Es stellt sich nun die Frage: Wie vermeidet die Zelle unter hochosmotischen Bedingungen einen „futile cycle“, dass heißt den Abbau des zuvor akkumulierten Prolins? Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Identifizierung, der für den Prolinabbau verantwortlichen Enzyme, PutB und PutC, der Prolinkatabolismus in *B. subtilis* auf molekularer und physiologischer Ebene charakterisiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass allein durch die obligatorische Kopplung von Prolinabbau und Prolintransport, *B. subtilis* einen eleganten Regulationsmechanismus gefunden hat, den Abbau der intrazellulär akkumulierten osmotischen Schutzsubstanz Prolin, zu verhindern. Darüber hinaus konnte mit PutP eine Prolin Permease identifiziert werden, die entgegen der osmotisch induzierbaren Prolin Permease OpuE (von Blohn *et al.*, 1997), durch exogenes Prolin induziert und durch hohe Osmolaritäten reprimiert wird.

Die unter hochosmotischen Bedingungen akkumulierten osmoprotektiven Substanzen bergen für die Zelle jedoch die Gefahr, nach einem hypoosmotischem Schock, infolge des Wassereinstroms

zu platzen. Um einen Anstieg des Turgors zu verhindern muß die Zelle den intrazellulären Pool der osmotisch wirksamen Substanzen umgehend reduzieren. Dazu stehen ihr prinzipiell drei Möglichkeiten zur Verfügung: (I) Efflux der osmotisch aktiven Solute, (II) Abbau und (III) Polymerisation. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass unter hochosmotischen Bedingungen ein ständiger Efflux von Prolin, Glycin-Betain und dessen biosynthetischen Vorläufer Cholin erfolgt. Gleichzeitig werden diese exogenen Solute über die Aufnahmesysteme wieder reimportiert. Darüber hinaus erfolgt nach einem hypoosmotischen Schock ein gesteigerter Efflux von osmotisch aktiven Soluten und eine Induktion des Prolinabbaus.

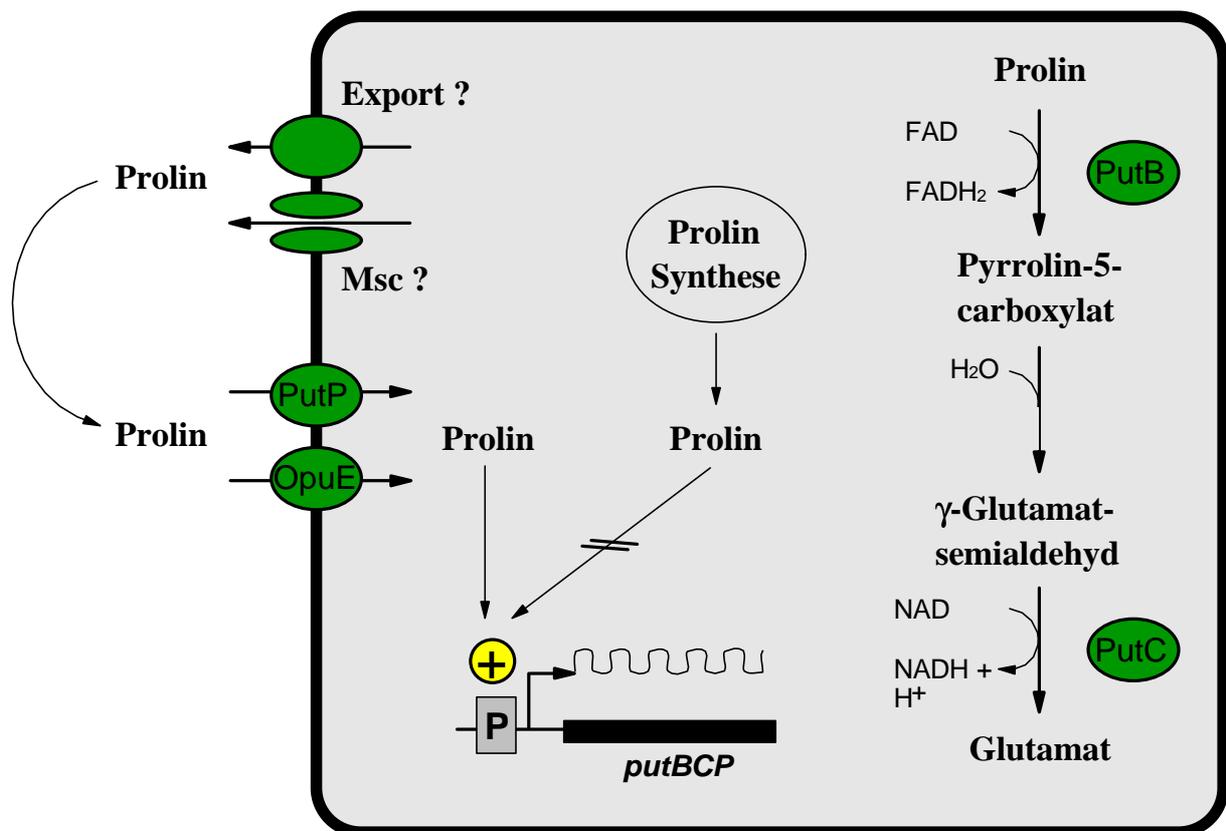


Abb.42: Regulationsmodell für den Prolinabbau in *B. subtilis*

Dargestellt ist der Abbauweg von Prolin zu Glutamat, dessen Regulation obligatorisch mit dem Transport von exogen verfügbarem Prolin gekoppelt ist. Das unter hochosmolaren Bedingungen, durch endogene Synthese akkumulierte Prolin, ist nicht in der Lage den Prolinabbau zu induzieren. Unter hochosmolaren Bedingungen erfolgt jedoch ein ständiger Efflux von Prolin über bisher noch nicht charakterisierte Systeme. Der Transport von Prolin in das Cytoplasma der Zelle, erfolgt bei geringen Osmolaritäten über die Prolin Permease PutP und unter hochosmolaren Bedingungen über die Prolin Permease OpuE. Über einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus ist dieses importierte Prolin in der Lage, die Transkription des *putBCP*-Operons zu induzieren, dessen Gene für die Prolin-abbauenden Enzyme PutB, PutC und die Prolin Permease PutP kodieren. Die Prolin Dehydrogenase PutB oxidiert Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat, dieses hydrolysiert spontan zu Glutamat-semialdehyd und wird von der γ-Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase PutC, zu Glutamat oxidiert.

1. Akkumulation von Prolin und Glycin-Betain unter hochosmotischen Bedingungen

Wie viele andere Gram-positive und Gram-negative Organismen, akkumuliert *B. subtilis*, nach einem hyperosmolaren Schock, die osmoprotektive Substanzen Glycin-Betain und Prolin in hohen Konzentrationen. Die Akkumulation erfolgt durch den Transport von exogen zur Verfügung stehenden Soluten und durch die endogene Synthese von Prolin (Kempf & Bremer, 1998). Im natürlichen Habitat von *B. subtilis* wird Prolin und Glycin-Betain durch verrottete Biomasse und Wurzelexudate freigesetzt (Kemble & MacPherson, 1954). Da Prolin und Glycin-Betain von vielen anderen Organismen als osmoprotektive Substanz genutzt wird, herrscht in dieser Umgebung ein hoher Konkurrenzdruck. *B. subtilis* besitzt aus diesem Grund effektive, osmotisch induzierbare Aufnahmesysteme für Prolin und Glycin-Betain und ermöglicht so eine erfolgreiche Osmoadaptation (Kempf & Bremer, 1998).

Wenn keine exogenen osmoprotektiven Substanzen zur Verfügung stehen ist *B. subtilis* auf die Synthese von Prolin angewiesen. Die osmotisch induzierbare Synthese erfolgt in drei enzymatisch katalysierten Schritten und erreicht innerhalb von 8 h die maximale intrazelluläre Prolinkonzentration (Whatmore *et al.*, 1990; Brill, 1998). Das Erreichen der maximalen Prolinkonzentration ist für die Proliferation der Zellen nicht essentiell, es konnte beobachtet werden, dass schon nach 4 h eine leichte Zunahme der Zellzahl erfolgt (Whatmore *et al.*, 1990). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Prolinkonzentration, in Abhängigkeit von der externen Osmolarität, ansteigt. Dabei stieg in adaptierten Zellen, bei einer Erhöhung der Osmolarität von 340 mOsm auf 1860 mOsm, die Prolinkonzentration von 8.8 mM auf 404 mM Prolin an (Abb. 5). Diese Daten stehen im Einklang mit Untersuchungen von Whatmore *et al.* (1990), die zudem zeigten, dass die Prolinkonzentration nicht nur von der Osmolarität des Mediums, sondern auch von der Temperatur beeinflusst wird (Whatmore *et al.*, 1990). Man geht davon aus, dass Prolin auch in der Kryoprotektion eine Rolle spielt, so dass beim Zusammentreffen von beiden Stressfaktoren die Synthese von Prolin gesteigert wird (Warr *et al.*, 1985; Wohlfarth *et al.*, 1990). Die Daten lassen folgende Hypothese zu: Die Zelle verhält sich wie ein Osmometer, sie detektiert den osmotischen Druck und reguliert exakt die Akkumulation von Prolin. Diese Beobachtung wurde durch die Reprimierung der Prolinsynthese, durch exogene Zugabe von Glycin-Betain und anderer osmoprotektiven Substanzen, unterstützt. Die Höhe der Reprimierung ist dabei abhängig von der externen Osmolarität und der Konzentration von Glycin-Betain (Abb. 6 und 7). Die Akkumulation von Glycin-Betain erfolgt durch Aufnahme über drei verschiedenen Transportsysteme und durch Synthese aus dem Vorläufermolekül Cholin. Auch für Glycin-Betain konnte eine lineare Abhängigkeit, zwischen intrazellulärer Konzentration und externer Osmolarität, beobachtet werden (Abb. 8). Die Zugabe von exogenem Glycin-Betain führte, bei Erhöhung der Osmolarität von 340 mOsm auf 1860 mOsm, zu einer Steigerung der internen Glycin-Betain Konzentration von 204 mM auf 938 mM.

2. Der Prolinkatabolismus in *B. subtilis*

Prolin wird von *B. subtilis* als proteinogene Aminosäure, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle genutzt und spielt als osmoprotektive Substanz eine bedeutende Rolle. In *B. subtilis* wird exogen vorliegendes Prolin durch hochaffine Transporter importiert oder unter hochosmolaren Bedingungen in hohen Konzentrationen synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Abbauweg von Prolin in *B. subtilis* aufgeklärt und untersucht, auf welche Weise die Zelle bei hoher Osmolarität den Abbau des zuvor akkumulierten Prolins verhindert und wie, nach einem hypoosmotischem Schock, die schnelle Oxidation von Prolin, zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase, reguliert wird.

2.1 Der Abbau von Prolin zu Glutamat in *B. subtilis*

Die ersten Untersuchungen zum Prolinabbau in *B. subtilis* identifizierten auf enzymatischer Ebene eine Prolin Dehydrogenase (PDH) und zwei Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenasen (P5CDH), die sich hinsichtlich ihrer Thermostabilität, ihrem chromatographischen Verhalten und ihren kinetischen Parametern unterscheiden. Die Aktivität aller Enzyme konnte bei Zugabe von Prolin gesteigert werden, während Arginin und Ornithin nur die P5CDH aktivierte (De Hauwer *et al.*, 1964). Spätere Untersuchungen bestätigten die Existenz einer PDH in *B. subtilis*, die durch Prolin induziert, aber in Medien mit hoher Aminosäurekonzentration inhibiert ist (Atkinson *et al.*, 1990; Fisher *et al.*, 1996). Im Rahmen der Genomsequenzierung wurde in *B. subtilis* ein offener Leserahmen (*ycgO*) identifiziert (Yamane *et al.*, 1996), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine Identität von 63 % zu der osmotisch regulierten Prolin Permease OpuE zeigte (Abb. 24). Unmittelbar neben dem *ycgO*-Gen liegen die Gene *ycgM* und *ycgN*, deren abgeleitete Proteine hohe Homologien zu PDH (YcgM) und P5CDH (YcgN) von Enterobakterien aufweisen (Abb. 20 und 22). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass YcgO der bedeutendste Transporter von Prolin für cytoplasmatische Stoffwechselprozesse ist, und YcgM und YcgN den Abbau von Prolin zu Glutamat katalysieren. Die Gene *ycgM*, *ycgN* und *ycgO* wurden in *putB*, *putC* und *putP* umbenannt, wobei *put* für „proline utilization“ steht.

Der Abbau von Prolin erfolgt, wie in den unter Abschnitt 2.2 aufgeführten pro- und eukaryotischen Organismen, auch in *B. subtilis* in drei Schritten, von denen zwei enzymatisch katalysiert werden und einer vermutlich spontan abläuft. Exogen verfügbares Prolin wird durch die Prolin Permease PutP in das Cytoplasma der Zelle transportiert, wo es durch die Prolin Dehydrogenase PutB zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) oxidiert wird. P5C hydrolysiert spontan zu γ -Glutamat-semialdehyd (GSA) und wird von der γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenase PutC zu Glutamat oxidiert. Das es sich bei dem Substrat von PutC vermutlich um GSA und nicht um P5C handelt wird durch die Analyse der Aminosäuresequenz deutlich. Im N-terminalen Bereich von PutB existiert eine Region (Abb. 20), der eine Beteiligung an der Hydrolyse von P5C zu GSA zugesprochen wird (Ling *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnte in PutC ein in Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) hochkonservierter, potentiell katalytisch aktiver Cystein- und Glutamatrest identifiziert werden (Abb. 22). Die potentielle P5C Hydrolyse Region, sowie die

beiden konservierten Aminosäuren, konnten auch in den PutA-Proteinen, unter anderem von *E. coli*, identifiziert werden. Sie führten zu der Zuordnung der Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase (P5CDH-Domäne von PutA) zu der ALDH Superfamilie (Hempel & Jornvall, 1987; Hempel *et al.*, 1993; Ling *et al.*, 1994). Das bedeutet, dass γ -Glutamat-semialdehyd das Substrat für die P5CDH Domäne von PutA, und damit aller P5CDH ist (Ling *et al.*, 1994). Die P5CDH-Domänen und die P5CDH repräsentieren eine neue Gruppe von ALDH, die γ -Glutamyl-semialdehyd Dehydrogenasen (GGSALDH) (Ling *et al.*, 1994; Perozich *et al.*, 1999). Die aus 13 Familien bestehende ALDH Superfamilie wird in zwei Untergruppen geteilt, den Substratunspezifischen und den Substratspezifischen ALDH. Die GGSALDH gehören zu den Substratspezifischen ALDH, bestehend aus einem Dimer und mit NAD als Coenzym.

Interessanterweise sind, bis auf *B. subtilis* und *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), in allen bisher untersuchten prokaryotischen Organismen die beiden Prolin-abbauenden Enzyme in einem einzigen Protein, mit zwei enzymatischen Domänen, einer PDH und einer GGSALDH, vereinigt (Abb. 19). Dagegen erfolgt der Prolinabbau in den eukaryotischen Organismen, wie auch in *B. subtilis*, durch zwei verschiedene Proteine, einer PDH und einer GGSALDH. Die Oxidation von GSA durch ein multifunktionales Fusionsprotein wurde bisher nur in Prokaryonten entdeckt. Sie gehören zum Typ II der GGSALDH, während PutC und RocA, als einzige prokaryotische GGSALDH, zusammen mit den eukaryotischen Enzymen den Typ I der „freien“ GGSALDH bilden (Perozich *et al.*, 1999).

