

**Biosynthese und Anhäufung
der osmotischen Schutzsubstanz Prolin
mittels *de novo* Synthese und Aufnahme prolinhaltiger Peptide
in *Bacillus subtilis***

**Dissertation
zur
Erlangung der Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jeanette Brill
aus Gütersloh

Marburg/Lahn 2001

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen und Manuskripte erstellt:

Belitsky B. R., Brill J., Bremer E. und Sonenshein A. L. 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4389-4392

Brill J. und Bremer E. 2001. A separate biosynthetic pathway mediates accumulation of the compatible solute proline in response to hypertonicity in *Bacillus subtilis*. (Eingereicht bei Molecular Microbiology)

Brill J., Putzer H. und Bremer E. T-box mediated control of anabolic proline biosynthetic genes in *Bacillus subtilis*. (Manuskript in Vorbereitung)

Brill J. und Bremer E. Osmoprotection of *Bacillus subtilis* by proline-containing peptides. (Manuskript in Vorbereitung)

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	2
1. Osmotischer Stress in Mikroorganismen	2
1.1 Osmotische Eigenschaften der Bakterienzelle	2
1.2 Aufrechterhaltung des Turgors unter hochosmolaren Bedingungen	3
1.3 Funktionsweise und Natur osmotischer Schutzsubstanzen	4
1.4 Peptide als osmotische Schutzsubstanzen	5
1.5 Das „Sensing“ von osmotischem Stress	6
2. Osmoregulation im Gram-positiven Modellorganismus <i>B. subtilis</i>	7
2.1 Initiale Phase der Anpassung: K ⁺ -Aufnahme	8
2.2 Zweite Phase der Anpassung: Akkumulation osmotischer Schutzsubstanzen	10
2.2.1 Synthese osmotischer Schutzsubstanzen	10
2.2.2 Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen	13
2.3 Katabolismus von Prolin in <i>B. subtilis</i> : Vermeidung eines „futile cycle“	16
2.4 Efflux osmotischer Schutzsubstanzen bei einem hypoosmotischen Schock	17
3. Transkriptionelle Antitermination	18
3.1 Der Mechanismus T-Box-abhängiger transkriptioneller Antitermination	18
3.2 Weitere Determinanten für eine tRNA-mRNA Wechselwirkung	19
3.3 Verbreitung des Mechanismus transkriptioneller Antitermination	21
3.4 Prozessierung der Leader-mRNA	21
3.5 Kontrolle von Aminosäurebiosynthesegenen durch T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination	22
4. Zielsetzung der Arbeit	23
III. MATERIAL UND METHODEN	24
1. Reagenzien und Chemikalien	24
2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	24
3. Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen	34
3.1 Kulturmedien	34
3.1.1 Vollmedien	34
3.1.2 Minimalmedien	34
3.1.3 Transformationsmedien	35
3.2 Zusätze und Antibiotika	35
3.3 Sterilisation	36
3.4 Wachstum	36
3.4.1 Wachstumsbedingungen	36
3.4.2 Bestimmung der Zelldichte	37

4. Molekularbiologische und genetische Methoden	37
4.1 Präparation von DNA und Gesamt-RNA	37
4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA	37
4.1.2 Präparation chromosomaler DNA	38
4.1.3 Präparation von Gesamt-RNA	38
4.1.4 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration	38
4.2 Klonierungstechniken	38
4.2.1 Restriktion von DNA	38
4.2.2 Auffüllen überhängender Enden	39
4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	39
4.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
4.2.5 Ligation	39
4.3 PCR und Bestimmung der Nukleotidsequenz	39
4.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
4.3.2 Bestimmung der Nukleotidsequenz	39
4.4 Transformation von Bakterien	40
4.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	40
4.4.2 Transformation von <i>B. subtilis</i>	40
4.5 DNA-Sonden und DNA-DNA Hybridisierungen (Southern-Blot)	40
4.6 Analyse von Gesamt-RNA durch Northern-Transfer und Hybridisierung	41
4.6.1 Erstellung der RNA-Sonden	41
4.6.2 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot)	42
4.7 Analyse von mRNA-Startpunkten durch Primer Extension	42
4.7.1 5'-Phosphorylierung der Oligonukleotide	42
4.7.2 Reverse Transkription	43
4.8 <i>In vitro</i> -Transkription	43
5. Computergestützte Sequenzanalysen	44
6. Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen	44
6.1 Plasmidkonstruktion	44
6.1.1 Konstruktion von <i>treA</i> - und <i>lacZ</i> -Reportergenfusionen	46
6.1.2 Konstruktion der Plasmide pJS5Mut1, pJS5Mut2 und pJS5Mut3	48
6.2 Konstruktion von <i>B. subtilis</i> -Stämmen	48
6.2.1 Konstruktion und Überprüfung von Unterbrechungs-Mutationen	49
6.2.2 Konstruktion und Überprüfung von <i>treA</i> - und <i>lacZ</i> -Fusionsstämmen	53
7. Biochemische Methoden	54
7.1 HPLC-Analyse von Aminosäuren aus <i>B. subtilis</i> -Zellextrakten	54
7.1.1 Mikroextraktion nach Bligh & Dyer	54
7.1.2 Vorsäulenderivatisierung mit FMOC/ADAM	55
7.1.3 HPLC-Analyse	55
7.2 TreA-Aktivitätsbestimmung	56
7.3 Test auf AmyE-Aktivität	57

IV. ERGEBNISSE	59
1. Molekulare und physiologische Charakterisierung der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i>	59
1.1 Veränderung des intrazellulären Glutamat- und Prolinpools in Abhängigkeit von der externen Osmolarität	59
1.2 Die <i>de novo</i> Prolinakkumulation in <i>B. subtilis</i> unterliegt einem osmotischen Stimulus	60
1.3 Die Expression des <i>proHJ</i> -Operons und des <i>proA</i> -Gens sind essentiell für die Prolinakkumulation unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen	61
1.3.1 Das <i>proHJ</i> -Operon: Konstruktion und Analyse chromosomaler <i>proHJ</i> -Deletionen in <i>B. subtilis</i>	62
1.3.2 Das <i>proBA</i> -Operon: Konstruktion und Analyse chromosomaler <i>proBA</i> -Deletionen in <i>B. subtilis</i>	62
1.3.3 Konstruktion und Analyse chromosomaler <i>proI</i> - und <i>proG</i> -Deletionen in <i>B. subtilis</i>	65
1.3.4 <i>B. subtilis</i> besitzt zwei Prolinbiosynthesewege, die durch ProA miteinander verbunden sind	65
1.4 Phänotypische Charakterisierung der <i>proHJ</i> -Mutante JSB8	66
1.5 Die <i>proHJ</i> -Mutante JSB8 ist nicht in der Lage Prolin als Antwort auf hochosmolare Umweltbedingungen zu akkumulieren	67
1.6 Die Rolle von Glutamat für die Protektion von <i>B. subtilis</i> vor osmotischem Stress	69
1.7 Die Rolle von Kalium für die osmotisch regulierte Prolinakkumulation in <i>B. subtilis</i>	71
2. Transkriptionelle Regulation der osmotisch vermittelten Prolinbiosynthese	73
2.1 Northern-Blot-Analyse der Prolinbiosynthesegene	73
2.2 Analyse des Startpunktes <i>proHJ</i> -spezifischer RNA	75
2.3 Reportergenfusionsanalysen der osmotisch kontrollierten <i>proHJ</i> -Expression	78
2.3.1 Die Gene <i>proH</i> und <i>proJ</i> werden nach einem hyperosmotischen Schock verstärkt exprimiert	78
2.3.2 Die Stärke der Expression der <i>proH-treA</i> Fusion verhält sich proportional zur Osmolarität des Wachstumsmediums	78
2.3.3 Charakterisierung eines minimalen DNA-Fragmentes, das für die osmotisch regulierte Funktion des <i>proHJ</i> -Promotors erforderlich ist	80
2.3.4 Die Expression der <i>proH-treA</i> Operonfusion in <i>B. subtilis</i> unterliegt einem osmotischen Stimulus	82
2.3.5 Der Einfluss der Wachstumstemperatur auf die osmotisch kontrollierte Expression einer <i>proH-treA</i> Operonfusion	83
3. Inhibition der γ-Glutamyl-Kinase ProB durch das Prolinanalogen 3,4-Dehydro-DL-Prolin	84

4. Die Kontrolle der Expression der anabolen Prolinbiosynthesegene erfolgt in <i>B. subtilis</i> durch transkriptionelle Antitermination	87
4.1 Strukturelle Analyse der <i>proBA</i> und <i>proI</i> T-Box-Leader	87
4.2 Identifikation der <i>proBA</i> - und <i>proI</i> -Transkriptionsstartpunkte	90
4.3 Spezifische Induktion der <i>proBA</i> -Expression durch Prolinlimitation	92
4.4 Eine spezifische Induktion der <i>proBA</i> -Expression durch Prolinlimitation wird durch das CCU-„Specifiercodon“ gewährleistet	94
4.5 Northern-Blot-Analyse der <i>proBA</i> und <i>proI</i> mRNA vor und während Prolinhunger	98
4.6 Unter Prolinmangelbedingungen erfolgt eine Prozessierung des <i>proBA</i> -Primärtranskriptes	100
4.7 Die Anwesenheit des Prolinanalogs 3,4-Dehydro-DL-Prolin beeinflusst die <i>proBA</i> -Expression nicht	102
5. Akkumulation der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide	104
5.1 Osmotisch regulierte Expression des <i>dpp</i> -Operons	104
5.1.1 Northern-Blot-Analyse des <i>dpp</i> -Operons	105
5.1.2 Analyse des Startpunktes für eine osmotisch regulierte Transkription des <i>dpp</i> -Operons	108
5.2 Northern-Blot-Analyse des <i>opp</i> -Operons	109
5.3 Northern-Blot-Analyse der putativen Peptidasegene <i>yqhT</i> und <i>ykvY</i>	111
5.4 Die Aufnahme verschiedener prolinhaltiger Di- und Tripeptide bedingt eine Komplementation des prolinauxotrophen Phänotyps von JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})I$]	113
5.5 Unter hyperosmotischen Bedingungen steigert die Anwesenheit prolinhaltiger Di- und Tripeptide sowohl das Wachstumsvermögen der <i>proHJ</i> -Mutante JSB8, als auch das des Wildtyp-Stammes JH642	115
5.6 Unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen kommt es durch die Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide in JSB8 [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})I$] zur Akkumulation von Prolin	116
5.6.1 JSB44 [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})I \Delta(\textit{opuE}::\textit{tet})I$], mit einem defekten OpuE-Transporter, wird durch prolinhaltige Peptide nicht mehr osmotisch protektiert	119
5.7 In osmotisch gestressten JSB8-Zellen stellt das Dipeptid Pro-Gly als alleinige Prolinquelle ein relativ ineffizientes Osmoprotektivum dar	120
5.8 Konstruktion und phänotypische Charakterisierung verschiedener Dpp-Mutanten	121
5.9 Das Dpp-System ist in osmotisch gestressten <i>B. subtilis</i> -Zellen in die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide involviert	122
5.10 Konstruktion und phänotypische Charakterisierung einer <i>opp</i> -Mutante	124
5.11 Das Opp-System ist in osmotisch gestressten <i>B. subtilis</i> -Zellen der dominante Transporter für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide	125

5.12 Der Einfluss von CodY und AbrB auf die osmotisch regulierte Expression des <i>dpp</i> -Operons in <i>B. subtilis</i>	128
5.12.1 Die osmotisch regulierte Expression des <i>dpp</i> -Operons in <i>B. subtilis</i> ist unabhängig von AbrB	129
5.12.2 Die Expression des <i>dpp</i> -Operons wird durch CodY beeinflusst	130
V. DISKUSSION	132
1. Anpassung des Prolinpools in <i>B. subtilis</i> entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Anforderungen	132
1.2 Neusynthese kompatibler Solute: Aufklärung des Syntheseweges für eine weitverbreitete osmotische Schutzsubstanz	135
2. Die Rolle von prolinhaltigen Peptiden für die Adaptation von <i>B. subtilis</i> an hyperosmotische Bedingungen	137
3. Prolinbiosynthese in verschiedenen Organismen	140
3.1 Art und Regulation der Prolinbiosynthese in anderen Mikroorganismen	141
3.2 Die Rolle von Prolin und die Regulation der Prolinbiosynthese in Pflanzen	143
4. Osmotische Regulation der <i>proHJ</i>-Expression in <i>B. subtilis</i>	146
5. Der dritte Schritt der Prolinbiosynthese	151
6. Kontrolle aminosäurebiosynthetischer Gene durch Transkriptionstermination in Gram-positiven Mikroorganismen	152
6.1 Negative Regulation: Stabilisierung des Terminators	152
6.2 Positive Regulation: Stabilisierung des Antiterminators	154
7. Die Expression des <i>proBA</i>-Operons und des <i>proI</i>-Gens sind dem Prolinbedarf der Zelle angepasst	154
7.1 Primärsequenz und Sekundärstruktur der <i>proBA</i> - und <i>proI</i> -Leader	155
7.2 Die Rolle des „Specifercodons“ im <i>proBA</i> - und <i>proI</i> -Leader	158
7.3 Die Rolle der tRNA	160
7.4 Prozessierung der <i>proBA</i> -Leader mRNA	161
7.5 Einfluss der T-Box abhängigen Kontrolle der <i>proBA</i> - und der <i>proI</i> -Expression auf die Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i>	162
VI. LITERATURVERZEICHNIS	165

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1	Akkumulation von osmotischen Schutzsubstanzen in <i>B. subtilis</i> durch Synthese und Transport	9
Abb. 2	Prolinbiosyntheseweg in <i>E. coli</i>	12
Abb. 3	Genereller Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination	20
Abb. 4	Schematische Darstellung der Lage und Orientierung der verwendeten Oligonukleotide	33
Abb. 5	Prolin- und Glutamatgehalt osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> -Zellen	60
Abb. 6	Der Einfluss von Mutationen im <i>proHJ</i> -, <i>proBA</i> -, <i>proI</i> - oder <i>proG</i> -Genort auf das Wachstum und die intrazelluläre Prolinakkumulation	63
Abb. 7	Anaboler (I) und osmoregulatorischer (II) Prolinbiosyntheseweg in <i>B. subtilis</i>	66
Abb. 8	Die <i>proHJ</i> -Mutante JSB8 zeigt unter hyperosmotischen Bedingungen einen osmosensitiven Wachstumsphänotyp	68
Abb. 9	Der <i>proHJ</i> -Stamm JSB8 ist nicht in der Lage Prolin als Antwort auf hochosmolare Umweltbedingungen zu akkumulieren	70
Abb. 10	Exogen zugegebenes Glutamat wirkt osmoprotektiv auf <i>B. subtilis</i>	71
Abb. 11	Der <i>proHJ</i> -Stamm JSB8 weist nach einem hyperosmolaren Schock keinen erhöhten Kaliumbedarf auf	72
Abb. 12	Northern-Blot-Analyse des <i>proHJ</i> -Genortes	73
Abb. 13	Northern-Blot-Analyse der Genorte <i>proBA</i> , <i>proI</i> und <i>proG</i>	74
Abb. 14	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes <i>proHJ</i> -spezifischer mRNA	76
Abb. 15	Die Lokalisation des <i>proHJ</i> -Promotors wurde mittels <i>In vitro</i> -Transkription verifiziert	77
Abb. 16	Osmotische Kontrolle der <i>proHJ</i> -Expression	79
Abb. 17	Analyse der <i>proHJ</i> -Promotorregion durch sukzessive Deletion	81
Abb. 18	Die Induktion der Expression des <i>proHJ</i> -Operons ist ein wirklich osmotischer Effekt	83
Abb. 19	Vergleich der <i>proHJ</i> -Expression bei 37°C und 25°C	84
Abb. 20	Vergleich der Aminosäuresequenzen der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus <i>B. subtilis</i> mit ProB aus <i>E. coli</i>	85
Abb. 21	Inhibition der <i>B. subtilis</i> -Stämme JSB15 und JSB16 durch das Prolinanalogen 3,4-Dehydro-DL-Prolin	86
Abb. 22	Sekundärstrukturmodell der <i>proBA</i> -(A) und <i>proI</i> -(B) Leadertranskripte	88
Abb. 23	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte <i>proBA</i> - und <i>proI</i> -spezifischer mRNA	91
Abb. 24	Reportergenfusionsanalyse der <i>proBA</i> -Expression unter prolinlimitierenden Wachstumsbedingungen	93
Abb. 25	Die Expression der Φ (<i>proB-treA</i>) ₂ Fusion in dem Stamm JSB31 Mut1 ist dem Phenylalaninbedarf der Zelle angepasst	96

Abb. 26	Ein Austausch der unmittelbar 5' und 3' des „Specifierncodons“ lokalisierten CCU-Triplets führt zum Verlust der prolinabhängigen Induktion der <i>proBA</i> -Expression	97
Abb. 27	Northern-Blot-Analyse der <i>proBA</i> - und <i>proI</i> -mRNA unter Prolinhungerbedingungen	99
Abb. 28	Die <i>proBA</i> -mRNA wird unter Prolinhungerbedingungen prozessiert	101
Abb. 29	Die <i>proI</i> -mRNA wird unter Prolinhungerbedingungen nicht prozessiert	103
Abb. 30	Northern-Blot-Analyse des <i>dpp</i> -Genortes	106
Abb. 31	Die Expression des <i>dpp</i> -Operons wird nicht durch die Verfügbarkeit prolinhaltiger Dipeptide im Medium beeinflusst	107
Abb. 32	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes <i>dpp</i> -spezifischer mRNA	108
Abb. 33	Northern-Blot-Analyse des <i>opp</i> -Genortes	110
Abb. 34	Northern-Blot-Analyse der <i>yqhT</i> - und <i>ykvY</i> -Genorte	112
Abb. 35	Die Verfügbarkeit prolinhaltiger Dipeptide im Medium beeinflusst die Expression der Gene <i>yqhT</i> und <i>ykvY</i> nicht	113
Abb. 36	Die Anwesenheit prolinhaltiger Peptide unter hyperosmolaren Bedingungen bedingt eine deutliche Wachstumsverbesserung	116
Abb. 37	In osmotisch gestressten JSB8-Zellen [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})I$] kommt es in Anwesenheit prolinhaltiger Di- oder Tripeptide zu einer Akkumulation von Prolin	118
Abb. 38	Wachstum des <i>B. subtilis</i> -Stammes JSB8 unter hochosmolaren Bedingungen bei verschiedenen Pro-Gly-Konzentrationen	121
Abb. 39	Der <i>dpp</i> ⁻ -Stamm JSB58 wird unter hochosmolaren Bedingungen weniger durch prolinhaltige Dipeptide protektiert als JSB8	123
Abb. 40	Der prolinauxotrophe Phänotyp von JSB62 [<i>oppA</i> × pJS53 (<i>neo</i>) $\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})I$] wird nur unzureichend durch die Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide komplementiert	125
Abb. 41	Der <i>B. subtilis</i> -Stamm JSB61 [<i>oppA</i> × pJS53 (<i>neo</i>) $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$] wird unter hochosmolaren Bedingungen nicht mehr durch prolinhaltige Tripeptide protektiert	126
Abb. 42	Der osmotisch gestresste <i>B. subtilis</i> -Stamm JSB61 [<i>oppA</i> × pJS53 (<i>neo</i>) $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$] akkumuliert in Gegenwart prolinhaltiger Tripeptide kein Prolin	128
Abb. 43	Die osmotisch regulierte Expression des <i>dpp</i> -Operons wird nicht durch AbrB beeinflusst	129
Abb. 44	Die Expression des <i>dpp</i> -Operons wird durch CodY beeinflusst	131
Abb. 45	Anpassung des Prolinpools in <i>B. subtilis</i> entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Anforderungen	134
Abb. 46	Die regulatorische <i>proHJ</i> -Promotorregion	148
Abb. 47	Model der S-Box Leader mRNA verändert nach Winkler <i>et al.</i> (2001)	153
Abb. 48	Das GA-Motiv im <i>proBA</i> -Leader	158

Abb. 49	Komplementäre Sequenzen zwischen dem <i>proBA</i> - und <i>proI</i> -Leader und der tRNA ^{Pro} _{UGG} und der tRNA ^{Phe} _{GAA}	161
Abb. 50	Nukleotidsequenzvergleich zwischen dem <i>proBA</i> - und dem <i>proI</i> -5'-Nichtkodierungsbereich	163

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1	<i>E. coli</i> -Stämme	24
Tab. 2	<i>B. subtilis</i> -Stämme	24
Tab. 3	Plasmide	27
Tab. 4	Oligonukleotide	29
Tab. 5	Osmolaritäten	34
Tab. 6	Antibiotika, Aminosäuren, Peptide und Zusätze	35
Tab. 7	Gradient für die Auftrennung FMOC-derivatisierter Aminosäuren	56
Tab. 8	Osmotisch induzierte Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i>	61
Tab. 9	Der Effekt von Mutationen in der „Specifizierdomäne“ auf die Induktion der <i>proB-treA</i> Expression	94
Tab. 10	Komplementation des prolinauxotrophen Phänotyps von JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})\textit{I}$] durch die Aufnahme verschiedener prolinhaltiger Di- und Tripeptide	114
Tab. 11	Wachstum und Prolinakkumulation von JSB8 [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})\textit{I}$] in Anwesenheit prolinhaltiger Peptide	119

ABKÜRZUNGEN

ADAM	1-Aminoadamantan
Ap ^r	resistent gegen Ampicillin
Pm ^r	resistent gegen Phleomycin
BGSC	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center
E _x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
Cm ^r	resistent gegen Chloramphenicol
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
Em ^r	resistent gegen Erythromycin
Fmoc	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
Km ^r	resistent gegen Kanamycin
MCS	multiple cloning site
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Sp ^r	resistent gegen Spectinomycin
Tc ^r	resistent gegen Tetracyclin
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galactosid

I. ZUSAMMENFASSUNG

Das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis* ist in der Lage durch eine hochosmolare Umwelt verursachte Störungen seines Wasserhaushalts durch die intrazelluläre Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen zu kompensieren. Hierbei spielt die Aminosäure Prolin eine integrale Rolle. In Abwesenheit exogen verfügbarer, osmotischer Schutzsubstanzen initiiert *B. subtilis* eine massive Akkumulation von Prolin mittels *de novo* Synthese (Whatmore *et al.*, 1990), wobei die intrazelluläre Konzentration dieser Aminosäure ein Vielfaches über das für ihre proteinogene Funktion erforderliche Maß hinaus ansteigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welcher Syntheseweg und welche regulatorischen Mechanismen den jeweiligen Bedarf von *B. subtilis* für diese Aminosäure entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Anforderungen decken und so zum einen die Bereitstellung von Prolin für den Baustoffwechsel der Zelle unter Normalbedingungen, zum anderen aber auch eine osmotisch kontrollierte Anhäufung unter hochosmolaren Bedingungen gewährleisten.

Es konnte gezeigt werden, dass es in *B. subtilis* neben dem anabolen Weg noch einen zweiten Weg der Prolinbiosynthese gibt, der für die osmotisch gesteuerte Prolinakkumulation verantwortlich ist. Damit ist erstmals im Bereich der Mikroorganismen die Aufklärung des Biosynthesewegs für dieses wichtige kompatible Solut gelungen. Die Synthese von Prolin erfolgt in beiden Wegen ausgehend von Glutamat über drei enzymatisch katalysierte Schritte. Für anabole Zwecke wird sie durch die Enzyme ProB, ProA und ProI/ProG vermittelt, wobei in Zusammenarbeit mit B. Belitsky (Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts) gezeigt werden konnte, dass in *B. subtilis* drei verschiedene Enzyme den letzten Schritt der Prolinbiosynthese katalysieren können und erst die simultane Ausschaltung dieser einen prolinauxotrophen Phänotyp zur Folge hat (Belitsky *et al.*, 2001). In dem zweiten zur Akkumulation von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen genutzten Syntheseweg ersetzen zwei Isoenzyme (ProJ und ProH) die unter normalen Bedingungen operierenden Enzyme ProB und ProI/ProG. Eine in dem ProH- und ProJ-Enzym defekte Mutante ist nicht mehr in der Lage Prolin zu akkumulieren und weist daher einen massiven Wachstumsnachteil unter hyperosmolaren Bedingungen auf. Wie Untersuchungen einer *proA*-Defektmutante gezeigt haben, wird zudem das ProA-Enzym des anabolen Weges rekrutiert, das somit den zweiten Schritt der Prolinbiosynthese in beiden Synthesewegen katalysiert.

Mit Hilfe von Northern-Analysen und Reporterfusionstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des *proHJ*-Operons einer fein abgestimmten osmotischen Kontrolle auf transkriptioneller Ebene unterliegt, die wie Primer Extension- und *In vitro*-Transkriptions-Analysen gezeigt haben, ausgehend von einem vom vegetativen Sigmafaktor σ^A abhängigen Promotor erfolgt. Nach einem hyperosmotischen Schock kommt es zu einer verstärkten *proHJ*-Expression, wobei das erzielte Niveau der Transkription proportional zur Osmolarität des Mediums ist und so lange aufrecht erhalten wird wie der osmotische Stimulus andauert. Physiologische Untersuchungen mit dem toxischen Prolinanalogen 3,4-Dehydro-D,L-Prolin lassen zudem vermuten, dass das ProJ-Enzym weitaus weniger sensitiv gegenüber einer allosterischen Endprodukthemmung durch Prolin ist als das paraloge ProB-Enzym des anabolen Synthesewegs.

Entsprechend seiner physiologischen Aufgabe ist auch der anabole Prolinbiosyntheseweg einer Regulation auf transkriptioneller Ebene unterworfen. Die Expression des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens wird über den Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination spezifisch dem Bedarf der Zelle an Prolin als proteinogene Aminosäure angepasst.

Wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, stellen prolinhaltige Di- und Tripeptide eine weitere Prolinquelle, sowohl für anabole als auch für osmoprotektive Zwecke dar. In osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen führt die Aufnahme prolinhaltiger Peptide zur Akkumulation des durch die anschließende Hydrolyse der Peptide freigesetzten Prolins. Die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide erfolgt zum Teil über das osmotisch reguliert exprimierte Dpp-Transportsystem, während das Opp-Transportsystem nicht osmotisch reguliert exprimiert wird, aber essentiell für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse demonstrieren die Bedeutung der Aminosäure Prolin für den Zellstoffwechsel und die wesentliche und integrale Stellung, die dieser osmotischen Schutzsubstanz in *B. subtilis* für die Stressantwort zukommt.

II. EINLEITUNG

1. Osmotischer Stress in Mikroorganismen

Mikroorganismen sind in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl von Limitationen und Stressfaktoren ausgesetzt. So beeinflussen, neben der Nährstoffverfügbarkeit, Temperatur- und pH-Wertschwankungen, vor allem Variationen in der Verfügbarkeit von Wasser das Wachstum von Mikroorganismen und deren Ansiedlung in einem gegebenen Habitat (Galinski und Trüper, 1994; Ingraham und Marr, 1996; Potts, 1994). Eine hochosmotische Umwelt ist zum einen durch eine hohe Konzentration von osmotisch wirksamen Substanzen in der Umgebung der Zelle gegeben, wie sie zum Beispiel im Meerwasser oder in Salzseen vorliegen (Ventosa *et al.*, 1998). Zum anderen sind vor allem Bewohner der oberen Bodenschichten, dem Ökosystem von *Bacillus subtilis*, sehr häufig von wechselnden Perioden der Austrocknung und Überflutung, und den damit einhergehenden osmotischen Schwankungen, betroffen (Miller und Wood, 1996; Galinski und Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998).

1.1 Osmotische Eigenschaften der Bakterienzelle

Im Gegensatz zu tierischen Zellen sind Pflanzen- und Bakterienzellen von einer elastischen Zellwand umgeben (Ingraham und Marr, 1996). Diese ist für Salze und zahlreiche niedermolekulare Substanzen durchlässig. Die osmotischen Eigenschaften der Zellen werden dagegen durch die Semipermeabilität der aus einer Lipiddoppelschicht und Proteinen bestehenden Zytoplasmamembran bestimmt. Sie stellt eine Barriere für organische Verbindungen, anorganische Salze und Makromoleküle dar (Bovell *et al.*, 1963), wohingegen sie für Wasser, Glycerin und einige kurzkettige Alkohole permeabel ist. Das Zytoplasma setzt sich aus einer wässrigen Lösung osmotisch aktiver Substanzen zusammen und besitzt in der Regel ein höheres osmotisches Potential als das umgebende Medium. Dies führt zu einem osmotisch gesteuerten Einstrom von Wasser über die Zytoplasmamembran in die Zelle, woraus ein nach außen, gegen die Zellwand gerichteter, hydrostatischer Druck, der Zellturgor, resultiert. Abschätzungen des Turgors Gram-negativer Bakterien belaufen sich auf etwa 3 bis 5 bar (Koch, 1984; Ingraham und Marr, 1996; Mitchell und Moyle, 1956). Gram-positive Mikroorganismen weisen, vermutlich auf Grund ihres aus mehr als 25 Peptidoglykanschichten bestehenden, sehr stabilen Mureinsacculus, mit circa 20 bar einen wesentlich höheren Zellturgor auf (Whatmore und Reed, 1990). Die Aufrechterhaltung dieses positiven Turgors, innerhalb enger physiologischer Grenzen, ist essentiell für die Erhaltung des Zellvolumens. Zudem liefert er vermutlich die mechanischen Kräfte für die Ausdehnung der Zelle während des Wachstums und ist essentiell für die Zellteilung (Koch, 1982; Höltje, 1998; Taiz, 1984). Der Turgor stellt somit einen wesentlichen Parameter für das Wachstum und Überleben von Mikroorganismen dar.

Veränderungen der externen Osmolarität beeinflussen unmittelbar den Wasserstrom über die Zytoplasmamembran. Unter hyperosmolaren Bedingungen kommt es zur Dehydrierung des Zytoplasmas, was im Extremfall den Verlust des Turgors und damit ein Zurückweichen der Zytoplasmamembran von der Zellwand zur Folge hat. Dieser als Plasmolyse bezeichnete Prozess

führt, bedingt durch eine Verringerung des zytoplasmatischen Volumens, zu einer Ankonzentrierung der Zellinhaltsstoffe und damit zur Inhibition zahlreicher physiologischer Prozesse (Csonka, 1989; Meury, 1988). Die Kinetik und das Ausmaß der Plasmolyse sind dabei nicht von der Art der im umgebenden Medium vorliegenden, nicht membrangängigen Osmolyte abhängig, sondern beruhen allein auf der Höhe des Anstiegs der Osmolarität (Mitchell und Moyle, 1956). Dagegen bedingt der unter hypoosmotischen Bedingungen verstärkte Wassereinstrom einen Anstieg des Turgors. Auf Grund ihrer sehr stabilen, dabei jedoch elastischen Struktur, kann dieser Druckanstieg in der Regel von der bakteriellen Zellwand aufgefangen werden (Carpita, 1985), wobei es zu einer Zunahme des Zellvolumens kommt (Csonka, 1989; Csonka und Epstein, 1996). Im Extremfall läuft die Zelle jedoch Gefahr zu platzen.

Osmotisch initiierte Wasserströme über die Zytoplasmamembran können zum einen mittels einfacher Diffusion durch die Lipiddoppelschicht erfolgen. Ein deutlich beschleunigter Wassertransfer kann jedoch durch Diffusion über wasserselektive Kanäle, die sogenannten Aquaporine, erreicht werden. Sie sind weitverbreitet in pflanzlichen und tierischen Zellen (Johansson *et al.*, 2000; Preston *et al.*, 1992) und erlauben, bei einer Änderung der Osmolarität der Umgebung, eine sehr rasche und effiziente Wasserpermeation in beide Richtungen durch die Zytoplasmamembran (Agre *et al.*, 1995; Maurel, 1997). Das bisher einzige charakterisierte, bakterielle Aquaporin, AqpZ aus *Escherichia coli* (Calamita *et al.*, 1998; Booth und Louis, 1999; Calamita, 2000), ist jedoch in *B. subtilis* nicht vorhanden.

1.2 Aufrechterhaltung des Turgors unter hochosmolaren Bedingungen

Um den Turgor in physiologisch akzeptablen Grenzen aufrecht zu halten, müssen Veränderungen in der externen Osmolarität rasch erkannt und von den Bakterien mittels aktiver Anpassungsmechanismen beantwortet werden. Da Mikroorganismen nicht über die Fähigkeit verfügen, Wasser aktiv in oder aus der Zelle heraus zu transportieren, müssen sie ihren Wasserhaushalt durch Kontrolle der intrazellulär vorhandenen, osmotisch aktiven Substanzen einregulieren, um so die Wasserströme über die Zytoplasmamembran gezielt zu steuern. Dies erfordert bei hoher Osmolarität die intrazelluläre Anhäufung von osmotisch aktiven Teilchen und deren rasche Exkretion, wenn die Zelle einer plötzlichen Erniedrigung der externen Osmolarität ausgesetzt ist. Für motile Bakterien stellt zudem die Osmotaxis eine nicht zu unterschätzende Möglichkeit dar, widrigen osmotischen Umständen zu entkommen (Li *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 1995).

Prinzipiell können zur Aufrechterhaltung des Turgors unter hochosmotischen Wachstumsbedingungen zwei Strategien verfolgt werden. Viele halophile Mikroorganismen, die an ein permanentes Leben in hochosmolaren Habitaten angepasst sind, erlauben die Aufnahme von Ionen, vor allem Kalium-Ionen, in das Zytoplasma (Zhilana und Zavarzin, 1990; Roberts, 2000). Die dabei erreichten, außerordentlich hohen, intrazellulären Ionenkonzentrationen erfordern bei dieser Gruppe von Mikroorganismen jedoch eine spezielle evolutionäre Anpassung praktisch aller Zellkomponenten und physiologischer Prozesse und beschränken sie damit auf die Kolonisierung hochsaliner Habitate. Im Gegensatz dazu kommt es bei nicht-halophilen und halotoleranten Mikroorganismen zum weitgehenden Ausschluss von Salzen aus dem Zellinneren. Zwar gibt es

auch hier häufig eine initiale Anhäufung von Kaliumionen, die eine rasche Restaurierung des Turgors ermöglicht, sie stellt jedoch nur ein Provisorium dar, da anorganische Ionen in hohen Konzentrationen, essentielle zelluläre Vorgänge hemmen würden. Diese Bakterien favorisieren daher für die längerfristige Anpassung die Strategie das akkumulierte Kalium durch eine Reihe niedermolekularer organischer Verbindungen zu ersetzen, die für den Zellstoffwechsel hochverträglich sind.

1.3 Funktionsweise und Natur osmotischer Schutzsubstanzen

Auf zellulärer Ebene gibt es bemerkenswerte Übereinstimmungen der Antworten auf osmotischen Stress, zwischen Bakterien, Pflanzen, Pilzen und tierischen Zellen. Organismen dieser Reiche akkumulieren unter hochosmolaren Bedingungen organische Osmolyte, die sogenannten osmotische Schutzsubstanzen, derselben Stoffklassen im Zytoplasma (Le Rudulier *et al.*, 1984; Delauney und Verma, 1993; Galinski und Trüper, 1994; Miller und Wood, 1996; Bremer und Krämer, 2000). Kompatible Solute sind nach einer von A. D. Brown (1976) aufgestellten Definition, Substanzen, die bei niedriger externer Wasseraktivität intrazellulär in hohen Konzentrationen akkumuliert werden, ohne dabei den Zellstoffwechsel zu beeinträchtigen. Zudem besitzen sie die Fähigkeit Proteine und andere Makromoleküle unter Bedingungen hoher Ionenstärke sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu stabilisieren und deren native Konformation zu schützen (Lippert und Galinski, 1992; Iakobashvili und Lapidot, 1999; Bourot *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2000; Courtenay *et al.*, 2000). Die Funktionsweise kompatibler Solute ist dabei durch drei wesentliche, gemeinsame Merkmale bedingt: Sie sind auch in hohen Konzentrationen sehr gut löslich, besitzen keine Netto-Ladung und interagieren nicht direkt mit Proteinen (Csonka, 1989). Zumindest gilt dies für die von *Bacteria* und Eukaryoten akkumulierten, kompatiblen Solute. *Archaea* dagegen nutzen eine Reihe organischer Solute, die eine negativ geladene Carboxyl-, Phosphat- oder Sulfatmodifikation tragen. Die Akkumulation dieser negativ geladenen Solute korreliert mit der hohen intrazellulären K^+ -Ionenkonzentration in *Archaea*, die vermutlich für den Ladungsausgleich sorgt (Martin *et al.*, 1999; Roberts, 2000) Das „preferential exclusion“-Modell (Arakawa und Timasheff, 1985) gibt eine mögliche Erklärung für die Chaperonen ähnliche Wirkung osmotischer Schutzsubstanzen (Baskakov und Bolen, 1998; Bolen und Baskakov, 2001; Vuillard *et al.*, 1998; Samuel *et al.*, 2000). Die grundlegende Annahme dieses Modells ist, dass kompatible Solute vorzugsweise von einer direkten Wechselwirkung mit der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen sind und sich in einem bestimmten Abstand schützend um diese lagern. Es kommt zu einer Erhöhung der lokalen Wasserkonzentration um das Protein. Dieser präferentielle Ausschluss ist energetisch dann am günstigsten, wenn die Oberfläche des Proteins möglichst klein ist und bedingt somit eine Stabilisierung des Proteins in seiner nativen Konformation (Timasheff, 1998).

Die von den verschiedensten Organismen akkumulierten kompatiblen Solute rekrutierten sich aus einer limitierten Anzahl von Stoffklassen, wie Aminosäuren (z. B. Prolin und Glutamat) und Aminosäurederivaten (z. B. Ectoin und Prolinbetain), Zuckern (z. B. Glukose, Fruktose, Saccharose oder Trehalose), Polyolen (z. B. Glycerin und Glykosylglycerin), kleineren Peptiden (z. B. N-Acetylglutaminyl-Glutaminamid) und vor allem Trimethylammonium-Verbindungen (z. B.

Glycinbetain), oder deren Sulfonium-Analoga (z. B. Dimethylsulfoniumpropionat) (Csonka 1889; Galinski und Trüper 1994; da Costa *et al.*, 1998, Bremer und Krämer, 2000). Zur Anhäufung dieser Substanzen kann entweder deren Neusynthese oder die direkte Aufnahme aus der Umgebung genutzt werden. Die meisten Mikroorganismen haben beide Möglichkeiten verwirklicht. Sie sind überwiegend in der Lage mindestens eine osmotische Schutzsubstanz endogen zu synthetisieren, bevorzugen aber meist die Aufnahme einer Reihe exogener Substanzen, sobald diese verfügbar sind (Galinski und Trüper, 1994).

1.4 Peptide als osmotische Schutzsubstanzen

Die Akkumulation der bisher beschriebenen, osmotischen Schutzsubstanzen beruht entweder auf einer *de novo* Synthese, einer Synthese aus biosynthetischen Vorläufern, oder einer Aufnahme durch meist spezifische, hochaffine und osmotisch regulierte Transportsysteme. Eine weitere Quelle für kompatible Solute stellen jedoch Peptide dar. Dieser Befund ist vor allem für die Nahrungsmittelindustrie von großer Bedeutung. Proteine werden durch proteolytische Aktivitäten, wie sie bei der normalen Lebensmittelverarbeitung vorkommen, oder durch die Freisetzung extrazellulärer Proteasen durch kontaminierende Mikroorganismen zu Peptiden abgebaut (Amezaga-Johnstone *et al.*, 1999). Verschiedene Bakterien können dann Peptide, von einer Länge von bis zu acht Aminosäuren, mittels spezifischer Transportsysteme aufnehmen und diese durch intrazelluläre Peptidasen zu freien Aminosäuren hydrolysieren (Amezaga-Johnstone *et al.*, 1999). Primär dient die Aufnahme von Peptiden in den meisten diesbezüglich untersuchten Bakterien der Versorgung mit essentiellen Aminosäuren (Verheul *et al.*, 1995; Verheul *et al.*, 1998; Juillard *et al.*, 1998) oder mit Nährstoffen (Amezaga und Booth, 1999).

Es wurde allerdings für einige Mikroorganismen schon vor langem eine Akkumulation bestimmter Peptide unter hochosmolaren Bedingungen mittels *de novo* Synthese nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass osmotisch gestresste *E. coli*-Zellen, neben der primär *de novo* akkumuliertem Trahalose, auch verstärkt Glutathion und γ -Glutamyl-glutamin synthetisieren und dies deutlich zur Osmotoleranz dieses Organismus beiträgt (McLaggan *et al.*, 1990). *Rhizobium meliloti* und *Pseudomonas aeruginosa* sind unter osmotischem Stress in der Lage, neben Glutamat und Trehalose, das Dipeptid N-Acetylglutaminyl-Glutaminamid (NAGGN) als osmotische Schutzsubstanz *de novo* zu akkumulieren (Smith und Smith, 1989).

Die Rolle exogener Peptide für die Osmostressprotektion wurde erstmalig für das in Lebensmitteln gefundene, pathogene Bakterium *L. monocytogenes*, den Verursacher der Listeriose, beschrieben (Amezaga *et al.*, 1995). Die Fähigkeit von *L. monocytogenes* sowohl bei hohen Salzkonzentrationen, als auch bei niedrigen Temperaturen um den Gefrierpunkt zu wachsen, macht es gegenüber diesen traditionellen Nahrungsmittelkonservierungsmethoden weitgehend resistent. Unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen führt zudem die Aufnahme von in Nahrungsmitteln vorhandenen Peptiden, die Glycin, Hydroxyprolin oder Prolin enthalten, in *L. monocytogenes* zu einer Akkumulation der Peptide selbst und der durch Abbau der Peptide freigesetzten Aminosäuren (Amezaga *et al.*, 1995). Die wachstumsstimulierende Wirkung von Peptiden unter hochosmolaren Bedingungen in diesem Bakterium, wird zum einen auf die osmoprotektive Wirkung der Peptide und freigesetzten Verbindungen, zum anderen aber auch auf die Nährstoffsupplementation

zurückgeführt. Zur Aufnahme von Peptiden zwecks Aminosäuresupplementation und Nährstoffversorgung, besitzt *L. monocytogenes* zwei Peptidtransportsysteme: Ein Di- und Tripeptidtransportsystem (Verheul *et al.*, 1995) und ein Oligopeptidtransportsystem (Verheul *et al.*, 1998). Bisher konnte jedoch noch für keines dieser Systeme eine Aufnahme von Peptiden für osmoprotektive Zwecke nachgewiesen werden.

1.5 Das „Sensing“ von osmotischem Stress

Gene und Enzyme, die für die Modulation des intrazellulären Levels an osmoregulatorischen Soluten verantwortlich sind, konnten in den verschiedensten Mikroorganismen identifiziert werden. Der Mechanismus, durch welchen die Mikroorganismen osmotische Veränderungen in ihrer Umwelt „wahrnehmen“ und welche Parameter dafür ausschlaggebend sind, ist dagegen nur unzureichend verstanden. Prinzipiell können Veränderungen der Osmolarität direkt als Veränderungen der extrazellulären Wasseraktivität (direct osmosensing) oder aber indirekt als Veränderungen der Zellstruktur registriert werden (indirect osmosensing) (Wood, 1999). Zur Ausbildung des Turgors ist nicht die absolute Konzentration extrazellulärer Solute von Belang, sondern das Konzentrationsgefälle über der Zytoplasmamembran. Eine alleinige Erfassung der exogenen Wasseraktivität würde der Zelle daher keine verlässlichen Informationen über den Bedarf an intrazellulären Soluten geben. Ähnliches gilt für die absolute intrazelluläre Wasseraktivität oder Konzentration osmotisch aktiver Substanzen. Als Veränderungen der Zellstruktur könnten zahlreiche Parameter, wie strukturelle Veränderungen der Zellwand, der Zytoplasmamembran oder des Nukleoids detektiert werden. Einige dieser Stimuli sind abhängig von Eigenschaften des Zytoplasmas und des Periplasmas, wie dem hydrostatischen Druck, der Osmolarität und der Ionenstärke. Die verlässlichsten Informationen über Missstände im Osmolythaushalt kann die Zelle vermutlich der Zytoplasmamembran entnehmen. Bisherige Erkenntnisse legen daher die Vermutung nahe, dass „Osmosensoren“ primär in der Zytoplasmamembran oder aber dem Nukleoid von Bakterien lokalisiert sind. Dabei könnten Veränderungen des osmotischen Drucks, des lateralen Drucks, der Membrandicke und der Struktur der Doppelschicht mögliche Stimuli membranassoziierter „Osmosensoren“ sein, während zum Beispiel Veränderungen der DNA-Topologie ein mögliches Signal für im Nukleoid lokalisierte „Osmosensoren“ darstellen (Wood, 1999).

So beeinflusst beispielsweise eine Veränderung des lateralen Drucks innerhalb der Phospholipiddoppelschicht die Konformation des mechanosensitiven Kanals MscL in *E. coli*. Bei einem hypoosmotischen Schock kommt es durch einen drastischen Anstieg des Turgors zu einer Verringerung des lateralen Drucks in der Membran. Das überträgt sich auf MscL und bewirkt die Öffnung des Kanals. Dieser Mechanismus erlaubt es dem Bakterium sich innerhalb weniger Millisekunden der zuvor akkumulierten kompatiblen Solute zu entledigen und so ein Platzen der Zelle zu verhindern (Blount *et al.*, 1997; Sukharev *et al.*, 1994).

Die durch das Zweikomponenten System KdpD und KdpE kontrollierte Expression des *kdpFABC*-Operons aus *E. coli*, wird bei einem Abfall des Zellurgors, ausgelöst durch einen plötzlichen Anstieg der extrazellulären Osmolarität, stimuliert. Das von *kdpFABC* kodierte Kdp-Transportsystem vermittelt die Aufnahme von K^+ -Ionen (Altendorf *et al.*, 1994; Altendorf *et al.*,

1998). Die Sensorkinase KdpD ist in der Membran lokalisiert, während es sich bei dem Response Regulator KdpE um ein lösliches Protein handelt. Das KdpD-Protein hat dabei sowohl eine Autokinase- und Phosphotransferaseaktivität, als auch eine „Phospho-KdpE“-spezifische Phosphataseaktivität. KdpD autophosphoryliert sich an einem Histidinrest und transferiert die Phosphatgruppe anschließend auf KdpE. Das phosphorylierte KdpE-Protein hat eine erhöhte Affinität zur *kdpFABC*-Promotorregion und induziert die Transkription des Operons. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch einen Stimulus aus der Umwelt, vermutlich eine Reduktion des Zellurgors, die „Phospho-KdpE“-spezifische Phosphataseaktivität des KdpD-Proteins direkt inhibiert wird, was zu einer Akkumulation phosphorylierter KdpEs und damit einer induzierten *kdpFABC*-Expression führt (Brandon *et al.*, 2000; Heermann *et al.*, 2000).

Das ABC-Transportsystem ProU katalysiert in *E. coli* die Aufnahme eines breiten Spektrums osmotischer Schutzsubstanzen (Haardt *et al.*, 1995). Ein plötzlicher Anstieg der externen Osmolarität, aber auch erhöhte intrazelluläre K^+ -Ionenkonzentrationen, führen zu einer verstärkten *proU*-Transkription. Dabei haben DNA-Bindeproteine wie zum Beispiel H-NS, TopA, GyrAB, IHF und HU pleiotrope Effekte auf die Genexpression und die DNA-Superstruktur. Diese wird zudem von der intrazellulären Akkumulation von K^+ -Glutamat und Veränderungen im DNA-„Supercoiling“ unter hochosmolaren Bedingungen beeinflusst (Gowrishankar und Manna, 1996). Im einzelnen ist der molekulare Mechanismus, der die osmotisch regulierte *proU*-Expression kontrolliert, jedoch noch nicht verstanden.

2. Osmoregulation im Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis*

B. subtilis ist ein stäbchenförmiger, Gram-positiver Endosporenbildner mit niedrigem GC-Gehalt (43 %) (Priest, 1993). Auf Grund seiner guten molekularbiologischen Zugänglichkeit und der seit 1997 veröffentlichten Nukleotidsequenz des gesamten Genoms (Kunst *et al.*, 1997), entwickelte sich *B. subtilis* in der mikrobiologischen Forschung zum Modellorganismus innerhalb der phylogenetischen Gruppe der Gram-positiven Bakterien. Der Focus der Untersuchungen lag hierbei vornehmlich auf den postexponentiellen Phänomenen der Sporulation (Stragier und Losick, 1996). Einen weiteren Schwerpunkt bildeten jedoch die Anpassungsmechanismen an den Lebensraum Boden, so dass sich *B. subtilis* bezüglich der Osmoregulation, neben dem Gram-negativen Modellsystem *E. coli*, zum bestuntersuchteten Mikroorganismus entwickelte. Gerade in der letzten Zeit konnten zahlreiche, erstmalig für die Anpassung von *B. subtilis* an hochosmolare Bedingungen nachgewiesene Phänomene und Transportsysteme (Kempf und Bremer; 1998a; Kempf und Bremer; 1998b), auch in anderen Organismen charakterisiert werden. Hierbei sind vor allem die Untersuchungen zur Osmostressantwort des humanpathogenen Bakteriums *L. monocytogenes* hervorzuheben (Ko und Smith, 1999; Fraser *et al.*, 2000; Sleator *et al.*, 2001a; Sleator *et al.*, 2001b).

B. subtilis besiedelt in erster Linie die obersten, gut belüfteten Bodenschichten, wo er besonders starken Schwankungen der Wasseraktivität durch Sonneneinstrahlung und Regenfälle, oder Auswaschung in Süß- oder Meerwasser ausgesetzt ist (Miller und Wood, 1996). Kurzfristigen Anstiegen der Osmolarität begegnet *B. subtilis* zunächst mit osmotaktischem Wegschwimmen aus dieser Region (Wong *et al.*, 1995). Unter allzu lebensfeindlichen Umweltbedingungen, wie

dramatischem Nährstoffmangel, können Endosporen mit einer Resistenz gegen eine Vielzahl physikalischer und chemischer Einwirkungen gebildet werden. Deren Bildung geht allerdings mit dem Tod der Mutterzelle einher, verschafft dem Organismus aber die Möglichkeit in dieser Form mehrere Jahre zu überdauern (Errington, 1993). Diese Art der Anpassung bedeutet den temporären Verlust der ökologischen Nische, und ist eine inadäquate Strategie zur Anpassung an osmotischen Stress. Es konnte gezeigt werden, dass unter Salzstress die Aktivierung der frühen Sigmafaktoren, σ^F und σ^E , in der Sporulationskaskade unterbrochen und somit die Bildung von Endosporen blockiert wird (Ruzal *et al.*, 1998).

Eine weniger drastische Anpassung bietet die generelle Stressantwort, die von einer Vielzahl von Stressfaktoren wie Hitze, Ethanol, Nährstoffmangel, aber auch eine Erhöhung der Salzkonzentration, transient induziert wird (Hecker *et al.*, 1996; Bernhardt *et al.*, 1997; Völker *et al.*, 1999; Hecker und Völker, 2001). Das generelle Stressregulon wird durch den alternativen Transkriptionsfaktor SigB (σ^B) gesteuert und kontrolliert direkt oder indirekt, schätzungsweise mehr als 200 Gene in *B. subtilis* (Petersohn *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2001). Proteom-Analysen haben gezeigt, dass die durch einen plötzlichen Anstieg der Osmolarität induzierten Proteine in zwei Gruppen, die salzspezifischen und die generellen Stressproteine, unterteilt werden können (Bernhardt *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebensfähigkeit einer *sigB*-Mutante nach einem plötzlichen wachstumslimitierenden Salzstress deutlich eingeschränkt ist (Völker *et al.*, 1999). Für das Wachstum an kontinuierliche hohe Salinität angepasster *B. subtilis*-Kulturen ist SigB dagegen nicht erforderlich (von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter und Bremer, 1998). Plötzliche, extreme Salzshocks und das Wachstum unter langanhaltend hochosmolaren Bedingungen stellen offensichtlich recht unterschiedliche Anforderungen an die Stressreaktion der Zelle, denen sie zum einen mit der Anschaltung der generellen Stressantwort, zum anderen mit für osmotischen Stress spezifischen Anpassungsreaktionen, wie der Akkumulation kompatibler Solute, begegnet. Das Sigma B-Regulon bietet eine schnelle, aber transiente Antwort, während andere Sigma-Faktoren, wie σ^A , so lange aktiv bleiben wie der Stimulus andauert.

2.1 Initiale Phase der Anpassung: K^+ -Aufnahme

Kalium ist in der Natur weit verbreitet und mit einer Konzentration von 100 bis 150 mM im Zytoplasma von Mikroorganismen das häufigste Kation. Es spielt bei der Aktivierung von Enzymen, der pH-Homöostase und der Aufrechterhaltung des Turgors eine entscheidende Rolle (Csonka und Hanson, 1991). Nach einem hyperosmotischen Schock zeigt *B. subtilis* einen biphasischen Adaptationsprozess: In einer ersten Phase der Anpassung kommt es zu einer schnellen Aufnahme und massiven Akkumulation von Kaliumionen in der Zelle, die in der zweiten Phase durch organische Osmolyte ersetzt werden. Ein moderater osmotischer „up-shock“ führt innerhalb einer Stunde zu einer Zunahme der intrazellulären Kaliumionenkonzentration von 350 mM auf 700 mM (Whatmore *et al.*, 1990). Die K^+ -Aufnahme wird in *B. subtilis* durch zwei Transportsysteme, KtrAB und KtrCD, vermittelt (Holtmann, 1999; Abb. 1), die zur Familie (Ktr) der erstmals für *Vibrio alginolyticus* beschriebenen (Nakamura *et al.*, 1998) K^+ -Aufnahmesysteme gehören. Beide Transportsysteme bestehen aus einem integralen Membranprotein, das strukturelle Ähnlichkeiten zu K^+ -Kanälen aufweist, und einer zweiten membranassoziierten Komponente, die eine mögliche

Nukleotidbindestelle besitzt. Sie sind an der initialen K^+ -Aufnahme beteiligt, wobei dem hochaffinen KtrAB-System allerdings eine größere Bedeutung für diese Osmostressantwort zukommt (Holtmann, 1999; Holtmann, Bakker und Bremer, nicht veröffentlichte Daten). Ein *B. subtilis*-Stamm, dem das hochaffine K^+ -Aufnahmesystem (KtrAB) fehlt, stellt nach einem plötzlichen osmotischen „up-shock“ das Wachstum ein. Beide Ktr-Systeme liefern zudem einen wesentlichen Beitrag für die langfristige Anpassung von *B. subtilis* an hochosmolare Wachstumsbedingungen (Holtmann, 1999).

Im Gegensatz zu *E. coli*, wo es parallel zur K^+ -Aufnahme nach einem osmotischen Schock zu einer verstärkten Glutamatsynthese kommt (McLaggan *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1996), bleibt die intrazelluläre Glutamatkonzentration in *B. subtilis* weitgehend unverändert (Whatmore *et al.*, 1990). Über die Natur des Gegenions in *B. subtilis*, welches zum Ausgleich der Elektroneutralität nötig ist, kann daher nur spekuliert werden. Auf Grund der Beobachtung, dass in *Streptomyces* nach einem osmotischen Schock die Cl^- -Ionenkonzentration ansteigt (Killham und Firestone, 1984), wird auch dies als ein mögliches Gegenion zu den K^+ -Ionen diskutiert.

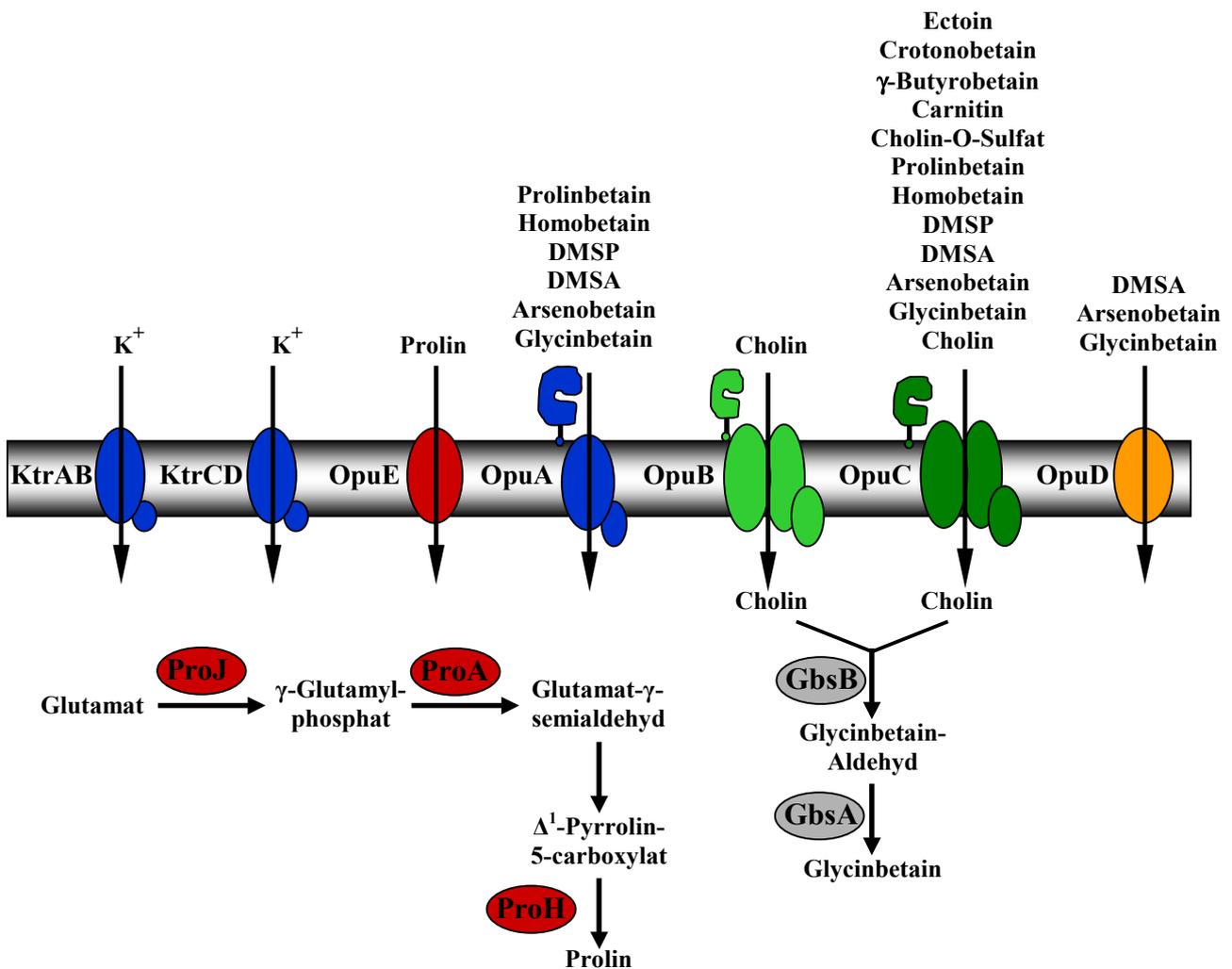


Abb. 1 Akkumulation von osmotischen Schutzsubstanzen in *B. subtilis* durch Synthese und Transport

Dargestellt sind die Transportsysteme OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE, die für die Aufnahme von osmotischen Schutzsubstanzen in *B. subtilis* verantwortlich sind und die Kaliumtransporter KtrAB und KtrCD. Zudem sind der Glycinbetain-Syntheseweg und der Prolinbiosyntheseweg dargestellt.

2.2 Zweite Phase der Anpassung: Akkumulation osmotischer Schutzsubstanzen

Trotz der Bedeutung der K^+ -Akkumulation für die initiale Osmostressreaktion stellt Kalium in hohen Konzentrationen, auf Grund seiner Unverträglichkeit mit der Zellphysiologie, für eine dauerhafte Anpassung an hochosmolare Bedingungen ein inadäquates Solut dar. In einem zweiten Schritt der Anpassung an hochosmotische Umweltbedingungen wird es daher durch mit dem Zellstoffwechsel kompatible Solute ersetzt. In Abwesenheit exogen verfügbarer osmotischer Schutzsubstanzen initiiert *B. subtilis* eine massive Akkumulation von Prolin mittels *de novo* Synthese (Whatmore *et al.*, 1990), wobei die Konzentration dieser Aminosäure ein Vielfaches über das für ihre proteinogene Funktion erforderliche Maß hinaus ansteigt.

2.2.1 Synthese osmotischer Schutzsubstanzen

Endogene Synthese des kompatiblen Soluts Prolin

Innerhalb des Genus *Bacillus* stellt *B. subtilis* im Hinblick auf das bei erhöhter Salinität vorherrschende Solut mit Prolin eine Minderheit dar. Der Großteil, der bisher diesbezüglich untersuchten Bacillen und verwandter Spezies, wie z. B. *B. alkalophilus*, *B. psychrophilus* und *B. pasteurii*, gehört zu den Ectoinproduzenten (Kuhlmann und Bremer, 2001; Galinski und Trüper, 1994). *Virgibacillus* (früher *Bacillus*) *panthotenticus* akkumuliert neben dem Tetrahydropyrimidin Ectoin zusätzlich Prolin, wobei die Anhäufung dieser Solute einer interessanten Dynamik unterliegt. Im Bereich moderater Erhöhungen der Osmolarität wird zuerst Prolin produziert und erst wenn die Osmolarität des Wachstumsmediums substantiell ansteigt, kommt es zur Synthese von Ectoin (Kuhlmann und Bremer, 2001). Zu der Gruppe der Prolinakkumulierer innerhalb des Genus *Bacillus* gehören neben *B. subtilis* noch *B. megaterium*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* (Kuhlmann und Bremer, 2001). Eine unter osmotischem Stress verstärkte *de novo* Synthese von Prolin konnte auch für eine Reihe weiterer Mikroorganismen, wie zum Beispiel die Gram-positiven Bodenbakterien *Streptomyces griseus* (Killham und Firestone, 1984), *Corynebacterium glutamicum* (Guillouet und Engasser, 1995a; Guillouet und Engasser, 1995b) und *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989), und das N_2 -fixierende, Gram-negative Bakterium *Azospirillum brasilense* (Madkour *et al.*, 1990) nachgewiesen werden. Prolin stellt zudem das am häufigsten von höheren Pflanzen akkumulierte kompatible Solut dar. Die Akkumulation von Prolin bei vor allem durch Trockenheit und saline Böden verursachtem hyperosmotischem Stress, beruht primär auf einer Stimulierung der Prolinbiosynthese, wie beispielsweise für *Arabidopsis thaliana*, *Vigna aconitifolia*, *Eukalyptus microcorys*, *Brassica napus* und so wichtige Kulturpflanzen wie *Zea mays*, *Triticum durum*, *Solanum tuberosum* und *Oryza sativa* gezeigt werden konnte (Corcuera *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1995; Larher *et al.*, 1996; Igarashi *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Almansouri *et al.*, 1999; Verslues und Sharp, 1999). Prolin hat in Pflanzen nicht allein die Aufgabe eines osmoregulatorischen Osmolyten, es konnten zudem Schutz vor, durch osmotischen Stress verursachtem, oxidativem Stress und vor freien Radikalen nachgewiesen werden (Hong *et al.*, 2000).

Prolin spielt für *B. subtilis* eine wesentliche Rolle und erfüllt vielschichtige Funktionen innerhalb dieses Organismus: 1. Prolin als proteinogene Aminosäure wird zum einen für anabole Zwecke benötigt. 2. Unter hochosmolaren Bedingungen müssen zum anderen große Mengen Prolin als osmotische Schutzsubstanz bereitgestellt werden. Diese massive Prolinakkumulation kann zum einen mittels *de novo* Synthese erfolgen, wobei Prolin das einzige von *B. subtilis de novo* akkumulierte Osmoprotektivum darstellt. Zudem kann eine Prolinakkumulation mittels Aufnahme aus dem umgebenden Medium über das hochaffine Transportsystem OpuE erfolgen. 3. *B. subtilis* kann diese Aminosäure unter einer effizienten Nutzung auch als alleinige C- und N-Quelle verstoffwechseln.

Erste Untersuchungen konnten bereits vor 25 Jahren eine Akkumulation von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen nachweisen (Measures, 1975; Gould und Measures, 1977). Detaillierte Studien von Whatmore *et al.* (1990), zum Muster der Prolinbiosynthese, haben zudem gezeigt, dass der intrazelluläre Prolinpool nach einem osmotischen Schock mit 0,4 M NaCl innerhalb von 7 Stunden von einem basalen Level von 16 mM auf 700 mM ansteigt. Dieser drastische Anstieg in der Prolinkonzentration legt eine fundamentale Rolle bei der Anpassung von *B. subtilis* an hyperosmolare Bedingungen nahe. Die molekulare Grundlage für dieses Phänomen war jedoch lange Zeit unbekannt.

In zahlreichen Mikroorganismen, wie zum Beispiel *E. coli*, erfolgt die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke ausgehend von Glutamat über drei enzymatische Reaktionen (Abb. 2): Im ersten Reaktionsschritt wird Glutamat zu γ -Glutamylphosphat phosphoryliert. Diese Reaktion wird von der γ -Glutamyl-Kinase, ProB, katalysiert. Im zweiten Schritt wird γ -Glutamylphosphat, katalysiert von ProA, einer γ -Glutamylphosphat-Reduktase, zu Glutamat- γ -semialdehyd reduziert. Dieses Aldehyd zyklisiert dann, unter Abspaltung von H₂O, spontan zu Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat, das im letzten Schritt, katalysiert durch das Genprodukt von *proC*, einer Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase, zu Prolin reduziert wird (Leisiger, 1996; Vogel und Davis, 1952). Das ProB und ProA Enzym bilden dabei einen Komplex, um die Freisetzung des höchst labilen Intermediates, γ -Glutamylphosphat, zu verhindern (Smith *et al.*, 1984). Obwohl *E. coli* über die beschriebene Umsetzung von Glutamat in der Lage ist Prolin zu synthetisieren, trägt dieses endogen gebildete Prolin nicht zum osmotischen Gleichgewicht dieses Organismus bei. Die γ -Glutamyl-Kinase (ProB) dieses und zahlreicher weiterer Mikroorganismen unterliegt einer Endprodukthemmung (Abb. 2), so dass Prolin nicht in osmoprotektiv relevanten Mengen synthetisiert werden kann. In *E. coli* führen bereits Prolinkonzentrationen im mikromolaren Bereich zu einer 50 %-igen Inhibition des ProB-Enzyms (Smith *et al.*, 1984). Es bedarf jedoch bemerkenswerter Weise nur einer einzigen Punktmutation im *proB*-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch führt, um die Endprodukthemmung der γ -Glutamyl-Kinase durch Prolin signifikant zu reduzieren. Diese *E. coli*-Mutanten zeigen eine verstärkte Prolinbiosynthese und erweisen sich als osmotoleranter als der Wildtyp (Dandekar und Uratsu, 1988; Rushlow *et al.*, 1985).

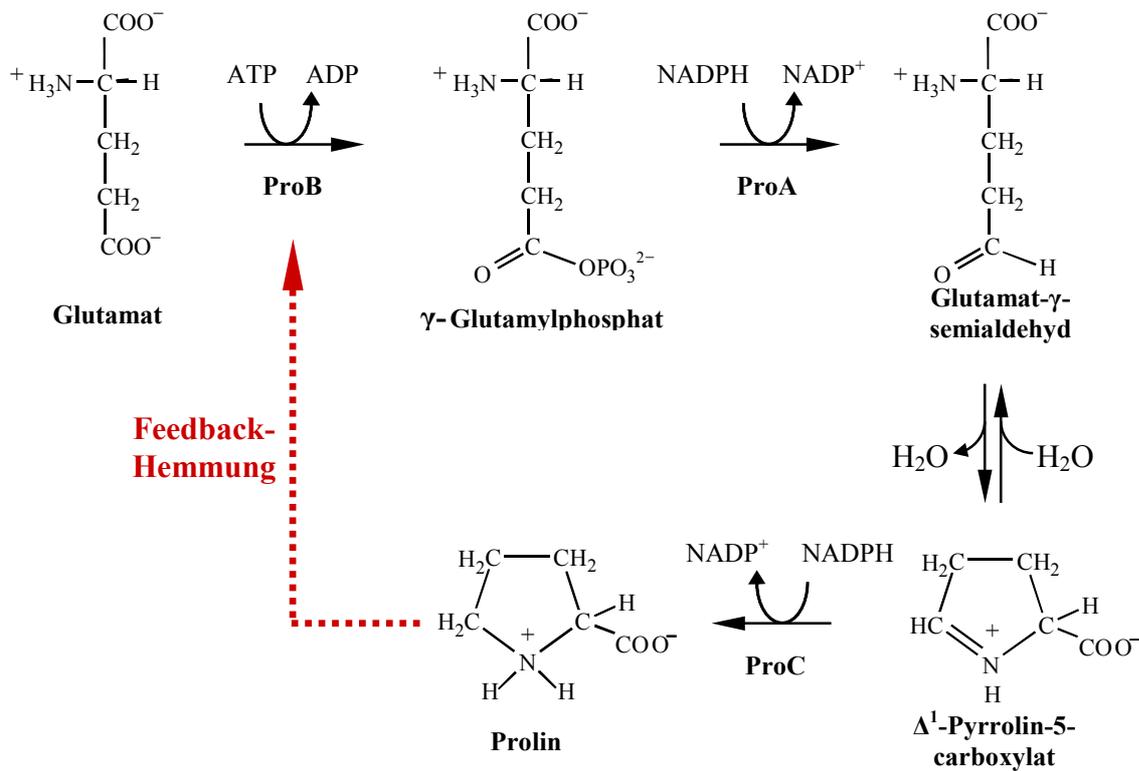


Abb. 2 Prolinbiosyntheseweg in *E. coli*

Dargestellt ist die Synthese von Prolin aus Glutamat in *E. coli* nach Leisinger *et al.* (1996).

Da osmotisch gestresste *B. subtilis*-Zellen Prolin in molaren Konzentrationen akkumulieren, stellt sich die Frage, wie den unterschiedlichen Anforderungen an diese Aminosäure unter normalen und hochosmolaren Bedingungen in diesem Organismus Rechnung getragen wird. Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich bereits wichtige Vorarbeiten zur Aufklärung der osmotisch vermittelten Prolinbiosynthese in *B. subtilis* geleistet (Brill, 1998). Darauf aufbauend wurden in der vorliegende Arbeit die molekularen und physiologischen Charakteristika der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* aufgeklärt. In einem ersten Schritt wurde gezeigt, dass *B. subtilis* Prolin für anabole Zwecke, wie viele andere Mikroorganismen, ausgehend von Glutamat über die für *E. coli* beschriebenen drei enzymatischen Reaktionen synthetisiert. Hierbei existieren auch in *B. subtilis* zu ProB, ProA und ProC aus *E. coli* analoge Enzyme. Neben diesem anabolen Weg gibt es in *B. subtilis* noch einen zweiten Weg der Prolinbiosynthese und dieser ist für die osmotisch gesteuerte Prolinanhäufung verantwortlich. Zwei neue Isoenzyme (ProJ und ProH) ersetzen unter hochosmolaren Bedingungen die unter normalen Bedingungen operierenden ProB und ProI-Proteine [ProI wurde in Brill (1998) noch als YqjO bezeichnet] des anabolen Syntheseweges. Der osmotisch gesteuerte Weg rekrutiert zusätzlich das ProA-Enzym aus dem anabolen Weg (Abb. 1). Damit ist erstmals im Bereich der Mikroorganismen die Aufklärung des Biosyntheseweges für dieses wichtige kompatible Solut gelungen. Da diese Daten Gegenstand der zur vorliegenden Arbeit gemachten Untersuchungen sind, soll an dieser Stelle nicht detaillierter darauf eingegangen werden.

Synthese von Glycinbetain aus Cholin

Glycinbetain kann von einer Vielzahl Pflanzen, aber nur einigen halophilen Mikroorganismen, wie z. B. *Actinopolyspora halophila* und *Ectothiorhodospira halochloris*, *de novo* synthetisiert werden (Severin *et al.*, 1992; Nyssölä *et al.*, 2000). In diesen Mikroorganismen wird Glycin in drei sukzessiven Methylierungsschritten, die von zwei Methyltransferasen, einer Glycin Sarcosin-Methyltransferase und einer Sarcosin-Dimethylglycin-Transferase, katalysiert werden, zu Glycinbetain umgewandelt (Nyssölä *et al.*, 2000). *B. subtilis* ist dagegen nicht in der Lage Glycinbetain *de novo* zu synthetisieren. Er kann jedoch, wie viele andere Mikroorganismen, aus der Umgebung importiertes Cholin als Vorläufer zur Synthese dieser potenten osmotischen Schutzsubstanz nutzen (Boch *et al.*, 1994). Cholin wird beim mikrobiellen Abbau von cholinhaltigen Phospholipiden (Phosphatidylcholin) aus Pflanzen und Tieren in den Boden freigesetzt. Die Aufnahme von Cholin erfolgt in *B. subtilis* über zwei ABC-Transportsysteme, die mit circa 80 % eine sehr hohe Sequenzidentität aufweisen und vermutlich aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Kappes *et al.*, 1999). Trotz ihrer engen Verwandtschaft ist die Substratspezifität dieser beiden Transporter völlig verschieden: Das OpuC-System (opu: osmo protectant uptake) ist ein hochaffiner Osmolyttransporter breiter Substratspezifität (Kappes und Bremer, 1998), während OpuB ausschließlich für die hochaffine Aufnahme von Cholin aus dem Medium verantwortlich ist (Kappes *et al.*, 1999) (Abb. 1). Der erste Schritt der Glycinbetain-Synthese, die Oxidation von Cholin zu Glycinbetain-Aldehyd, wird von GbsB (gbs: glycine betaine synthesis), einer Typ III Alkohol-Dehydrogenase, katalysiert. Im zweiten Schritt wird Glycinbetain-Aldehyd zu Glycinbetain oxidiert. Diese Reaktion wird von GbsA, einer Glycin-Betain-Aldehyd-Dehydrogenase katalysiert (Boch *et al.*, 1996) (Abb. 1). Die Expression des Glycinbetain-biosynthetischen Operons *gbsAB* wird durch die Anwesenheit von Cholin, aber nicht durch erhöhte Osmolarität im Medium, stimuliert (Nau-Wagner, 1999). Vor diesem Operon befindet sich ein divergent angeordneter Leserahmen (*gbsR*), dessen Genprodukt, GbsR, als intrazellulärer Cholinsensor fungiert. Der Repressor GbsR reguliert die Transkription des *gbsAB*-Operons und des *opuB*-Operons in Abhängigkeit von der Cholin-Verfügbarkeit (Nau-Wagner, 1999).