Die enge räumliche Anordnung der Prolin-abbauenden Gene *putB*, *putC* und *putP*, sowie eine σ^A -abhängige Promotorregion (Abb. 28) vor und eine Terminatorsequenz nach den *putBCP*-Genen (Abb. 18) spricht für die Organisation der Gene in einem gemeinsamen Operon. Diese Hypothese konnte mittels Northern-Blot Analysen auf molekularer Ebene, durch Detektion einer spezifischen, polycistronischen mRNA, mit der Länge eines *putBCP*-Operons bestätigt werden (Abb. 27).

Die chromosomale Deletion des *putBCP*-Operons in *B. subtilis* führt zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit auf Prolin als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zu wachsen (Tab. 7). Neben PutC konnte in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Arbeiten von De Hauwer *et al.* (1964), Atkinson *et al.* (1990) und Fisher *et al.* (1996) noch eine zweite GGSALDH, RocA, in *B. subtilis* identifiziert werden. RocA wurde als ein am Arginin-Stoffwechsel beteiligtes Enzym charakterisiert, welches als GGSALDH, die Umsetzung von GSA zu Glutamat katalysiert (De Hauwer *et al.*, 1964; Calogero *et al.*, 1994; Gardan *et al.*, 1995). RocA besitzt eine 69 %ige Sequenzidentität zu PutC (Abb. 22) und ist in der Lage PutC zu ersetzen, so dass eine *putC*-Mutante auf Prolin als N-Quelle wachsen kann (Tab. 7). Das Unvermögen der *putC*-Mutante auf Prolin als C-Quelle zu wachsen, ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Deletion im *putC*-Gen wahrscheinlich einen polaren Effekt auf die Transkription des *putP*-Gens hat. So wird, durch die fehlende Prolin Permease PutP, weniger Prolin in die Zellen transportiert, wodurch vermutlich zu wenig Prolin zum Aufbau der Zellsubstanz oder als Energiequelle zur Verfügung steht. Da vergleichsweise weniger Stickstoff zur Proliferation der Zellen benötigt wird, ist beim Wachstum auf Prolin als N-Quelle, der Ausfall der Prolin Permease PutP nicht

offensichtlich. Das für eine Prolin Dehydrogenase (PDH) kodierende *putB*-Gen, spielt eine Schlüsselrolle im Abbau von Prolin zu Glutamat, da PutB nicht durch alternative Enzyme ersetzt werden kann. Eine *putB*-Mutation führt zu einem Verlust der Fähigkeit auf Prolin als C- oder N-Quelle zu wachsen (Tab. 7). Die essentielle Bedeutung von PutB konnte auch durch die Bestimmung der Enzymaktivität der PDH bestätigt werden. Diese beruht auf einem kolorimetrischen Test, in dem die Umsetzung von Prolin zu P5C, durch die Bildung eines Chromophors, zwischen P5C und *o*-Aminobenzaldehyd gemessen wird (Dendinger & Brill, 1970). Während die exogene Zugabe von Prolin im Wildtyp zu einer 14-fachen Steigerung der PDH-Aktivität führt, ist in einer *putB*-Deletionsmutante keine Enzymaktivität mehr zu beobachten (Tab. 8).

Dennoch konnte durch die systematische Sequenzierung des *B. subtilis*-Genoms ein offener Leserahmen (*yusM*) identifiziert werden, dessen abgeleitetes Protein, aufgrund seiner Homologie, als PDH beschrieben wurde. Obwohl YusM eine 49 % Sequenzidentität zu PutB (Abb. 21) besitzt, ist es offensichtlich nicht in der Lage, die Funktion des PutB-Proteins in einer *putB*-Mutante vollständig zu ersetzen. Auch hier muß der polare Effekt der *putB*-Deletion auf die Transkription des *putC*- und *putP*-Gens beachtet werden. Da jedoch, wie zuvor beschrieben, eine *putC*-Mutante auf Prolin als N-Quelle wachsen kann, ist davon auszugehen, dass PutB essentiell für den Prolinabbau in *B. subtilis* ist.

2.2 Der Abbau von Prolin zu Glutamat in verschiedenen Organismen

In Pro- und Eukaryonten wird die Umsetzung von Prolin zu Glutamat durch zwei verschiedene Enzymsysteme katalysiert. In allen Prokaryonten erfolgt, mit Ausnahme von *B. subtilis*, der dreistufige Prolinabbau durch PutA, einem bifunktionellen Protein mit zwei enzymatischen Domänen, eine für die Prolin Dehydrogenase (PDH) und eine für die γ -Glutamat-semialdehyd Dehydrogenase (GGSALDH). Die PDH katalysiert, unter Reduktion von eng assoziiertem FAD, die Oxidation von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C). P5C hydrolysiert spontan zu γ -Glutamat-semialdehyd und wird durch die GGSALDH, unter Reduktion von NAD, zu Glutamat oxidiert. Für *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass es dabei zu keiner Freisetzung des Intermediates P5C kommt. PutA transportiert P5C direkt durch einen „leaky-channel“ Mechanismus zwischen den beiden enzymatischen Domänen (Surber & Maloy, 1998). Die Regulation der *putA*-Gen Transkription erfolgt durch zwei verschiedene Mechanismen. In den Enterobakterien *E. coli*, *S. typhimurium* und *Klebsiella aerogenes* erfordert der Prolinabbau die zwei Proteine PutA und PutP, deren Gene zueinander divergent in dem *put*-Operon angeordnet sind (Chen *et al.*, 1998, Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993; Ling *et al.*, 1994). Dabei ist PutP die bedeutendste Prolin Permease, während das multifunktionale, periphere Membranprotein PutA nicht nur die Oxidation von Prolin zu Glutamat katalysiert, sondern darüber hinaus auch als Transkriptions-Repressor des *put*-Operons fungiert. In Anwesenheit von Prolin ändert sich der Redox-Zustand von PutA, das daraufhin mit der cytoplasmatischen Membran assoziieren kann und so die Transkription von PutP und PutA ermöglicht. Wenn die Prolinkonzentration wieder abnimmt, akkumuliert PutA im Cytoplasma und interagiert mit dem

put-spezifischen Operatorbereich, die Transkription wird reprimiert (Wood, 1987; Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993; Muro-Pastor & Maloy, 1995; Surber & Maloy, 1998).

Im Gegensatz zu den Enterobakterien ist in *R. capsulatus*, *A. tumefaciens* und *B. japonicum* (Keuntje *et al.*, 1995, Cho & Winans 1996; Straub *et al.*, 1996; Jafri *et al.*, 1999) das Gen für die Prolin Permease nicht unmittelbar neben dem *putA*-Gen angeordnet. Anstelle dessen befindet sich ein ebenfalls divergent angeordnetes regulatorisches Gen, *putR*, stromaufwärts von *putA*. Die PutR Proteine der oben aufgeführten Organismen zeigen eine große Homologie zu den regulatorischen Proteinen Lrp und AsnC von *E. coli*, BkdR von *Pseudomonas putida* und Grp von *Zymomonas mobilis* (Jafri *et al.*, 1999; Keuntje *et al.*, 1995). Neben PutR konnte bisher nur Lrp selber und BkdR biochemisch charakterisiert werden. In *E. coli* ist Lrp ein generelles Stressprotein, das für die Leucin-abhängige Kontrolle von mehreren Duzend Operons verantwortlich ist (Calvo & Matthews, 1994). BkdR ist ein positiver Transkriptionsregulator des *bkd*-Operons, das für eine Multikomponenten Dehydrogenase kodiert (Madhusudhan *et al.*, 1993). Das PutR Protein von *R. capsulatus* und *A. tumefaciens* ist an der Substrat-abhängigen Aktivierung von *putA* und der Autorepression seiner eigenen Transkription beteiligt. Es besitzt einen N-terminalen Bereich mit einem konservierten Helix-Turn-Helix Motiv, mit dem es wahrscheinlich direkt an die Region zwischen dem *putR* und *putA* Gen bindet, unabhängig von der Prolinkonzentration. Dies erklärt die Beobachtung, dass PutR seine eigene Transkription reprimiert und läßt vermutet, dass das gebundene PutR-Protein bei Anwesenheit von Prolin, eine Konformationsänderung erfährt (Keuntje *et al.*, 1995; Cho & Winans, 1996; Jafri *et al.*, 1999). In Abwesenheit von Prolin reguliert PutR die Transkription von *putA* auf niedrigem Niveau, während in Anwesenheit von Prolin, die Expression von *putA* um das 100-fache gesteigert wird. Neben der positiven Regulation durch PutR erfolgt in *R. capsulatus*, wie auch in den Enterobakterien, eine negative Autoregulation durch PutA (Keuntje *et al.*, 1995). In Kontrast dazu hat in *A. tumefaciens* PutA keinen Einfluß auf seine eigene Transkription (Jafri *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu den Prokaryonten katalysieren die eukaryotischen Organismen die Umsetzung von Prolin zu Glutamat durch zwei verschiedene Enzyme, der PDH und der GGSALDH. In *S. cerevisiae* erfolgt der Prolinabbau über die Proteine PUT1 (PDH) und PUT2 (GGSALDH), deren Transkription durch Prolin induziert und über PUT3 aktiviert wird. Der Regulator PUT3 bindet konstitutiv mit seinem N-terminus, einem Cystein-reichen Zink-Cluster Motiv, an eine kurze DNA-Sequenz im Promotorbereich der *PUT1* und *PUT2* Gene. Eine auch in vielen Pilz-Aktivatoren zentrale Domäne in der Mitte des PUT3 Proteins spielt eine Rolle in der Aktivierung der Transkription. Daneben erfolgt die Regulation und Aktivierung der Transkription durch den negativ geladenen Carboxyterminus. Durch die Prolin-induzierte Expression der Strukturgene *PUT1* und *PUT2* werden zunächst zwei Prepeptide gebildet, die erst nach dem Transport aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien in die aktive Form überführt werden (Brandriss & Magasanik, 1979; Krzywicki & Brandriss, 1984; Wang & Brandriss 1986; des Etages *et al.*, 1996).

Wie in *B. subtilis* induziert hyperosmotischer Stress auch in vielen Pflanzen eine schnelle Akkumulation von Prolin durch *de novo* Synthese aus Glutamat. Zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase erfolgt, nach der hyperosmolaren Belastung, die schnelle Oxidation von Prolin zu Glutamat. Über den Prolinabbau in Pflanzen ist vergleichsweise wenig bekannt. Der erste Schritt ist auch hier die Oxidation von Prolin zu P5C durch das mitochondriale, innere Membranenzym PDH. In Pflanzen ist dieses Enzym mit der Respiratorischen Elektronentransportkette verbunden, die den Prolinabbau mit der ATP-Bildung koppelt (Elthon & Stewart, 1981). Auf genetischer Ebene wurde bisher nur eine PDH aus *A. thaliana* beschrieben (Verbruggen *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass der Prolinkatabolismus durch die Transkription des *ATPDH* Gens reguliert wird. Unter hochosmotischen Bedingungen ist die Transkription reduziert und wird erst nach einem hypoosmotischen Schock wieder erhöht. Die Zugabe von exogenem Prolin induziert die *ATPDH* Transkription, dieser induzierende Effekt von Prolin erfolgt jedoch nicht unter hyperosmotischem Stress. Es wird vermutet, dass die Regulation durch einen Repressor erfolgt, der die Transkription in Abhängigkeit von der Osmolarität reguliert (Verbruggen *et al.*, 1996).

2.3 Der Prolin Transporter PutP

Der Prolin Transporter PutP zeigt eine 63 %ige Identität (Abb. 24) zu dem osmotisch regulierten Prolin Transporter OpuE aus *B. subtilis* (von Blohn *et al.*, 1997). Aufgrund der hohen Verwandtschaft handelt es sich bei diesen Prolin Permeasen offensichtlich um ein bewährtes Modul, das infolge der unterschiedlichen Regulation verschiedene Funktionen erfüllt. Das osmotisch induzierbare OpuE-Protein ist für den Transport von Prolin, als osmotische Schutzsubstanz und damit für die Osmoadaptation, essentiell (von Blohn *et al.*, 1997). Demgegenüber transportiert, die durch Prolin induzierbare und unter hohen Osmolaritäten reprimierte PutP Permease, Prolin ausschließlich für katabole Zwecke.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die unterschiedlichen physiologischen Funktionen von PutP und OpuE zunächst anhand ihrer kinetischen Parameter demonstriert werden (Tab. 9). Beide Permeasen besitzen mit K_m -Werten von 8 μM (PutP) bzw. 12 μM (OpuE) eine hohe Affinität zu Prolin, die sich in der OpuE-Permease mit zunehmender Osmolarität auf 22 μM reduziert. Die Differenzierung beider Permeasen wird bei der Betrachtung der Transportraten deutlich. Die PutP-Permease zeigt die höchste Transportrate in Prolinhaltigem Medium geringer Osmolarität. Bei zunehmender Osmolarität nimmt die Transportrate drastisch ab, so dass in für *B. subtilis* moderaten Osmolaritäten von 1100 mOsm kein Prolintransport mehr über PutP erfolgt. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (von Blohn *et al.*, 1997) konnte der osmotisch induzierte Prolintransport durch OpuE, im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden. OpuE ist der PutP-Permease entgegengesetzt reguliert, so dass in niederosmolarem Medium auch bei Existenz von exogenem Prolin nur eine geringe Transportrate zu beobachten ist. Diese steigt, jedoch unabhängig von exogenem Prolin, mit zunehmender Osmolarität an, und erreicht ihre maximale Umsatzrate bei einer Osmolarität von 1480 mOsm (Tab. 9).

Damit wird deutlich, dass die Prolin-induzierte PutP Permease für die Aufnahme von Prolin bei geringer Osmolarität verantwortlich ist. Diese Beobachtung wird durch Wachstumsexperimente mit Prolin als C-Quelle unterstützt (Abb. 29). Während in der PutP-Mutante SMB11, bei geringer Osmolarität, ein signifikant reduziertes Wachstum beobachtet werden kann, ist der Wachstumsphänotyp in der OpuE-Mutante BLOB9 nur minimal. Unter hochosmotischen Bedingungen erfolgt der Transport von Prolin als C-Quelle fast ausschließlich durch das osmotisch induzierbare OpuE-System. Dies belegen, neben den oben aufgeführten kinetischen Parametern, auch Expressionstudien mit einem *putB-treA* Reporterstamm (Abb. 36B). Die Daten zeigen, dass der Prolintransport und damit das Wachstum auf Prolin als C-Quelle bei geringer Osmolarität von PutP, und unter hochosmotischen Bedingungen von OpuE abhängig ist. Die physiologisch wichtigste Funktion von OpuE besteht jedoch im Transport von Prolin, zur Adaptation an hochosmotischen Bedingungen, und damit zur Akkumulation als osmoprotektive Substanz.

Das in *B. subtilis*, neben PutP, noch weitere Permeasen existieren, welche die Aufnahme von Prolin in niederosmolarem Medien katalysieren, konnte durch Experimente mit *putP/opuE*-Mutanten, in Medien geringer Osmolarität demonstriert werden. Obwohl beide Prolin Permeasen deletiert waren konnte eine Induktion der Prolin-abbauenden Gene, durch exogenes Prolin, beobachtet werden, die im Vergleich zum Wildtyp nur um die Hälfte reduziert war (Abb. 36A). Darüber hinaus zeigte die Doppelmutante eine Sensitivität gegenüber des toxischen Prolinanalogs, L-Azetidin-2-carbonsäure (Abb. 30).

Neben PutP und OpuE erfolgt der Transport von Prolin vermutlich durch RocC. RocC ist eine potentielle Aminosäure Permease (Gardan *et al.*, 1995), von der angenommen wird, dass sie neben Arginin auch Prolin, Ornithin und Citrullin für den Argininstoffwechsel transportiert (Calogero *et al.*, 1994; Gardan *et al.* 1995 + 1997). Die Suche nach weiteren Prolin Transportern, mit Homologien zur Aminosäuresequenz von PutP aus *B. subtilis*, erfolgte mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) in der SubtiList Datenbank. Dabei konnten vier Proteine identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz eine Identität von 26% (YwcA), 18 % (YhjB) und 14 % (YodF) zu PutP aufweisen. Bis auf YodF mit 305 Aminosäuren entsprechen die anderen Proteine mit ca. 500 Aminosäuren der Größe von PutP Proteinen. YwcA weist Ähnlichkeiten zu Proteinen mit Natrium-abhängigen Symport auf. Die Suche nach der für SSF-Proteine beschriebenen potentiellen Natrium-Bindestelle, in der Aminosäuresequenz von YwcA, zeigte nur eine geringe Übereinstimmung. Ob es sich bei den aufgeführten Proteinen um Prolin Permeasen handelt, kann durch die Mutation der betreffenden Gene geklärt werden.

Wie in *B. subtilis* existieren auch in dem nahe verwandten Gram-positiven Bakterium *S. aureus* zwei Aufnahmesysteme für Prolin: ein hochaffines System (PutP), transportiert Prolin für katabole Zwecke in die Zelle und ein bisher noch nicht identifiziertes, niederaffines osmotisch induzierbares System, akzeptiert neben Prolin auch Glycin-Betain als Substrat (Townsend & Wilkinson, 1992; Pourkomialian & Booth, 1992; Bae & Miller, 1992; Wengender & Miller, 1995; Schwan *et al.*, 1997). Eine ähnliche Situation wurde in *C. glutamicum* beobachtet. Das

hochaffine Transportsystem PutP versorgt die Zelle mit Prolin für Stoffwechselprozesse, und kann nicht durch einen Wechsel der externen Osmolarität induziert werden. Ein weiteres, bisher nicht identifiziertes Transportsystem mit geringer Affinität zu Prolin ist dagegen osmotisch induzierbar und transportiert neben Prolin auch Glycin-Betain und Ectoin (Peter *et al.*, 1997). In den Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *S. typhimurium* existieren drei Transportsysteme für Prolin. PutP besitzt die höchste Affinität zu Prolin und ist vorherrschend, wenn Prolin als Energie-, Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle benötigt wird. Die beiden Transportsysteme ProP und ProU sind osmotisch induzierbare Glycin-Betain Transporter, die mit geringer Affinität auch Prolin transportieren (Dunlap & Csonka, 1985; Wood, 1988; Csonka, 1988). Das Prolin Transportsystem PutP wird auf einem geringen Niveau konstitutiv expremiert, durch Zugabe von Prolin wird die Expression jedoch gesteigert (Wood, 1988; Dendinger & Brill, 1970).

Die PutP Permeasen von *E. coli* und *S. typhimurium* sind von Reizer *et al.* (1994) der Familie von Solute-Symportern (SSF) zugeordnet worden, die ein spezifisches Substrat im Cotransport mit Natrium-Ionen in die Zelle transportieren. Diese Familie umfaßt 14 Proteine, davon sechs aus Gram-negativen Bakterien und acht aus Säugetieren. Die Substratspezifität dieser Proteine umfaßt Pantothersäure und Prolin in Bakterien und Nukleoside, Glucose und neutrale Aminosäuren in Säugetieren. Neben OpuE aus *B. subtilis* repräsentieren die PutP Permeasen aus *S. aureus* und *C. glutamicum* neue Mitglieder der SSF-Proteinen aus Gram-positiven Bakterien (Wengender & Miller, 1995; Peter *et al.*, 1997; von Blohn *et al.*, 1997). Durch die deutliche Homologie zwischen PutP und OpuE aus *B. subtilis*, sowie zu den übrigen PutP Permeasen (Abb. 24), wurde PutP aus *B. subtilis* der Familie der SSF-Proteine zugeordnet. Die Analyse der SSF-Proteine offenbarte zehn Aminosäuren, die in allen Proteinen hoch konserviert waren, sowie ein potentiell Natrium-Bindestellen-Motiv (Deguchi *et al.*, 1990; Reizer *et al.*, 1994). Darüber hinaus wird einem Aspartatrest eine Funktion bei der Na⁺-abhängigen Bindung von Prolin zugesprochen, und der daneben liegende Serinrest soll in unmittelbarer Nähe zur Prolin-Bindedomäne liegen (Quick *et al.*, 1996; Quick & Jung, 1997). Durch direkten Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Prolin Permeasen wurde deutlich, dass bis auf PutP aus *B. subtilis* alle Prolin Permeasen mit ca. 490 Aminosäuren von gleicher Größe sind. Da jedoch die Sequenz vor dem potentiellen Proteinanfang von PutP eine hohe Homologie zu dem N-terminalen Bereich der anderen Prolin Permeasen aufweist, ist davon auszugehen, dass der im Genom-Sequenzierprojekt (Yamane *et al.*, 1996) vorgeschlagene Leserahmen erweitert werden muß. Dafür spricht auch das im folgenden aufgeführte Sekundärstruktur-Modell für die SSF-Proteine.

Die Topologie der Na⁺/Prolin Transporter wurde bisher durch Hydropathie-Analysen bestimmt. Danach ging man von einem hydrophoben Protein, mit 12 α -helicalen Transmembran-Domänen aus, welche durch hydrophile Loops miteinander verbunden waren (Nakao *et al.*, 1987). In diesem Modell befanden sich der Amino- und Carboxyterminus im Cytoplasma (von Heijne, 1992). Basierend auf den Experimenten mit *phoA/lacZ*-Operonfusionen wurde von Jung *et al.* (1998) ein neues Sekundärstruktur-Modell für PutP aufgestellt, bestehend aus 13 α -helicalen Transmembran-Domänen, mit einem N-terminus außerhalb und einem C-terminus innerhalb des

Cytoplasmas. Die 13-Helix Struktur wird als ein gemeinsames topologisches Motiv für alle Mitglieder der Na⁺/Substrat Cotransporter diskutiert. Unterstützt wird dieses Modell durch die gleichzeitige Zuordnung der PutP Transporter von, unter anderen *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* und *S. aureus*, zu der Familie der SGLT Cotransporter (Turk & Wright, 1997). Diese Familie umfaßt die zu Na⁺/Glucose Cotransportern homologen Proteine von Säugetieren, Eubakterien, Hefen, Insekten und Nematoden.

2.4 Regulation des Prolinabbaus in *B. subtilis*

Prolin dient in *B. subtilis* als ergiebige Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und ermöglicht als osmoprotektive Substanz, das Wachstum der Zellen unter hochosmotischen Bedingungen. Exogen vorliegendes Prolin wird in niederosmolarem Medium über die Prolin Permease PutP und unter hochosmolaren Bedingungen, durch die Prolin Permease OpuE importiert. Unter osmotischen Stressbedingungen erfolgt darüber hinaus eine osmotisch induzierbare Prolinsynthese (Abb. 5). Für das Überleben der Zellen in einer Umgebung, mit den durch schwankende Osmolaritäten verursachten Stressbedingungen, ist es notwendig, das in hohen Konzentrationen akkumulierte Prolin nach einem hypoosmotischen Schock zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase zu nutzen (Verbruggen *et al.*, 1996).

Neben *B. subtilis* induziert osmotischer Stress in einer Vielzahl von Mikroorganismen und Pflanzen die *de novo* Synthese von Prolin. Während in Pflanzen die Prolinsynthese im Cytoplasma und der Prolinabbau in den Mitochondrien erfolgt, findet in Prokaryonten die Synthese und Abbau von Prolin in nur einem Kompartiment, dem Cytoplasma, statt. Damit besteht für *B. subtilis* die Notwendigkeit den Abbau von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen zu regulieren, um eine gleichzeitige Synthese und Abbau von Prolin zu vermeiden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten detaillierte Einblicke in die Regulation, der für den Prolinabbau in *B. subtilis* verantwortlichen Proteine PutB und PutC, sowie der Prolin Permease PutP gewonnen werden.

Die Regulation des Prolinabbaus wurde zunächst auf Ebene der Transkription, durch die Konstruktion einer im *B. subtilis*-Chromosom integrierten Operonfusion (*putB-treA*) untersucht, bei der das *treA*-Reporter gen unter der Kontrolle des *putBCP*-Promotors stand (Abb. 31). In diesen *putB-treA* Fusionsstämmen konnte der σ^A -abhängige Promotor (Abb. 28) durch Zugabe von exogenem Prolin rasch stimuliert werden. Die Stärke der Expression stieg linear mit der zugegebenen Prolinkonzentration an (Abb. 32) und erreichte innerhalb einer Stunde ein Niveau, das im Rahmen des Meßzeitraumes aufrecht erhalten blieb (Abb. 33). Dabei führte die Zugabe von 1 mM Prolin zu einem 30-fachen Anstieg der *putBCP*-Transkription. Das bei Zugabe von Prolin das gesamte Operon transkribiert wird, konnte durch Northern-Blot Analyse bestätigt werden. Auch hier ist eine 30-fache Steigerung des mRNA-Transkriptes gegenüber uninduzierten Kulturen zu beobachten (Abb. 27). Interessanterweise erfolgt die Induktion der *putBCP*-Transkription durch exogenes Prolin auch bei erhöhter Osmolarität (Abb. 34), diese ist sogar gegenüber den Kulturen geringer Osmolarität gesteigert. Darüber hinaus ist in diesen Kulturen, das Basalniveau um das 3-fache gegenüber Kulturen niedriger Osmolarität erhöht.

Die Daten zeigen ein interessantes Phänomen, die Induktion des *putBCP*-Transkription erfolgt nur durch exogen zugeführtes Prolin. Das abhängig von der Osmolarität des Mediums endogen synthetisierte Prolin ist nicht in der Lage den *putBCP*-Promotor zu stimulieren. Das Erstaunliche daran ist, das *B. subtilis* in Medien mit einer Osmolarität von 1480 mOsm, Prolin in einer cytoplasmatischen Konzentration von 300 mM synthetisiert (Abb. 5), der Prolinabbau aber nur geringfügig induziert wird. Demgegenüber führt die exogene Zugabe von nur 1 mM Prolin zu einer vollständigen Induktion der *putBCP*-Transkription (Abb. 34).

Endogenes Prolin ist nicht in der Lage den Prolinabbau direkt zu induzieren. Die geringe Induktion durch das endogen synthetisierte Prolin beruht auf der ständigen Exkretion von Prolin aus dem Cytoplasma der Zellen und dem anschließenden Reimport, durch die Prolin Permease OpuE (Abb. 10). Dies konnte mit Hilfe einer *opuE*-Mutante demonstriert werden. Unter erhöhter Osmolarität ist in diesem Stamm keine geringfügige Induktion der *putBCP*-Transkription mehr zu beobachten (Abb. 36B). Die geringfügige Induktion der Prolin-abbauenden Gene konnte jedoch gesteigert werden, wenn die unter moderaten osmotischen Bedingungen kultivierten Wildtyp-Zellen einem hypoosmotischen Schock ausgesetzt wurden (Abb. 35). Dies ist damit zu erklären, dass nach einem hypoosmotischem Schock ein Efflux der in hohen Konzentrationen akkumulierten osmoprotektiven Substanzen, wie z.B. Prolin erfolgt. Die zunehmende extrazelluläre Konzentration von Prolin führt dann zu einem gesteigerten Prolin Import, wodurch die Induktion der Prolin-abbauenden Gene gesteigert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit für *B. subtilis* eine obligatorische Kopplung von Prolinabbau und Prolintransport charakterisiert werden. Dieser Regulationsmechanismus, der den Abbau von endogen synthetisierten Prolin verhindert, ist bisher in keinem weiteren Organismus gefunden worden. Lediglich in einer Mutante von *S. typhimurium* wurde eine solche Regulation untersucht, die Ergebnisse konnten eine Kopplung von Prolinabbau und Prolintransport jedoch nicht bestätigen (Ekena & Maloy, 1990).

Für verschiedenen Organismen, die in der Lage sind Prolin als osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren, konnte eine Regulation des Prolinabbaus auf enzymatischer Ebene gezeigt werden. So erfolgt in den Pflanzen *H. vulgare* und *Zea mays*, unter osmotischem Stress, eine Reduktion der Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase (PDH) (Stewart *et al.*, 1977; Rayapati & Stewart, 1991). In *A. thaliana* und *A. brasilense* beruht die osmotisch induzierte Akkumulation von Prolin auf einer reziproken Regulation der PDH und der Pyrrolin-5-carboxylat Synthetase (P5CS, verantwortlich für die Prolinsynthese). Während die Transkription der P5CS durch osmotischen Stress induziert wird, ist die PDH Aktivität unter diesen Bedingungen inhibiert (Peng *et al.*, 1996; Madkour *et al.*, 1990). Die in früheren Arbeiten durchgeführten Untersuchungen zur Regulation des Prolinabbaus in *B. subtilis* zeigten, dass die Prolin Dehydrogenase (PDH), das ersten Enzym im Prolinabbau, durch Prolin induziert werden kann (De Hauwer *et al.*, 1964; Fisher *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des zuvor beschriebenen PDH-Tests gezeigt werden, dass exogenes Prolin die Enzymaktivität um das 14-fache steigert (Tab. 8). Interessanterweise bewirkt auch in Medien höherer

Osmolarität, eine Induktion durch exogenes Prolin, eine Zunahme der Enzymaktivität, die sogar mit zunehmender Osmolarität geringfügig ansteigt. Damit ist ausgeschlossen, dass eine Regulation des Prolinabbaus unter osmotischem Stress, auf Reprimierung der Proteinaktivität beruht.

Die bisher dargestellten Daten zeigen, dass in *B. subtilis* die Regulation des Prolinabbaus unter osmotischem Stress und damit die Vermeidung eines „futile cycles“, nicht auf Reprimierung der Transkription oder Enzymaktivität beruht. Allein durch die Unterscheidung zwischen internem und externem Prolin verhindert *B. subtilis*, unter hochosmolaren Bedingungen, auf elegante Weise den Abbau der intrazellulär akkumulierten osmoprotektiven Substanz Prolin. Im folgenden wurden verschiedene Ansätze untersucht, um herauszufinden, wie *B. subtilis* zwischen internem und externem Prolin zu unterscheiden vermag.

Die Abhängigkeit der *putBCP*-Transkription von exogenem Prolin spricht dafür, dass extrazelluläres Prolin entweder direkt, oder bei seinem Transport durch die cytoplasmatische Membran, als Induktor wirkt und ein bisher nicht bekanntes Regulatorprotein aktiviert. Dieses Regulatorprotein muß in der Lage sein, mit der DNA in Wechselwirkung zu treten und die Transkription des *putBCP*-Operons bei Vorhandensein von externem Prolin zu induzieren oder in Abwesenheit von Prolin zu reprimieren. Bei diesem Regulatorsystem könnte es sich um ein Zwei-Komponenten System handeln. In diesem regulatorischen System würde Prolin als Stimulus dienen und die Autophosphorylierung des Sensor Proteins, einer Histidin Protein Kinase induzieren. Dieses Signal würde dann durch eine Phosphortransfer Reaktion auf die zweite Komponente, den Response Regulator übertragen werden, welcher im allgemeinen ein Transkriptions Aktivator ist. Die Protein Kinasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, den Membran-assoziierten Proteinen und den cytoplasmatischen Proteinen (Msadek *et al.*, 1993; Hoch & Silhavy, 1995). In Experimenten mit *B. subtilis*-Stämmen, die Mutationen in den Prolin Permeasen PutP und OpuE tragen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Induktion der *putBCP*-Transkription von dem Prolintransport durch die Prolin Permeasen abhängig ist (Abb. 36). Die induzierende Wirkung von Prolin ist dabei unabhängig von einem bestimmten Transportsystem, relevant für die Stärke der Transkription ist lediglich die Transportrate. So führt die Deletion der OpuE-Permease unter hochosmolaren Bedingungen zu einem fast völligen Erliegen der *putBCP*-Transkription. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine Membran-assoziierte Protein Kinase an der Regulation der Prolin-abbauenden Gene beteiligt ist, da sonst eine Induktion der *putBCP*-Transkription auch in den Transportermutanten erfolgen müßte. Es ist jedoch möglich, dass für eine cytoplasmatische Protein Kinase, der Import von Prolin, durch die verschiedenen Prolin Permeasen, ein Signal darstellt, wodurch die Regulation der *putBCP*-Transkription induziert wird.