2.2.2 Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen

Um den Osmolytgehalt des Zytoplasmas langfristig zu erhöhen, akkumuliert *B. subtilis* Prolin mittels des oben skizzierten Syntheseweges. Daneben spielt in der Anpassung an hohe Osmolarität, wie in anderen Bodenbakterien (Miller und Wood, 1996), die Aufnahme eines breiten Spektrums kompatibler Solute aus der Umgebung eine tragende Rolle (Kempf und Bremer, 1998b; Bremer, 2002). Die genutzten Substanzen sind natürlich vorkommende Osmoprotektiva und werden entweder von Pflanzen und Algen oder von Mikroorganismen produziert. Der Eintrag in den Boden und die Verfügbarkeit osmotischer Schutzsubstanzen hängt daher von der verrottenden Biomasse und von Wurzelexudaten ab (Kemble und McPherson, 1954).

Das osmotisch regulierte Prolintransportsystem OpuE

Enterobakterien bewerkstelligen die osmoprotektive Prolinaufnahme durch die Glycinbetain Transportsysteme ProP und ProU (Csonka, 1988; Lucht und Bremer, 1994). In *B. subtilis* ist dagegen keines der Glycinbetain-Aufnahmesysteme OpuA, OpuC oder OpuD, noch der Cholintransporter OpuB an der Aufnahme von Prolin beteiligt (Abb. 1). Osmotisch gestresste *B. subtilis*-Zellen nutzen allein das hochaffine und substratspezifische Einkomponenten-Transportsystem OpuE, um Prolin effizient aus der Umgebung aufzunehmen (von Blohn *et al.*, 1997; Abb. 1). OpuE wird zur Familie der SSS-Transporter (sodium/solute symporter) gezählt, einer Gruppe von Proteinen aus Prokaryoten und Eukaryoten, bei der eine an einen Na⁺-Symport gekoppelte Substrataufnahme erfolgt (Reizer *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1998). Interessanterweise weist das OpuE-Protein eine hohe Sequenzidentität zu den PutP Prolinpermeasen auf, die sowohl in *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Staphylococcus aureus*, als auch in *B. subtilis* für die Aufnahme von Prolin als C- und N-Quelle verantwortlich sind. Die PutP-Transportaktivität in diesen Organismen ist allerdings unter hochosmolaren Bedingungen weitgehend inhibiert (Wood, 1988; Moses, 1999). Im Gegensatz dazu findet unter hochosmolaren Bedingungen eine Stimulation der OpuE-vermittelten Prolinaufnahme statt, die allein auf einer verstärkten Expression des *opuE*-Gens beruht (von Blohn *et al.*, 1997). Die Transkription erfolgt ausgehend von zwei eng benachbarten Promotoren, die von unterschiedlichen Sigmafaktoren erkannt werden (von Blohn *et al.*, 1997). *opuE*-P1 wird vom vegetativen Sigmafaktor σ^A und *opuE*-P2 von dem alternativen, durch allgemeinen Stress induzierten Sigmafaktor σ^B erkannt. Den Promotoren *opuE*-P1 und *opuE*-P2 kommen bei der Kontrolle der Expression des *opuE*-Gens unterschiedliche Aufgaben zu. Ein plötzlicher, osmotischer „up-shock“ führt zu einem unmittelbaren, aber nur vorübergehenden Anstieg der *opuE*-P2 (σ^B) Aktivität, während in Zellen, die über lange Zeit osmotischem Stress ausgesetzt sind, die verstärkte Expression von *opuE* ausschließlich auf dem σ^A -abhängigen *opuE*-P1 Promotor beruht. Die Aktivität dieses Promotors verhält sich dabei proportional zur Osmolarität des die Zelle umgebenden Mediums und bleibt so lange auf hohem Niveau wie der osmotische Stress andauert (Spiegelhalter und Bremer, 1998). Die Tatsache, dass die osmotische Regulation des σ^A -abhängigen *opuE*-P1 Promotors völlig unabhängig vom σ^B -Regulon erfolgt, spricht für die Existenz zweier unterschiedlicher Signaltransduktionswege, die in *B. subtilis* bei der Anpassung an osmotischen Stress eine Rolle spielen (Spiegelhalter und Bremer, 1998).

Der OpuE-Transporter dient aber nicht nur dazu Quellen exogen vorhandenen Prolins effizient zu erschließen, sondern er ist auch für das „Recycling“ von aus der Zelle austretendem Prolin verantwortlich. Unter hochosmolaren Bedingungen ist der mittels Neusynthese aufgebaute Prolingradient über der Zytoplasmamembran offensichtlich so steil, dass *B. subtilis* bedeutende Mengen des *de novo* synthetisierten Prolins in das Medium abgibt (von Blohn, 1997). Diese werden jedoch durch den OpuE-Transporter unmittelbar wieder in die *B. subtilis*-Zelle gepumpt, so dass es in der Regel zu keinem Verlust kommt (von Blohn, 1997, Moses, 1999). Dieser Efflux und anschließende Reimport von osmoprotektiven Substanzen unter konstanten osmotischen Bedingungen ist in Mikroorganismen vermutlich ein weitverbreitetes Phänomen und konnte unter anderem auch in *S. typhimurium* (Koo *et al.*, 1991) beobachtet werden.

Die Aufnahme von Glycinbetain und strukturverwandten osmotischen Schutzsubstanzen

Die Akkumulation der Trimethylammonium-Verbindung Glycinbetain als eine metabolisch inerte und hocheffektive osmotische Schutzsubstanz, ist in vielen Gram-negativen und Gram-positiven Mikroorganismen weit verbreitet (Boch *et al.*, 1994; Csonka und Epstein, 1996; Poolmann und Glaasker, 1998; Kempf und Bremer, 1998a; Bremer und Krämer, 2000). *B. subtilis* zieht die Aufnahme exogenen Glycinbetains der endogenen Prolinbiosynthese deutlich vor, so dass bei Anwesenheit von Glycinbetain in hyperosmolarem Medium die *de novo* Prolinakkumulation reprimiert wird (Whatmore *et al.*, 1990). Mit Hilfe der Akkumulation von Glycinbetain erlangt *B. subtilis* eine beachtliche Toleranz gegenüber hoher Osmolarität, so dass auch Habitats erschlossen werden können, deren geringe Wasseraktivität andernfalls die Proliferation unterbinden würde (Boch *et al.*, 1994). Erstaunlicherweise verfügt *B. subtilis* über drei verschiedene Transportsysteme, die Glycinbetain osmotisch reguliert und mit hoher Affinität aufnehmen (Kappes *et al.*, 1996). Dies sind die beiden ABC-Transporter OpuA (Kempf und Bremer, 1995) und OpuC und das sekundäre Transportsystem OpuD (Kappes *et al.*, 1996) (Abb. 1).

OpuA und OpuC gehören zur Klasse der bindeproteinabhängigen Glycinbetain-Transportsysteme. Das aus drei Genen bestehende *opuA*-Operon kodiert für eine membranassoziierte ATPase (OpuAA), für eine Transmembrankomponente (OpuAB) und ein Substratbindeprotein (OpuAC). Das *opuC*-Operon wird von vier Genen kodiert und unterscheidet sich von OpuA durch den Besitz einer zweiten Transmembrankomponente (OpuCD). Beide Transporter weisen Homologien zu den ABC-Transportsystemen ProU aus *E. coli* und *S. typhimurium* auf, die allerdings im Gegensatz zu den Pendanten aus *B. subtilis* ein frei diffundierbares, periplasmatisches Bindeprotein besitzen. Da *B. subtilis* keine äußere Membran besitzt, sind die beiden Bindeproteine OpuAC und OpuCC über eine Lipidmodifikation in der Zytoplasmamembran verankert (Kempf *et al.*, 1997). Ein Vergleich der kinetischen Parameter dieser beiden Systeme zeigt, dass OpuA unter hochosmolaren Bedingungen über eine weitaus höhere Transportkapazität für Glycinbetain verfügt als OpuC. OpuA ist somit das dominante Aufnahmesystem von *B. subtilis* für diese osmotische Schutzsubstanz (Kappes *et al.*, 1996). OpuC dagegen ist neben der Aufnahme von Glycinbetain auch für die Aufnahme von 11 weiteren Osmoprotektiva verantwortlich und ermöglicht es *B. subtilis* so eine Vielfalt zusätzlicher kompatibler Solute zu nutzen (Abb. 1). Dabei werden diese Substanzen, mit Ausnahme von Ectoin, alle mit hoher Affinität und substantieller Transportrate durch OpuC aufgenommen (Kappes und Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Jebbar *et al.*, 1997; Bremer, 2002).

Das dritte Glycinbetain-Aufnahmesystem, OpuD, ist ein Einkomponentensystem und der BCCT-Familie (Betain-Cholin-Carnitin-Transporter) von Sekundärtransportern zuzuordnen. Hierbei handelt es sich um eine kleine Gruppe strukturell und funktionell verwandter Aufnahmesysteme, zu der unter anderem die Cholin- und Carnitin-Transporter BetT (Lamark *et al.*, 1991) und CaiT (Eichler *et al.*, 1994) aus *E. coli*, der Glycinbetain-Transporter BetP und das EctP-System aus *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998), der Cholin-Transporter CudT aus *Staphylococcus xylosum* (Rosenstein *et al.*, 1999), das Glycinbetain-Transportsystem BetL aus *L.*

monocytogenes und der Ectoin/Hydroxyectoin-Transporter EctT aus *V. panthotenticus* (Kuhlmann, 2001) angehören.

Entsprechend der physiologischen Aufgabe, sind die Strukturgene aller fünf bisher in *B. subtilis* identifizierten Opu-Transporter auf Ebene der Transkription einer osmotischen Kontrolle unterworfen. Die verschiedenen Charakteristika von OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE bezüglich ihrer Substratspezifität, der Affinität und der Transportaktivität gewährleisten zudem eine flexible Anpassung von *B. subtilis* an unterschiedliche ökologische Nischen hoher Osmolarität.

2.3 Katabolismus von Prolin in *B. subtilis*: Vermeidung eines „futile cycle“

Die Aminosäure Prolin spielt nicht nur eine wesentliche Rolle als kompatibles Solut für *B. subtilis*, sondern kann zudem effizient als einzige C- und N-Quelle verwendet werden (Fisher und Sonenshein, 1991). Die Oxidation von Prolin zu Glutamat erfolgt dabei in zwei enzymatisch katalysierten Schritten. Im ersten Schritt wird Prolin, katalysiert durch eine FAD-abhängige Prolin-Dehydrogenase (PutB), zu Pyrrolin-5-carboxylat oxidiert, das nach der Hydrolyse zu Glutamat- γ -semialdehyd von einer NAD-abhängigen Glutamat- γ -semialdehyd-Dehydrogenase (PutC) zu Glutamat oxidiert wird (Moses, 1999). Um einen „futile cycle“ zu vermeiden, muss jedoch sichergestellt werden, dass die unter hochosmolaren Bedingungen mittels *de novo* Synthese als osmotische Schutzsubstanz akkumulierten, großen Mengen an Prolin, nicht umgehend verstoffwechselt werden. Die erforderliche Regulation des Prolinabbaus, während und nach osmotischem Stress, ist Gegenstand vieler Untersuchungen in verschiedenen Organismen. So findet der Prolinabbau in Pflanzen in räumlicher Trennung zur im Zytoplasma erfolgenden, Prolinsynthese an der inneren Mitochondrienmembran statt (Verbruggen *et al.*, 1996). Zudem ist die Expression, der für die Oxidation von Prolin zu Glutamat verantwortlichen Enzyme unter hochosmolaren Verhältnissen reprimiert (Peng *et al.*, 1996). In Prokaryoten müssen dagegen die Synthese und der Abbau von Prolin im Zytoplasma erfolgen. Für *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Prolin unter hohen Osmolaritäten auf enzymatischer Ebene direkt inhibiert ist (Ekena und Maloy, 1990). Zudem agiert das bifunktionelle PutA-Protein, das beide für den Abbau von Prolin zu Glutamat benötigten, katalytischen Domänen trägt, in Enterobakterien als Transkriptionsregulator und reprimiert in Anwesenheit von Prolin die Expression des *putA*-Gens, indem es an die DNA der *put*-Kontrollregion bindet (Wood, 1987).

In *B. subtilis* kodiert das *putBCP*-Operon für den Einzelkomponenten Prolin-Transporter PutP und die beiden Enzyme, PutB und PutC, die den Abbau von Prolin zu Glutamat katalysieren. PutP ist eng verwandt mit dem zuvor beschriebenen, auf Transkriptionsebene osmotisch induzierten, Prolintransporter OpuE. Im Gegensatz zu diesem wird die PutP-Transportaktivität allerdings bei hoher Osmolarität inhibiert. Die Transkription des *putBCP*-Operons wird jedoch bereits durch mikromolare Konzentrationen exogenen Prolins im Wachstumsmedium stark induziert. Die unter hochosmolaren Bedingungen intrazellulär gebildeten, großen Prolinmengen, vermögen dagegen die Expression des *putBCP*-Operons nicht zu induzieren (Moses, 1999). *B. subtilis* verhindert somit durch die obligatorische Kopplung von Prolintransport und Prolinabbau den Abbau des intrazellulär akkumulierten Prolins. Wie *B. subtilis* vermag zwischen exogenem und endogenem Prolin zu unterscheiden, ist bisher ungeklärt.

2.4 Efflux osmotischer Schutzsubstanzen bei einem hypoosmotischen Schock

An eine hochosmotische Umwelt angepasste Mikroorganismen haben intrazellulär hohe Konzentrationen osmoprotektiver Solute akkumuliert. In seinem natürlichen Habitat ist *B. subtilis* jedoch ständig der Gefahr eines hypoosmotischen Schocks durch plötzlich einsetzenden Regen oder das Auswaschen in Frischwasser ausgesetzt. Auf Grund der massiven Ansammlung von Osmolyten im Zytoplasma, kommt es zu einem raschen Einstrom von Wasser in die Zelle und zu einem erheblichen Anstieg des Turgors. Die Zelle läuft im Extremfall Gefahr zu lysieren. Um diesem Szenario vorzubeugen, muss sie in der Lage sein sich im Falle eines osmotischen „down-shocks“ möglichst schnell der akkumulierten Solute zu entledigen (Booth und Louis, 1999). Dazu stehen der Zelle prinzipiell drei Mechanismen zur Verfügung. Die osmotischen Schutzsubstanzen können zum einen abgebaut oder zu osmotisch inaktiven Formen polymerisiert werden. So ist beispielsweise *Rhizobium meliloti* in der Lage das unter hochosmolaren Bedingungen als Schutzsubstanz angehäufte Glycinbetain nach einem hypoosmotischen Schock unter Nutzung als C- und N-Quelle schnell wieder abzubauen (Fougère und Le Rudulier, 1990). Das von osmotisch gestressten Pflanzen akkumulierte Prolin wird bei Wiederherstellung der normalen Wachstumsbedingungen ebenfalls abgebaut und stellt vermutlich die Energiequelle für die Erholungsphase dar (Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996).

Eine sehr schnelle und effektive Anpassung an hypoosmotische Bedingungen ist jedoch nur durch den schnellen Export der kompatiblen Solute gegeben. Für eine Vielzahl Gram-negativer und Gram-positiver Mikroorganismen wurde der Efflux der kompatiblen Solute über dehnungsaktivierbare Kanäle beschrieben, die unabhängig von den jeweiligen Aufnahmesystemen operieren. Innerhalb weniger Sekunden nach einem hypotonen Schock setzt ein massiver Ausstrom der Osmolyte durch diese sogenannten mechanosensitiven Kanäle (Martinac, 2001) ein. Die Öffnung dieser Kanäle beruht auf dem steigenden zytoplasmatischen Druck und ist daher vom Ausmaß des hypoosmotischen Schocks abhängig. Untersuchungen mit *E. coli* haben gezeigt, dass mechanosensitive Kanäle eine herausragende Rolle für das Überleben eines osmotischen „down-shifts“ spielen (Levina *et al.*, 1999; Booth und Louis, 1999). Verwandte Kanäle zu zwei der für *E. coli* beschriebenen Kanäle, MscL und MscS (Levina *et al.*, 1999), konnten auch in *B. subtilis* identifiziert werden (Moe *et al.*, 1998; Boiangiu, 2001). Auch in *B. subtilis* sind diese beiden Kanalproteine offensichtlich essentiell für das Überleben nach einem plötzlichen Abfall der exogenen Osmolarität. Die Expression der Gene, die für MscL und MscS kodieren, unterliegt interessanterweise einer osmotischer Kontrolle und ist unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen verstärkt. *B. subtilis* bereitet sich somit offensichtlich schon unter Bedingungen erhöhter Osmolarität auf einen möglichen osmotischen „down-shift“ vor (Boiangiu, 2001).

3. Transkriptionelle Antitermination

Von Chopin *et al.* (1998) durchgeführte Datenbankanalysen bezüglich eines für den Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination charakteristischen Primärsequenzelementes lassen vermuten, dass die Prolinbiosynthesegene *proBA* und *proI* aus *B. subtilis* einer transkriptionellen Kontrolle durch diesen Mechanismus unterliegen. Der Mechanismus ist hochkonserviert und weitverbreitet in Gram-positiven Mikroorganismen. In *B. subtilis* konnte für eine Gruppe von circa 19 Genen nachgewiesen werden, dass durch die T-Box abhängige Antitermination der Transkription kontrolliert werden (Chopin *et al.*, 1998). Diese Gene kodieren vor allem für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, aber auch für einige Aminosäurebiosyntheseenzyme und einen putativen Aminosäuretransporter. Neuere Datenbankanalysen haben gezeigt, dass weitaus mehr, nämlich circa 77 *B. subtilis*-Gene, die für diesen Mechanismus typischen T-Box Leader Strukturelemente aufweisen (Winkler *et al.*, 2001).

3.1 Der Mechanismus T-Box-abhängiger transkriptioneller Antitermination

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bilden eine Klasse essentieller Enzyme, die eine spezifische Beladung der tRNAs mit der passenden Aminosäure am 3'-Akzeptorende der tRNA katalysieren. Der Bedarf der Bakterienzelle an diesen für die Proteinbiosynthese essentiellen Enzymen und ebenso an einigen Aminosäurebiosyntheseenzymen ist unter Aminosäuremangelbedingungen erhöht (Putzer *et al.*, 1995a; Putzer *et al.*, 1995b). Die Expression jedes Gens der T-Box-Familie wird daher individuell durch die limitierte Verfügbarkeit einer bestimmten Aminosäure, nicht jedoch durch allgemeine Aminosäurelimitation induziert (Henkin *et al.*, 1992; Putzer *et al.*, 1992; Grandoni *et al.*, 1992). Die jeweilige unbeladene tRNA agiert dabei als Effektor, der einen Mangel an der spezifischen Aminosäure signalisiert (Grundy und Henkin 1993; Grundy *et al.*, 1994; Putzer *et al.*, 1995b; Condon *et al.*, 1996a; van de Guchte *et al.*, 2001).

Alle durch diesen Mechanismus kontrollierten Gene besitzen eine hochstrukturierte, nicht-translatierte mRNA-Leaderregion von circa 300 Nukleotiden Länge im 5'-Nichtkodierungsbereich, vor dem Startpunkt der eigentlich kodierenden Sequenz. Innerhalb der T-Box Familie von Genen weist dieser Leaderbereich eine hohe Konservierung primärer Sequenz- und sekundärer Strukturelemente auf (Grundy und Henkin, 1993; Chopin *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Er umfasst mehrere charakteristische Sekundärstruktur-Schleifen und einen im 3'-Bereich des Leaders, stromaufwärts der Shine-Dalgarno-Sequenz gelegenen, faktorunabhängigen, intrinsischen Terminator (Putzer *et al.*, 1992). Unmittelbar stromaufwärts von dieser Terminatorstruktur befindet sich eine hochkonservierte Sequenz von 14 Nukleotiden. Diese sogenannte T-Box ist zu dem 5'-Teil des Terminatorstammes komplementär und kann mit diesem unter Bildung einer alternativen, aber weniger stabilen Antiterminatorstruktur, basenpaaren (Grundy und Henkin, 1993). Diese Antiterminatorkonformation der mRNA-Leaderregion kann allerdings durch die direkte Interaktion mit der passenden, unbeladenen tRNA stabilisiert werden. Es konnten zwei elementare Stellen der Interaktion zwischen der Leader-mRNA und der tRNA identifiziert werden (Abb. 3B). Eine klassische Codon-Anticodon Basenpaarung findet zwischen dem Anticodon der tRNA und dem sogenannten „Specifiercodon“ statt. Dabei handelt es sich um eine exponierte Dreiergruppe von

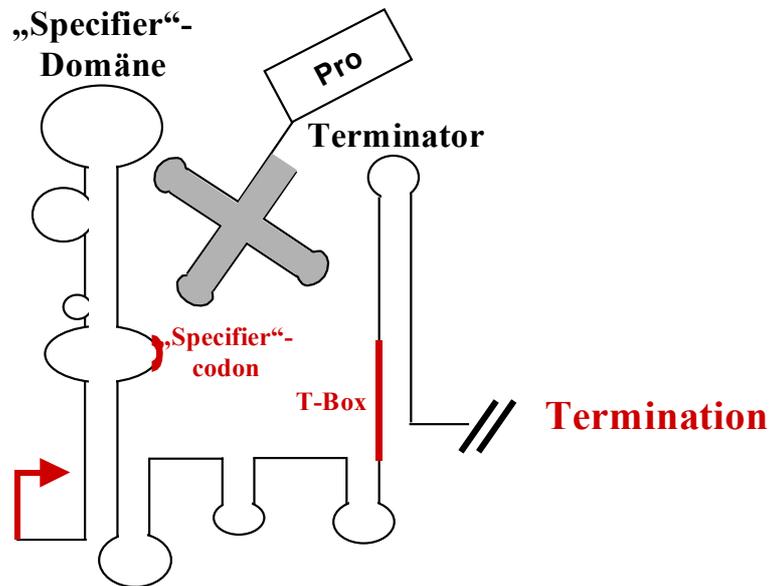
Nukleotiden, die seitlich aus der haarnadelförmigen Sekundärstruktur, der „Specifierdomäne“, im 5'-Bereich des mRNA Leaders ausgestülpt ist. Eine zweite Basenpaarung findet zwischen dem ungepaarten 5'-NCCA-3' Akzeptorende der unbeladenen tRNA und der dazu perfekt komplementären 5'-UGGN-3' Sequenz innerhalb der T-Box statt (Grundy und Henkin, 1993; Grundy *et al.*, 1994; van de Guchte *et al.*, 1998). Diese letzte Interaktion verdeutlicht das regulatorische Potential dieses Systems (Abb. 3). Herrscht ein Mangel an einer bestimmten Aminosäure, so spiegelt sich das auch im Beladungszustand der zugehörigen tRNAs wieder. Die unter diesen Bedingungen vorherrschend unbeladen vorliegende tRNA kann an das Leadertranskript binden, die Antiterminatorkonformation stabilisieren und so die Expression des jeweiligen Operons, oder Gens anschalten (Abb. 3B). Ist dagegen eine ausreichende Menge einer bestimmten Aminosäure vorhanden, so ist die überwiegende Zahl der jeweiligen tRNAs beladen. Eine tRNA, die am Akzeptorarm mit einer Aminosäure beladen ist, kann nicht an das Leadertranskript binden um den Antiterminator zu stabilisieren. Es bildet sich daraufhin die energetisch günstigere Terminatorkonformation aus und die Expression des Operons oder Gens ist reprimiert (Abb. 3A).

3.2 Weitere Determinanten für eine tRNA-mRNA Wechselwirkung

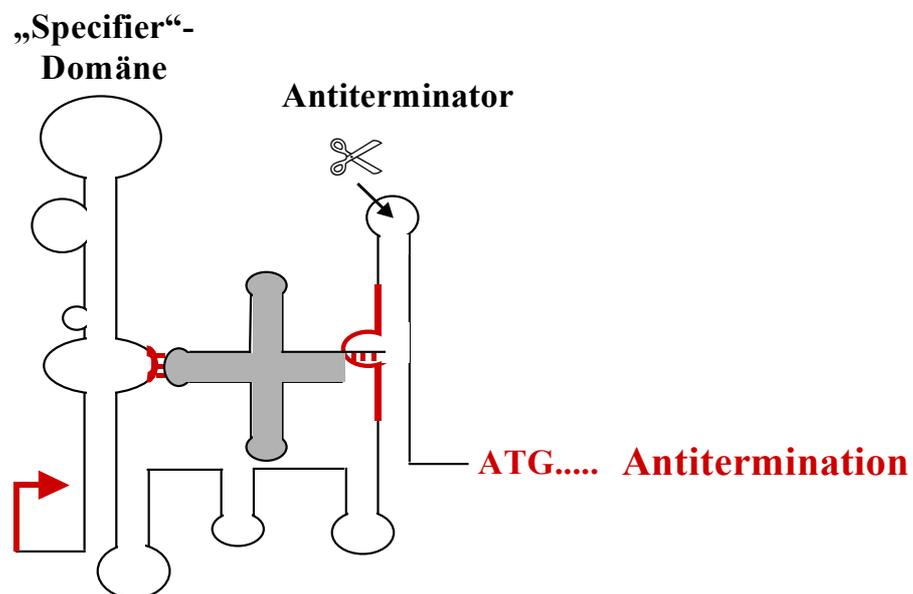
Obwohl die beiden genannten Stellen der mRNA-tRNA-Interaktion entscheidend für die Antitermination sind, stellen sie nicht die einzigen Determinanten für eine mRNA-tRNA-Erkennung dar. Zusätzlich zu der T-Box und der dazu komplementären Sequenz im 5'-Teil des Terminatorstammes, gibt es weitere hochkonservierte Primärsequenzelemente in den meisten mRNA-Leadern. Es konnte gezeigt werden, dass zudem die in einer Schleife der „Specifierdomäne“ lokalisierte AG-Box (5'-CAGAGA-3'), die GNUG-Box (5'-GNUG-3') an der Spitze der „Specifierdomäne“ und die circa 40 bis 50 Nukleotide stromaufwärts der T-Box lokalisierte F-Box (5'-CGUUA-3') *in vivo* für eine effiziente Antitermination in den diesbezüglich untersuchten Genen absolut erforderlich sind (Rollins *et al.*, 1997). In wieweit diese Primärsequenzelemente jedoch an einer Wechselwirkung mit der tRNA oder möglichen regulatorischen Proteinen beteiligt sind, oder ob sie für die Ausbildung der Sekundärstruktur essentiell sind, ist bisher ungeklärt.

Untersuchungen der *tyrS* Leaderregion aus *B. subtilis* und der zugehörigen tRNA^{Tyr} im Hinblick auf mögliche tRNA-Determinanten, welche die transkriptionelle Antitermination beeinflussen, haben ergeben, dass vermutlich bei der tRNA- mRNA Leader Interaktion die gesamte Tertiärstruktur der tRNA und nicht einzelne Primärsequenzelemente eine Rolle spielen (Grundy *et al.*, 2000). In Experimenten zu der tryptophanabhängigen Expression des *trp*-Operons aus *Lactococcus lactis* (van de Guchte *et al.*, 1998) konnte zudem gezeigt werden, dass der T- und der D-Arm der tRNA^{Trp} wichtig für die Erkennung komplementärer Strukturen im *trp*-Leadertranskript sind (van de Guchte *et al.*, 2001). In dieser Studie konnten auch für weitere Gene aus *L. lactis*, aber auch aus *B. subtilis* kurze komplementäre Bereiche zwischen der „Specifierdomäne“ und dem D-Arm der zugehörigen tRNA, und der unmittelbar stromaufwärts der Antiterminatorstruktur gelegenen Haarnadelstruktur und dem T-Arm der tRNA ausfindig gemacht werden (van de Guchte *et al.*, 2001). Die Angaben für diese Gene beruhen allerdings bisher ausschließlich auf Sequenzvergleichen.

A. Ausreichend Prolin



B. Prolinmangel

**Abb. 3** Genereller Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination

Verändert nach Grundy und Henkin (1993). Das Specifiercodon und die T-Box sind rot dargestellt. **A.** Terminatorkonformation des Leaders. Die beladene $tRNA^{Pro}$ ist nicht in der Lage mit dem Leader zu interagieren. Die Transkription wird terminiert. **B.** Die Antiterminatorkonformation des Leaders wird durch die unbeladene $tRNA^{Pro}$ stabilisiert und erlaubt eine Transkription der Gene. Die kurzen roten Linien symbolisieren die beiden Stellen der Basenpaarung: Zum einen zwischen dem Anticodon der tRNA und dem „Specifiercodon“ und zweitens zwischen dem Akzeptorende der tRNA und dem „Antiakzeptor“ innerhalb der T-Box. Die Schere gibt zudem die Lokalisation für eine mögliche Prozessierung des Primärtranskriptes an.

In allen bisher untersuchten, bakteriellen Antiterminationssystemen sind mindestens ein oder aber mehrere Proteine in die Bildung eines Antiterminators involviert oder kommunizieren mit dem Transkriptionsapparat (Derbarbouille *et al.*, 1990; Roberts, 1993; Babitzke und Yanofsky, 1993). Im Falle der T-Box Gene ist bisher ungeklärt, ob die tRNA alleine zur Aktivierung der Antitermination in Abwesenheit von Proteinfaktoren in der Lage ist. Dagegen spricht, dass es bisher noch nicht gelungen ist, die Entstehung der Antiterminatorkonformation und deren direkte Interaktion mit der tRNA *in vitro* nachzuweisen (Luo *et al.*, 1998). Mögliche Proteinfaktoren könnten zum einen unspezifisch mit allen Leadern der T-Box Familie interagieren oder aber spezifisch für ein individuelles Gen sein. Die Präsenz der oben genannten, hochkonservierten primären Sequenzelemente in den Leaderregionen lässt jedoch vermuten, dass es sich um generelle Faktoren handelt, die mit diesen Elementen in allen Leadern interagieren (Rollins *et al.*, 1997).

Die bis dahin ausschließlich auf genetischen Experimenten beruhenden Sekundärstrukturmodelle T-Box-kontrollierter Leaderregionen konnten 1998 in RNA-Schutzexperimenten, unter Verwendung chemischer Modifikation und enzymatischen Verdau mit spezifischen RNAsen, erstmals sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für den *thrS*-Leader weitgehend bestätigt werden (Luo *et al.*, 1998).

3.3 Verbreitung des Mechanismus transkriptioneller Antitermination

Mit Hilfe von Datenbankanalysen konnten circa 200 putative T-Box Leadersequenzen in einer Vielzahl von Mikroorganismen identifiziert werden (Winkler *et al.*, 2001). Die durch transkriptionelle Antitermination kontrollierten Gene werden in der sogenannten T-Box-Familie zusammengefasst. Es wurden bisher Vertreter dieser Familie in den Genera *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Corynebacterium* gefunden (Grundy und Henkin, 1994; Henkin 1994; Putzer *et al.*, 1995a). Die Liste der Gene und Organismen in denen T-Box-abhängige Gene vermutete werden wächst auf Grund zahlreicher Genomprojekte stetig. Neuere Untersuchungen zeigen, dass dieser Mechanismus in weitaus mehr Gram-positiven Genera verbreitet zu sein scheint (Winkler *et al.*, 2001). Demgegenüber wird dieser regulatorische Mechanismus bisher nur in einem einzigen Gram-negativen Bakterium vermutet. Dieser Gram-negative Organismus, *Symbiobacterium thermophilum*, wächst interessanterweise ausschließlich in Co-Kultur mit einem spezifischen *Bacillus*-Stamm und es wird spekuliert, dass das entsprechende Gen, inklusive der regulatorischen Leaderregion, über einen horizontalen Gentransfer erworben wurde (Grundy und Henkin, 1999).

3.4 Prozessierung der Leader-mRNA

Für einige, der durch transkriptionelle Antitermination kontrollierten Gene aus *B. subtilis*, konnte ein zusätzlicher Level genetischer Kontrolle nachgewiesen werden. Die Leaderregionen dieser Gene werden zwischen der T-Box und dem Terminator geschnitten (Abb. 3B; Condon *et al.*, 1996b). Im Falle des *thrS*-Leaders wurde gezeigt, dass die Prozessierung verstärkt unter Threoninmangelbedingungen stattfindet. Dies lässt vermuten, dass der Schnitt in der Antiterminatorkonformation des Leaders erfolgt. Das macht auch Sinn, da die Schnittstelle in dieser

Konformation in der Schleife an der Spitze des Antiterminators lokalisiert ist (Abb. 3B). Nach der Prozessierung weist das stromabwärts gelegene mRNA-Fragment, welches das gesamte Strukturgen trägt, eine Terminatorstruktur an beiden Enden auf und ist nachweislich mehrfach stabiler als das unprozessierte Gesamttranskript. Die prozessierte mRNA trägt daher maßgeblich zum Gesamtlevel funktioneller *thrS*-mRNA unter Threoninmangelbedingungen bei (Condon *et al.*, 1996a; Condon *et al.*, 1996b; Condon *et al.*, 1997). Für den Fall des *thrS*-Leaders konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung unabhängig vom Specifiercodon und der Specifierdomäne erfolgt und zudem nicht unbedingt die Präsenz der unbeladenen tRNA erfordert, aber sehr wohl durch eine stabilisierte Antiterminatorkonformation stimuliert wird. Für die Prozessierung der mRNA ist in *B. subtilis* vermutlich ein funktionelles Homolog zur RNaseE aus *E. coli* verantwortlich (Condon *et al.*, 1997).

B. subtilis benutzt somit neben dem Mechanismus der transkriptionellen Antitermination offensichtlich in einigen Genen eine Prozessierung des Leaders, um die Genexpression unter spezifischen Aminosäurehungerbedingungen weiter zu erhöhen.

3.5 Kontrolle von Aminosäurebiosynthesegenen durch T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination

Primärer Gegenstand bisheriger Untersuchungen zur T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination in *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Organismen waren Aminoacyl-tRNA-Synthetasegene. Die typischen primären Sequenzelemente T-Box kontrollierter Gene aus *B. subtilis* konnten jedoch auch vor zahlreichen biosynthetischen Genen und Operons gefunden werden, wie zum Beispiel vor dem *argS-lysA*-Operon aus *C. glutamicum*, dem *trp*- und dem *his*-Operon aus *Lactobacillus casei* und *Lactococcus lactis* (Grundy und Henkin, 1994). Eindeutig nachgewiesen werden konnte eine Regulation durch diesen Mechanismus auf Grund näherer Untersuchungen bisher jedoch nur für das *ilv-leu*-Operon aus *B. subtilis* (Grandoni *et al.*, 1992; Marta *et al.*, 1996). Dieses Operon besteht aus 7 Genen, die für die Synthese von Leucin, Isoleucin und Valin erforderlich sind und wird durch Leucinmangel induziert. In von Chopin *et al.* (1998) durchgeführten Datenbankanalysen konnten zudem die Prolinbiosynthesegene *proBA* und *proI* identifiziert werden. Das *proI*-Gen war zu diesem Zeitpunkt noch nicht näher charakterisiert und wurde als mögliches Prolinbiosynthesegen *yqjO* bezeichnet. Gegenstand der zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es somit das *proBA*-Operon und das *proI*-Gen auf eine Regulation durch transkriptionelle Antitermination hin zu überprüfen und diese gegebenenfalls näher zu charakterisieren.

4. Zielsetzung der Arbeit

Prolin spielt für *B. subtilis* eine wesentliche Rolle und erfüllt vielschichtige Funktionen innerhalb dieses Organismus. Zum einen ist Prolin die einzige von *B. subtilis* *de novo* synthetisierte osmotische Schutzsubstanz (Whatmore *et al.*, 1990). Die Akkumulation von Prolin stellt ein zentrales Element der Anpassungsstrategie von *B. subtilis* an hochosmotische Umweltbedingungen dar. Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich bereits wichtige Vorarbeiten zur Aufklärung der osmotisch vermittelten Prolinbiosynthese in *B. subtilis* geleistet (Brill, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass es neben dem anabolen Weg in *B. subtilis* noch einen zweiten Weg der Prolinbiosynthese gibt, der für die osmotisch gesteuerte Prolinanhäufung verantwortlich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten beide Prolinbiosynthesewege durch detaillierte physiologische und molekularbiologische Untersuchungen charakterisiert werden. Zudem sollten Untersuchungen zur Regulation des osmotisch stimulierten Prolinbiosyntheseweges durchgeführt werden.

Prolin als proteinogene Aminosäure wird natürlich auch für anabole Zwecke benötigt. Es sollte in einem ersten Schritt geklärt werden, welche Enzyme tatsächlich an der Prolinbiosynthese für anabole Zweck beteiligt sind. Ferner sollte untersucht werden, ob das erste Enzym des Prolinbiosyntheseweges einer Kontrolle durch Endprodukthemmung unterliegt, wie es für zahlreiche Gram-negative Mikroorganismen gezeigt werden konnte (Leisinger, 1996). Auf Grund von Datenbankanalysen (Chopin *et al.*, 1998) konnte stromaufwärts der *proBA*- und *proI*-kodierenden Regionen die hochkonservierte, für den Mechanismus der transkriptionellen Antitermination charakteristische, T-Box Konsensussequenz nachgewiesen werden. Ziel der zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es daher das *proBA*-Operon und das *proI*-Gen auf eine an den Prolinbedarf der Zelle angepasste Expressionskontrolle durch transkriptionelle Antitermination hin zu überprüfen und diese gegebenenfalls näher zu charakterisieren.

Eine weitere Quelle für kompatible Solute und damit auch für Prolin stellen Peptide dar. Die Rolle exogener Peptide für die Osmostressprotektion wurde erstmalig für das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* beschrieben (Amezaga *et al.*, 1995). Unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen kommt es in *L. monocytogenes* zu einer Akkumulation der Peptide selbst und der durch Abbau der Peptide freigesetzten Aminosäuren (Amezaga *et al.*, 1995). Es sollte daher untersucht werden, ob osmotisch gestresste *B. subtilis*-Zellen ebenfalls von der Anwesenheit prolinhaltiger Peptide im Medium profitieren und ob es zu einer intrazellulären Akkumulation der Peptide, oder des durch eine hydrolytische Spaltung freigesetzten Prolins kommt. Zudem sollten mögliche Peptidtransporter identifiziert werden, die eine Aufnahme der Peptide für osmoprotektive Zwecke katalysieren.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Reagenzien und Chemikalien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Roche, Fluka, Merck, Roth, Riedel-de-Häen, Serva, Qiagen oder Sigma bezogen. Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Bachem bezogen. Es wurden Restriktionsenzyme, Polymerasen und weitere DNA-modifizierende Enzyme der Firmen MBI-Fermentas, NEB-Biolabs, Amersham-Pharmacia Biotech, Stratagene, USB, Ambion, Eurogentech und Roche-Diagnostics verwendet. Die Bestandteile der Vollmedien stammten von Difco.

2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 (*E. coli*) und Tabelle 2 (*B. subtilis*) aufgeführt. Tabelle 3 sind die verwendeten Plasmide und Tabelle 4 die verwendeten Oligonukleotide zu entnehmen, deren Lage in Abb. 4 dargestellt ist.

Tab. 1 *E. coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 Φ 80[<i>lacZ</i> Δ M15] <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
GM2159	<i>dam13::Tn9 thr1 ara14 leuB36 lacY1 tsx33 supE</i>	Marinus <i>et al.</i> , 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^f Z</i> Δ M15 TN10 (Tc ^r)]	Stratagene

Die Bezeichnung der *E. coli* Gene folgt der Nomenklatur von Bachmann (Bachmann, 1990)

Tab. 2 *B. subtilis*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	BGSC ^a ;1A96
FSB1	JH642 (<i>treA::neo</i>)1	Spiegelhalter und Bremer, 1998
TRB0	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::(treA cat)</i> ^b	Spiegelhalter und Bremer, 1998
MTPB33	<i>his nprR2 nprE18 proB::neo^c aprE'-lacZ</i>	Ogura <i>et al.</i> , 1994
BB1951	SMY Δ ^d (<i>proG::ble</i>)	Belitsky <i>et al.</i> , 2001
PS258	<i>trpC2 (codY::erm)</i>	A. L. Sonenshein
MB319	JH642 <i>proBA</i> Δ (<i>dciAE132::neo</i>)	Mathiopoulos <i>et al.</i> , 1991
MB307	JH642 Δ (<i>dciAE132::neo</i>)	Mathiopoulos <i>et al.</i> , 1991

Fortsetzung Tabelle 2

Stamm	Beschreibung	Referenz
BLOB9	JH642 $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})I$	von Blohn <i>et al.</i> , 1997
MBB17	$(\text{treA}::\text{erm})2 \Delta(\text{abrB}::\text{tet})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{opuAA}'\text{-treA})I \text{ cat}]$	M. Brosius, 1999
JSB5	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi^b(\text{proB}'\text{-treA})I \text{ 'ykkE cat}]^e$	Brill, 1998
JSB6	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proJ}'\text{-treA})I \text{ proH 'rtp cat}]$	Brill, 1998
JSB7	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proH}'\text{-treA})I \text{ 'rtp cat}]$	Brill, 1998
JSB8	JH642 $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})I$	Brill, 1998
JSB8 ery	JH642 $\Delta(\text{proHJ}::\text{ery})I$	diese Arbeit
JSB8 kan	JH642 $\Delta(\text{proHJ}::\text{neo})I$	diese Arbeit
JSB9	JH642 $\Delta(\text{proI}::\text{spc})I$	Belitsky <i>et al.</i> , 2001
JSB10	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proI}'\text{-treA})I \text{ yqjP}' \text{ cat}]$	Brill, 1998
JSB11	JH642 $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})I$	Brill, 1998
JSB12	JH642 $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})I \Delta(\text{proBA}::\text{cat})I$	Brill, 1998
JSB13	JH642 $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})I \Delta(\text{proI}::\text{spc})I$	Brill, 1998
JSB14	JH642 $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})I \Delta(\text{proI}::\text{spc})I$	Brill, 1998
JSB15	JH642 $\Delta(\text{proJ}::\text{neo})I$	Brill, 1998
JSB16	JH642 $(\text{proB}::\text{neo})I^f$	Brill, 1998
JSB17	JH642 $[\text{proA} \times \text{pEPV1T}(\text{tet})]^g$	Brill, 1998
JSB18	JH642 $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})I (\text{proB}::\text{neo})I$	Brill, 1998
JSB19	JH642 $[\text{proH} \times \text{pJS23}(\text{erm})]$	diese Arbeit
JSB20	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proB}'\text{-treA})5 \text{ 'ykkE cat}]$	diese Arbeit
JSB21	JH642 $\Delta(\text{proI}::\text{spc})I [\text{proH} \times \text{pJS23}(\text{erm})]$	diese Arbeit
JSB23	JH642 $\text{amyE}::[\Phi(\text{proH}'\text{-lacZ})I \text{ 'rtp cat}]$	diese Arbeit
JSB24	JH642 $\text{amyE}::[\Phi(\text{proB}'\text{-lacZ})I \text{ 'ykkE cat}]$	diese Arbeit
JSB28	JH642 $\text{amyE}::[\Phi(\text{proB}'\text{-treA})I \text{ 'ykkE cat}] [\text{proA} \times \text{pEPV1T}(\text{tet})]$	diese Arbeit
JSB30	JH642 $\text{amyE}::[\Phi(\text{proI}'\text{-treA})I \text{ yqjP}' \text{ cat}] [\text{proA} \times \text{pEPV1T}(\text{tet})]$	diese Arbeit
JSB31	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proB}'\text{-treA})I \text{ 'ykkE cat}] [\text{proA} \times \text{pEPV1T}(\text{tet})]$	diese Arbeit
JSB33	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proI}'\text{-treA})I \text{ yqjP}' \text{ cat}] [\text{proA} \times \text{pEPV1T}(\text{tet})]$	diese Arbeit
JSB34	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I [\text{proA} \times \text{pEPV1T}(\text{tet})]$	diese Arbeit
JSB35	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proH}'\text{-treA})5 \text{ 'rtp cat}]$	diese Arbeit
JSB36	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proH}'\text{-treA})2 \text{ 'rtp cat}]$	diese Arbeit
JSB37	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proH}'\text{-treA})6 \text{ 'rtp cat}]$	diese Arbeit
JSB38	JH642 $(\text{treA}::\text{neo})I \text{ amyE}::[\Phi(\text{proH}'\text{-treA})3 \text{ 'rtp cat}]$	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2

Stamm	Beschreibung	Referenz
JSB39	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proH}'\textit{-treA})$ 4 'rtp <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB5 Mut1	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 2 'ykkE <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB5 Mut2	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 3 'ykkE <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB5 Mut3	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 4 'ykkE <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB31 Mut1	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 2 'ykkE <i>cat</i>] [<i>proA</i> × pEPV1T (<i>tet</i>)]	diese Arbeit
JSB31 Mut2	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 3 'ykkE <i>cat</i>] [<i>proA</i> × pEPV1T (<i>tet</i>)]	diese Arbeit
JSB31 Mut3	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 4 'ykkE <i>cat</i>] [<i>proA</i> × pEPV1T (<i>tet</i>)]	diese Arbeit
JSB1951	JH642 $\Delta(\textit{proG}::\textit{ble})$	diese Arbeit
JSB41	JH642 $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ 1 $\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})$ 1 $\Delta(\textit{proG}::\textit{ble})$	diese Arbeit
JSB42	JH642 $\Delta(\textit{abrB}::\textit{tet})$ 1	diese Arbeit
JSB43	JH642 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proH}'\textit{-lacZ})$ 2 <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB44	JH642 $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{ery})$ 1 $\Delta(\textit{opuE}::\textit{tet})$ 1	diese Arbeit
JSB46	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proI}'\textit{-treA})$ 2 <i>yqjP'</i> <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB47	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proI}'\textit{-treA})$ 2 <i>yqjP'</i> <i>cat</i>] [<i>proA</i> × pEPV1T (<i>tet</i>)]	diese Arbeit
JSB48	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{dppA}'\textit{-treA})$ 1 'proG <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB49	JH642 $\Delta(\textit{dppBC}::\textit{ery})$ 1	diese Arbeit
JSB50	JH642 $\Delta(\textit{dppBC}::\textit{ery})$ 1 $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ 1	diese Arbeit
JSB51	JH642 $\Delta(\textit{dppBC}::\textit{ery})$ 1 $\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})$ 1	diese Arbeit
JSB52	JH642 $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ 1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$ 1 'ykkE <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB53	JH642 $\Delta(\textit{dppE}::\textit{spc})$ 1 $\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})$ 1	diese Arbeit
JSB54	JH642 $\Delta(\textit{dppE}::\textit{spc})$ 1	diese Arbeit
JSB55	JH642 $\Delta(\textit{dppE}::\textit{spc})$ 1 $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ 1	diese Arbeit
JSB56	JH642 (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE</i> ::[$\Phi(\textit{dppA}'\textit{-treA})$ 2 'proG <i>cat</i>]	diese Arbeit
JSB58	JH642 $\Delta(\textit{dciAE132}::\textit{neo})$ $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ 1	diese Arbeit
JSB60	JH642 (<i>codY</i> :: <i>erm</i>)	diese Arbeit
JSB61	[<i>oppA</i> × pJS53 (<i>neo</i>)] $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ 1	diese Arbeit
JSB62	[<i>oppA</i> × pJS53 (<i>neo</i>)] $\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})$ 1	diese Arbeit
JSB63	[<i>oppA</i> × pJS53 (<i>neo</i>)]	diese Arbeit

Die *B. subtilis*-Gene wurden nach der von Anagnostopoulos *et al.* (1994) vorgeschlagenen Nomenklatur benannt. ^aBGSC *Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, Ohio, USA. ^bPromotorloses *treA*-Gen für Operonfusion (Φ) verwendet. ^cIn der genannten Referenz (Ogura *et al.*, 1994) wurde der Genotyp des Stammes MTPB33 fälschlicherweise als (*proB*::*cat*) beschrieben. ^d Δ bedeutet, dass ein Teil des entsprechenden Gens deletiert und durch ein Resistenzgen ersetzt wurde. ^e*amyE*:: $\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})$, 'ykkE)1 bedeutet, dass in das *amyE*-Gen eine Genfusion des Promotorbereiches von *proB* mit dem promotorlosen *treA*-Strukturgen inseriert wurde. Analog hierzu sind die weiteren aufgelisteten Fusionsstämme beschrieben. ^f(*proB*::*neo*)1 bedeutet, dass in das *proB*-Gen das Gen für eine

Kanamycinresistenz inseriert wurde. [§]× bedeutet, dass das jeweilige Plasmid durch einfache, homologe Rekombination (Campbell-Typ) zwischen dem zirkulären Plasmid und dem Chromosom in den beschriebenen Genort inseriert wurde.

Tab. 3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBSK- pBKB21	pBluescript [®] II SK- Phagemid Vektor, ColEI-Derivat, Ap ^r Derivat von pUC19BM20, Km ^r	Stratagene GmbH B. Kempf
pBKB22	Derivat von pHSG575, <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺	B. Kempf
pBKB26	Deletionsderivat von pBKB22, <i>proB</i> ⁺	B. Kempf
pBKB80	MCS aus pUCBM20, Ap ^r Em ^r	B. Kempf
pBKB143	MCS aus pUCBM20 in pBKB141 mit promotorlosem <i>lacZ</i>	B. Kempf
pRMK59	Derivat von pUC19, trägt Cm ^r aus pJH101	Kappes <i>et al.</i> , 1999
pRMK65	Derivat von pRMK38, Ap ^r , Spc ^r	Kappes <i>et al.</i> , 1999
pJMB1	Derivat von pMD476, Vektor geringer Kopienzahl (pACYC177 Replikationsursprung) mit promotorlosem <i>treA</i> , Ap ^r Cm ^r	M. Jebbar
pJH101	Derivat von pBR322, trägt Cm ^r -Kassette, Ap ^r , Tc ^r	Ferrari <i>et al.</i> , 1983
pBEST307	Derivat von pGEM4, Ap ^r Tc ^r	Itaya, 1992
pMUTIN2	Ap ^r Em ^r	Vagner <i>et al.</i> , 1998
pEPV1T	Derivat von pUC19, trägt ' <i>proA</i> ' Tc ^r	Ogura <i>et al.</i> , 1994
pDG646	Derivat von pUC19, Ap ^r , Em ^r	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG783	Derivat von pUC18, Ap ^r , Km ^r	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pDG1726	Derivat von pUC19, Ap ^r , Spc ^r	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995
pUC19	Vektor hoher Kopienzahl, Ap ^r	Yanisch-Perron, 1985
pUK19	Ap ^r , Km ^r	Smirnova <i>et al.</i> , 1998
pFSB66	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>proB proA</i> '	F. Spiegelhalter
pJS2	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>ykkE proB</i> '	Brill, 1998
pJS3	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>ykkE proB proA</i> '	Brill, 1998
pJS5	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE</i> ::[Φ(<i>proB</i> '- <i>treA</i>)1 ' <i>ykkE cat</i>]	Brill, 1998
pJS5Mut1	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE</i> ::[Φ(<i>proB</i> '- <i>treA</i>)2 ' <i>ykkE cat</i>]	diese Arbeit
pJS5Mut2	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE</i> ::[Φ(<i>proB</i> '- <i>treA</i>)3 ' <i>ykkE cat</i>]	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 3

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJS5Mut3	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})4$ 'ykkE cat]	diese Arbeit
pJS6	Derivat von pBSK-, trägt 'rtp <i>proH'</i>	Brill, 1998
pJS8	Derivat von pJS3, trägt $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})1$	Brill, 1998
pJS12	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>proH proJ'gltC</i>	Brill, 1998
pJS13	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>rtp proH proJ'gltC</i>	Brill, 1998
pJS14	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>rtp proH proJ'</i>	Brill, 1998
pJS15	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proJ}'\text{-treA})1$ <i>proH' rtp cat</i>]	Brill, 1998
pJS16	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-treA})1$ ' <i>rtp cat</i>]	Brill, 1998
pJS17	Derivat von pJS12, trägt $\Delta(\text{proJ}::\text{neo})1$	Brill, 1998
pJS18	Derivat von pBSK-, trägt <i>yqjP' proI' yqjN</i>	Belitsky <i>et al.</i> , 2001
pJS19	Derivat von pJS13, trägt $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1$	Brill, 1998
pJS19ery	Derivat von pJS13, trägt $\Delta(\text{proHJ}::\text{ery})1$	diese Arbeit
pJS19kan	Derivat von pJS13, trägt $\Delta(\text{proHJ}::\text{neo})1$	diese Arbeit
pJS20	Derivat von pJS18, trägt $\Delta(\text{proI}::\text{spc})1$	Belitsky <i>et al.</i> , 2001
pJS21	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proI}'\text{-treA})1$ <i>yqjP' cat</i>]	Brill, 1998
pJS22	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>proH proJ'</i>	diese Arbeit
pJS23	Derivat von pMUTIN, trägt ' <i>proH'</i>	Brill, 1998
pJS25	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>ykkE proB'</i>	diese Arbeit
pJS27	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})2$ ' <i>ykkE cat</i>]	diese Arbeit
pJS28	Derivat von pBKB143, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-lacZ})1$ ' <i>rtp cat</i>]	diese Arbeit
pJS29	Derivat von pBKB143, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proB}'\text{-lacZ})1$ ' <i>ykkE cat</i>]	diese Arbeit
pJS31	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>proH'</i>	diese Arbeit
pJS32	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>proH'</i>	diese Arbeit
pJS33	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>proH'</i>	diese Arbeit
pJS34	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-treA})5$ ' <i>rtp cat</i>]	diese Arbeit
pJS35	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-treA})2$ ' <i>rtp cat</i>]	diese Arbeit
pJS36	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-treA})6$ ' <i>rtp cat</i>]	diese Arbeit
pJS38	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-treA})3$ ' <i>rtp cat</i>]	diese Arbeit
pJS39	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proH}'\text{-treA})4$ ' <i>rtp cat</i>]	diese Arbeit
pJS43	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::</i> [$\Phi(\text{proI}'\text{-treA})2$ <i>yqjP' cat</i>]	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 3

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJS44	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::[Φ(proH'-lacZ)2 cat]</i>	diese Arbeit
pJS45	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>dppA dppB dppC dppD</i> '	diese Arbeit
pJS46	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::[Φ(dppA'-treA)1 'proG cat]</i>	diese Arbeit
pJS49	Derivat von pJS45, trägt $\Delta(dppBC::ery)I$	diese Arbeit
pJS50	Derivat von pBSK-, trägt ' <i>dppD dppE ykfA</i> '	diese Arbeit
pJS51	Derivat von pJS50, trägt $\Delta(dppE::spc)I$	diese Arbeit
pJS52	Derivat von pJMB1, trägt <i>amyE::[Φ(dppA'-treA)2 'proG cat]</i>	diese Arbeit
pJS53	Derivat von pUK19, trägt ' <i>oppA</i> '	diese Arbeit

Tab. 4 Oligonukleotide

Bezeichnung ^a	Sequenz (5'→3') ^b	Lage, Bemerkung
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>proHJ</i>-Region		
proHJ5-JS3	TGCTTGAAGTACTTCGGTC	5'-Bereich von <i>rtp</i> , stromaufwärts von <i>proH</i>
proHJ3-JS6	TCCGCCATGGATCCTGCTCC	<i>proH</i> -Startcodon, führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein
proHJ5-JS16	GTCC <u>CCCGGG</u> TAGAAACAAACACCCG	5' von <i>proHJ</i> -Promotor, führt <i>Sma</i> I-Schnittstelle ein
proHJ5-JS17	GTCC <u>CCCGGG</u> GAAACAATACAAATCA	5' von <i>proHJ</i> -Promotor, führt <i>Sma</i> I-Schnittstelle ein
proHJ3-JS18	GCGGGATCCCATCTCCTTTGTTCGCTT	3' von <i>proHJ</i> -Promotor, führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>proBA</i>-Region		
proBA3-JS12	CGTAAAAGGATCCGTCCCG	5'-Bereich von <i>proB</i> , führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein
proBA5-JS13	GAATCCGTAC <u>CCCGGG</u> CC	3'-Bereich von <i>ykkE</i> stromaufwärts von <i>proB</i> , führt <i>Sma</i> I-Schnittstelle ein
proBA5-JS23	CCGCATGAAACCTGCCGAATTCGCCTT GGAGTCCTAGGGG	„Specifierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, führt CCT (Pro) zu TTC (Phe) Austausch ein, Tab. 9
proBA3-JS24	CCCCTAGGACTCCAAGGCGAATTCGGC AGGTTTCATGCGG	„Specifierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, führt CCT (Pro) zu TTC (Phe) Austausch ein, Tab. 9

Fortsetzung Tabelle 4

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Lage, Bemerkung
proBA5-JS27	GAAACATTTTGCCGCATGAAATTCGCC GAACCTGCCTTGGAGTCC	„Specifizierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, führt CCT zu TTC Austausch ein, Tab. 9
proBA3-JS28	GGA CTCCAAGGCAGGTTCTGGCGAATTT CATGCGGCAAATGTTTC	„Specifizierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, führt CCT zu TTC Austausch ein, Tab. 9
proBA5-JS29	GCATGAAACCTGCCGAACCTGTTCTGG AGTCCTAGGGGG	„Specifizierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, führt CCT zu TTC Austausch ein, Tab. 9
proBA3-JS30	CCCCCTAGGACTCCAGAACAGGTTCTGG CAGGTTTCATGC	„Specifizierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, führt CCT zu TTC Austausch ein, Tab. 9
proBA5-JS33	AACTAGACTGCAAGAGGCC	5' von <i>proBA</i> -Promotor
proBA3-JS36 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCC ACCTTGATTGAACGCGC	„Specifizierdomäne“ des <i>proB</i> -Leaders, unmittelbar 5' vom Terminator, führt T7-Promotorsequenz ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>proI</i>-Region		
proI5-JS21	GACATTAGCTTGTCCGCC	<i>proI</i> -Promotor
proI3-JS25	GCGGGATCCCTCTGCATGGACGCACGC	5'-Bereich von <i>proI</i> , führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein
proI5-JS26	GTCCCCCGGGGTCGGGACGCGGATCGC	3'-Bereich von <i>yqjP</i> , stromaufwärts von <i>proI</i> , führt <i>Sma</i> I-Schnittstelle ein
proI5-JS31	CTTCCCCGGGCTCGGTCTTGTGTCATTAT TGC	Stromaufwärts von <i>proI</i> -Promotor, führt <i>Sma</i> I-Schnittstelle ein
proI5-JS35 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCAT ATCTGTTGCCCTGCC	3'-Bereich von <i>proI</i> , führt T7-Promotorsequenz ein
proI5-JS43 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT ACCACCCTCATTAGC	„Specifizierdomäne“ des <i>proI</i> -Leaders, unmittelbar 5' vom intrinsischen Terminator, führt T7-Promotorsequenz ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>proG</i>-Region		
proG5-JS52	CGCGATATCGCCTCTGTGCCGGACG	3'-Bereich von <i>proG</i> , führt <i>Eco</i> RV-Schnittstelle ein
proG5-JS64	GGCTGCGGGCACTCATGTCA	5'-Bereich von <i>proG</i>
proG3-JS65 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCAC AGAGGCGTGTATCACC	3'-Bereich von <i>proG</i> , führt T7-Promotorsequenz ein

Fortsetzung Tabelle4

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Lage, Bemerkung
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>yqhT</i>-Region		
yqhT5-JS37	CCTGTTTGGACAGCTGGG	5'-Bereich von <i>yqhT</i>
yqhT3-JS38 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGAAC TTCCATGCCGAGCCC	3'-Bereich von <i>yqhT</i> , führt T7-Promotorsequenz ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>ykvY</i>-Region		
ykvY5-JS50	AAGCGGGGCATACTGCCG	5'-Bereich von <i>ykvY</i>
ykvY3-JS51 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCTCC GATTCTCACACCGGG	3'-Bereich von <i>ykvY</i> , führt T7-Promotorsequenz ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>dpp</i>-Region		
dppA5-JS39	GTGGATTCCGGCAGGCGG	5'-Bereich von <i>dppA</i>
dppA3-JS40	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCTT CAAGCATGTCCTTCGC	3'-Bereich von <i>dppA</i> , führt T7-Promotorsequenz ein
dpp5-JS48	GTCAAGCCGCTCACACCG	3'-Bereich von <i>dppA</i>
dpp3-JS49	CGGTGGTCGGTTCATCCG	in <i>dppD</i>
dppA3-JS53	GCGGGATCCC GCTGTAAACGCTTCAG	5'-Bereich von <i>dppA</i> , führt <i>Bam</i> HI - Schnittstelle ein
dpp5-JS58	GCCGAATACTATGGGAGCG	3'-Bereich von <i>dppC</i>
dpp3-JS59 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGGTC GCCGACAGTCAGCG	3'-Bereich von <i>dppD</i> , führt T7-Promotorsequenz ein
dpp5-JS60	GATCTGACTCGCACACCG	3'-Bereich von <i>dppD</i>
dpp3-JS61	GAACAAGCTCGGTCAGCG	5' von <i>dppE</i> , im 3'-Bereich von <i>ykfA</i>
dppA3-JS63	GCGGGATCCGCTTGCCGGAATCC	5'-Bereich von <i>dppA</i> , führt <i>Bam</i> HI - Schnittstelle ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>opp</i>-Region		
opp5-JS46	TCGCTTGACCGTCAGTCG	in <i>oppA</i>
opp3-JS47	GCCTGTAATCGTCATGGC	in <i>oppC</i>
oppA5-JS44	GGATCAAACGGTGAAGGG	5'-Bereich von <i>oppA</i>
oppA3-JS45 T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCCC AATCAAGTTCGCC	3'-Bereich von <i>oppA</i> , führt T7-Promotorsequenz ein
Synthetische Oligonukleotide aus der <i>amyE</i>-Region		
amyE1	AAATGTGTGCAGCCGC	5'-Bereich von <i>amyE</i>
amyE2	TCACTTGAAATGAACCC	3'-Bereich von <i>amyE</i>

Fortsetzung Tabelle 4

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Lage, Bemerkung
Synthetische Oligonukleotide für Primer Extension-Analyse		
proHJ-PE3	GTAACGCAGATGTTTTGTTTCGGG	5'-Bereich von <i>proH</i> , komplementär zu Position 45 bis 68 im <i>proH</i> -Gen, [³² P] ^c
proBA-PE1	TCTCTGTCACAGAAAGGTCTGC	<i>proB</i> -Leader, komplementär zu Position 70 bis 92 in Abb. 19A, [³² P]
proI-PE1	TTTTCTAACCGCGACTTGAGGGC	<i>proI</i> -Leader, komplementär zu Position 156 bis 179 in Abb. 19B, [IRD800] ^d
dpp-PE1	CCGCGTTCATAATTCCGCTTGCCG	5'-Bereich von <i>dppA</i> , komplementär zu Position 67 bis 91 im <i>proH</i> -Gen, [IRD800]
Verwendete Sequenzier-Oligonukleotide		
Reverse Primer	GGAAACAGCTATGACCATG	pBSK-, vor <i>SacI</i> Schnittstelle, liest in MCS und inseriertes Genfragment, [IRD800]
M13 Forward Primer	GTAAAACGACGGCCAGT	pBSK-, vor <i>KpnI</i> Schnittstelle und liest in MCS und inseriertes Genfragment, [IRD800]
pJMB1 IRD	ATAAGGGTAACTATTGCCG	pJMB1, stromaufwärts von <i>treA</i> und <i>SmaI</i> -Schnittstelle, [IRD800]
<i>treA</i> IRD	ACCATTTCTGTCGTATCG	pJMB1, 5'-Bereich von <i>treA</i> , [IRD800]

^aDie Benennung der Oligonukleotide ergibt sich zunächst aus dem Namen des Gens in welchem sie lokalisiert sind, die folgende Zahl (5 oder 3) gibt an, ob sie in 5'→3' (5) oder in 3'←5' (3) Orientierung zum Gen vorliegen. ^bSequenzen, die nicht mit dem *B. subtilis*-Chromosom identisch sind und der Einführung von Restriktionsschnittstellen, Punktmutationen oder der T7-Promotorsequenz dienen, sind fett gedruckt. Restriktionsschnittstellen die sich daraus ergeben, sind zudem unterstrichen. ^cDie mit ³²P gekennzeichneten, für Primer Extension-Reaktionen verwendeten, Oligonukleotide, wurden mit Hilfe von Polynukleotidkinase radioaktiv mit [γ -³²P]-ATP markiert. ^dFür Sequenzanalysen und Primer Extension-Reaktionen verwendete Oligonukleotide sind, wenn gekennzeichnet, an ihren 5'-Enden mit dem im Infrarotbereich fluoreszierenden Farbstoff IRD800 modifiziert. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

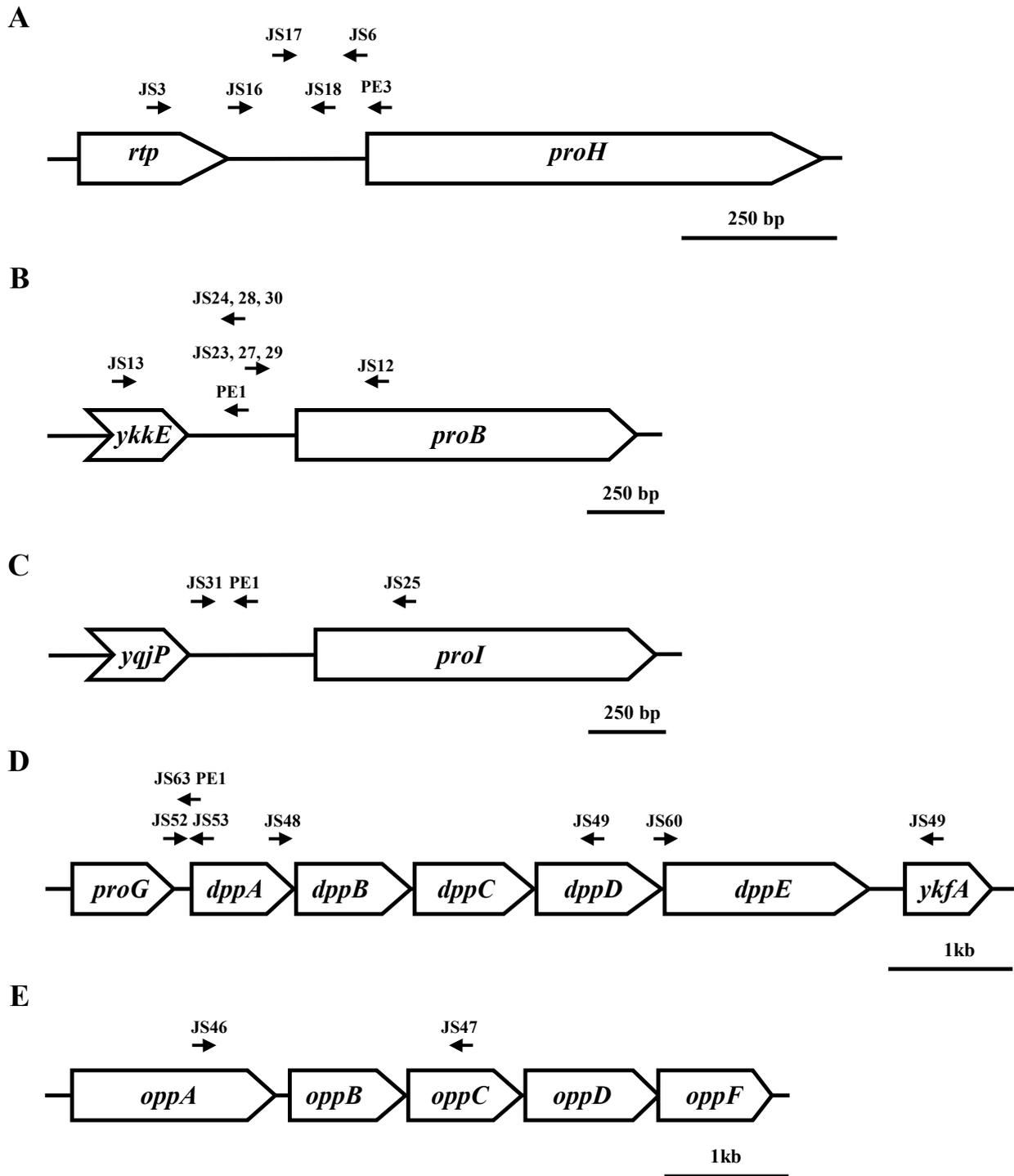


Abb. 4 Schematische Darstellung der Lage und Orientierung der verwendeten Oligonukleotide

Dargestellt ist die Lage und die Orientierung der für die Amplifikation (PCR) von Fragmenten der *proHJ*- (A), *proBA*- (B), *proI*- (C), *dpp*- (D) und *opp*-Region (E) genutzten und der für Primer Extension-Reaktionen genutzten Oligonukleotide (Tab. 4). Die Länge der Oligonukleotide ist nicht maßstabsgetreu dargestellt, wobei der korrekte Startpunkt durch den Beginn des Pfeils gekennzeichnet ist.

3. Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen

3.1 Kulturmedien

3.1.1 Vollmedien

Die Vollmedien LB (Luria-Bertani Broth) und DYT (Double Yeast Tryptone) wurden wie beschrieben hergestellt (Miller, 1992; Sambrook *et al.*, 1989). Festmedien enthielten zusätzlich 15 g Agar pro Liter Medium. Um LacZ⁺-Kolonien auf Agarplatten identifizieren zu können, wurde X-Gal (40 µg ml⁻¹) zugegeben.

3.1.2 Minimalmedien

Als definiertes Medium für *B. subtilis*-Kulturen wurde Spizizens Minimalmedium (SMM) (Spizizen, 1958) mit zusätzlichen Spurenelementen (Harwood and Archibald, 1990) verwendet. Als Kohlenstoffquelle wurde 0,5 % (w/v) Glukose zugegeben. Zur Komplementation zweier Auxotrophien des *B. subtilis*-Stammes JH642 und seiner Derivate (Tab. 2) wurden dem Medium L-Tryptophan (20 mg l⁻¹) und L-Phenylalanin (18 mg l⁻¹) zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter Medium und um LacZ⁺-Kolonien auf Agarplatten identifizieren zu können, X-Gal (40 µg ml⁻¹) zugesetzt. Die Osmolarität von SMM wurde durch Zugabe von NaCl (5 M NaCl Stammlösung), KCl, Saccharose, Laktose, oder Glycerin erhöht und mit Hilfe eines Dampfdruckosmometers (Modell 5500, Wescor Inc., Logan, Utah, USA) bestimmt (Tab. 5).

Tab. 5 Osmolaritäten

Medium	Osmolarität [mOsmol (kg H ₂ O) ⁻¹]
SMM	340
SMM + 0,1 M NaCl	530
SMM + 0,2 M NaCl	710
SMM + 0,3 M NaCl	880
SMM + 0,4 M NaCl	1100
SMM + 0,4 M KCl	1100
SMM + 0,61 M Laktose	1100
SMM + 0,62 M Saccharose	1100
SMM + 0,68 M Glycerin	1100
SMM + 0,5 M NaCl	1290
SMM + 0,6 M NaCl	1480
SMM + 0,7 M NaCl	1640
SMM + 0,8 M NaCl	1860
SMM + 0,9 M NaCl	2010
SMM + 1,0 M NaCl	2240
SMM + 1,2 M NaCl	2700

3.1.3 Transformationsmedien

Für die Transformation von *B. subtilis* wurde HS (high-salt)-Medium und LS (low-salt)-Medium verwendet. Die Transformationsmedien wurden direkt vor Gebrauch frisch angesetzt.

HS-Medium:	SMM-Medium (5x)	10 ml
	H ₂ O	74,5 ml
	1 M Mg SO ₄	30 µl
	50 % Glukose	1 ml
	L-Tryptophan (5 mg ml ⁻¹)	1 ml
	L-Phenylalanin (3 mg ml ⁻¹)	1,5 ml
	2 % Casein-Hydrolysat	1 ml
	10 % Hefeextrakt	1 ml
	8 % L-Arginin / 0,4 % L-Histidin	10 ml
LS-Medium:	SMM-Medium (5x)	2 ml
	H ₂ O	17,2 ml
	1 M MgCl ₂	50 µl
	50 % Glukose	0,2 ml
	L-Tryptophan (5 mg ml ⁻¹)	20 µl
	L-Phenylalanin (3 mg ml ⁻¹)	30 µl
	2 % Casein-Hydrolysat	0,1 ml
	10 % Hefeextrakt	0,2 ml
	50 mM Spermin	0,2 ml

3.2 Zusätze und Antibiotika

Den Medien wurden bei Bedarf die in Tabelle 6 aufgelisteten Substanzen in den entsprechenden Endkonzentrationen aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Tab. 6 Antibiotika, Aminosäuren, Peptide und Zusätze

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Antibiotika			
Ampicillin	100 mg ml ⁻¹ in H ₂ O		100 µg ml ⁻¹
Chloramphenicol	30 mg ml ⁻¹ in 95 % Ethanol	5 µg ml ⁻¹	30 µg ml ⁻¹
Erythromycin	1 mg ml ⁻¹ in 95 % Ethanol	1 µg ml ⁻¹	
Kanamycin	50 mg ml ⁻¹ in H ₂ O	10 µg ml ⁻¹	
Lincomycin	50 mg ml ⁻¹ in 50 % Ethanol	15 µg ml ⁻¹	
Phleomycin	1 mg ml ⁻¹ in H ₂ O	1 µg ml ⁻¹	
Spektinomycin	100 mg ml ⁻¹ in H ₂ O	100 µg ml ⁻¹	
Tetracyclin	5 mg ml ⁻¹ in 50 % Ethanol	15 µg ml ⁻¹	

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Zusätze		
X-Gal	10 mg ml ⁻¹	40 µg ml ⁻¹
Aminosäuren, Osmoprotektiva^a und Peptide^b		
Glycinbetain	100 mM	- // 1 mM ^c
3,4-Dehydro-D,L-Prolin	100 mM	0,2 mM bzw. 1mM
L-Phenylalanin	3 mg ml ⁻¹	18 µg ml ^{-1d} // -
L-Tryptophan	5 mg ml ⁻¹	20 µg ml ^{-1d} // -
L-Glutamat	10 mg ml ⁻¹ // 100 mM	- // 1 mM
L-Prolin	10 mg ml ⁻¹ // 100 mM	50 µg ml ^{-1c} // 1 mM
H-Gly-Gly-OH	100 mM	100 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Pro-Pro-OH HCl	100 mM	50 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Pro-Glu-OH	100 mM	105 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Pro-Lys-OH Acetat	100 mM	105 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Leu-Pro-OH HCl	100 mM	114 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Phe-Pro-OH	100 mM	114 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Pro-Gly-OH	100 mM	83 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Gly-Pro-OH 0,4 H ₂ O	100 mM	78 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Pro-Gly-Gly-OH	100 mM	100 µg ml ⁻¹ // 1 mM
H-Pro-Val-Gly-OH	100 mM	120 µg ml ⁻¹ // 1 mM

^aDie Aminosäuren, Peptide und Osmoprotektiva wurden in der angegebenen Konzentration in H₂O gelöst. ^bDie aufgelisteten prolinhaltigen Di- und Tripeptide wurden zur Komplementation der Prolinauxotrophie dem SMM in den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben, die sich aus der Berechnung der zu 50 µg ml⁻¹ Prolin äquivalenten Menge von Prolin in peptidgebundener Form ergeben. ^cEndkonzentration der jeweiligen Aminosäure als Aminosäurequelle // Endkonzentration der jeweiligen Aminosäure als osmotische Schutzsubstanz. ^dFür Prolin-, Tryptophan-, oder Phenylalanin-Hungerexperimente wurden diese Aminosäuren in den, für das jeweilige Experiment genannten, Konzentrationen zugesetzt.

3.3 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 120°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze, wie Aminosäuren, Peptide und Antibiotika wurden sterilfiltriert. Glasgeräte wurden 3 h bei 180°C trocken sterilisiert.

3.4 Wachstum

3.4.1 Wachstumsbedingungen

Die Bakterienkulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, immer gut belüftet (aerob) bei 37°C inkubiert. Agarplatten wurden im Brutschrank, Flüssigkulturen auf dem Reagenzglasroller oder dem Schüttler bei 220 rpm inkubiert.

E. coli

Flüssigkulturen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern, Kulturen von 50 bis 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben von 100 bis 2000 ml inkubiert.

B. subtilis

Vorkulturen von 20 ml wurden über Nacht in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C bzw. 25°C und 220 rpm inkubiert. Für Wachstumsversuche, TreA-Aktivitätsbestimmungen, HPLC-Analysen und RNA-Isolierung wurden Kulturen von 75 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD₅₇₈ von 0,05 bis 0,2 (für das jeweilige Experiment angegeben) beimpft und bei 37°C bzw. 25°C in Schüttelwasserbädern gezogen. Für Wachstumsversuche und HPLC-Analysen in Gegenwart prolinhaltiger Peptide wurden kleinere Volumina gewählt. Es wurden Kulturen von 15 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben oder von 40 bis 60 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben gezogen.

Für Wachstumsversuche und TreA-Aktivitätsbestimmungen mit limitierenden Mengen an Prolin, Phenylalanin oder Tryptophan wurden die jeweiligen Zellen in SMM mit einer ausreichenden Menge der jeweiligen Aminosäure vorgezogen [Prolin (10 mM); Phenylalanin (0,1 mM); Tryptophan (0,1 mM)], einmal bei 4°C mit SMM-Medium ohne Aminosäuren gewaschen und anschließend in das jeweilige Wachstumsmedium inokuliert.

3.4.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm mit einem Spektralphotometer (Pharmacia LKB, Ultrospec III) bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine OD₅₇₈ von 1 etwa 1×10^9 Zellen ml⁻¹ entspricht (Miller, 1992). Ferner beträgt der Proteingehalt einer *B. subtilis*-Kultur in SMM bei einer OD₅₇₈ von 1 etwa 100 µg ml⁻¹.

4. Molekularbiologische und genetische Methoden

4.1 Präparation von DNA und Gesamt-RNA

4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Das Ausgangsvolumen der Zellkulturen betrug dabei 50 ml für Plasmide hoher Kopienzahl und 250 ml für Plasmide niedriger Kopienzahl. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Präparationen kleineren Maßstabes wurden aus 1,6 ml Kultur nach einem verkürzten Verfahren (ohne Fällung durch Isopropanol, ohne RNase Inkubation) durchgeführt und in 50 µl TE mit 10 µg ml⁻¹ RNase aufgenommen. Plasmid-DNA für Sequenzreaktionen wurde mit Hilfe eines „Plasmid-Midi-/Maxi-Kits“ (Qiagen) über DNA-bindende Säulen nach Vorschrift des Herstellers präpariert.

4.1.2 Präparation chromosomaler DNA

Genomische DNA aus *B. subtilis* wurde aus in 10 ml LB-Medium gezogenen Kulturen mit Hilfe von DNA-bindenden Säulen (Qiagen-tip 20) der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert. Die so gewonnene chromosomale DNA wurde in 100 µl TE aufgenommen.

4.1.3 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus exponentiell in SMM mit den für das jeweilige Experiment angegebenen Zusätzen gewachsenen *B. subtilis*-Kulturen, bei einer OD₅₇₈ von etwa 0,5 bis 0,8 oder zu dem für das jeweilige Experiment gesondert angegebenen Zeitpunkt isoliert. Die Präparation erfolgte zum einen mit Hilfe DNA/RNA-bindender Säulen, unter Verwendung des „Qiagen RNA/DNA Midi Kits“ oder des „High Pure RNA Isolation Kits“ von Roche, nach Angaben des Herstellers. Zum anderen wurde die saure Phenol-Methode angewendet. Hierzu wurden 20 ml Kultur über 10 g zu Eis gefrorenes 20 mM NaN₃ gegeben und bei 6000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml kaltem Puffer 1 [50 mM Tris-HCl (pH 8), 0,25 mM EDTA, 25 % Saccharose, 1 mg ml⁻¹ Lysozym] resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Protoplasten wurden für 5 Minuten bei 6000 g abzentrifugiert und in 300 µl einer 0,2 M NaCl und 3 mM EDTA enthaltenden Lösung resuspendiert, zu 300 µl auf 95°C vorgeheiztem Puffer 2 [0,2 M NaCl, 3 mM EDTA, 1 % SDS] gegeben und für weitere 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 600 µl saures Phenol zugegeben und für 5 Minuten geschüttelt. Die nach Zentrifugation erhaltene, obere, wässrige Phase wurde nochmals mit saurem Phenol und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach einer Ethanol-fällung wurde die RNA in DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen.

4.1.4 Bestimmung der RNA- und DNA- Konzentration

Die Konzentration und die Reinheit der DNA und der RNA wurden photometrisch bestimmt (Pharmacia LKB, Ultrospec III). Eine A₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg ml⁻¹ dsDNA, oder 40 µg ml⁻¹ RNA. Der Quotient der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren (Sambrook *et al.*, 1989).

4.2 Klonierungstechniken

4.2.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Ansätze von 20 bis 100 µl Gesamtvolumen verwendet. Restriktionsansätze mit chromosomaler DNA hatten ein Gesamtvolumen von 50 µl. Dabei wurde pro 1 µg DNA mindestens eine Enzymeinheit (U) eingesetzt und im entsprechenden Restriktionspuffer für 2 h, oder über Nacht bei 37°C bzw. 25°C inkubiert.

4.2.2 Auffüllen überhängender Enden

Wenn nötig, wurden überhängende 5'-Enden von Restriktionsschnitten in DNA mit Hilfe des Exonuklease-freien Klenow-Enzymes (Amersham-Pharmacia Biotech) aufgefüllt. Die Durchführung erfolgte laut Vorschrift des Herstellers.

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 0,7 - 1,4 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenstandard diente mit *BstEII* geschnittene λ -DNA (MBI-Fermentas). Die Gele wurden mit einer Ethidiumbromidlösung ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) gefärbt und unter UV-Licht mit Hilfe eines Video-Printers (Biotec-Fischer oder Intas) dokumentiert.

4.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese in „low-melting“ Agarose (peqGold „Low Melt Agarose, peqLAB-Biotechnologie) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und die entsprechende Bande unter UV-Beleuchtung als Gelstück ausgeschnitten. Das erhaltene Gelstück wurde für 5 Minuten bei 70°C geschmolzen, anschließend mit 1 ml Resin [66,84 g Guanidin-Hydrochlorid in 33,3 ml Merlin III-Puffer (61,35 g Kaliumacetat, 35,7 ml Essigsäure; ad 500 ml H₂O) mit 2 g Diatomenerde (Celite); pH 5,5] versetzt und unter gelegentlichem Invertieren für 10 bis 15 Minuten inkubiert. Die an die Diatomenerde gebundene DNA wurde über Filtersäulchen (Wizard[®] Minicolumns, Promega) nach Angaben des Herstellers gereinigt und mit 40 μl H₂O eluiert.

4.2.5 Ligation

Die linearisierten DNA-Fragmente wurden in Ligationspuffer mit einer Einheit T4-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech oder Roche) über Nacht bei 15°C in einem Wasserbad ligiert.

4.3 PCR und Bestimmung der Nukleotidsequenz

4.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Segmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardprotokollen (White, 1993) eingesetzt. PCR-Reaktionen wurden mit der Taq DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech oder Eppendorf) oder der Pfu Turbo[®] DNA-Polymerase (Stratagene) in einem „Trio Thermoblock-Cycler“ (Biometra) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

4.3.2 Bestimmung der Nukleotidsequenz

Zur Sequenzanalyse wurde die Didesoxy-Kettenabbruchmethode angewendet (Sanger *et al.*, 1977). Dazu diente der „Thermo Sequenase[™] DYEnamic Direct cycle sequencing Kit“ mit „7-DeazadGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech). In die Sequenzreaktion wurde pro 1 kb (Kilobase) doppelsträngiger Plasmid-DNA 0,5 bis 1 μg DNA eingesetzt und 1 pmol IR800-markierter Primer (Tab. 4) zugesetzt. Es wurde ebenfalls der Trio-Thermoblock-Cycler (Biometra) verwendet. Das

Sequenzgel wurde mittels eines Sequenzgel Kits (Sequagel XR ultra pure Lösung und Sequagel complete ultra pure Lösung, Biozym) nach Angaben des Herstellers erstellt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte mit einem Li-COR DNA-Sequenzer (Modell 4000, MWG). Die Sequenz wurde mit Hilfe der Base ImagIRTM-Software (Li-COR) ausgewertet. Weitere computergestützte Sequenzanalysen erfolgten unter Verwendung der Lasergene Programme von DNASTar Ltd. (London, UK).

Die neben den Primer Extension-Reaktionen der *proHJ*- oder *proBA*-Transkripte aufgetragenen Sequenzreaktionen wurden ebenfalls nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung [α -³³P]-markierter Didesoxynukleotiden (ddNTP, Amersham Pharmacia Biotech). Die hierzu verwendeten Oligonukleotide waren nicht radioaktiv markiert. In einem denaturierenden 5 %-igen Polyacrylamid-Gel wurden die entstehenden DNA-Fragmente elektrophoretische aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.4 Transformation von Bakterien

4.4.1 Transformation von *E. coli*

Plasmid-DNA und Ligationsansätze wurden zuvor dialysiert und anschließend mittels Elektroporation mit dem „BioRad-Gene-Pulser^{TMcc}“ (BioRad, Hercules, CA, USA) in *E. coli* transformiert. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (Bacterial electrotransformation and pulse controler instruction manual, Version 1.0).

4.4.2 Transformation von *B. subtilis*

Die Gewinnung kompetenter *B. subtilis*-Zellen wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurden von einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte 3 ml HS-Medium in einem Reagenzglas inokuliert und bei 37°C auf einem Roller über Nacht inkubiert. Mit einem ml dieser HS-Kultur wurden dann 20 ml vorgewärmtes LS-Medium in einem 100 ml Kolben angeimpft und 3 h bei 30°C und 100 rpm in einem Wasserbad inkubiert. Die vorbereitete DNA-Lösung (50 ng genomische DNA bzw. 10 bis 15 µg Plasmid-DNA) wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt, 1 ml der LS-Kultur wurde zugegeben und der Transformationsansatz für 2 h bei 37°C auf dem Roller inkubiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.5 DNA-Sonden und DNA-DNA-Hybridisierungen (Southern-Blot)

Die Identität aller in dieser Arbeit durch Integration eines Plasmids in das Chromosom erstellten Deletions- sowie Fusionsstämme von *B. subtilis* wurde durch eine DNA-DNA Hybridisierung (Sambrook *et al.*, 1989) verifiziert. Dabei erfolgte die Herstellung der DNA-Sonden und die Durchführung der Southern-Hybridisierungen mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kits“ (Roche) nach Vorgaben des Herstellers. Die Konstruktion der einzelnen, in dieser Arbeit verwendeten Sonden ist unter der Beschreibung des jeweiligen überprüften *B. subtilis*-Stammes zu finden. Für eine Southern-Blot-Analyse wurden 4 bis 10 µg chromosomale DNA nach Verdau mit

den jeweiligen Restriktionsenzymen über 1 %-ige TAE-Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe einer Vakuum-Blotanlage (VacuGeneTM XL, Pharmacia LKB) bei 70 bis 80 mbar Unterdruck auf Nylonmembranen (Nytran[®] 13N, Schleicher & Schuell) transferiert und mit Hilfe von UV-Licht (UV-Stratalinker[®] 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde nach Angaben des „DIG-System User’s Guide“ weiterbehandelt. Als Größenstandard diente der „DIG-DNA Molecular Weight Marker VII“ (Roche). Die Detektion erfolgte auf einem Phosphoimager (Storm 860, Amersham Pharmacia Biotech) mittels Chemilumineszenz, des als Substrat dienenden ECF-Vistra (12 µl cm⁻² Blot; Amersham Pharmacia Biotech). Die Verarbeitung und Darstellung der Daten erfolgte mit der Image QuANTTM-Software von Molecular Dynamics.

4.6 Analyse von Gesamt-RNA durch Northern-Transfer und Hybridisierung

4.6.1 Erstellung der RNA-Sonden

Bei allen in dieser Arbeit zur Analyse von Gesamt-RNA verwendeten Sonden, handelt es sich um einzelsträngige, DIG-markierte, *anti-sense* RNA-Sonden. Die *proHJ*- (Abb. 12A), *proBA*- (Abb. 13A) und *proI*- (Abb. 13B) spezifischen Sonden wurden unter Verwendung des „DIG RNA-Labeling (SP6/T7) Kits“ (Roche), die *proG*- (Abb. 13C), *proB*-, *proB*-Leader- (Abb. 28A), *proI*-, *proI*-Leader (Abb. 29A), *dppA*-, *dppCD*- (Abb. 30A), *oppA*- (Abb. 33A) *yqhT*- (Abb. 34A) und *ykvY*- (Abb. 34B) spezifischen Sonden mit Hilfe des „Strip-EZTM RNA Kits“ (Ambion Inc., Houston, TX, USA), nach den Angaben des jeweiligen Herstellers erstellt. Hierzu wurden die als Template verwendeten PCR-Fragmente oder linearisierten Plasmide, die eine T7- oder T3-Promotorsequenz tragen, zunächst mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) laut Herstellerangaben gereinigt. Bei der folgenden *In vitro*-Transkription wurde das in dem verwendeten Nukleotidgemisch enthaltene DIG-UTP (Roche) mit in die RNA-Sonden eingebaut. Die als Matrize dienende DNA wurde nach der Reaktion mit DNase entfernt.

Als Template der T7-Polymerase diente für die Herstellung der 1597 nt *proHJ*-Sonde das linearisierte Plasmid (*EcoRI*) pJS22 und für die 520 nt *proBA*-Sonde das linearisierte (*XhoI*) Plasmid pFSB66. Das linearisierte (*ScaI*) Plasmid pJS18 wurde zur Erstellung der 855 nt langen, *proI*-spezifischen Sonde und das linearisierte (*EcoRV*) Plasmid pJS2 für die 1065 nt *proB*-Sonde als Template für die T3-Polymerase genutzt.

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten RNA-Sonden wurden von PCR-Fragmenten abgeleitet, die unter Verwendung von Oligonukleotiden (Tab. 4) erstellt wurden, von denen der jeweils stromabwärts gelegene Primer am 5'-Ende eine artifizielle T7-Promotorsequenz trägt. Der Herstellung der *proG*-Sonde diente ein 618 bp PCR-Fragment (*proG5*-JS64/*proG3*-JS65 T7; Tab. 4), der Herstellung einer zweiten *proI*-Sonde (Abb. 29A) ein 1082 bp PCR-Fragment (*proI5*-JS26/*proI3*-JS35 T7, Tab. 4), der Herstellung einer *proI*-Leader-spezifischen Sonde ein 241 bp PCR-Fragment (*proI5*-JS21/*proI3*-JS43 T7, Tab. 4) und der Herstellung der *proB*-Leader-spezifischen Sonde ein 276 bp PCR-Fragment (*proBA5*-JS33/*proBA3*-JS36 T7, Tab. 4). Für die Konstruktion der *dppA*-Sonde wurde ein 710 bp PCR-Fragment (*dppA5*-JS39/*dppA3*-JS40 T7, Tab. 4), zur Konstruktion der *dppCD*-Sonde ein 612 bp PCR-Fragment (*dpp5*-JS58/*dpp3*-JS59 T7, Tab. 4), zur Herstellung der *oppA*-spezifischen Sonde ein 733 bp PCR-Fragment (*oppA5*-JS44/*oppA3*-

JS45 T7, Tab. 4), zur Herstellung der *yqhT*-Sonde ein 857 bp PCR-Fragment (*yqhT5*-JS37/*yqhT3*-JS38 T7, Tab. 4) und zur Herstellung der *ykvY*-spezifischen Sonde ein 780 bp PCR-Fragment (*ykvY5*-JS50/*ykvY3*-JS51 T7, Tab. 4) verwendet.

4.6.2 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot)

Für den Northern-Transfer wurden 5 bis 14 µg Gesamt-RNA (Die tatsächlich eingesetzte Menge ist für das jeweilige Experiment im Ergebnisteil angegeben) und als Größenmarker dienender RNA-Marker (RNA Ladder NO362S, NEB) in einem 1,4 %-igen Agarosegel in MOPS-Puffer für etwa 3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurde die RNA für 5 Minuten in $1 \times$ MOPS mit 50 % Formamid und 6,5 % Formaldehyd bei 70°C denaturiert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Nytran[®] 13N, Schleicher & Schuell) erfolgte für 12 bis 16 Stunden mit $10 \times$ SSC (Sambrook *et al.*, 1989). Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von UV-Licht (UV-Stratalinker[®] 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert. Der aufgetragene Marker wurde unter UV-Licht (253 nm) sichtbar gemacht und neben den einzelnen Markerbanden auch die Banden der ribosomalen RNA mit Bleistift auf der Membran markiert. Die RNA-RNA-Hybridisierung erfolgte bei 68 bis 70°C für circa 16 Stunden in $5 \times$ SSC, 50 % Formamid, 2 % Blocking Reagent (Roche), 7 % SDS und 0,1 % N-Laurylsarcosin. Anschließend wurde die Membran bei gleicher Temperatur zweimal 10 Minuten in $2 \times$ SSC, 0,1 % SDS und zweimal 15 Minuten in $0,2 \times$ SSC und 0,1 % SDS gewaschen. Die Membran wurde dann bei RT in Puffer 1 [100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5)] äquilibriert, 30 Minuten in Puffer 2 [Puffer 1 mit 1 % Blocking Reagent (Roche)] abgesättigt und die DIG-markierte RNA immunologisch durch 30 minütige Inkubation in Puffer 2 mit 1/10000 Volumen Anti-DIG-Antikörper-Konjugat (Anti-Digoxygenin-AP-Fab-Fragments, Roche) nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 Minuten mit Puffer 1 gewaschen und schließlich in 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,5) äquilibriert. Die Detektion erfolgte auf einem Phosphoimager (Storm 860, Amersham Pharmacia Biotech) mittels Chemilumineszenz, des als Substrat dienenden „ECF-Vistra“ (12 µl cm⁻² Blot; Amersham Pharmacia Biotech). Zur Verarbeitung der Daten, insbesondere zur Quantifizierung der erhaltenen Signale und damit der Transkriptmenge, wurde die Image QuaNT[™]-Software von Molecular Dynamics verwendet.

4.7 Analyse von mRNA-Startpunkten durch Primer Extension

4.7.1 5'-Phosphorylierung der Oligonukleotide

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide proHJ-PE3 und proBA-PE1 erfolgte mit Hilfe von [γ -³²P] ATP (Amersham Pharmacia Biotech). Dabei wurde in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligodesoxynukleotids übertragen. Die Durchführung erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989).

4.7.2 Reverse Transkription

Zur Analyse der Transkriptionsstartpunkte wurde die Gesamt-RNA aus *B. subtilis*-Wildtypzellen, die in SMM unter den jeweils angegebenen Bedingungen bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) gewachsen sind, präpariert. Für die radioaktive Primer Extension-Analyse der *proHJ*- und *proBA*-mRNA wurden je 15 µg Gesamt-RNA mit 2 pmol der am 5'-Ende ³²P-markierten Oligonukleotide proHJ-PE3 oder proBA-PE1 in 5 µl Reverse Transkriptase (RT)-Puffer [50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM MgCl₂, 80 mM KCl] für 4 Minuten auf 70 °C erhitzt und dann in Ethanol-Trockeneis schockgefroren. Nach Auftauen der Proben auf Eis, wurden 5 µl einer Lösung von 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 8 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) in RT-Puffer und 4 Einheiten (U) AMV Reverse Transkriptase (avian myeloblastosis virus [AMV] Reverse Transcriptase, Eurogentec) zugegeben. Diese Ansätze wurden für 30 Minuten bei 48°C inkubiert, dann präzipitiert, gewaschen, getrocknet und in 12 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Unter Verwendung der oben genannten, jedoch nicht radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden auf dem Plasmid pJS13 (*proHJ*) und pJS2 (*proBA*) Sequenzreaktionen (Abschnitt 4.3) durchgeführt. Diese wurden in einem denaturierenden 5 %-igen Polyacrylamid-Gel neben den entstehenden cDNA-Fragmenten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung und Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte unter Verwendung eines PhosphorImagers (Molecular Dynamics).

Für die nicht-radioaktive Primer Extension-Reaktion der *proI*-mRNA wurden 15 µg Gesamt-RNA mit 10 pmol 5'-IRD800-markiertem *proI*-spezifischem Oligonukleotid (proI-PE1, Tab. 4) in 20 µl 1 × AMV Reverse Transkriptase-Puffer (Promega) zusammengegeben. In einem Eppendorf Thermomixer wurden dieser Ansatz für 3 Minuten auf 75°C erhitzt und der Thermomixer anschließend auf 42°C eingestellt, so dass ein langsames Abkühlen bis zu dieser Temperatur erfolgte. Nach Zugabe von 1 µl dNTP-Mix [je 8 mM dNTP in 1 × AMV Reverse Transkriptase-Puffer (Promega)] und 10 Einheiten (U) AMV Reverse Transkriptase (Promega) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 500 µl Ethanol (96 %-ig) gefällt, mit 80 %-igem Ethanol gewaschen und in 6 µl 1 × Stop-Puffer (Stoplösung aus dem „Thermo Sequenase™ DYEnamic Direct cycle sequencing Kit“, Amersham Pharmacia Biotech) aufgenommen. Vor der gelelektrophoretischen Analyse auf dem Li-COR DNA-Sequenzer (Modell 4000, MWG) wurden die Reaktionsprodukte bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

4.8 *In vitro*-Transkription

Die *In vitro*-Transkription (IVT) wurde mit aus *B. subtilis* gereinigter RNA-Polymerase (RNAP/σ^A-Holoenzym; wurde von H. Putzer, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris zur Verfügung gestellt) auf einem 161 bp PCR-Fragment (proHJ5-JS6/proHJ3-JS17, Tab. 4) als Template durchgeführt. Es wurde eine von Grandoni *et al.* (1992) beschriebene Methode angewendet. Hierzu wurden in einem 20 µl-Ansatz folgende Komponenten in 1 × IVT-Puffer [40 mM Tris (pH 8), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1mM 1,4-Dithiothreitol, 10 µg µl⁻¹ Bovine Serum Albumin (BSA)] zusammengegeben: Je 2,5 mM ATP, CTP, GTP und UTP; 10 µCi [α-³²P] UTP (Amersham Pharmacia Biotech); 0,5 µg gereinigtes *B. subtilis* RNAP/σ^A-Holoenzym; 50 ng PCR-Fragment (Matrize) und 48 Einheiten (U)

RNase-Inhibitor (Promega). Zudem wurden zu weiteren Ansätzen verschiedene Konzentrationen (100, 200 und 300 mM) Kaliumglutamat (pH 7,5) zugegeben. Die Ansätze wurde für 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl 3 M Natrium Acetat (pH 4,5) und 20 µl saures Phenol zugegeben, gemischt und die obere wäßrige Phase anschließend mit 2 µl 10 M LiCl₂ und 75 µl Ethanol gefällt. Das Pellet wurde gewaschen, getrocknet und in 10 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Unter Verwendung des proHJ-PE3 Oligonukleotids wurde auf dem Plasmid pJS13 (*proHJ*) eine Sequenzreaktion (Abschnitt 4.3) durchgeführt. Diese wurde als Größenmarker in einem denaturierenden 5 %-igen Polyacrylamid-Gel neben der entstehenden RNA elektrophoretisch aufgetrennt.

5. Computergestützte Sequenzanalysen

DNA- und Proteinsequenzanalysen wurden unter Verwendung des Programmpaketes Lasergene (DNAS_tar Ltd, London, U.K.) durchgeführt. Vergleiche von Proteinsequenzen erfolgten mit Hilfe des Clustal-Algorithmus in „MegAlign“ (DNAS_tar). Datenbankvergleiche mit veröffentlichten Sequenzen anderer Organismen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990; Gish and States 1993) am NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) online durchgeführt. RNA-Sekundärstrukturen mit minimaler freier Energie, wurden mit Hilfe eines von M. Zuker (1989) beschriebenen Programms ermittelt.

6. Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen

6.1 Plasmidkonstruktion

Sämtliche in diesem Abschnitt erwähnten Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt und die Lage der Oligonukleotide ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Zur Amplifikation der Konstrukte wurden die Ligationsansätze durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert.

Handelte es sich um Konstrukte bei denen ein Fragment in die MCS des Vektors pBSK-inseriert wurde, so wurde dieser Transformationsansatz auf LB-Ampicillin-Agarplatten, die X-Gal, eine normalerweise farblose Verbindung, enthalten ausplattiert. Bei der Spaltung von X-Gal durch die β-Galactosidase entsteht das tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo. Die MCS des pBSK- Vektors liegt innerhalb eines 5'-Abschnitts des *lacZ*-Gens. Dieser Abschnitt kodiert ein aminotermiales Fragment der β-Galactosidase. Um das sogenannte Blau-Weiß-Screening ausnutzen zu können, müssen jedoch die passenden Bakterienstämme verwendet werden, die wie DH5α in ihrem Genom den 3'-Abschnitt des *lacZ*-Gens besitzen und somit den carboxyterminalen Teil der β-Galaktosidase kodieren. Bakterien, die pBSK- tragen sind dann ampicillinresistent und bilden zudem eine funktionsfähige β-Galaktosidase, die sich aus dem plasmidkodierten Anteil und dem vom Genom des *E. coli*-Stammes kodierten Anteil zusammensetzt. Sie bilden auf Ampicillinagarplatten mit X-Gal blaue Kolonien. Bakterien die pBSK- mit einem in die MCS inseriertem Fragment tragen, bilden keine funktionsfähige β-Galaktosidase mehr und bleiben in Gegenwart von X-Gal farblos. Diese Ap^r und weißen Kolonien wurden isoliert und die Richtigkeit der präparierten Plasmide durch Restriktionsverdaue überprüft.

Die Nukleotidsequenz von klonierten PCR-Fragmenten wurde, sofern sie nicht in einem nachfolgenden Schritt zur Konstruktion von „Knockoutmutanten“ verwendet wurden, stets auf ihre Richtigkeit hin analysiert.

pJS19ery: Zur Konstruktion von pJS19ery wurde das 1,60 kb *XbaI-NsiI* Fragment des Plasmides pDG646, das ein Erythromycin-Resistenzgen trägt, in das mit *NsiI* und *AvrII* geschnittene Plasmid pJS13 ligiert. In dem entstandenen Plasmid pJS19ery ist ein interner Teil des *proHJ*-Operons (1089 bp) durch das *erm*-Gen ersetzt.

pJS19kan: Zur Konstruktion von pJS19kan wurde das 1,49 kb *XbaI-PstI* Fragment aus pDG783, das ein Kanamycin-Resistenzgen trägt, in das mit *NsiI* und *AvrII* geschnittene Plasmid pJS13 ligiert. In dem entstandenen Plasmid pJS19kan ist ein interner Teil des *proHJ*-Operons (1089 bp) durch das *neo*-Gen ersetzt.

pJS22: Zur Konstruktion von pJS22 wurde das 1570 bp '*proH proJ*' *DraI* Fragment aus pJS13 in den mit *EcoRV* linearisierten pBSK- ligiert.

pJS25: Unter Verwendung der Oligonukleotide proBA5-JS13, das eine *SmaI*- und proBA3-JS12, das eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 909 bp '*ykkE proB*' Fragment aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Nach Verdau mit *BamHI* und *SmaI* wurde das entstehende 884 bp Fragment in den mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten pBSK-Vektor ligiert.

pJS31: Unter Verwendung der Oligonukleotide proHJ5-JS16, das eine *SmaI*- und proHJ3-JS18, das eine *BamHI*-Schnittstelle einführt, wurde ein 176 bp Fragment der *proHJ* Promotorregion amplifiziert. Das nach Verdau mit *SmaI* und *BamHI* entstehende 173 bp-Fragment wurde in den mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten Vektor pBSK- ligiert.

pJS32: Unter Verwendung der Oligonukleotide proHJ5-JS17, das eine *SmaI*- und proHJ3-JS6, das eine *BamHI*-Schnittstelle einführt, wurde ein 161 bp Fragment der *proHJ* Promotorregion, das stromabwärts bis zum ATG Codon reicht, amplifiziert. Das nach Verdau mit *SmaI* und *BamHI* entstehende 153 bp-Fragment wurde in den mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten Vektor pBSK- ligiert.

pJS33: Unter Verwendung der Oligonukleotide proHJ5-JS17, das eine *SmaI*- und proHJ3-JS18, das eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 105 bp Fragment der *proHJ* Promotorregion amplifiziert. Das nach Verdau mit *SmaI* und *BamHI* entstehende 102 bp-Fragment wurde in den mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten Vektor pBSK- ligiert.

pJS45: Unter Verwendung der Oligonukleotide dpp5-JS48 und dpp3-JS49 wurde ein 2672 bp '*dppA dppB dppC dppD*' Fragment amplifiziert. Das nach einem Verdau mit *EcoRI* und *EcoRV* entstehende 2601 bp-Fragment, wurde in den mit *EcoRI* und *HincII* linearisierten Vektor pBSK- ligiert.

pJS49: Zur Konstruktion von pJS49 wurde das 1538 bp *NdeI-MluI* Fragment des Plasmides pBKB80, das ein Erythromycin-Resistenzgen trägt, in das mit *NdeI* und *MluI* geschnittene Plasmid

pJS45 ligiert. In dem so entstandenen Plasmid pJS49 wurde ein internes '*dppB dppC*' Fragment (1322 bp) durch das *erm*-Gen ersetzt.

pJS50: Unter Verwendung der Oligonukleotide dpp5-JS60 und dpp3-JS61 wurde ein 2355 bp '*dppD dppE ykfA*' Fragment amplifiziert. Das nach Verdau mit *NaeI* und *EcoRI* entstehende 1941 bp große '*dppE ykfA*' Fragment wurde in den mit *HincII* und *EcoRI* linearisierten Vektor pBSK-ligiert.

pJS51: Zur Konstruktion von pJS51 wurde das 1218 bp *HindIII* Fragment des Plasmides pDG1726, das ein Spectinomycin-Resistenzgen trägt, in den mit *HindIII* geschnittenen Vektor pJS50 ligiert. In dem so entstandenen Plasmid pJS51 wurde ein internes '*dppE*' Fragment (1077 bp) durch das *spc*-Gen ersetzt.

pJS53: Unter Verwendung der Oligonukleotide opp5-JS46 und opp3-JS47 wurde ein 2246 bp '*oppA oppB oppC*' Fragment amplifiziert. Das nach Verdau mit *PstI* und *EcoRI* entstehende 391 bp '*oppA*' Fragment wurde in den mit *PstI* und *EcoRI* linearisierten Vektor pUK19 ligiert.

6.1.1 Konstruktion von *treA*- und *lacZ*-Reporterfusionen

Der zur Konstruktion von Reporterfusionen genutzte Fusionsvektor pJMB1 ist ein Derivat des Vektors pMD476 (Schöck *et al.*, 1996), dessen Replikationsursprung durch den des Vektors pACYC177 (Chang und Cohen, 1978) ersetzt wurde (M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlicht). Somit liegt pJMB1 in geringer Kopienzahl in *E. coli* vor. Als Reportergen trägt pJMB1 *treA* aus *B. subtilis* ohne seinen authentischen Promotor. Zur Konstruktion von Operonfusionen können 5' von *treA* gerichtet Promotorfragmente eingefügt werden, wobei eine *BamHI*- und eine *SmaI*-Schnittstelle zur Verfügung stehen. Gemeinsam mit dem *cat*-Gen, das für eine Chloramphenicolresistenzkassette kodiert, sind diese Fusionen von 5'- und 3'-Sequenzen des *amyE*-Gens aus *B. subtilis* flankiert, wodurch sie mittels homologer Rekombination gezielt als Einzelkopie in das chromosomale *amyE*-Gen von *B. subtilis* integriert werden können. Da es sich bei diesen Fusionen um transkriptionelle Fusionen handelt, soll eine Proteinfusion mit *treA* ausgeschlossen werden. Zur Konstruktion einer Operonfusion stehen somit prinzipiell die zwei Leseraster im *treA*-Gen zur Verfügung, die nicht dem für die Translation des *treA*-Gens genutzten Leseraster entsprechen. Der Fusionspunkt, der in den Plasmiden pJS15 (*proH'-treA*)7, pJS16 (*proH'-treA*)1, pJS34 (*proH'-treA*)5, pJS35 (*proH'-treA*)2, pJS36 (*proH'-treA*)6, pJS38 (*proH'-treA*)3 und pJS39 (*proH'-treA*)4 konstruierten *proH'-treA* Reporterfusionen ist so gewählt, dass sie alle in den dritten Leseraster des *treA*-Gens führen, der auf ein Stopcodon läuft. Die Sequenz sämtlicher in pJMB1 inserierter Fragmente wurden mit Hilfe der Oligonukleotide pJMB1 IRD und *treA* IRD (Tab. 4) überprüft, dabei wurde auch der Übergang von dem inserierten Fragment zum *treA* Gen an der *BamHI*-Schnittstelle überprüft.

pJS27: Zur Konstruktion von pJS27 wurde das 884 bp *SmaI*-*BamHI* Fragment aus pJS25 in den mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten Vektor pJMB1 ligiert.

pJS28: Unter Verwendung der Oligonukleotide proHJ5-JS3 und proHJ3-JS6, das eine *Bam*HI-Schnittstelle einführt, wurde ein 492 bp '*rtp proH*' Fragment amplifiziert. Das nach Verdau mit *Sca*I und *Bam*HI entstehende 474 bp-Fragment wurde in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pBKB143 ligiert.

pJS29: Zur Konstruktion von pJS25 wurde das 884 bp *Sma*I-*Bam*HI Fragment aus pJS25 in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pBKB143 ligiert.

pJS34: Zur Konstruktion von pJS34 wurde das 173 bp *Bam*HI-*Sma*I Fragment aus pJS31 in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert.

pJS35: Zur Konstruktion von pJS35 wurde das 153 bp *Bam*HI-*Sma*I Fragment aus pJS32 in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert.

pJS36: Zur Konstruktion von pJS36 wurde das 102 bp *Bam*HI-*Sma*I Fragment aus pJS33 in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert.

pJS38: Unter Verwendung der Oligonukleotide proHJ5-JS16, das eine *Sma*I- und proHJ3-JS6, welches eine *Bam*HI-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 232 bp Fragment der *proHJ* Promotorregion, das stromabwärts bis zum ATG Codon reicht, amplifiziert. Das nach Verdau mit *Sma*I und *Bam*HI entstehende 224 bp-Fragment wurde in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert.

pJS39: Unter Verwendung des Oligonukleotids proHJ5-JS3 und proHJ3-JS18, das eine *Bam*HI-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 432 bp Fragment amplifiziert. Das nach Verdau mit *Sca*I und *Bam*HI entstehende 423 bp-Fragment, das einen 3'-Teil des *rtp*-Gens und einen 173 bp der *proHJ* Promotorregion trägt wurde in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert.

pJS43: Unter Verwendung der Oligonukleotide proI5-JS31, das eine *Sma*I- und proI3-JS25, das eine *Bam*HI-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 525 bp *proI*' Fragment amplifiziert, das nach Verdau mit *Sma*I und *Bam*HI in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert wurde.

pJS44: Zur Konstruktion von pJS44 wurde das 153 bp *Sma*I-*Bam*HI Fragment aus pJS32 in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pBKB143 ligiert.

pJS46: Unter Verwendung der Oligonukleotide proG5-JS52, das eine *Eco*RV- und dppA3-JS53, welches eine *Bam*HI-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 369 bp '*proG dppA*' Fragment amplifiziert, das nach Verdau mit *Eco*RV und *Bam*HI in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert wurde.

pJS52: Unter Verwendung der Oligonukleotide proG5-JS52, das eine *Eco*RV- und dppA3-JS63, welches eine *Bam*HI-Schnittstelle erzeugt, wurde ein 298 bp '*proG dppA*' Fragment amplifiziert, das nach Verdau mit *Eco*RV und *Bam*HI in den mit *Sma*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJMB1 ligiert wurde.

6.1.2 Konstruktion der Plasmide pJS5Mut1, pJS5Mut2 und pJS5Mut3

Die Plasmide pJS5Mut1, pJS5Mut2 und pJS5Mut3 sind Derivate des Plasmides pJS5 (Brill, 1998). Dieses $\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})1$ Plasmid ist ein pJMB1-Derivat und trägt ein mit dem *treA*-Gen fusioniertes 1016 bp '*ykkE proB*' Fragment (*MunI-Sau3AI*), das den *proBA*-Promotor, die gesamte *proBA*-Leaderregion und 576 bp *proB*-kodierender Region umfasst. Unter Verwendung des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits“ (Stratagene) wurden Austausche dreier, in der *proBA*-Spezifizierungsregion lokalisierter CCU-Tripletts (Pro) gegen UUC-Tripletts (Phe) vorgenommen (Tab. 9). Hierbei wurde den Angaben des Herstellers folgend vorgegangen. Das Prinzip dieser ortsgerichteten Mutagenese beruht auf der Verwendung zweier zueinander und zu den beiden Strängen des verwendeten Ausgangsvektors komplementärer, synthetischer Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation tragen. Als Vektor wurde in dieser Arbeit pJS5 verwendet. Für den Austausch des Spezifiziercodons selbst, in pJS5 Mut1 [$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})2$, Tab. 9] wurden proBA5-JS23 und das dazu komplementäre Oligonukleotid proBA3-JS24 verwendet. Für den Austausch des stromabwärts vom Spezifiziercodon lokalisierten CCU-Codons in pJS5Mut2 [$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})3$, Tab. 9] wurden die Oligonukleotide proBA5-JS29 und proBA3-JS30 verwendet. Die zueinander komplementären Oligonukleotide proBA5-JS27 und proBA3-JS28 wurden für den Austausch des stromaufwärts vom Spezifiziercodon lokalisierten CCU-Codons in pJS5Mut3 [$\Phi(\textit{proB}'\textit{-treA})4$, Tab. 9] verwendet. Die genannten Primerkombinationen wurden in eine PCR mit pJS5 als Template eingesetzt. Unter Verwendung der „Pfu Turbo® DNA-Polymerase“ (Stratagene) kommt es zur Verlängerung der Primer, die zu dem jeweils gegenüberliegenden Strängen des Vektors komplementär sind. Die so entstehenden doppelsträngigen Plasmide tragen die Mutation und zudem versetzte Schnitte in den beiden Strängen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit *DpnI* verdaut. Die *DpnI* Endonuklease schneidet spezifisch methylierte DNA und kann somit zum Verdau der parentalen pJS5 Plasmid-DNA benutzt werden. Die verbleibenden Plasmide sind durch PCR hervorgegangen und tragen die gewünschte Mutation. Diese durch PCR generierten Plasmide wurden in kompetente XL1-Blue *E. coli*-Zellen transformiert, wo eine Reparatur der versetzten Schnitte erfolgt und die Plasmide anschließend repliziert wurden. Nach Präparation der auf diese Weise entstandenen Plasmide pJS5Mut1, pJS5Mut2 und pJS5Mut3 wurde die Sequenz der 1016 bp '*ykkE proB*' Fragmente mit Hilfe der Oligonukleotide pJMB1 IRD und *treA* IRD (Tab. 4) überprüft und die eingeführten CCU zu UUC Mutationen nachgewiesen.

6.2 Konstruktion von *B. subtilis*-Stämmen

Mittels der in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Methode kompetent gemachte *B. subtilis*-Zellen sind in der Lage DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Enthält diese DNA Sequenzen, die homolog zum Chromosom sind, so kann es zur Rekombination zwischen der aufgenommenen DNA und dem dazu homologen Bereich im Genom kommen. Handelt es sich bei der aufgenommenen DNA um ein zirkuläres Plasmid, das sich in *B. subtilis* nicht replizieren kann, welches aber chromosomale DNA von *B. subtilis* trägt, so kann das gesamte Plasmid über eine einfache Rekombination in das Genom von *B. subtilis* integrieren („Campbell-Typ-Rekombination“). Die rekombinanten Zellen können über eine auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz selektiert werden (Campbell, 1962;

Niaudet und Ehrlich, 1982). Handelt es sich bei der aufgenommenen DNA um ein linearisiertes Plasmid, so wird durch zweimalige homologe Rekombination der chromosomale Teil zwischen den Rekombinationsstellen gegen das entsprechende, auf dem Plasmid kodierte DNA-Fragment ausgetauscht (Niaudet und Ehrlich, 1982). Es kann auf einen, auf dem integrierten DNA-Fragment gelegenen Resistenzmarker selektiert werden.

6.2.1 Konstruktion und Überprüfung von Unterbrechungs-Mutationen

JSB8 ery: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB8 ery $\Delta(\text{proHJ}::\text{ery})I$ wurde das Plasmid pJS19ery mittels eines *Bam*HI-Verdaus linearisiert und in kompetente JH642-Zellen eingebracht. Es wurde auf erythromycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *ery*-Kassette in das *proHJ*-Operon mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung. Als Sonde diente das 2,64 kb *Acc*65I-*Bam*HI-Fragment aus pJS13, welches das gesamte *proHJ*-Operon und die 3'-Enden der flankierenden Gene enthält.

JSB8 kan: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB8 kan $\Delta(\text{proHJ}::\text{neo})I$ wurde das Plasmid pJS19neo mittels eines *Sal*I-Verdaus linearisiert und in kompetente JH642-Zellen eingebracht. Es wurde auf kanamycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *neo*-Kassette in das *proHJ*-Operon mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung. Als Sonde diente die für JSB8 ery beschriebene *proHJ*-spezifische Sonde.

JSB19: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB19 [*proH* × pJS23 (*erm*)] wurde das zirkuläre Plasmid pJS23 (Brill, 1998) in kompetente JH642-Zellen transformiert und erythromycinresistente Kolonien selektiert. Es kommt durch einfache Rekombination zur Integration des gesamten Plasmids in das Genom von *B. subtilis* JH642 („insertional mutagenesis“). Die Integration erfolgt in das *proH*-Gen und führt zu einer Unterbrechung dieses Gens im Genom von JSB19. Das 427 bp '*proH*'-Fragment liegt nach dem Rekombinationsereignis dupliziert, jeweils an den Enden des integrierten Plasmids, vor. Um zu verhindern, dass das Plasmid das *proH*-Gen, durch ein weiteres einfaches Rekombinationsereignis zwischen diesen '*proH*'-Fragmenten wieder verlässt, wurde JSB19 ausschließlich auf erythromycinhaltigem Medium angezogen. Die korrekte Integration des Plasmides wurde anhand eines Southern-Blots, mit der für JSB19ery beschriebenen Sonde überprüft. Das Plasmid pJS23 ist ein Derivat des Plasmides pMUTIN (Vagner *et al.*, 1998). In JSB19 steht daher das stromabwärts des *proH*-Gens gelegene *proJ*-Gen unter Kontrolle eines auf dem pJS23 Plasmid lokalisierten IPTG-induzierbaren P_{spac}-Promotors. Wie Northern-Blot-Analysen gezeigt haben (Daten nicht gezeigt), wird das *proJ*-Gen in diesem Stamm auch unabhängig von IPTG, konstitutiv exprimiert.

JSB21: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB21 [$\Delta(\text{proI}::\text{spc})I$ (*proH* × pJS23 (*erm*))] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB19 [*proH* × pJS23 (*erm*)] in den Stamm JSB9 [$\Delta(\text{proI}::\text{spc})I$] transformiert und auf erythromycinresistente Kolonien selektiert. Es wurde anschließend geprüft, ob diese zudem eine Spektinomycinresistenz aufweisen.

JSB28: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB28 [*amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})I$ '*ykkE cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*))] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB5 *amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})I$ '*ykkE*

cat] in den Stamm JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] transformiert und auf chloramphenicol- und teracyclinresistente Kolonien selektiert. Um die Integration der *proB-treA*-Fusion in das chromosomale *amyE*-Gen von *B. subtilis* zu überprüfen, wurde zudem der AmyE-Phänotyp mittels des Amylase-Aktivitätstests (Cutting und Vander Horn, 1990) bestimmt.

JSB30: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB30 [*amyE*::[Φ(*proI'*-*treA*)]*I yqjP' cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB10 [*amyE*::[Φ(*proI'*-*treA*)]*I yqjP' cat*] in den Stamm JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] transformiert und auf chloramphenicol- und teracyclinresistente Kolonien selektiert. Um die Integration der *proB-treA*-Fusion in das chromosomale *amyE*-Gen von *B. subtilis* zu überprüfen, wurde zudem der AmyE-Phänotyp mittels des Amylase-Aktivitätstests (Cutting und Vander Horn, 1990) bestimmt.

JSB31: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB31 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*I 'ykkE cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes FSB1 (*treA*::*neo*)]*I* in den Stamm JSB28 [*amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*I 'ykkE cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] transformiert und auf kanamycin- und teracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB33: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB33 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proI'*-*treA*)]*I yqjP' cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes FSB1 (*treA*::*neo*)]*I* in den Stamm JSB30 [*amyE*::[Φ(*proI'*-*treA*)]*I yqjP' cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] transformiert und auf kanamycin- und teracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB34: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB34 [(*treA*::*neo*)]*I proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes FSB1 (*treA*::*neo*)]*I* in den Stamm JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] transformiert und auf kanamycin- und teracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB31Mut1: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB31Mut1 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*2 'ykkE cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] in den Stamm JSB5Mut1 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*2 'ykkE cat*] transformiert und auf teracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB31Mut2: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB31Mut2 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*3 'ykkE cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] in den Stamm JSB5Mut2 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*3 'ykkE cat*] transformiert und auf teracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB31Mut3: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB31Mut3 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*4 'ykkE cat*] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] in den Stamm JSB5Mut3 [(*treA*::*neo*)]*I amyE*::[Φ(*proB'*-*treA*)]*4 'ykkE cat*] transformiert und auf teracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB41: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB41 [Δ(*proHJ*::*tet*)]*I* Δ(*proI*::*spc*)]*I* Δ(*proG*::*ble*)] wurde chromosomale DNA des Stammes BB1951 Δ(*proG*::*ble*) in den Stamm JSB13 [Δ(*proHJ*::*tet*)]*I* Δ(*proI*::*spc*)]*I* transformiert und auf phleomycinresistente Kolonien selektiert.

JSB42: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB42 [$\Delta(abrB::tet)I$] wurde chromosomale DNA des Stammes MBB17 in den *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 transformiert und auf tetracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB44: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB44 [$\Delta(proHJ::ery)I \Delta(opuE::tet)I$] wurde chromosomale DNA des $\Delta(opuE::tet)I$ Stammes BLOB9 in JSB8ery [$\Delta(proHJ::ery)I$] transformiert und auf tetracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB47: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB47 [(*treA::neo*)*I amyE::*[$\Phi(proI'-treA)2 yqjP' cat$] [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde chromosomale DNA des Stammes JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] in den Stamm JSB46 [(*treA::neo*)*I amyE::*[$\Phi(proI'-treA)I yqjP' cat$]] transformiert und tetracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB49: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB49 [$\Delta(dppBC::ery)I$] wurde das Plasmid pJS49 mittels eines *SalI-XhoI* Verdaus linearisiert und in kompetente JH642-Zellen eingebracht. Es wurde auf erythromycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *ery*-Kassette in das *dpp*-Operon mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung. Als Sonde diente das 2672 bp, DIG-markierte PCR-Fragment der Primer *dpp5*-JS48 und *dpp3*-JS49.

JSB50: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB49 [$\Delta(dppBC::ery)I \Delta(proHJ::tet)I$] wurde das Plasmid pJS49 mittels eines *SalI-XhoI* Verdaus linearisiert und in kompetente JSB8-Zellen [$\Delta(proHJ::tet)I$] eingebracht. Es wurde auf erythromycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *ery*-Kassette in das *dpp*-Operon durch eine Southern-Hybridisierung unter Verwendung der für JSB49 beschriebenen *dpp*-spezifischen Sonde.

JSB51: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB51 [$\Delta(dppBC::ery)I \Delta(proBA::cml)I$] wurde das Plasmid pJS49 mittels eines *SalI-XhoI* Verdaus linearisiert und in kompetente JSB11-Zellen [$\Delta(proBA::cml)I$] eingebracht. Es wurde auf erythromycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *ery*-Kassette in das *dpp*-Operon durch eine Southern-Hybridisierung unter Verwendung der für JSB49 beschriebenen *dpp*-spezifischen Sonde.

JSB52: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB52 [$\Delta(proHJ::tet)I amyE::$ [$\Phi(proB'-treA)I 'ykkE cat$]] wurde chromosomale DNA des [$\Delta(proHJ::tet)I$] Stammes JSB8 in kompetente JSB5-Zellen [*amyE::*[$\Phi(proB'-treA)I 'ykkE cat$]] transformiert und auf tetracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB53: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB53 [$\Delta(dppE::spc)I \Delta(proBA::cml)I$] wurde das Plasmid pJS51 mittels eines *NotI-XhoI* Verdaus linearisiert und in kompetente JSB11-Zellen [$\Delta(proBA::cml)I$] eingebracht. Es wurde auf spectinomycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *spc*-Kassette in das *dppE*-Gen durch eine Southern-Hybridisierung unter Verwendung der für JSB49 beschriebenen *dpp*-spezifischen Sonde.

JSB54: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB54 [$\Delta(dppE::spc)I$] wurde das Plasmid pJS51 mittels eines *NotI-XhoI* Verdaus linearisiert und in kompetente JH642-Zellen eingebracht. Es wurde auf spectinomycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die

Insertion der *spc*-Kassette in das *dppE*-Gen durch eine Southern-Hybridisierung unter Verwendung der für JSB49 beschriebenen *dpp*-spezifischen Sonde.

JSB55: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB55 [$\Delta(dppE::spc)l \Delta(proHJ::tet)l$] wurde das Plasmid pJS51 mittels eines *NotI-XhoI* Verdaus linearisiert und in kompetente JSB8-Zellen [$\Delta(proHJ::tet)l$] eingebracht. Es wurde auf spectinomycinresistente Stämme selektiert. Überprüft wurde die Rekombination auf die Insertion der *spc*-Kassette in das *dppE*-Gen durch eine Southern-Hybridisierung unter Verwendung der für JSB49 beschriebenen *dpp*-spezifischen Sonde.

JSB58: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB58 [$\Delta(proHJ::tet)l \Delta(dciAE132::neo)$] wurde chromosomale DNA des [$\Delta(dciAE132::neo)$] Stammes MB307 in kompetente JSB8-Zellen [$\Delta(proHJ::tet)l$] transformiert und auf tetracyclinresistente Kolonien selektiert.

JSB60: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB60 (*codY::erm*) wurde chromosomale DNA des Stammes PS258 in kompetente JH642-Zellen transformiert und auf erythromycinresistente Kolonien selektiert.

JSB61: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB61 [$[oppA \times pJS53 (neo)] \Delta(proHJ::tet)l$] wurde das zirkuläre Plasmid pJS53 in kompetente JSB8-Zellen [$\Delta(proHJ::tet)l$] transformiert und kanamycinresistente Kolonien selektiert. Es kommt durch einfache Rekombination zur Integration des gesamten Plasmids in das Genom von *B. subtilis* JSB8. Die Integration erfolgt in das *oppA*-Gen und führt zu einer Unterbrechung dieses Gens im Genom von JSB61. Das 391 bp '*oppA*'-Fragment liegt nach dem Rekombinationsereignis dupliziert, jeweils an den Enden des integrierten Plasmids, vor. Um zu verhindern, dass das Plasmid das *oppA*-Gen durch ein weiteres, einfaches Rekombinationsereignis zwischen diesen '*oppA*'-Fragmenten wieder verlässt, wurde JSB61 ausschließlich auf kanamycinhaltigem Medium angezogen. Die korrekte Integration des Plasmides wurde anhand eines Southern-Blots überprüft. Als Sonde diente das 3136 bp, DIG-markierte PCR-Fragment der Primer oppA5-JS44 und opp3-JS47.

JSB62: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB62 [$[oppA \times pJS53 (neo)] \Delta(proBA::cml)l$] wurde das zirkuläre Plasmid pJS53 in kompetente JSB11-Zellen [$\Delta(proBA::cml)l$] transformiert und kanamycinresistente Kolonien selektiert. Um zu verhindern, dass das Plasmid das *oppA*-Gen durch ein weiteres einfaches Rekombinationsereignis zwischen diesen '*oppA*'-Fragmenten wieder verlässt, wurde JSB62 ausschließlich auf kanamycinhaltigem Medium angezogen. Die korrekte Integration des Plasmides wurde anhand eines Southern-Blots mit der für JSB61 beschriebenen Sonde überprüft.

JSB63: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB63 [$oppA \times pJS53 (neo)$] wurde das zirkuläre Plasmid pJS53 in kompetente JH642-Zellen transformiert und kanamycinresistente Kolonien selektiert. Es kommt durch einfache Rekombination zur Integration des gesamten Plasmids in das Genom von *B. subtilis* JH642. Um zu verhindern, dass das Plasmid das *oppA*-Gen durch ein weiteres einfaches Rekombinationsereignis zwischen diesen '*oppA*'-Fragmenten wieder verlässt, wurde JSB61 ausschließlich auf kanamycinhaltigem Medium angezogen. Die korrekte Integration des Plasmides wurde anhand eines Southern-Blots, mit der für JSB61 beschriebenen Sonde überprüft.

JSB1951: Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB1951 [$\Delta(\text{proG}::\text{ble})I$] wurde chromosomale DNA des Stammes BB1951 (Belitsky *et al.*, 2001) in kompetente JH642-Zellen transformiert und auf phleomycinresistente Kolonien selektiert.

6.2.2 Konstruktion und Überprüfung von *treA*- und *lacZ*-Fusionsstämmen

Alle zur Konstruktion der *treA*- und *lacZ*-Reporterfusionen genutzten Plasmide sind Derivate der Plasmide pJMB1 (*treA*) oder pBKB143 (*lacZ*) und wurden durch doppelt homologe Rekombination in das chromosomale *amyE*-Gen der *B. subtilis*-Stämme FSB1 (*treA*::*neo*)1 (*treA*-Fusionen) oder JH642 (*lacZ*-Fusionen) integriert. Um die komplette Integration der zirkulären Plasmide über einfache, homologe Rekombination zu unterbinden, wurden diese zuvor durch Schnitte mit Restriktionsendonukleasen in dem nicht zu transformierenden Bereich linearisiert. Die Rekombinationen erfolgten zwischen auf dem Plasmid kodierten 5'- und 3'-Bereichen von *amyE* und ihren Pendants im Chromosom von *B. subtilis*. In den daraus entstehenden Stämmen ist das chromosomale *amyE*-Gen von der jeweiligen Fusion und dem *cat*-Gen unterbrochen, was sich im Verlust der AmyE-Aktivität äußert. Sämtliche Fusionsstämmen wurden daher zunächst als Cm^r selektioniert und anschließend auf den Verlust ihrer AmyE-Aktivität, mittels des Amylase-Aktivitätstests, (siehe Abschnitt 7.3) überprüft. Zur weiteren Kontrolle der Stämme wurde ein Southern-Blot mit einer DIG-markierten, *amyE*-spezifischen Sonde durchgeführt. Die Sonde, ein internes 972 bp Fragment des *amyE*-Gens, wurde unter Verwendung der Primer amyE1 und amyE2 (Tab. 4) mittels PCR konstruiert.

JSB5Mut1: Zur Konstruktion von JSB5Mut1 [(*treA*::*neo*)1 *amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})$ 2 'ykkE cat]] wurde das mit *Xho*I und *Pst*I linearisierte Plasmid pJS5Mut1 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA*::*neo*)1] transformiert.

JSB5Mut2: Zur Konstruktion von JSB5Mut2 [(*treA*::*neo*)1 *amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})$ 3 'ykkE cat]] wurde das mit *Xho*I und *Pst*I linearisierte Plasmid pJS5Mut2 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA*::*neo*)1] transformiert.

JSB5Mut3: Zur Konstruktion von JSB5Mut3 [(*treA*::*neo*)1 *amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})$ 4 'ykkE cat]] wurde das mit *Xho*I und *Pst*I linearisierte Plasmid pJS5Mut3 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA*::*neo*)1] transformiert.

JSB20: Zur Konstruktion von JSB20 [(*treA*::*neo*)1 *amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-treA})$ 5 'ykkE cat]] wurde das mit *Xho*I und *Pst*I linearisierte Plasmid pJS27 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA*::*neo*)1] transformiert.

JSB23: Zur Konstruktion von JSB23 [*amyE*::[$\Phi(\text{proH}'\text{-lacZ})$ 1 'rtp cat]] wurde das mit *Xho*I linearisierte Plasmid pJS28 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 transformiert.

JSB24: Zur Konstruktion von JSB24 [*amyE*::[$\Phi(\text{proB}'\text{-lacZ})$ 1 'ykkE cat]] wurde das mit *Xho*I und *Pst*I linearisierte Plasmid pJS29 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 transformiert.

JSB35: Zur Konstruktion von JSB35 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proH'*-*treA*)5 '*rtp cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS34 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB36: Zur Konstruktion von JSB36 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proH'*-*treA*)2 '*rtp cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS35 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB37: Zur Konstruktion von JSB37 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proH'*-*treA*)6 '*rtp cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS36 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB38: Zur Konstruktion von JSB38 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proH'*-*treA*)3 '*rtp cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS38 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB39: Zur Konstruktion von JSB39 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proH'*-*treA*)4 '*rtp cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS39 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB43: Zur Konstruktion von JSB43 [*amyE::*[Φ (*proH'*-*lacZ*)2 '*cat*]] wurde das mit *XhoI* linearisierte Plasmid pJS44 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 transformiert.

JSB46: Zur Konstruktion von JSB46 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proI'*-*treA*)2 *yqjP'* '*cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS43 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB48: Zur Konstruktion von JSB48 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*dppA'*-*treA*)1 '*proG cat*]] wurde das mit *XhoI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS46 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

JSB56: Zur Konstruktion von JSB56 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*dppA'*-*treA*)2 *yqjP'* '*cat*]] wurde das mit *ClaI* und *PstI* linearisierte Plasmid pJS52 in kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [(*treA::neo*)1] transformiert.

7. Biochemische Methoden

7.1 HPLC-Analyse von Aminosäuren aus *B. subtilis*-Zellextrakten

Bei allen für die HPLC-Analyse verwendeten Chemikalien und Lösungen handelt es sich um chromatographiereine Produkte (HPLC-Gradient oder HPLC-Ultra Grade) der Firmen Roth, Sigma Aldrich, J.T. Baker oder Merck.

7.1.1 Mikroextraktion nach Bligh & Dyer

Die Extraktion der Aminosäuren erfolgte mittels einer nach Bligh & Dyer (Bligh und Dyer, 1959; Kunte *et al.*, 1993) modifizierten Methode zur Extraktion kompatibler Solute. Diese Technik dient

dazu die Membranen ganzer Zellen aufzulösen und die Inhaltsstoffe freizusetzen. Hierzu wurden die jeweiligen *B. subtilis*-Stämme unter den jeweils zu untersuchenden Wachstumsbedingungen in Minimalmedium bis zu einer OD_{578} von circa 2 angezogen. Ein Aliquot von 15 bis 20 ml der Kulturen wurde abzentrifugiert, das Pellet in Ethanol-Trockeneis schockgefroren und anschließend über Nacht gefriergetrocknet (B. Braun Biotech). Die Zelltrockenmasse wurde bestimmt. Sie variierte im Bereich von 6 bis 30 mg. Die getrockneten Zellen wurden anschließend in 500 μ l Bligh & Dyer Extraktionslösung [Methanol/Chloroform/Wasser 10:5:4 (v/v/v)] für 15 Minuten im Ultraschallbad und anschließend für 1 Stunde auf dem Eppendorf-Thermoschüttler (maximale Einstellung) homogenisiert. Danach wurden 130 μ l Chloroform und 130 μ l H_2O zugegeben, für weitere 30 Minuten geschüttelt und anschließend für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Methanol/Wasser-Phase (450 μ l) wurde abgenommen und bei 55°C über Nacht eingetrocknet. Das Pellet wurde in 100 μ l Wasser und 400 μ l Acetonitril aufgenommen und wenn nötig zu einer geeigneten Konzentration in 0,5 M Na-Boratpuffer (pH 7,7) verdünnt.

7.1.2 Vorsäulenderivatisierung mit FMOC/ADAM

Die Proben und Standardlösungen (L-Prolin- und L-Glutamat-Standards von 10 bis 250 μ M) wurden entsprechend einer geringfügig modifizierten Vorsäulenderivatisierungs-Methode (Grom, Applikations-Service) unter Verwendung von 9-Fluorenyloxycarbonylchlorid (FMOC, Grom) und 1-Aminoadamantan (ADAM, Grom) umgesetzt. FMOC reagiert schnell, sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminosäuren und bildet intensiv fluoreszierende, bei Raumtemperatur über 30 Stunden stabile Derivate. Das FMOC-Reagenz wird im Überschuss zugesetzt, um bei der Derivatisierung eine quantitative Umsetzung der Aminosäuren zu erzielen. Da jedoch FMOC selbst und der aus ihm durch Hydrolyse und Decarboxylierung entstehenden Fluorenylalkohol (FMOC-OH), die gleichen spektroskopischen Eigenschaften haben wie die Aminosäurederivate, muss dieser Überschuss entfernt werden. Daher wird das überschüssige FMOC in einem zweiten Schritt durch Zugabe von ADAM umgesetzt. Dieses Amin ist hydrophober als die zu bestimmenden Aminosäuren, weshalb es als FMOC-Derivat am Ende des Chromatogramms eluiert wird.

Für die Derivatisierung der Proben und Standards wurde folgender Ansatz genutzt: Zu 40 μ l 0,5 M Na-Boratpuffer (pH 7,7) mit 50 μ M Taurin als internem Standard, wurden 40 μ l Probe oder Standardlösung und 80 μ l FMOC-Reagenz II (Grom) zugesetzt. Der Ansatz wurde 45 Sekunden intensiv gemischt und das überschüssige FMOC durch die Zugabe von 100 μ l ADAM-Lösung [40 mM ADAM in Aceton/ H_2O 1:1 (v/v)] umgesetzt. Nach 45 Sekunden intensiven Mischens wurde das Reaktionsgemisch mit 140 μ l Eluent A [20 % Acetonitril und 0,5 % Tetrahydrofuran (THF) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,2)] verdünnt.

7.1.3 HPLC-Analyse

Mit Hilfe eines Autosamplers wurden 10 μ l des mit Puffer A verdünnten Reaktionsgemisches auf die HPLC-Säule aufgetragen. Als Trennsäule wurde eine LiChroCart Kartusche (Grom) von 125 mm Länge und 4 mm Durchmesser verwendet, die mit Supersphere 60 RP-8 (Merck) Säulenmaterial, mit einem Partikeldurchmesser von 4 μ m gepackt war. Als Vorsäule diente eine 10

× 4 mm Säule gleichen Säulenmaterials (Merck). Das in dieser Arbeit verwendete Chromatographiesystem war von der Firma Sykam und bestand aus Autosampler (S5200), Säulenofen (S4011), Pumpensystem (S1121), „Low pressure gradient“-Mixer (S8111) und Vakuumentgaser (S7505). Das für die Auftrennung der Aminosäurederivate genutzte Lösungsmittelsystem bestand aus Puffer A und Puffer B [80 % Acetonitril in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,2)]. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 1,25 ml min⁻¹ und 45°C, unter Verwendung des in Tabelle 7 dargestellten Gradienten. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm und einer Emission von 316 nm mit einem Fluoreszenz-Detektor (Sykam, Modell S3400). Aufzeichnung und Integration der Detektorsignale, das Identifizieren der chromatographischen Peaks und die quantitative Berechnung erfolgten mit Hilfe der Analyse-Software von Sykam (Pyramid 2000, Sykam Chromatographie). Die Standards für Retentionszeiten und Quantifizierung wurden mit Reinsubstanzen von Prolin und Glutamat ermittelt. Für die Auswertung einer aus circa 20 Proben bestehende Messreihe, wurden mindestens 8 verschiedene, bekannte Prolin- und Glutamat-Konzentrationen zur Kalibrierung verwendet.

Tab. 7 Gradient für die Auftrennung FMOC-derivatisierter Aminosäuren

Zeit (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	100	0
15	91	9
30	70	30
40	40	60
42	0	100
47	0	100
49	100	0
55	100	0

7.2 TreA-Aktivitätsbestimmung

Die *proH-treA*-Fusionsstämme erlauben eine Charakterisierung der Regulation der Expression des *proHJ*-Operons in Abhängigkeit der Osmolarität des umgebenden Mediums. Das für diese Untersuchungen verwendete Reporterger *treA* kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glukosidase (TreA) von *B. subtilis* (Gotsche und Dahl, 1995; Schöck *et al.*, 1996). Es wurden zwei Typen von Experimenten mit den *proH-treA*-Fusionsstämmen durchgeführt: Osmotische „up-shock“-Experimente und Langzeitexperimente.

Für ein „up-shock“-Experiment wurden 75 ml SMM-Medium mit einer Vorkultur des jeweiligen *B. subtilis treA*-Fusionsstammes auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft und bei 37°C und 220 rpm in einem Wasserbad bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot (1,6 ml) der Kultur entnommen. Unmittelbar nach der Probenentnahme wurde die Osmolarität der Kultur plötzlich erhöht. Dies erfolgte durch die sterile Zugabe von 0,4 M NaCl,

0,62 M Saccharose oder 0,68 M Glycerin aus in SMM vorliegenden, auf 37°C vorgewärmten Stammlösungen. Es wurden nun alle 15 bzw. 30 Minuten Proben für die TreA-Aktivitätsbestimmung entnommen und die OD₅₇₈ zu dem jeweiligen Zeitpunkt bestimmt.

Um langfristige Einflüsse der Osmolarität auf die Expression des Reportergens *treA* unter Kontrolle verschiedener Abschnitte der *proHJ*-Promotorregion zu ermitteln, wurden die jeweiligen *proH-treA*-Fusionsstämme in SMM mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,8) gezogen und Proben für die TreA-Aktivitätsbestimmung entnommen. Hierbei wurde stets aus Vorkulturen der entsprechenden Osmolaritäten beimpft.

Zudem wurden mit den *proB-treA*-Fusionsstämmen sogenannte Hungerexperimente durchgeführt. Dazu wurden Kulturen dieser Stämme in Minimalmedium (SMM) mit einer ausreichenden Menge der zu testenden Aminosäure vorgezogen und anschließend mit SMM-Medium ohne Aminosäuresupplementation einmal gewaschen. Aus diesen „aminosäurefreien“ Kulturen wurde dann die zu testende Kultur angeimpft und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für die TreA-Aktivitätsbestimmung gezogen.

Für den Enzymtest wurden aus den Kulturen Aliquots von 1,6 ml entnommen und die OD₅₇₈ zu diesem Zeitpunkt bestimmt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation für 2 min in einer Eppendorf Mikrozentrifuge bei 14000 rpm geerntet. Das Pellet wurde in 250 µl Z-Puffer (Gotsche und Dahl, 1995; Helfert *et al.*, 1995) [100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,0); 1 mM KCl, 1 mM MgSO₄] mit 1 mg ml⁻¹ Lysozym resuspendiert und für 5 min bei 37°C unter Schütteln auf einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 2 min entfernt und 200 µl des klaren Überstandes wurden in die TreA-Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Zu den 200 µl Überstand wurden 600 µl Z-Puffer (pH 6,0) gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl einer *para*-Nitrophenyl- α -D-Glukopyranosid-Lösung [4 mg ml⁻¹ α -PNPG (Sigma) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5)] gestartet. Nach Inkubation bei 28°C im Wasserbad bis zur Gelbfärbung, jedoch höchstens für 2 Stunden wurde die Enzymreaktionen durch Zugabe von 500 µl einer 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt und die Reaktionsdauer notiert. Unverzöglich wurde die Extinktion bei 420 nm gegen einen Blindwert ohne Zellextrakt bestimmt. Die TreA-Aktivität ist in Units pro mg Zellprotein angegeben (Gotsche und Dahl, 1996; Helfert *et al.*, 1995) und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{1500}{V \times T \times P} \times OD_{420}$$

Hiebei ist V das in die Reaktion eingesetzte Volumen in ml, T die Reaktionszeit in Minuten und P die Proteinkonzentration des Zellextraktes in mg ml⁻¹. Bei dieser Berechnung wird davon ausgegangen, dass eine OD₅₇₈ von 1 einer Proteinkonzentration von 100 µg ml⁻¹ entspricht.

7.3 Test auf AmyE-Aktivität

Um die Integration der *treA*-Reportergenfusionen in das chromosomale *amyE*-Gen von *B. subtilis* zu überprüfen, wurde der AmyE-Phänotyp mittels eines Amylase-Aktivitätstests (Cutting und Vander Horn, 1990) bestimmt. Dazu wurden *B. subtilis*-Zellen auf Agarplatten mit 1 %

Kartoffelstärke ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Kolonien von der Platte gespült und die Platte wurde für einige Minuten mit Grams Jodlösung [0,5 % (w/v) Jod, 1 % (w/v) Kaliumiodid in H₂O] überschichtet. AmyE⁺-Stämme, die in der Lage sind Amylase in das Medium zu sezernieren, verstoffwechseln die in den Agarplatten enthaltene Stärke und zeichnen sich durch das Vorhandensein eines hellen, stärkefreien Hofes aus. AmyE⁻-Stämme mit unterbrochenem *amyE*-Gen zeigen dagegen keinen weißen Hof.