In Enterobakterien erfolgt die Regulation des für den Prolinabbau verantwortlichen *putPA*-Operons durch das multifunktionale PutA-Protein selber. Neben seiner enzymatischen Funktion, der Oxidation von Prolin zu Glutamat, reprimiert PutA in Abwesenheit von Prolin die

Transkription des *putA*-Gens, indem es an die *put*-Kontrollregion bindet. Ist Prolin vorhanden, so ändert sich der Redoxzustand von PutA, es kommt zu einer Konformationsänderung, so dass sich PutA von der DNA löst und mit der cytoplasmatischen Membran assoziiert. Hier katalysiert PutA den enzymatischen Abbau von Prolin, gleichzeitig kann eine Induktion der *put*-Gene erfolgen. PutP ist eine Permease, die für den Transport von Prolin für metabolische Zwecke verantwortlich ist (Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993; Muro-Pastor & Maloy, 1995; Surber & Maloy, 1998). Die Anordnung des *putBCP*-Operons aus *B. subtilis* unterscheidet sich von dem *putPA*-Operon der Enterobakterien, es ist jedoch vorstellbar, dass es sich bei dem Regulatorprotein, das für die Induktion des *putBCP*-Operons verantwortlich ist, um PutB oder PutC handelt. Es zeigte sich jedoch, dass die Transkription des *putBCP*-Operons in *B. subtilis*-Stämmen, die Mutationen in den *putB*- oder *putC*-Genen tragen, bei Zugabe von exogenem Prolin weiterhin induzierbar ist und darüber hinaus stetig während des gesamten Versuchszeitraumes ansteigt (Abb. 37). Damit ist auszuschließen, dass es sich bei einem der beiden Enzyme um Aktivatorproteine handelt. Da unter uninduzierten Bedingungen keine konstitutive Expression der Gene nachgewiesen werden konnte, vielmehr die Transkriptionsrate auf Basisniveau liegt, ist auch auszuschließen, dass es sich bei PutB oder PutC um Repressorproteine handelt. Die Daten zeigen deutlich, dass die Prolin-abbauenden Enzyme PutB und PutC, weder als Aktivatoren noch als Repressoren an der Regulation der eigenen Transkription beteiligt sind.

Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass neben PutB eine weitere PDH existiert, die in Analogie zu dem PutA Protein aus Enterobakterien, direkt an der Regulation der *putBCP*-Transkription beteiligt ist. Wie zuvor beschrieben, befindet sich im *B. subtilis* Chromosom das Gen *yusM*, das eine 49 %ige Identität zu *putB* aufweist (Abb. 21). Die hohe Identität spricht dafür, dass es sich bei YusM ebenfalls um eine PDH handeln könnte, die Prolin zu P5C oxidiert, deren Aktivität aber sehr gering ist (Tab. 7 und 8). Um die Rolle von YusM bei der Regulation des Prolinabbaus in *B. subtilis* aufzuklären, ist es erforderlich eine Deletionsmutante zu konstruieren und deren Einfluß auf die Transkription zu untersuchen

Die Untersuchung der Regulation der *putBCP*-Transkription zeigte deutlich, dass *putB*- und *putC*-Mutanten einer höheren Sensitivität gegenüber Prolin besitzen, da die Transkriptionsrate, im Vergleich zu dem Wildtyp, weiter ansteigt (Abb. 37). Im Einklang mit diesen Daten steht die erhöhte Enzymaktivität der Prolin Dehydrogenase in einer *putC*-Mutante, hier ist die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um das 3,5-fache gesteigert (Tab. 8). Da in den *putB*- und *putC*-Deletionsstämmen, Prolin nicht mehr zu Glutamat abgebaut werden kann, ist es wahrscheinlich, dass entweder Prolin selbst oder das durch PutC synthetisierte Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) eine ständige induzierende Wirkung auf die *putBCP*-Transkription ausüben. Da endogenes Prolin keine induzierende Wirkung besitzt, kann eine fortlaufende Induktion durch Prolin nur erreicht werden, wenn dieses aus der Zelle exkretiert und wieder aufgenommen wird. Dieser Weg scheint jedoch unwahrscheinlich, da unter den Versuchsbedingungen, mit geringer Osmolarität, nur sehr geringe Prolinkonzentrationen exkretiert und recycelt werden (Abb. 10), die Transkriptionsrate aber deutlich ansteigt. Über die induzierende Wirkung von P5C ist bisher nichts bekannt. P5C

kann durch die P5C-Reduktase, dem letzten Enzym im Prolin Biosyntheseweg, wieder zu Prolin umgesetzt werden, wie zuvor aufgezeigt ist dieser Induktionsweg aber unwahrscheinlich. Eine direkte Induktion durch P5C scheint zunächst nicht möglich, da auch in den *putB*- und *putBCP*-Mutanten, welche Prolin nicht mehr zu P5C oxidieren können, steigende Transkriptionsraten zu beobachten sind. Wie zuvor erwähnt könnte es sich bei YusM um eine weitere PDH handeln, die für Induktion der *putBCP*-Transkription ausreichende Konzentrationen von P5C zur Verfügung stellt. Somit besteht die Möglichkeit, dass P5C als Induktor der *putBCP*-Transkription fungiert. Die Identifikation des Induktors kann durch Konstruktion einer P5C-Reduktase Mutante erfolgen, in der die *putBCP*-Transkription nach exogener Zugabe von Ornithin oder Arginin bestimmt wird. Ornithin und Arginin werden durch den Argininstoffwechselweg über P5C zu Glutamat umgesetzt, und können im Wildtyp die *putBCP*-Promotoraktivität induzieren (Abb. 33). Erfolgt in der P5C-Reduktase Mutante eine Induktion der *putBCP*-Transkription, so ist P5C der Induktor, ist keine Induktion meßbar, so ist Prolin der Induktor.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *B. subtilis*, durch die obligatorische Kopplung von Prolinabbau und Prolintransport, eine effektive Regulation des Prolinabbaus, gerade unter hochosmotischen Bedingungen erfolgt. Welcher Mechanismus die Zelle in die Lage versetzt, zwischen endogenem und exogenem Prolin zu unterscheiden, ist bisher nicht geklärt. Sollte jedoch genau ein Protein für die Erkennung von exogenem Prolin und damit für die Regulation der *putBCP*-Transkription verantwortlich sein, so würde eine Mutation in diesem Protein die Regulation der Transkription verhindern. Um dies zu erreichen wurde ein „Screen“ etabliert, der es ermöglicht mit Hilfe einer Reporterengenfusion, eine große Anzahl von *B. subtilis*-Stämmen auf Regulatormutanten zu untersuchen.

3. Efflux und Recycling von osmoprotektiven Substanzen

Der intrazelluläre Pool von osmotisch aktiven Soluten ist, auch unter konstanten physiologischen Bedingungen, einem ständigen Austausch durch Efflux und Recycling der osmoprotektiven Substanzen ausgesetzt. Der Efflux unter isoosmotischen Bedingungen ist ein langsamer Prozeß und erfolgt, wie auch nach einem moderaten osmotischen Schock, durch spezifische Proteine. Ein hypoosmotischer Schock führt demgegenüber zu einem massiven Efflux von osmoprotektiven Substanzen durch Mechanosensitive Kanäle (Csonka & Epstein, 1996; Glaasker *et al.*, 1996).

3.1 Efflux und Recycling von osmoprotektiven Substanzen bei konstanter Osmolarität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* unter konstanten hochosmotischen Bedingungen, die in hohen Konzentrationen akkumulierten osmoprotektiven Substanzen Prolin und Glycin-Betain, sowie das Glycin-Betain Vorläufermolekül Cholin, über die Membran exkretiert (Abb. 15). Gleichzeitig erfolgt ein Rücktransport dieser Solute über die hochaffinen osmotisch induzierbaren OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE Transporter, so dass der „Verlust“ von osmoprotektiven Substanzen relativ gering ist (Kempf & Bremer, 1998).

Demgegenüber konnte ein Nettoefflux und damit die extrazelluläre Akkumulation von osmoprotektiven Substanzen in verschiedenen Versuchsansätzen mit Transportermutanten demonstriert werden (Abb. 10, 11, 13 und 14). Hier wurde deutlich, dass die Stärke der Exkretion von der cytoplasmatischen Konzentration der osmoprotektiven Substanz abhängig ist (Abb. 10). Die physiologische Bedeutung des Recyclings wird in dem Wachstumsphänotyp von *B. subtilis*-Stämmen, mit Deletionen im Prolin- bzw. Glycin-Betain Transportsystem, offensichtlich (Abb. 9 und 12). Die Deletionsmutanten sind nicht mehr in der Lage, das exogene Prolin bzw. Glycin-Betain zu importieren, so dass ihre Fähigkeit zur Osmoadaptation reduziert ist. Die Ursache für die höhere Sensitivität gegenüber osmotischem Stress ist wahrscheinlich in der geringeren cytoplasmatischen Konzentration der osmoprotektiven Substanz (Abb. 10 und 14) und dem Energieverlust durch die zusätzliche Syntheseleistung begründet.

Der Efflux und anschließende Reimport von osmoprotektiven Substanzen, unter konstanten osmotischen Bedingungen, scheint in Mikroorganismen ein weit verbreitetes Phänomen zu sein, um die Zusammensetzung der cytoplasmatischen Solute zu regulieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für *B. subtilis* gezeigt werden, dass ein konstanter Efflux von Prolin und Glycin-Betain erfolgt. Gleichzeitig findet ein Reimport über die entsprechenden Transportsysteme statt. Da bisher nicht bekannt ist über welchen Mechanismus der Efflux erfolgt, werden drei Möglichkeiten diskutiert: Die Diffusion über die Membran, eine Inversion des Aufnahmesystems zum Exportsystem und der spezifische Transport über ein Exportsystem (Zittrich & Kramer, 1994). In *E. coli* wurde der Efflux von Glycin-Betain und Ectoin beobachtet, der Reimport erfolgt über die Transportsysteme ProU und ProP. Ein Efflux über ProU und PutP konnte nicht nachgewiesen werden (Lamark *et al.*, 1992; Jebbar *et al.*, 1992). *S. typhimurium* exkretiert Prolin und Glycin-Betain durch ein spezifisches Glycin-Betain/Prolin-Effluxsystem, das osmotisch reguliert, seine höchste Aktivität unter niedrigen Osmolaritäten besitzt. Der Reimport erfolgt über ProP und ProU (Csonka, 1988; Koo *et al.*, 1991). Auch in *Synechocystis sp.* ist der Efflux der osmotischen Schutzsubstanz Glycosylglycerol zu beobachten, während ein potentielles ABC-Transportersystem das exogene Glycosylglycerol wieder importiert (Hagemann *et al.*, 1997). In *L. plantarum* erfolgt ein Efflux von Glycin-Betain durch ein spezifisches Glycin-Betain Effluxsystem, der Reimport erfolgt über Transporter, die bisher erst auf physiologischer Ebene charakterisiert werden konnten (Glaasker *et al.*, 1996).

3.2 Efflux von osmoprotektiven Substanzen nach einem hypoosmotischen Schock

Bakterien passen sich an einen erhöhten Turgor durch den Efflux ihrer osmotischen Solute über zwei verschiedene Wege an. Nach einer moderaten Reduzierung der externen Osmolarität erfolgt in vielen Prokaryonten ein spezifischer Export von osmoprotektiven Substanzen, wie K^+ , Trehalose, Glutamat, Prolin und Glycin-Betain, während andere niedrig molekulare Verbindungen im Cytoplasma der Zelle zurückbleiben (Glaasker *et al.*, 1996). Wenn der Turgor durch einen starken und schnellen hypoosmotischer Schock ansteigt, öffnen sich Mechanosensitive (MS) Kanäle und es kommt zu einem schnellen Efflux der Solute (Csonka & Epstein, 1996).

Der Efflux von osmoprotektiven Substanzen nach einem hypoosmotischen Schock wurde bisher für verschiedenen Bakterien beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *B. subtilis* eine plötzliche Reduzierung der externen Osmolarität, einen Efflux der osmotischen Schutzsubstanz Glycin-Betain zur Folge hat. Das Ausmaß des Glycin-Betain Efflux ist dabei abhängig von der Höhe des hypoosmotischer Schocks (Abb. 16). In *L. plantarum* erfolgt nach einem hypoosmotischen Schock in der ersten Phase ein schneller Efflux von Glycin-Betain, möglicherweise über einen MS Kanal, gefolgt von einer langsameren zweiten Phase, vermutlich über ein Exportsystem. Der Import von Glycin-Betain ist unter diesen Bedingungen stark inhibiert. *L. plantarum* ist durch die positive und negative Regulation von Aufnahme und Efflux in der Lage, sich schnell an hohe und niedrige Osmolaritäten anzupassen (Glaasker *et al.*, 1996). Auch in *Listeria monocytogenes* erfolgt nach einem hypoosmotischen Schock ein biphasischer Efflux von Glycin-Betain und Carnitin. Nach dem schnellen Efflux durch eine Kanal-ähnliche Aktivität, folgt ein langsamerer Efflux insbesondere von Glycin-Betain (Verheul *et al.*, 1997). *E. coli* zeigt nach einem hypoosmotischen Schock einen kurzen, spezifischen und extrem schnellen Efflux von osmotischen Soluten wie K^+ , Glutamat und Trehalose. Aufgrund der kinetischen Daten wurde vermutet, dass Kanäle und nicht Exporter in diesem Efflux involviert sind (Schleyer *et al.*, 1993). Durch die molekulare Charakterisierung von MS Kanälen in *E. coli* konnte inzwischen gezeigt werden, dass MS Kanäle essentiell für das Überleben der Zellen nach einem hypoosmotischen Schock sind (Sukharev *et al.*, 1994; Cui & Adler, 1996; Levina *et al.*, 1999). *C. glutamicum* exkretiert nach einem hypoosmotischen Schock osmoprotektive Substanzen wie Glycin-Betain und Prolin, während der Efflux von Molekülen gleicher Größe wie Glutamat und Lysin beschränkt ist, ATP verbleibt vollständig im Cytoplasma (Ruffert *et al.*, 1997). Auf physiologischer Ebene konnten kürzlich zwei MS Kanäle in *C. glutamicum* identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich für den Efflux von Prolin und Glycin-Betain unter hypoosmolaren Bedingungen verantwortlich sind (Ruffert *et al.*, 1999). Der geringe Efflux von Glutamat nach einem hypoosmotischen Schock erfolgt durch ein Energie-abhängiges, spezifisches Exportsystem. Der Efflux über dieses System wird durch Veränderungen des physikalischen Zustands der Membran induziert, so auch durch osmotischen Stress (Krämer *et al.*, 1994). In *S. typhimurium* führt eine plötzliche Verringerung des osmotischen Drucks zu einem schnellen Efflux von Glycin-Betain (Koo *et al.*, 1991).

3.3 Mechanosensitive Kanäle

Mechanosensitivität, die Fähigkeit einen mechanischen Stimulus zu detektieren, ist in vielen sensorischen Systemen von Pro- und Eukaryonten verbreitet. Die in Prokaryonten vorhandenen Mechanosensitiven (MS) Kanäle öffnen sich als Antwort auf hohen cytoplasmatischen Druck. Man geht davon aus, dass durch einen hypoosmotischen Schock, das cytoplasmatische Volumen ansteigt, wodurch sich die Cytoplasmamembran ausdehnt und gegen die Zellwand gedrückt wird. Die aus einem Murein-Sacculus bestehende Zellwand gibt diesem Druck nur unwesentlich nach, wodurch sich der cytoplasmatische Turgor erhöht. MS Kanäle, die sich in der cytoplasmatischen Membran befinden erfahren infolge dieses Drucks eine Konformations-

änderung, ein Kanal wird gebildet und es kommt zum Efflux von cytoplasmatischen Soluten. Die Substratspezifität der MS Kanäle konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Spezifität der Kanäle von den Schockbedingungen abhängig ist (Schleyer *et al.*, 1993). Dabei sind neben der Osmolarität, die Temperatur und die Durchführung des osmotischen Schocks wichtige Parameter (Tsapis & Kepes, 1977; Tschichholz & Trüper, 1990; Koo *et al.*, 1991; Berrier *et al.*, 1992). Demgegenüber spricht der von Ajouz *et al.* (1998) beobachtete Efflux des 12 kDa großen Thioredoxins, durch einen MS Kanal (MscL), für einen unspezifischen Efflux cytoplasmatischer Solute, nach einem hypoosmotischen Schock. Messungen ergaben, dass die offene Pore des MscL Kanals eine Größe zwischen 30 und 40 nm im Durchmesser besitzt, wodurch ebenfalls keine Selektivität zu erwarten wäre (Cruickshank *et al.*, 1997; Sukharev *et al.*, 1999).

Mechanosensitive Kanäle wurden seit ihrer ersten Charakterisierung, im Skelettmuskel von Hühnern (Guharay & Sachs, 1984), in vielen Membranen von Tieren und Pflanzen entdeckt (Hamill *et al.*, 1981, 1992; Morris, 1990). In Mikroorganismen zeigten erste patch-clamp Experimente mit Protoplasten aus *E. coli* zwei Kanalaktivitäten: Ein Kanal weist eine schnelle Kinetik und große Leitfähigkeit auf (MscL; Mechanosensitive channel Large conductance) und ein zweiter zeigt eine langsamere Kinetik und eine geringere Leitfähigkeit (MscS Small) (Martinac *et al.*, 1987, 1990; Sukharev *et al.*, 1993, 1997; Cui *et al.*, 1995). Die Unterscheidung zwischen zwei Kanälen wurde später ergänzt durch die Einteilung der MS Kanäle, aufgrund ihrer Leitfähigkeit, in drei Gruppen: MscL, MscS und MscM (Msc Mini) (Berrier *et al.*, 1996). In den Gram-positiven Bakterien *Streptococcus faecalis* und *B. subtilis* wurden MS Kanäle unterschiedlicher Leitfähigkeit charakterisiert (Zoratti & Petronelli, 1988; Zoratti *et al.*, 1990; Szabó *et al.*, 1992; Alcayaga *et al.*, 1992).

MscL aus *E. coli* (Eco-MscL) stellt den ersten aus Prokaryonten isolierten MS Kanal dar (Sukharev *et al.* 1993). Die Deletion von *mscL* führte zu einem vollständigen Verlust der zuvor durch patch-clamp Experimente gemessenen Leitfähigkeit (Sukharev *et al.* 1994). Inzwischen wurden in mehr als 20 verschiedenen Prokaryonten homologe Proteine zu Eco-MscL gefunden (Moe *et al.*, 1998). Durch die Kristallisierung des MscL-Kanals aus *M. tuberculosis* (Tb-MscL) wurde das Strukturmodell verbessert und damit eine Grundlage zum besseren Verständnis der Funktionsweise von MS-Kanäle geschaffen. Der Kanal ist als Homopentamer organisiert, wobei jede Untereinheit aus zwei Transmembran α -Helices und einer dritten cytoplasmatischen α -Helix besteht (Blount *et al.*, 1996; Häse *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998). Auf der extrazellulären Seite befindet sich eine mit Wasser gefüllte Öffnung, die zu einer Pore mit hydrophilen Aminosäureresten führt, die sich an der cytoplasmatischen Seite zu einer hydrophoben Spitze verengt, welche als Kanal-Tor dienen könnte (Chang *et al.*, 1998). Da durch Studien mit Eco-MscL gezeigt werden konnte, dass die Kanalöffnung einzig und allein durch das Protein selber erfolgt (Sukharev *et al.*, 1994), ist davon auszugehen, dass integrale strukturelle Veränderungen zu einer Kanalöffnung führen. Der MscL Kanal (Chang *et al.*, 1998) muß, um solch eine große Pore ausbilden zu können, in Form eines Fasses aufgebaut sein (Batiza *et al.*, 1999). Ausgehend

von dem Strukturmodell von Tb-MscL erscheint es möglich, dass die TM1 Helix, die in der Nähe des Kanals liegt, eine hydrophobe Barriere bildet, welche den Kanal verschließt (Chang *et al.*, 1998). Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Region auf der TM1 Helix, die neben mehrere Glycinresten ein Valin enthält. Jede Mutation dieser Aminosäure, die die Krümmung der Helix reduziert, führt zu einem Kanal, der leichter zu öffnen ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Glycinregion als eine Art Verschluss dient, um den Kanal zu schließen (Booth & Louis, 1999; Ou *et al.*, 1998). Die Öffnung des Kanals erfordert, dass die cytoplasmatischen Enden aller fünf Helices von der Mitte nach außen schwingen, gefolgt von den zehn Transmembran-Helices. Die Überwindung der enormen Energiebarriere, um die hydrophoben Aminosäurereste der Transmembran-Helices der wässrigen Umgebung auszusetzen, erfordert die mechanische Arbeit durch die Dehnung der Lipid-Doppelschicht (Batiza *et al.*, 1999).

Neben den MscL-Kanälen konnten durch neue Untersuchungen von Levina *et al.* (1999) in *E. coli* eine Reihe von Genen identifiziert werden, die zu einer neuen Proteinfamilie mit potentieller MscS-Funktion zusammengefaßt wurden (Levina *et al.*, 1999). Diese Familie umfaßt zwei Klassen von Proteinen: Große Proteine mit mehr als 700 Aminosäuren, die bisher nur in Gram-negativen Bakterien gefunden wurden, und kleinere Proteine mit 300 - 500 Aminosäuren, die in fast allen bakteriellen Genomen ubiquitär verbreitet sind. Gemeinsam ist beiden Proteinklassen die zweite Membrandomäne, sowie der cytoplasmatische C-Terminus (Levina *et al.*, 1999). *E. coli* besitzt drei Mitgliedern der großen Proteinklasse (KefA, YjeP und F786) und zwei Mitgliedern der kleinen Proteinklasse (YggB und F343). Es zeigte sich, dass Deletionsmutanten von KefA und YjeP nicht die Charakteristik der MscS Kanäle veränderten, während die Inaktivierung von YggB zu einem kompletten Verlust der MscS Leitfähigkeit führte.

Die Bestimmung der Sensitivität gegenüber einem hypoosmotischen Schock zeigte die essentielle Bedeutung der MS Kanäle MscL und YggB. Während die Einzelmutanten von MscL und YggB keinen Einfluß auf das Überleben der Zellen nach einen hypoosmotischen Schock zeigten, reduzierte eine Doppelmutante die Überlebensrate auf 10 % (Levina *et al.*, 1999). Damit konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass MS Kanäle für den Efflux von osmotisch aktiven Substanzen nach einem hypoosmotischen Schock verantwortlich sind.

Die Suche nach MS Kanälen in der *B. subtilis* Proteindatenbank führte zu verschiedenen Proteinen mit potentieller MS Kanal-Funktion. Hohe Homologien zu MscL-Proteinen verschiedener Organismen zeigt YwpC (Abb. 39). Daneben existieren drei Proteine YhdY, YkuT und YfkC, die den kleineren Proteinen der MscS Kanäle zugeordnet werden (Abb. 40; Levina *et al.*, 1999). Die drei Proteine besitzen analog zu den MscS Proteinen von *E. coli* eine hydrophobe Transmembran-Domäne und eine cytoplasmatische hydrophile Domäne. Das Protein YhdY besitzt die höchste Homologie zu YggB, sein kodierendes Gen *yhdY* ist vermutlich mit *yhdZ* in einem Operon angeordnet. Da YhdZ Homologien zu den Regulatorproteinen der SIR2 Familie aufweist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es an der Regulation der MS

Kanäle beteiligt ist. Eine geringere Homologie zu YggB besitzt Ykut, gefolgt von YfkC. Das Gen *yfkC* ist wahrscheinlich mit *yfkB* in einem Operon angeordnet, YfkB zeigt jedoch keine Homologien zu bereits charakterisierten Proteinen anderer Organismen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Deletion aller potentiellen MS Kanäle (YwpC, YhdY, YkuT und YfkC) und ihrer Regulatorproteine (YhdZ und YfkC) die Voraussetzung für die Analyse von MS Kanälen in *B. subtilis* geschaffen (Abb. 41).

VI. REFERENZEN

- Abrahamson, J. L., Baker, L. G., Stephenson, J. T., and Wood, J. M. (1983).** Proline dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. Properties of the membrane-associated enzyme. *Eur. J. Biochem.* **134**, 77-82.
- Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B. and Nielsen, S. (1993).** Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.* **0265**, F463-76.
- Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M., and Ghazi, A. (1998).** Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 26670-4.
- Alcayaga, C., Venegas, R., Carrasco, A., and Wolff, D. (1992).** Ion channels from the *Bacillus subtilis* plasma membrane incorporated into planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **311**, 246-50.
- Allen, S. W., Senti-Willis, A., and Maloy, S. R. (1993).** DNA sequence of the *putA* gene from *Salmonella typhimurium*: a bifunctional membrane-associated dehydrogenase that binds DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1676.
- Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F., and Trust, T. J. (1999).** Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-80.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-10.
- Anderson, R. R., Menzel, R., and Wood, J. M. (1980).** Biochemistry and regulation of a second L-proline transport system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **141**, 1071-6.
- Arakawa, T., and Timasheff, S. N. (1985).** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* **47**, 411-4.
- Atkinson, M. R., Wray, L. V., Jr., and Fisher, S. H. (1990).** Regulation of histidine and proline degradation enzymes by amino acid availability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**, 4758-65.
- Bae, J.-H., and Miller, K. J. (1992).** Identification of two proline transport systems in *Staphylococcus aureus* and their possible roles in osmoregulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 471-75.
- Baker, P. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Rob, A., and Stillman, T. J. (1992).** Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Implications for nucleotide. *J. Mol. Biol.* **228**, 662-71.
- Bakker, E. P., Booth, I. R., Dinnbier, U., Epstein, W., and Gajewska, A. (1987).** Evidence for multiple K⁺ export systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3743-9.
- Bakker, E. P., Borchard, A., Michels, M., Altendorf, K., and Siebers, A. (1987).** High-affinity potassium uptake system in *Bacillus acidocaldarius* showing immunological cross-reactivity with the Kdp system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 4342-8.
- Bakker, E. P. (1993).** Cell K⁺ and K⁺ transport systems in prokaryotes. In: Bakker, E. P (ed.) *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. Boca Ranton, Fl: CRS Press, 205-24
- Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D. (1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**, 205-7.

- Batiza, A. F., Rayment, I., and Kung, C. (1999).** Channel gate! Tension, leak and disclosure. *Structure* **7**, R99-R103.
- Berrier, C., Coulombe, A., Houssin, C., and Ghazi, A. (1989).** A patch-clamp study of ion channels of inner and outer membranes and of contact zones of *E. coli*, fused into giant liposomes. Pressure- activated channels are localized in the inner membrane. *FEBS Lett.* **259**, 27-32.
- Berrier, C., Coulombe, A., Houssin, C., and Ghazi, A. (1992).** Fast and slow kinetics of porin channels from *Escherichia coli* reconstituted into giant liposomes and studied by patch-clamp. *FEBS Lett.* **306**, 251-6.
- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M., and Ghazi, A. (1992).** Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* **206**, 559-65.
- Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A., and Ghazi, A. (1996).** Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* **151**, 175-87.
- Biggin, M. D., Gibson, T. J., and Hong, G. F. (1983).** Buffer gradient gels and 35S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**, 3963-5.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 15-23.
- Blomberg, A. (1997).** Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Elektrophoresis* **18**, 1429-40.
- Blount, P., Sukharev, S. I., Moe, P. C., Schroeder, M. J., Guy, H. R., and Kung, C. (1996).** Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*. *Embo J.* **15**, 4798-805.
- Blount, P., Sukharev, S. I., Schroeder, M. J., Nagle, S. K., and Kung, C. (1996).** Single residue substitutions that change the gating properties of a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 11652-7.
- Blount, P., Sukharev, S. I., Moe, P. C., Nagle, S. K., and Kung, C. (1996).** Towards an understanding of the structural and functional properties of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria. *Biol. Cell* **87**, 1-8.
- Blount, P., Sukharev, S. I., Moe, P., and Kung, C. (1997).** Mechanosensitive channels of *E. coli*: a genetic and molecular dissection. *Biol. Bull.* **192**, 126-7.
- Blount, P., Sukharev, S. I., Moe, P. C., Martinac, B., and Kung, C. (1999).** Mechanosensitive channels of bacteria. *Methods Enzymol.* **294**, 458-82.
- Boch, J., Kempf, B. and Bremer, E. (1994).** Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.* **176**, 5364-71.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., and Bremer, E. (1996).** Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* **178**, 5121-9.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., and Bremer, E. (1997).** Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* **168**, 282-9.
- Booth, I. R., and Louis, P. (1999).** Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 166-9.

- Bovell, C. R., Packer, L., and Hergerson, R. (1963).** Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochem. Biophys. Acta* **75**, 257-266.
- Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., and Boeke, J. D. (1995).** The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* **9**, 2888-902.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandriss, M. C. (1979).** Isolation and preliminary characterization of *Saccharomyces cerevisiae* proline auxotrophs. *J. Bacteriol.* **138**, 816-22.
- Brandriss, M. C., and Magasanik, B. (1979).** Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: mutation causing constitutive enzyme expression. *J. Bacteriol.* **140**, 504-7.
- Brandriss, M. C. (1983).** Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned *PUT2* gene. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1846-56.
- Brandriss, M. C. (1987).** Evidence for positive regulation of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **117**, 429-35.
- Brill, J. (1998).** Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**, 803-46.
- Brown, E. D., and Wood, J. M. (1993).** Conformational change and membrane association of the PutA protein are coincident with reduction of its FAD cofactor by proline. *J. Biol. Chem.* **268**, 8972-9.
- Bröer, S., and Krämer, R. (1991).** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* **202**, 137-43.
- Brückner, R. (1992).** A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **122**, 187-92.
- Burg, S. A., Kwon, E. D. and Kültz, D. (1997).** Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 437-55.
- Cairny, J., Higgins, C. F., and Booth, I. R. (1984).** Proline uptake through the major transport system of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions. *J. Bacteriol.* **160**, 22-7.
- Calmita, G., Bishani, W. R., Preston, G. M., Guggine, W. B., and Agre, P. (1995).** Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29063-66.
- Calogero, S., Gardan, R., Glaser, P., Schweizer, J., Rapoport, G., and Debarbouille, M. (1994).** RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **176**, 1234-41.
- Calvo, J. M., and Matthews, R. G. (1994).** The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**, 466-90.
- Carpita, N. C. (1985).** Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant Physiol.* **79**, 485-88.
- Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T., and Rees, D. C. (1998).** Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**, 2220-6.
- Chen, C. C., Tsuchiya, T., Yamane, Y., Wood, J. M., and Wilson, T. H. (1985).** Na⁺ (Li⁺)-proline cotransport in *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **84**, 157-64.