IV. ERGEBNISSE

1. Molekulare und physiologische Charakterisierung der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese in *B. subtilis*

1.1 Veränderung des intrazellulären Glutamat- und Prolinpools in Abhängigkeit von der externen Osmolarität

Die Aminosäure Prolin ist die einzige unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen von *B. subtilis* *de novo* akkumulierte osmotische Schutzsubstanz (Whatmore *et al.*, 1990). Whatmore *et al.* (1990) haben zudem gezeigt, dass bei einer Wachstumstemperatur von 25°C der intrazelluläre Prolinspiegel von *B. subtilis*, innerhalb von sieben Stunden nach einem moderaten osmotischen Schock mit 0,4 M NaCl, von einem Basalniveau von 16 mM auf 705 mM Prolin ansteigt und damit zu diesem Zeitpunkt 80 % der freien Aminosäuren in der Zelle ausmacht. Bedingt durch diese massive Prolinakkumulation, steigt der Gesamtaminosäurepool im selben Zeitraum von 138 mM auf 893 mM an. Glutamat dagegen liegt in nicht gestressten Zellen in einer Konzentration von 103 mM vor und macht 75 % des Gesamtaminosäurepools aus. Sieben Stunden nach einem osmotischen Schock mit 0,4 M NaCl bleibt der Glutamatlevel mit einer Konzentration von 167 mM relativ konstant und bildet an dem erhöhten Pool freier Aminosäuren nur noch einen Anteil von 19 % (Whatmore *et al.*, 1990).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Korrelation zwischen der externen Salinität und der intrazellulären Prolin- und Glutamatkonzentration von kontinuierlich in Minimalmedium unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen wachsenden *B. subtilis*-Zellen genauer quantifiziert. Hierzu wurden Kulturen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 in Minimalmedium (75 ml SMM), dessen Osmolarität durch die Zugabe von NaCl mit einer Endkonzentration im Bereich von 0 M bis 1 M NaCl variiert wurde, auf eine optischen Dichte (OD₅₇₈) von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 2 inkubiert. Der intrazelluläre Prolin- und Glutamatgehalt wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt (Abb. 1). Es konnte gezeigt werden, dass die Prolinkonzentration im Zellinnern ab einer externen NaCl-Konzentration von 0,2 M NaCl proportional zur Osmolarität des umgebenden Mediums ansteigt. *B. subtilis* ist somit offensichtlich in der Lage seinen intrazellulären Prolinpool sensitiv den osmotischen Bedingungen in seiner Umgebung anzupassen. In SMM mit einer Grundosmolarität von 340 mOsmol (kg H₂O)⁻¹ gewachsene Zellen weisen einen Basallevel von 3,4 µmol Prolin pro mg Zelltrockenmasse auf. In SMM mit 1 M NaCl gewachsene *B. subtilis*-Zellen dagegen, haben einen circa 100-fach erhöhten intrazellulären Prolinspiegel von 364,3 µmol Prolin pro mg Zelltrockenmasse (Abb. 5). Betrachtet man im Vergleich dazu die Veränderung des Glutamatspiegels in diesen Zellen, so zeigt sich dass dieser mit steigender Osmolarität des umgebenden Mediums und mit zunehmender Prolinakkumulation signifikant abnimmt (Abb. 5). Offensichtlich bedingt die unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen verstärkte Prolinbiosynthese, die von Glutamat als Substrat ausgeht, eine Transformation des unter Normalbedingungen in *B. subtilis* dominanten Glutamatpools, in einen unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen dominanten Prolinpool.

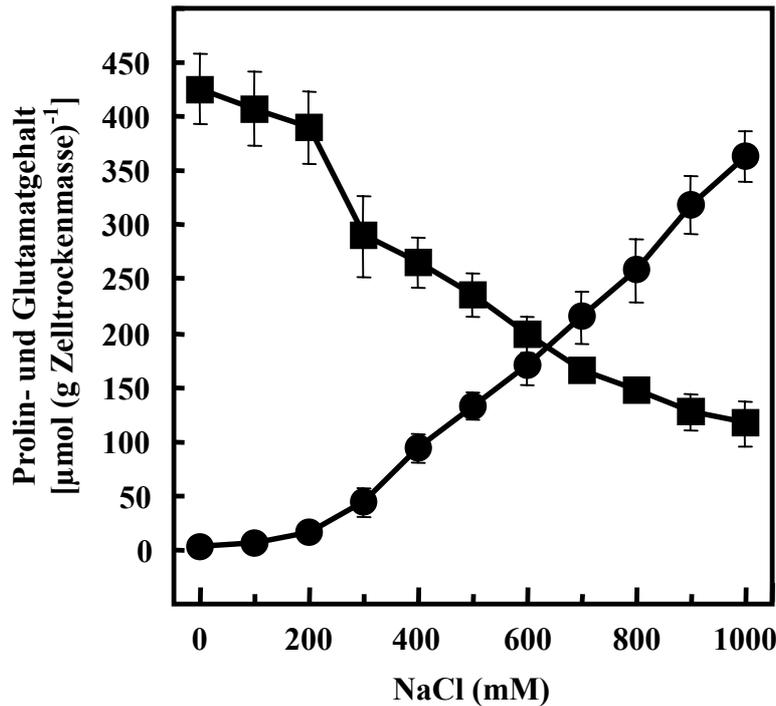


Abb. 5 Prolin- und Glutamatgehalt osmotisch gestresster *B. subtilis*-Zellen

Kulturen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 2 in Minimalmedium (SMM) gezogen, dessen Osmolarität durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen NaCl erhöht wurde. Die Bestimmung des Prolin- (●) und des Glutamatgehaltes (■) erfolgte mittels HPLC-Analyse. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängig voneinander gewachsenen Kulturen. Für jede Probe wurden der Prolin- und Glutamatgehalt jeweils doppelt bestimmt.

1.2 Die *de novo* Prolinakkumulation in *B. subtilis* unterliegt einem osmotischen Stimulus

In dem zuvor dargestellten Versuch wurde die Erhöhung der Osmolarität im Wachstumsmedium durch Zugabe entsprechender Mengen an NaCl simuliert. Wichtig in diesem Zusammenhang ist es jedoch zu überprüfen, ob die auf diese Weise stimulierte Prolinakkumulation mittels *de novo* Synthese wirklich auf einen osmotischen Effekt zurückzuführen ist, oder lediglich durch die Anwesenheit des ionischen Osmolytes NaCl im Medium induziert wird. Hierzu wurde der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 in SMM [$340 \text{ mosmol (kg H}_2\text{O)}^{-1}$], dessen Osmolarität durch die Zugabe von entweder Salzen (NaCl und KCl) oder nichtionischen Osmolyten wie Zuckern (Saccharose und Laktose) oder Glycerin auf $1100 \text{ mOsmol (kg H}_2\text{O)}^{-1}$ erhöht wurde, bis zum Erreichen einer OD_{578} von 2 angezogen und die intrazelluläre Prolinkonzentration mittels HPLC-Analyse bestimmt (Tab. 8). Die Kulturen, die bei äquivalent osmolaren Konzentrationen von entweder Salzen oder Zuckern gewachsen sind, zeigen im Gegensatz zu den in Abwesenheit zusätzlicher Osmolyte gewachsenen Kulturen eine starke Stimulation (etwa 35-fach) der Prolinbiosynthese (Tab. 8). Die Anwesenheit von Glycerin hingegen, welches aufgrund seiner geringen molekularen Masse und seiner Ladungsverteilung auch in hoher Konzentration die Zytoplasmamembran noch frei passieren kann und somit nicht in der Lage ist einen osmotisch effektiven Gradienten aufzubauen (Bovell *et al.*, 1963), führte nicht zu einer verstärkten

Prolinbiosynthese (Tab. 8). Die Stimulation der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* reflektiert somit einen echten osmotischen Effekt.

Es wurde zudem getestet, ob die exogene Zugabe eines kompatiblen Solutes wie Glycinbetain die Prolinakkumulation unter hochosmolaren Bedingungen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die *de novo* Synthese von Prolin in *B. subtilis* durch die Anwesenheit von 1 mM Glycinbetain im Medium vollständig reprimiert wird (Tab. 8), was den Schluss nahe legt, dass unter den getesteten Bedingungen die Aufnahme einer potenten osmotischen Schutzsubstanz gegenüber der Prolinbiosynthese bevorzugt ist.

Tab. 8 Osmotisch induzierte Prolinbiosynthese in *B. subtilis*

Medium ^a	Osmolarität [mOsmol (kg H ₂ O) ⁻¹]	Prolin ^b [μmol (g Zelltrockenmasse) ⁻¹]
SMM	340	3
SMM mit 0,4 M NaCl	1100	107 ± 12
SMM mit 0,62 M Saccharose	1100	116 ± 19
SMM mit 0,61 M Laktose	1100	111 ± 13
SMM mit 0,4 M KCl	1100	126 ± 16
SMM mit 0,68 M Glycerin	1100	3
SMM mit 0,4 M NaCl und 1 mM Glycinbetain	1100	4

^aKulturen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 wurden in Minimalmedium (SMM) in Ab- oder Anwesenheit verschiedener ionischer oder nicht-ionischer Osmolyte bis zu einer OD₅₇₈ von 2 gezogen. Die Zellen wurden anschließend extrahiert und der intrazelluläre Prolingehalt mittels HPLC-Analyse bestimmt. ^bDie gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung dreier unabhängig voneinander gewachsener Kulturen. Die Prolinkonzentration jeder Probe wurde doppelt bestimmt.

1.3 Die Expression des *proHJ*-Operons und des *proA*-Gens sind essentiell für die Prolinakkumulation unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen

Der Befund, dass sich der intrazelluläre Prolingehalt von osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen proportional zur Osmolarität des Mediums verhält, legt die Frage nach den Enzymen, die für dieses Phänomen verantwortlich sind nahe. Im Genom von *B. subtilis* konnten im Rahmen des Genomprojektes (Kunst *et al.*, 1997) offene Leseraster identifiziert werden, deren abgeleitete Proteinsequenzen signifikante Homologien zu den drei Prolinbiosyntheseenzymen aus *E. coli* ProB, ProA und ProC (ProG und ProI in *B. subtilis*) aufweisen (Belitsky *et al.*, 2001). Zusätzlich hierzu kodiert in *B. subtilis* das *proHJ* Operon (GenBank Accession-Nummer: AF006720) für Isoenzyme der von *proB* kodierten γ -Glutamyl-Kinase (ProJ) und der von *proI* und *proG* kodierten Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen (ProH). ProB und ProJ von *B. subtilis* weisen eine Sequenzidentität von 43 % zueinander auf. Ein ähnlich hoher Level an Sequenzidentität besteht zwischen ProH und ProI (42 %), während ProH zu ProG nur eine Sequenzidentität von 24 % aufweist.

Um die Gene, die für die osmotisch regulierte Prolinbiosynthese verantwortlich sind zu identifizieren, wurden Mutanten in den verschiedenen *pro*-Genorten konstruiert. Diese Mutanten wurden anschließend auf Minimalmediumagarplatten bezüglich ihres Pro-Phänotyps getestet. Es wurde zudem mittels HPLC-Analyse ihre Fähigkeit zur *de novo* Prolinbiosynthese unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen untersucht (Abb. 6).

1.3.1 Das *proHJ*-Operon: Konstruktion und Analyse chromosomaler *proHJ*-Deletionen in *B. subtilis*

Zur Konstruktion einer chromosomalen *proHJ*-Mutante wurde ein Plasmid konstruiert, in dem ein interner Teil des *proHJ*-Operons durch ein Tetracyclinresistenzgen ersetzt wurde. Dieses defekte *proHJ*-Operon [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})\textit{I}$] wurde dann mittels eines Doppelrekombinationsereignisses gegen das intakte *proHJ*-Operon auf dem Chromosom des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 ersetzt (Abb. 6A). Im Stamm JSB15 [$\Delta(\textit{proJ}::\textit{neo})\textit{I}$] wurde auf die oben beschriebene Weise ein interner Teil des *proJ*-Gens durch ein Kanamycinresistenzgen ersetzt (Abb. 6A). Der *B. subtilis*-Stamm JSB19 [*proH* × pJS23] trägt ein mittels einfach homologer Rekombination in das *proH*-Gen inseriertes Plasmid (pJS23) (Abb. 6A). Die Transkription des *proJ*-Gens in JSB19 steht unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren P_{spac}-Promotors. Northern-Blot-Analysen mit einer *proJ*-spezifischen RNA-Sonde haben jedoch gezeigt, dass *proJ* in diesem Stamm konstitutiv exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

Die Deletion des *proHJ*-Operons in dem *B. subtilis*-Stamm JSB8, oder die Unterbrechung des *proH*-Gens in JSB19 und des *proJ*-Gens in JSB15 allein führte zu keinem generellen Wachstumsdefekt auf definierten Minimalmediumagarplatten ohne Prolin und somit nicht zu einem prolinauxotrophen Phänotyp (Abb. 6A). Das bedeutet, dass weder ProH noch ProJ in die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke involviert sein können. Jedoch ist keiner dieser Stämme in der Lage die osmotische Schutzsubstanz Prolin unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen *de novo* zu synthetisieren (Abb. 6A). Das *proHJ*-Operon ist somit essentiell für die massive Prolinakkumulation unter hochosmolaren Stressbedingungen, es ist jedoch nicht für die anabole Synthese dieser Aminosäure erforderlich.

1.3.2 Das *proBA*-Operon: Konstruktion und Analyse chromosomaler *proBA*-Deletionen in *B. subtilis*

In dem *B. subtilis*-Stamm JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})\textit{I}$] wurde ein internes *proBA*-Fragment gegen ein Chloramphenicolresistenzgen ausgetauscht. In JSB17 [*proA* × pEPV1T (*tet*)] wurde das Plasmid pEPV1T durch ein Campbell-Typ einfach Rekombinationsereignis in das *proA*-Gen von *B. subtilis* inseriert. Da durch eine erneute einfache Rekombination das inserierte Plasmid das *proA*-Gen wieder verlassen könnte, wurde den Kulturen dieses Stammes immer Tetracyclin zugesetzt und somit ein dauerhafter Selektionsdruck auf das inserierte Plasmid ausgeübt. Sowohl die Deletion des *proBA*-Operons, als auch die Unterbrechung des *proA*-Gens allein, bedingt einen deutlichen prolinauxotrophen Phänotyp (Abb. 6B) der resultierenden *B. subtilis*-Stämme JSB11 und JSB17.

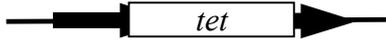
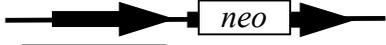
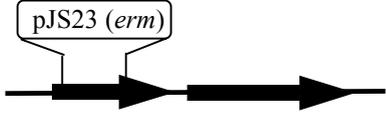
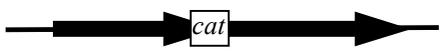
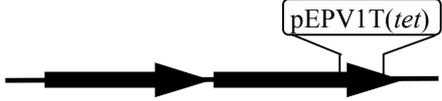
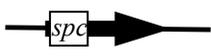
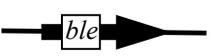
Stamm		Wachstum auf SMM-Agarplatten ohne Prolin	Prolingehalt [μmol (g Zelltrockenmasse) $^{-1}$] in SMM-Medium mit 0,4 M NaCl gewachsener Zellen
A			
JH642		+	107 ± 12
JSB8 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})\text{I}$]		+	8
JSB15 [$\Delta(\text{proJ}::\text{neo})\text{I}$]		+	5
JSB19 [<i>proH</i> x pJS23]		+	6
B			
JH642		+	104 ± 11
JSB11 [$\Delta(\text{proBA}::\text{cat})\text{I}$]		-	2
JSB16 [$(\text{proB}::\text{neo})\text{I}$]		+/-	101 ± 19
JSB17 [<i>proA</i> x pEPV1T]		-	2
C			
JH642		+	107 ± 12
JSB9 [$\Delta(\text{proI}::\text{spc})\text{I}$]		+	116 ± 15
D			
JH642		+	107 ± 12
JSB1951 [$\Delta(\text{proG}::\text{ble})\text{I}$]		+	125 ± 18

Abb. 6 Der Einfluss von Mutationen im *proHJ*-, *proBA*-, *proI*- oder *proG*-Genort auf das Wachstum und die intrazelluläre Prolinakkumulation

Auf der linken Seite der Abbildung ist die genetische Organisation der (A) *proHJ*-, (B) *proBA*-, (C) *proI*- und (D) *proG*-Region im *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und den jeweiligen Mutantenstämmen dargestellt. Die *cat*, *neo*, *tet*, *spc* und *ble* Antibiotika-Resistenzgene und die inserierten Plasmide pJS23 und pEPV1T sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. In dem *B. subtilis*-Stamm JSB19 ist die *proJ*-Expression unter Kontrolle des P_{spac} Promotors, der auf dem Plasmid pJS23 lokalisiert ist, welches durch ein Campbell-Typ Rekombinationsereignis in *proH* inseriert wurde. Das Wachstum der Stämme auf Minimalmediumagarplatten (SMM) ohne Prolin wurde nach zweitägiger Inkubation der Platten bei 37°C bestimmt (gutes Wachstum: +; kein Wachstum: -; schwaches Wachstum +/-). Der intrazelluläre Prolingehalt [$\mu\text{mol (g Zelltrockenmasse)}^{-1}$] von in SMM mit 0,4 M NaCl gewachsenen Zellen der aufgeführten Stämme wurde mit Hilfe von HPLC-Analysen bestimmt. Hierfür wurden Kulturen der unter (A), (C) und (D) aufgelisteten Stämme bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 2 geerntet, während die unter (B) genannten Stämme bereits bei einer OD von 1 geerntet wurden. Die *B. subtilis*-Stämme JSB11 und JSB17 sind prolinauxotroph, sie wurden daher in SMM mit 0,4 M NaCl, dem 0,4 mM Prolin zugefügt wurde kultiviert. In dieser geringen Konzentration übt Prolin keinen signifikanten osmoprotektiven Effekt auf das Zellwachstum aus (Daten nicht gezeigt). Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängig voneinander gewachsenen Kulturen, wobei die Prolinkonzentration jeder Probe zudem doppelt bestimmt wurde.

In einem weiteren Experiment wurde die Fähigkeit dieser Stämme zur Prolinakkumulation unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen getestet. Um ein Wachstum der Stämme in Minimalmedium zu erlauben, wurde die Prolinauxotrophie durch die Zugabe von 0,4 mM Prolin kompensiert, was jedoch nicht ausreichend für eine Prolinakkumulation in osmoprotektiv relevanten Mengen ist, sondern lediglich den Bedarf an Prolin für anabole Zwecke decken kann. Die HPLC-Analyse der Zellextrakte in Minimalmedium mit 0,4 M NaCl gewachsener Kulturen von JSB11 und JSB17 zeigte jedoch, dass beide Stämme nicht in der Lage waren Prolin mittels de novo Synthese zu akkumulieren (Abb. 6B). Diese Ergebnisse belegen, dass die von *proA* kodierte γ -Glutamyl-phosphat-Reduktase sowohl für die anabole, als auch für die osmoregulatorische Prolinbiosynthese essentiell ist.

Der aus der Insertion eines Kanamycinresistenzgens in *proB* hervorgehende *B. subtilis*-Stamm JSB16 [*(proB::neo)I*] zeigt auf Minimalmediumagarplatten ein gegenüber dem Wildtyp vermindertes, aber deutliches Wachstum (Abb. 6B). Da der *proBA*-Genort als Operon organisiert ist (siehe unten), muss davon ausgegangen werden, dass die in *proB* inserierte Kanamycinresistenzkassette einen ungenügend polaren Effekt auf die Transkription des *proA*-Gens ausübt, oder aber die Expression von *proA* von einer innerhalb des Kanamycinresistenzgens lokalisierten Transkriptionsinitiationsstelle aus erlaubt. Die Zugabe von Salz (0,4 M NaCl) verbessert das Wachstum von JSB16 in SMM deutlich und führt zu einer mit dem Wildtyp vergleichbar hohen, osmoregulatorischen Akkumulation von Prolin (Abb. 6B). Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass die von *proJ* kodierte γ -Glutamyl-Kinase die Funktion des von *proB* kodierten Enzyms zum Teil kompensiert. Hierfür spricht zudem, dass der *B. subtilis*-Stamm JSB18, der eine Kombination aus der [*(proB::neo)I*] Mutation und dem [Δ (*proHJ::tet*)I] Allel trägt, einen prolinauxotrophen Phänotyp aufweist und nicht in der Lage ist Prolin unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen zu akkumulieren (Daten nicht gezeigt).

1.3.3 Konstruktion und Analyse chromosomaler *proI*- und *proG*-Deletionen in *B. subtilis*

In dem *B. subtilis*-Stamm JSB9 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})I$] ist ein internes Fragment des *proI*-Gens gegen ein Spektinomycinresistenzgen ausgetauscht (Abb. 6C). Zur Konstruktion des Stammes JSB1951 [$\Delta(\textit{proG}::\textit{ble})I$] wurde ein Teil des *proG*-Gens durch eine Phleomycinresistenzkassette ersetzt (Abb. 6D). Die Zerstörung eines der beiden Gene *proI* in JSB9 oder *proG* in JSB1951, bedingt weder einen prolinauxotrophen Phänotyp, noch beeinflusst sie die Fähigkeit Prolin unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen *de novo* zu synthetisieren (Abb. 6C und 6D). Auch Stamm BB1969, der eine Mutation in beiden Genen (*proG* und *proI*) trägt, zeigt keinen Defekt in dem dritten Schritt der anabolen Prolinbiosynthese (Belitsky *et al.* 2001), sowie auch die parallele Mutation in *proH* und *proI* in den *B. subtilis*-Stämmen JSB13 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})I \Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})I$] und JSB21 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})I \textit{proH} \times \textit{pJS23} (\textit{erm})$] die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Die Expression von *proI* und von *proG* ist somit für keinen der beiden Prolinbiosynthesewege essentiell. Erst der simultane Defekt in drei der vier Gene, die für Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen in *B. subtilis* kodieren, führt zu einem prolinauxotrophen Phänotyp des resultierenden Stammes JSB41 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})I \Delta(\textit{proG}::\textit{ble})I \Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})I$] (Belitsky *et al.* 2001).

1.3.4 *B. subtilis* besitzt zwei Prolinbiosynthesewege, die durch ProA miteinander verbunden sind

Zusammenfassend kann man auf Grund der bisher gezeigten Daten sagen, dass *proJ*, *proA* und *proH* für Enzyme kodieren, die für die unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen massive Prolinbiosynthese in *B. subtilis* von zentraler Bedeutung sind (Abb. 7). Die Isoenzyme ProH und ProJ ersetzen unter hochosmolaren Bedingungen die unter Normalbedingungen operierenden ProB- und ProG/ProI-Proteine des anabolen Weges. Der osmotisch gesteuerte Weg rekrutiert zudem das ProA-Enzym aus dem anabolen Weg. Die Enzyme ProJ, ProA und ProH bilden damit einen neuen Prolinbiosyntheseweg, der sich von dem für anabole Zwecke genutzten Syntheseweg unterscheidet. Diese Synthesewege sind jedoch nicht autark, sondern durch die γ -Glutamyl-phosphat-Reduktase ProA, die den zweiten Schritt der Umsetzung von Glutamat zu Prolin in beiden Wegen katalysiert, miteinander verbunden (Abb. 7).

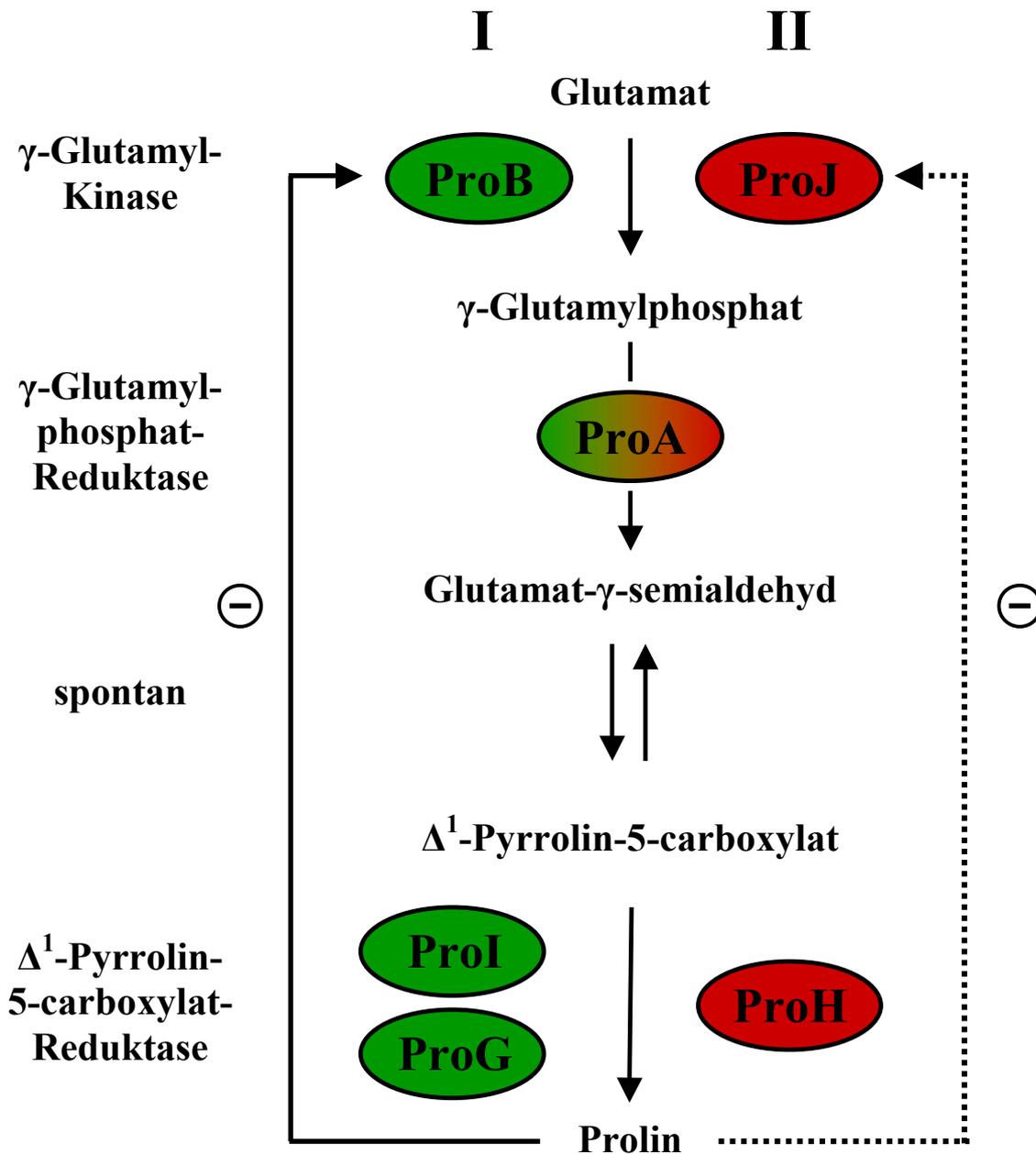


Abb. 7 Anaboler (I) und osmoregulatorischer (II) Prolinbiosyntheseweg in *B. subtilis*

1.4 Phänotypische Charakterisierung der *proHJ*-Mutante JSB8

Um die Rolle des *proHJ*-Operons für die osmotische Stressantwort von *B. subtilis* näher zu charakterisieren, wurden Wachstumsexperimente mit dem Wildtyp-Stamm JH642 und seinem $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$ Derivat JSB8 durchgeführt. Hierzu wurden 75 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft, bei 37°C aerob inkubiert und die Entwicklung der OD_{578} der Kulturen für 18 Stunden registriert. Die Deletion des *proHJ*-Operons in JSB8 führt zu keinem generellen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp (Abb. 8A). Die beiden Stämme weisen in Minimalmedium (SMM) ohne

erhöhte Osmolarität nahezu identische Wachstumskurven auf (Abb. 8A). In SMM, dessen Osmolarität durch die Zugabe von 1,2 M NaCl deutlich erhöht wurde, zeigt der Stamm JSB8 (*proHJ*) jedoch ein, im Vergleich zum Wildtyp, signifikant beeinträchtigtes Wachstum (Abb. 8A). Die Verdopplungszeit (t_d) von JSB8 in SMM mit 1,2 M NaCl beträgt 9,2 Stunden, die von JH642 unter den gleichen Bedingungen nur 4,7 Stunden (Abb. 8A). Der für beide Stämme in unterschiedlichem Maße inhibitorische Effekt der erhöhten Osmolarität kann durch die Anwesenheit von 1 mM Glycinbetain im Medium fast vollständig kompensiert werden, so dass beide Stämme eine Verdopplungszeit (t_d) von 1,9 h aufweisen. Die Tatsache, dass der stark inhibitorische Effekt erhöhter Osmolarität auf das Wachstumsvermögen von JSB8 durch die Zugabe einer osmotischen Schutzsubstanz vollständig aufgehoben werden kann, legt den Schluss nahe, dass das beobachtete Wachstumsdefizit durch einen Mangel an osmoprotektiven Verbindungen verursacht wird. Die Aufhebung des Wachstumsphänotyps von JSB8 durch die Zugabe von Glycinbetain zeigt zudem, dass die Mutante nicht per se NaCl-sensitiv ist, sondern in ihrem Wachstum auf Grund der fehlenden osmotischen Schutzsubstanz beeinträchtigt ist.

Um nun den Bereich erhöhter Osmolarität näher zu bestimmen in dem eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums von JSB8 vorliegt, wurden Wachstumsversuche in SMM steigender Osmolarität durchgeführt. Hierzu wurden 75 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes auf eine OD_{578} von 0,05 angeimpft und aerob bei 37°C inkubiert. Die Osmolarität des Mediums wurde durch die Zugabe von Salz, mit einer Endkonzentration im Bereich von 0 bis 2 M NaCl, variiert. Nach 17 Stunden wurde die erreichte OD_{578} der Kulturen bestimmt und in Abhängigkeit der jeweiligen externen NaCl-Konzentration aufgetragen (Abb. 8B). Wie schon in dem oben beschriebenen Experiment gezeigt, weist der *proHJ*-Stamm (JSB8) einen deutlichen, osmosensitiven Wachstumsphänotyp auf, der sich bereits ab einer NaCl-Konzentration von 0,6 M im Medium manifestiert (Abb. 8B). JSB8 hat damit einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich zu geringeren Osmolaritäten hin verschobenen Wachstumsbereich.

1.5 Die *proHJ*-Mutante JSB8 ist nicht in der Lage Prolin als Antwort auf hochosmolare Umweltbedingungen zu akkumulieren

Die *de novo* Synthese von Prolin stellt in Minimalmedium die einzig verfügbare Möglichkeit der Akkumulation einer osmotischen Schutzsubstanz für *B. subtilis* dar (Whatmore *et al.*, 1990). Um zu zeigen, dass der in Medium moderater und hoher Osmolarität beobachtete Wachstumsdefekt von JSB8 [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$] auf eine fehlende Prolinakkumulation zurückzuführen ist, wurde der intrazelluläre Prolingehalt von JSB8-Kulturen mittels HPLC-Analyse bestimmt. Hierzu wurden wiederum 75 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und aerob bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{578} von 2 inkubiert. Die Osmolarität des Mediums wurde durch die Zugabe von Salz, mit einer Endkonzentration im Bereich von 0 M bis 1 M NaCl, variiert. Der *B. subtilis*-Stamm JSB8 zeigt im Gegensatz zum Wildtyp keine Akkumulation von Prolin unter hyperosmolaren Bedingungen (Abb. 9A). Das *proHJ*-Operon ist somit essentiell für die unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen beobachtete, massive Prolinakkumulation.

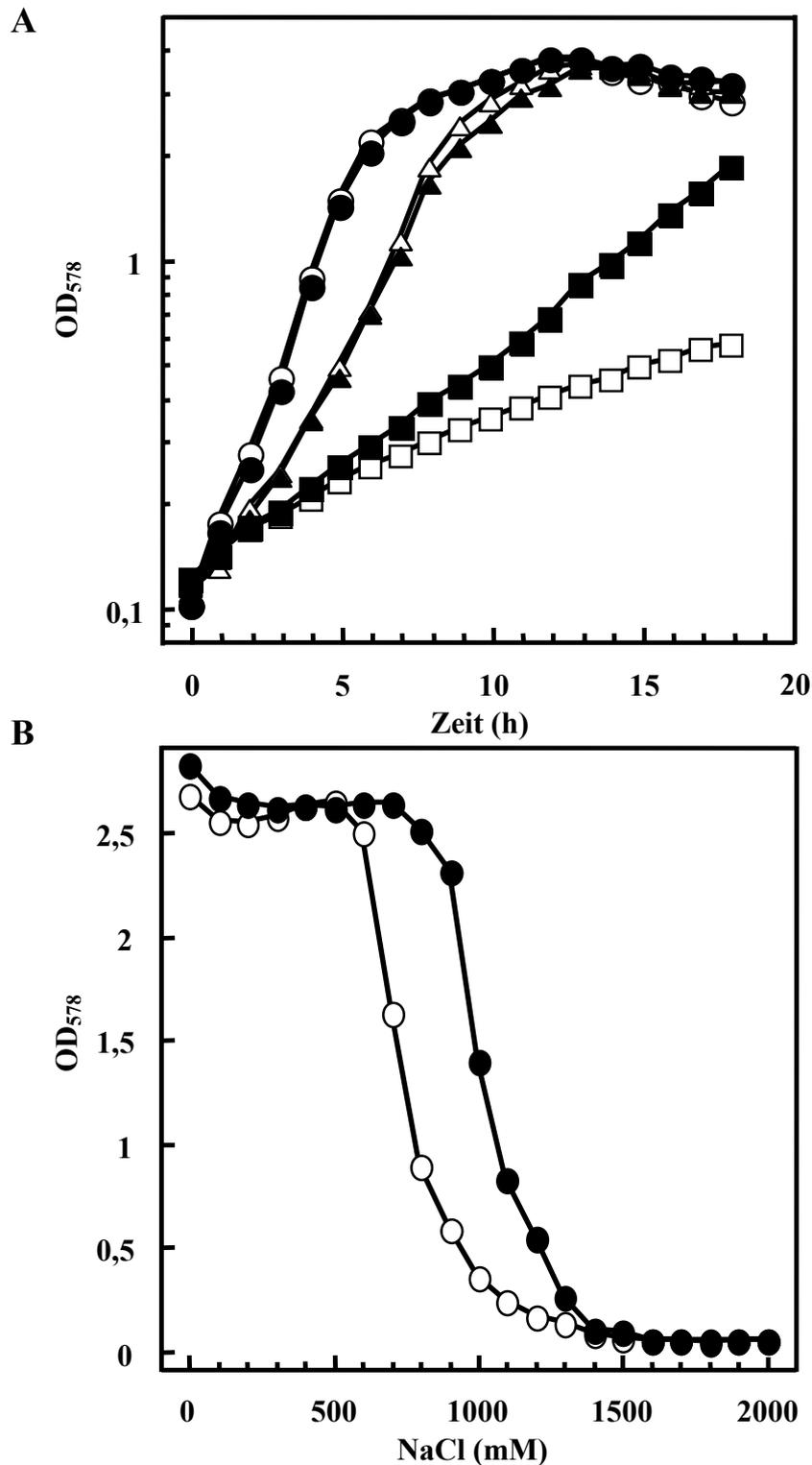


Abb. 8 Die *proHJ*-Mutante JSB8 zeigt unter hyperosmotischen Bedingungen einen osmosensitiven Wachstumsphänotyp

A. Kulturen des *proH*⁺ *proJ*⁺ Stammes JH642 (● ▲ ■) und seines Δ(*proHJ::tet*)I Derivates JSB8 (○ △ □) wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung der OD₅₇₈ dieser Kulturen in SMM (● ○) und SMM mit 1,2 M NaCl in Abwesenheit (■ □) oder Anwesenheit (▲ △) von 1 mM Glycinbetain wurde für 18 Stunden registriert. **B.** Dargestellt ist die nach 17 Stunden erreichte OD₅₇₈ der in SMM mit im Bereich von 0 – 2 M variierenden NaCl-Konzentrationen gewachsenen *B. subtilis*-Stämme JH642 [*proHJ*⁺] (●) und JSB8 [Δ(*proHJ::tet*)I] (○). Die Kulturen wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft und aerob bei 37°C inkubiert. Die in (A) und (B) dargestellten Wachstumsversuche stellen jeweils ein repräsentatives Experiment dar, die gezeigten Daten konnten in zwei weiteren, von einander unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

1.6 Die Rolle von Glutamat für die Protektion von *B. subtilis* vor osmotischem Stress

Betrachtet man unter dem Aspekt der fehlenden Prolinakkumulation in JSB8 das zuvor beschriebene Wachstumsexperiment (Abb. 8B), so stellt sich die Frage, wieso erhöhte Osmolaritäten nicht einen viel stärkeren Wachstumsdefekt zur Folge haben, wie man ihn für einen Stamm mit einem völligen Verlust der Fähigkeit Prolin zu akkumulieren erwarten könnte. Salzkonzentrationen, die 0,7 M NaCl übersteigen, hemmen zwar das Wachstum von JSB8 signifikant, der Stamm ist jedoch mit einer deutlich verringerten Verdopplungszeit immer noch in der Lage unter diesen hyperosmolaren Bedingungen zu wachsen (Abb. 8).

Um zu testen, ob der Stamm JSB8 den Verlust der Prolinbiosynthesekapazität unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen durch die Synthese anderer organischer Osmolyte kompensiert, wurden [¹³C]-NMR-Spektren von ethanolischen Ganzzellextrakten des Wildtyps und der *proHJ*-Mutante aufgenommen (Brill, 1998). Diese erlauben die Detektion dominanter, intrazellulärer organischer Solute. Wie zuvor beschrieben sind Glutamat und Prolin die dominanten organischen Osmolyte mit Salz gestresster Wildtypzellen. In gestressten JSB8-Zellen konnten dagegen nur die Resonanzsignale von Glutamat detektiert werden (Brill, 1998). Die Akkumulation einer weiteren organischen Verbindung, sofern sie mit Hilfe von [¹³C]-NMR-Spektroskopie nachzuweisen ist, kann somit ausgeschlossen werden.

Die Betrachtung einer genaueren Quantifizierung des Glutamatgehaltes mittels HPLC-Analyse in Abhängigkeit der externen Osmolarität zeigt jedoch, dass für den *proHJ*-Stamm ein anderes Muster vorliegt als zuvor für den Wildtyp-Stamm beschrieben. Aus mir bisher unerklärlichen Gründen ist der Glutamatspiegel in osmotisch ungestressten JSB8-Kulturen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm niedriger (Abb. 9B). Dieser Basallevel an Glutamat in JSB8 bleibt jedoch auch bei Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen weitgehend konstant, während der Glutamatgehalt im Wildtyp-Stamm mit zunehmender Osmolarität des Mediums und damit verbundener Prolinbiosynthese stetig abnimmt (Abb. 9B). Der Pool an Glutamat in der $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})\textit{I}$ -Mutante JSB8 ist auf Grund einer fehlenden osmotisch induzierten Prolinbiosynthese konstant und damit bei einer Salzkonzentration von mehr als 0,5 M NaCl im Medium höher als der des Wildtyps (Abb. 9B). Es wäre somit denkbar, dass die *proHJ*-Mutante den Verlust ihrer Prolinbiosynthesekapazität zum Teil durch einen erhöhten Glutamatspiegel kompensiert. Glutamat würde in diesem Zusammenhang dem JSB8-Stamm als eine osmotische Schutzsubstanz dienen, die jedoch deutlich ineffektiver als Prolin ist und daher nur ein vermindertes Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen erlaubt. Dies würde auch die verstärkte intrazelluläre Akkumulation eines Gegenions für Glutamat, höchstwahrscheinlich Kalium (Whatmore und Reed, 1990), erfordern.

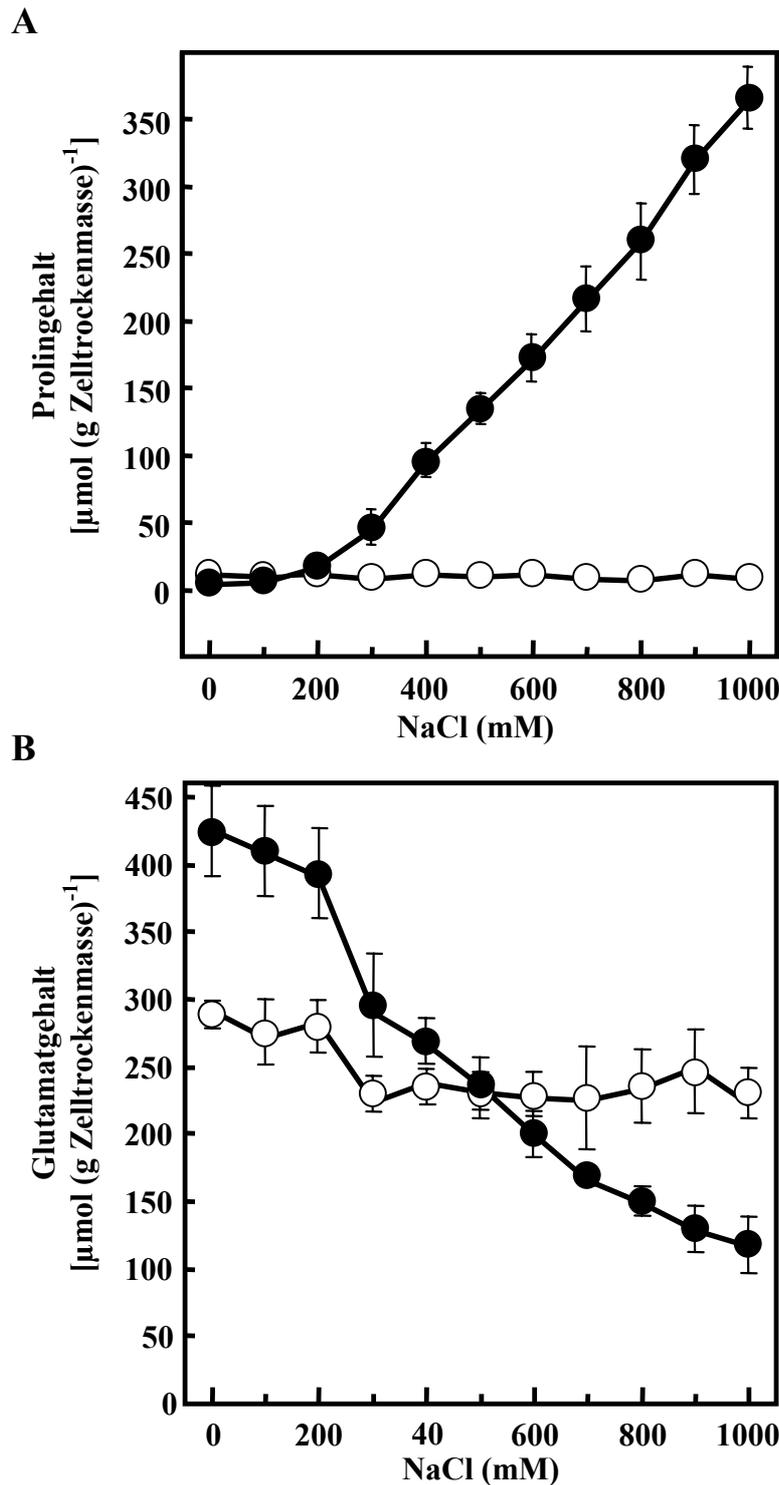


Abb. 9 Der *proHJ*-Stamm JSB8 ist nicht in der Lage Prolin als Antwort auf hochosmolare Umweltbedingungen zu akkumulieren

Kulturen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 (●) und seines $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})$ Derivates JSB8 (○) wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 2 in Minimalmedium (SMM) gezogen, dessen Osmolarität durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen NaCl erhöht wurde. Der Prolin- (A) und der Glutamatgehalt (B) wurden mittels HPLC-Analyse bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängig voneinander gewachsenen Kulturen. Für jede Probe wurden der Prolin- und Glutamatgehalt jeweils doppelt bestimmt.

Die Rolle von Glutamat für die Adaptation von *B. subtilis* an hyperosmolare Wachstumsbedingungen wurde in einem einfachen Wachstumsexperiment näher untersucht. Hierzu wurde das Wachstumsvermögen des Wildtyps und das der *proHJ*-Mutante in SMM und SMM mit 1 M oder 1,2 M NaCl, in An- und Abwesenheit von 1 mM Glutamat ermittelt. Zur Quantifizierung des Wachstumsvermögens wurde die nach 16 h erreichte OD₅₇₈ der verschiedenen Kulturen bestimmt (Abb. 10). Die Zugabe von 1 mM Glutamat optimiert das Wachstumsvermögen des Wildtyps unter hyperosmolaren Bedingungen dramatisch, aber auch das Wachstum der *proHJ*-Mutante wird in Anwesenheit von Glutamat verbessert (Abb. 10). Diese Beobachtungen bekräftigen die Annahme, dass mit zunehmender Prolinakkumulation unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen der für die Prolinbiosynthese verfügbare Glutamatpool im Wildtyp abnimmt und sogar limitierend wird. Die exogene Zugabe von Glutamat erlaubt dem Wildtyp dann die Akkumulation größerer Mengen an Prolin, was zu einer erhöhten osmotischen Toleranz führt. Theoretisch könnte aber auch das Glutamat selbst osmoprotektiv wirken. Um dies näher zu untersuchen wären weitere HPLC-Analysen nötig. Auf Grund des defekten Prolinbiosyntheseweges kann der *B. subtilis*-Stamm JSB8 das Glutamat nicht in Prolin umwandeln, es muss somit in diesem Falle selbst osmoprotektiv wirken. Über welches Transportsystem die Aufnahme von Glutamat erfolgt ist bisher ungeklärt.

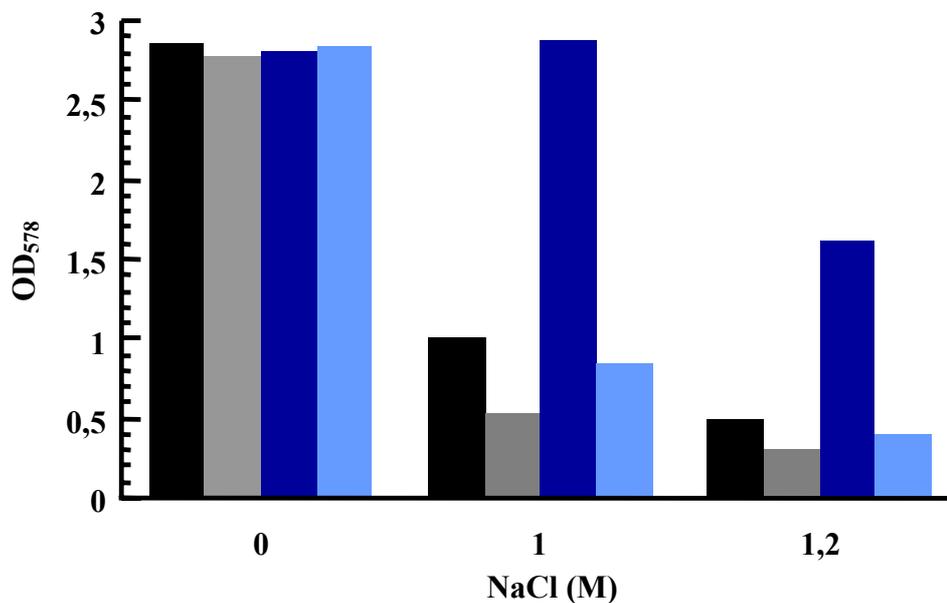


Abb. 10 Exogen zugegebenes Glutamat wirkt osmoprotektiv auf *B. subtilis*

Die *B. subtilis*-Stämme JH642 (■ ■) und JSB8 [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tetI})$] (■ ■) wurden in SMM und SMM mit 1 M NaCl oder 1,2 M NaCl, ohne Zusatz (■ ■) oder mit Zusatz (■ ■) von 1 mM Glutamat auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und die nach 16-stündiger, aerober Inkubation bei 37°C erreichte OD₅₇₈ bestimmt. Der dargestellte Wachstumsversuche stellt ein repräsentatives Experiment dar, das in zwei von einander unabhängigen Experimenten bestätigt wurde.

1.7 Die Rolle von Kalium für die osmotisch regulierte Prolinakkumulation in *B. subtilis*

In der ersten Phase der Anpassung nach einem hochosmolaren Schock kommt es in *B. subtilis* zu einer schnellen Akkumulation von K⁺-Ionen. Die Aufnahme erfolgt vor allem durch das hochaffine

K⁺-Aufnahmesystem KtrAB (Holtmann, 1999). Die Natur des Gegenions für Kalium ist ungeklärt, aber vermutlich handelt es sich hierbei um Glutamat (Whatmore *et al.*, 1990). Der in der *proHJ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Glutamatpool unter hochosmolaren Bedingungen könnte somit begleitet sein von einer intrazellulären K⁺-Ionenanhäufung. Die Anhäufung hoher intrazellulärer Kaliumkonzentrationen ist jedoch eine inadäquate Strategie für eine Langzeitanpassung an hochosmolare Umgebungen. In dem *B. subtilis*-Wildtyp folgt daher auf diese schnelle erste Antwort eine längerfristige Akkumulation kompatiblerer Solute, wie zum Beispiel Prolin. Im folgenden sollte untersucht werden, ob der *B. subtilis*-Stamm JSB8 nach einem osmotischen Schock mit 0,6 M NaCl einen höheren Kaliumbedarf als der Wildtyp-Stamm JH642 hat. Hierzu wurden beide Stämme zunächst in SMM mit ausreichend (200 mM) Kalium und SMM mit einer limitierten Kaliumkonzentration (1 mM Kalium) bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigte der Stamm JSB8 keinen Wachstumsnachteil bei Wachstum in Kaliummangelmedium. Auch der osmotischer Schock nach plötzlicher Zugabe von Salz, mit einer finalen Konzentration von 0,6 M NaCl im Medium, führte zu keinem Wachstumsdefizit für den JSB8-Stamm (Abb. 11). Dieses Experiment legt nahe, dass der *proHJ*-Stamm JSB8 nach einem hyperosmolaren Schock keinen erhöhten Kaliumbedarf aufweist.

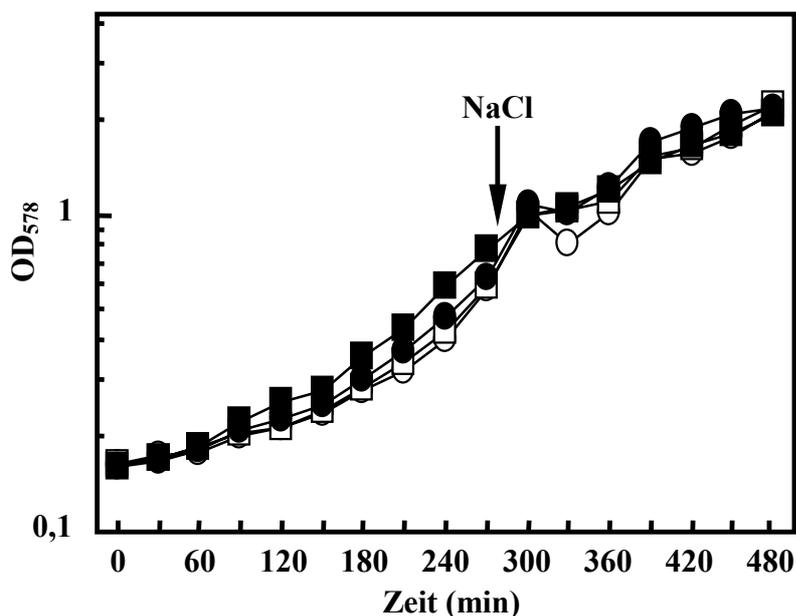


Abb. 11 Der *proHJ*-Stamm JSB8 weist nach einem hyperosmolaren Schock keinen erhöhten Kaliumbedarf auf

Kulturen des Wildtypstammes JH642 (○ □) und seines $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$ Derivates JSB8 (● ■) wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung der OD_{578} dieser Kulturen in Kaliummangelmedium (1 mM Kalium; ● ○) und Minimalmedium mit 200 mM Kalium (■ □) wurde verfolgt. Zum angezeigten Zeitpunkt (↓) wurden die Zellen einer plötzlichen Erhöhung der Osmolarität, durch die Zugabe von NaCl einer Endkonzentration von 0,6 M ausgesetzt.

2. Transkriptionelle Regulation der osmotisch vermittelten Prolinbiosynthese

2.1 Northern-Blot-Analyse der Prolinbiosynthesegene

Die zuvor präsentierten, physiologischen Daten haben gezeigt, dass die Prolinbiosynthese für osmoprotektive Zwecke unter osmotischer Kontrolle steht. Im folgenden sollte mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse des chromosomalen *proHJ*-Genortes geklärt werden, ob diese osmotische Regulation in *B. subtilis* auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (0,4 M und 0,6 M NaCl) gewachsenen sind. Anschließend wurde diese RNA mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten, *proHJ*-spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Abb. 12A) hybridisiert, wobei eine einzelne, 2100 nt lange mRNA-Spezies detektiert wurde (Abb. 12B). Die Länge des Transkriptes entspricht damit der kalkulierten Distanz (2,07 kb) zwischen dem *proHJ*-Promotor (siehe unten) und einem stromabwärts von der *proHJ*-kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator (Abb. 12A). Die Gene *proH* und *proJ* werden somit als Operon von einem osmotisch regulierten Promotor aus kotranskribiert. Eine Quantifizierung der jeweiligen Signale ergab, dass die von *B. subtilis*-Zellen unter hochosmolaren Bedingungen (0,6 M NaCl) produzierte Menge an *proHJ*-Transkript 8-mal größer ist als die von in SMM gewachsenen Zellen (Abb. 12B).

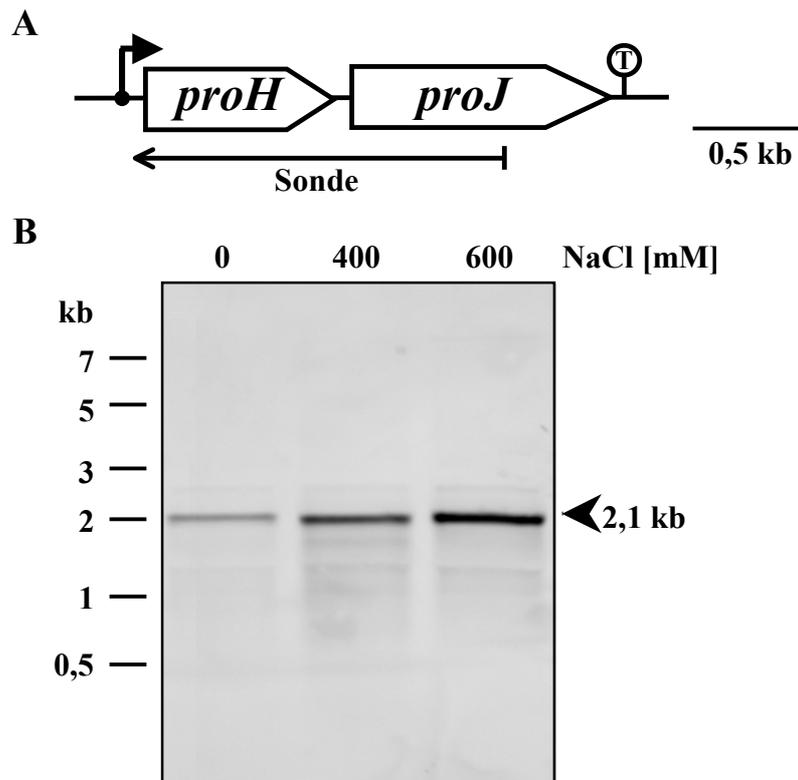


Abb. 12 Northern-Blot-Analyse des *proHJ*-Genortes

A. Genetische Organisation der *proHJ*-Region. Die Position des σ^A -abhängigen Promotors und eines möglichen faktorunabhängigen Transkriptionsterminators [T] ist angezeigt. Die Lage der für die Hybridisierung verwendeten *proHJ*-spezifischen RNA-Sonde ist ebenfalls angegeben. **B.** Gesamt-RNA (4 μ g) aus in SMM und SMM mit 0,4 M oder 0,6 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) kultivierten JH642-Zellen wurde mit der *proHJ*-spezifischen DIG-markierten *anti-sense* RNA-Sonde hybridisiert. Hybridisierende mRNA-Spezies wurden nach 10-minütiger Inkubation mit dem Reagenz ECF-Vistra (12 μ l cm^2 Blot) detektiert.

Die physiologischen Untersuchungen der *proBA*-Mutantenstämme haben gezeigt, dass die γ -Glutamyl-phosphat-Reduktase ProA den zweiten Schritt sowohl der anabolen Prolinbiosynthese als auch der osmotisch induzierten Prolinakkumulation katalysiert. In einer Northern-Blot-Analyse des chromosomalen *proBA*-Genortes sollte daher untersucht werden, ob die Transkription dieser Gene ebenfalls einer osmotischen Kontrolle unterliegt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von bis zur exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit 0,4 M NaCl gewachsenen JH642-Kulturen präpariert und mit einer für *proBA* spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Abb. 13A) hybridisiert. Es wurde ein etwa 2700 nt langes Transkript detektiert, das bei Wachstum der Zellen in erhöhter Osmolarität gleichermaßen stark vertreten war (Abb. 13A). Die Länge des Transkriptes entspricht der kalkulierten Distanz (2,67 kb) zwischen dem *proBA*-Promotor (siehe unten) und einem unmittelbar stromabwärts von der *proBA*-kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator (Abb. 13A). Die Gene *proB* und *proA* sind somit ebenfalls als Operon organisiert, es findet jedoch unter hochosmolaren Bedingungen keine verstärkte Expression des *proBA*-Operons statt.

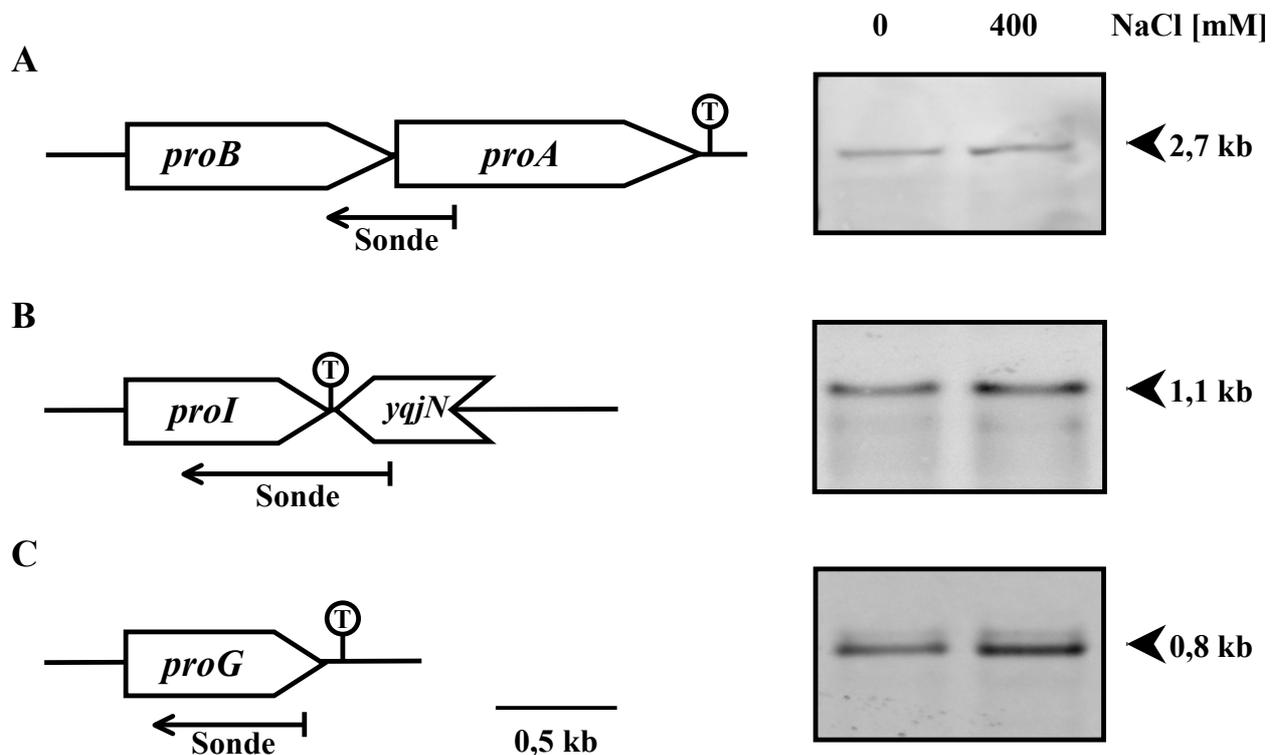


Abb. 13 Northern-Blot-Analyse der Genorte *proBA*, *proI* und *proG*

Die genetische Organisation der *proBA*- (A), der *proI*- (B) und der *proG*-Region (C) ist dargestellt. Die Position der jeweiligen σ^A -abhängigen Promotoren und möglicher faktorunabhängiger Transkriptionsterminatoren [T] ist angegeben. Die Lage der für diese Gene spezifischen, für die Hybridisierung verwendeten RNA-Sonde ist ebenfalls angegeben. Die Gesamt-RNA aus in SMM und SMM mit 0,4 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) kultivierten JH642-Zellen wurde präpariert. 10 μ g dieser RNA wurde der Größe entsprechend mittels Elektrophorese auf einem 1,2 %-igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Zur Detektion der *proBA*- (A), *proI*- (B) und *proG*- (C) Transkripte, wurde die RNA mit einer *proBA*-, *proI*- oder *proG*-spezifischen, DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert. Zur Detektion der *proBA*- und *proI*-Transkripte erfolgte eine 60-minütige Inkubation. Zur Detektion des *proG*-Transkriptes erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Reagenz ECF-Vistra (12 μ l cm^{-2} Blot).

Auf Grund der oben präsentierten, physiologischen Experimente (Abb. 6) sind *ProI* und *ProG* nicht in die osmotisch induzierte Prolinakkumulation involviert. Die Transkription des *proI*- und des *proG*-Gens unterliegt somit vermutlich auch keiner osmotischen Kontrolle. Diese Annahme wurde in einer Northern-Blot-Analyse dieser beiden Genorte untermauert (Abb. 13B und 13C). Die Gesamt-RNA von in SMM oder SMM moderat erhöhter Osmolarität (0,4 M NaCl) kultivierten JH642-Zellen wurde mit einer für *proI*-spezifischen (Abb. 13B) oder einer *proG*-spezifischen (Abb. 13C), einzelsträngigen RNA-Sonde hybridisiert. Es konnten ein 1100 nt langes *proI*-spezifisches Transkript und ein 800 nt langes *proG*-spezifisches Transkript detektiert werden (Abb. 13B und 13C). Die Expression des *proI*- und *proG*-Gens unterliegt jedoch keiner osmotischen Kontrolle, was mit den aus physiologischen Untersuchungen gewonnenen Daten korreliert.

2.2 Analyse des Startpunktes *proHJ*-spezifischer RNA

Um den Promotor des *proHJ*-Operons zu identifizieren wurde der stromaufwärts des *proH*-Strukturgens gelegene Transkriptionsstartpunkt mit Hilfe von Primer Extension-Analysen bestimmt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA in SMM oder SMM mit 0,4 M NaCl kultivierter JH642-Zellen präpariert. Nach Hybridisierung eines *proH*-spezifischen, am 5'-Ende radioaktiv markierten Oligonukleotids (*proHJ*-PE1) an die passende mRNA, diente dieses Oligonukleotid als Primer für die reverse Transkriptase. Die Reaktionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienende Sequenzreaktion, die unter Verwendung desselben Oligonukleotids durchgeführt wurde, gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 14B). Es konnte eine einzige cDNA-Spezies detektiert werden, deren Länge dem Abstand von der Oligonukleotidsequenz bis zum Transkriptionsstart entspricht (Abb. 14B). Der Transkriptionsstartpunkt liegt damit 86 bp stromaufwärts von dem *proHJ*-Startcodon auf einem Guanin (Abb. 14A). In geeignetem Abstand stromaufwärts dieses Transkriptionsstartpunktes befinden sich mögliche -10 und -35 Regionen, die ähnlich zu den entsprechenden Konsensussequenzen σ^A -abhängiger Promotoren (Helmann, 1995) sind. Der Abstand zwischen der -35 und der -10 Region beträgt 16 bp (Abb. 14A) und ist damit suboptimal. Die -10 Region weist nur eine geringfügige Homologie zu der -10 Konsensussequenz σ^A -abhängiger Promotoren auf. Unmittelbar stromaufwärts der -10 Region des *proHJ*-Operons befindet ein sogenanntes TG-Motiv, das in circa 45 % der σ^A -abhängigen Promotoren aus *B. subtilis* konserviert ist (Voskuil und Chambliss, 1998). Die zuvor im Northern-Blot gewonnenen Ergebnisse konnten zudem verifiziert werden. Wie eine Quantifizierung der jeweiligen cDNA-Signale ergab, ist die Transkription des *proHJ*-Operons unter hochosmolaren Bedingungen (0,4 M NaCl) 4,6-fach induziert (Abb. 14A).

Um die Lokalisation des Transkriptionsstartpunktes und seine Erkennung durch den Sigmafaktor A (σ^A) aus *B. subtilis* zu verifizieren, wurde eine *In vitro*-Transkription durchgeführt. Als DNA-Matrize wurde ein 156 bp PCR-Fragment verwendet (entspricht dem in Abb. 14A dargestellten DNA-Fragment), das den putativen *proHJ*-Promotor trägt. Es wurde eine RNA-Polymerase aus *B. subtilis* mit einer σ^A -Untereinheit verwendet. Zudem sollte getestet werden, ob die osmotisch induzierte Transkription auch *in vitro* rekonstruiert werden kann. Dazu wurden die unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen in *B. subtilis* vorherrschenden, intrazellulären ionischen Bedingungen imitiert. In *E. coli* konnte in einem vergleichbaren Experiment gezeigt werden, dass die Transkription der *osmB* und *osmY* Gene *in vitro*, in Anwesenheit von 400 mM Kaliumglutamat verstärkt erfolgt (Ding *et al.*, 1995). Es ist bekannt, dass in *B. subtilis* nach einem osmotischen Schock der Kaliumlevel in der Zelle ebenfalls ansteigt (Whatmore *et al.*, 1990). Die Natur des Gegenions ist bisher ungeklärt, es handelt sich dabei aber höchstwahrscheinlich um Glutamat. Es wurden daher dem Reaktionsansatz für die *In vitro*-Transkription verschiedene Konzentrationen Kaliumglutamat zugegeben. Die Transkriptionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienende Sequenzreaktion gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 15). Die Länge des Transkriptes entspricht mit 89 nt relativ genau dem Abstand von 86 bp zwischen dem ATG-Codon und dem Transkriptionsstartpunkt (Abb. 14A). Hiermit konnte eindeutig gezeigt werden, dass der oben beschriebene Promotor von der σ^A -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *B. subtilis* erkannt wird und sich zudem an der ermittelten Position befindet. Eine Verstärkung der *In vitro*-Expression in Anwesenheit von Kaliumglutamat ist jedoch nicht zu beobachten, im Gegenteil, die Gegenwart von Kaliumglutamat scheint die Transkription des *proHJ*-Operons *in vitro* eher zu hemmen.

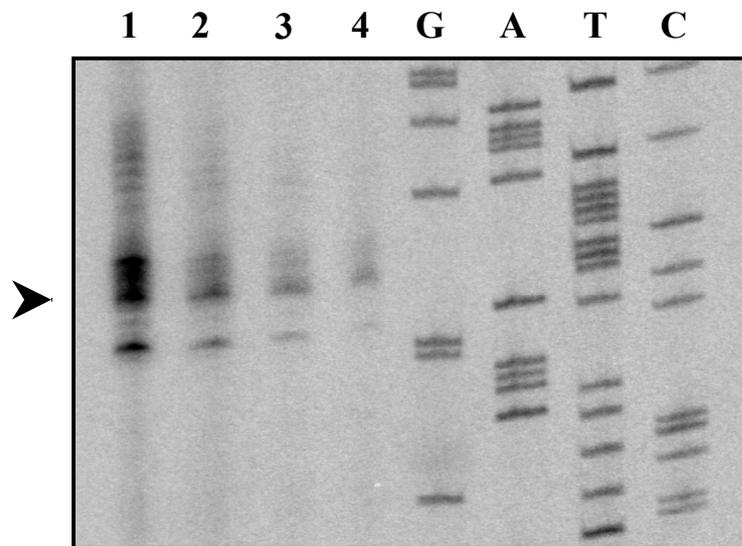


Abb. 15 Die Lokalisation des *proHJ*-Promotors wurde mittels *In vitro*-Transkription verifiziert

Als DNA-Matrize für die *In vitro*-Transkription wurde ein 156 bp PCR-Fragment verwendet (entspricht dem in Abb. 14A dargestellten DNA-Fragment), das den putativen Promotor trägt. Für die *In vitro*-Transkription selbst wurde eine RNA-Polymerase aus *B. subtilis* mit einer σ^A -Untereinheit verwendet. Dem Reaktionsansatz wurden kein (Spur1), 100 mM (Spur2), 200 mM (Spur3) oder 300 mM (Spur4) Kaliumglutamat zugegeben. Die Transkriptionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienenden Sequenzreaktion gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.3 Reporterfusionenanalysen der osmotisch kontrollierten *proHJ*-Expression

Um detaillierter zu untersuchen, in welcher Weise sich Veränderungen der umgebenden Osmolarität auf die Expression des *proHJ*-Operons auswirken, wurde *treA* aus *B. subtilis* als Reporter gen eingesetzt. Es kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glukosidase (TreA) aus *B. subtilis*, deren Aktivität anhand der Umsetzung des Substratanalogons *para*-Nitrophenyl- α -D-Glukopyranosid (α -PNPG) kolorimetrisch gemessen werden kann (Schöck *et al.*, 1996; Gotsche und Dahl, 1995). Es wurden Operonfusionen zwischen *proH* und *treA* in dem Plasmid pJMB1 [*amyE-treA-cat-amyE*] konstruiert. Die so entstandenen Plasmide wurden in den *B. subtilis*-Stamm FSB1 transformiert, wo eine Integration der *proH-treA* Operonfusionen als Einzelkopie am chromosomalen *amyE*-Genort erfolgte. Das authentische *treA*-Gen ist in FSB1 durch eine Resistenzkassette unterbrochen [(*treA::neo*)I]. Zur Kontrolle des Hintergrundes der TreA-Aktivität diente der Stamm TRB0, ein FSB1-Derivat, das ein in das *amyE*-Gen von FSB1 integriertes, promotorloses *treA*-Gen trägt (Spiegelhalter und Bremer, 1998). Die in TRB0 gemessenen TreA-Aktivitäten lagen unterhalb von 3 Einheiten und damit nahe der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

In dem auf die oben beschriebene Weise konstruierten Φ (*proH-treA*)I Fusionsstamm JSB7 wurde das promotorlose *treA*-Gen mit einem 474 bp Fragment fusioniert, das das 3'-Ende des *rtp*-Gens und die intergene Region zwischen *rtp* und *proH* trägt (Abb. 17A). In einem weiteren Φ (*proHJ-treA*)7 Fusionsstamm JSB6 wurde das promotorlose *treA* mit einem 1464 bp Fragment fusioniert, das das gleiche 5'-Ende wie das oben beschriebene 474 bp lange Fragment trägt, dessen 3'-Ende jedoch 179 bp in dem *proJ*-Gen liegt (Abb. 17A).

2.3.1 Die Gene *proH* und *proJ* werden nach einem hyperosmotischen Schock verstärkt exprimiert

Es sollte zunächst die Expression der Φ (*proH-treA*)I Operonfusion in Abhängigkeit von plötzlichen Veränderungen der externen Osmolarität bestimmt werden. Hierzu wurden JSB7 Kulturen bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ von 0,4) einem plötzlichen osmotischen Schock mit Salz, einer Endkonzentration von 0,4 M NaCl im Medium, ausgesetzt. Die TreA-Aktivität wurde sowohl unmittelbar vor dem Schock, als auch danach über einen Zeitraum von zwei Stunden bestimmt. Die TreA-Aktivität von in SMM gewachsenen Zellen ist niedrig. Sie steigt nach einem osmotischen „up-shock“ mit 0,4 M NaCl jedoch schnell von einem Basallevel von 25 Units pro mg Zellprotein auf 100 Units pro mg Zellprotein an (Abb. 16A). Diese innerhalb von ungefähr 40 Minuten vervierfachte TreA-Aktivität wurde für die weitere Messdauer auf diesem Niveau aufrechterhalten (Abb. 16A).

2.3.2 Die Stärke der Expression der *proH-treA* Fusion verhält sich proportional zur Osmolarität des Wachstumsmediums

Es sollte zudem die TreA-Aktivität in JSB7-Zellen ermittelt werden, die über einen längeren Zeitraum in Medien verschiedener Osmolaritäten gewachsen sind. Hierzu wurden die Zellen über Nacht in SMM unterschiedlicher Osmolaritäten vorgezogen. Mit Aliquots dieser Übernachtskulturen

wurden frische SMM Kulturen der gleichen Osmolarität inokuliert, aerob bei 37°C bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} von 0,5 bis 0,8) inkubiert und die TreA-Aktivität bestimmt. Es konnte eine lineare Korrelation zwischen der Osmolarität des Wachstumsmediums und der Expression der $\Phi(\textit{proH-treA})I$ Operonfusion gezeigt werden (Abb. 16B). Dieser Befund steht im Einklang mit den für die intrazelluläre Prolinkonzentration ermittelten Daten (Abb. 5A), auch hier wurde eine lineare Beziehung zwischen der Osmolarität des Mediums und der Prolinakkumulation festgestellt.

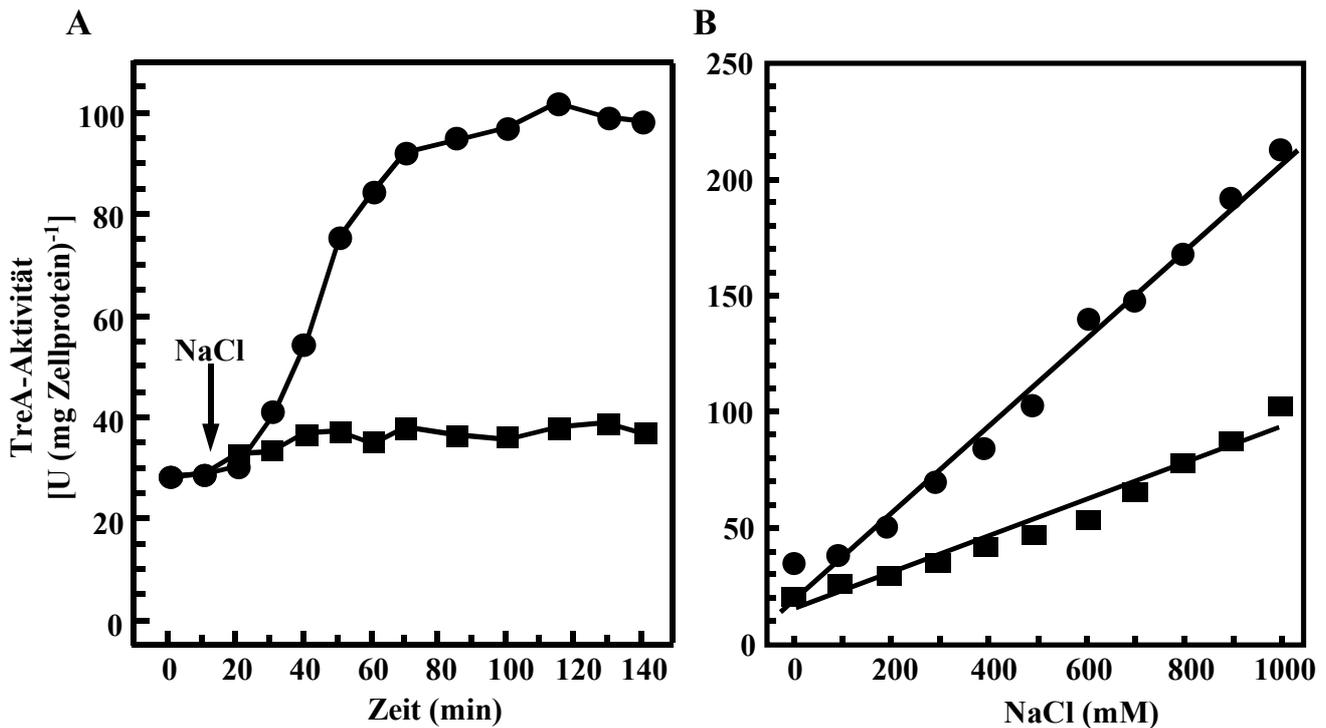


Abb. 16 Osmotische Kontrolle der *proHJ*-Expression

Die Expression der chromosomalen $\Phi(\textit{proH-treA})I$ Reportergenfusion in dem Stamm JSB7 wurde untersucht. Der Stamm TRB0 [$(\textit{treA}::\textit{neo})I$], der ein promotorloses, in das *amyE*-Gen inseriertes *treA*-Gen trägt, diente als Kontrolle. Er zeigte weniger als drei Einheiten TreA-Aktivität und war unbeeinflusst von der Osmolarität.

A. Die TreA-Aktivität wurde von in SMM gewachsenen JSB7-Kulturen (■) und in SMM gewachsenen JSB7-Kulturen, deren Osmolarität durch die plötzliche Zugabe (↓) von NaCl einer Endkonzentration von 0,4 M NaCl erhöht wurde (●) bestimmt. **B.** Kulturen des *B. subtilis*-Stammes JSB7 wurden in SMM und SMM mit aufsteigenden NaCl-Konzentrationen in Ab- (●) oder Anwesenheit (■) von 1 mM Glycinbetain vorgezogen. Sie wurde dann in SMM derselben Osmolarität überimpft und die TreA-Aktivität während der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die in (A) und (B) dargestellten Daten stellen jeweils ein repräsentatives Experiment dar. Sie konnten in zwei weiteren, von einander unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Die Stimulation der *proU*-Transkription in *E. coli* und der *OpuE*-Expression in *B. subtilis* bei erhöhter Osmolarität wird durch die Zugabe von Glycinbetain größtenteils aufgehoben. (Lucht und Bremer, 1994; Spiegelhalter und Bremer, 1998). Um zu überprüfen, ob die exogene Verfügbarkeit dieser potenten osmotischen Schutzsubstanz auch die *proHJ*-Expression in osmotisch getressten *B. subtilis*-Zellen beeinflusst, wurde das oben beschriebene Experiment nochmals in Anwesenheit von 1 mM Glycinbetain im Medium durchgeführt. In Gegenwart von Glycinbetain kommt es zu einer

dramatischen Reduktion der *proHJ*-Expression, wobei diese jedoch in Bereichen sehr hoher Osmolarität nicht vollständig verloren geht und auf geringerem Level noch proportional zur NaCl-Konzentration des Mediums erfolgt (Abb. 16B). Diese Daten machen deutlich, dass *B. subtilis* offensichtlich in der Lage ist das Ausmaß des osmotischen Stresses sehr genau zu erfassen und die Stärke der *proHJ*-Transkription und damit auch der Prolinbiosynthese den Umweltbedingungen exakt anzupassen.

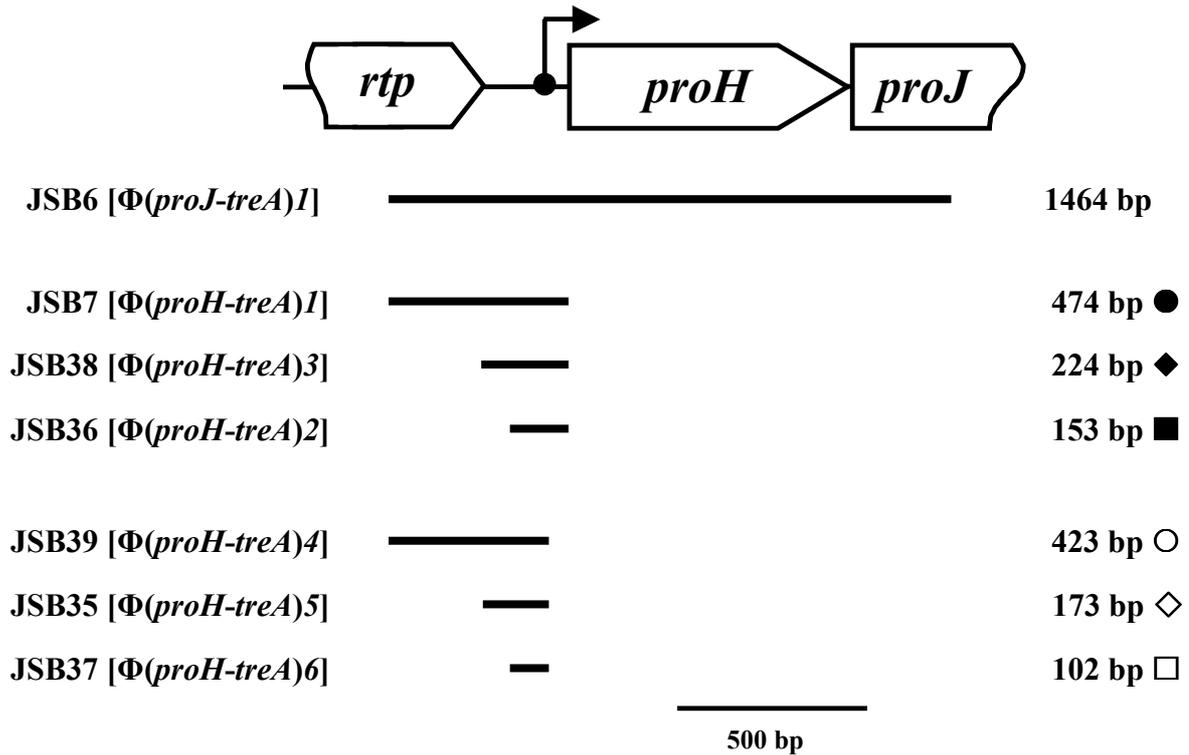
2.3.3 Charakterisierung eines minimalen DNA-Fragmentes, das für die osmotisch regulierte Funktion des *proHJ*-Promotors erforderlich ist

Die oben beschriebenen „up-shock“- und Langzeit-Experimente wurden auch mit dem $\Phi(\textit{proJ-treA})1$ Fusionsstamm JSB6 durchgeführt. Hierbei ergab sich ein zu dem $\Phi(\textit{proH-treA})1$ Fusionsstamm JSB7 vergleichbares, regulatorisches Muster (Daten nicht gezeigt). In der *proHJ*-kodierenden Region sind daher keine regulatorischen *cis*-Elemente zu erwarten. Um zu ermitteln welche DNA-Sequenzen *in cis* für die Funktion des *proHJ*-Promotors erforderlich sind, wurde das 474 bp Fragment in der $\Phi(\textit{proH-treA})1$ Fusion von JSB6 vom 5'- und 3'-Ende her verkürzt (Abb. 17A).

Der $\Phi(\textit{proH-treA})3$ Fusionsstamm JSB38 trägt ein am 5'-Ende um 250 bp verkürztes Fragment. Das verbleibende insgesamt 224 bp lange Fragment, das den gesamten stromaufwärts von *proH* gelegenen Bereich bis zum Ende des *rtp*-Gens trägt, wurde mit dem promotorlosen *treA*-Gen fusioniert (Abb. 17A). JSB38 zeigte bei langfristigen Wachstum in SMM mit erhöhten NaCl-Konzentrationen die gleichen regulatorischen Eigenschaften wie die zuvor beschriebene, 474 bp lange $\Phi(\textit{proH-treA})1$ Fusion (Abb. 17B). Die insgesamt gegenüber dieser Fusion leicht erhöhte TreA-Aktivität kann an dieser Stelle nicht logisch erklärt werden. In dem $\Phi(\textit{proH-treA})2$ Fusionsstamm JSB36 wurde das 5'-Ende um weitere 71 bp auf 153 bp verkürzt, wobei der 3'-gelegene Fusionspunkt mit *treA* wiederum unberührt bleibt (Abb. 14A und Abb. 17A). Für diese Fusion konnte ein nahezu identisches Niveau der TreA-Aktivität und regulatorisches Pattern wie für die $\Phi(\textit{proH-treA})1$ Fusion gezeigt werden (Abb. 17B).

Eine weitere Verkürzung des in JSB36 verwendeten Fragmentes um 51 bp wurde von seinem 3'-Ende her durchgeführt, wobei das 5'-Ende erhalten blieb (Abb. 17A). Der daraus resultierende Stamm JSB37 [$\Phi(\textit{proH-treA})6$] zeigte ein geringes basales Niveau der Reporterexpression, die zudem nicht mehr osmotisch stimulierbar war. Auch die für die Fusionsstämme JSB7 und JSB38 verwendeten Fragmente wurden am 3'-Ende um 51 bp verkürzt, wobei das 5'-Ende in beiden Fällen erhalten blieb (Abb. 17A). Die daraus resultierenden Stämme JSB39 [$\Phi(\textit{proH-treA})4$] und JSB35 [$\Phi(\textit{proH-treA})5$] zeigen das gleiche basale Niveau an Reporterexpression. Sie sind jedoch nur noch rudimentär durch hochosmolare Wachstumsbedingungen stimulierbar.

A



B

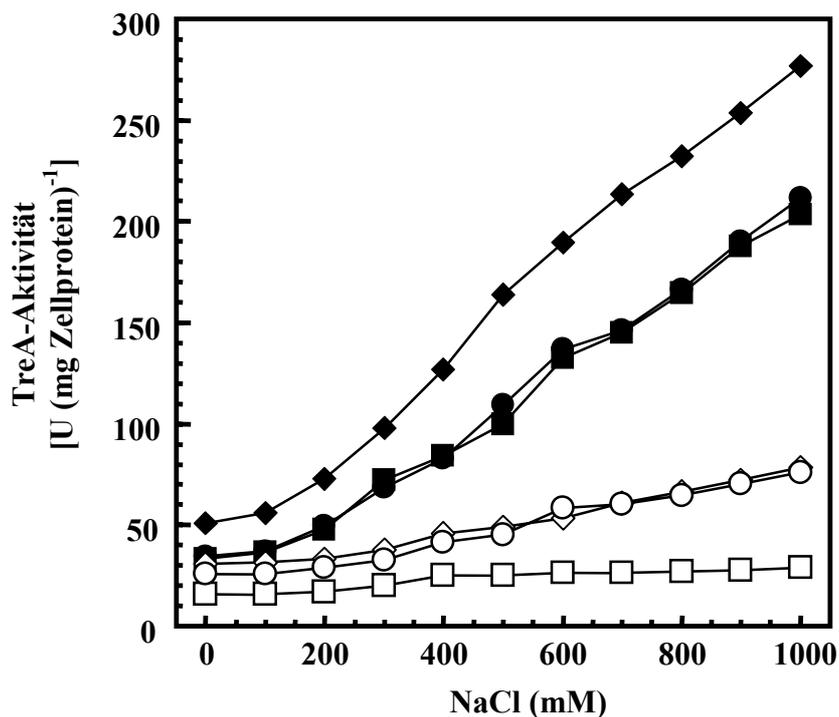


Abb. 17 Analyse der *proHJ*-Promotorregion durch sukzessive Deletion

A. Sechs verschieden lange DNA-Segmente aus dem 5'-Bereich von *proHJ* wurden mit dem promotorlosen *treA*-Gen fusioniert. Diese Operonfusionen wurden zur Konstruktion der Stämme JSB7, JSB35, JSB36, JSB37, JSB38 und JSB39 in Einzelkopie an dem *amyE*-Genort des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)1*] integriert. Die Lage des Transkriptionsstartpunktes ist durch einen Pfeil markiert. Lage und Größe der DNA-Segmente sind angegeben. **B.** *B. subtilis*-Stämme, die verschiedene *proH-treA* Fusionen tragen (siehe A) wurden in SMM und SMM mit aufsteigenden NaCl-Konzentrationen vorgezogen. Anschließend wurden sie in SMM derselben Osmolarität überimpft und die TreA-Aktivität während der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die präsentierten Daten stellen jeweils ein repräsentatives Experiment dar, das in zwei weiteren, von einander unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte.

Das 153 bp DNA-Fragment aus der $\Phi(\textit{proH-treA})_2$ Fusion in JSB36 beinhaltet somit alle *in cis* für eine vollwertige und osmotisch regulierte Expression des *proHJ*-Operons erforderlichen DNA-Sequenzen. Es bietet somit interessante Ansatzpunkte für die Suche nach den *in cis* oder *in trans* aktiven Elementen, die eine osmotisch regulierte Expression des *proHJ*-Operons gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde *lacZ*, das für die β -Galaktosidase aus *E. coli* kodiert, als Reportergen eingesetzt und eine Operonfusion zwischen *proH* und *lacZ* in dem Plasmid pBKB143 [*amyE-lacZ-cat-amyE*] konstruiert. Das so entstandene Plasmid pJS44 wurde in den *B. subtilis*-Wildtypstamm transformiert, wo eine Integration der *proH-lacZ* Operonfusionen als Einzelkopie am chromosomalen *amyE*-Genort erfolgte. Der entstandene *B. subtilis*-Stamm JSB43, bietet die Möglichkeit auf Minimalmediumagarplatten, die X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid) enthalten, eine Induktion der *proH-lacZ* Expression durch eine Blaufärbung der Kolonien sichtbar zu machen und somit gezielt nach Mutanten zu screenen.

2.3.4 Die Expression der *proH-treA* Operonfusion in *B. subtilis* unterliegt einem osmotischen Stimulus

Analog zu dem in Abschnitt 1.2 (Tab. 8) dargestellten Versuch sollte untersucht werden, ob die unter hypertonen Wachstumsbedingungen beobachtete Induktion der Transkription des *proHJ*-Operons auf einen osmotischen Effekt zurückzuführen ist, oder lediglich durch die Anwesenheit von NaCl im Medium induziert wird. Hierzu wurde der $\Phi(\textit{proHJ-treA})_1$ Fusionsstamm JSB7 in SMM [$340 \text{ mOsmol (kg H}_2\text{O)}^{-1}$] bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Osmolarität des Wachstumsmediums wurde dann durch die plötzliche Zugabe von NaCl, Saccharose oder Glycerin schockartig auf $1100 \text{ mOsmol (kg H}_2\text{O)}^{-1}$ erhöht. Die TreA-Aktivität von ungestressten, in SMM gewachsenen Zellen ist in allen Kulturen gleich. Sie steigt nach dem osmotischen „up-shock“ mit Salz und Saccharose jedoch schnell an (Abb. 18). Die mit einer äquivalent osmolaren Menge an Glycerin geschockte Kultur hingegen zeigte keine verstärkte TreA-Aktivität. Bei der Stimulation der Expression des *proHJ*-Operons in *B. subtilis* handelt es sich somit um einen echten osmotischen Effekt (Abb. 18). Die Zugabe von Saccharose induziert die Expression des *proHJ*-Operons aus unerklärlichen Gründen stärker als die Zugabe einer äquiosmolaren Menge NaCl.

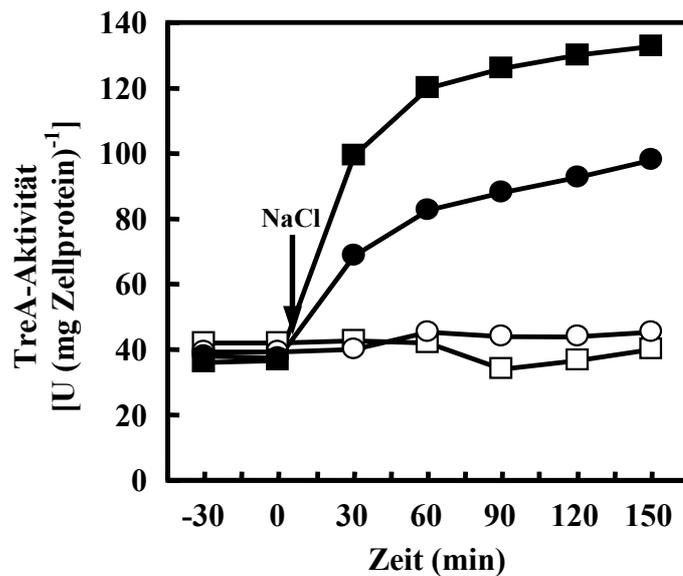


Abb. 18 Die Induktion der Expression des *proHJ*-Operons ist ein wirklich osmotischer Effekt. Die TreA-Aktivität wurde von in SMM [$340 \text{ mOsmol (kg H}_2\text{O)}^{-1}$] gewachsenen JSB7-Kulturen (\square) und in SMM gewachsenen JSB7-Kulturen, deren Osmolarität durch die plötzliche Zugabe (\downarrow) von NaCl (\bullet), Saccharose (\blacksquare) oder Glycerin (\circ) schockartig auf $1100 \text{ mOsmol (kg H}_2\text{O)}^{-1}$ erhöht wurde (\bullet) bestimmt. Die präsentierten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in einem weiteren, davon unabhängigen Experiment bestätigt werden konnte.

2.3.5 Der Einfluss der Wachstumstemperatur auf die osmotisch kontrollierte Expression einer *proH-treA* Operonfusion

Die von Whatmore *et al.* (1990) durchgeführten Untersuchungen zur Prolinakkumulation in *B. subtilis* wurden bei einer suboptimalen Wachstumstemperatur von 25°C durchgeführt. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass der nach einem osmotischen Schock mit $0,4 \text{ M NaCl}$ synthetisierte Level an Prolin in Zellen, die bei 25°C gewachsen sind, fast drei mal höher liegt als bei 37°C gewachsenen Zellen. Ob sich diese Beobachtung auch auf transkriptioneller Ebene widerspiegelt, sollte im folgenden Experiment untersucht werden. Analog zu dem in Abschnitt 2.3.2 dargestellten Versuch, wurden JSB7 Kulturen über Nacht in SMM unterschiedlicher Osmolaritäten bei der jeweiligen Temperatur vorgezogen. Mit Aliquots dieser Übernachtskulturen wurden frische SMM Kulturen der gleichen Osmolarität angeimpft, aerob bei 25°C oder 37°C bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} von $0,5$ bis $0,8$) inkubiert und die TreA-Aktivität bestimmt. Es konnte bei beiden Temperaturen in Bereichen hoher Osmolaritäten eine lineare Abhängigkeit der Expression der $\Phi(\textit{proH-treA})$ Operonfusion von der Osmolarität des Wachstumsmediums gezeigt werden (Abb. 19). Die bei 25°C gewachsenen, ungestressten oder nur geringfügig osmotisch gestressten Kulturen (0 M bis $0,2 \text{ M NaCl}$) zeigten eine doppelt so hohe Reportergenexpression wie die bei 37°C in Medium gleicher Osmolarität gewachsenen Kulturen. Auch bei höheren Osmolaritäten ist die TreA-Aktivität der 25°C -Kulturen deutlich höher als in den 37°C -Kulturen. Suboptimale Wachstumstemperaturen bedingen somit eine verstärkte Expression des *proHJ*-Operons und damit vermutlich auch eine verstärkte Prolinakkumulation.

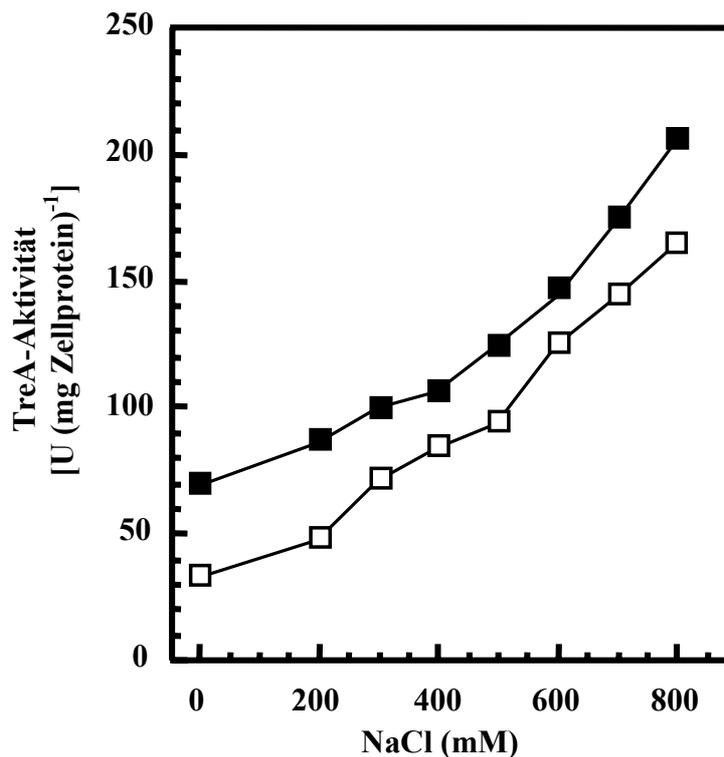


Abb. 19 Vergleich der *proHJ*-Expression bei 37°C und 25°C

Kulturen des $\Phi(\textit{proH-treA})2$ Fusionsstammes JSB36 wurden in SMM verschiedener Osmolaritäten bei 37°C und 25°C vorgezogen. Sie wurden dann in Medium derselben Osmolarität überimpft, bei 37°C (□) oder 25°C (■) bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und die TreA-Aktivität bestimmt. Die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in einem weiteren, davon unabhängigen Experiment bestätigt werden konnte.

3. Inhibition der γ -Glutamyl-Kinase ProB durch das Prolinanalogue 3,4-Dehydro-DL-Prolin

Für zahlreiche Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Serratia marcescens* konnte gezeigt werden, dass die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke allosterisch durch eine Endprodukthemmung des ersten Enzyms (γ -Glutamyl-Kinase; ProB) des Prolinbiosyntheseweges reguliert wird (Leisinger, 1996). In diesen Mikroorganismen wird die γ -Glutamyl-Kinase bereits durch mikromolare (μM) Konzentrationen Prolin oder des Prolinanalogs 3,4-Dehydro-DL-Prolin gehemmt (Smith *et al.*, 1984). Da es nach einem osmotischen Schock mit 0,4 M NaCl in *B. subtilis* zu einer Akkumulation von circa 700 mM Prolin kommt, wird das in die osmoregulatorische Prolinbiosynthese involvierte ProJ-Enzym höchstwahrscheinlich nur ineffektiv oder aber gar nicht über eine Feedback-Hemmung reguliert. 3,4-Dehydro-DL-Prolin weist eine zu Prolin verwandte Strukturformel auf. Es wird durch viele Prolintransportsysteme als Substrat erkannt (Csonka, 1982; Grothe *et al.*, 1986; Ordal *et al.*, 1977; Gallori *et al.*, 1978) und wie C. von Blohn (1997) zeigen konnte, unter Normalbedingungen und hochosmolaren Wachstumsbedingungen (0,4 M NaCl) von *B. subtilis* gleichermaßen gut transportiert. In der Zelle angelangt, wird es von den meisten Organismen anstelle von Prolin in die Proteine eingebaut und bewirkt dadurch fehlerhafte Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen (Leisinger, 1996). In der Literatur werden *E. coli*-, *S. typhimurium*- und *S. marcescens*-Mutanten beschrieben, die resistent gegenüber

dem Prolinanalogen 3,4-Dehydro-DL-Prolin sind (Rushlow *et al.*, 1985; Dandekar und Uratsu, 1988; Omori *et al.*, 1992; Csonka *et al.*, 1988; Smith, 1985). Sie zeichnen sich durch eine Prolinüberproduktion und eine gesteigerte Toleranz gegenüber osmotischem Stress aus. Die Prolinüberproduktion bedingt eine intrazelluläre Verdünnung der toxischen Prolinanaloga und erklärt somit die beobachtete Resistenz. Verantwortlich für diesen Phänotyp sind einzelne Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 107, 117 oder 143 der γ -Glutamyl-Kinase ProB. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der *E. coli* γ -Glutamyl-Kinase (ProB) und der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis* zeigt, dass zwei der in die Feedback-Hemmung des ProB-Enzyms aus *E. coli* involvierten Aminosäurereste auch in dem ProB-Enzym aus *B. subtilis* konserviert sind, nicht jedoch in dem ProJ-Protein (Abb. 20). Sollte das ProJ-Enzym tatsächlich eine geringere Sensitivität gegenüber einer allosterischen Endprodukthemmung durch Prolin aufweisen, würde man erwarten, dass ein ProB⁻ProJ⁺-Stamm weniger sensitiv gegenüber einer Inhibition des Wachstums durch 3,4-Dehydro-DL-Prolin ist, als ein ProB⁺ProJ⁻-Stamm. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Wachstum der Stämme JSB15 (ProB⁺ProJ⁻) und JSB16 (ProB⁻ProJ⁺) in SMM in Ab- oder Anwesenheit von 0,2 mM oder 1 mM 3,4-Dehydro-DL-Prolin verglichen (Abb. 21A und 21B). Um das Wachstum des *B. subtilis*-Stammes JSB16, der ein defektes *proB*-Gen trägt, zu ermöglichen, wurde die *proHJ*-Expression durch Zugabe von 0,6 M NaCl zu dem Medium induziert.

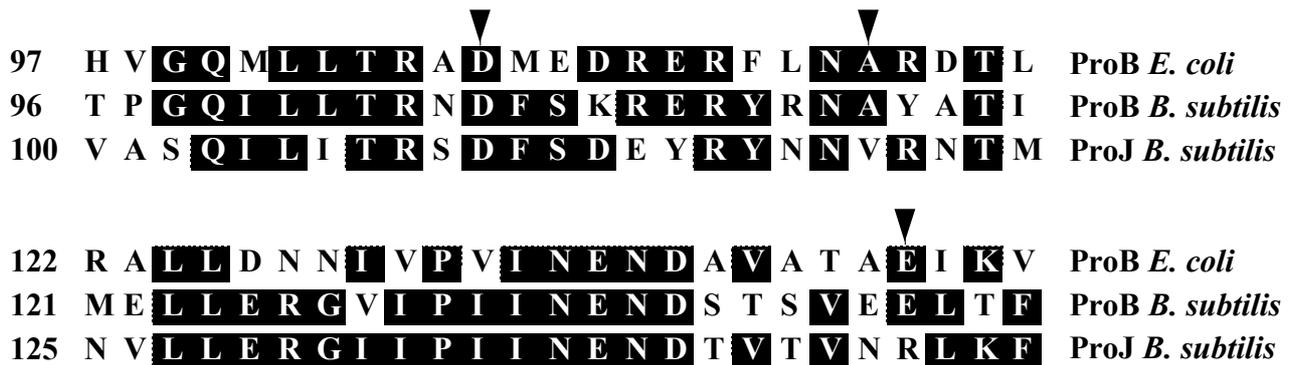


Abb. 20 Vergleich der Aminosäuresequenzen der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis* mit ProB aus *E. coli*

In mindestens zwei Proteinen konservierte Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt. Die auf der linken Seite angegebenen Zahlen entsprechen der Aminosäureposition in dem jeweiligen Protein. Die für das ProB-Protein von *E. coli* identifizierte Aminosäuren an Position 107, 117 und 143, die für die Feedbackkontrolle der γ -Glutamyl-Kinase durch Prolin relevant sind, wurden durch einen Pfeil markiert.

Der *B. subtilis*-Stamm JSB15, der ein intaktes *proB*-Gen trägt, wurde bereits bei einer 3,4-Dehydro-DL-Prolin-Konzentration von 0,2 mM im Medium in seinem Wachstum inhibiert (Abb. 21A). Das Wachstum des *B. subtilis*-Stammes JSB16 dagegen wurde unter diesen Bedingungen nur geringfügig beeinflusst (Abb. 21B). Dieser ein intaktes *proJ*-Gen exprimierende Stamm, wuchs sogar in Anwesenheit von 1 mM 3,4-Dehydro-DL-Prolin (Abb. 21B), während das Wachstum von JSB15 bei dieser 3,4-Dehydro-DL-Prolin-Konzentration vollständig inhibiert wurde (Abb. 21A).

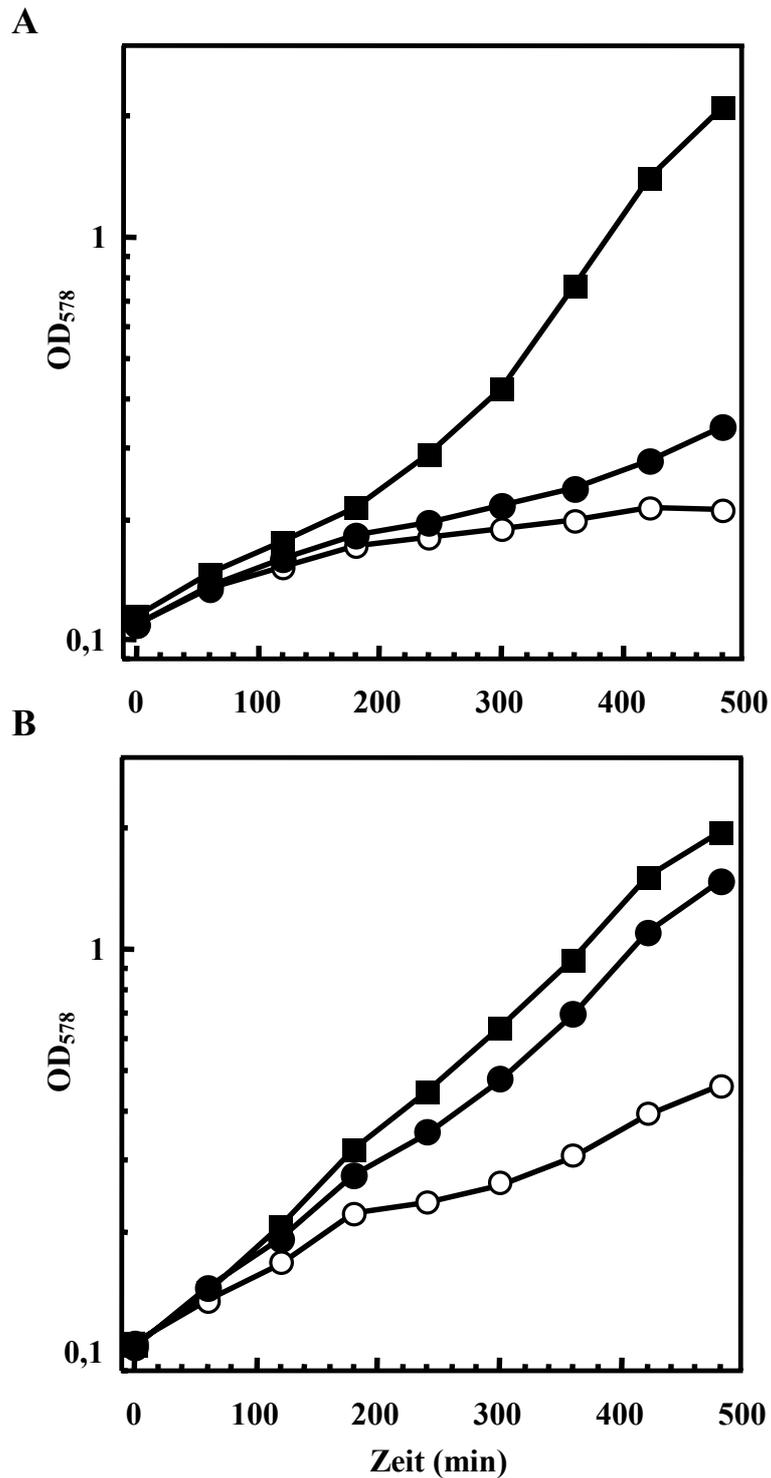


Abb. 21 Inhibition der *B. subtilis*-Stämme JSB15 und JSB16 durch das Prolinanalogen 3,4-Dehydro-DL-Prolin

Kulturen der *B. subtilis*-Stämme JSB15 [$\Delta(proJ::neo)1 proB^+$] (A) und JSB16 [$(proB::neo)1 proJ^+$] (B) wurden von Übernachtskulturen auf eine OD_{578} von 0,1 in SMM ohne (■) oder mit 0,2 mM (●), beziehungsweise 1 mM (○) 3,4-Dehydro-DL-Prolin angeimpft. Um das Wachstum des Stammes JSB16, der ein defektes *proB*-Gen trägt und daher in Minimalmedium nur schwaches Wachstum zeigt, zu ermöglichen, wurde die *proHJ*-Expression durch Zugabe von 0,6 M NaCl zu dem Medium induziert. Die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in zwei weiteren, davon unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte.

Diese physiologischen Experimente legen nahe, dass sowohl die von *proB* als auch die von *proJ* kodierte γ -Glutamyl-Kinase aus *B. subtilis* einer allosterischen Feedback-Kontrolle durch Prolin unterliegen. Das ProJ-Enzym weist jedoch eine weitaus geringere Sensibilität gegenüber dieser Endprodukthemmung auf als das paraloge ProB-Enzym.

4. Die Kontrolle der Expression der anabolen Prolinbiosynthesegene erfolgt in *B. subtilis* durch transkriptionelle Antitermination

Die zuvor präsentierten Daten haben gezeigt, dass die osmotische Kontrolle des von *B. subtilis* für osmoprotektive Zwecke genutzten Prolinbiosyntheseweges auf transkriptioneller Ebene erfolgt und dass das erste Enzym des anabolen Prolinbiosyntheseweges, die γ -Glutamyl-Kinase ProB, höchstwahrscheinlich einer allosterischen Feedback-Hemmung durch Prolin unterliegt. Im Folgenden wurde ein weiterer Level genetischer Kontrolle der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die für anabole Zwecke genutzte Prolinbiosynthese zudem auf Expressionsebene durch den Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination (Grundy und Henkin, 1993) reguliert wird. Dieser Mechanismus koppelt die Transkription der Prolinbiosynthesegene *proB*, *proA* und *proI* an den Prolinbedarf der Zelle. In von Chopin *et al.* (1998) durchgeführte Datenbankanalysen konnten 20 Gene in *B. subtilis* identifiziert werden, die stromaufwärts ihrer kodierenden Regionen die hochkonservierte, für diesen Regulationsmechanismus charakteristische T-Box Konsensussequenz aufweisen. Drei dieser Gene waren die Prolinbiosynthesegene *proBA* und *proI*, das zu diesem Zeitpunkt noch nicht näher charakterisiert war und als mögliches Prolinbiosynthesegen *yqjO* bezeichnet wurde.

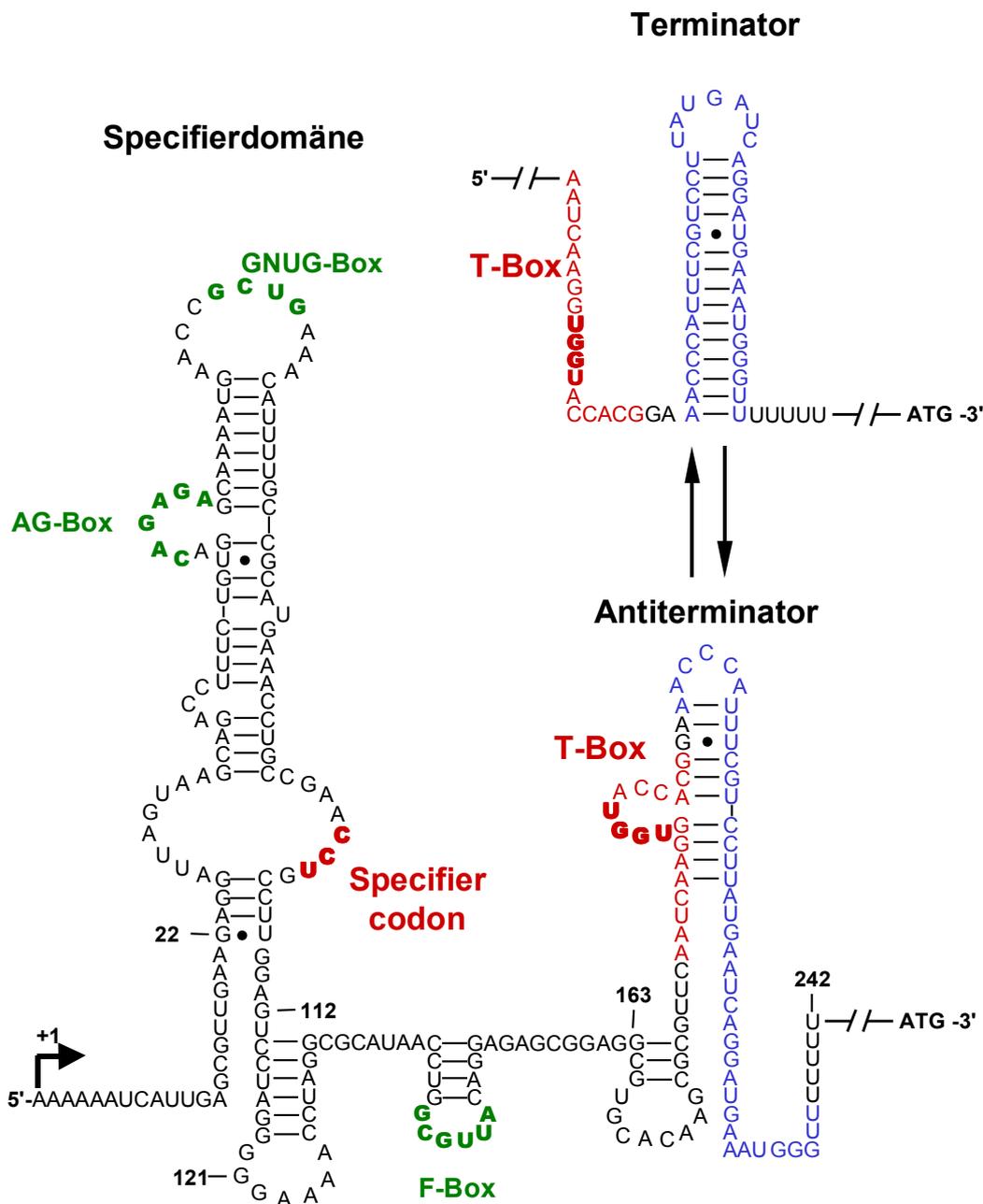
4.1 Strukturelle Analyse der *proBA* und *proI* T-Box-Leader

Bei genauer Inspektion fanden sich stromaufwärts der kodierenden Region des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens die typischen, hochkonservierten, primären Sequenzmotive und sekundären Strukturmerkmale sogenannter T-Box-Leader (Abb. 22A und 22B). Ein solcher vor den jeweiligen Strukturgenen lokalisierte Leader zeichnet sich neben der T-Box Sequenz, durch einen stromabwärts hiervon gelegenen, intrinsischen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator aus. Das Transkript dieser Region kann zudem eine alternative, sogenannte Antiterminatorstruktur annehmen (Abb. 22A und 22B). Hierbei kommt es zu einer Basenpaarung zwischen der T-Box und der hierzu komplementären Sequenz im 5'-Teil des Terminators. Die im Leader des *proI*-Gens gefundene T-Box Sequenz (Abb. 22B) entspricht perfekt der Konsensussequenz (5'-AANNNGGGTGGNACCNCG-3'; N steht für ein beliebiges Nukleotid). Die T-Box Sequenz die dem *proBA*-Operon vorangeht dagegen weist einen „Mismatch“ auf (Abb. 22A). An Stelle des ersten, hochkonservierten Guanins ist ein Adenin (Chopin *et al.*, 1998). Diese Variation wurde auch in den T-Box Sequenzen des *valsS*-Gens aus *Lactococcus casei* und *Bacillus stearothermophilus* gefunden (Grundy und Henkin, 1994). Die Basenpaarung zur Ausbildung der Antiterminatorkonformation ist auf Grund einer kompensatorischen Substitution eines Cytosins gegen ein Uracil auf der anderen Seite der Helix jedoch weiterhin gewährleistet (Abb. 22A). Wie für die bisher untersuchten Leader anderer Gene beschrieben, so liegt vermutlich auch im *proBA*-

und *proI*-Leader der zentrale Teil der T-Box (UGGNACC) in der Antiterminatorkonformation ungepaart als Schleife vor.

Sowohl der *proBA*-, als auch der *proI*-Leader zeichnen sich durch eine hochstrukturierte 5'-Hälfte, die sogenannte „Specifierdomäne“ mit dem ebenfalls in einer Schleife lokalisierten CCU „Specifiercodon“ aus (Abb. 22A und 22B). Dieses Specifiercodon ist insofern ungewöhnlich, als dass die Mehrzahl der bisher untersuchten „Specifiercodons“ einen Cytosinrest in ihrer dritten Position aufweisen. Zudem ist dieses Specifiercodon nicht vollständig komplementär zu den Anticodons, der in *B. subtilis* vorhandenen tRNA^{Pro}_{UGG} und tRNA^{Pro}_{GGG}.

A



B

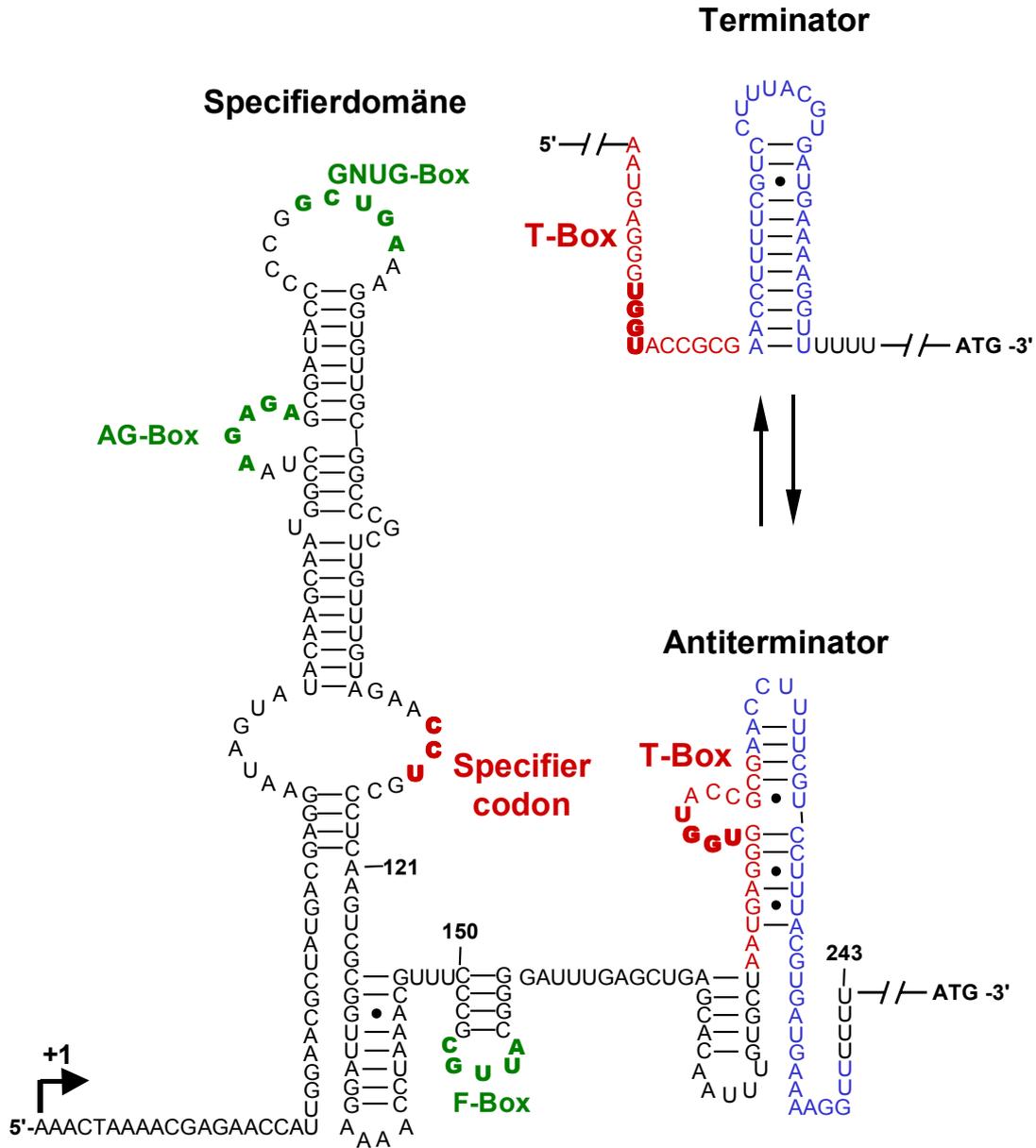


Abb. 22 Sekundärstrukturmodell der *proBA*-(A) und *proI*-(B) Leadertranskripte

Es sind die „Specifierdomänen“ und die alternativen Terminator- oder Antiterminatorkonformationen gezeigt. Der Transkriptionsstartpunkt (+1) ist durch einen Pfeil markiert. Die Zahlen geben die zu dem Transkriptionsstartpunkt relativen Positionen im Leadertranskript an. Der Translationsstartpunkt (ATG-Codon) ist an Position +272 im *proBA*-(A) und an Position +267 im *proI*-(B) Leader. Konservierte Primärsequenzelemente, durch transkriptionelle Antitermination kontrollierter Gene sind grün, die T-Box ist rot gedruckt. Die Pro (CCU) „Specifiersequenzen“ und die in der T-Box lokalisierte UGGU-Sequenz, die mit der tRNA^{Pro} wechselwirkt, sind zudem fett gedruckt. Die Terminatorsequenz ist blau dargestellt.

Es konnten zudem in beiden Fällen die in der Einleitung erwähnten, primären Sequenzelemente identifiziert werden: Die in einer Schleife der „Specifierdomäne“ lokalisierte AG-Box, die GNUG-Sequenz an der Spitze der „Specifierdomäne“ und die F-Box (Abb. 22A und 22B). Die Präsenz typischer T-Box Leadersequenzen stromaufwärts der *proBA*- und *proI*-Gene legt nahe, dass die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke in *B. subtilis* durch eine tRNA-abhängige Antitermination der Transkription kontrolliert wird.

4.2 Identifikation der *proBA*- und *proI*-Transkriptionsstartpunkte

Um die Promotoren der *proBA*- und *proI*-Gene zu identifizieren, erfolgte eine Bestimmung der jeweiligen Transkriptionsstartpunkte dieser Strukturgene mit Hilfe von Primer Extension-Analysen. Hierzu wurde die Gesamt-RNA in SMM kultivierter JH642-Zellen präpariert. Nach Hybridisierung eines zu den Nukleotiden 81 bis 70 in Abb. 23A (*proBA*) komplementären Oligonukletids und eines zu den Nukleotiden 178 bis 155 in Abb. 23B (*proI*) komplementären Oligonukleotids an die passende mRNA, dienten diese Oligonukleotide als Primer für die reverse Transkriptase. Die Reaktionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienende Sequenzreaktion, die unter Verwendung desselben Oligonukleotids durchgeführt wurde, gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 23C und 23D). Es konnte jeweils eine einzige cDNA-Spezies detektiert werden, deren Länge dem Abstand von der Oligonukleotidsequenz bis zum Transkriptionsstart des jeweiligen Gens entspricht (Abb. 23C und 23D). Der Transkriptionsstartpunkt des *proBA*-Operons liegt damit 269 bp stromaufwärts des ATG-Startcodons auf einem Adenin (Abb. 23A). In geeignetem Abstand stromaufwärts dieses Transkriptionsstartpunktes befindet sich ein möglicher σ^A -abhängiger Promotor (Helmann, 1995). Der Abstand zwischen der -35 und der -10 Region beträgt 17 bp (Abb. 23A) und ist damit optimal. Der Transkriptionsstartpunkt des *proI*-Gens ist 268 bp stromaufwärts des Startcodons auf einem Adenin lokalisiert (Abb. 23B). Stromaufwärts befinden sich auch hier mögliche -35 und -10 Konsensussequenzen eines σ^A -abhängigen Promotors. Der Abstand zwischen der -35 und der -10 Region des *proI*-Promotors beträgt 18 bp (Abb. 23B).

Abb. 23 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte *proBA*- und *proI*-spezifischer mRNA

A. und B. Nukleotidsequenz und Strukturelemente der 5'-nichtkodierenden Region von *proBA* (A) und *proI* (B). Die –10 und –35 Sequenzen der σ^A -abhängigen Promotoren sind hervorgehoben. Der jeweilige Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die putativen Ribosomenbindestellen (rbs) sind unterstrichen. Die AG-Box, die GNUG, die T-Box und die F-Box sind durch einen Rahmen markiert. Das „Specifiercodon“ und die UGGU-Sequenz sind zudem in Rot dargestellt. Die gestrichelten Pfeile markieren den jeweiligen intrinsischen Transkriptionsterminator.

C. und D. Gelelektrophoretische Analyse der *proBA*- (C) und *proI*- (D) spezifischen Primer Extension-Produkte. Gesamt-RNA aus in SMM bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) kultivierten JH642-Zellen wurde präpariert. Nach Hybridisierung eines *proBA*-spezifischen, am 5'-Ende radioaktiv [^{32}P]-markierten Oligonukleotids (*proBA*-PE1), das komplementär zu den Nukleotiden an Position 70 bis 92 (A) ist, an die passende mRNA, diente dieses Oligonukleotid als Primer für die reverse Transkriptase. Das *proI*-spezifische, am 5'-Ende mit einem Infrarotfarbstoff (IRD-800) markierte Oligonukleotids (*proI*-PE1), das komplementär zu den Nukleotiden an Position 156 bis 179 (B) ist, diente nach Hybridisierung an die passende mRNA, als Primer für die reverse Transkriptase. Die Reaktionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienende Sequenzreaktion, die unter Verwendung derselben Oligonukleotide auf den Plasmiden pJS2 (C) oder pJS18 (D) durchgeführt wurde, gelelektrophoretisch aufgetrennt.

4.3 Spezifische Induktion der *proBA*-Expression durch Prolinlimitation

Um im Folgenden zu untersuchen, ob die *proBA*-Expression tatsächlich einer an den Prolinbedarf der Zelle gekoppelten Regulation unterliegt, wurde eine Operonfusion zwischen *proB* und dem Reportergen *treA* erstellt. Diese $\Phi(\textit{proB-treA})I$ Fusion wurde als Einzelkopie am chromosomalen *amyE*-Genort des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [$(\textit{treA}::\textit{neo})I$] integriert. In dem auf diese Weise konstruierten Fusionsstamm JSB5, ist das promotorlose *treA*-Gen mit einem 1016 bp Fragment fusioniert, das 576 bp der kodierenden *proB*-Region, den gesamten *proB*-Leader, den Promotor und 171 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegene Sequenz trägt. Der ausgehend von JSB5 konstruierte *B. subtilis*-Stamm JSB31, besitzt zudem ein defektes *proA*-Gen [$\textit{proA}\times\textit{pEPV1T}(\textit{tet})$], was sich in einem prolinauxotrophen Phänotyp zeigt. Beide *proB-treA* Fusionsstämme, JSB5 und JSB31, haben einen phenylalaninauxotrophen Phänotyp da sie, wie alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme, Derivate des Wildtyp-Stammes JH642 [$(\textit{trpC2} \textit{pheA1})$, J. Hoch, BGSC 1A96] sind. Für die folgenden Wachstumsversuche mit limitierenden Mengen Prolin, Phenylalanin oder Tryptophan wurden die Zellen zunächst mit einer ausreichenden Menge der jeweiligen Aminosäure vorgezogen. Die Zellen wurden dann in SMM ohne Aminosäuresupplementation gewaschen, um die Aminosäuren vollständig aus dem Medium zu entfernen und anschließend in das jeweilige Wachstumsmedium inokuliert.

Es wurde zunächst die Expression der $\Phi(\textit{proB-treA})I$ Fusion in JSB31 bei Wachstum in SMM mit einer ausreichenden Menge (0,1 mM) Phenylalanin und limitierenden Mengen (0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM oder 1,2 mM) Prolin bestimmt. Als Referenz wurde die Expression der $\Phi(\textit{proB-treA})I$ Fusion in JSB5, der ein intaktes *proA*-Gen exprimiert, in SMM mit 0,1 mM Phenylalanin aber ohne Prolin bestimmt. Die OD_{578} unter diesen Bedingungen gewachsener Kulturen wurde verfolgt (Abb. 24A) und zudem die TreA-Aktivität alle 30 Minuten bestimmt (Abb. 24B). Die Wachstumskurven zeigen, dass sich je nach zugegebener Prolinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten das Wachstum der JSB31-Kulturen drastisch reduziert. Dies geschieht dann, wenn das im Medium vorhandene Prolin nahezu aufgebraucht und damit limitierend ist. Die TreA-Aktivität in JSB5- und JSB31-Zellen, die mit einer ausreichenden Prolinmenge wachsen, ist niedrig. In JSB5 bleibt dieser basale Level erhalten, da dieser Stamm ausreichende Mengen an Prolin *de novo* synthetisieren kann. Mit einsetzender Prolinlimitierung in JSB31 steigt jedoch die TreA-Aktivität

innerhalb von 120 Minuten von einem Basallevel von 21 Einheiten auf 270 Einheiten pro mg Zellprotein an (Abb. 24B). Prolin hunger resultiert somit in einer maximal 11,7-fachen Induktion der *proBA*-Expression (Tab. 9).

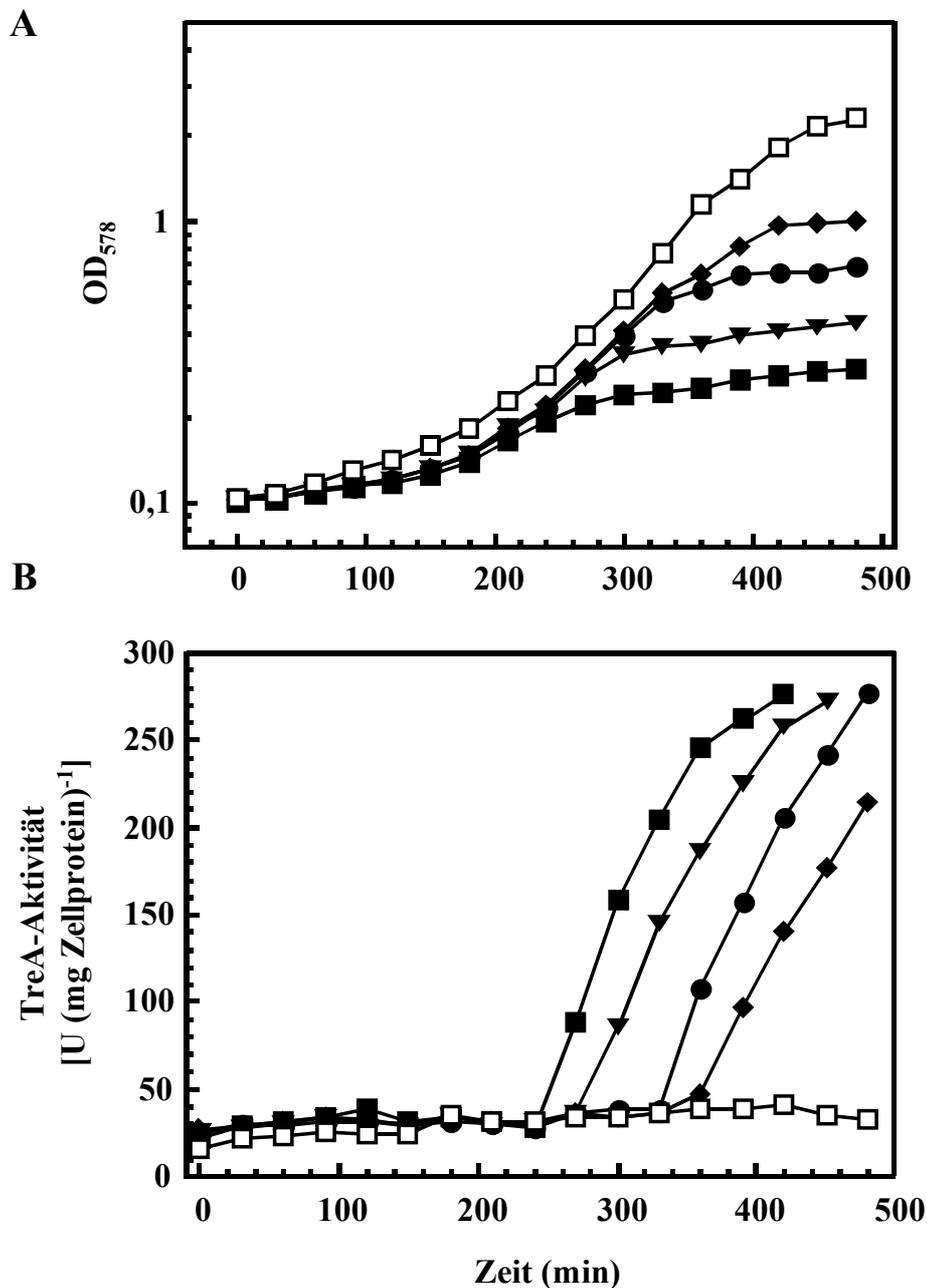


Abb. 24 Reporter genfusionanalyse der *proBA*-Expression unter prolinlimitierenden Wachstumsbedingungen

A. Gezeigt ist das Wachstum des prolinauxotrophen Stammes JSB31 [Φ (*proB-treA*)1 (*treA::neo*)1 *proA* \times pEPV1T (*tet*)] in Minimalmedium mit limitierenden Prolinmengen. Kulturen des Φ (*proB-treA*)1 Fusionsstammes JSB31, der ein defektes *proA*-Gen trägt, wurden in SMM in der Anwesenheit von 0,2 mM (■), 0,4 mM (▼), 0,8 mM (●) oder 1,2 mM (◆) Prolin und einer ausreichenden Menge (0,1 mM) Phenylalanin gezogen. Als Referenz wurde das Wachstum des *B. subtilis*-Stammes JSB5, der ebenfalls die Φ (*proB-treA*)1 Fusion, aber ein intaktes *proA*-Gen trägt, in SMM mit 0,1 mM Phenylalanin aber ohne Prolin (□) verfolgt. **B.** Expression der Φ (*proB-treA*)1 Fusion unter prolinlimitierenden Wachstumsbedingungen. Aus den unter (A) beschriebenen Kulturen wurde alle 30 Minuten Aliquots entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt. Diese ist unter Verwendung derselben Symbole aufgetragen. Die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in zwei weiteren, davon unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte.

Die Expression der $\Phi(\textit{proB-treA})1$ Fusion in JSB31 wurde zudem in Kulturen untersucht, die mit ausreichend Prolin (10 mM) und einer ausreichenden (0,1 mM) oder limitierenden Menge (0,032 mM oder 0,016 mM) Phenylalanin wuchsen. Eine Phenylalaninlimitation führte jedoch zu keiner Induktion der *proBA*-Expression (Tab. 9). Es wurde zudem überprüft, ob eine Tryptophanlimitation zu einer verstärkten *proBA*-Expression führt, diese konnte jedoch ausschließlich durch Prolinlimitation induziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse beweisen, dass die Expression des *proBA*-Operons spezifisch durch Prolinhunger induziert wird, nicht jedoch durch allgemeinen Aminosäuremangel.

Tab. 9 Der Effekt von Mutationen in der „Specifierdomäne“ auf die Induktion der *proB-treA* Expression

<i>proB-treA</i> Fusionsstamm ^a	„Specifierdomäne“ ^b	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹] ^c					
		Prolinhunger		Induktion (-fach)	Phenylalanin- hunger		Induktion (-fach)
		-	+		-	+	
JSB31 (Wt) $\Phi(\textit{proB-treA})1$	CCUGCCGAAC <u>CCUG</u> CCU	21±4	270±21	11,7	12±2	10±1	0,8
JSB31 Mut1 $\Phi(\textit{proB-treA})2$	CCUGCCGAA <u>UUC</u> GCCU	11±2	13±1	1,2	6±1	40±3	6,7
JSB31 Mut2 $\Phi(\textit{proB-treA})3$	CCUGCCGAAC <u>CCU</u> <u>GUUC</u>	13±2	12±1	0,9	9±2	11±1	1,1
JSB31 Mut3 $\Phi(\textit{proB-treA})4$	<u>UUC</u> GCCGAAC <u>CCUG</u> CCU	8±1	10±2	1,3	9±1	8±2	0,9

^aDie aufgelisteten *B. subtilis*-Stämmen sind sowohl auxotroph für Prolin [*proA*× pEPV1T (*tet*)] als auch für Phenylalanin [*pheA1*]. Wt, Wildtypfusion ^bMutationen in der „Specifierdomäne“ sind unterstrichen, das „Specifiercodon“ ist in Rot dargestellt. ^cZellen der aufgeführten Stämme wurden in SMM mit ausreichend (10 mM; Prolinhunger: -) oder mit limitierenden Mengen (0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM und 1,2 mM; Prolinhunger: +) Prolin und ausreichend (0,1 mM; Phenylalaninhunger: -) oder limitierenden Mengen (0,016 mM und 0,032 mM; Phenylalaninhunger: +) Phenylalanin gezogen. Das Wachstum wurde verfolgt und alle 30 Minuten wurde die TreA-Aktivität bestimmt. Die gezeigten TreA-Aktivitäten sind Mittelwerte der maximal gemessenen *proB-treA* Induktionen ± Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

4.4 Eine spezifische Induktion der *proBA*-Expression durch Prolinlimitation wird durch das CCU-„Specifiercodon“ gewährleistet

Um im nächsten Schritt die Relevanz des „Specifiercodons“ an der gezeigten Position im *proBA*-Leader (Abb. 22A) für eine ausschließlich prolinabhängige *proBA*-Induktion nachzuweisen, wurden Austausche dreier, in der *proBA*-„Specifierregion“ lokalisierter, CCU-Triplets gegen UUC-Triplets vorgenommen (Tab. 9). Die mittels ortsgerichteter Mutagenese erhaltenen Derivate des pJS5-Plasmids, pJS5Mut1, pJS5Mut2 und pJS5Mut3, tragen mit dem *treA*-Gen fusionierte Derivate

des *proBA*-Leaders. Die auf diesen Plasmiden kodierten $\Phi(\textit{proB-treA})$ Fusionen wurden mittels Transformation als Einzelkopie in den chromosomalen *amyE*-Genort des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)I*] eingebracht. In die auf diese Weise konstruierten Stämme, JSB5 Mut1, JSB5 Mut2 und JSB5 Mut3 wurde zudem das defekte *proA*-Allel [*proA*× pEPV1T (*tet*)] eingebracht.

In dem auf die oben beschriebene Weise konstruierten Stamm JSB31 Mut1 liegt eine veränderte Aminosäureidentität des „Specifiertriplets“ selbst vor. An Stelle des CCU-Codons (Prolin) ist hier ein UUC-Codon (Phenylalanin) lokalisiert (Tab. 9). Es wurde die maximal erreichte TreA-Aktivität in Kulturen des $\Phi(\textit{proB-treA})2$ Fusionstammes JSB31 Mut1 bestimmt, die unter prolin- oder phenylalaninlimitierten Bedingungen gewachsen sind. Wie in Tab. 9 gezeigt, führt der Austausch des CCU-„Specifiertriplets“ gegen ein UUC-Triplett zu einem vollständigen Verlust der Induktion durch Prolinlimitation. Es kommt jedoch zu einer Spezifitätsveränderung dahingehend, dass die $\Phi(\textit{proB-treA})2$ Fusion durch eine Phenylalaninlimitation induziert werden kann. Die Expression der $\Phi(\textit{proB-treA})2$ Fusion in JSB31 Mut1 wurde dazu in Kulturen untersucht, die mit ausreichend Prolin (10 mM) und limitierender Menge (0,032 mM oder 0,016 mM) Phenylalanin wuchsen (Abb. 25A und 25B). Phenylalaninhunger resultiert in einer 6,7-fachen Induktion der *proBA*-Expression in JSB31 Mut1 (Abb. 25B, Tab. 9). Die Identität des CCU-Codons an dieser Position determiniert somit die Spezifität der Antwort für eine Prolinlimitation. Die maximale Induktion der $\Phi(\textit{proB-treA})2$ Fusion durch Phenylalaninhunger ist jedoch deutlich geringer als die, für die Wildtypfusion $\Phi(\textit{proB-treA})1$ ermittelte, maximale Induktion durch Prolinhunger (Tab. 9). Daraus lässt sich ableiten, dass die tRNA^{Phe}_{GAA} zwar mit dem mutierten *proBA*-Leader interagiert, diese Interaktion jedoch weniger effizient ist als die Interaktion der tRNA^{Pro}_{UGG}, oder tRNA^{Pro}_{GGG} mit dem Wildtyp-Leader. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass noch andere Sequenz- und Strukturelemente des Leaders und der tRNA an der Spezifizierung dieser Antwort und der Stabilisierung der Antiterminatorkonformation beteiligt sein müssen.

Sowohl stromaufwärts, als auch stromabwärts des Specifiertriplets ist je ein weiteres CCU-Triplett lokalisiert (Abb. 22A). In dem $\Phi(\textit{proB-treA})3$ Fusionstamm JSB31 Mut2 und dem $\Phi(\textit{proB-treA})4$ Fusionstamm JSB31 Mut3 wurden diese ebenfalls durch ortsgerichtete Mutagenese gegen ein UUC-Triplett ausgetauscht (Tab. 9). Die Transformation eines dieser CCU-Triplets (Pro) in ein UUC-Triplett (Phe) führte zu einem vollständigen Verlust der *proBA*-Induktion durch Prolinhunger (Tab. 9, Abb. 26A und 26B). Dies ist verständlich, da es durch den Austausch zum Verlust von Basenpaarungen in dem Stamm ober- und unterhalb des, in einer Schleife lokalisierten, „Specifiertriplets“ kommt (Abb. 22A). Der Austausch des 5'-gelegenen CCU-Triplets gegen UUC führt zum Verlust von zwei Basenpaarungen. Der Austausch des 3'-gelegenen CCU-Triplets führt zum Verlust der geschlossenen Stammstruktur stromabwärts des „Specifiertriplets“ (Abb. 22A). Die *proBA*-Expression in JSB31 Mut2 und JSB31 Mut3 kann auch nicht durch eine Phenylalaninlimitation induziert werden (Tab. 9), was bedeutet dass diese Mutationen keine Spezifitätsveränderung bedingen.

Mit Hilfe der präsentierten Experimente konnte die exakte Position des „Specifiertriplets“ im *proBA*-Leader eindeutig nachgewiesen werden.

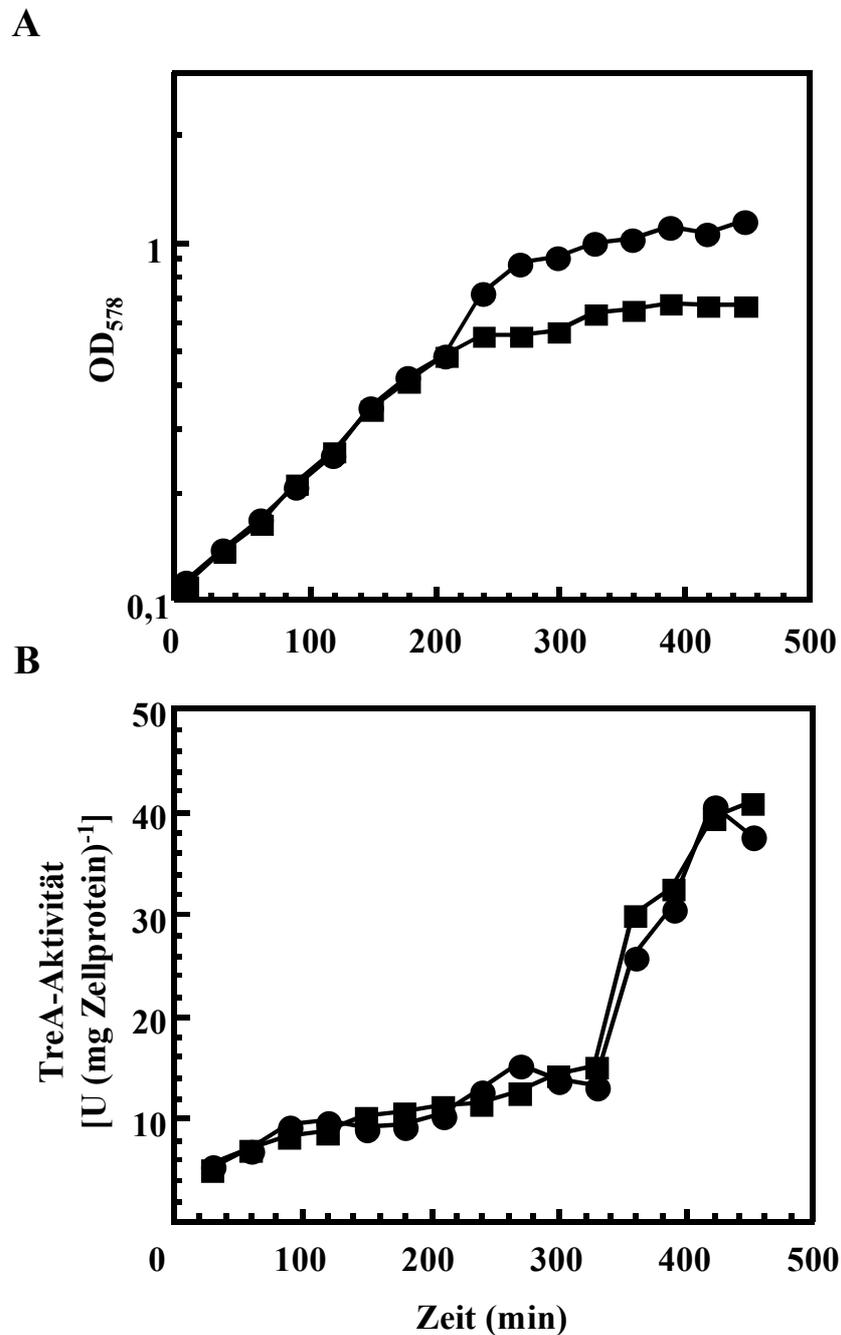


Abb. 25 Die Expression der $\Phi(\text{proB-treA})2$ Fusion in dem Stamm JSB31 Mut1 ist dem Phenylalaninbedarf der Zelle angepasst

A. Gezeigt ist das Wachstum des $\Phi(\text{proB-treA})2$ Fusionsstammes JSB31 Mut1 in Minimalmedium mit limitierenden Phenylalaninmengen. Kulturen des JSB31 Mut1 Stammes, der an Stelle des CCU-, „Specifiereodon“ (Pro) ein UUC-Codon (Phe) trägt, wurden in SMM mit 0,032 mM (●) oder 0,016 mM (■) Phenylalanin gezogen. **B.** Expression der $\Phi(\text{proB-treA})2$ Fusion in JSB31 Mut1 unter phenylalaninlimitierenden Wachstumsbedingungen. Aus den unter (A) beschriebenen Kulturen wurde alle 30 Minuten Aliquots entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt. Diese wurde unter Verwendung derselben Symbole aufgetragen. Die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in zwei weiteren, davon unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte.