- Chen, L. M., and Maloy, S. (1991).** Regulation of proline utilization in enteric bacteria: cloning and characterization of the *Klebsiella put* control region. *J. Bacteriol.* **173**, 783-90.
- Chen, L. M., Goss, T. J., Bender, R. A., Swift, S., and Maloy, S. (1998).** Genetic analysis, using P22 challenge phage, of the nitrogen activator protein DNA-binding site in the *Klebsiella aerogenes put* operon. *J. Bacteriol.* **180**, 571-7.
- Cho, K., and Winans, S. C. (1996).** The *putA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* is transcriptionally activated in response to proline by an Lrp-like protein and is not autoregulated. *Mol. Microbiol.* **22**, 1025-33.
- Clancy, M., Madill, K. A., and Wood, J. M. (1981).** Genetic and biochemical requirements for chemotaxis to L-proline in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **146**, 902-6.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B. G. *et al.* (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393** (6685), 537-44.
- Costilow, R. N., and Cooper, D. (1978).** Identity of proline dehydrogenase and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid reductase in *Clostridium sporogenes*. *J. Bacteriol.* **134**, 139-46.
- Chrispeels, M. J. and Agre, P. (1994).** Aquaporins: water channel proteins of plants and animal cells. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 421-25.
- Cruickshank, C. C., Minchin, R. F., Le Dain, A. C., and Martinac, B. (1997).** Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **73**, 1925-31.
- Csonka, L. N. (1982).** A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. *J. Bacteriol.* **151**, 1433-43.
- Csonka, L. N. (1988).** Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation, and cellular retention of proline. *J. Bacteriol.* **170**, 2374-8.
- Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121-47.
- Csonka, L. N., and Hanson, A. D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.
- Csonka, L. N., and Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology,. ASM Press, Washington, DC, 1210-23.
- Cui, C., Smith, D. O., and Adler, J. (1995).** Characterization of mechanosensitive channels in *Escherichia coli* cytoplasmic membrane by whole-cell patch clamp recording. *J. Membr. Biol.* **144**, 31-42.
- Cui, C., and Adler, J. (1996).** Effect of mutation of potassium-efflux system, KefA, on mechanosensitive channels in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **150**, 143-52.
- Dandekar, A. M., and Uratsu, S. L. (1988).** A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J. Bacteriol.* **170**, 5943-5.

- De Hauwer, G., Lavallo, R., and Wiame, J. M. (1964).** Étude de la pyrroline déhydrogénase et de la Régulation du catabolisme de l'arginine et de la proline chez *Bacillus subtilis*. *Biochem. et Biophys. Acta* **81**, 257-69.
- Deguchi, Y., Yamato, I., and Anraku, Y. (1990).** Nucleotide sequence of *gltS*, the NA^+ /glutamate symport carrier of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **265**, 21704-8.
- Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. (1993).** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**, 215-23.
- Dendinger, S., and Brill, W. J. (1970).** Regulation of proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **103**, 144-52.
- Dersch, P., Fsihi, H., and Bremer, E. (1994).** Low-copy-number T7 vectors for selective gene expression and efficient protein overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Lett.* **123**, 19-26.
- des Etages, S. A., Falvey, D. A., Reece, R. J., and Brandriss, M. C. (1996).** Functional analysis of the PUT3 transcriptional activator of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**, 1069-82.
- Deutch, C. E., O'Brien, J. M., and VanNieuwenhze, M. S. (1985).** Identification of a trans-dominant mutation affecting proline dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 988-93.
- Deutch, C. E., Hasler, J. M., Houston, R. M., Sharma, M., and Stone, V. J. (1989).** Nonspecific inhibition of proline dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli* during osmotic stress. *Can. J. Microbiol.* **35**, 779-85.
- Douglas, R. M., Ritchie, G. Y., Munro, A. W., McLaggan, D., and Booth, I. R. (1994).** The $\text{K}^{(+)}$ -efflux system, KefC, in *Escherichia coli*: genetic evidence for oligomeric structure. *Mol. Membr. Biol.* **11**, 55-61.
- Dunlap, V. J., and Csonka, L. N. (1985).** Osmotic regulation of L-proline transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **163**, 296-304.
- Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H. P., and Mandrand-Berthelot, M. A. (1994).** Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**, 775-86.
- Ekena, K., Liao, M. K., and Maloy, S. (1990).** Activation of a new proline transport system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 2940-5.
- Ekena, K., and Maloy, S. (1990).** Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: how do cells avoid a futile cycle? *Mol. Gen. Genet.* **220**, 492-4.
- Elthon, T. E. and Stewart, C. R. (1981).** Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol.* **67**, 780-4.
- Elthon, T. E. and Stewart, C. R. (1982).** Proline oxidation in corn mitochondria. *Plant Physiol.* **70**, 567-72.
- Elthon, T. E., and Stewart, C. R. (1984).** Effects of proline analog L-thiazolidine-4-carboxylic acid on proline metabolism. *Plant Physiol.* **74**, 213-8.
- Fischel, U., and Oren, A. (1993).** Fate of compatible solutes during dilution stress in *Ectothiorhodospira marismortui*. *FEMS Lett.* **113**, 113-8.
- Fisher, S. H., and Sonenshein, A. L. (1991).** Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 107-35.
- Fisher, S. H., Rohrer, K., and Ferson, A. E. (1996).** Role of CodY in regulation of the *Bacillus subtilis hut* operon. *J. Bacteriol.* **178**, 3779-84.

- Fisher, S. H. (1999).** Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol. Microbiol.* **32**, 223-32.
- Fougère, F., and Le Rudulier, D. (1990).** Glycine betaine biosynthesis and catabolism in bacteroids of *Rhizobium meliloti*: effect of salt stress. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2503-10.
- Galinski, E. A., and Herzog, R. M. (1990).** The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch. Microbiol.* **153**, 607-13.
- Galinski, E. A., and Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 95-108.
- Galinski, E. A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 272-328.
- Gardan, R., Rapoport, G., and Debarbouille, M. (1995).** Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **249**, 843-56.
- Gardan, R., Rapoport, G., and Debarbouille, M. (1997).** Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **24**, 825-37.
- Ghazi, A., Berrier, C., Ajouz, B., and Bernard, M. (1998).** Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie* **80**, 357-62.
- Glaasker, E., Konings, W. N., and Poolman, B. (1996).** Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **271**, 10060-5.
- Glaasker, E., Konings, W. N., and Poolman, B. (1996).** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 575-82.
- Glaasker, E., Tjan, F. S., Ter Steeg, P. F., Konings, W. N., and Poolman, B. (1998).** Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J. Bacteriol.* **180**, 4718-23.
- Gotsche, S., and Dahl, M. K. (1996).** Purification and characterization of the phospho- α -(1.1)-glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **177**, 2721-6.
- Gowrishankar, J. (1989).** Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 1923-31.
- Gowrishankar, J., and Manna, D. (1996).** How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? *Genetica* **97**, 363-78.
- Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L., and Wood, J. M. (1986).** Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **166**, 253-9.
- Guerout-Fleury, A. M., Shazand, K., Frandsen, N., and Stragier, P. (1995).** Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**, 335-6.
- Guhuray, F., and Sachs, F. (1984).** Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.* **352**, 685-701.
- Hagemann, M., Richter, S., and Mikkat, S. (1997).** The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **179**, 714-20.
- Hahn, D. R., and Maloy, S. R. (1986).** Regulation of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*: characterization of promoter and operator mutations. *Genetics* **114**, 687-703.
- Hahn, D. R., Myers, R. S., Kent, C. R., and Maloy, S. R. (1988).** Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: molecular characterization of the *put* operon, and DNA sequence of the *put* control region. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 125-33.
- Haldenwang, W. G., (1995).** The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**, 1-30.

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, H. J. (1981).** Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.
- Hamill, O. P., and McBride, D. W. (1994).** The cloning of a mechano-gated membrane ion channel. *Trends Neurosci.* **17**, 439-43.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-80.
- Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (1990).** Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, UK.
- Hayward, D. C., Delaney, S. J., Campbell, H. D., Ghysen, A., Benzer, S., Kasprzak, A. B., Cotsell, J. N., Young, I. G., and Miklos, G. L. (1993).** The sluggish-A gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 2979-83.
- Häse, C. C., Ledain, A. C., and Martinac, B. (1997).** Molecular dissection of a large mechanosensitive ion channel (MscL) of *E. coli* - mutants with altered channel gating and pressure sensitivity. *J. Membr. Biol.* **175**, 17-25.
- Hecker, M., Schumann, W., and Volker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**, 417-28.
- Helfert, C., Gotsche, S., and Dahl, M. K. (1995).** Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalyzed by a phospho- α -(1,1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol. Microbiol.* **16**, 111-120.
- Helmann, J. D., (1999).** Anti-sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 135-41.
- Hempel, J., and Jornvall, H. (1987).** Functional topology of aldehyde dehydrogenase structures. *Prog. Clin. Biol. Res.* **232**, 1-14.
- Hempel, J., Nicholas, H., and Lindahl, R. (1993).** Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci.* **2**, 1890-900.
- Hempel, J., Perozich, J., Chapman, T., Rose, J., Boesch, J. S., Liu, Z. J., Lindahl, R., and Wang, B. C. (1999).** Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 53-9.
- Herzog, R. M., Galinski, E. A., and Trüper, H. G. (1990).** Degradation of the compatible solute trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*: isolation and characterization of trehalose. *Arch. Microbiol.* **153**, 600-6.
- Hoch, J. A. and Silhavy, T. J. (eds.) (1995).** Two-component signal transduction. American society for Microbiology, Washington, DC.
- Holtmann, G. (1999).** Diplomarbeit, Universität Marburg
- Hosoya, H., and Nakamura, K. (1994).** DNA sequence of proline permease gene from *Pseudomonas fluorescens* and predicted structure of proline permease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 2099-101.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. (1992).** A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase) catalyze the first steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9354-8.
- Jafri, S., Evoy, S., Cho, K., Craighead, H. G., and Winans, S. C. (1999).** An Lrp-type transcriptional regulator from *Agrobacterium tumefaciens* condenses more than 100 nucleotides of DNA into globular nucleoprotein complexes, *J. Mol. Biol.* **288**, 811-24.

- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T., and Blanco, C. (1992).** Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J. Bacteriol.* **174**, 5027-35.
- Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Blanco, C., and Bernard, T. (1995).** Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmatic osmolyte pool. *Arch. Microbiol.* **163**, 380-6.
- Jebbar, M., von Blohn, C., and Bremer, E. (1997).** Ectoin function as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 325-30.
- Jewell, J. B., and Kashket, E. R. (1991).** Osmotically regulated transport of proline by *Lactobacillus acidophilus* IFO 3532, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2829-33.
- Jimenez-Zurdo, J. I., Garcia-Rodriguez, F. M., and Toro, N. (1997).** The *Rhizobium meliloti* *putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol. Microbiol.* **23**, 85-93.
- Jung, H., Rubenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M., and Schmid, R. (1998).** Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**, 26400-7.
- Jung, H. (1998).** Topology and function of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na⁺/solute cotransporter family. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 60-4.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Kakazaki, N., Maruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Tekeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **30**, 109-36.
- Kang, C. M., Brody, M. S., Akbar, S., Yang, X., Price, C. W. (1996).** Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B in response to environmental stress. *J. Bacteriol.* **178**, 3846-53.
- Kappes, R. (1997).** Molekulare und physiologische Charakterisierung von Transportsystemen für die Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Universität Marburg
- Kappes, R. M., Kempf, B., and Bremer, E. (1996).** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**, 5071-9.
- Kappes, R. M., and Bremer, E. (1998).** Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and gamma-butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**, 83-90.
- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J., and Bremer, E. (1999).** Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**, 203-16.
- Kawahara, Y., Oshumi, T., Yoshihara, Y., and Ikeda, S. (1989).** Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2475-9.
- Kavi Kishor, P. B., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A., and Verma, D. P. S. (1995).** Overexpression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108**, 1387-94.
- Kemble, A. R. and MacPherson, H. T. (1954).** Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem.* **58**, 46-59.

- Kempf, B., and Bremer, E. (1995).** OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16701-13.
- Kempf, B., Gade, J. and Bremer, E. (1997).** Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: Purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.* **179**, 6213-20.
- Kempf, B., and Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**, 319-30.
- Kempf, B., and Bremer, E. (1998).** Stress response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: Uptake and synthesis of osmoprotectants. *J. Biosci.* **23**, 4, 447-55.
- Keuntje, B., Masepohl, B., and Klipp, W. (1995).** Expression of the *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein. *J. Bacteriol.* **177**, 6432-9.
- Killham, K., and Firestone, M. K. (1984).** Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces* indigenous to saline soils. *Appl. Environ. Microbiology* **47**, 301-6.
- Killham, K., and Firestone, M. K. (1984).** Proline transport increase growth efficiency in salt-stressed *Streptomyces griseus*. *Appl. Environ. Microbiology* **48**, 239-41.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1996).** A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**, 1323-35.
- Koo, S. P., Higgins, C. F., and Booth, I. R. (1991).** Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2617-25.
- Krämer, R. (1994).** Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **162**, 1-13.
- Krämer, R. (1994).** Secretion of amino acid by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 75-94.
- Krzywicki, K. A., and Brandriss, M. C. (1984).** Primary structure of the nuclear *PUT2* gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2837-42.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A., and *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-56.**
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-32.
- La Rosa, P. C., Rhodes, D., Rhodes, J. C., Bressan, R. A., and Csonka, L. N. (1991).** Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Plant Physiol.* **96**, 245-50.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J., and Strom, A. R. (1991).** DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1049-64.

- Lamark, T., Styrvold, O. B., and Strom, A. R. (1992).** Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **75**, 149-54.
- Leisinger, T. (1996).** Biosynthesis of proline. In: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, Washington, D.C, American Society for Microbiology, 434-41.
- Leranz, A. M., Fuste, M. C., Vinas, M., Hull, R. A., and Williams, R. P. (1991).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding proline oxidase of *Serratia marcescens*. Microbios **67**, 87-94.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A., and Booth, I. R. (1999).** Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. Embo J. **18**, 1730-7.
- Ling, M., Allen, S. W., and Wood, J. M. (1994).** Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. J. Mol. Biol. **243**, 950-6.
- Lolkema, J. S., Poolman, B., and Konings, W. N. (1998).** Bacterial solute uptake and efflux systems. Curr. Opin. Microbiol. **1**, 248-53.
- Lucht, J. M., and Bremer, E. (1994).** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. FEMS Microbiol. Rev. **14**, 3-20.
- Madhusudhan, K. T., Lorenz, D., and Sokatch, J. R. (1993).** The *bkdR* gene of *Pseudomonas putida* is required for expression of the *bkd* operon and encodes a protein related to Lrp of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**, 3934-40.
- Madkour, M. A., Smith, L. T., and Smith, G. M. (1990).** Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 2876-81.
- Mager, W. H., and Varela, J. C. S. (1993).** Osmostress response of yeast *Saccharomyces*. Mol. Microbiol. **10**, 253-8.
- Maloy, S. R., and Roth, J. R. (1983).** Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: characterization of *put::Mu d(Ap, lac)* operon fusions. J. Bacteriol. **154**, 561-8.
- Maloy, M. A., Smith, L. T., and Smith, G. M. (1987).** The proline utilization operon. In: Neidhardt, F.C, Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1513-19
- Maloy, S., and Stewart, V. (1993).** Autogenous regulation of gene expression. J. Bacteriol. **175**, 307-16.
- Marczak, J. E., and Brandriss, M. C. (1989).** Isolation of constitutive mutations affecting the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular analysis of the PUT3 transcriptional activator. Mol. Cell. Biol. **9**, 4696-705.
- Marczak, J. E., and Brandriss, M. C. (1991).** Analysis of constitutive and noninducible mutations of the PUT3 transcriptional activator. Mol. Cell. Biol. **11**, 2609-19.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A., and Roberts, M. F. (1999).** Osmoadaptation in archea. Appl. Environ. Microbiol. **65**, 1815-25.

- Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A. H., Adler, J., and Kung, C. (1987).** Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **84**, 2297-301.
- Martinac, B., Adler, J., and Kung, C. (1990).** Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. Nature **348**, 261-3.
- Matsushita, O., Jung, C. M., and Okabe, A. (1995).** Identification of the gene encoding a mechanosensitive channel MscL homologue in *Clostridium perfringens*. Gene **165**, 147-8.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T., and Epstein, W. (1994).** Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **269**, 1911-7.
- Measures, J. C. (1975).** Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature **257**, 398-400.
- Meile, L., Soldati, L., and Leisinger, T. (1982).** Regulation of proline catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Arch. Microbiol. **132**, 189-93.
- Menzel, R., and Roth, J. (1981).** Purification of the *putA* gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. J. Biol. Chem. **256**, 9755-61.
- Menzel, R., and Roth, J. (1981).** Enzymatic properties of the purified PutA protein from *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. **256**, 9762-6.
- Menzel, R., and Roth, J. (1981).** Regulation of the genes for proline utilization in *Salmonella typhimurium*: autogenous repression by the *putA* gene product. J. Mol. Biol. **148**, 21-44.
- Miller, J. H. (1992).** A short course in bacterial genetics, a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
- Miller, K. J., and Wood, J. M. (1996).** Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **50**, 101-36.
- Moe, P. C., Blount, P., and Kung, C. (1998).** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. Mol. Microbiol. **28**, 583-92.
- Monticello, D. J., and Costilow, R. N. (1981).** Purification and partial characterization of proline dehydrogenase from *Clostridium sporogenes*. Can. J. Microbiol. **27**, 942-8.
- Morris, C. E. (1990).** Mechanosensitive ion channels. J. Membrane Biol. **113**, 93-107
- Msadek, T., Kunst, F. and Rapaport, G. (1993).** Two-component regulatory systems. In: Hoch *et al.* (eds.) *Bacillus subtilis* and other gram-positive Bacteria, American Society for Microbiology, Washington, DC, 719-45.
- Muro-Pastor, A. M., and Maloy, S. (1995).** Proline dehydrogenase activity of the transcriptional repressor PutA is required for induction of the *put* operon by proline. J. Biol. Chem. **270**, 9819-27.
- Muro-Pastor, A. M., Ostrovsky, P., and Maloy, S. (1997).** Regulation of gene expression by repressor localization: biochemical evidence that membrane and DNA binding by the PutA protein are mutually exclusive. J. Bacteriol. **179**, 2788-91.
- Myers, R. S., and Maloy, S. R. (1988).** Mutations of *putP* that alter the lithium sensitivity of *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. **2**, 749-55.
- Nakamaru, Y., Takahashi, Y., Unemoto, T., and Nakamura, T. (1999).** Mechanosensitive channel functions to alleviate the cell lysis of marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, by osmotic downshock. FEBS Lett. **444**, 170-2.

- Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T., and Bakker, E. P. (1998).** KtrAB, a new type of bacterial K⁽⁺⁾-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **180**, 3491-4.
- Nakamura, T., Yamamuro, N., Stumpe, S., Unemoto, T., and Bakker, E. P. (1998).** Cloning of the *trkAH* gene cluster and characterization of the Trk K⁽⁺⁾-uptake system of *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* **144**, 2281-9.
- Nakao, T., Yamato, I., and Anraku, Y. (1987).** Nucleotide sequence of *putC*, the regulatory region for the *put* regulon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 364-8.
- Nakao, T., Yamato, I., and Anraku, Y. (1987).** Nucleotide sequence of *putP*, the proline carrier gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 70-5.
- Nakao, T., Yamato, I., and Anraku, Y. (1988).** Mapping of the multiple regulatory sites for *putP* and *putA* expression in the *putC* region of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 379-88.
- Nau-Wagner, G., Boch, J., Le Good, J. A., and Bremer, E. (1999).** High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 560-8.
- Nau-Wagner, G. (1999).** Physiologische und genetische Untersuchungen zur Biosynthese und Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Universität Marburg.
- Nikaido, H. (1996).** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 5853-9.
- O'Brien, K., Deno, G., Ostrovsky de Spicer, P., Gardner, J. F., and Maloy, S. R. (1992).** Integration host factor facilitates repression of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*. *Gene* **118**, 13-9.
- Ordal, G. W., Villani, D. P., Nicholas, R. A., and Hamel, F. G. (1978).** Independence of proline chemotaxis and transport in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **253**, 4916-9.
- Ostrovsky de Spicer, P., O'Brien, K., and Maloy, S. (1991).** Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: a membrane-associated dehydrogenase binds DNA in vitro. *J. Bacteriol.* **173**, 211-9.
- Ostrovsky de Spicer, P., and Maloy, S. (1993).** PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 4295-8.
- Ou, X., Blount, P., Hoffmann, R. and Kung, C. (1998).** One face of a transmembrane helix is crucial in mechanosensitive gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11471-5.
- Parra-Lopez, C., Lin, R., Aspedon, A., and Groisman, E. A. (1994).** A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *Embo J.* **13**, 3964-72.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., and Saier, M. H. (1998).** Microbial genome analysis: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* **277**, 573-92.
- Peng, Z., Lu, Q., and Verma, D. P. S. (1996).** Reciprocal regulation of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 334-41.
- Perozich, J., Nicholas, H., Lindahl, R., and Hempel, J. (1999).** The big book of aldehyde dehydrogenase sequences. An overview of the extended family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 1-7.
- Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B. C., Lindahl, R., and Hempel, J. (1999).** Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**, 137-46.

- Peter, H., Burkovski, A., and Kramer, R. (1996).** Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J. Bacteriol.* **178**, 5229-34.
- Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C., and Kramer, R. (1997).** Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. *Arch. Microbiol.* **168**, 143-51.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Kramer, R., and Morbach, S. (1998).** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.* **180**, 6005-12.
- Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C., and Le Rudulier, D. (1997).** Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *SinoRhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143**, 1369-79.
- Poolman, B., and Konings, W. N. (1993).** Secondary solute transport in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 5-39.
- Poolman, B., and Glaasker, E. (1998).** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**, 397-407.
- Potts, M. (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**, 755-805.
- Pourkomialian, B., and Booth, I. R. (1992).** Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for two transport systems and for their possible roles in osmoregulation. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2515-8.
- Qu, Y., Bolen, C. L., and Bolen, D. W. (1998).** Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9268-73.
- Quick, M., Tebbe, S., and Jung, H. (1996).** Ser57 in the Na⁺/proline permease of *Escherichia coli* is critical for high-affinity proline uptake. *Eur. J. Biochem.* **239**, 732-6.
- Quick, M., and Jung, H. (1997).** Aspartate 55 in the Na⁺/proline permease of *Escherichia coli* is essential for Na⁺-coupled proline uptake. *Biochemistry* **36**, 4631-6.
- Rancourt, D. E., Stephenson, J. T., Vickell, G. A., and Wood, J. M. (1983).** Proline excretion by *Escherichia coli* K12. *Biotechnology and Bioengineering* **16**, 74-80.
- Rayapati, P. J., and Stewart, C. R. (1991).** Solubilization of a proline dehydrogenase from Maize (*Zea Mays* L.) Mitochondria. *Plant Physiol.* **95**, 787-91.
- Record, M. T., Jr., Courtenay, E. S., Cayley, S., and Guttman, H. J. (1998).** Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 190-4.
- Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M. H., Jr. (1994).** A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 133-66.
- Rhodes, D., Handa, S., and Bressan, R. A. (1986).** Metabolic changes associated with adaption of plant cell to water stress. *Plant Physiol.* **82**, 890-903.
- Rhodes, D., and Hanson, A. D. (1993).** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 357-84.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V. F., and Krämer, R. (1997).** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.* **247**, 572-80.

- Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R., and Ghazi, A. (1999).** Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **181**, 1673-6.
- Sackin, H. (1995).** Mechanosensitive channels. *Annu. Re. Physiol.* **57**, 333-53.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. E. (1989).** Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-7.
- Savouré, A., Hua, X. J., Bertauche, N., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (1997).** Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 104-9.
- Schleyer, M., Schmid, R., and Bakker, E. P. (1993).** Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Arch. Microbiol.* **160**, 424-31.
- Schmidt-Kittler, O. (1997).** Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Schöck, F., Gotsche, S., and Dahl, M. K. (1996).** Vectors using the phospho-(1,1)-glucosidase-encoding gene *treA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene* **170**, 77-80.
- Schwan, W. R., Coulter, S. N., Ng, E. Y., Langhorne, M. H., Ritchie, H. D., Brody, L. L., Westbrook-Wadman, S., Bayer, A. S., Folger, K. R., and Stover, C. K. (1998).** Identification and characterization of the PutP proline permease that contributes to in vivo survival of *Staphylococcus aureus* in animal models. *Infect Immun.* **66**, 567-72.
- Silver, S. (1996).** Transport of inorganic cations In: Neidhardt *et al.* (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edn. Washington, DC. American Society for Microbiology, 1091-102
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., Abee, T. and Hill, C. (1999).** Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 8974-82.
- Steinmetz, M., and Richter, R. (1994).** Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene* **142**, 79-83.
- Steinmetz, M., and Richter, R. (1994).** Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* **176**, 1761-3.
- Stewart, T. S., Hruby, D. E., Sharma, O. K., and Roberts, W. K. (1977).** An ATP-dependent inhibition of protein synthesis in ascites cell extracts by wheat germ protein. *Biochim. Biophys. Acta* **479**, 31-8.
- Straub, P. F., Reynolds, P. H., Althomsons, S., Mett, V., Zhu, Y., Shearer, G., and Kohl, D. H. (1996).** Isolation, DNA sequence analysis, and mutagenesis of a proline dehydrogenase gene (*putA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 221-9.
- Strizhov, N., Abraham, E., Ökrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, S., and Szabados, L. (1997).** Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**, 557-69.
- Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer M. and Bakker, E. P. (1996).** K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺-uptake systems. In: Konings, W. N., Kaback, H. R. and Lolkema, J. S. (eds.). *Handbook of Biological Physics*, Vol. 2, Amsterdam: Elsevier, 474-99.

- Styrvoid, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M. W., Bjornsen, T., and Strom, A. R. (1986).** Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* **165**, 856-63.
- Styrvoid, O. B., and Strom, A. R. (1991).** Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J. Bacteriol.* **173**, 1187-92.
- Sukharev, S. I., Martinac, B., Arshavsky, V. Y., and Kung, C. (1993).** Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys. J.* **65**, 177-83.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R., and Kung, C. (1994).** A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* **368**, 265-8.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Guy, H. R., and Kung, C. (1996).** MscL: a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **51**, 133-41.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., and Kung, C. (1997).** Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the *mscL* gene, protein, and activities. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 633-57.
- Sukharev, S. I. (1999).** Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters. *Faseb J.* **13**, S. 55-61.
- Sukharev, S. I., Sigurdson, W. J., Kung, C. and Sachs, F. (1999).** Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. *J. Gen. Physiol.* **113**, 525-39.
- Surber, M. W., and Maloy, S. (1998).** The PutA protein of *Salmonella typhimurium* catalyzes the two steps of proline degradation via a leaky channel. *Arch. Biochim. Biophys.* **354**, 281-7.
- Szabo, I., Petronilli, V., Guerra, L., and Zoratti, M. (1990).** Cooperative mechanosensitive ion channels in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 280-6.
- Szabo, I., Petronilli, V., and Zoratti, M. (1992).** A patch-clamp study of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 29-38.
- Szoke, A., Miao, G.-H., Hong, Z., and Verma, D. P. S. (1992).** Subcellular location of Δ -pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiol.* **99**, 1642-49.
- Takami, H., Takaki, Y., Nakasone, K., Hiram, C., Inoue, A., and Horikoshi, K. (1999).** Sequence analysis of the 32-kb region including the major ribosomal protein gene clusters from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain C-125. *Bioscience, Biotech. & Biochem.* **63**, 452-5.
- Timasheff, S. N. (1991).** A physicochemical basis for the selection of osmolytes of cholin oxidase from *Cylindrocarpus didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 815-20.
- Townsend, D. E., and Wilkinson, B. J. (1992).** Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. *J. Bacteriol.* **174**, 2702-10.
- Tsang, A. W., and Escalante-Semerena, J. C. (1996).** *cobB* function is required for catabolism of propionate in *Salmonella typhimurium* LT2: evidence for existence of a substitute function for CobB within the 1,2-propanediol utilization (*pdu*) operon. *J. Bacteriol.* **178**, 7016-9.
- Tsang, A. W., and Escalante-Semerena, J. C. (1998).** CobB, a new member of the SIR2 family of eucaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide:5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in *cobT* mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* **273**, 31788-94.
- Tsapis, A., and Kepes, A. (1977).** Transient breakdown of the permeability barrier of the membrane of *Escherichia coli* upon hypoosmotic shock. *Biochim. Biophys. Acta* **469**, 1-12.

- Tschichholz, I., and Trüper, H. G. (1990).** Fate of compatible during dilution stress in *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol. Reviews* **73**, 181-86.
- Turk, E., and Wright, E. M. (1997).** Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J. Membr. Biol.* **159**, 1-20.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., and Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504-44.
- Verbruggen, N., Villarroel, R., and Van Montagu, M. (1993).** Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **103**, 771-81.
- Verbruggen, N., Hua, X., May, M., and Van Montagu, M. (1996).** Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc. Natl. Sci. USA* **93**, 8787-91.
- Verheul, A., Glaasker, E., Poolman, B., and Abee, T. (1997).** Betaine and L-carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. *J. Bacteriol.* **179**, 6979-85.
- Voelker, U., Volker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., Haldenwang, W. G. (1995).** Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177**, 3771-80.
- Völker, U., Maul, B., Hecker, M. (1999).** Expression of the σ^B -Dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**, 3942-48.
- von Blohn, C. (1997).** Die Rolle des Transportsystems OpuE in *Bacillus subtilis* bei der Homöostase von Prolin unter hochosmotischen Bedingungen. Dissertation, Universität Marburg.
- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M., and Bremer, E. (1997).** Osmostress in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.* **10**, 175-87.
- von Heijne, G. (1992).** Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive inside rule. *J. Mol. Biol.* **136**, 2527-35.
- Wang, S. S., and Brandriss, M. C. (1986).** Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned *PUT1* gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2638-45.
- Wang, S. S., and Brandriss, M. C. (1987).** Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation, and mitochondrial localization of the *PUT1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4431-40.
- Warr, S. R. C., Reed, R. H., Stewart, W. D. P. (1988).** The compatibility of osmotica in cyanobacteria. *Plant Cell Environ.* **11**, 137-42
- Wengender, P. A., and Miller, K. J. (1995).** Identification of a PutP proline permease gene homolog from *Staphylococcus aureus* by expression cloning of the high-affinity proline transport system in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 252-9.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A., and Reed, R. H. (1990).** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2527-35.
- Whatmore, A. M., and Reed, R. H. (1990).** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K^+ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2521-6.
- White, B. A. (1993).** PCR protocols. J. M. Walker (Herausg.), Humanan Press, Totowa, NJ.
- Williams, I., and Frank, L. (1975).** Improved chemical synthesis and enzymatic assay of Δ^1 -pyrroline-5- carboxylic acid. *Anal. Biochem.* **64**, 85-97.

- Wohlfahrt, A. M., Severin, J., and Galinski, E. A. (1990).** The spectrum of compatible solutes in heterotroph halophilic eubacteria of the familiy *Halomonadaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 705-12.
- Wong, L. S., Johnson, M. S., Sandberg, L. B., and Taylor, B. L. (1995).** Amino acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**, 4342-9.
- Wood, J. M., and Zadworny, D. (1979).** Characterization of an inducible porter required for L-proline catabolism by *Escherichia coli* K12. *Can J Biochem* **57**, 1191-9.
- Wood, J. M., and Zadworny, D. (1980).** Amplification of the *put* genes and identification of the *put* gene products in *Escherichia coli* K12. *Can. J. Biochem.* **58**, 787-96.
- Wood, J. M. (1981).** Genetics of L-proline utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **146**, 895-901.
- Wood, J. M. (1981).** The membrane enzyme complex required for L-proline transport and utilization in *Escherichia coli* K12. *Biophys. J.* **37**, 19-20.
- Wood, J. M. (1987).** Membrane association of proline dehydrogenase in *Escherichia coli* is redox dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 373-7.
- Wood, J. M. (1988).** Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J. Membr. Biol.* **106**, 183-202.
- Wood, J. M. (1999).** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 230-62.
- Yamane, K., Kumano, M., and Kurita, K. (1996).** The 25°-36° region of the *Bacillus subtilis* chromosome: determination of the sequence of a 146 kb segment and identification of 113 genes. *Microbiology* **142**, 3047-56.
- Zittrich, S., and Kramer, R. (1994).** Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **176**, 6892-9.
- Zoratti, M., and Petronilli, V. (1988).** Ion-conducting channels in a gram-positive bacterium. *FEBS Lett.* **240**, 105-9.
- Zoratti, M., Petronilli, V., and Szabo, I. (1990).** Stretch-activated composite ion channels in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 443-50.

VII. ANHANG

1. Die DNA-Sequenz des *putBCP*-Operons

GT TGAA GAA GTGT GGAA GGAT GGA GGAAGCT GAT GTTT TTTGT CGCTT CCTT TTCT CCT TTAT TCGA CAGAAT CCCCCC GACTTTCTA AACTAT CTGAT 100
V E E V W K D G G .
^{*ycgL*}
TGTGGC AAACCCCA AAAAAT AATCAGAATCT TTGTATT TTGAGGATATTGTGAAACGCTGGTTT TGCCATTTACAATAA AACTCATACA AATACTTCTTAG 200
- 35 - 10

AT TGCGGGGTGTT GAGGTTGGAAGTGCATCAC AAGAGAT TTTT TCT TATT TTTT ATCCAAA AGCGGCTT TCT CAAT AAAATGGCGA GGAA CTGGGGA AGTC G 300
^{*putB*} M I T R D F F L F L S K S G F L N K M A R N W G S R

GGTAGCAGCGGGT AAAA TTA TCGGCGGGAAT GAC TTTAACAGTTC AATCCCAGCATTCC GACAGCTT AACAGCC AAGGCTT GTCAGTT ACTGT CGATCAT 400
V A A G K I I G G N D F N S S I P T I R Q L N S Q G L S V T V D H

TT AGGCAGT TTTGTGAA CAGCGCC GAGGT CGCAC GGGAGCGT ACGGAAGAGT GCAT TCA AACCATTCGCA CCAT CGCGGAT CAGGAGCTGAA CTCACAC G 500
L G E F V N S A E V A R E R T E E C I Q T I A T I A D Q E L N S H

TT TCTT TAAAAT GACGTCT TTAGGTT TGA TAT AGAT ATGGATT TGGT GTATGAAAAT ATGA CAAA AAT CCTT CAGACGCGCAGAA ACAT AAAATCAT 600
V S L K M T S L G L D I D M D L V Y E N M T K I L Q T A E K H K I M

GGTCCCAT TGAC ATGGAGGACGA AGT CAGATGC CAGAAAAC GCT TGAT ATT TTA CAAGATTT CAGA AAGAAAT ACGAGCA TGT GAGCAGAGT GCTGCA A 700
V T I D M E D E V R C Q K T L D I F K D F R K K Y E H V S T V L Q

GCCTAT CTGTACC GGACGGA AAAA GACATTGACGATTT GGAT TCT TTA AACCCGTT CCT TCGCCTTGTAA AAGGAGCTTAT AAA GAAT CAGAAAA AGTAG 800
A Y L Y R T E K D I D D L D S L N P F L R L V K G A Y K E S E K V

CT TTCCCGGAGAA AAGCGAT GTCGATGAAAAT TCAAAA AATCATCCGAAA GCGACTTAA ACGGTCATCTAT ACAGCGGATT GCCACACAT GACGACA A 900
A F P E K S D V D E N Y K K I I R K Q L L N G H Y T A I A T H D D K

AATGAT CGACTTT ACAAGCAGCT TGC CAAGGAA CATGGCAT TGC CAAT GACAAGT TTGAATT TCAGATGCTGT ACGGCAT GCGGTGCGAAA CCCAGCT C 1000
M I D F T K Q L A K E H G I A N D K F E F Q M L Y G M R S Q T Q L

AGCCTCGTA AAAGAAGGTTATAAC ATGAGAGTCT ACCT GCCATAC GGCGAGGATTGGT ACGGCTACT TTAGAGACGCTT GCA GAACGTCCGTC AAACA 1100
S L V K E G Y N M R V Y L P Y G E D W Y G Y F M R R L A E R P S N

TT GCAT TTGCTTT CAAAGGAATGA CAAAGAA GTAAAAAGGAGAGATTATCATGCAAC ACCT TACA AACACGAGC GGCATT CACA AATT TCCA AGATCAA A 1200
I A F A F K G M T K . ^{*putC*} M T T P Y K H E P F T N F Q D Q

ACTACGTGGAAGC GTTT AAAAAGCGCTTGC GAC AGTAAGCGAAT ATTT AGGAAAA GACTATCCGCT TGT CATT AACGGCGAGA GAGT GGAAACGGAAGC 1300
N Y V E A F K K A L A T V S E Y L G K D Y P L V I N G E R V E T E A

GA AAAT CGT TTCAATCA ACCCAGCTGATAAA GAA GAAGT CGT CGGCCGA GTGTCAA AAGCGTCTCAA GAGCACGCTGAGCA AGCGATT CAAGCGGCTGCA A 1400
K I V S I N P A D K E E V V G R V S K A S Q E H A E Q A I Q A A A

AAAGCATTG GAAGAGTGGAGATAC ACCTCTC CTGAAGA GAGCGGCTGTCTGTT CCGCGCT GCTGCCAAGT CCGCAGA AGA AAACATGA ATTCTCAG 1500
K A F E E W R Y T S P E E R A A V L F R A A A K V R R R K H E F S

CTTTGCTTGTGAA AGAA GCA GGAA AGCCTTGAA CAGAGCGGATGCCGATACGGCT GAA GCGATTGACTT CATGGAGTATT ATGCACGCCAAATGATCGA 1600
A L L V K E A G K P W N E A D A D T A E A I D F M E Y Y A R Q M I E

ACTGGC AAAAGGC AAACCGGTCAA CAGCCGT GAA GCGGAGAA AAA CCAATAT GTAT ACA CGCCGACT GGA GTGACAGT CGT TAT CCCGCTT GGA ACTT C 1700
L A K G K P V N S R E G E K N Q Y V Y T P T G V T V V I P P W N F

TTGTTT GCGATCATGGC AGGCACA ACA GTGGCGCGAT CGTT ACT GGAAACA CAGT GGT TCTGAAAC CTGCGAGTGTACA CCTGTTATTGAC AGC AAAAT 1800
L F A I M A G T T V A P I V T G N T V V L K P A S A T P V I A A K

TTGTTGAGGTGCT TGAA GAGTCCGGAT TGCC AAAAGGC GTAGTCA ACTT TGT TCCGGGA AGCGGATCGGA AGTAGCGACT ATCTTGT TGACCAT CCGA A 1900
F V E V L E E S G L P K G V V N F V P G S G S E V G D Y L V D H P K

AA CAAGCCTTATCACAT TTA CGGGATCAAGA GAA GTTGTGAC GAGAATTTTC GAACGCGCGC GAAGGTT CAGC CCGGCCA GCA GCAT TTAAGC GTGT C 2000
T S L I T F T G S R E V G T R I F E R A A K V Q P G Q Q H L K R V

ATCGCT GAAATGGCGGTAAAGAT ACGGTTGTTGTTGATGAGGAT GCGGACATTGAATT AGCGGCTCAAT CGATCTTACT TCA GCAT TCGGCTT TCGGG 2100
I A E M G G K D T V V V D E D A D I E L A A Q S I F T S A F G F A

GACAAAAT GCTCTGCA GGTTCACGTGCAGT AGT TCAT GAAA AAGTGTATGATCAA GTATTAGAGCGTGT CATT GAAATTA CCGAATCAAAA GTAACAGC 2200
G Q K C S A G S R A V V H E K V Y D Q V L E R V I E I T E S K V T A

TAAACCTGACAGT GCAGATGTTTATAT GGGACCTGTCATTGACCA AGGTCTTATGATA AAAT TATGAGCTATATTGAGAT CCGAAAA CAGGAAGGCGT 2300
K P D S A D V Y M G P V I D Q G S Y D K I M S Y I E I G K Q E G R

TTAGTAAGCGCGGTACTGGTGTATGAT TCGA AAGGATCTTCAATCAACCGACGATCTT CGCTGACCTTGATCCGAAAGCA AGACTCATGCA GGAAGAA 2400
L V S G G T G D D S K G Y F I K P T I F A D L D P K A R L M Q E E

TTTTCGGACCTGT CGTTGCATTTT GTAAAGT GTCAGACTTTGATGAAGCTTT AGAAGTG GCAAACAATACTGAA TATGGTT TGA CAGGCGCGGTT ATCAC 2500
I F G P V V A F C K V S D F D E A L E V A N N T E Y G L T G A V I T

AAACAA CCGCAAGCACATCGAGCGTGC GAAA CAGGAAT TCCATGT CGGA AACCTAT ACT TCAA CCGC AACTGTACAGGTGCTAT CGTCGGCT ACCATCCG 2600
 N N R K H I E R A K Q E F H V G N L Y F N R N C T G A I V G Y H P

TT TGGC GGCTTCAAAAT GTCGGGAACGGATT CAA AAGC AGGC GGGCCGGATT ACTT GGCTCTGCATATGCAAGCAAAAACAATCAGTGAAT GTTCTAAG 2700
 F G G F K M S G T D S K A G G P D Y L A L H M Q A K T I S E M F .

CGGGACTAAATGGGCAT CCT CCCT GCGGGGGTGT CCAT TTCATCCATAT ACT ATAAAAAGAGGAGGAAGT GCC ATA GAA AACA CACA GCTG ATTATTT C 2800
putP I E N T Q L I I S

GATTTGTATTTAT ATG GCGGAAT GCT GCTAATC GGCT ACTT TGC TTAC AAGCGTACGT CGAA TCTGACGGATT ATATGCT GGGAGGA CGCTCT TGG GTT 2900
 I C I Y M A G M L L I G Y F A Y K R T S N L T D Y M L G G R S L G
putP

CCGGCA GTAACCGCTCT CAGT GCCGGCGCTGCCGATAT GAGCGCTGGCTGCTAAT GGGGCTT CCGGCGCCAT GTTTTCT ACTGGTCTGAGCGGCGCTT 3000
 P A V T A L S A G A A D M S G W L L M G L P G A M F S T G L S G A

GGATCGTCATCGGACTT GCTCTGGAGCGTGGGC GAATGGCTTT ACGT CGCACCA CGGCTGA GAACCTA TACT GAAAAGCGGGAA TTCT ATTACAAT 3100
 W I V I G L C L G A W A N W L Y V A P R L R T Y T E K A G N S I T I

TC CCGGATT CCTGGAATCGCTT CCGAGAT CAAACAAAGCT TCT CAGACTGTTTT CCGGAAT TGTCATT TTAGTCTTTTT CACGTTTATGTAT CGTCC 3200
 P G F L E N R F G D Q T K L L R L F S G I V I L V F F T F Y V S S

GGAATGGTGTCCGGCGCGCT CTTATTTCAACA GCATCTT GGGGATGATT ATCACACCGGCTGTGGA TTGTGACGGGT GTT GTTGTGGCATATACCCTGT 3300
 G M V S G G V L F N S I L G M D Y H T G L W I V T G V V V A Y T L

TTGGCGGCTTTTT GGCA GTCAGCT GGA CAGATTT TGTT CAGGGGA TTAT TAT GTTT GCCGCAC TCAT TCT TGTGCCGATCGTTA CGTT TTTCCACACGGG 3400
 F G G F L A V S W T D F V Q G I I M F A A L I L V P I V T F F H T G

AGGAGCAGGTGAT ACAGTTGCTGAAAT CCGCTCTGTAGATCCTGATATGTTT AATA TTT TCAAAGGAACGAGCGCTCCTTGGCAT TATTCTTTGTTGCC 3500
 G A G D T V A E I R S V D P D M F N I F K G T S V L G I I S L F A

TGGGGGCTGGGAT ACTT TGGCCAGCCGCATATTA TTGT GCGT TTTATGGCGATAACGTCTGTCAAAGAGATCAA AAGAGCGCGCAGAA TTTGGGATGGCT 3600
 W G L G Y F G Q P H I I V R F M A I T S V K E I K R A R R I G M G

GGATGATTTTGCTGCA GTAGGCGCAGT GCTGACCGGT TGGGCGGAAT CGCTTAT TACCATCAGCGCGCATGACACTGAAGGCCAGAGACGATTTT 3700
 W M I L S A V G A V L T G L G G I A Y Y H Q R G M T L K D P E T I F

TATTC AATTAGGGAATA TCTTGTTCATCCGATT ATCA CCGGTTT TCTGATTTCAGCGATTTT GGCCGCGATTATGAGTACAAATTTCT TCCCAGCTGCTT 3800
 I Q L G N I L F H P I I T G F L I S A I L A A I M S T I S S Q L L

GTGACATCAAGCTCTCT GGTAGAA GATTTGTATAAGTCGATGTT CAGACGCTCAGCTT CAGAT AAAGAACTGGT GTTTTAAAGC GACTGGCTGT TCTGG 3900
 V T S S S L V E D L Y K S M F R R S A S D K E L V F L G R L A V L

CTGTTTCAATTGT CGCGTTGGTTCTGGCTTGGGA GAAA AATAACA CCATCCT TGGATTGGTCA GCTACGC GTGGCGGGCT TCGGTGCATCATT CCGGCC 4000
 A V S I V A L V L A W E K N N T I L G L V S Y A W A G F G A S F G P

AGTTGTACTGCTCAGTCTGTTTGGAAACGAATGACCA AATGGGGGCACTCGCCGGCATGATGTGGGA GCAGCGACTGT AATCATT TGGCGCAATGCC 4100
 V V L L S L F W K R M T K W G A L A G M I V G A A T V I I W A N A

GGTCTTTCGGACTTTCTGTATGAAATGATACCTGTTT TGCTGCGAGTCTAT TATCTGTCTTT TTTGTCA GCATATTGACGAGGCTCCGTCACAAGCTG 4200
 G L S D F L Y E M I P G F A A S L L S V F F V S I L T Q A P S Q A

TCACAGACCAGTTCAACGACTACCAAGATACAATGTGCAAT AAA GATCGAAAGGA GGA GGA GGGGCTGTCCCTTTTCTCTCTTTCTCTCTTT AAGCG 4300
 V T D Q F N D Y Q D T M S Q .

GCATT TTTTCTTTTGAAACAAACGTATT TTTTCT ATACAAA AAGACCCCGTATGGATAT GATT AAAGTAAAAAAGTATA GGAGAAAAAGG ATG G 4400
ycgP M

AA GAGCTTTT TAGAGAGATTTT CA 4426
 E E L L E R V F S

Abb.43: Die Nukleotidsequenz des *putBCP*-Operons

Dargestellt ist die DNA-Sequenz des *putBCP*-Operons und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine. In den Leserastern von *putB* und *putC* sind die potentiellen Startcodons grau umrahmt, sowie die Ribosomenbindestellen unterstrichen. Für *putP* wurden verschiedene mögliche Startpunkte der Leserastern und zwei potentielle Ribosomenbindestellen markiert. Der Promotor mit den möglichen -35 und -10 Regionen sind grau umrahmt. Eine Palindrome Sequenz hinter den drei Leserastern des Operons, die als Rho-unabhängige Termination der Transkription dienen könnte, ist mit Pfeilen markiert.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, November 1999