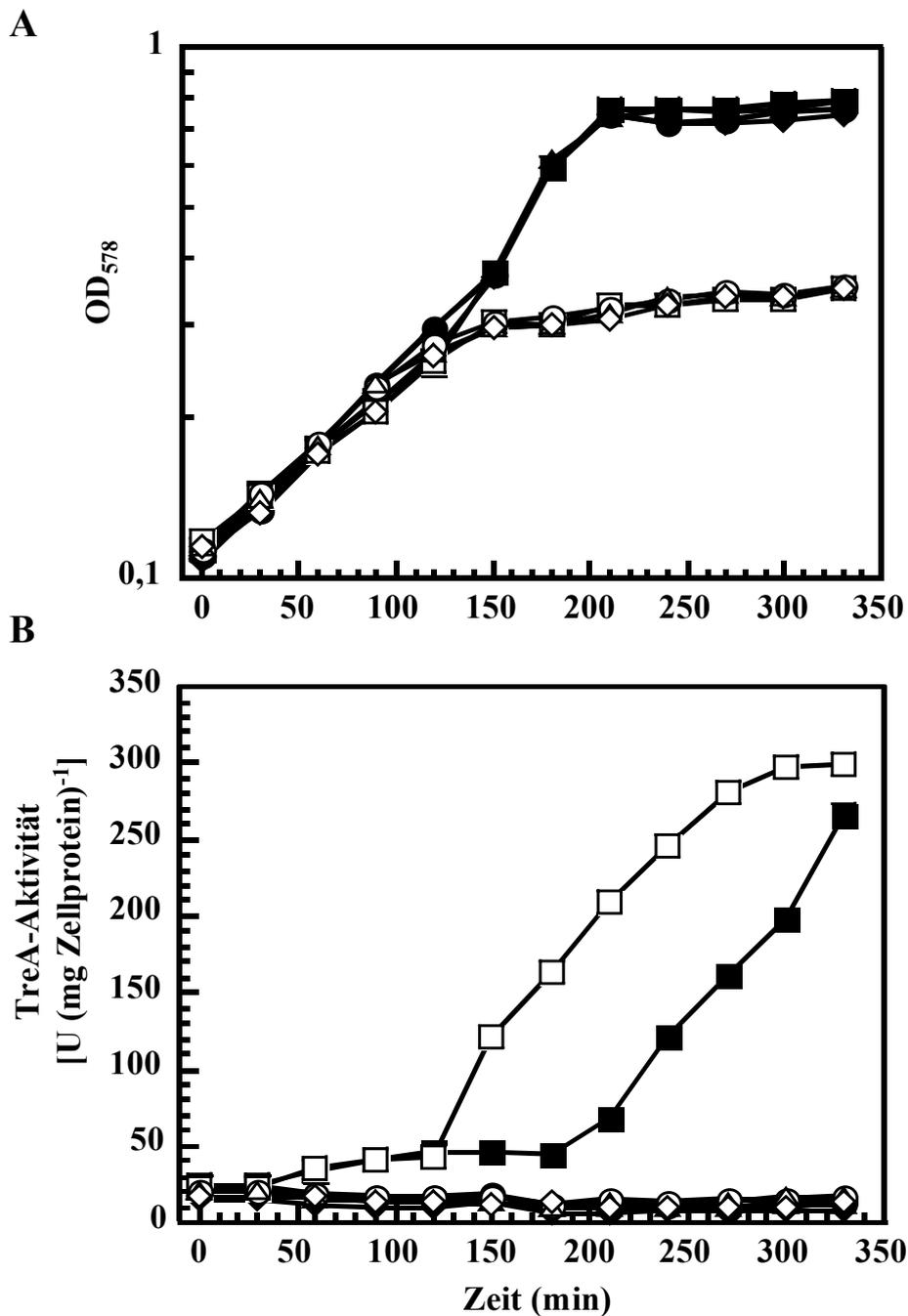


Abb. 26 Ein Austausch der unmittelbar 5' und 3' des „Specifiercodons“ lokalisierten CCU-Triplets führt zum Verlust der prolinabhängigen Induktion der *proBA*-Expression

A. Kulturen der Stämme JSB31 (■ □), JSB31 Mut1 (● ○), JSB31 Mut2 (▲ △) und JSB31 Mut3 (◆ ◇) wurden in SMM mit 0,2 mM (offene Symbole), oder 0,8 mM (geschlossene Symbole) Prolin gezogen. **B.** Expression der Φ (*proB-treA*) Fusionen unter prolinlimitierenden Wachstumsbedingungen. Aus den unter (A) beschriebenen Kulturen wurde alle 30 Minuten Aliquots entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt. Diese wurde unter Verwendung derselben Symbole aufgetragen. Die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in zwei weiteren, davon unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte.

4.5 Northern-Blot-Analyse der *proBA* und *proI* mRNA vor und während Prolinhunger

Die Präsenz der T-Box leadertypischen Elemente stromaufwärts von *proI*, legt eine Induktion der Expression dieses Gens durch Prolinlimitation nahe. Zur Überprüfung dieser Annahme und Verifizierung der für die *proBA*-Regulation gewonnenen Daten auf mRNA-Ebene wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Das Wachstum der prolinauxotrophen *B. subtilis*-Stämme JSB41 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})\Delta(\textit{proG}::\textit{ble})\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})\textit{I}$] (Abb. 27A), der defekt im letzten Schritt der Prolinbiosynthese ist (Belitsky *et al.*, 2001) und JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})\textit{I}$] (Abb. 27B) in SMM mit einer ausreichenden (10 mM) oder limitierenden (0,6 mM) Menge an Prolin wurde verfolgt. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten aus den prolinlimitierten Kulturen (t1, t2 und t3 in Abb. 27A und 27B) und je einmal (zum Zeitpunkt t2) aus den nicht gehungerten Kulturen.

Die aus JSB41 präparierte RNA wurde anschließend mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, *proB*-spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Sonde 1, Abb. 28A) hybridisiert, die zu der gesamten regulatorischen Region und 575 Nukleotiden der *proB*-kodierenden Region komplementär ist. Es konnte ein langes Gesamttranskript von 2700 nt Länge detektiert werden, das unter Prolinhungerbedingungen deutlich verstärkt exprimiert wird (Abb. 27C). Die Länge dieses Transkriptes stimmt gut mit der kalkulierten Distanz (2,67 kb) zwischen dem *proBA*-Promotor und einem stromabwärts von der kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator überein. Es konnte zudem unter allen Bedingungen ein kurzes terminiertes Transkript detektiert werden (Abb. 27C), was mit einer Länge von circa 240 nt vermutlich das gleiche 5'-Ende wie das lange Transkript aufweist, aber an dem, im *proBA*-Leader lokalisierten, intrinsischen Terminator endet (Abb. 23A). Unter Prolinhungerbedingungen taucht ein weiteres Transkript von circa 2500 nt Länge auf (Abb. 27C). Die Herkunft dieses Transkriptes wurde, wie im folgenden Kapitel 4.6 dargestellt, im Detail untersucht.

Die unter den beschriebenen Bedingungen aus JSB11 präparierte RNA wurde mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, *proI*-spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Sonde 1, Abb. 29A) hybridisiert, die zu der gesamten Leaderregion und 640 Nukleotiden der kodierenden Region komplementär ist. Es konnte ein langes Gesamttranskript von 1100 nt Länge detektiert werden, das unter Prolinhungerbedingungen deutlich verstärkt exprimiert wird (Abb. 27D). Die Transkriptlänge entspricht der kalkulierten Distanz (1,14 kb) zwischen dem *proI*-Transkriptionsstart und einem stromabwärts von der kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator. Es konnte zudem unter allen Bedingungen ein kurzes, terminiertes Transkript detektiert werden (Abb. 27D), was mit einer Länge von circa 240 bp vermutlich das gleiche 5'-Ende wie das lange Transkript aufweist und an dem ersten, intrinsischen Terminator endet (Abb. 23B). Es wurde eine zweite Bande, die einer Länge von circa 200 bp entspricht detektiert (*), deren Herkunft nicht erklärt werden kann. Unter Prolinhungerbedingungen kommt es zu einer 3,2-fachen Induktion der Expression des Gesamttranskriptes (Abb. 27D). Hiermit konnte gezeigt werden, dass auch die Expression des *proI*-Gens an den Prolinbedarf der Zelle gekoppelt ist. Verglichen mit dem *proBA*-Operon liegt eine dreifach geringere Induktion der Expression des *proI*-Gens durch Prolinmangel vor. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Präsenz dreier weiterer Gene (*proH*, *proG* und *comER*) sein, die in *B. subtilis* für Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen

kodieren (Belitsky *et al.*, 2001). Die Expression des *proA*-Gens hingegen ist essentiell für *B. subtilis*, was eine stärkere Induktion der *proBA*-Expression durch Prolinhunger rechtfertigt.

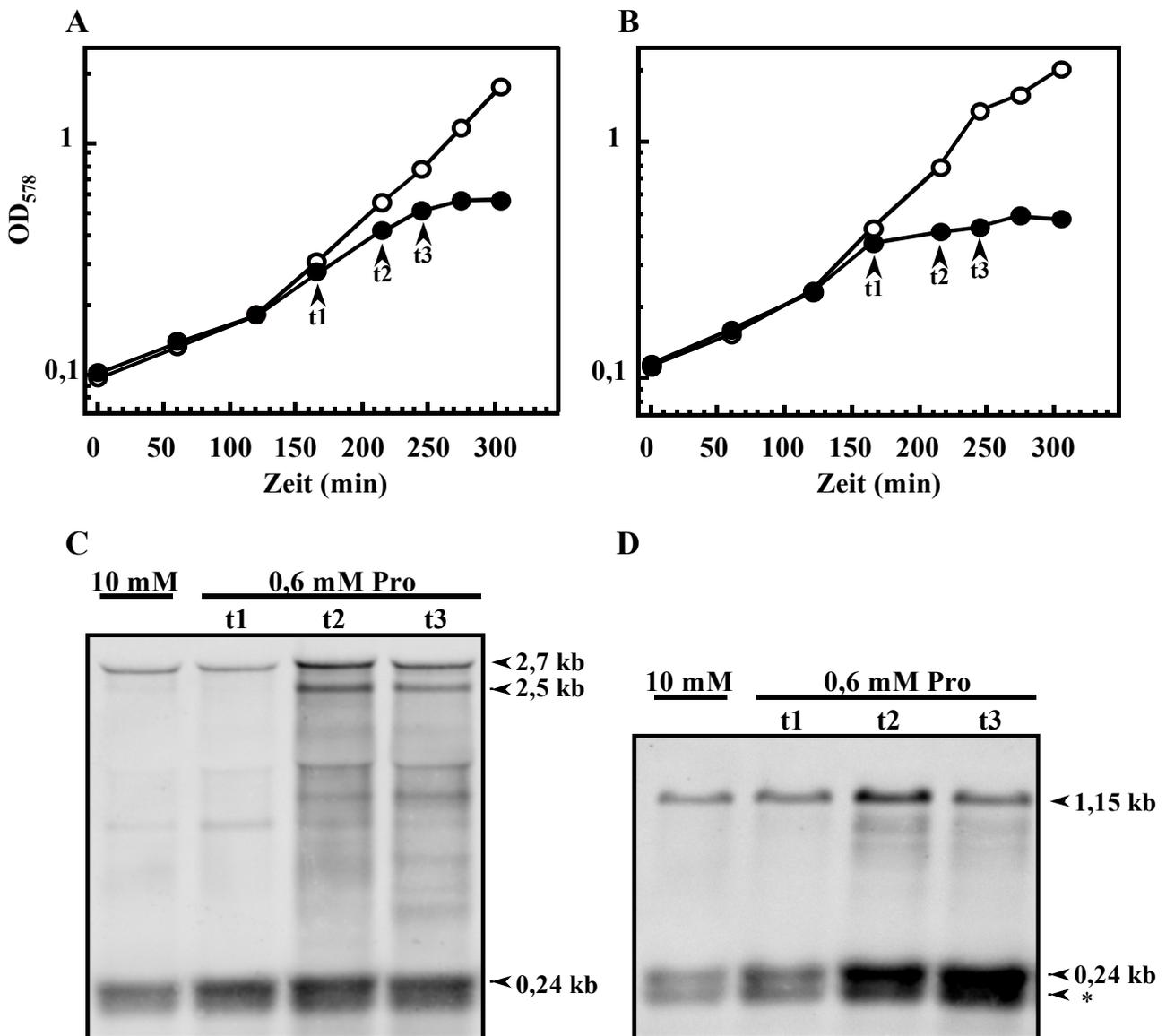


Abb. 27 Northern-Blot-Analyse der *proBA*- und *proI*-mRNA unter Prolinhungerbedingungen
A. und **B.** Dargestellt ist das Wachstum der prolinauxotrophen *B. subtilis*-Stämme JSB41 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})1 \Delta(\textit{proG}::\textit{ble})1 \Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$] (**A**) und JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})1$] (**B**) in SMM mit einer ausreichenden (10 mM; ○) oder limitierenden (0,6 mM; ●) Menge Prolin.
C. und **D.** Die Gesamt-RNA wurde zu den drei, mit einem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkten (t1, t2 und t3) aus den prolinlimitierten Kulturen und einmal zum Zeitpunkt t2 aus den nicht gehungerten Kulturen präpariert. 15 μg der aus JSB41 präparierten RNA wurden mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten, *proB*-spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde hybridisiert (**C**). Diese Sonde ist komplementär zu der gesamten regulatorischen Region und 575 Nukleotiden der *proB*-kodierenden Region. 15 μg der aus JSB11 präparierten RNA wurden mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten, *proI*-spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde hybridisiert (**D**). Diese Sonde ist komplementär zu der gesamten regulatorischen Region und 640 Nukleotiden der *proB*-kodierenden Region. Die *proB*- und *proI*-spezifischen RNA-Sonden entsprechen den Sonden 1 in Abb. 28A und 29A.

Mit den *B. subtilis*-Stämmen JSB33 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proI'*-*treA*)1 *yqjP'* *cat*] [*proA* × pEPV1T(*tet*)] und JSB47 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ (*proI'*-*treA*)2 *yqjP'* *cat*] [*proA* × pEPV1T(*tet*)] wurden für *proI* ebenfalls *treA*-Repotergenfusionen in einem ProA⁻-Hintergrund konstruiert. In, zu den in Abschnitt 4.3 beschriebenen, analogen Prolinhungerexperimenten konnte jedoch keine eindeutig verstärkte Expression dieser *proI*-*treA* Fusion unter Prolinlimitation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der zu *proBA* nahezu identischen Leaderstruktur und der eindeutigen Northernblotdaten, die eine Induktion der *proI*-Expression bei Prolinlimitation nachweisen, wird jedoch davon ausgegangen, dass die Expression des *proI*-Gens ebenfalls der transkriptionellen Antitermination unterliegt.

4.6 Unter Prolinmangelbedingungen erfolgt eine Prozessierung des *proBA*-Primärtranskriptes

Condon *et al.* (1996b) konnten für einige, der durch ein T-Box Element regulierten Gene, einen zusätzlichen Level regulatorischer Komplexität nachweisen. Die nicht-translatierte Leaderregion des Threonyl-tRNA Synthetasegens (*thrS*) und einiger weiterer Mitglieder der T-Box Familie wird zwischen der T-Box und dem ersten, intrinsischen Transkriptionsterminator prozessiert (Abb. 3). Die Abspaltung des *thrS*-Leaders findet verstärkt unter Threoninmangelbedingungen statt (Condon *et al.*, 1996b; Condon *et al.*, 1997). Die entstehende, reife *thrS* mRNA besitzt einen Terminator an beiden Enden und weist deshalb eine signifikant höhere Stabilität als das Gesamttranskript auf (Condon *et al.*, 1996b; Condon *et al.*, 1997). Mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen sollte daher untersucht werden, ob die Leader der *proBA*- und *proI*-Gesamttranskripte ebenfalls prozessiert werden.

Es wurde die Gesamt-RNA aus in SMM mit einer ausreichenden (10 mM) oder limitierenden (0,6 mM) Menge an Prolin gewachsenen JSB41-Zellen präpariert. Zwei mal exakt die gleichen RNA-Mengen wurde elektrophoretisch auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Diese wurde anschließend in zwei Teile geschnitten. Ein Teil wurde mit der, bereits für den in Abschnitt 4.5 beschriebenen Northern-Blot genutzten, *proB*-spezifischen Sonde 1 (Abb. 28A) hybridisiert. Der zweite Teil der Membran wurde mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, einzelsträngigen 276 nt RNA-Sonde 2 (Abb. 28A) hybridisiert, die spezifisch für den *proB*-Leader ist und deren 5'-Ende in der T-Box lokalisiert ist. Sie besitzt somit keine zu dem intrinsischen Terminator komplementären Bereiche. Von beiden Sonden wurden das 2700 nt lange, unter Prolinhungerbedingungen verstärkt gebildete Gesamttranskript und das kurze, terminierte, 240 nt lange Transkript detektiert (Abb. 28B). Sonde 1 detektierte zudem die 2500 nt lange mRNA-Spezies, welche von der, nur zu dem *proB*-Leader komplementären Sonde 2 nicht detektiert wurde (Abb. 28B). Dieses Transkript entspricht somit einem Spaltprodukt der Gesamt-mRNA (*proBA*), ohne den *proB*-Leader. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil der *proBA*-Leaderregion unter Prolinhungerbedingungen prozessiert wird. Eine Quantifizierung der Intensität der beiden Banden, die dem Gesamttranskript und dem prozessierten Transkript entsprechen, ergab einen insgesamt 11,3-fachen Anstieg der *proBA*-Transkription. Das korreliert

perfekt mit den aus den *proB-treA* Fusionsstudien gewonnenen Daten, bei welchen ein 11,7-facher Anstieg ermittelt wurde (Tab. 9).

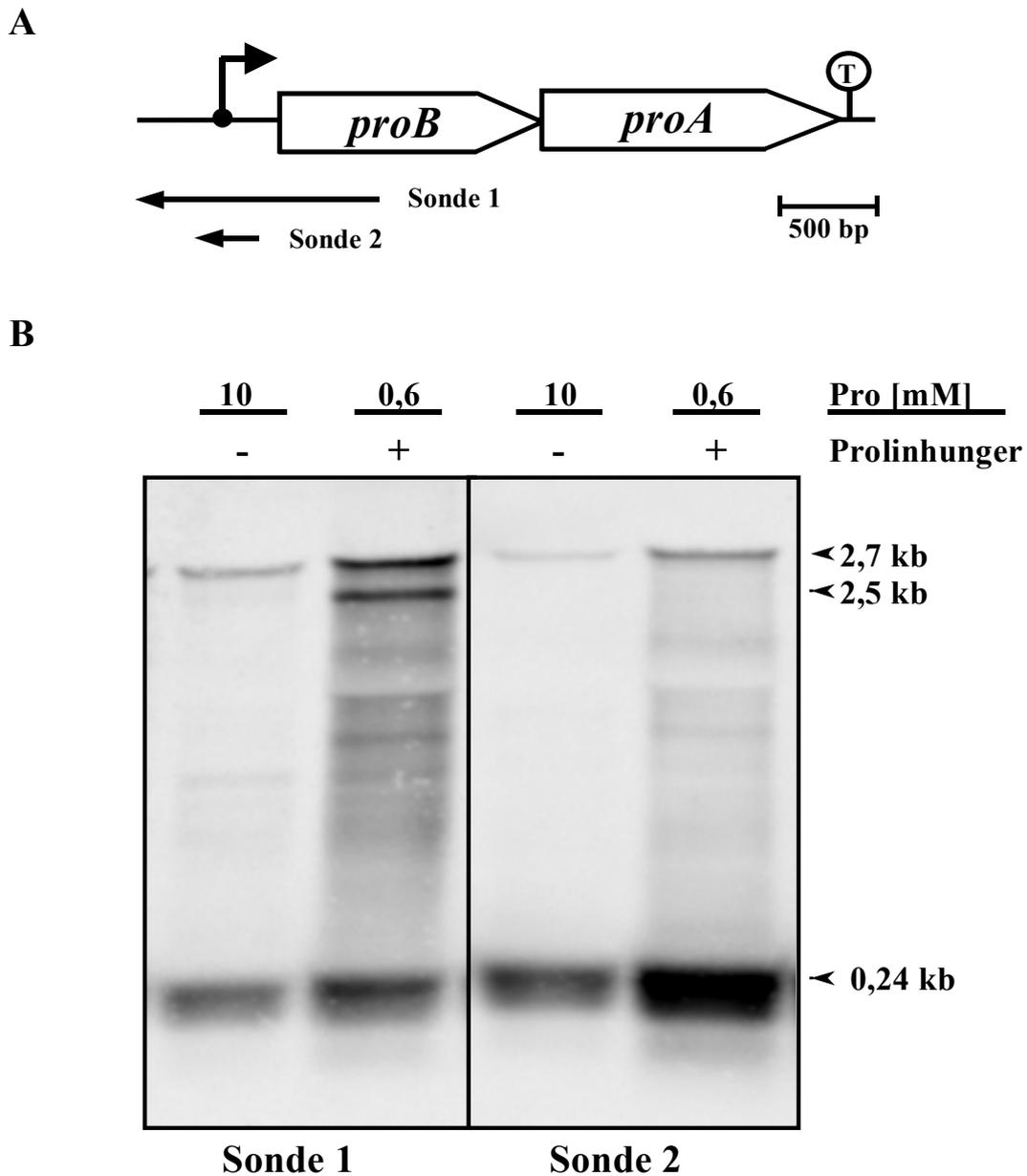


Abb. 28 Die *proBA*-mRNA wird unter Prolinhungerbedingungen prozessiert

A. Genetische Organisation der *proBA*-Genregion. Die Position des σ^A -abhängigen Promotors und des putativen faktorunabhängigen Transkriptionsterminators [T] sind angegeben. Die Lage der spezifischen, für die Hybridisierung verwendeten RNA-Sonden 1 und 2 ist ebenfalls angegeben. **B.** Northern-Blot-Analyse der *proBA*-mRNA. Die Gesamt-RNA des in SMM mit ausreichend (10 mM; Prolinhunger: -) oder einer limitierenden Menge (0,6 mM; Prolinhunger: +) Prolin kultivierten *B. subtilis*-Stammes JSB41 [$\Delta(\textit{proI}::\textit{spc})1$ $\Delta(\textit{proG}::\textit{ble})1$ $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$] wurde präpariert. 15 μg dieser RNA wurden der Größe entsprechend mittels Elektrophorese auf einem 1,2 %-igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Diese wurde anschließend in zwei Teile geschnitten. Ein Teil wurde mit der DIG-markierten, *proB*-spezifischen RNA-Sonde 1 (A), die komplementär zur regulatorischen Region und 575 nt der *proB*-kodierenden Region ist, hybridisiert. Der zweite Teil der Membran wurde mit der Digoxigenin (DIG)-markierten, einzelsträngigen, 276 nt langen RNA-Sonde 2 hybridisiert, die spezifisch für den *proB*-Leader ist und deren 5'-Ende in der T-Box lokalisiert ist. Sie besitzt somit keine zu dem intrinsischen Terminator komplementären Bereiche.

Im Vergleich zum *thrS*-Gen, wo ein Anteil der prozessierten *thrS*-mRNA an der gesamten, nicht-terminierten *thrS*-mRNA von 86 % ermittelt wurde (Condon *et al.*, 1996b), macht die prozessierte *proBA*-mRNA nur einen Anteil von 33 % an der gesamten, nicht-terminierten *proBA*-mRNA aus. In Zellen, die keiner Prolinlimitation ausgesetzt waren, liegt die gesamte *proBA*-mRNA in ihrer nicht-prozessierten Form vor (Abb. 28B), was beweist, dass eine Prozessierung des *proBA*-Transkripts ausschließlich unter Prolinhungerbedingungen stattfindet.

Im folgenden wurde untersucht, ob auch das *proI*-Gesamttranskript unter Prolinhungerbedingungen prozessiert wird. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus in SMM mit einer ausreichenden (10 mM) oder limitierenden (0,6 mM) Menge an Prolin gewachsenen JSB11-Zellen präpariert und wie zuvor beschrieben behandelt. Ein Teil der Membran wurde mit der, bereits für den in Abschnitt 4.5 beschriebenen Northern-Blot genutzten, *proI*-spezifischen Sonde 1 (Abb. 29A) hybridisiert. Der zweite Teil der Membran wurde mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, einzelsträngigen, 241 nt RNA-Sonde hybridisiert, die spezifisch für den *proI*-Leader ist (Sonde 2, Abb. 29A). Von beiden Sonden wurden das 1100 nt lange, unter Prolinhungerbedingungen verstärkt gebildete Gesamttranskript und die kurzen, terminierten 240 nt und 200 nt langen Transkripte detektiert (Abb. 29B). Das 200 nt Transkript weist somit das gleiche 5'-Ende, wie die beiden anderen Transkripte auf. Da mit Sonde 1 keine weiteres *proI*-Transkript detektiert wurde, kann man davon ausgehen, dass keine Prozessierung der *proI*-mRNA unter Prolinhungerbedingungen stattfindet.

4.7 Die Anwesenheit des Prolinanalogs 3,4-Dehydro-DL-Prolin beeinflusst die *proBA*-Expression nicht

Wie in Kapitel 3 dargestellt, wird das Wachstum des ProB^+ProJ -Stammes JSB15 bei einer 3,4-Dehydro-DL-Prolin-Konzentration von 1 mM im Medium (SMM) vollständig inhibiert (Abb. 21A). Aus diesen physiologischen Experimente wurde gefolgert, dass die von *proB* kodierte γ -Glutamyl-Kinase aus *B. subtilis* einer allosterischen Feedback-Kontrolle durch Prolin unterliegt. 3,4-Dehydro-DL-Prolin weist eine zu Prolin verwandte Strukturformel auf und wird von den meisten Organismen anstelle dieser Aminosäure in die Proteine eingebaut (Leisinger, 1996). Diese Eigenschaft des 3,4-Dehydro-DL-Prolins setzt eine Beladung der tRNA^{Pro} mit diesem Prolinanon vor aus. Es ist somit auch denkbar, dass unter diesen Wachstumsbedingungen ein Grossteil der tRNA^{Pro} mit 3,4-Dehydro-DL-Prolin beladen vorliegt und somit zu einer Termination der *proBA*-Transkription bereits am intrinsischen, ersten Terminator führt. Es sollte daher untersucht werden, ob die Anwesenheit verschiedener 3,4-Dehydro-DL-Prolin Konzentrationen im Medium die Expression einer *proB-treA* Fusion beeinflusst. Hierzu wurde an dem *amyE*-Locus des ProB^+ProJ -Stammes JSB15 die $\Phi(\text{proB-treA})I$ Fusion eingebracht. Der entstehende *B. subtilis*-Stamm JSB52 wurde in SMM ohne und mit 0,2 mM oder 1 mM 3,4-Dehydro-DL-Prolin gezogen und die TreA-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Wachstumskurve von JSB52 unter diesen Bedingungen ergab ein analoges Bild, zu dem in Abb. 21A von JSB15 gezeigten Verlauf. Die TreA-Aktivität war unbeeinflusst von der externen 3,4-Dehydro-DL-Prolin Konzentration und bewegte sich um einen Mittelwert von 30 Einheiten pro mg Zellprotein (Daten

nicht gezeigt). Eine durch die Anwesenheit von 3,4-Dehydro-DL-Prolin verminderte *proBA*-Expression kann somit ausgeschlossen werden.

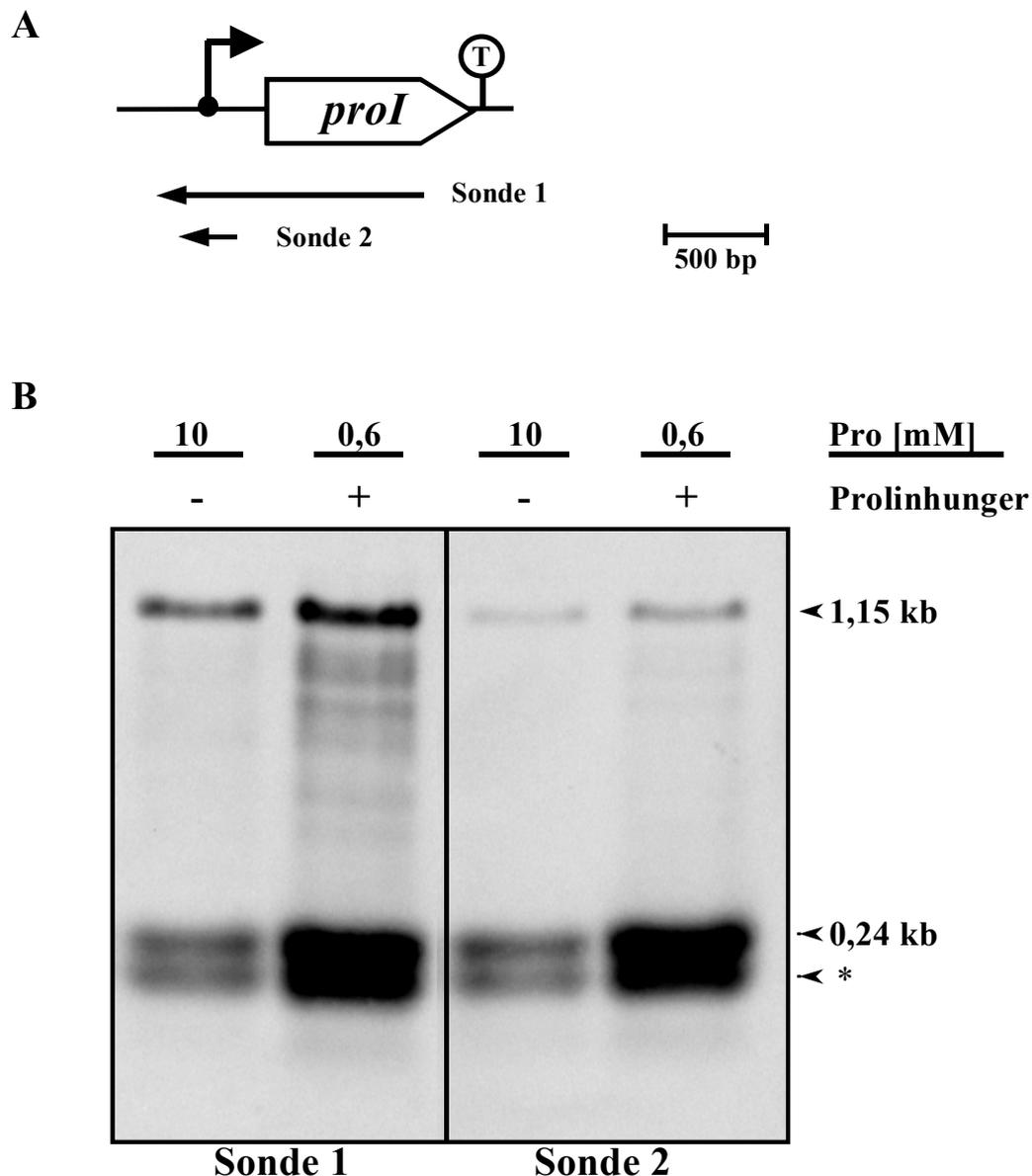


Abb. 29 Die *proI*-mRNA wird unter Prolinhungerbedingungen nicht prozessiert

A. Genetische Organisation der *proI*-Genregion. Die Position des σ^A -abhängigen Promotors und des putativen faktorunabhängigen Transkriptionsterminators [T] sind angegeben. Die Lage der spezifischen, für die Hybridisierung verwendeten RNA-Sonden 1 und 2 ist ebenfalls angegeben. **B.** Northern-Blot-Analyse der *proI*-mRNA. Die Gesamt-RNA des in SMM mit ausreichend (10 mM; Prolinhunger: -) oder einer limitierenden Menge (0,6 mM; Prolinhunger: +) Prolin kultivierten *B. subtilis*-Stammes JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})I$] wurde präpariert. 15 μg dieser RNA wurden der Größe entsprechend, mittels Elektrophorese auf einem 1,2 %-igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Diese wurde anschließend in zwei Teile geschnitten. Ein Teil wurde mit der DIG-markierten RNA-Sonde 1 (A), die komplementär zur regulatorischen Region und 640 nt der *proI*-kodierenden Region ist, hybridisiert. Der zweite Teil der Membran wurde mit der Digoxigenin (DIG)-markierten, einzelsträngigen, 241 nt langen RNA-Sonde 2 hybridisiert, die spezifisch für den *proI*-Leader ist und deren 5'-Ende in der T-Box lokalisiert ist. Sie besitzt somit keine zu dem intrinsischen Terminator komplementären Bereiche.

5. Akkumulation der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide

Eine weitere Quelle für kompatible Solute stellen Peptide dar. Die Rolle exogener Peptide für die Osmostressprotektion wurde erstmalig für das in Lebensmitteln gefundene, pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes*, den Verursacher der Listeriose, beschrieben (Amezaga *et al.*, 1995). Unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen führt die Aufnahme Peptiden, die Glycin, Hydroxyprolin oder Prolin enthalten, in *L. monocytogenes* zu einer Akkumulation der Peptide selbst und der durch den Abbau der Peptide freigesetzten Aminosäuren (Amezaga *et al.*, 1995). Es konnten zwei Peptidtransportsysteme für *L. monocytogenes* identifiziert werden: Ein Di- und Tripeptidtransportsystem (Verheul *et al.*, 1995) und ein Oligopeptidtransportsystem (Verheul *et al.*, 1998). Sie dienen offensichtlich primär der Aufnahme von Peptiden zur der Versorgung mit essentiellen Aminosäuren (Verheul *et al.*, 1995; Verheul *et al.*, 1998; Juillard *et al.*, 1998) oder mit Nährstoffen (Amezaga und Booth, 1999). Bisher konnte jedenfalls für keines dieser Systeme nachgewiesen werden, dass es in eine Aufnahme von Peptiden für osmoprotektive Zwecke involviert ist.

Auch *B. subtilis* besitzt zwei relativ gut charakterisierte Peptidtransportsysteme; ein Dipeptidtransportsystem (Dpp; Mathiopoulos *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1991) und ein Oligopeptidtransportsystem (Opp; Perego *et al.*, 1991). Es konnte ein weiteres Oligopeptidtransportsystem (App) in *B. subtilis* identifiziert werden, das ausschließlich Tetra- und Pentapeptide transportiert. Derivate des *B. subtilis*-Wildtypstammes 168 tragen jedoch eine „Frame-Shift“-Mutation in dem Substratbindeprotein (AppA) (Koide und Hoch, 1994), so dass das App-Transportsystem in dem für diese Untersuchungen benutzten JH642-Stamm defekt ist.

5.1 Osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons

Das ursprünglich als *dciA* bezeichnete *dpp* Operon besteht aus fünf Genen (Abb. 30A). Das erste Gen des Operons (*dppA*) wurde erst kürzlich charakterisiert. Es codiert für eine D-Amino-peptidase (Cheggour *et al.*, 2000; Remaut *et al.*, 2001), die zu einer neuen Familie von Peptidasen gehört und deren physiologische Rolle vermutlich in einer Nutzung von (D-Ala)₂-Dipeptiden unter Nährstoffmangelbedingungen besteht. Die vier weiteren Gene des *dpp*-Operons kodieren für die einzelnen Komponenten des ABC-Transportsystems: Die in der Membran lokalisierten Permeasekomponenten DppB und DppC, das ATP-Bindeprotein DppD und das Dipeptidbindeprotein DppE (Abb. 30A). Die Expression des *dpp*-Operons wird durch verschiedene Bedingungen induziert, die einen Übergang der *B. subtilis*-Zellen von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase oder die Initiation der Sporulation bedingen. Hierzu gehört vor allem eine Nährstofflimitation und ein Mangel an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen (Mathiopoulos *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1995).

Eine globale Analyse aller unter hochosmolaren Bedingungen in *B. subtilis* induzierten Gene mit Hilfe eines DNA Macroarrays (L. Steil, nicht veröffentlichte Daten) hat ergeben, dass die Expression des *dpp*-Operons zudem durch NaCl induziert werden kann. Diese Entdeckung legte die Vermutung nahe, dass Dipeptide auch in *B. subtilis* für osmoprotektive Zwecke genutzt werden

können. In den oberen Bodenschichten, dem natürlichen Habitat von *B. subtilis*, kommt es beim Verrotten organischer Materialien, das von einem Abbau langer Peptidketten durch hydrolytische Enzyme begleitet wird, zur Freisetzung großer Mengen kurzkettiger Peptide (Röhm, persönliche Mitteilung). Es wäre somit denkbar, dass Dipeptide oder kurzkettige Oligopeptide neben ihrer Funktion als Nährstoffquelle, einer Versorgung von osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen mit osmoprotektiven Substanzen dienen. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem untersucht, ob es wie für *L. monocytogenes* gezeigt, zu einer Akkumulation der Peptide selbst oder der durch hydrolytischen Abbau freigesetzten Aminosäuren kommt. Hierbei habe ich mich in meinen Studien auf die Untersuchung prolinhaltiger Di- und Tripeptide fokussiert, da für zwei dieser (Pro-Gly und Pro-Gly-Gly) bereits eine Aufnahme durch das Dpp- beziehungsweise Opp-Aufnahmesystem nachgewiesen wurde (Mathiopoulos *et al.*, 1991).

5.1.1 Northern-Blot-Analyse des *dpp*-Operons

Um eine osmotisch regulierte Expression der *dpp*-Gene zu verifizieren und zudem die Stärke der Expression in Abhängigkeit von der externen Osmolarität zu bestimmen, wurden Northern-Blot-Analysen des chromosomalen *dpp*-Genortes durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (0,7 M, 1,0 M und 1,2 M NaCl) gewachsen sind. Anschließend wurde diese RNA mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, *dppA*-spezifischen, 710 nt langen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Sonde 1; Abb. 30A) hybridisiert. Hierbei konnte eine 5500 nt lange mRNA-Spezies detektiert werden (Abb. 30B). Die Länge dieses Transkriptes entspricht damit der kalkulierten Distanz (5,48 kb) zwischen dem *dpp*-Promotor (siehe unten) und einem stromabwärts von der *dppABCDE*-kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator (Abb. 30A). Eine Quantifizierung ausschließlich dieses, einer Größe von 5500 nt entsprechenden Signals ergab, dass die von *B. subtilis*-Zellen unter hochosmolaren Bedingungen (0,7 M NaCl) produzierte Menge 4,8-mal größer ist als die in SMM ohne erhöhte Osmolarität gewachsener Zellen (Abb. 30B). Wird die Osmolarität des Mediums weiter auf 1,0 oder 1,2 M NaCl in SMM erhöht, kommt es zu einer 7,7-fachen, beziehungsweise 11,1-fachen Induktion der Expression des *dpp*-Operons. Mit der *dppA* Sonde wurden zudem zahlreiche Transkripte detektiert, deren elektrophoretische Mobilitäten einer Länge von etwa 1600 nt bis 400 nt entsprechen. Auf Grund der Tatsache, dass diese im gleichen Maße osmotisch reguliert werden, handelt es sich vermutlich um spezifische Abbauprodukte des polycistronischen, 5500 nt langen *dppABCDE*-Gesamttranskriptes.

Da das *dppA*-Gen nicht für eine Komponente des Dpp-Transportsystems kodiert, wurde die Expression des *dpp*-Operons zudem mit einer *dppCD*-spezifischen, 612 nt langen RNA-Sonde untersucht (Sonde 2; Abb. 30A). Hierzu wurde die unter den oben beschriebenen Bedingungen präparierte RNA mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, *dppCD*-spezifischen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Sonde 2; Abb. 30A) hybridisiert. Es konnten das 5500 nt lange *dppABCDE*-Gesamttranskript, jedoch deutlich weniger Abbaufragmente detektiert werden (Abb. 30C). Bei den mit dem *dppA*-Sonde detektierten Abbau handelt es sich somit vermutlich um Fragmente des *dppA*-Transkriptes selbst. Es konnte auch unter Verwendung der *dppCD*-Sonde eindeutig eine osmotisch

regulierte, proportional zur externen Osmolarität induzierte Expression des *dpp*-Operons nachgewiesen werden (Abb. 30C).

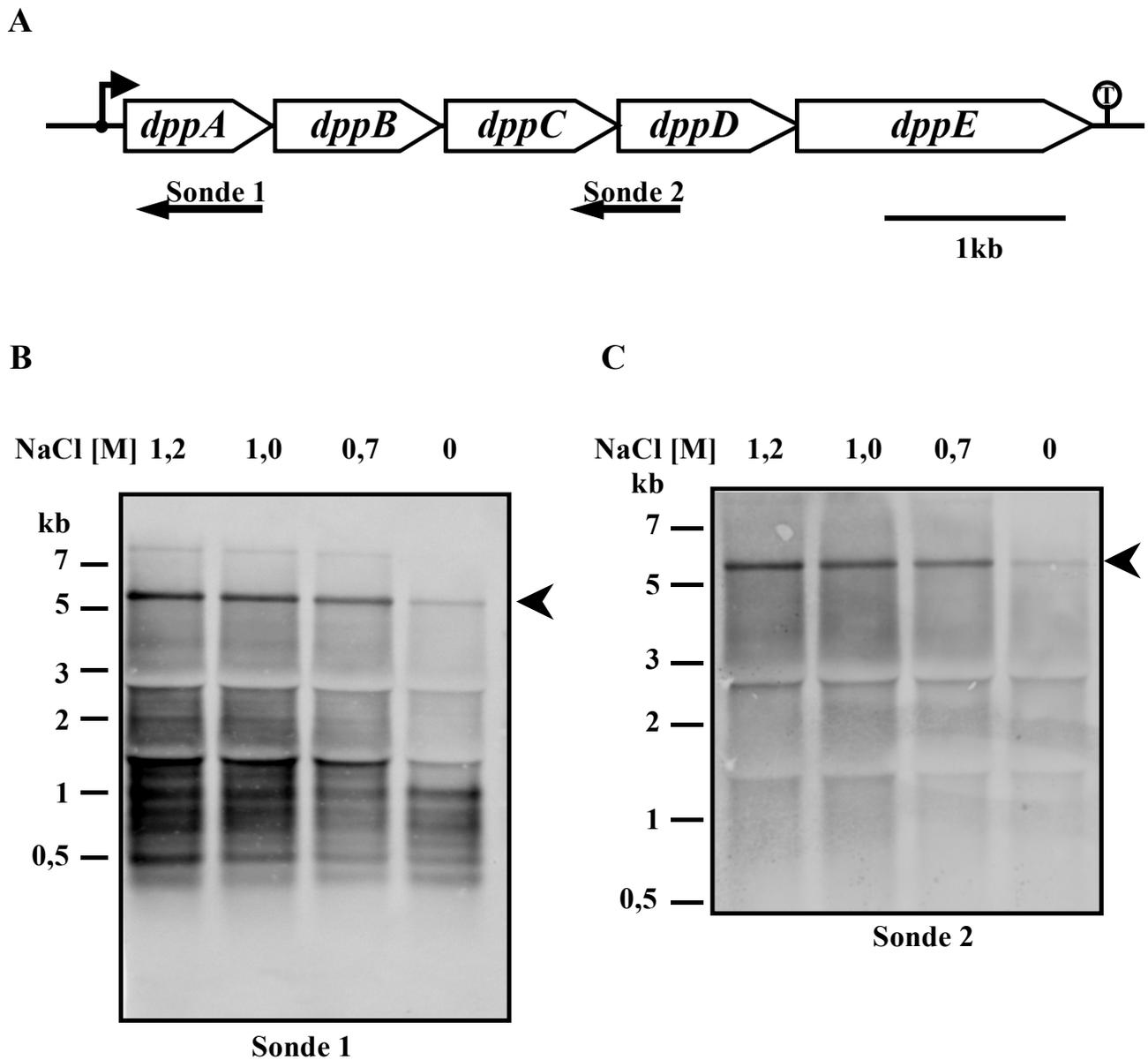


Abb. 30 Northern-Blot-Analyse des *dpp*-Genortes

A. Genetische Organisation der *dpp*-Region. Die Position des σ^A -abhängigen Promotors und eines möglichen faktorunabhängigen Transkriptionsterminators [T] ist angezeigt. Die Lage der für die Hybridisierung verwendeten, *dppA*-spezifischen RNA-Sonde 1 und der *dppCD*-spezifischen RNA-Sonde 2 ist angegeben. **B.** Gesamt-RNA (10 μ g) aus bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM und SMM mit 0,7 M, 1,0 M oder 1,2 M NaCl kultivierten JH642-Zellen, wurde mit der *dppA*-spezifischen DIG-markierten *anti-sense* RNA-Sonde 1 hybridisiert. **C.** Gesamt-RNA (10 μ g) aus in SMM und SMM mit 0,7 M, 1,0 M oder 1,2 M NaCl kultivierten JH642-Zellen wurde mit der *dppCD*-spezifischen, DIG-markierten, *anti-sense* RNA-Sonde 2 hybridisiert. Zur Detektion der *dpp*-Transkripte erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Reagenz ECF-Vistra (12 μ l cm^{-2} Blot).

Unter Verwendung derselben, *dppCD*-spezifischen RNA-Sonde wurde zudem untersucht, ob eine Induktion der Expression des *dpp*-Operons allein durch die Anwesenheit von prolinhaltigen Dipeptiden im Medium (SMM) ausgelöst werden kann, oder ob die externe Verfügbarkeit dieser unter hyperosmotischen Bedingungen zu einer verstärkten Induktion der *dpp*-Expression führt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (1,0 M NaCl), entweder ohne zugefügte Peptide, oder in Anwesenheit von 1 mM Phe-Pro beziehungsweise 1 mM Pro-Gly gewachsenen sind. Die Anwesenheit der Dipeptide im Medium hatte jedoch weder unter Normalbedingungen, noch unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen einen Einfluss auf die *dpp*-Expression (Abb. 31).

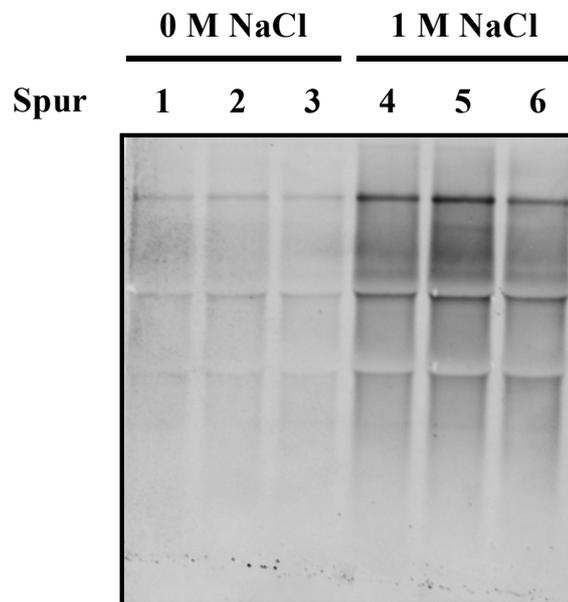


Abb. 31 Die Expression des *dpp*-Operons wird nicht durch die Verfügbarkeit prolinhaltiger Dipeptide im Medium beeinflusst

Gesamt-RNA wurde aus JH642-Zellen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM (0 M NaCl) oder SMM mit erhöhter Osmolarität (1,0 M NaCl), entweder ohne zugefügte Peptide (Spur 1 und 4), oder in Anwesenheit von 1 mM Pro-Gly (Spur 2 und 5), beziehungsweise 1 mM Phe-Pro (Spur 3 und 6) gewachsenen sind. 10 μ g dieser RNA wurden mit der *dppCD*-spezifischen, DIG-markierten, *anti-sense* RNA-Sonde 2 (Abb. 30A) hybridisiert.

5.1.2 Analyse des Startpunktes für eine osmotisch regulierte Transkription des *dpp*-Operons

Die Position des Promotors von dem aus die, mit Initiation der Sporulation induzierte Transkription des *dpp*-Operons erfolgt, ist in der Literatur beschrieben (Slack *et al.*, 1991). Mit Hilfe von Primer Extension-Analysen sollte im Folgenden bestimmt werden, ob von dem selben Transkriptionsstartpunkt ausgehend, eine osmotisch regulierte *dpp*-Expression erfolgt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA, in SMM oder SMM mit 1 M NaCl kultivierter JH642-Zellen präpariert. Nach Hybridisierung eines *dppA*-spezifischen, am 5'-Ende markierten Oligonukleotids (*dppA*-PE1) an die passende mRNA, diente dieses Oligonukleotid als Primer für die reverse Transkriptase. Die Reaktionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienenden Sequenzreaktion, die unter Verwendung desselben Oligonukleotids durchgeführt wurde, gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 32B).

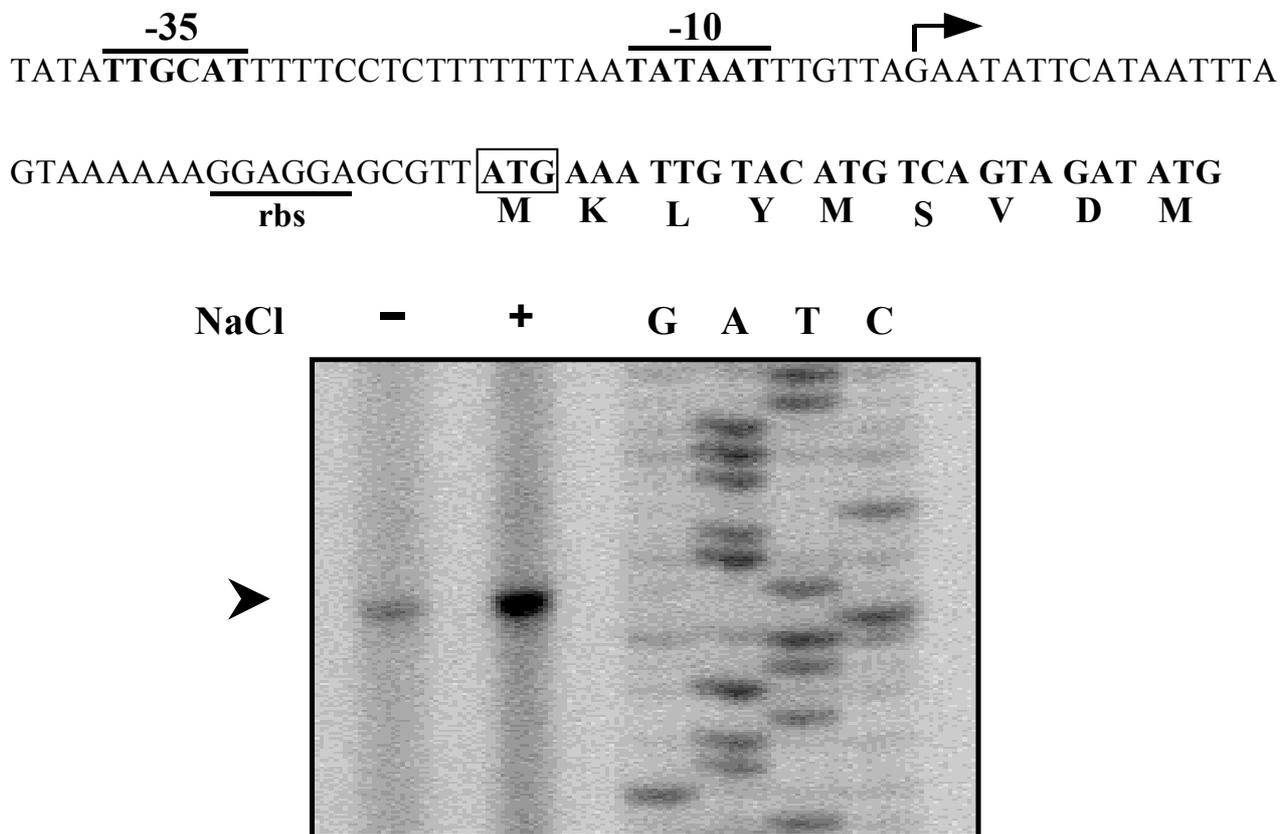


Abb. 32 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes *dpp*-spezifischer mRNA

A. Nukleotidsequenz der *dpp*-Promotorregion. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil markiert. Die -35 und -10 Region sind hervorgehoben. Das Startcodon ist eingerahmt und die putative Ribosomenbindestelle (rbs) ist unterstrichen. **B.** Gesamt-RNA aus in SMM und SMM mit 1 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) kultivierten JH642-Zellen wurde präpariert. Nach Hybridisierung eines *dppA*-spezifischen, am 5'-Ende mit einem Infrarotfarbstoff (IRD-800) markierten Oligonukleotids (*dppA*-PE1) an die passende mRNA, diente dieses Oligonukleotid als Primer für die reverse Transkriptase. Die Reaktionsprodukte wurden neben einer als Größenstandard dienende Sequenzreaktion, die unter Verwendung desselben Oligonukleotids auf dem Plasmid pJS47 durchgeführt wurde, gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Es konnte eine einzige cDNA-Spezies detektiert werden, deren Länge dem Abstand von der Oligonukleotidsequenz bis zum Transkriptionsstart entspricht (Abb. 32B). Der Transkriptionsstartpunkt liegt damit 36 bp stromaufwärts von dem *dpp*-Startcodon auf einem Adenin (Abb. 32A). In geeignetem Abstand stromaufwärts dieses Transkriptionsstartpunktes befindet sich ein möglicher σ^A -abhängiger Promotor (Helmann, 1995). Der Abstand zwischen der -35 und der -10 Region beträgt 17 bp (Abb. 32A) und ist damit optimal. Die zuvor im Northern-Blot gewonnenen Ergebnisse konnten zudem verifiziert werden. Die Transkription des *dpp*-Operons erfolgt von einem unter hyperosmotischen Bedingungen (1 M NaCl) stark stimulierten Promotor aus (Abb. 32A). Für eine osmotisch regulierte Transkription des *dpp*-Operons in *B. subtilis* wird somit derselbe, σ^A -abhängige Promotor genutzt, wie für eine an die Nährstoffsituation angepasste Expression des *dpp*-Operons (Slack *et al.*, 1991).

5.2 Northern-Blot-Analyse des *opp*-Operons

Das *opp*-Operon kodiert ebenfalls für ein ABC-Transportsystem und setzt sich aus fünf Genen zusammen, die für die einzelnen Komponenten dieses Transporters kodieren (Abb. 33A). *OppA* ist ein Substratbindeprotein, das mit der Membran von *B. subtilis* über einen Lipidanker verbunden ist. *OppB* und *OppC* bilden die beiden hydrophoben, integralen Membranproteine und *OppD* ist die ATP-bindende Untereinheit, welche die ATP-Hydrolyse an den Transportprozess koppelt. Das *oppF*-Gen kodiert ebenfalls für ein ATP-bindendes Protein, das jedoch weder für den Transport, noch für die Sporulation essentiell ist (Perego *et al.*, 1991). *OppF* ist jedoch wesentlich für die genetische Kompetenz von *B. subtilis* (Rudner *et al.*, 1991). Das *Opp*-Permeasesystem transportiert Tri-, Tetra- und Pentapeptide. Es konnte eine durch das *Opp*-System vermittelte Aufnahme des Tripeptids Pro-Gly-Gly und des toxischen Tripeptids Bialaphos nachgewiesen werden (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Es wurde zudem gezeigt, dass das *Opp*-System eine essentielle Rolle bei der Initiation der Sporulation spielt (Perego *et al.*, 1991). Untersuchungen zur Expression des *opp*-Operons wurden allerdings bisher nicht durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob die Expression des *opp*-Operons ebenfalls osmotisch stimuliert werden kann, wurden Northern-Blot-Analysen der entsprechenden Transkripte des chromosomalen *opp*-Genortes durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (0,4 M und 0,7 M NaCl) gewachsen sind. Anschließend wurde diese RNA mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten, *oppA*-spezifischen, 733 nt langen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Abb. 33A) hybridisiert. Hierbei konnten zwei mRNA Spezies detektiert werden (Abb. 33B). Die Länge des etwa 5700 nt Transkriptes entspricht der kalkulierten Distanz (5,76 kb) zwischen einem putativen *opp*-Promotor und einem stromabwärts von der *oppABCDF*-kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator (Abb. 33A). Das kleinere Transkript weist eine Länge von etwa 1800 nt auf, was der Distanz (1,87 kb) zwischen dem putativen *opp*-Promotor und einem stromabwärts von der *oppA*-kodierenden Sequenz lokalisierten, potentiellen, faktorunabhängigen Transkriptionsterminator entspricht. Doch weder das *oppABCDF*-

Gesamttranskript, noch das *oppA*-Transkript werden unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen verstärkt exprimiert (Abb. 33B).

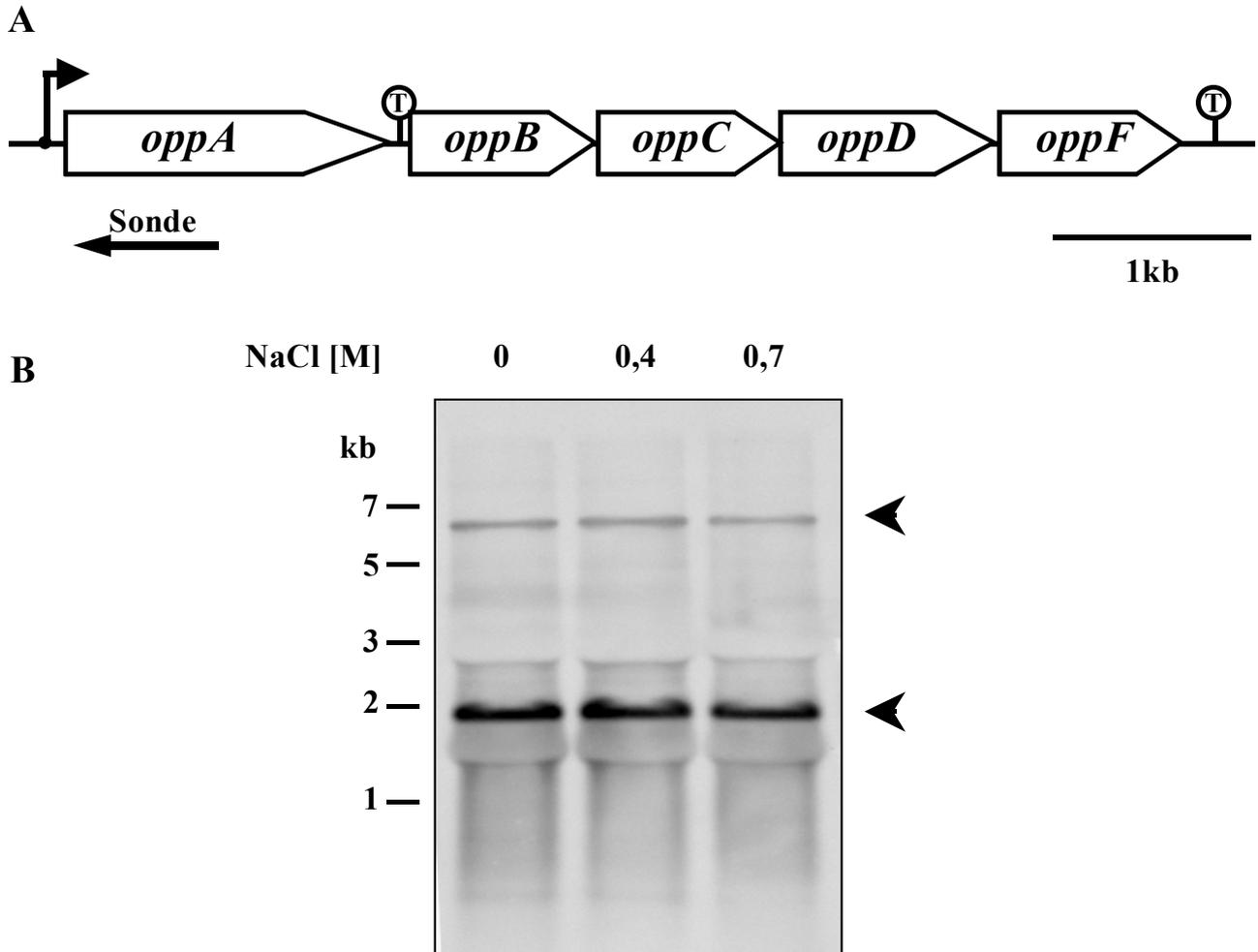


Abb. 33 Northern-Blot-Analyse des *opp*-Genortes

A. Genetische Organisation der *opp*-Region. Die Position des putativen Promotors und möglicher faktorunabhängiger Transkriptionsterminatoren [T] ist angezeigt. Die Lage der für die Hybridisierung verwendeten *oppA*-spezifischen RNA-Sonde ist angegeben. **B.** Gesamt-RNA (10 µg) aus bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM und SMM mit 0,4 M, oder 0,7 M NaCl kultivierten JH642-Zellen wurde mit der *oppA*-spezifischen, DIG-markierten, *anti-sense* RNA-Sonde hybridisiert. Zur Detektion der *opp*-Transkripte erfolgte eine circa 30-minütige Inkubation mit dem Reagenz ECF-Vistra (12 µl cm⁻² Blot).

5.3 Northern-Blot-Analyse der putativen Peptidasegene *yqhT* und *ykvY*

Sowohl das *yqhT*- als auch das *ykvY*-Gen aus *B. subtilis* kodieren für bisher unbekannte Proteine, die jedoch auf Grund ihrer abgeleiteten Proteinsequenzen ähnlich zu bekannten Xaa-Pro Dipeptidasen aus anderen Organismen sind. So weist zum Beispiel das YqhT Protein aus *B. subtilis* eine 59 %-ige Sequenzidentität zu einer Xaa-Pro Dipeptidase aus *Bacillus halodurans* (GenBank Accession-Nummer: AP001516) auf. YqhT und YkvY von *B. subtilis* weisen eine Sequenzidentität von 31 % zueinander auf. Xaa-Pro Dipeptidasen (EC 3.4.13.9) werden auch Prolidasen genannt und sind Enzyme, die die Freisetzung einer N-terminalen Aminosäure, auch von Prolin selbst, die mit Prolin in der C-terminalen Position verbunden ist, aus einem Dipeptid katalysieren. Sie gehören zur Peptidasefamilie M24B.

Die globale Analyse aller unter hochosmolaren Bedingungen in *B. subtilis* induzierten Gene mit Hilfe eines DNA Macroarrays (L. Steil, nicht veröffentlichte Daten) hat neben einer Induktion der Expression des *dpp*-Operons durch NaCl gezeigt, dass auch das *yqhT*-Gen osmotisch induziert werden kann. Es wäre also denkbar, dass das *yqhT*-Gen unter hochosmolaren Bedingungen die Freisetzung von Prolin aus prolinhaltigen Peptiden katalysiert. Mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen sollte daher untersucht werden, ob die Gene *yqhT* und *ykvY* einer osmotisch regulierten Expression unterliegen. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (0,7 M und 1,2 M NaCl) gewachsenen sind. Diese RNA wurde mit einer Digoxigenin-(DIG)-markierten, *yqhT*-spezifischen, 857 nt langen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Abb. 34A), beziehungsweise mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten, *ykvY*-spezifischen, 780 nt langen, einzelsträngigen RNA-Sonde (Abb. 34B) hybridisiert. Mit der *yqhT*-spezifischen Sonde konnten eine etwa 2800 nt lange und eine 1600 nt lange mRNA-Spezies detektiert werden (Abb. 34C). Das *yqhT*-Gen wird somit vermutlich mit benachbarten Genen kotranskribiert. Die Länge des 2800 nt Transkriptes entspricht der kalkulierten Distanz (2,84 kb) zwischen einem stromaufwärts des *yqhR*-Gens lokalisierten Promotors und einem stromabwärts des *efp*-Gens lokalisierten Transkriptionsterminator (Abb. 34A). Das 1600 nt Transkript entspräche in seiner Länge einem Kotranskript von *yqhT* und *yqhS* (1,62 kb) (Abb. 34A). Beide detektierten Transkripte werden jedoch unter hochosmolaren Bedingungen nicht verstärkt gebildet (Abb. 34C). Eine osmotisch regulierte Expression des *yqhT*-Gens konnte somit nicht bestätigt werden. Auch die mit der *ykvY*-spezifischen Sonde detektierte 1400 nt lange mRNA, die in ihrer Größe einem möglichen *ykvY*-Transkript entspricht, unterliegt keiner osmotisch induzierten Expression (Abb. 34D).

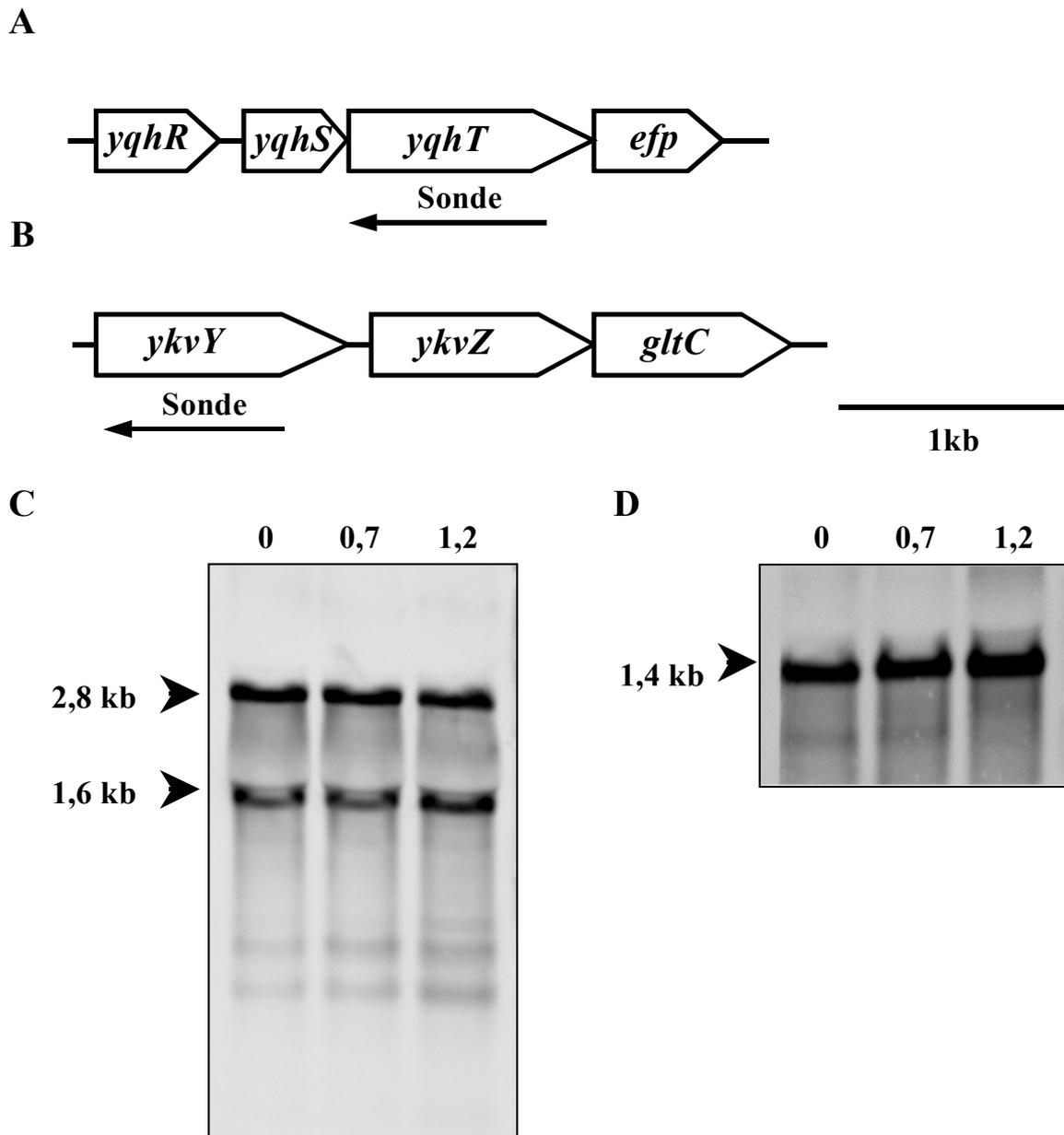


Abb. 34 Northern-Blot-Analyse der *yqhT*- und *ykvY*-Genorte

A. und **B.** Genetische Organisation der *yqhT*- (A) und *ykvY*- (B) Region. Die Position putativer Promotoren und möglicher, faktorunabhängiger Transkriptionsterminatoren [T] ist angezeigt. Die Lage der für die Hybridisierung verwendeten *yqhT*- und *ykvY*-spezifischen RNA-Sonden ist angegeben.

C. und **D.** Gesamt-RNA aus bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM und SMM mit 0,7 M oder 1,2 M NaCl kultivierten JH642-Zellen wurde präpariert. 10 μ g dieser RNA wurden mit der *yqhT*-spezifischen oder *ykvY*-spezifischen, DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert. Zur Detektion der Transkripte erfolgte eine circa 30-minütige Inkubation mit dem Reagenz ECF-Vistra (12 μ l cm^{-2} Blot).

Unter Verwendung derselben *yqhT*- und *ykvY*-spezifischen RNA-Sonden wurde zudem untersucht, ob die Expression dieser Gene durch die Anwesenheit prolinhaltiger Dipeptiden im Medium (SMM) induziert werden kann. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit

erhöhter Osmolarität (1,0 M NaCl), entweder ohne zugefügte Peptide, oder in Anwesenheit von 1 mM Phe-Pro beziehungsweise 1 mM Pro-Gly gewachsen sind. Handelte es sich im Falle der beiden Proteine tatsächlich um Xaa-Pro Dipeptidasen, dürfte nur Phe-Pro, das einen C-terminalen Prolinrest trägt, als Substrat dienen. Die Expression der *yqhT*- und *ykvY*-Gene wurde jedoch weder unter Normalbedingungen, noch unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen durch die Verfügbarkeit prolinhaltiger Dipeptide im Medium induziert (Abb. 35A und 35B).

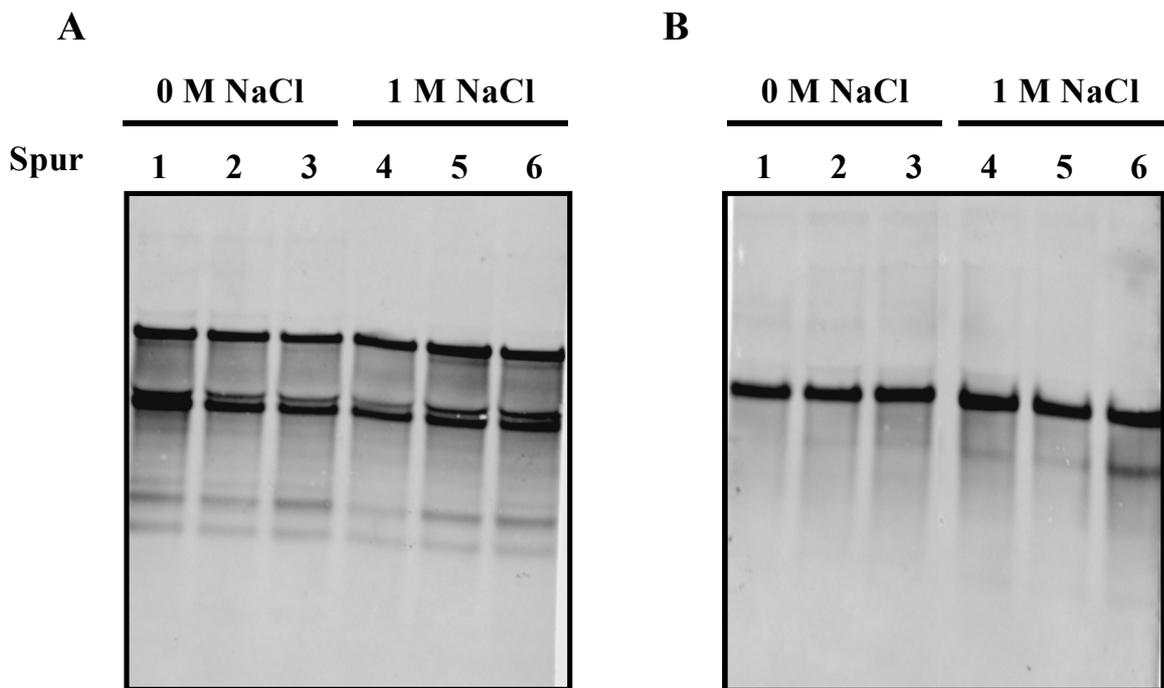


Abb. 35 Die Verfügbarkeit prolinhaltiger Dipeptide im Medium beeinflusst die Expression der Gene *yqhT* und *ykvY* nicht

Gesamt-RNA wurde aus JH642-Zellen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM (0 M NaCl) oder SMM mit erhöhter Osmolarität (1,0 M NaCl), entweder ohne zugefügte Peptide (Spur 1 und 4), oder in Anwesenheit von 1 mM Pro-Gly (Spur 2 und 5) beziehungsweise 1 mM Phe-Pro (Spur 3 und 6) gewachsen sind. **A.** 10 μ g dieser RNA wurden mit der *yqhT*-spezifischen, DIG-markierten RNA-Sonde (Abb. 34A) hybridisiert. **B.** 10 μ g dieser RNA wurden mit der *ykvY*-spezifischen, DIG-markierten RNA-Sonde (Abb. 34B) hybridisiert.

5.4 Die Aufnahme verschiedener prolinhaltiger Di- und Tripeptide bedingt eine Komplementation des prolinauxotrophen Phänotyps von JSB11 [$\Delta(proBA::cat)I$]

Um beurteilen zu können, ob eine Aufnahme verschiedener prolinhaltiger Di- und Tripeptide in *B. subtilis* stattfindet, wurde das Wachstum des prolinauxotrophen *B. subtilis*-Stammes (JSB11) in SMM mit prolinhaltigen Di- und Tripeptiden als einziger Prolinquelle bestimmt. Die in diesem Versuch getesteten Peptide sind in Tabelle 10 aufgeführt. In einem Vorversuch wurde die Stabilität der Peptide unter den späteren Versuchsbedingungen getestet. Hierzu wurde die Präsenz der Peptide mittels HPLC-Analyse nachgewiesen. Es wurde zum einen eine frisch angesetzte Lösung, definierter Peptidkonzentration (50 μ M) vermessen und zudem äquimolare Mengen Peptid in SMM

und SMM mit 1,2 M NaCl gelöst, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann ebenfalls mittels HPLC analysiert. Alle getesteten Peptide waren unter den untersuchten Bedingungen stabil und in gleicher Konzentration vorhanden.

Die Komplementation der Prolinauxotrophie des *B. subtilis*-Stammes JSB11 durch prolinhaltige Peptide wurde in einem Wachstumsversuch getestet. Zunächst wurde JSB11 in SMM mit ausreichend Prolin (10 mM) vorgezogen und einmal mit SMM gewaschen, um Prolin vollständig aus dem Medium zu entfernen. Aus diesen prolinfreien Kulturen wurden dann 15 ml SMM, mit oder ohne den in Tabelle 10 aufgeführten Peptiden auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die nach 16 Stunden erreichte OD₅₇₈ wurde bestimmt. Alle in diesem Versuch getesteten, prolinhaltigen Peptide vermochten die Prolinauxotrophie von JSB11 zu komplementieren. In Abwesenheit exogener Peptiden oder Anwesenheit des Gly-Gly Dipeptids zeigte der JSB11-Stamm kein Wachstum (Tab. 10). Die getesteten prolinhaltigen Di- und Tripeptide werden also unter normalen Wachstumsbedingungen von *B. subtilis* aufgenommen und als Prolinquelle genutzt. Hierbei sind sie effektiver als das ebenfalls getestete Prolin selbst, da die Anwesenheit prolinhaltiger Peptide im Medium offensichtlich nicht zu einer Induktion des Prolinabbaus (*putBCP*-Operon) führt.

Tab. 10 Komplementation des prolinauxotrophen Phänotyps von JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})1$] durch die Aufnahme verschiedener, prolinhaltiger Di- und Tripeptide

Peptid bzw. Prolin [$\mu\text{g (ml)}^{-1}$] ^a	OD ₅₇₈ nach 16 h ^b	Wachstum ^c
ohne	0,38	-
Pro [50]	1,02	+
Gly-Gly [100]	0,36	-
Pro-Pro [50]	3,11	++
Pro-Glu [105]	3,82	++
Pro-Lys [105]	2,78	++
Leu-Pro [114]	3,55	++
Phe-Pro [114]	3,77	++
Pro-Gly [83]	3,37	++
Gly-Pro [78]	3,28	++
Pro-Gly-Gly [100]	3,17	++
Pro-Val-Gly [120]	3,08	++

^aDie aufgelisteten prolinhaltigen Di- und Tripeptide und Prolin wurden dem SMM in den in Klammern angegebenen Konzentrationen zugegeben, die sich aus der Berechnung der zu 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Prolin äquivalenten Menge von Prolin in peptidgebundener Form ergeben. ^bDer *B. subtilis*-Stamm JSB11 wurde in SMM mit ausreichend Prolin (10 mM) vorgezogen und einmal mit SMM gewaschen, um Prolin vollständig aus dem Medium zu entfernen. Aus diesen prolinfreien Kulturen wurden dann 15 ml SMM auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die nach 16 Stunden erreichte OD₅₇₈ wurde bestimmt. ^ckein Wachstum: -; Wachstum: +; gutes Wachstum: ++

5.5 Unter hyperosmotischen Bedingungen steigert die Anwesenheit prolinhaltiger Di- und Tripeptide sowohl das Wachstum der *proHJ*-Mutante JSB8 als auch das des Wildtyp-Stammes JH642

Durch das in Tabelle 10 dargestellte Experiment wurde die Aufnahme der getesteten, prolinhaltigen Peptide durch *B. subtilis* nachgewiesen. Es sollte nun untersucht werden, ob die Anwesenheit dieser Peptide eine bessere Adaptation an hochosmotische Wachstumsbedingungen ermöglicht. Hierzu wurde das Wachstumsvermögen des Wildtypstammes und des *proHJ*-Mutantenstammes JSB8 in SMM mit 1,2 M NaCl, in An- und Abwesenheit prolinhaltiger Di- und Tripeptide, mit einer Endkonzentration von 1 mM im Medium, untersucht. Zudem wurde die osmoprotektive Wirkung von 1 mM Prolin und 1 mM Glycinbetain im Medium überprüft. Es wurden 15 ml Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und aerob bei 37°C inkubiert. Nach 17 Stunden wurde die erreichte OD_{578} der Kulturen bestimmt (Abb. 36). Das Wachstumsvermögen des Wildtypstammes wird durch die Anwesenheit aller getesteten, prolinhaltigen Peptide deutlich verbessert. Den stärksten osmoprotektiven Effekt haben die Dipeptide Pro-Gly und Phe-Pro und das Tripeptid Pro-Val-Gly (Abb. 36). Der *B. subtilis*-Stamm JSB8 zeigt auf Grund der fehlenden Prolinakkumulation unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen einen deutlichen, osmosensitiven Phänotyp (Abb. 8). Die Anwesenheit der Dipeptide Phe-Pro und Pro-Gly und des Tripeptids Pro-Val-Gly in hyperosmolarem Medium führt jedoch zu einer signifikanten Verbesserung des Wachstumsvermögens. Auch die Zugabe von Pro-Pro, Pro-Lys, Gly-Pro und Pro-Gly-Gly hat eine osmoprotektive Wirkung, während Pro-Glu und Leu-Pro zu keiner deutlichen Wachstumsverbesserung führen. Auch das als Kontrolle dienende Dipeptid Gly-Gly zeigte keine osmoprotektive Wirkung (Abb. 36). Keines der untersuchten Peptide ist jedoch sowohl für JSB8 als auch für JH642 vergleichbar osmoprotektiv wie Glycinbetain (Abb. 36). In einem weiteren Versuch wurden die in den Peptiden enthaltenen Aminosäuren auf ihre Osmoprotektivität hin untersucht. Mit Ausnahme von Prolin (Abb. 36) und Glutamat (Abb. 10) führt die Anwesenheit keiner dieser Aminosäuren zu einer Wachstumsverbesserung unter hochosmolaren Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Der in unterschiedlichem Maße ausgeprägte, osmoprotektive Effekt der untersuchten Peptide könnte auf eine unterschiedliche Affinität des jeweiligen Transporters für die getesteten Peptide zurückzuführen sein.

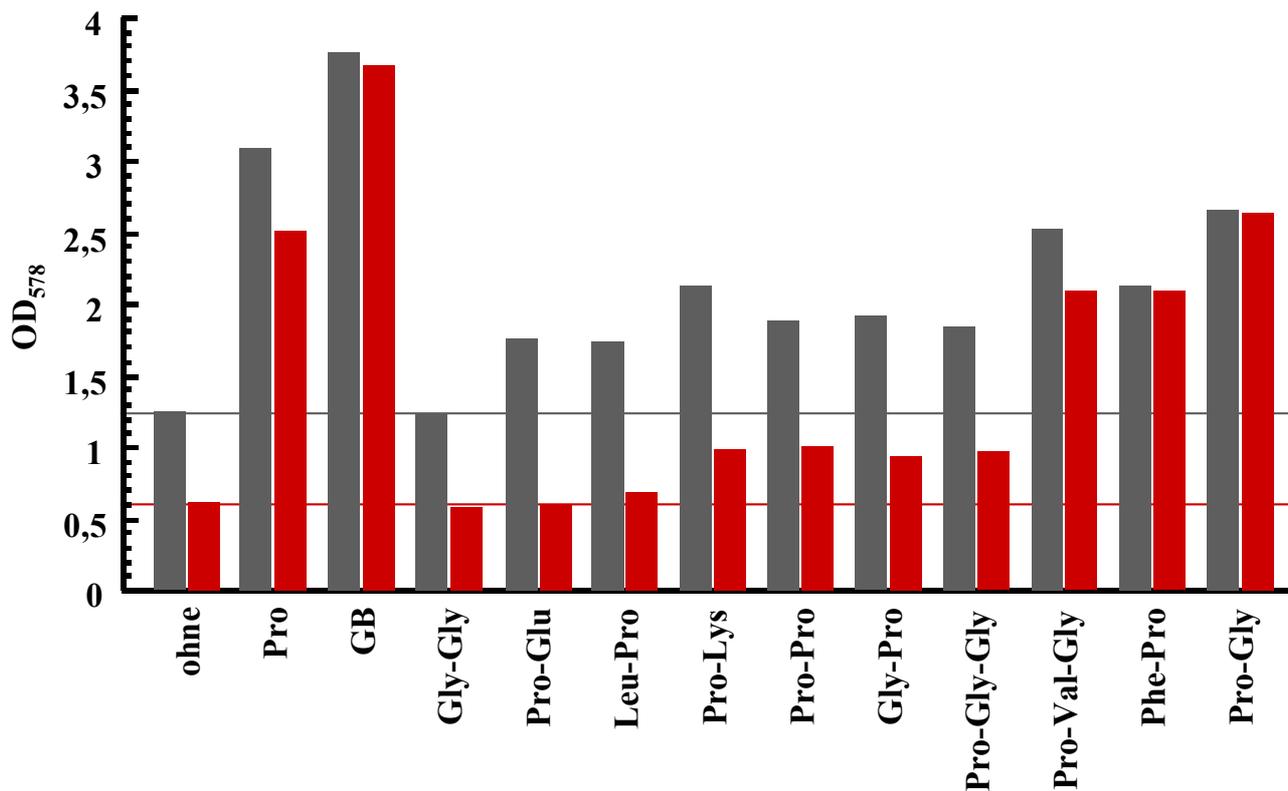


Abb. 36 Die Anwesenheit prolinhaltiger Peptide unter hyperosmolaren Bedingungen bedingt eine deutliche Wachstumsverbesserung

Der *B. subtilis* Wildtypstamm (■) und der [$\Delta(proHJ::tet)$]-Stamm JSB8 (■) wurden in SMM mit 1,2 M NaCl, ohne oder mit prolinhaltigen Di- und Tripeptiden auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und aerob bei 37°C inkubiert. Nach 17 Stunden wurde die OD₅₇₈ der Kulturen bestimmt. Die Peptide wurden dem Medium in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Prolin und Glycinbetain wurden ebenfalls in einer Konzentration von 1 mM zugegeben. Die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Wachstumsexperiment dar, das in zwei weiteren, davon unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnte.

5.6 Unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen kommt es durch die Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide in JSB8 [$\Delta(proHJ::tet)$] zur Akkumulation von Prolin

In *L. monocytogenes* führt die Aufnahme von Peptiden, die Glycin, Hydroxyprolin oder Prolin enthalten unter hochosmolaren Bedingungen zu einer Akkumulation der Peptide selbst und der durch den Abbau der Peptide freigesetzten Aminosäuren (Amezaga *et al.*, 1995). Nachdem auch für *B. subtilis* eindeutig die osmoprotektive Wirkung prolinhaltiger Di- und Tripeptide nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob es zu einer Akkumulation der Peptide oder der durch Peptidasen freigesetzten Aminosäuren kommt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Prolingehalt von Zellen der Stämme JSB8 und JH642 bestimmt, die in SMM mit 1,2 M NaCl in An- oder Abwesenheit der aufgeführten Peptide gewachsen sind. Die Kulturen wurden in 15 ml SMM auf eine optische Dichte (OD₅₇₈) von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 2 inkubiert. Der intrazelluläre Prolingehalt wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt (Abb. 37).

In dem *B. subtilis*-Stamm JSB8 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})I$], der in hyperosmotischem Medium nicht zu einer *de novo* Prolinsynthese für osmoprotektive Zwecke in der Lage ist (Abb. 9A), kommt es in Anwesenheit prolinhaltiger Peptide zu einer signifikanten Prolinakkumulation (Abb. 37A). Hier spiegelt sich das bereits beim Wachstumsvermögen unter hochosmolaren Bedingungen beobachtete, unterschiedliche osmoprotektive Potential der Peptide wieder. Die Dipeptide Pro-Gly und Phe-Pro und das Tripeptid Pro-Val-Gly, mit dem stärksten osmoprotektiven Effekt auf das Wachstum von JSB8 (Abb. 36), führen auch zur Akkumulation der höchsten intrazellulären Prolinmengen (Abb. 37A). Auch die Zugabe von Pro-Lys, Gly-Pro und Pro-Gly-Gly zeigt eine osmoprotektive Wirkung (Abb. 36) und führt zu einer deutlichen Prolinakkumulation (Abb. 37A). Das Dipeptid Pro-Pro dagegen weicht von dem beschriebenen Schema ab. Obwohl die Anwesenheit von Pro-Pro zu einer mit Pro-Gly-Gly vergleichbaren Osmoprotektion führt (Abb. 36), kommt es in osmotisch gestressten Zellen zur Akkumulation der doppelten Prolinmenge (Abb. 37A). Sowohl Pro-Glu und Leu-Pro, als auch das als Kontrolle dienende Dipeptid Gly-Gly, zeigten keine osmoprotektive Wirkung (Abb. 36) und es konnte auch keine Akkumulation von Prolin nachgewiesen werden (Abb. 37A). Die in Abb. 36 und 37A abgebildeten Daten sind in Tabelle 11 noch einmal zusammengestellt. Mittels HPLC-Analyse konnte in unter hochosmolaren Bedingungen gezogenen JSB8-Zellen keines der getesteten Peptide selbst in signifikanten Mengen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen führt somit die Aufnahme der erwähnten prolinhaltigen Di- und Tripeptiden zu einer Akkumulation des, durch den Abbau der Peptide, freigesetzten Prolins. Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* kommt es jedoch nicht zu einer Akkumulation der Peptide selbst.

In dem *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642, der unter hyperosmotischen Bedingungen bereits große Mengen Prolin *de novo* synthetisiert (Abb. 9A), kommt es in Anwesenheit prolinhaltiger Peptide zu keiner signifikant verstärkten Prolinakkumulation (Abb. 37B). Eine mögliche Erklärung für den in Anwesenheit dieser Peptide dennoch deutlichen Wachstumsvorteil in hochosmolaren Medien ist, dass die Aufnahme dieser Peptide und der hydrolytische Abbau zu Prolin für *B. subtilis* energetisch günstiger ist als die Neusynthese dieser osmotischen Schutzsubstanz. In diesem Falle würde man in hyperosmolaren Medien mit prolinhaltigen Peptiden eine reduzierte Prolinneusynthese erwarten und vermutlich eine verminderte Induktion der *proHJ*-Expression. Diese Annahme wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

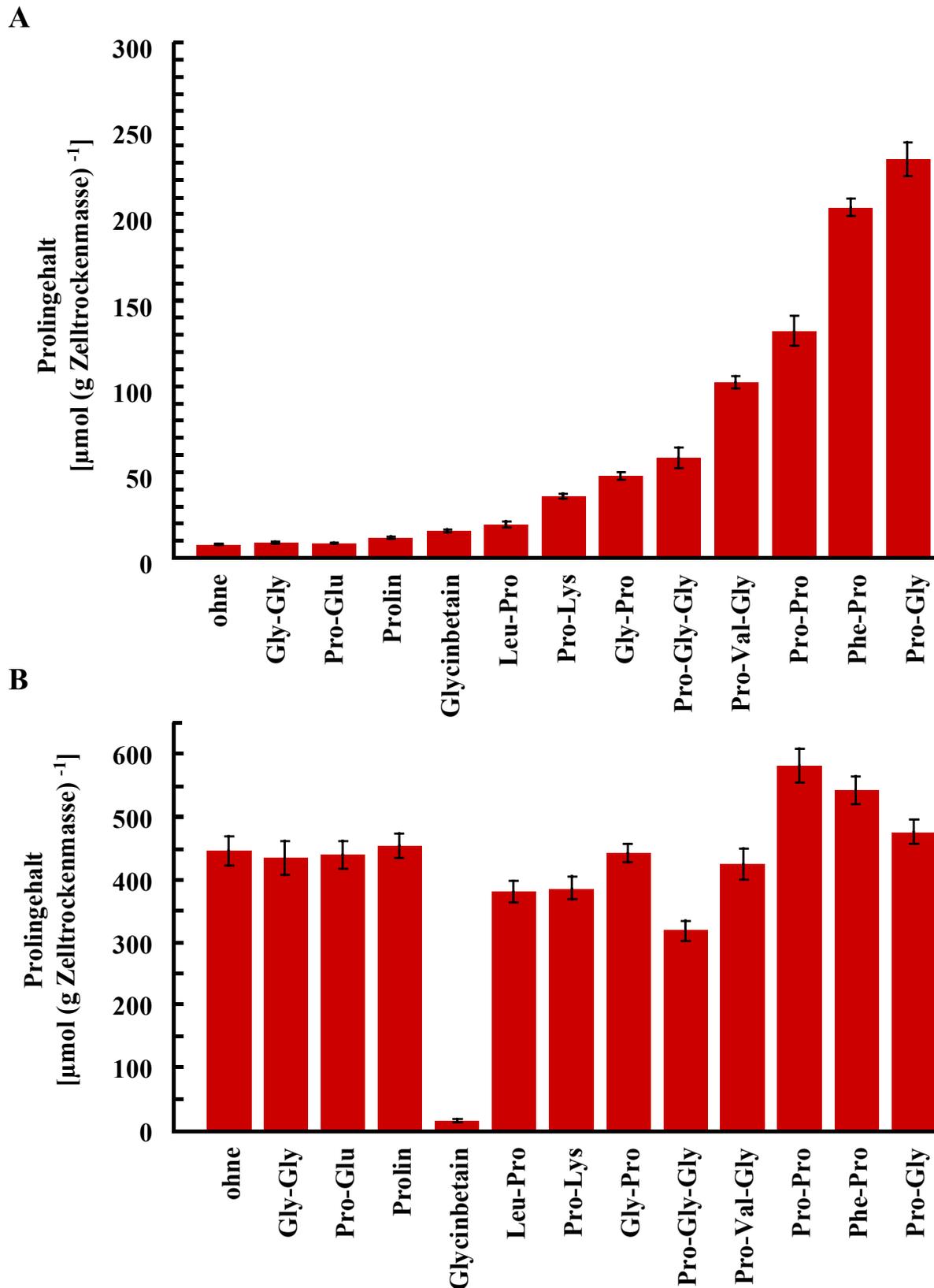


Abb. 37 In osmotisch gestressten JSB8-Zellen [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})\text{I}$] kommt es in Anwesenheit prolinhaltiger Di- oder Tripeptide zu einer Akkumulation von Prolin

Kulturen der *B. subtilis*-Stämme JSB8 (A) und JH642 (B) wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 2 in SMM mit 1,2 M NaCl in Ab- oder Anwesenheit der aufgeführten Peptide oder osmotischen Schutzsubstanzen gezogen. Die Peptide und Osmoprotektiva wurden dem Medium in einer Konzentration von 1 mM zugegeben. Die Bestimmung des Prolingehaltes [$\mu\text{mol (g Zelltrockenmasse)}^{-1}$] erfolgte mittels HPLC-Analyse. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier, unabhängig voneinander gewachsener Kulturen. Für jede Probe wurden der Prolin- und Glutamatgehalt jeweils doppelt bestimmt.

Tab. 11 Wachstum und Prolinakkumulation von JSB8 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1$] in Anwesenheit prolinhaltiger Peptide

Peptide und osmotische Schutzsubstanzen [1 mM]	osmoprotektiver Effekt ^a	Prolinakkumulation ^b
ohne	-	-
Pro	++	-
Glu	++	-
Glycinbetain	+++	-
Gly-Gly	-	-
Pro-Glu	-	-
Leu-Pro	-	-
Pro-Lys	+	+
Pro-Pro	+	++
Gly-Pro	+	+
Pro-Gly-Gly	+	+
Pro-Val-Gly	++	++
Phe-Pro	++	+++
Pro-Gly	++	+++

^aDie in Abb. 36 aufgeführten Daten wurden hier vereinfacht dargestellt. Das Wachstum entspricht dem ohne exogene kompatible Solute : - . Verschiedene Abstufungen signifikant verbesserten Wachstums: +, ++, +++. ^bDie in Abb. 37A präsentierten Daten wurden vereinfacht dargestellt. Die akkumulierte Prolinmenge ist geringer als 15 μmol (g Zelltrockenmasse)⁻¹: - ; die akkumulierte Prolinmenge ist größer als 35 μmol (g Zelltrockenmasse)⁻¹: + ; die akkumulierte Prolinmenge ist größer als 100 μmol (g Zelltrockenmasse)⁻¹: ++ ; die akkumulierte Prolinmenge ist größer als 200 μmol (g Zelltrockenmasse)⁻¹: +++

5.6.1 JSB44 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$], mit einem defekten OpuE-Transporter, wird durch prolinhaltige Peptide nicht mehr osmotisch protektiert

Ursprünglich wurde der *B. subtilis*-Stamm JSB44 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$] konstruiert, um den Nachweis zu erbringen, dass die Peptide erst nach ihrer Aufnahme in die Zelle durch Peptidasen gespalten werden und dadurch Prolin freigesetzt wird. Es wäre theoretisch auch denkbar, dass die Peptidasen unter hochosmolaren Bedingungen ausgeschleust werden und das durch extrazellulären Abbau der Peptide freigesetzte Prolin anschließend durch OpuE aufgenommen wird. In einem Wachstumsexperiment zeigte sich jedoch, dass der OpuE⁻-Stamm JSB44 unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen nicht mehr von der Anwesenheit prolinhaltiger Di- und Tripeptide profitiert (Daten nicht gezeigt). Dies kann durch den für *B. subtilis* beschriebenen, kontinuierlichen Efflux von Prolin unter isoosmotischen Bedingungen erklärt werden (von Blohn, 1997; Moses, 1999). Mit Hilfe von Kreuzfütterungsexperimenten konnte in diesen Arbeiten gezeigt werden, dass *B. subtilis* unter konstanten hochosmotischen Bedingungen, das in hohen Konzentrationen akkumulierte Prolin über die Membran exkretiert. Gleichzeitig erfolgt ein Rücktransport über den hochaffinen, osmotisch stimulierten Transporter OpuE, so dass der Verlust von Prolin relativ gering ist. In dem *B. subtilis*-Stamm JSB44 kommt es durch die Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide ebenfalls zur Akkumulation von Prolin. Im Gegensatz zu dem

Wildtyp-Stamm ist JSB44 jedoch, aufgrund seines defekten OpuE-Systems, nicht in der Lage das unter diesen Bedingungen exkretierte Prolin zu reimportieren. Es kommt somit zu einem stetigen Prolinverlust und der Stamm wird nicht länger osmotisch protektiert.

Eine Ausschleusung von Peptidasen, mit anschließender Prolinaufnahme durch OpuE kann ausgeschlossen werden, da ein Stamm, der in einem der beiden Peptidaufnahmesysteme (Dpp oder Opp) defekt ist, nicht mehr oder nur noch schlecht, durch die Anwesenheit prolinhaltiger Peptide osmotisch protektiert wird (siehe Abschnitt 5.8 und 5.10).

5.7 In osmotisch gestressten JSB8-Zellen stellt das Dipeptid Pro-Gly als alleinige Prolinquelle ein relativ ineffizientes Osmoprotektivum dar

Für Glycinbetain ergibt die Bestimmung der minimal von *B. subtilis* benötigten Konzentration, dass diese osmotische Schutzsubstanzen bereits bei einer Konzentration von 100 μM im Medium eine maximale Protektion zeigt. Eine weitere Erhöhung der exogenen Glycinbetainkonzentration führt zu keiner weiteren Wachstumsverbesserung osmotisch gestresster JH642-Zellen (von Blohn *et al.*, 1997). Analog hierzu sollte die minimal von *B. subtilis* benötigte Konzentration an dem Dipeptid Pro-Gly für ein unter hochosmolaren Bedingungen maximales Wachstum bestimmt werden. Dazu wurden 15 ml SMM-Medium einer Salzkonzentration von 1,2 M NaCl in 100 ml Kolben mit einer im Bereich von 0 μM bis 2000 μM variierenden Pro-Gly-Konzentration versetzt und auf eine OD_{578} von 0,05 mit JSB8 angeimpft. Die nach 19 Stunden erreichte OD_{578} wurde bestimmt und in Abhängigkeit der Pro-Gly-Konzentration des Mediums aufgetragen (Abb. 38). Im Bereich der getesteten Pro-Gly-Konzentrationen kommt es zu keiner Sättigung des Wachstumsertrages. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass, um eine maximale Osmoprotektion und maximales Wachstum zu gewährleisten, Peptidkonzentrationen im millimolaren Bereich erforderlich sind und Pro-Gly daher als alleinige Prolinquelle ein relativ ineffizientes Osmoprotektivum darstellt.

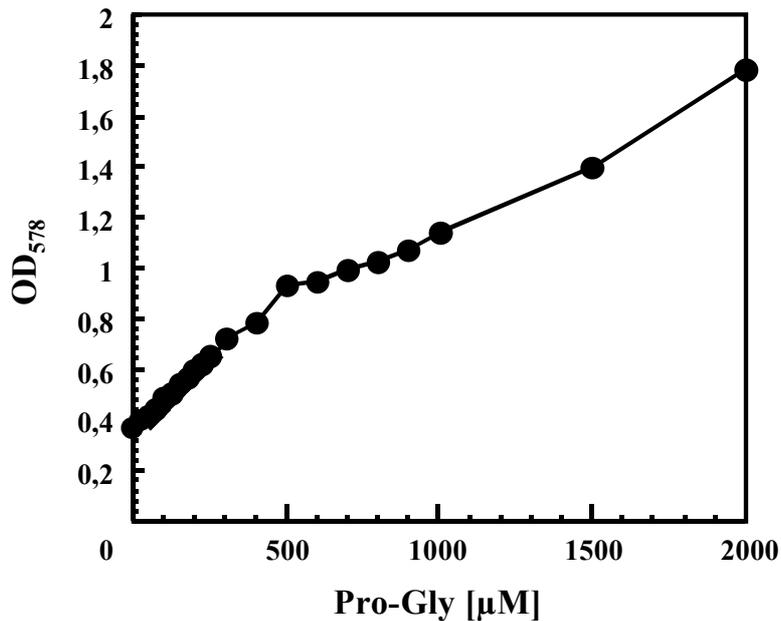


Abb. 38 Wachstum des *B. subtilis*-Stammes JSB8 unter hochosmolaren Bedingungen bei verschiedenen Pro-Gly-Konzentrationen

Dargestellt ist die nach 19 Stunden erreichte OD₅₇₈ des in SMM mit 1,2 M NaCl und mit im Bereich von 0 - 2000 μM variierenden Pro-Gly-Konzentration gewachsenen *B. subtilis*-Stammes JSB8 [$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})$]. Die Kulturen wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft und aerob bei 37°C inkubiert. Die nach 19 Stunden erreichte OD₅₇₈ wurde bestimmt. Der dargestellten Wachstumsversuch stellt ein repräsentatives Experiment dar, das in einem weiteren, davon unabhängigen Experiment bestätigt wurde.

5.8 Konstruktion und phänotypische Charakterisierung verschiedener Dpp-Mutanten

In der Literatur wurde bereits der *dppE*⁻-Stamm MB307 [$\Delta(\text{dciAE132}::\text{neo})$] beschrieben, in dem die carboxyterminale Hälfte des *dppE*-Gens (früher *dciAE* genannt) gegen ein Kanamycinresistenzgen ausgetauscht wurde. Die Peptidtransportaktivität dieses Stammes wurde als das Wachstum des prolinauxotrophen Derivates MB319 [$\Delta(\text{dciAE132}::\text{neo}) \text{proBA}^-$] auf dem prolinhaltigen Dipeptid Pro-Gly als einziger Prolinquelle bestimmt (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Hierzu wurden MB319-Zellen auf Minimalmediumagarplatten mit 100 μM Pro-Gly ausgestrichen. Sie zeigten in diesem Versuch kein Wachstum (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Unter denselben Versuchsbedingungen wurde das Wachstum in Flüssigmedium getestet. Es konnte ein geringfügiges Wachstum nachgewiesen werden (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, dass die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide für metabolische Zwecke in *B. subtilis* durch das Dpp-System erfolgt.

Um zu untersuchen, ob die bei osmotischem Stress nachgewiesene Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide durch das Dpp-System erfolgt, wurden *dpp*-Mutanten in *B. subtilis* JH642 konstruiert. In dem *B. subtilis*-Stamm JSB49 [$\Delta(\text{dppBC}::\text{ery})$] wurde ein internes *dppBC*-Fragment gegen ein Erythromycinresistenzgen ausgetauscht. In JSB54 [$\Delta(\text{dppE}::\text{spc})$] wurde die carboxyterminale

Hälfte des *dppE*-Gens gegen ein Spectinomycinresistenzgen ausgetauscht. Das gleiche *dppE*-Fragment ist in MB307 [$\Delta(dciAE132::neo)$] gegen ein Kanamycinresistenzgen ausgetauscht worden (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Diese Stämme sollten zunächst auf ihren Dpp-Phänotyp getestet werden. Die beschriebenen Mutationen in dem *dpp*-Operon wurden dazu in einen *proBA*-Hintergrund gebracht, was zur Konstruktion der Stämme JSB51 [$\Delta(dppBC::ery)I \Delta(proBA::cat)I$] und JSB53 [$\Delta(dppE::spc)I \Delta(proBA::cat)I$] führte. Die Komplementation der Prolinauxotrophie der *B. subtilis*-Stämme JSB11, JSB51 und JSB53 durch Pro-Gly und Phe-Pro wurde in einem Wachstumsversuch getestet. Dazu wurden diese prolinauxotrophen Stämme in SMM mit ausreichend Prolin (10 mM) vorgezogen und einmal mit SMM gewaschen, um das Prolin vollständig aus dem Medium zu entfernen. Aus diesen prolinfreien Kulturen wurden dann 15 ml SMM, ohne und mit 100 μ M Pro-Gly oder 100 μ M Phe-Pro auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die nach 8 Stunden erreichte OD₅₇₈ wurde bestimmt. Die getesteten Stämme wurden jedoch in ihrer Prolinauxotrophie alle gleichermaßen gut durch die prolinhaltigen Dipeptide komplementiert (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis konnte in einem, zu dem von Mathiopoulos *et al.* (1991) beschriebenen, analogen Experiment auf Minimalmediumagarplatten leider nur bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Da diese Beobachtungen im Widerspruch zu den in dieser Publikation präsentierten Daten stehen, wurden auch der dort verwendete Stamm MB319 [$\Delta(dciAE132::neo) proBA^+$] überprüft. Die von Mathiopoulos *et al.* (1991) gemachten Beobachtungen konnten nicht bestätigt werden; auch für den *B. subtilis*-Stamm MB319 konnte eine Aufnahme von Pro-Gly und Phe-Pro gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Alle in diesen Untersuchungen verwendeten *B. subtilis*-Stämme wurden in einer Southern Blot-Analyse auf die korrekte Integration der jeweiligen *dpp*-Mutation im *B. subtilis*-Chromosom überprüft (Daten nicht gezeigt). Da es sich um doppelte Rekombinationsereignisse handelt, kann somit ausgeschlossen werden, dass die Mutationen nicht an der gewünschten inseriert sind. Eine mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen wäre, dass es in *B. subtilis* ein weiteres Dipeptidtransportsystem gibt. Dies erklärt jedoch nicht den Widerspruch der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, zu den publizierten Daten.

5.9 Das Dpp-System ist in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen in die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide involviert

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob das Dpp-System unter hochosmolaren Bedingungen in den Transport prolinhaltiger Dipeptide involviert ist. Hierzu wurde in einem Wachstumsexperiment getestet, ob der *proHJ*-Stamm JSB8 und der *B. subtilis*-Stamm JSB58 [$\Delta(dciAE132::neo) \Delta(proHJ::tet)$], der zudem ein defektes *dppE*-Gen aufweist, unter hochosmolaren Bedingungen gleichermaßen von der Anwesenheit prolinhaltiger Dipeptide im Medium profitieren. Dazu wurden 40 ml hochosmolares SMM-Medium (1,2 M NaCl) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes auf eine OD₅₇₈ von 0,2 angeimpft und die Entwicklung der OD₅₇₈ dieser Kulturen für 15 Stunden registriert.

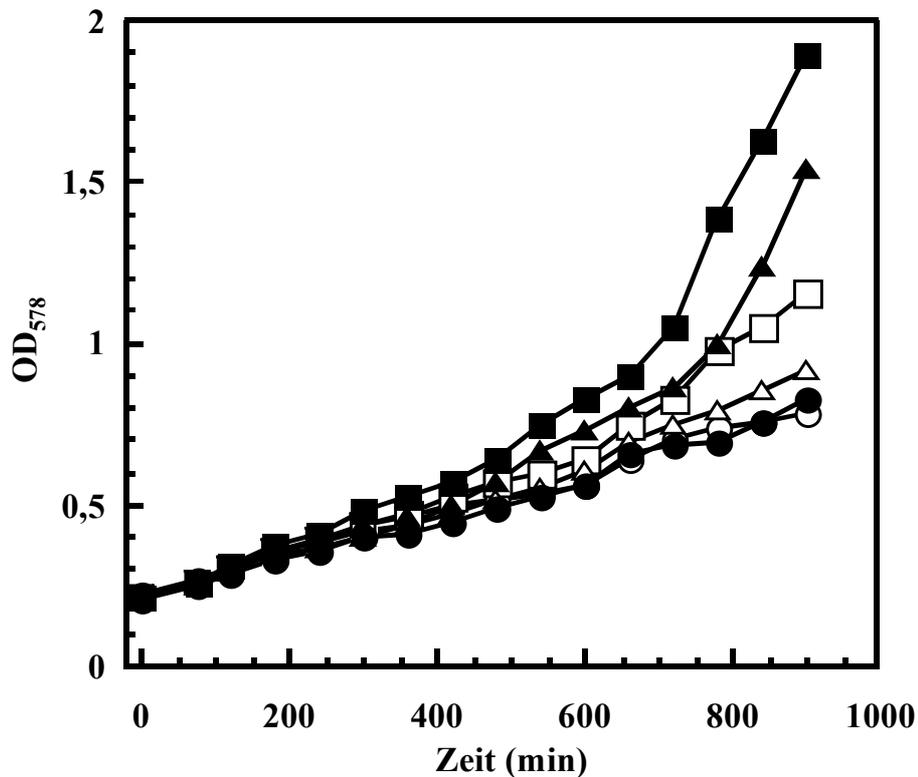


Abb. 39 Der *dpp*⁻-Stamm JSB58 wird unter hochosmolaren Bedingungen weniger durch prolinhaltige Dipeptide protektiert als JSB8

Kulturen des *dpp*⁺ Stammes JSB8 (● ▲ ■) und seines [$\Delta(dciAE132::neo)$]-Derivates JSB58 (○ △ □) wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung der OD_{578} dieser Kulturen in SMM mit 1,2 M NaCl (● ○) und SMM mit 1,2 M NaCl mit Zugabe von 1 mM Pro-Gly (■ □) oder 1 mM Phe-Pro (▲ △) wurde für 15 Stunden registriert. Dieser Wachstumsversuch zeigt ein repräsentatives Experiment, das in einem weiteren, davon unabhängigen Experiment bestätigt wurde.

Die beiden Stämme weisen in Minimalmedium (SMM) mit 1,2 M NaCl nahezu identische Wachstumskurven auf (Abb. 39). Die Deletion des *dppE*-Gens in JSB58 führt also in hochosmolaren Medien zu keinem generellen Wachstumsnachteil gegenüber dem JSB8-Stamm. In Anwesenheit der prolinhaltigen Dipeptide Pro-Gly und Pro-Phe wurde das Wachstumsvermögen des *proHJ*-Stammes JSB8 deutlich verbessert, wobei Pro-Gly den stärkeren osmoprotektiven Effekt zeigt (Abb. 39). Auch JSB58 zeigt in Anwesenheit von Pro-Gly im hochosmolaren Medium ein verbessertes Wachstum. Dieser osmoprotektive Effekt ist jedoch deutlich schwächer als der für JSB8 gezeigte (Abb. 39). Das Dipeptid Pro-Phe dagegen, hat nur einen minimalen Effekt auf das Wachstum von JSB58 (Abb. 39). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Dpp-System in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen zwar in die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide involviert ist, aber nicht der einzige Transporter ist, der diese Aufnahme in *B. subtilis* katalysiert.

In einem weiteren Wachstumsexperiment wurde zudem untersucht, ob der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und die Dpp⁻-Derivate MB307 [$\Delta(dciAE132::neo)$] und JSB54 [$\Delta(dppE::spc)I$] unter hochosmolaren Bedingungen gleichermaßen von der Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide im Medium profitieren (Daten nicht gezeigt). Da sowohl der *B. subtilis* Wildtypstamm, als auch MB307 und JSB54 in der Lage sind, Prolin mittels *de novo* Synthese unter hochosmolaren Bedingungen zu akkumulieren, kann das Wachstum zwar durch die Anwesenheit prolinhaltiger Dipeptide verbessert werden, es ist jedoch kein Unterschied in der Protektion erkennbar zwischen dem Wildtypstamm und den *dppE*-Mutanten (Daten nicht gezeigt).

5.10 Konstruktion und phänotypische Charakterisierung einer *opp*-Mutante

In der Literatur wurde bereits der *oppA*-Stamm MB269 [*spoOKA::pDR1 (cat)*] beschrieben (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Die Peptidtransportaktivität dieses Stammes wurde durch das Wachstum des prolinauxotrophen Derivates MB318 [*spoOKA::pDR1 (cat)*] auf dem prolinhaltigen Tripeptid Pro-Gly-Gly als einziger Prolinquelle getestet (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Da die auf Minimalmediumagarplatten mit 100 μ M Pro-Gly-Gly ausgestrichenen MB318-Zellen kein Wachstum zeigten wurde gefolgert, dass die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide durch das Opp-System erfolgt (Mathiopoulos *et al.*, 1991).

In dem im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Stamm JSB63 [*oppA* \times pJS53 (*neo*)] wurde das Plasmid pJS53 durch eine einfache Rekombination (Campbell-Typ) in das *oppA*-Gen von *B. subtilis* inseriert. Die korrekte Insertion in das *oppA*-Gen wurde mittels einer Southern Hybridisierungs-Analyse mit einer *opp*-spezifischen Sonde überprüft (Daten nicht gezeigt). Da durch eine erneute, einfache Rekombination das inserierte Plasmid das *oppA*-Gen wieder verlassen könnte, wurde den Kulturen dieses Stammes immer Kanamycin zugesetzt und somit ein dauerhafter Selektionsdruck auf das in das Genom inserierte Plasmid ausgeübt. Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes JSB62 [*oppA* \times pJS53 (*neo*) $\Delta(proBA::cat)I$] wurde die beschriebene *opp*-Mutation in einen *proBA*⁻-Hintergrund gebracht. Die Komplementation der Prolinauxotrophie der *B. subtilis*-Stämme JSB11 und JSB62 durch Pro-Gly-Gly und Pro-Val-Gly wurde in einem Wachstumsversuch getestet. Dazu wurden diese prolinauxotrophen Stämme in SMM mit ausreichend Prolin (10 mM) vorgezogen und einmal mit SMM gewaschen, um Prolin vollständig aus dem Medium zu entfernen. Aus diesen prolinfreien Kulturen wurden dann 15 ml SMM ohne und mit 100 μ M Pro-Gly-Gly oder 100 μ M Pro-Val-Gly auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die nach 6 Stunden erreichte OD₅₇₈ wurde bestimmt. Die Prolinauxotrophie in dem JSB11-Stamm, mit einem intakten Opp-System, wurde durch die prolinhaltigen Tripeptide komplementiert (Abb. 40). Der *opp*⁻-Stamm dagegen zeigte ein deutlich geringeres Wachstumsvermögen und wurde in seiner Prolinauxotrophie offensichtlich wesentlich schlechter durch die Tripeptide Pro-Gly-Gly und Pro-Val-Gly komplementiert (Abb. 40). Unter Normalbedingungen ist das Opp-System somit wesentlich an der Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide in *B. subtilis* beteiligt, es kann jedoch zum Teil in seiner Funktion von einem anderen, bisher unbekanntem System ersetzt werden.

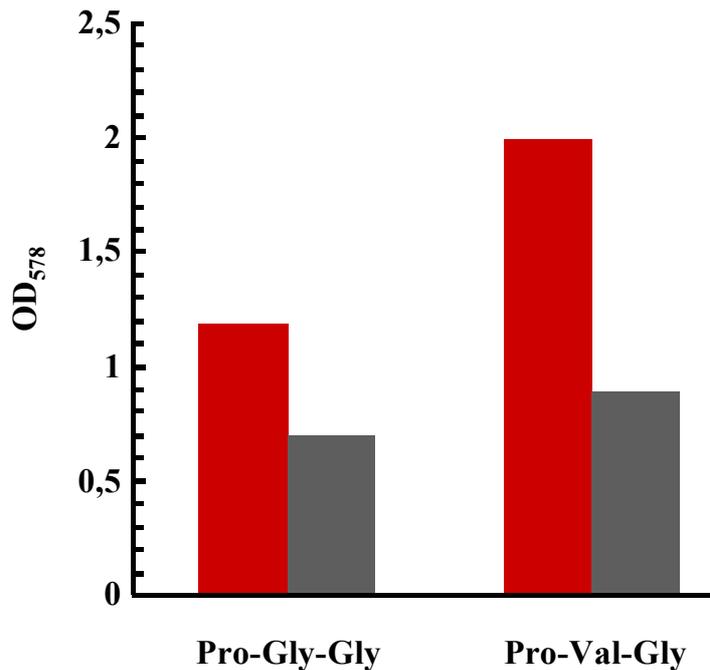


Abb. 40 Der prolinauxotrophe Phänotyp von JSB62 [*oppA* × pJS53 (*neo*) Δ(*proBA::cat*)I] wird nur unzureichend durch die Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide komplementiert

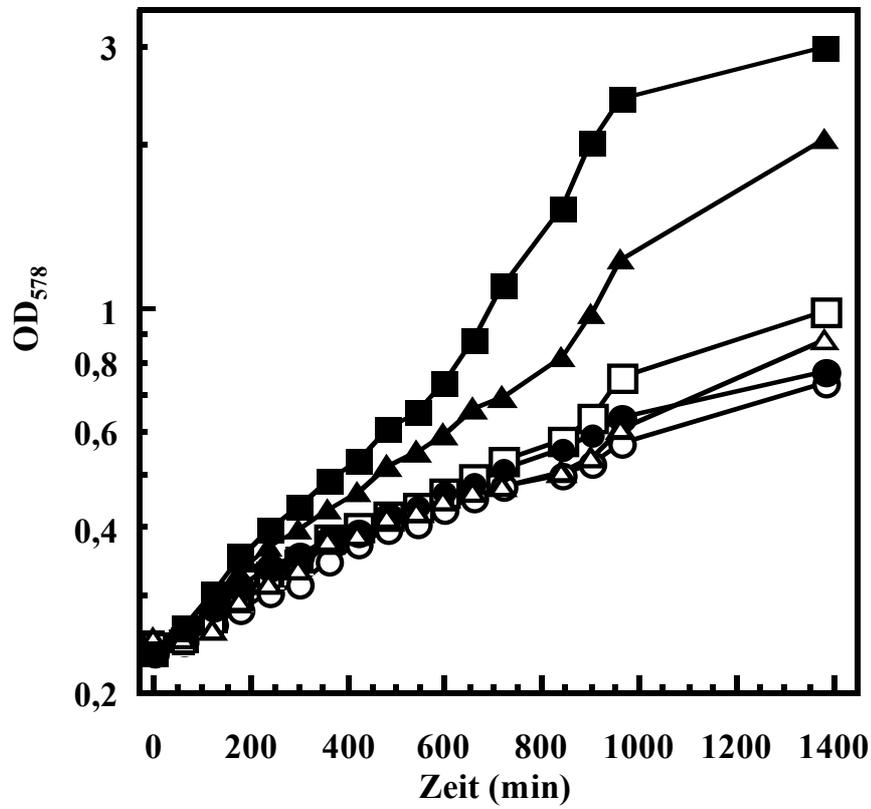
Der *B. subtilis*-Stamm JSB11 (■) und das [*oppA* × pJS53 (*neo*)] Derivat JSB62 (■) wurden in SMM mit ausreichend Prolin (10 mM) vorgezogen, mit SMM gewaschen und dann in SMM ohne oder mit 100 μM Pro-Val-Gly beziehungsweise mit 100 μM Pro-Gly-Gly auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die nach 6 Stunden erreichte OD₅₇₈ wurde bestimmt.

5.11 Das Opp-System ist in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen der dominante Transporter für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide

Die beschriebenen Experimente haben den Nachweis erbracht, dass die Tripeptide Pro-Gly-Gly und Pro-Val-Gly osmoprotektiv auf das Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis*-Zellen wirken (Abb. 36), indem sie zu einer Prolinakkumulation führen (Abb. 37). Im Folgenden sollte die Relevanz des Opp-Systems für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide unter hochosmolaren Bedingungen untersucht werden. Hierzu wurde in einem Wachstumsexperiment untersucht, ob der *proHJ*-Stamm JSB8 und der *B. subtilis*-Stamm JSB61 [*oppA* × pJS53 (*neo*) Δ(*proHJ::tet*)I], der zudem ein defektes *oppA*-Gen aufweist, unter hochosmolaren Bedingungen gleichermaßen von der Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide im Medium profitieren. Es wurden 40 ml hochosmolares SMM-Medium (1,2 M NaCl) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes auf eine OD₅₇₈ von 0,2 angeimpft, bei 37°C aerob inkubiert und die Entwicklung der OD₅₇₈ der Kulturen wurde für 23 Stunden registriert. Die beiden Stämme wachsen in Minimalmedium (SMM) mit 1,2 M NaCl nur sehr langsam (Abb. 41A). Die Zugabe prolinhaltiger Tripeptide verbessert das Wachstum von JSB8 signifikant. Pro-Val-Gly hat dabei einen stärkeren osmoprotektiven Effekt als Pro-Gly-Gly (Abb. 41A). Der *opp*⁻-Stamm JSB61 wird dagegen unter hochosmolaren Bedingungen nicht von prolinhaltigen Tripeptiden protektiert

(Abb. 41A). Weder die Anwesenheit von Pro-Gly-Gly, noch von Pro-Val-Gly führt zu einem verbesserten Wachstum osmotisch gestresster JSB61-Zellen.

A



B

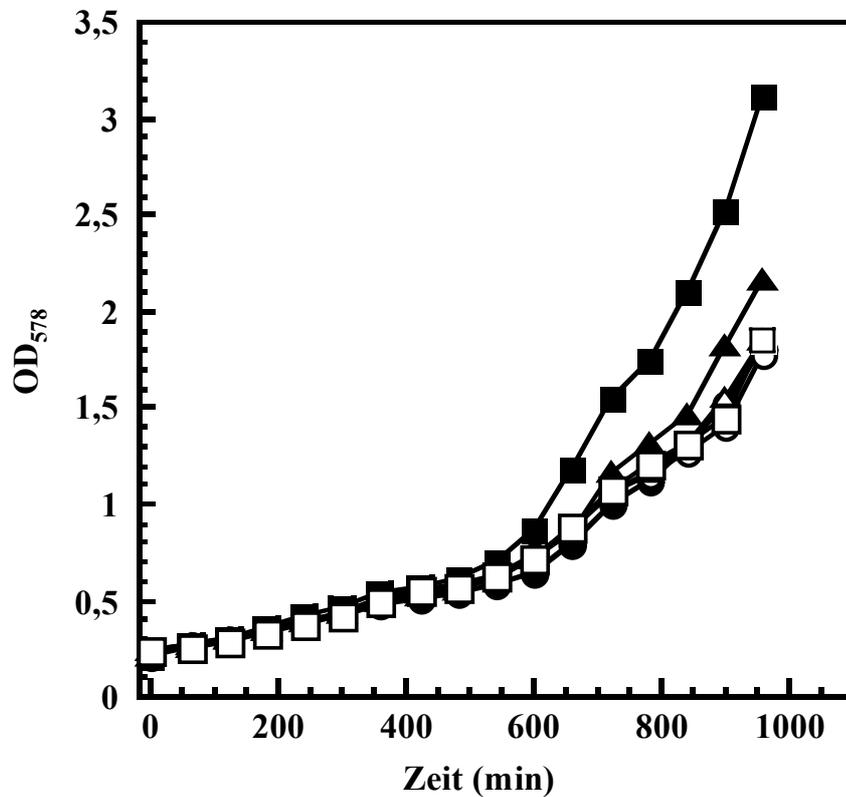


Abb. 41 Der *B. subtilis*-Stamm JSB61 [*oppA* × pJS53 (*neo*) Δ(*proHJ::tet*)] wird unter hochosmolaren Bedingungen nicht mehr durch prolinhaltige Tripeptide protektiert

A. Kulturen des *opp*⁺ *proHJ* Stammes JSB8 (● ▲ ■) und seines [*oppA* × pJS53 (*neo*)]-Derivates JSB61 (○ △ □) wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung der OD₅₇₈ dieser Kulturen in SMM mit 1,2 M NaCl (● ○) und SMM mit 1,2 M NaCl in Anwesenheit von 1 mM Pro-Val-Gly (■ □) oder 1 mM Pro-Gly-Gly (▲ △) wurde für 23 Stunden registriert. **B.** Kulturen des *opp*⁺ Stammes JH642 (● ▲ ■) und seines [*oppA* × pJS53 (*neo*)]-Derivates JSB63 (○ △ □) wurden aus in SMM ohne Salz gewachsenen Übernachtskulturen auf eine OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert und aerob bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung der OD₅₇₈ dieser Kulturen in SMM mit 1,2 M NaCl (● ○) und SMM mit 1,2 M NaCl in Anwesenheit von 1 mM Pro-Val-Gly (■ □) oder 1 mM Pro-Gly-Gly (▲ △) wurde für 15 Stunden registriert. Diese Wachstumsversuche zeigen ein repräsentatives Experiment, das in je einem weiteren, davon unabhängigen Experiment bestätigt wurde.

In einem weiteren Wachstumsexperiment wurde zudem untersucht, ob der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und das *Opp*⁻-Derivat JSB63 [*oppA* × pJS53 (*neo*)] unter hochosmolaren Bedingungen gleichermaßen von der Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide im Medium profitieren. Da sowohl der *B. subtilis* Wildtypstamm, als auch JSB63 in der Lage sind Prolin mittels *de novo* Synthese unter hochosmolaren Bedingungen zu akkumulieren, sind die hier beobachteten Effekte weitaus weniger drastisch. Es wird aber dennoch deutlich, dass der Wildtypstamm in Anwesenheit von Pro-Gly-Gly oder Pro-Val-Gly einen Wachstumsvorteil gegenüber dem *Opp*⁻-Stamm JSB63 hat, der von diesen prolinhaltigen Tripeptiden offensichtlich nicht protektiert wird (Abb. 41B).

In dem *B. subtilis*-Stamm JSB8 [Δ(*proHJ::tet*)], der in hyperosmotischem Medium nicht zu einer *de novo* Prolinsynthese für osmoprotektive Zwecke in der Lage ist (Abb. 9A), kommt es in Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide zu einer signifikanten Prolinakkumulation (Abb. 37A). Der osmoprotektive Effekt beruht also nicht auf einer Akkumulation der Tripeptide selbst, sondern einer Anhäufung des durch die Spaltung der Peptide freigesetzten Prolins. Die HPLC-Analyse osmotisch gestresster JSB61-Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob es in diesem Stamm in Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide noch zu einer Akkumulation von Prolin kommt. Es konnte dabei eindeutig nachgewiesen werden, dass JSB61 unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen nicht in der Lage ist Prolin durch die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide zu akkumulieren (Abb. 42).

Die in Abbildung 41 und 42 präsentierten Ergebnisse haben den Nachweis erbracht, dass das *Opp*-System in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen essentiell für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide ist und einer Akkumulation der osmotischen Schutzsubstanz Prolin dient.

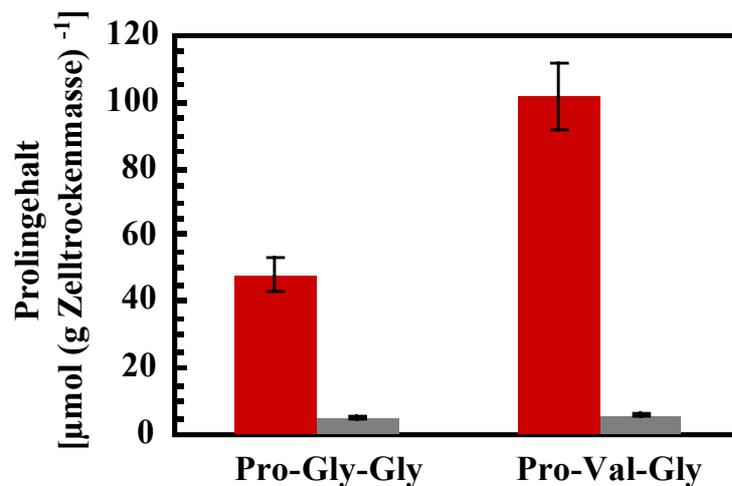


Abb. 42 Der osmotisch gestresste *B. subtilis*-Stamm JSB61 [*oppA* × pJS53 (*neo*) Δ (*proHJ::tet*)] akkumuliert in Gegenwart prolinhaltiger Tripeptide kein Prolin

Kulturen des *B. subtilis*-Stammes JSB8 (■) und seines [*oppA* × pJS53 (*neo*)] Derivates JSB61 (■) wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 2 in SMM mit 1,2 M NaCl unter Zugabe von 1 mM Pro-Val-Gly oder 1 mM Pro-Gly-Gly gezogen. Der Prolingehalt wurden mittels HPLC-Analyse bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei Kulturen. Für jede Probe wurden der Prolin- und Glutamatgehalt jeweils doppelt bestimmt.

5.12 Der Einfluss von CodY und AbrB auf die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons in *B. subtilis*

Die Expression des *dpp*-Operons von *B. subtilis* ist in Medien, die schnell metabolisierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthalten reprimiert (Slack *et al.*, 1991). Unter Nährstoffmangelbedingungen, wie sie in der frühen Stationärphase auftreten kommt es dagegen zu einer Induktion der *dpp*-Expression. Die *dpp*-Expression wird zudem durch alle Mechanismen induziert, die zur Initiation der Sporulation führen (Mathiopoulos *et al.*, 1991). Dpp ist jedoch nicht essentiell für die Sporulation. Die Expression des *dpp*-Operons steht unter indirekter Kontrolle von Spo0A (Slack *et al.*, 1991), einem regulatorischen Protein, das die Transkription zahlreicher Stationärphasegene kontrolliert, von denen allerdings nur wenige essentiell für die Sporulation sind (Strauch, 1993). So hat Spo0A auch die Aufgabe die Synthese von AbrB, einem negativen, globalen Regulator einiger früher Stationärphasegene zu reprimieren (Strauch *et al.*, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass AbrB direkt an die *dpp*-Promotorregion bindet (Slack *et al.*, 1991), aber nicht für die Repression von *dpp* bei Wachstum in nährstoffreichem Medium verantwortlich ist. Ein weiterer direkter Repressor des Dipeptid-Transportoperons ist CodY (cod: control of *dpp*), der an die *dpp*-Promotorregion bindet, wenn *B. subtilis* mit ausreichend Glukose und Casaminoäuren wächst (Slack *et al.*, 1995; Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindestellen von CodY und AbrB an die *dpp*-Promotorregion überlappen, und AbrB und CodY daher um die Bindung konkurrieren (Serror und Sonenshein, 1996).

Inwieweit die Induktion der Expression des *dpp*-Operons in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen von CodY und AbrB beeinflusst wird, sollte mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen untersucht werden.

5.12.1 Die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons in *B. subtilis* ist unabhängig von AbrB

Um die Rolle des Repressorproteins AbrB für eine osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons zu untersuchen, wurden Northern-Blot-Analysen des chromosomalen *dpp*-Genortes im *B. subtilis*-Wildtyp und in dem *abrB*⁻-Stamm JSB42 [$\Delta(\textit{abrB}::\textit{tet})$] durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von JH642- und JSB42-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (0,7 M NaCl) gewachsen sind. Anschließend wurde diese RNA mit der bereits oben beschriebenen, *dppA*-spezifischen RNA-Sonde (Sonde 1; Abb. 30A) hybridisiert. Hierbei konnte das 5500 nt lange Transkript des *dpp*-Operons detektiert werden, die Produktion dieses Transkriptes, war unabhängig vom Vorhandensein des AbrB-Proteins sowohl im Wildtyp, als auch in der *abrB*-Mutante JSB42 unter osmotischer Kontrolle (Abb. 43). Das AbrB-Protein hat somit keinen Einfluss auf die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons.

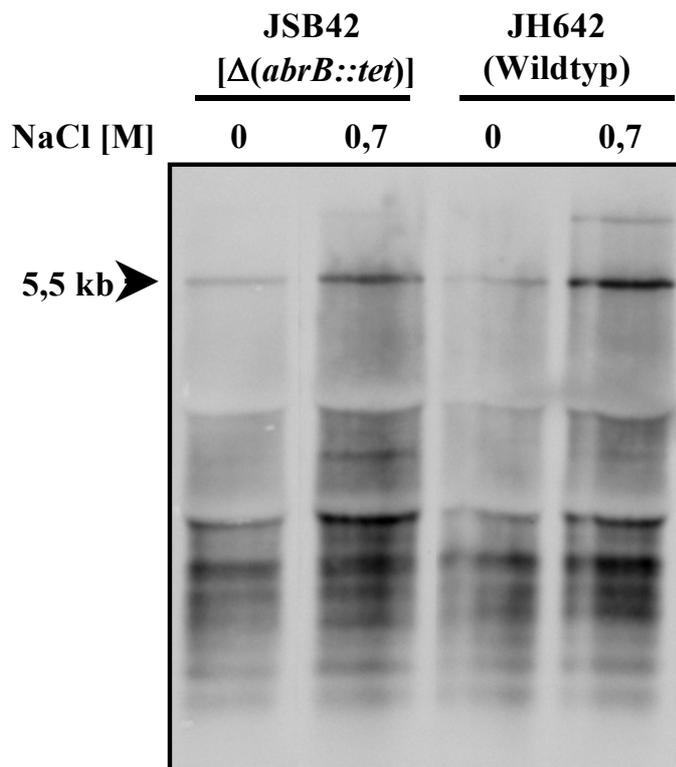


Abb. 43 Die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons wird nicht durch AbrB beeinflusst

Gesamt-RNA wurde aus JH642-Zellen und Zellen des *abrB*-Stammes JSB42 [$\Delta(\textit{abrB}::\textit{tet})$] präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) in SMM (0 M NaCl) oder SMM mit erhöhter Osmolarität (0,7 M NaCl) gewachsen sind. 10 μ g dieser RNA wurden mit der *dppA*-spezifischen, DIG-markierten *anti-sense* RNA-Sonde 1 (Abb. 30A) hybridisiert.

5.12.2 Die Expression des *dpp*-Operons wird durch CodY beeinflusst

Das CodY-Protein ist ein direkter Repressor des Dipeptid-Transportoperons. Er bindet an die *dpp*-Promotorregion, wenn *B. subtilis* in Anwesenheit leicht verstoffwechselbarer Kohlenstoff- und Stickstoffquellen wächst und führt zu einer deutlich verminderten *dpp*-Expression (Slack *et al.*, 1995; Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). Er koppelt somit die *dpp*-Expression an die Nährstoffversorgung der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass Casaminosäuren indirekt über CodY einen starken, negativen Effekt auf die *dpp*-Transkription ausüben, unabhängig davon ob gut metabolisierbare Kohlenstoffquellen wie Glukose im Medium vorhanden sind. Zwar reduziert Glukose ebenfalls die *dpp*-Transkription, der Effekt ist jedoch deutlich schwächer (Slack *et al.*, 1991; Serror und Sonenshein, 1996). Der indirekte Einfluss von Casaminosäuren auf die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons wurde in einer Northern-Blot-Analysen näher untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus JH642-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (1 M NaCl) in Ab- oder Anwesenheit von 0,2 % Casaminosäuren gewachsen sind. Das für alle Untersuchungen in dieser Arbeit verwendete Minimalmedium (SMM) enthält zudem 0,5 % Glukose. Diese RNA wurde mit der bereits oben beschriebenen, *dppCD*-spezifischen RNA-Sonde (Sonde 2; Abb. 30A) hybridisiert. Es konnte das 5500 nt lange Transkript des *dpp*-Operons detektiert werden. In SMM ohne Casaminosäuren gewachsenen *B. subtilis*-Zellen zeigten eine osmotisch induzierte Expression des *dpp*-Operons. Das unter Normalbedingungen gebildete *dpp*-Transkript wurde unter hyperosmotischen Bedingungen verstärkt gebildet (Abb. 44A). Wurden die *B. subtilis*-Zellen dagegen in Minimalmedium mit 0,2 % Casaminosäuren kultiviert, so konnte ohne Zugabe von Salz kein *dpp*-Transkript detektiert werden. Die Zugabe von NaCl, mit einer Endkonzentration von 1 M dagegen führt nur zu einer minimalen Induktion der Expression des *dpp*-Operons (Abb. 44A). Es kommt somit auch in Anwesenheit von Casaminosäuren noch zu einer minimalen osmotischen Induktion der *dpp*-Expression, der Gesamtlevel an *dpp*-Transkript ist jedoch drastisch reduziert.

Um die Rolle des Repressorproteins CodY für die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons, in Ab- und Anwesenheit von Casaminosäuren näher zu charakterisieren wurden Northern-Blot-Analysen des chromosomalen *dpp*-Genortes in dem *codY*-Stamm JSB60 (*codY::erm*) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde von JSB60-Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 bis 0,8) in SMM oder SMM mit erhöhter Osmolarität (1 M NaCl) in Ab- oder Anwesenheit von 0,2 % Casaminosäuren gewachsen sind. Anschließend wurde diese RNA mit der beschriebenen, *dppCD*-spezifischen RNA-Sonde (Sonde 2; Abb. 30A) hybridisiert. In der *codY*-Mutante JSB60 zeigt sich eine osmotisch induzierte Expression des *dpp*-Operons, die völlig unabhängig von der Präsenz von Casaminosäuren im Medium ist (Abb. 44B). Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die in Anwesenheit von Casaminosäuren verminderte *proHJ*-Expression ausschließlich auf dem CodY-Repressorprotein beruht. Der Expressionslevel des *dpp*-Operons ist abhängig von CodY und damit der Nährstoffsituation von *B. subtilis* angepasst.

Mit den *B. subtilis*-Stämmen JSB48 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ(*dppA'*-*treA*)1 '*proG cat*]] und JSB56 [(*treA::neo*)1 *amyE::*[Φ(*dppA'*-*treA*)1 '*proG cat*]] wurden für das *dpp*-System zwei *treA*-Repotergenfusionen mit unterschiedlichen Fusionspunkten im *dppA*-Gen konstruiert. Mit Hilfe

dieser Stämme sollte die osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons näher charakterisiert werden. Zu den für das *proHJ*-Operon beschriebenen Experimenten, analoge Untersuchungen zeigten jedoch eine vollkommen deregulierte, konstitutive Expression der *dppA-treA* Fusionen auf hohem Level. Eine osmotisch regulierte Expression des *dpp*-Operons war mit Hilfe dieser Fusionsstämme nicht nachweisbar. Die TreA-Aktivitäten variierten unabhängig von der externen NaCl-Konzentration im Bereich von 1000 bis 1400 Einheiten pro mg Zellprotein. Die Zugabe von Casamino­säuren führte zwar zu einer starken Repression der *dpp*-Expression, es war jedoch auch hier kein osmotischer Effekt mehr erkennbar (Daten nicht gezeigt).

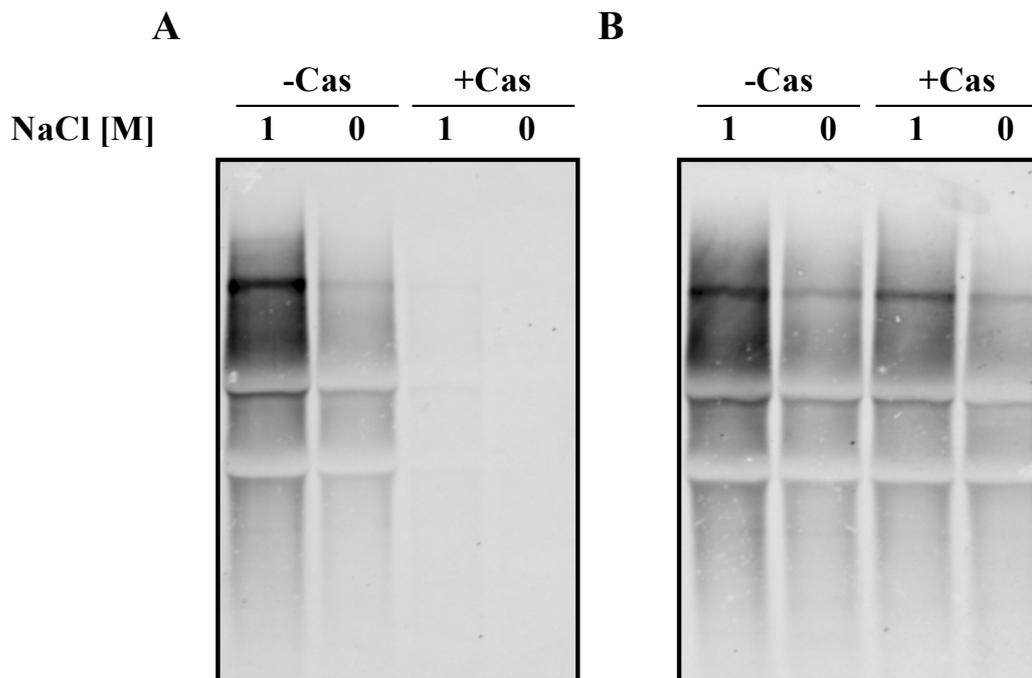


Abb. 44 Die Expression des *dpp*-Operons wird durch CodY beeinflusst

Gesamt-RNA wurde aus JH642- (A) oder JSB60 (B) -Zellen, die bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,8) in SMM (0 M NaCl) oder SMM mit 1,0 M NaCl in Ab- oder Anwesenheit von 0,2 % Casamino­säuren gewachsen sind, präpariert. 10 μ g dieser RNA wurde mit der bereits oben beschriebenen, *dppCD*-spezifischen RNA-Sonde (Sonde 2; Abb. 30A) hybridisiert.

V. DISKUSSION

Das Wachstum und Überleben von Mikroorganismen ist eng an die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen in ihrem Habitat gekoppelt. So ist vor allem der Boden, das natürliche Habitat von *B. subtilis*, ein sowohl durch extreme als auch durch stark fluktuierende Osmolaritäten gekennzeichneter Lebensraum. Um einem durch hohe extrazelluläre Osmolarität implizierten Wasserausstrom entgegenzuwirken, müssen Mikroorganismen einen höheren Osmolytgehalt im Zytoplasma etablieren. Denn der für die Aufrechterhaltung des Zellvolumens und die Zellteilung essentielle Turgor kann nur solange aufrechterhalten werden, wie die intrazelluläre Konzentration gelöster, osmotisch aktiver Teilchen die extrazelluläre übertrifft. Die Akkumulation kompatibler organischer Solute, die auch in molaren Konzentrationen für den Stoffwechsel tolerierbar sind, ist ein evolutionär hochkonserviertes Instrument der Anpassung an hohe Osmolarität. Neben *Bacteria*, *Archaea* und Pilzen, machen sich auch Pflanzen und tierische Zellen die Akkumulation osmotischer Schutzsubstanzen zunutze (Csonka und Epstein, 1996; Bremer und Krämer, 2000; Delauney und Verma, 1993; Roberts, 2000; Martin *et al.*, 1999; Kirst, 1996; Kirst 1990; Garcia de Castro und Tunnacliffe, 2000; Nevoigt und Stahl, 1997; Handler und Kwon, 1993; Yoshida *et al.*, 1995).

1. Anpassung des Prolinpools in *B. subtilis* entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Anforderungen

Auch das Gram-positive Bodenbakterium *B. subtilis* nutzt ein weites Spektrum kompatibler Solute, indem es diese Substanzen durch hochaffine und osmotisch regulierte Transportsysteme aus der Umgebung aufnimmt (Abb. 1, Kempf und Bremer, 1998b). In Abwesenheit exogener Schutzsubstanzen greift *B. subtilis* auf seine eigenen biosynthetischen Ressourcen zur Akkumulation kompatibler Solute zurück. Prolin spielt dabei eine besondere Rolle für die Osmostressantwort in *B. subtilis*, da es sowohl durch den hochaffinen Prolintransporter OpuE aus dem umgebenden Medium aufgenommen werden kann (Abb. 45), als auch das einzige von *B. subtilis* mittels *de novo* Synthese akkumulierte Osmoprotektivum darstellt. Erste Untersuchungen konnten bereits vor 25 Jahren eine Akkumulation von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen nachweisen (Measures, 1975; Gould und Measures, 1977). Detaillierte Studien von Whatmore *et al.* (1990) zum Muster der Prolinbiosynthese haben zudem gezeigt, dass der intrazelluläre Prolinpool nach einem osmotischen Schock mit 0,4 M NaCl innerhalb von 7 Stunden von einem basalen Level von 16 mM auf 700 mM ansteigt. Es konnte zudem eine proportionale Korrelation zwischen der intrazellulär *de novo* synthetisierten Prolinmenge und dem Ausmaß des osmotischen Stresses nachgewiesen werden (Abb. 5). Da bei diesem Experiment *B. subtilis* deutlich höheren Salzkonzentrationen als 0,4 M NaCl ausgesetzt wurde, kann man davon ausgehen, dass es endogen zu einer Anhäufung von Prolin in molaren Konzentrationen kommt. Dieser drastische Anstieg des intrazellulären Prolinpools verdeutlicht die fundamentale Rolle der Prolinsynthese bei der Anpassung von *B. subtilis* an hyperosmolare Bedingungen. Im Rahmen dieser und der vorhergehenden Arbeit (Brill, 1998) konnten die molekularen und physiologischen Details dieser osmotisch vermittelten Prolinbiosynthese in *B. subtilis* aufgeklärt werden. Es wurde ein neuer Prolinbiosyntheseweg charakterisiert, der sich von dem für anabole Zwecke genutzten Syntheseweg

unterscheidet. Zwei Isoenzyme, ProH und ProJ, ersetzen unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen die unter normalen Bedingungen operierenden ProB- und ProG/ProI-Proteine des anabolen Prolinbiosyntheseweges (Abb. 45). Der osmotische Weg ist jedoch nicht autark, sondern er rekrutiert das ProA-Enzym aus dem anabolen Syntheseweg. Die γ -Glutamylphosphat-Reduktase (ProA) katalysiert somit den zweiten Schritt der Prolinbiosynthese in beiden Wegen (Abb. 45). Die Expression aller drei Gene *proH*, *proJ* und *proA* ist für die osmotisch induzierte Prolinakkumulation essentiell. Ein im *proHJ*-Operon defekter *B. subtilis*-Stamm ist nicht mehr in der Lage Prolin mittels *de novo* Synthese zu akkumulieren (Abb. 6A und 9A) und weist daher einen massiven Wachstumsnachteil unter hyperosmolaren Bedingungen auf (Abb. 8). Obwohl *B. subtilis* für die anabole und die osmoregulatorische Prolinbiosynthese offensichtlich sehr ähnliche Enzyme nutzt, unterscheiden sich die beiden Synthesewege entsprechend ihrer unterschiedlichen physiologischen Funktion grundlegend in ihrer Regulation.

Mit Hilfe von Northern-Analysen (Abb. 12) und Reporterfusionstudien (Abb. 16) konnte nachgewiesen werden, dass das *proHJ*-Operon einer fein abgestimmten osmotischen Kontrolle auf transkriptioneller Ebene unterliegt (Abb. 45). Die Expression der für die anabolen Prolinsyntheseenzyme kodierenden Gene ist dagegen unter hochosmolaren Bedingungen nicht erhöht (Abb. 13). Obwohl auch das ProA-Protein in die Prolinbiosynthese unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen involviert ist, findet keine entsprechende Induktion der Expression des zugehörigen Strukturgens statt. Die intrazelluläre Menge an ProA ist somit offensichtlich nicht limitierend für eine Prolinakkumulation. Mittels Primer Extension-Analyse wurde der Transkriptionsstartpunkt des *proHJ*-Operons bestimmt (Abb. 14). Der unmittelbar stromaufwärts von diesem gelegene *proHJ*-Promotor (Abb. 14) wird durch den vegetativen Sigmafaktor A aus *B. subtilis* erkannt (Abb. 15) und seine Aktivität ist eng an die Osmolarität des Wachstumsmediums gekoppelt (Abb. 16).

Prolin als proteinogene Aminosäure wird in ungestressten Zellen primär für anabole Zwecke benötigt. Entsprechend dieser physiologischen Aufgabe ist der anabole Prolinbiosyntheseweg ebenfalls einer Regulation auf transkriptioneller Ebene unterworfen. Die Expression des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens wird über den Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination (Abb. 3; Grundy und Henkin, 1993) spezifisch dem Prolinbedarf der Zelle angepasst (Abb. 45).

Die beiden Enzyme, die den ersten Schritt des anabolen (ProB) und des osmoregulatorischen (ProJ) Prolinbiosyntheseweges katalysieren, unterscheiden sich signifikant in ihrer Sensitivität gegenüber einer Feedbackkontrolle durch Prolin (Abb. 45). Die γ -Glutamyl-Kinase ProB unterliegt vermutlich einer allosterischen Hemmung durch das Endprodukt Prolin (Abb. 21). Das steht auch in Konkordanz mit der physiologischen Aufgabe dieses Enzyms im anabolen Prolinbiosyntheseweg, wo es aus energetischen Gründen gilt eine überflüssige Synthese großer Prolinmengen in nicht osmotisch gestressten Zellen zu vermeiden. Unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen ist dagegen die Akkumulation dieser osmotischen Schutzsubstanz in hohen intrazellulären Konzentrationen essentiell für das Überleben der Zelle. Entsprechend dieser Anforderung weist die γ -Glutamyl-Kinase ProJ aus dem osmotisch induzierten Prolinsyntheseweg eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber einer Feedbackinhibition auf (Abb. 21).

Das in Abbildung 45 dargestellte Schema zur Anpassung des Prolinpools in *B. subtilis* entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Anforderungen, verdeutlicht die Bedeutung von Prolin für den Zellstoffwechsel und welche wesentliche und integrale Stellung dieser Aminosäure in *B. subtilis* zudem für die Stressantwort zukommt.

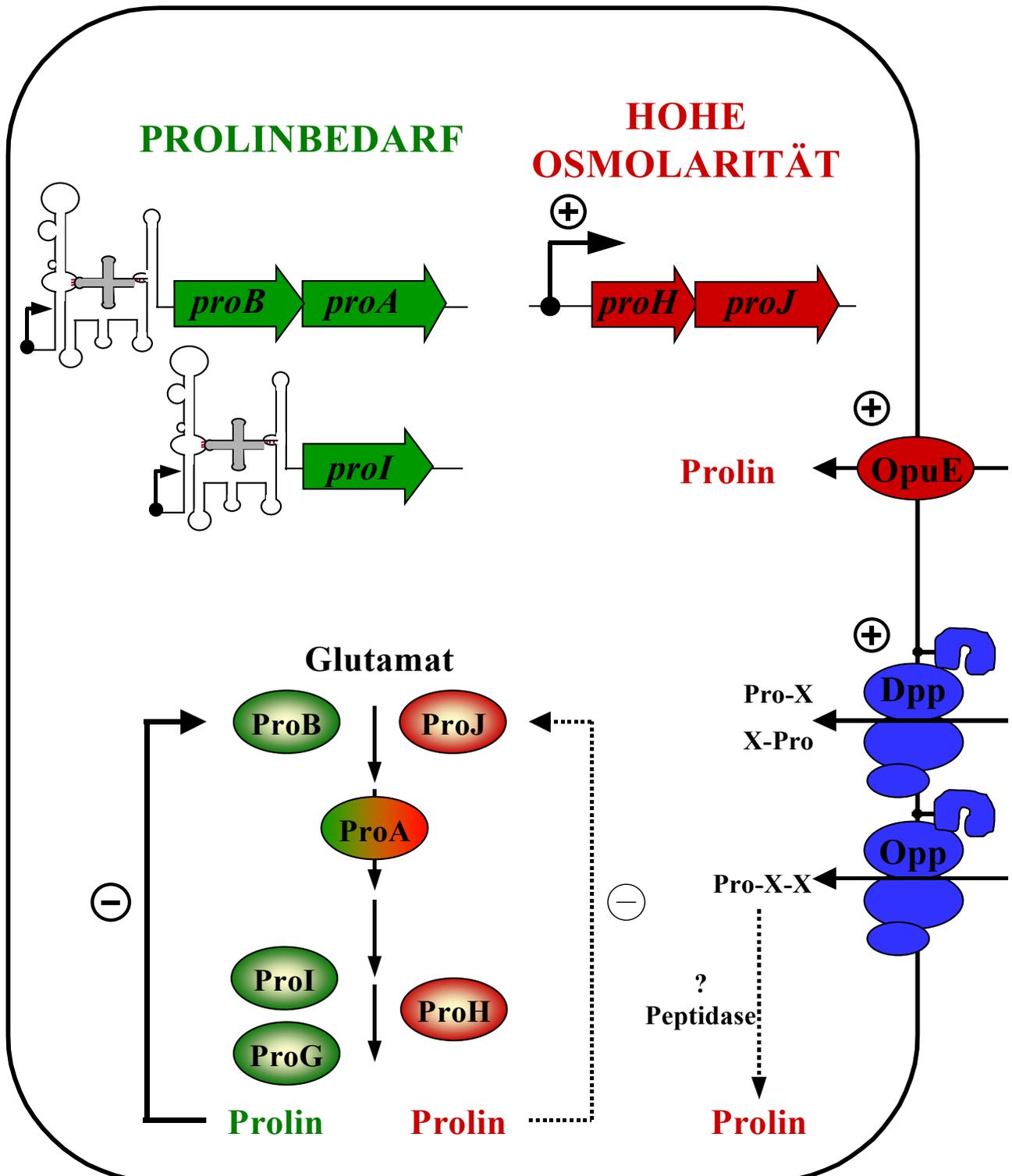


Abb. 45 Anpassung des Prolinpools in *B. subtilis* entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Anforderungen

In rot sind die vorwiegend einer Anpassung an hochosmolare Wachstumsbedingungen dienenden Elemente dargestellt. Grün dagegen symbolisiert die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke, blau die Aufnahme prolinhaltiger Peptide.

1.2 Neusynthese kompatibler Solute: Aufklärung des Syntheseweges für eine weitverbreitete osmotische Schutzsubstanz

Von osmotisch gestressten Mikroorganismen kann zur Anhäufung kompatibler Solute entweder die direkte Aufnahme aus der Umgebung oder deren Neusynthese genutzt werden. Die meisten Mikroorganismen haben beide Möglichkeiten verwirklicht und sind so überwiegend in der Lage mindestens eine osmotische Schutzsubstanz endogen zu synthetisieren (Galinski und Trüper, 1994). Die zugrunde liegenden Biosynthesewege konnten in *Bacteria* bisher jedoch nur für wenige der genutzten osmotischen Schutzsubstanzen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Beispiele hierfür sind der Zucker Trehalose, die Trimethylammoniumverbindung Glycinbetain und das Tetrahydropyrimidin Ectoin.

Trehalose ist die einzige in Minimalmedium von *E. coli* und *S. typhimurium de novo* synthetisierte osmotische Schutzsubstanz und ersetzt das in der ersten Phase der Anpassung an hohe Osmolarität akkumulierte Kaliumglutamat. Der Weg und die Regulation der Trehalosebiosynthese in osmotisch gestressten *E. coli*-Zellen ist sehr gut untersucht. Zwei Enzyme, die von dem osmotisch regulierten *otsAB*-Operon (*ots*: *o*smoregulated *t*rehalose *s*ynthesis) kodiert werden, sind an der Trehalosesynthese in *E. coli* beteiligt. Im ersten Schritt katalysiert die Trehalose-6-phosphat-Synthase (OtsA) die Kondensation von Glukose-6-phosphat und UDP-Glukose zu Trehalose-6-phosphat, welches im folgenden Schritt, katalysiert durch die Trehalose-6-Phosphatase, zu Trehalose dephosphoryliert wird (Kaasen *et al.*, 1992; Strøm und Kaasen, 1993; Kaasen *et al.*, 1994). Die Induktion des *otsAB*-Operons wird allein durch den alternativen Sigmafaktor RpoS (σ^S) kontrolliert und erfolgt zum einen durch osmotischen Stress, zum anderen aber auch in Stationärphasezellen (Hengge-Aronis *et al.*, 1991; Hengge-Aronis, 1996; Conter *et al.*, 1997; Loewen *et al.*, 1998). Die Akkumulation von Trehalose, sowohl unter hochosmolaren Bedingungen als auch in der stationären Phase, spiegelt die Funktion dieses Disaccharids als generelle Stressverbindung wider (Strøm und Kaasen, 1993).

Die Nutzung der osmotische Schutzsubstanz Glycinbetain ist weit verbreitet und es gibt prinzipiell zwei Glycinbetainsynthesewege in Bakterien. Nur einige halophile Mikroorganismen sind in der Lage Glycinbetain *de novo* zu synthetisieren (Severin *et al.*, 1992; Galinski und Trüper, 1994; Nyssölä *et al.*, 2000). Der Weg und die an einer Neusynthese von Glycinbetain aus Glycin beteiligten Enzyme wurden kürzlich für zwei extrem halophile Mikroorganismen, *Actinopolyspora halophila* und *Ectothiorhodospira halochloris*, aufgeklärt und charakterisiert. In diesen Mikroorganismen wird Glycin in drei sukzessiven Methylierungsschritten, die von zwei Methyltransferasen, einer Glycin-Sarcosin-Methyltransferase und einer Sarcosin-Dimethylglycin-Transferase katalysiert werden, zu Glycinbetain umgewandelt. S-Adenosyl-Methionin fungiert bei dieser Reaktion als Methylgruppen-Donor (Nyssölä *et al.*, 2000). Der zweite Biosyntheseweg geht von dem aus der Umgebung importierten Vorläufer Cholin aus, der in einer zweistufigen Reaktion zu Glycinbetain oxidiert wird (Lamarck *et al.*, 1991). Dieser Biosyntheseweg wurde für viele Mikroorganismen charakterisiert und ist in der Natur weit verbreitet, jedoch unterscheiden sich die daran beteiligten Enzymsysteme voneinander. So katalysiert in den Gram-positiven Bakterien *Arthrobacter pascens* und *Arthrobacter globiformis* eine bifunktionelle, lösliche Cholinoxidase beide Schritte der Umsetzung von Glycin zu Glycinbetain (Rozwadowsko *et al.*, 1991). In *E. coli*,

als Gram-negativem Modellsystem wird dagegen der erste Schritt von der membrangebundenen, FAD-abhängigen Cholin-Dehydrogenase BetA katalysiert. Das dabei entstehende Glycinbetain-Aldehyd wird dann in einer zweiten Reaktion zu Glycinbetain oxidiert. Dieser zweite Oxidationsschritt kann sowohl von BetA als auch von BetB, einer cytoplasmatischen Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase katalysiert werden (Lamark *et al.*, 1991). *B. subtilis* nutzt dagegen für den ersten Oxidationsschritt der Glycinbetainsynthese eine lösliche, NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase vom Typ III (GbsB). Der zweite Schritt der Umsetzung wird von der Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase GbsA katalysiert, die eine hohe Sequenzidentität zu dem BetB-Protein aus *E. coli* aufweist (Boch *et al.*, 1996). Die Glycinbetainsynthese hängt in beiden Mikroorganismen von der Cholinverfügbarkeit ab. Die Präsenz dieses Vorläufers in der Umgebung der Bakterienzelle beeinflusst die Expression der Gene, die für die Aufnahme und die enzymatische Oxidation von Cholin kodieren, sowohl in *B. subtilis* als auch in *E. coli*. So wird die Induktion des *betT*-Gens, das für den hochaffinen Cholintransporter BetT kodiert und die Induktion des *betIBA*-Operons aus *E. coli* durch den BetI-Repressor kontrolliert (Lamark *et al.*, 1996), während in *B. subtilis* der intrazelluläre Cholinsensor und Repressor GbsR die Expression des *opuB*- und *gbsAB*-Operons in Abhängigkeit von der Cholin-Verfügbarkeit reguliert (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner, 1999).

Die *de novo* Synthese der wichtigen osmotischen Schutzsubstanz Ectoin ist ebenfalls weit verbreitet und der zugrundeliegende Syntheseweg wurde erstmals in zwei moderat halophilen Bakterien, dem Gram-positiven *Marinococcus halophilus* (Louis und Galinski, 1997) und dem Gram-negativen *Halomonas elongata* (Cánovas *et al.*, 1997; Cánovas *et al.*, 1998; Göller *et al.*, 1998), aufgeklärt. L-Aspartat- β -semialdehyd dient als Vorläufer für die Synthese von Ectoin über drei enzymatisch katalysierte Schritte. Im ersten, von der L-2,4-Diaminobutyrat-Transaminase EctB katalysierten Schritt, wird L-Aspartat- β -semialdehyd unter Verwendung von Glutamat als Aminogruppendonor zu L-2,4-Diaminobutyrat umgesetzt. Dieses wird dann im zweiten Schritt von der L-2,4-Diaminobutyrat-N γ -Acetyltransferase EctA unter Verwendung von Acetyl-CoA zu N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat acetyliert, das im letzten Reaktionsschritt, der durch die N-Acetyldiaminobutyrat Dehydratase EctC katalysiert wird, zu zyklischem L-Ectoin kondensiert (Trüper und Galinski, 1990; Peters *et al.*, 1990; Louis und Galinski, 1997). Die Gene für die an der Ectoinbiosynthese beteiligten Enzyme sind in den diesbezüglich untersuchten Organismen in einem Operon (*ectABC*) organisiert. Dieses Operon wurde auch aus dem Gram-positiven *Bacillus pasteurii* isoliert und es konnte gezeigt werden, dass es in osmotisch gestressten Zellen verstärkt exprimiert wird (Kuhlmann und Bremer, 2001).

Die Akkumulation der Aminosäure Prolin als osmotische Schutzsubstanz ist ein weitverbreitetes Phänomen. Die Tatsache, dass Prolin auch von zahlreichen Pflanzen als primäre, endogene Schutzsubstanz bei hohen Salzkonzentrationen und Trockenheit *de novo* synthetisiert wird, spiegelt die große Effizienz und Bedeutung dieser Aminosäure als Osmoprotektivum wider (Delauney und Verma, 1993). Der einer osmotisch induzierten Prolinakkumulation in Pflanzen zu Grunde liegende Prolinbiosyntheseweg ist bekannt und wird in einem folgenden Abschnitt im Detail diskutiert. Obwohl eine verstärkte *de novo* Synthese von Prolin unter osmotischem Stress auch für zahlreiche Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* (Kuhlmann und Bremer, 2001), *Streptomyces griseus* (Killham und

Firestone, 1984), *Corynebakterium glutamicum* (Guillouet und Engasser, 1995a; Guillouet und Engasser, 1995b) und *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.*, 1989) nachgewiesen wurde, ist die molekulare Grundlage für diese Prolinakkumulation völlig ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Biosyntheseweg für dieses wichtige kompatible Solut erstmals im Bereich der Mikroorganismen aufgeklärt werden. Für *B. subtilis* wurde damit die Existenz eines zweiten osmotisch regulierten Prolinsyntheseweges neben dem normalen anabole Weg nachgewiesen (Abb. 45) - ein Phänomen, dass auch in anderen Mikroorganismen verwirklicht sein könnte.

2. Die Rolle von prolinhaltigen Peptiden für die Adaptation von *B. subtilis* an hyperosmotische Bedingungen

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellen prolinhaltige Di- und Tripeptide eine weitere Prolinquelle für *B. subtilis*, sowohl für anabole (Tab. 10) als auch für osmoprotektive Zwecke (Tab. 11) dar. In osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen führt offensichtlich die Aufnahme prolinhaltiger Peptide zu einer Akkumulation des durch die anschließende Hydrolyse der Peptide freigesetzten Prolins (Abb. 37). Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* (Amezaga *et al.*, 1995) kommt es in *B. subtilis* jedoch zu keiner Akkumulation der Peptide selbst.

Die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide für osmoprotektive Zwecke erfolgt über das osmotisch reguliert exprimierte Dpp-System (Abb. 30, 39 und 45). Hierbei handelt es sich um einen ABC-Transporter. Ist dieses System neben dem *proHJ*-Operon ausgeschaltet, wird der Stamm (JSB58) zwar deutlich weniger, aber immer noch durch die Anwesenheit prolinhaltiger Dipeptide im Medium osmotisch protektiert (Abb. 39). Zudem werden *dpp⁻ proBA⁻*-Stämme (JSB51 und JSB53) in ihrer Fähigkeit prolinhaltige Dipeptide als Prolinquelle für anabole Zwecke aufzunehmen nicht beeinflusst. Es gibt somit offensichtlich noch ein zweites, bisher unbekanntes Transportsystem, das die Aufnahme prolinhaltiger Dipeptide vermittelt. Auf Grund von Datenbankanalysen konnte eine weiteres putatives Di/Tripeptidaufnahmesystem (YclF) in *B. subtilis* identifiziert werden. Dieser Transporter gehört vermutlich zur Familie protonenabhängiger Oligopeptidtransporter (Saier *et al.*, 2002). Nähere Untersuchungen im Hinblick auf die physiologische Bedeutung dieses Transporters wurden allerdings nicht durchgeführt.

Das auf Transkriptionsebene osmotisch nicht induzierte Opp-System ist dagegen essentiell für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide für osmoprotektive Zwecke (Abb. 45). Ein *B. subtilis*-Stamm, der ein defektes *opp*-Operon und ein defektes *proHJ*-Operon trägt (JSB61), profitiert unter hochosmolaren Bedingungen nicht mehr von der Anwesenheit prolinhaltiger Tripeptide (Abb. 41) und ist auch nicht in der Lage Prolin über die Aufnahme und Hydrolyse der Peptide zu akkumulieren (Abb. 42). Ein *opp⁻ proBA⁻*-Stamm (JSB62) wird in seiner Fähigkeit prolinhaltige Dipeptide als Prolinquelle für anabole Zwecke aufzunehmen zwar beeinflusst, kann diese jedoch noch zur Kompensation seiner Prolin-Auxotrophie nutzen (Abb. 40). Unter Normalbedingungen kann daher offensichtlich auch das Opp-System zum Teil in seiner Funktion durch ein weiteres, bisher unbekanntes Oligopeptidaufnahmesystem ersetzt werden. In *B. subtilis* gibt es ein weiteres ABC-Transportsystem (App), das jedoch ausschließlich Tetra- und Pentapeptide transportiert. Zudem tragen Derivate des *B. subtilis*-Wildtypstammes 168 eine Frameshift-Mutation in dem Substratbindeprotein (AppA) (Koide und Hoch, 1994), so dass das App-System in dem für diese

Studien verwendeten JH642-Stamm defekt ist. Datenbankanalysen lassen vermuten, dass es ein weiteres putatives Oligopeptidaufnahmesystem YkfD in *B. subtilis* gibt, das ebenfalls zur Familie der ABC-Transporter gehört (Saier *et al.*, 2002).

Zahlreiche in der frühen Stationärphase exprimierte Gene werden durch eine Nährstofflimitation induziert, unabhängig davon ob ihre Genprodukte für die Sporulation erforderlich sind oder nicht. Das *dpp*-Operon, das ursprünglich *dciA* (Mathiopoulos und Sonenshein, 1989) genannt wurde, kodiert für das Dpp-Dipeptidtransportsystem, das zwar in der Stationärphase und bei Induktion der Sporulation induziert wird, jedoch nicht essentiell für die Sporulation von *B. subtilis* ist (Mathiopoulos *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1991). In exponentiell wachsenden Zellen ist *dpp* reprimiert (Slack *et al.*, 1991), was darauf beruht dass *dpp* unter Kontrolle von AbrB steht, einem globalen, negativen Regulator früher Stationärphasegene (Slack *et al.*, 1991; Strauch und Hoch, 1993). AbrB selbst steht unter Kontrolle von Spo0A (Bird *et al.*, 1993), einem positiven Regulator früher sporulationspezifischer Gene. AbrB ist am häufigsten und aktivsten in Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und in geringer Zelldichte vorliegen. Das AbrB-Protein bindet dann direkt an den *dpp*-Promotor und verhindert so die Expression des *dpp*-Operons (Slack *et al.*, 1991). Seine Synthese wird jedoch durch Spo0A reprimiert und seine Konzentration geringer, wenn die Zellkultur höhere Zelldichten erreicht (Perego *et al.*, 1988; Strauch *et al.*, 1989; Furbass *et al.*, 1991). Für eine stationärphaseabhängige Induktion der *dpp*-Expression ist somit AbrB verantwortlich. Wie Northern-Blot-Analysen gezeigt haben, wird die osmotisch regulierte *dpp*-Expression in exponentiell wachsenden Zellen dagegen nicht von AbrB beeinflusst (Abb. 43).

Die *dpp*-Expression wird zudem durch Nährstoffmangel induziert. In Medien, die schnell verstoffwechselbare C- und N-Quellen, wie Glukose oder Aminosäuregemische enthalten, ist sie dagegen vollständig reprimiert. Die durch Aminosäuren verursachte Repression ist dabei deutlich stärker als der Effekt von Glukose (Slack *et al.*, 1991). Diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Transkription wird gar nicht oder nur schwach durch Glukose reprimiert, da das in dieser Arbeit verwendete Minimalmedium (SMM) 0,5 % Glukose als C-Quelle enthält und dennoch *dpp*-Transkripte nachgewiesen wurden (Abb. 30). Eine mögliche Repression durch Glukose wurde allerdings nicht durch die Verwendung einer alternativen C-Quelle, wie Succinat überprüft. In Gegenwart von 0,2 % Casaminosäuren in SMM-Medium kam es dagegen zu einer völligen Repression der *dpp*-Expression (Abb. 44). Die glukose- und aminosäureabhängige Regulation der *dpp*-Expression wird nicht von AbrB, sondern durch einen zweiten, globalen Regulator vermittelt (Slack *et al.*, 1993). CodY (control of dpp) ist ein in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt weit verbreiteter Regulator, der die Expression zahlreicher Gene kontrolliert, die in Zellen induziert werden, die von der exponentiellen Phase in die Stationärphase und die Sporulation übergehen. In dieser Phase kommt es zu einer Nährstofflimitation und CodY verhindert eine Initiation der Sporulation solange noch ausreichend Nährstoffe vorliegen. CodY ist ein GTP-Bindeprotein, das den intrazelluläre GTP-Spiegel als Indikator für einen Nährstoffüberschuss oder Mangel nutzt (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). CodY ist ebenfalls ein direkter Repressor der *dpp*-Transkription, der an eine mit der AbrB-Bindestelle überlappende Promotorregion bindet (Serror und Sonenshein, 1996) und die *dpp*-Expression reprimiert, wenn die

Zellen mit einer ausreichenden Menge Glukose oder Casamino­säuren wachsen (Slack *et al.*, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einer CodY-Mutante die Expression des *dpp*-Operons unabhängig von der Verfügbarkeit von Casamino­säuren erfolgt (Abb. 44). Die *dpp*-Expression unterliegt zudem einer osmotischen Kontrolle (Abb. 30). Dabei kommt es in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen und in Abwesenheit von Casamino­säuren zu einer verstärkten *dpp*-Expression. In Anwesenheit exogener Casamino­säuren kommt es dagegen zu einer vollständigen Repression der *dpp*-Transkription, die auch durch osmotischen Stress nur minimal stimuliert werden kann (Abb. 44). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die osmotisch regulierte Expression vom *dpp*-Promotor ausgeht, während die Bindung des CodY-Repressors unmittelbar stromabwärts des Promotors dann entscheidet, ob die Transkription fortgesetzt werden kann. Die osmotisch regulierte Transkription des *dpp*-Operons erfolgt, ebenso wie die des *proHJ*-Operons ausgehend von einem Promotor (Abb. 32), der abhängig vom vegetativen Sigmafaktor A aus *B. subtilis* ist. Für die an den Nährstoffbedarf der Zelle angepasste Expression des *dpp*-Operons, wird derselbe σ^A -abhängige Promotor genutzt (Slack *et al.*, 1991). Die Tatsache, dass die Regulation der *dpp*-Expression von dem CodY-Repressor dominiert wird und diese Regulation offensichtlich stärker ist als die durch osmotischen Stress, verdeutlicht, dass das Dipeptidtransportsystem primär der Aufnahme von Dipeptiden als Nährstoffquelle dient. Sind dagegen keine leicht verstoffwechselbaren C- und N-Quellen im Medium vorhanden, kann das System auch durch hochosmolare Wachstumsbedingungen induziert werden (Abb. 44).

Das Opp-System weist eine sehr hohe Sequenzidentität von durchschnittlich circa 50 % sowohl zu dem Dpp- und dem App-System aus *B. subtilis* (Rudner *et al.*, 1991; Perego *et al.*, 1991) als auch zu den Opp-Systemen aus Gram-negativen Spezies wie *E. coli* und *S. typhimurium* auf (Hiles *et al.*, 1987). Die Expression des *opp*-Operons ist in *B. subtilis* essentiell für die Initiation der Sporulation (Rudner *et al.*, 1991; Perego *et al.*, 1991). Opp-Mutanten sind in den ersten Schritten der Sporulation blockiert. In Gram-negative Bakterien besteht die Hauptaufgabe von Opp im Recycling von Zellwandpeptiden, die beim Peptidoglycanaufbau freigesetzt werden. Es wird daher vermutet, dass die Akkumulation solcher Peptide in *B. subtilis* eine Signalrolle spielt für die Initiation der Sporulation, und der Sporulationsdefekt einer Opp-Mutante daher auf ihrer Unfähigkeit beruht, diese Peptide aufzunehmen (Perego *et al.*, 1991). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass das Opp-System essentiell für die Aufnahme prolinhaltiger Tripeptide in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen ist. Dabei wird die Expression des *opp*-Operons jedoch im Gegensatz zum *dpp*-System nicht osmotisch reguliert (Abb. 33). Offensichtlich ist dieses System sowohl unter Normalbedingungen als auch in osmotisch gestressten Zellen in ausreichender Menge vorhanden.

Unter Normalbedingungen kann die Prolinauxotrophie des *B. subtilis*-Stammes JSB11 [$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cml}1)$] durch alle in dieser Arbeit getesteten, prolinhaltigen Di- und Tripeptide komplementiert werden (Tab. 10). Der *proHJ*-Stamm JSB8 [$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet}1)$], der nicht in der Lage ist Prolin als osmotische Schutzsubstanz unter hyperosmotischem Stress *de novo* zu akkumulieren (Abb. 9A), ist in der Lage Prolin mittels Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide zu akkumulieren (Tab. 11). Es muss somit sowohl unter normalen Wachstumsbedingungen, als auch in osmotisch gestressten Zellen zu einer Hydrolyse der getesteten Peptide und damit zur Freisetzung

von Prolin kommen. Die meisten Peptidasen mit genereller Spezifität sind nicht in der Lage Peptidbindungen mit Prolin zu spalten. Es sind daher prolinspezifische Peptidasen erforderlich. Die Aminopeptidase P (Xaa-Pro Aminopeptidase) und Xaa-Pro Dipeptidase (Prolidase) gehören zu der relativ gut charakterisierten Familie prolinspezifischer Peptidasen (M24B). Die Aminopeptidase P ist ein Enzym, das die Freisetzung einer N-terminalen Aminosäure aus einem Oligopeptid katalysiert, die mit Prolin verbunden ist. Ein solches Enzym dürfte also für die in dieser Arbeit untersuchten Oligopeptide, Pro-Gly-Gly und Pro-Val-Gly, keine Rolle gespielt haben. Xaa-Pro Dipeptidasen katalysieren dagegen die Hydrolyse von Dipeptiden, die einen Prolinrest in der C-terminalen Position tragen. Die Genprodukte der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene *yqhT* und *ykvY* aus *B. subtilis* weisen Sequenzidentitäten zu Xaa-Pro Dipeptidasen anderer Organismen und auch zueinander (31 %) auf. So weist das YqhT Protein eine 59 %-ige Sequenzidentität zu einer Xaa-Pro Dipeptidase aus *Bacillus halodurans* (GenBank Accession-Nummer: AP001516) auf. Die Expression des *yqhT*- und des *ykvY*-Gens ist jedoch weder osmotisch reguliert (Abb. 34), noch kann sie durch das exogen vorhandene Dipeptid Phe-Pro, eine putatives Substrat für Xaa-Pro Dipeptidasen, induziert werden (Abb. 35). Das bedeutet natürlich nicht, dass diese Proteine nicht an der Spaltung der getesteten Xaa-Pro Dipeptide (Pro-Pro, Leu-Pro, Phe-Pro und Gly-Pro) in *B. subtilis* beteiligt sind. Es muss jedoch noch mindestens zwei weitere spezifische Peptidasen geben, die die Freisetzung von Prolin aus den getesteten Pro-Xaa-Dipeptiden und den Pro-Xaa-Xaa-Tripeptiden katalysieren.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten, prolinhaltigen Di- und Tripeptide protektieren osmotisch gestresste *B. subtilis*-Zellen in sehr unterschiedlichem Maße (Abb. 36) und führen dementsprechend in dem *proHJ*-Stamm JSB8 zur Akkumulation sehr unterschiedlicher Prolinmengen (Abb. 37). Diese Beobachtung kann zum einen darauf beruhen, dass die getesteten Di- und Tripeptide mit unterschiedlicher Affinität von *B. subtilis* aufgenommen werden. Andererseits wäre es auch denkbar, dass sie nach der Aufnahme in die Zelle unterschiedlich effizient hydrolysiert werden. Es stellt sich zudem die Frage, was mit den anderen bei der Hydrolyse freiwerdenden Aminosäuren geschieht. Wie HPLC-Analysen gezeigt haben werden diese nicht akkumuliert. Sie könnten somit einerseits der Proteinbiosynthese, oder als C- und N-Quelle dienen, andererseits wäre es theoretisch auch denkbar, dass sie wieder exportiert werden. Es wird vermutet, dass der osmoprotektive Effekt von Peptiden, die Glycin, Hydroxyprolin und Prolin enthalten, in *L. monocytogenes* ein additiver Effekt ist, der sich auf der einen Seite aus der Akkumulation der Peptide selbst und den freigesetzten Aminosäuren als osmotische Schutzsubstanz und auf der anderen Seite der Nährstoffsupplementation durch die Peptide zusammensetzt (Amezaga *et al.*, 1995).

3. Prolinbiosynthese in verschiedenen Organismen

Der am weitesten verbreitete Prolinbiosyntheseweg ist der in Abbildung 1 dargestellte Weg aus Glutamat über drei enzymatische Reaktionen. Das im ersten Schritt dieses Weges entstehende γ -Glutamylphosphat ist extrem labil und hat die Tendenz zu 5-Oxopyrrolidin-2-carboxylat zu zyklisieren. Es liegt daher *in vivo* ausschließlich als enzymgebundenes Intermediat vor. In Mikroorganismen bilden die γ -Glutamyl-Kinase (ProB) und die γ -Glutamylphosphat-Reduktase

(ProA) einen Enzymkomplex, der die beiden ersten Schritte der Prolinbiosynthese katalysiert und einen direkten Transfer dieses instabilen Intermediates ermöglicht (Smith *et al.*, 1984). Auf Grund dieser Tatsache muss man voraussetzen, dass in *B. subtilis* die γ -Glutamylphosphat-Reduktase (ProA), die den zweiten Schritt in beiden Prolinbiosynthesewegen katalysiert, in der Lage ist sowohl mit dem ProB-Protein des anabolen als auch mit dem ProJ-Protein des stressinduzierten Prolinbiosyntheseweges zu interagieren. In Pflanzen werden die ersten beiden Schritte der Prolinbiosynthesen durch ein bifunktionelles Enzym, die Pyrrolin-5-carboxylat-Synthetase katalysiert (Hu *et al.*, 1992).

3.1 Art und Regulation der Prolinbiosynthese in anderen Mikroorganismen

Die Synthese von Prolin aus Glutamat für anabole Zwecke wurde für zahlreiche, vorwiegend Gram-negative Mikroorganismen beschrieben und charakterisiert. In den meisten diesbezüglich untersuchten Mikroorganismen unterliegt dieser Weg einer Regulation durch Feedbackinhibition. Das bedeutet, dass das erste Enzym des Prolinbiosyntheseweges, die γ -Glutamyl-Kinase ProB, durch mikromolare Konzentrationen intrazellulären Prolins oder der Prolinanaloga 3,4-Dehydro-D,L-Prolin und L-Azetidin-2-carbonsäure, allosterisch gehemmt wird. Dies korreliert mit der physiologischen Aufgabe dieses Syntheseweges, der einer Synthese von Prolin für anabole Zwecke dient. Eine Akkumulation von Prolin in osmoprotektiv relevanten Mengen ist daher nicht möglich. Es wurden jedoch Mutanten beschrieben, die eine Resistenz gegenüber den Prolinanaloga 3,4-Dehydro-Prolin oder L-Azetidin-2-carbonsäure aufweisen. Diese Stämme zeichnen sich durch eine verstärkte Prolinbiosynthese und einer darauf beruhenden, erhöhten Toleranz gegenüber osmotischem Stress aus. Dieser Phänotyp ist in allen Fällen auf Punktmutationen im ProB-Enzym zurückzuführen. So bedingen Punktmutationen, die einen Aminosäureaustausch an den Positionen 107 (Asp zu Asn) oder 143 (Glu zu Ala) im *E. coli* ProB-Enzym zur Folge haben, dass das mutierte ProB-Enzym 400-mal weniger sensitiv gegenüber einer Feedbackinhibition durch Prolin ist und die betreffenden Stämme einen 250-fach höheren Prolinlevel aufweisen als der Wildtyp (Dandekar und Uratsu, 1988). In *S. marcescens* wurde interessanterweise der Alaninrest, der an Position 117 in dem ProB-Enzym sowohl dieses Organismus als auch in *E. coli* (Abb. 20) lokalisiert ist, gegen ein Valin ausgetauscht (Omori *et al.*, 1992). Der resultierende Stamm war weitgehend resistent gegenüber den Prolinanaloga 3,4-Dehydro-Prolin und L-Azetidin-2-carbonsäure und das mutierte ProB-Enzym zeigte eine 700-fach geringere Sensitivität gegenüber einer allosterischen Inhibition durch Prolin (Omori *et al.*, 1992). Ein analoges Experiment wurde auch für die γ -Glutamyl-Kinase aus *Thermus thermophilus* durchgeführt. Hier wurde ebenfalls der zur Position 117 im *E. coli*- und *S. marcescens*-Enzym analoge Alaninrest gegen ein Valin ausgetauscht, was in dem entstehenden Mutantenstamm eine verstärkte Prolinbiosynthese und eine Resistenz gegenüber den toxischen Prolinanaloga zur Folge hatte (Kosuge und Hoshino, 1998). Im ProB-Enzym von *L. monocytogenes* findet sich an genau dieser Position (117 im *E. coli*-Protein) ein Valinrest, dessen Austausch gegen einen Isoleucinrest zu einer deutlich verstärkten Toleranz des entstehenden Stammes gegenüber osmotischem Stress führt (Sleator *et al.*, 2001b). Die durch diese Experimente identifizierten Aminosäurereste sind vermutlich innerhalb der allosterischen Domäne der Wildtyp γ -Glutamyl-Kinase lokalisiert und an der Bindung von Prolin beteiligt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen

des ProB-Enzyms aus *E. coli* und der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis* zeigt (Abb. 20), dass der Alaninrest an Position 117 im ProB-Enzym von *B. subtilis* ebenfalls konserviert ist, während sich im ProJ-Enzym an dieser Stelle ein Valin befindet. An Stelle des sauren Glutamatrestes an Position 143 im *E. coli*-Enzym, befindet sich im ProJ-Protein ein basischer Argininrest. Wie Wachstumsexperimente in Gegenwart von 3,4-Dehydro-Prolin gezeigt haben (Abb. 21), weist das ProJ-Enzym aus dem osmotisch induzierten Prolinsyntheseweg eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber diesem Prolinanalogen auf als das paraloge ProB-Enzym. Man könnte somit spekulieren, dass dies auf der von den ProB-Enzymen abweichenden Aminosäureidentität an den Positionen 117 und 143 im ProJ-Enzym von *B. subtilis* (Abb. 20) beruht. Einen Beweis könnte letztlich jedoch nur eine Mutagenese des ProJ-Enzyms an einer dieser Positionen erbringen, bei der die im ProB-Enzym konservierten Aminosäurereste in ProJ eingebracht werden, was in diesem Falle dann zu einer erhöhten Sensitivität des ProJ-Proteins gegenüber einer Endprodukthemmung führen müsste. Für das ProB-Protein aus *Streptococcus thermophilus* wurde ein weiterer Aminosäurerest identifiziert, der in die Feedbackinhibition in diesem Organismus involviert ist (Massarelli *et al.*, 2000). Der Aspartatrest an Position 192 des *S. thermophilus* ProB-Enzyms ist jedoch weder im *E. coli* ProB-Enzym noch in einer der γ -Glutamyl-Kinasen aus *B. subtilis* konserviert.

Ein zu dem *proBA*-abhängigen Prolinbiosyntheseweg aus *B. subtilis* homologer Syntheseweg wurde auch für *Streptococcus bovis* (Campanile *et al.*, 1993); *Streptococcus thermophilus* (Limauro, *et al.*, 1996) und *L. monocytogenes* (Sleator *et al.*, 2001a) identifiziert. *Streptococcus pyrogenes* verfügt ebenfalls über diesen Weg, allerdings fehlt diesem Organismus die Fähigkeit Glutamat zu synthetisieren (Ferretti *et al.*, 2001). Sequenzanalysen lassen vermuten, dass dieser Weg in den meisten Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt zu finden ist.

Zusätzlich zu dem beschriebenen Prolinbiosyntheseweg gibt es in einigen Gram-negativen Mikroorganismen, wie *E. coli* und *S. typhimurium*, noch die Möglichkeit Prolin über den parallel zum Glutamatweg verlaufenden Argininbiosynthesewege zu bilden (Leisinger, 1996). Dieser geht ebenfalls von Glutamat aus, das über zwei enzymatisch katalysierte Reaktionen zu N-Acetylglutamat- γ -semialdehyd umgewandelt wird. Dieses kann zum einen über N-Acetylorithin in Ornithin umgewandelt werden, es kann jedoch auch in einer von der N-Acetylorithin-Deacetylase ArgE katalysierten Reaktion zu Glutamat- γ -semialdehyd umgesetzt werden. Dieses geht dann in den bekannten Prolinbiosyntheseweg ein (Abb. 1).

Für einige Gram-positive Mikroorganismen konnte gezeigt werden, dass auch zwei katabole Wege zur Synthese von Prolin aus Ornithin führen können. Diese sind unabhängig von den ersten beiden Enzyme (ProB und ProA) des Prolinbiosyntheseweges aus Glutamat.

Zum einen kann Prolin direkt aus Ornithin in einer von der Ornithin-Cyclodeaminase katalysierten Reaktion gebildet werden. Dieser Weg, der alle drei beschriebenen Prolinbiosyntheseenzyme überflüssig macht, existiert in *Clostridium sporogenes* und *Clostridium botulinum* (Muth und Costilow, 1974). Gene, die für mögliche Ornithin-Cyclodeaminasen kodieren, wurden auch in den Genomen von *Bacillus anthracis*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *C. difficile* identifiziert (Belitsky, 2002). In *C. sporogenes* dient diese Reaktion dem anaeroben Katabolismus von Ornithin über Prolin zu δ -Aminovalerat (Costilow und Laycock, 1971). In den bisher

untersuchten Genomen von *Archaea* wurden keine zu *proB*, *proA* oder *proC* analogen Gene gefunden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *Methanococcus jannaschii* in der Lage ist Prolin über eine Zyklisierung von Ornithin zu synthetisieren. Diese Umsetzung ist sehr ähnlich zu der von der Ornithin-Cyclodeaminase aus *C. sporogenes* katalysierten. Ein entsprechendes Enzym konnte in *M. jannaschii* allerdings nicht identifiziert werden (Graupner und White, 2001).

B. subtilis besitzt kein Gen, das für eine mögliche Ornithin-Cyclodeaminase kodiert. Er verfügt jedoch über einen dem Abbau von Arginin dienenden Arginaseweg (Fisher, 1993). Der erste Schritt dieses Weges, die Umsetzung von Arginin zu Ornithin, wird von der Arginase RocF katalysiert. Ornithin kann dann in einer weiteren Reaktion, die von der Ornithin- δ -Aminotransferase RocD katalysiert wird, zu Glutamat- γ -semialdehyd umgesetzt werden. Dies zyklisiert dann spontan zu Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat, einem Substrat für eine der Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen ProH, ProI, oder ProG (Belitsky *et al.*, 2001). Ein *B. subtilis*-Stamm, der ein defektes *proBA*-Operon trägt, kann somit extrazelluläres Ornithin oder die verwandten Aminosäuren Arginin und Citrullin als Prolinquelle nutzen (Brill, 1998). Dieser Weg stellt in *B. subtilis* eine Alternative zur Prolinbiosynthese über den beschriebenen anabolen Glutamatweg dar, nutzt jedoch einen gemeinsamen letzten Schritt der Umsetzung zu Prolin (Belitsky *et al.*, 2001). Ob er auch alternativ zu dem osmotisch induzierten Weg zur Akkumulation von Prolin genutzt werden kann, wurde bisher nicht untersucht. In *S. aureus*, der über keine zu ProB und ProA aus *B. subtilis* homologen Enzyme verfügt, ist der beschriebene Arginaseweg offensichtlich der Hauptprolinbiosyntheseweg (Townsend *et al.*, 1996).

Obwohl eine verstärkte *de novo* Synthese von Prolin unter osmotischem Stress für zahlreiche Mikroorganismen nachgewiesen wurde, ist die molekulare Grundlage für diese Prolinakkumulation völlig ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese erstmals für *B. subtilis* aufgeklärt werden. Es wäre somit denkbar, dass auch weitere Mikroorganismen dieselbe Strategie verfolgen und einen zum anabolen Weg parallelen, osmotisch induzierten Weg der Prolinbiosynthese besitzen. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Zerstörung des *proBA*-Locus in *L. monocytogenes* in einem prolinauxotrophen Phänotyp resultiert und dass die entstehende Mutante zudem deutlich salzsensitiver als der Wildtyp ist (Sleator *et al.*, 2001a). Es ist jedoch bisher unbekannt, ob dieser Organismus über Gene verfügt, die zu *proH* und *proJ* aus *B. subtilis* verwandt sind.

3.2 Die Rolle von Prolin und die Regulation der Prolinbiosynthese in Pflanzen

Es gibt deutliche Parallelen zwischen den osmotischen Stresssituationen und den daraus resultierenden Anpassungsmechanismen zwischen Pflanzen und terrestrischen Mikroorganismen wie *B. subtilis*. Das Wachstum und damit auch der Ertrag bedeutender Kulturpflanzen wird am drastischsten durch hyperosmotischen Stress beeinflusst. Dieser kann zum einen durch anhaltende Trockenheit, aber auch durch einen Anstieg der Salinität des Bodens verursacht werden (Boyer, 1982). So bedingen hohe Temperaturen eine kontinuierliche Transpiration über die Blätter. Um einem Turgorverlust der Pflanzenzellen vorzubeugen, kommt es zur Aufnahme von Wasser über die Wurzeln. Der Erhalt des Turgors ist für Pflanzen wie für Mikroorganismen essentiell. Zum einen um die äußere Gestalt der Pflanze zu bewahren und damit das Welken zu vermeiden, aber auch um Streckungswachstum und turgorabhängige Variationsbewegungen, wie das Schließen und Öffnen

der Stomata zu gewährleisten. Gerade in ariden Zonen überwiegt jedoch die Wasserverdunstung den Eintrag von Wasser in dem Boden und bewirkt so eine Anreicherung von Salzen in den oberflächennahen Bodenschichten. Die Anpassungsmechanismen von Pflanzen an die hochosmotischen Bedingungen sind entsprechend dem höheren Entwicklungsgrad deutlich komplexer als die der Mikroorganismen und können in vier Kategorien unterteilt werden: Es gibt neben einer entwicklungspezifischen Anpassung (z. B. Blütezeit) und strukturellen Anpassungen (z. B. eine Wachsschicht auf den Blättern) auch die Möglichkeit einer physiologischen Anpassung. So kann die aus mehreren Kompartimenten bestehende Pflanzenzelle NaCl in der Vakuole anreichern, während das Zytoplasma weitgehend natriumarm bleibt, wie es zum Beispiel bei den großen Vakuolen sukkulenter Pflanzen der Fall ist. In vierter Kategorie kann eine Anpassung des Metabolismus erfolgen, bei der es primär zur Akkumulation kompatibler Solute kommt. Die am häufigsten von Pflanzen genutzte osmotische Schutzsubstanz ist Prolin. Zahlreiche Daten belegen eine Verbindung zwischen der Prolinakkumulation und der Anpassung an Salzstress oder Trockenheit in verschiedenen Pflanzen (Kohl *et al.*, 1988; Chou *et al.*, 1991; Fougère *et al.*, 1991; Chiang und Dandekar, 1991; Szoke *et al.*, 1992; Delauney und Verma, 1993; Stines *et al.*, 1999; Verslues und Sharp, 1999). Der Großteil der Untersuchungen zur Prolinbiosynthese wurde an den Modellsystemen *V. aconitifolia* und *A. thaliana* durchgeführt auf welche sich die im Folgenden diskutierten Daten zumeist beziehen.

Prolin kann in Pflanzen zum einen aus Glutamat über einen zu dem für *B. subtilis* beschriebenen, analogen Weg synthetisiert werden (Delauney und Verma, 1993). Die ersten beiden Schritte der Prolinbiosynthese werden dabei durch ein bifunktionelles Enzym, die Pyrrolin-5-carboxylat-Synthetase (P5CS) katalysiert. Die beiden enzymatischen Domänen dieses Proteins entsprechen dem ProB- und ProA-Protein aus *B. subtilis* und jede zeichnet sich durch einen Leucinzipper aus, der vermutlich die inter- oder intramolekulare Interaktion begünstigt (Hu *et al.*, 1992). Der letzte Schritt der Umsetzung wird ebenfalls von einer Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (P5CR) katalysiert (Delauney und Verma, 1990; Hua *et al.*, 1997). Pflanzen können Prolin zum anderen auch aus Ornithin synthetisieren. Der erste Schritt dieser Reaktion wird analog zu dem alternativen Arginaseweg in *B. subtilis* von einer Ornithin- δ -Aminotransferase (OAT) katalysiert (Delauney *et al.*, 1993; Roosens *et al.*, 1998). Das dabei aus Ornithin entstehende Glutamat- γ -semialdehyd wird dann wie in *B. subtilis* weiter über den Glutamatweg erst zu Pyrrolin-5-carboxylat und dann mittels der P5CR zu Prolin umgesetzt. Unter normalen Wachstumsbedingungen und einem ausreichend hohen N-Level ist Ornithin die Hauptstickstoffquelle für die Synthese von Prolin. Sind die Pflanzen dagegen osmotischem Stress oder Stickstoffmangel ausgesetzt, ist der Glutamatweg der dominante Prolinbiosyntheseweg (Delauney *et al.*, 1993). Die Expression der Gene, die für die OAT und die P5CS kodieren, wird dementsprechend reziprok reguliert (Delauney *et al.*, 1993). Unter hochosmolaren Bedingungen kommt es daher zu einer verstärkten Expression der P5CS (Hu *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1995) und der P5CR (Delauney und Verma, 1990; Verbruggen *et al.*, 1993). Dies ist vergleichbar zu *B. subtilis*. Auch hier erfolgt unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen eine Regulation auf transkriptioneller Ebene. Das *proHJ*-Operon wird in osmotisch gestressten Zellen verstärkt exprimiert (Abb. 16).

In Pflanzen ist die P5CS das limitierende Enzym, während der P5CR-Level keinen großen Einfluss auf die Prolinbiosynthese hat. Das beruht darauf, dass die P5CS mittels allosterischer Endprodukthemmung kontrolliert wird (Hu *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995). Die Aktivität der P5CS aus *V. aconitifolia* ist in Anwesenheit von 6 mM Prolin zu 50 % inhibiert (Hu *et al.*, 1992). Sie ist damit deutlich weniger sensitiv als die γ -Glutamyl-Kinase aus *E. coli*, die bereits bei einer intrazellulären Prolinkonzentration von 0,007 mM zu 50 % inhibiert ist (Smith *et al.*, 1984). Unter osmotischem Stress kommt es jedoch zur Akkumulation von 129 mM Prolin im Zytosol der Pflanzen (Delauney und Verma, 1993). Eine Konzentration die eigentlich zu einer völligen Abschaltung des P5CS-Enzyms führen müsste. Im Gegensatz zu *B. subtilis* verfügen Pflanzen nicht über einen separaten Prolinbiosyntheseweg, der die Akkumulation großer Mengen Prolin in osmotisch gestresste Zellen katalysiert. Es wird daher diskutiert, ob die P5CS aus Pflanzen unter osmotischem Stress eine Konformationsänderung durchläuft, die zu einem teilweisen Verlust der allosterischen Feedbackinhibition führt (Hong *et al.*, 2000). Ein Aminosäuresequenzvergleich der γ -Glutamyl-Kinase aus *E. coli* und der entsprechenden Domäne der P5CS aus *V. aconitifolia* zeigt eine relative hohe Sequenzidentität der beiden Enzyme (Brill, 1998). Wie für *E. coli* beschrieben, wurden auch in dem P5CS-Enzym aus Pflanzen Aminosäuren identifiziert, die in die Endproduktinhibition durch Prolin involviert sind. Diese unterscheiden sich in ihrer Lokalisation jedoch von denen bakterieller γ -Glutamyl-Kinasen. So führt ein Austausch des Aspartats an Position 129 gegen ein Phenylalanin in der P5CS von *V. aconitifolia* zu einem dramatischen Anstieg der Prolinkonzentration für eine 50 %-ige Inhibition von 6 mM auf 960 mM Prolin (Zhang *et al.*, 1995). Dieses Experiment zeigt, dass die regulatorischen Eigenschaften der P5CS durch die Modifikation eines einzigen Aminosäurerestes dramatisch verändert werden können. Zudem beweist dieses Experiment, dass die Feedbackinhibition unter osmotischem Stress nicht vollständig verloren geht, da im Zytosol von osmotisch gestressten *V. aconitifolia*-Pflanzen nur 129 mM Prolin akkumuliert werden. Die P5CS ist in dieser Eigenschaft ähnlich zu dem ProJ-Protein aus *B. subtilis*, das ebenfalls einer Feedbackinhibition unterliegt, jedoch eine geringere Sensitivität gegenüber einer Endprodukthemmung aufweist als das korrespondierende ProB-Enzym des anabolen Weges (Abb. 21). In *B. subtilis* liegen zwei parallele Enzyme vor, die je nach dem physiologischen Bedarf der Zelle aktiv sind (Abb. 45). In *V. aconitifolia* dagegen werden die ersten beiden Schritte der Prolinbiosynthese aus Glutamat, sowohl unter Normalbedingungen als auch unter osmotischem Stress von derselben P5CS katalysiert. Diese wird jedoch in ihrer Sensitivität gegenüber einer Feedbackinhibition durch Prolin der jeweiligen Situation angepasst. Wie dieser Verlust der Sensitivität der P5CS gegenüber einer allosterischen Hemmung durch Prolin in osmotisch gestressten Pflanzen erfolgt, ist ungeklärt.

Die Akkumulation von Prolin in Pflanzen wird zudem vermutlich durch die Verfügbarkeit von Glutamat limitiert. Wie Untersuchungen des Glutamat- und Prolinpools osmotisch gestresster Pflanzen gezeigt haben, erfolgt die Akkumulation von Prolin auf Kosten des intrazellulären Glutamatpools (Kishor *et al.*, 1995). Auch für *B. subtilis* konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Level an freiem Glutamat in der Zelle mit steigender Prolinakkumulation abnimmt (Abb. 5).

Die Prolinakkumulation in osmotisch gestressten Pflanzen wird jedoch nicht allein durch eine verstärkte Expression der P5CS und eine verminderte Feedbackinhibition der P5CS durch Prolin ermöglicht. Es findet zudem eine reziproke Regulation der Prolinsynthese und des Prolinabbaus statt (Peng *et al.*, 1996). Der Abbau von Prolin wird in *A. thaliana* von zwei Enzymen katalysiert. Die Prolin-Dehydrogenase PDH katalysiert die Oxidation zu Pyrrolin-5-carboxylat, das im folgenden Schritt, der von der Pyrrolin-5-carboxylat-Dehydrogenase P5C-DH katalysiert wird, zu Prolin oxidiert wird. Die PDH ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. In osmotisch gestressten Pflanzenzellen ist die Expression der PDH reprimiert und erlaubt so eine Akkumulation großer Mengen Prolin. Der Abbau freien Prolins in der Erholungsphase nach osmotischem Stress beruht in Pflanzen dagegen auf einer Induktion der Transkription des PDH-Gens und einer Reduktion der P5CS-Expression. Prolin dient in dieser Phase als Energielieferant. Der Abbau ist über die Abgabe von Elektronen an die Atmungskette gekoppelt. Beim Abbau von Prolin wird Glutamat frei, das zudem als Stickstoffquelle für die Synthese anderer Aminosäuren dient (Peng *et al.*, 1996).

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass die primäre Rolle von Prolin für die Osmoprotektion in Pflanzen nicht allein auf seiner Eigenschaft als osmoregulatorisches Osmolyt beruht, sondern dass Prolin der Pflanze zudem hilft den durch osmotischen Stress implizierten oxidativen Stress zu überwinden (Verma, 1999; Hong *et al.*, 2000). Unter osmotischem Stress kommt es in der Pflanzenzelle zur vermehrten Bildung freier Radikale (Alia und Mohanty, 1993). Diese könne mit vielen Zellbestandteilen wie der DNA, Proteinen und Lipiden reagieren, was zur Radikalkettenprozessen, Querverbindungen, Peroxidation, Membranzerstörung und der Bildung toxischer Verbindungen führen kann (Davies *et al.*, 1995). Prolin agiert als Fänger freier Radikale und reduziert den Level dieser in osmotisch gestressten Zellen nachweislich (Smirnov und Cumbes, 1989; Alia und Mohanty, 1993; Alia und Mohanty, 1997; Hong *et al.*, 2000). Ähnliche Untersuchungen sind in *B. subtilis* nicht durchgeführt worden, es wäre jedoch durchaus denkbar, dass Prolin auch in diesem Organismus Schutz vor oxidativem Stress bietet.

4. Osmotische Regulation der *proHJ*-Expression in *B. subtilis*

B. subtilis ist in der Lage das aktuelle Ausmaß an osmotischem Stress zu erfassen und seine Prolinbiosynthesekapazität dementsprechend anzupassen (Abb. 5). Dabei beruht die verstärkte Prolinakkumulation auf einer fein abgestimmten, osmotisch stimulierten Transkription des *proHJ*-Operons (Abb. 12 und 16). Nach einem hyperosmotischen Schock kommt es zu einer verstärkten *proHJ*-Expression (Abb. 16A), wobei das erzielte Niveau der Transkription über einen weiten Bereich direkt proportional zur Osmolarität des Wachstumsmediums ist und solange aufrechterhalten wird wie der osmotische Stimulus andauert (Abb. 16B). Aus diesen Experimenten kann man ableiten, dass *B. subtilis* nicht nur eine plötzliche Veränderung der Osmolarität in seiner Umgebung messen kann, sondern auch in der Lage ist die Stärke des osmotischen Anstiegs genau zu erfassen. Diese Umweltinformation kann dann dahingehend prozessiert werden, dass es zu einer differenziert eingestellten Stärke der *proHJ*-Transkription und damit zu einer Anpassung der Prolinbiosynthesekapazität an die osmotischen Verhältnisse der Umgebung kommt. Wie diese Signaltransduktionskaskade auf molekularer Ebene erfolgt, ist bisher jedoch nicht verstanden und

konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Exogenes Glycinbetain wirkt in *E. coli* als ein Modulator osmotisch regulierter Genexpression. Die Zugabe dieses potenten, kompatiblen Solut zum Wachstumsmedium schwächt die durch hohe Salzkonzentrationen ausgelösten Effekte erheblich ab (Barron *et al.*, 1986; Sutherland *et al.*, 1986; Lucht und Bremer, 1994). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *B. subtilis* für die durch hohe Osmolarität stimulierte Transkription des *opuA*- und des *opuE*-Operons gemacht (Spiegelhalter und Bremer, 1998; Brosius, 1999). In Anwesenheit von 1 mM Glycinbetain kommt es in Minimalmedium mit 0,4 M NaCl zu keiner Prolinakkumulation (Tab. 8; Whatmore *et al.*, 1990). Auf transkriptioneller Ebene kommt es zu einer dramatischen Reduktion der *proHJ*-Expression, wobei diese jedoch in Bereichen hoher Osmolarität nicht vollständig verloren geht, sondern auf geringerem Level proportional zur NaCl-Konzentration des Mediums erfolgt (Abb. 16B). Diese Daten verdeutlichen, dass *B. subtilis* nicht die Osmolarität seiner Umgebung *per se* misst, da diese ja unabhängig von der Glycinbetain-Anwesenheit ist. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung führen hohe extrazelluläre Konzentrationen von membranpermeablem Glycerin nicht zu einer Induktion der *proHJ*-Expression (Abb. 18). Die osmotische Kontrolle der Aktivität des *proHJ*-Promotors beruht somit vermutlich eher auf Veränderungen der Zellstruktur, die durch einer Erhöhung der Osmolarität ausgelöst werden, wie eine Abnahme des Turgors, eine Kaliumaufnahme, Veränderungen in der Zusammensetzung des Zytoplasmas oder Veränderungen im „Supercoiling“ der DNA (Sutherland *et al.*, 1986; Higgins *et al.*, 1988; Dattananda *et al.*, 1991; Csonka und Epstein, 1996; Conter *et al.*, 1997).

Der *proHJ*-Promotor (Abb. 14) von dem aus die osmotisch regulierte Transkription erfolgt, wird durch den vegetativen Sigmafaktor A (Helmann, 1995) aus *B. subtilis* erkannt (Abb. 15; Abb. 46). Es konnte auch für andere, auf transkriptioneller Ebene osmotisch regulierte Systeme in *B. subtilis* gezeigt werden, dass sie einer Kontrolle durch den „Housekeeping“-Sigmafaktor unterliegen. So erfolgt die Transkription des *opuA*-Operons, des *opuB*-Operons, des *opuE*- und des *opuD*-Gens ausgehend von Sigma A-abhängigen Promotoren (Kappes *et al.*, 1999; Kempf und Bremer, 1995; Spiegelhalter und Bremer, 1998; Spiegelhalter, 1999). Das *opuE*- und das *opuD*-Gen besitzen zudem noch einen zweiten, Sigma B-abhängigen Promotor, der bei osmotischem Stress jedoch nur eine transiente Anschaltung der Transkription erlaubt und unabhängig vom Sigma A-System reguliert wird (Spiegelhalter und Bremer, 1998; Spiegelhalter, 1999).

Das Sigma A Protein ähnelt sowohl strukturell als auch funktionell dem vegetativen Sigmafaktor 70 (σ^{70}) aus *E. coli*. Beide Faktoren erkennen Promotoren identischer Konsensussequenz, obwohl σ^A -abhängige Promotoren aus *B. subtilis* dieser Konsensussequenz durchschnittlich näher kommen als σ^{70} -abhängige Promotoren aus *E. coli*. Bei der Erkennung dieser Promotoren scheinen zudem für das RNAP/ σ^A -Holoenzym in *B. subtilis* strengere Kriterien zu gelten als für den entsprechenden RNAP/ σ^{70} -Komplex in *E. coli*. Das zeigt sich darin, dass σ^A -abhängige Promotoren aus *B. subtilis* in der Regel von *E. coli* problemlos erkannt werden, während umgekehrt starke σ^A -abhängige Promotoren aus *E. coli* in *B. subtilis* nur schlecht erkannt werden (Moran *et al.*, 1982; Yamada *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Helmann und Moran, 2002). Dies ist zum Teil auf die unterschiedliche Relevanz eines als -16 Region oder TG-Motiv bezeichneten Promotorelementes zurückzuführen (Henkin und Sonenshein, 1987; Moran *et al.*, 1982; Voskuil *et*

Die Aktivität des σ^A -abhängigen *opuE*-Promotors ist dabei von der Präsenz dieses -16 Motivs abhängig. So resultiert der Austausch des TG-Dinukleotids gegen ein AC in einer drastisch verminderten Aktivität des *opuE*-Promotors und einem Verlust der osmotischen Stimulierbarkeit (Spiegelhalter, 1999). Im Gegensatz zu den σ^A -abhängigen *opuA*-, *opuD*- und *opuE*-Promotoren aus *B. subtilis* und den osmotisch regulierten *proU*- und *proP*-Genen aus *E. coli* weist die -10 Region des *proHJ*-Promotors keinen ungewöhnlich hohen G+C-Gehalt auf (Abb. 46B). Allerdings ist der Abstand zwischen der -10 und der -35 Region des *proHJ*-Promotors mit 16 bp suboptimal (Abb. 46). Auch der *opuA*-Promotor und der *proU*-Promotor aus *E. coli* haben mit 16 bp, beziehungsweise 18 bp von dem Konsensus (17 bp) abweichende „Spacer“ (Abb. 46B; Kempf und Bremer, 1995). Die osmotisch regulierte Expression des *proU*-Operons ist sensitiv gegenüber Veränderungen der DNA-Topologie (Higgins *et al.*, 1988; Owen-Hughes *et al.*, 1992). Die RNA-Polymerase kommt dabei vermutlich in Kontakt mit der -10 und der -35 Region. Die relative Orientierung dieser beiden Sequenzen ist somit eine wichtige Determinante für die Effizienz der Transkriptionsinitiation (Auble und de Haseth, 1988). Promotoren mit 16 bp oder 18 bp „Spacerregionen“ können somit wahrscheinlich sensitiv durch Veränderungen der DNA-Topologie kontrolliert werden.

Das RNAP/ σ^{70} -Holoenzym aus *E. coli* kann zudem vermutlich selbst osmotischen Stress wahrnehmen, indem es in seiner Promotorselektivität direkt durch die intrazelluläre Kaliumglutamat-Konzentration beeinflusst wird. In *E. coli* kommt es nach einem osmotischen Schock zunächst zu einer verstärkten K^+ -Aufnahme, die von einer raschen Induktion der Synthese von Glutamat als Gegenion gefolgt wird. Die Transkription zweier osmotisch regulierter Promotoren der *osmY*- und *osmB*-Gene aus *E. coli* wurde von Ding *et al.* (1995) *in vitro* untersucht. Hierzu wurde das RNAP/ σ^{70} -Holoenzym verwendet. Die Zugabe von bis zu 400 mM Kaliumglutamat, in Simulation der intrazellulären ionischen Verhältnisse osmotisch gestresster *E. coli*-Zellen, führte zu einer verstärkten Expression dieser Gene. Dieselbe Konzentration KCl bedingte dagegen eine völlige Repression der Transkription. Das RNAP/ σ^{70} -Holoenzym reagiert somit direkt auf Veränderungen der intrazellulären Kaliumglutamatkonzentration, indem diese seine Promotorselektivität verändert (Ding *et al.*, 1995). Ein vergleichbares Experiment wurde im Rahmen dieser Arbeit für den *proHJ*-Promotor mit dem RNAP/ σ^A -Holoenzym aus *B. subtilis* durchgeführt (Abb. 15). In diesem Fall konnte die *In vitro*-Transkription des *proHJ*-Operons jedoch nicht durch die Anwesenheit von Kaliumglutamat verstärkt werden, sondern wurde im Gegenteil eher reprimiert (Abb. 15). Dies könnte darauf beruhen, dass die Promotorselektivität des RNAP/ σ^A -Holoenzym in *B. subtilis* nicht direkt durch Kaliumglutamat verändert werden kann, sondern weitere Faktoren für die Erkennung dieses Promotors in osmotisch gestressten Zellen eine Rolle spielen. Zudem ist nicht gesichert, dass Glutamat auch in *B. subtilis* als Gegenion für Kalium fungiert.

Ausgehend von einer Fusion aus einem 474 bp *proH*-Fragment und dem promotorlosen Reportergen *treA* wurde durch sukzessive Deletion ein 153 bp langes DNA-Fragment lokalisiert, das die maximale und osmotisch regulierte *proHJ*-Transkription vermittelt (Abb. 17). Dieses Fragment trägt 32 bp stromaufwärts des Promotors gelegene DNA-Sequenz, den *proHJ*-Promotor selbst (-10 und -35 Region) und 85 bp zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und dem ATG-

Startcodon (Abb. 46). Es beinhaltet alle *in cis* für eine osmotisch regulierte Transkription erforderlichen DNA-Sequenzen, wobei eine genauere Inspektion dieses Fragmentes jedoch keine Hinweise dazu gibt, warum der *proHJ*-Promotor einer osmotischen Kontrolle unterliegt. Das 153 bp Fragment umfasst kein Codon des *proHJ*-Leserahmens (Abb. 46A). Anders als das *proU*-Operon in *E. coli* und *S. typhimurium*, an dessen osmotischer Regulation Sequenzen innerhalb des ersten Strukturgens *proV* beteiligt sind (Overdier *et al.*, 1989; Dattananda *et al.*, 1991; Lucht *et al.*, 1994; Fletcher und Csonka, 1995), beherbergt *proHJ* also keine weiter stromabwärts gelegenen *cis*-aktiven Elemente. Auch der stromaufwärts gelegene Bereich ist mit 32 bp nur sehr kurz (Abb. 46A). Für die volle und osmotisch regulierte Aktivität des σ^A -abhängigen *opuE*-Promotors werden dagegen 170 bp stromaufwärts der -35 Region gelegene Sequenzen benötigt. Dabei weist diese Region eine moderate intrinsische Krümmung auf, die essentiell für die Aktivität des *opuE*-Promotors ist (Spiegelhalter und Bremer, 1998). Die stromaufwärts von *proHJ* benötigte Region (32 bp) ist viel zu kurz um eine solche Krümmung der DNA-Helix zu ermöglichen und weist zudem nicht die charakteristischen kurzen Abfolgen von A oder T auf. Die osmotische Regulation der *proHJ*-Expression erfolgt daher vermutlich am oder über den Promotor selbst.

DNA-Array Analysen haben gezeigt, dass das *proH*-Gen zudem mit Beginn der Sporulation verstärkt exprimiert wird, während diese Induktion in einer SigE-Mutante von *B. subtilis* ausbleibt. Stromaufwärts des σ^A -abhängigen *proHJ*-Promotors wurde ein putativer, σ^E -abhängiger Promotor identifiziert (Abb. 46A; Steil, 2000). Dieser Promotor entspricht dabei recht gut der Konsensussequenz (ATa 16-18 cATAcAnT; Helmann und Moran, 2002) σ^E -abhängiger Promotoren. Sigma E spielt eine Rolle bei der Sporulation von *B. subtilis* und ist ein regulatorisches Element des als „Crisscross“-Regulation bezeichneten Prozesses der Sporenbildung. σ^E liegt normalerweise in einer inaktiven „Proprotein“-Form vor (Pro- σ^E). In Abhängigkeit von σ^F findet sich bei Ausbildung des Septums in der Sporenmutterzelle der reife, prozessierte σ^E -Faktor. σ^E bewirkt dann die Expression des Sigmafaktors G in der Vorspore. Das unter Kontrolle des Sigmafaktors E stehende Regulon umfasst bisher circa 60 Gene, die fast ausschließlich in Prozesse involviert sind, die im engen Zusammenhang zur Sporulation stehen (Helmann und Moran, 2002). Die Lokalisation des σ^E -abhängigen Promotors stromaufwärts des *proHJ*-Operons konnte zwar bisher nicht experimentell bestätigt werden. Reportergernefusionsanalysen haben jedoch gezeigt, dass das *proHJ*-Operon zu Beginn der Sporulation verstärkt exprimiert wird (L. Steil, persönliche Mitteilung). Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese verstärkte Expression vom σ^A -abhängigen Promotor aus erfolgt. Über eine mögliche physiologische Bedeutung einer verstärkten *proHJ*-Expression in der Sporenmutterzelle und einer damit vermutlich auch verstärkten Prolinbiosynthese kann nur spekuliert werden. Zum einen könnte man vermuten, dass Prolin als osmotische Schutzsubstanz agiert. Zum anderen könnte theoretisch auch oxidativer Stress oder die Bildung freier Radikale, analog zu der für Pflanzen dargestellten Situation, ein möglicher Grund für einen erhöhten Prolinbedarf sein. Bisher wurde jedoch weder ein erhöhter osmotischer, noch erhöhter oxidativer Stress im Verlauf der Sporulation, innerhalb der Sporenmutterzelle nachgewiesen. Dass der σ^E -abhängige Promotor eine Rolle für die osmotisch regulierte Expression des *proHJ*-Operons in exponentiell wachsenden Zellen spielt, kann ausgeschlossen werden, da das oben beschriebene 153 bp-Minimalfragment nur die -10 Region, nicht jedoch die -35 Region (Abb.

46A) dieses Promotors trägt und eine vollständige osmotisch regulierte Expression gewährleistet (Abb. 17).

5. Der dritte Schritt der Prolinbiosynthese

In *B. subtilis* haben vier verschiedene Gene das Potential für Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen zu kodieren: *proH*, *proI*, *proG* und *comER*. Ebenso wurden im Genom der Gram-positiven Bakterien *B. halodurans* (Takami *et al.*, 2000), *B. anthracis*, *E. faecalis* und *C. difficile* und des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas putida* verschiedene Gene mit dem Potential für Isoenzyme der Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase zu kodieren gefunden (Belitsky *et al.*, 2001). Ein physiologischer Sinn für die parallele Existenz dieser Enzyme wurde bisher jedoch nicht beschrieben. Es wird vermutet, dass multiple Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase Isoenzyme an der Entfernung überschüssigen Pyrrolin-5-carboxylats beteiligt sind, welches toxisch für *Aspergillus nidulans* (Arst *et al.*, 1981) und menschlichen Zellen ist (Maxwell und Davis, 2000). Bisher konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass Pyrrolin-5-carboxylat auch toxisch für *B. subtilis*-Zellen ist.

ProH und ProI weisen eine Sequenzidentität von 42 % zueinander auf, während ProH und ProG nur zu 24 % identisch sind und ProG und ComER eine noch geringere Sequenzidentität zueinander haben. Im Rahmen dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit B. Belitsky (Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts) wurden Mutanten in den einzelnen und multiplen Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase-Genorten erstellt (Abb. 6; Belitsky *et al.*, 2001). Dabei haben Mutationen in einem oder zwei der Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase-Gene keinen Einfluss auf die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke (Abb. 6; Belitsky *et al.*, 2001). Es konnte zudem in keiner der erstellten Mutanten ein Beitrag des *comER*-Gens zur Fähigkeit der Zelle ohne Prolin zu wachsen festgestellt werden. Nur die simultane Zerstörung des *proI*-, *proH*- und *proG*-Gens führt zu einem prolinauxotrophen Phänotyp (Belitsky *et al.*, 2001). Dies beweist, dass, wie in anderen Organismen auch, in *B. subtilis* ein Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase-Enzym für die anabole Prolinbiosynthese erforderlich ist. Diese Funktion kann jedoch von einem der drei Proteine ProH, ProI oder ProG übernommen werden. Dasselbe gilt auch für die Prolinbiosynthese aus Ornithin, Citrullin oder Arginin über den oben beschriebenen Arginaseweg. Für diesen Weg ist wie für den Glutamatweg ebenfalls ein intaktes ProH, ProI oder ProG-Protein erforderlich (Belitsky *et al.*, 2001). Für die Akkumulation von Prolin in osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen ist dagegen ein intaktes ProH-Protein essentiell (Abb. 6). Es kann in dieser Funktion nicht einmal teilweise von einer der anderen Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen ersetzt werden (Abb. 6), was vermutlich mit der unter hochosmolaren Bedingungen verstärkten Expression (Abb. 12) des *proHJ*-Operons zusammenhängt. Die Hauptaufgabe des ProH-Proteins besteht somit in einer verstärkten Prolinbiosynthese unter hyperosmolarem Stress. Die Expression des *proI*-Gens wird ebenso wie die des *proBA*-Operons entsprechend dem Prolinbedarf der Zelle über den Mechanismus der T-Box abhängigen transkriptionellen Antitermination reguliert (Abb. 27). Die koordinierte Induktion des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens unter Prolinmangelbedingungen lässt vermuten, dass das ProI-Protein die Haupt-Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase unter diesen Bedingungen ist. Die Rolle des ProG- und des ComER-Proteins ist dagegen ungeklärt. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, unterliegt das *proG*-Gen keiner osmotisch regulierten Expression (Abb. 13) und ist

nicht an der Prolinakkumulation unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen beteiligt (Abb. 6). Die Expression des *comER*-Operons steigt in der Stationärphase bei Wachstum in „Kompetenz-Medium“ an, es konnte jedoch kein Effekt einer *comER*-Mutation auf die Kompetenz von *B. subtilis* festgestellt werden (Hahn *et al.*, 1993; Inamine und Dubnau, 1995). Interessanterweise besitzt das *comER*-Gen ebenso wie das *proHJ*-Operon einen putativen σ^E -abhängigen Promotor und steht vermutlich zum Teil unter Sporulationskontrolle (Fawcett *et al.*, 2000). Es konnte jedoch weder ein Effekt einer *comER*-Mutation noch einer Triplemutation in *proH*, *proG* und *proI* auf die Effizienz der Sporulation in Minimalmedium mit einer limitierenden Menge Prolin festgestellt werden (Belitsky *et al.*, 2001).

6. Kontrolle aminosäurebiosynthetischer Gene durch Transkriptionstermination in Gram-positiven Mikroorganismen

Eine Vielzahl genetischer Systeme wird, unabhängig vom Promotor, auf dem Level einer frühzeitigen Termination der Transkription reguliert. Diese Klasse von Genen besitzt Transkriptionsterminatoren stromaufwärts der kodierenden Sequenz. Die Kontrolle der Aktivität dieser regulatorischen Terminatoren kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. So kann zum Beispiel eine Modifikation der RNA-Polymerase hin zu einer terminatorresistenten Form erfolgen, oder aber das wachsende Transkript in zwei alternativen Konformationen vorliegen, zum einen als Terminator und zum anderen als Antiterminator. Die Entstehung dieser beiden strukturellen Alternativen des Transkriptes kann zum einen über die Kinetik der Translation der RNA, über die Bindung spezifischer regulatorischer Proteine oder aber über eine mRNA-tRNA Wechselwirkung kontrolliert werden (Henkin, 1996; Henkin, 2000).

6.1 Negative Regulation: Stabilisierung des Terminators

Eine klassische Regulation der Transkription durch Attenuation, bei der unter Verwendung eines Leaderpeptids wie im *trp*-Operon von *E. coli* die Translation die Transkriptionstermination moduliert (Landick und Yanofsky, 1987), konnte in *B. subtilis* nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Tryptophanbiosynthesegenen aus *L. casei* und *L. lactis*, deren Expression über den T-Box Mechanismus kontrolliert wird, wird das Tryptophanbiosyntheseoperon (*trpEDCFBA*) aus *B. subtilis* durch ein Protein kontrolliert, das in Gegenwart eines Effektormoleküls an die 204 bp mRNA-Leaderregion stromaufwärts des Transkriptionsterminators bindet und so die Bildung einer Antiterminatorstruktur blockiert. In Anwesenheit von Tryptophan bindet das aktivierte TRAP-Protein (*trp RNA-binding attenuation protein*) an die für dieses Protein typische Erkennungsregion, wickelt quasi einen Teil der Antiterminatorsequenz um seine Peripherie und erlaubt so die Ausbildung des konkurrierenden intrinsischen Terminators (Babitzke, 1997). Der beschriebene Mechanismus beruht vor allem auf Tryptophan als Signal, wird jedoch auch vom Beladungszustand der tRNA^{Trp} beeinflusst (Lee *et al.*, 1996; Sarsero *et al.*, 2000). Die letztere Kontrolle erfolgt durch eine interessante Kopplung des beschriebenen Mechanismus mit dem T-Box Mechanismus. In *B. subtilis* wird die Transkription eines Operons, bisher unbekannter Funktion (*yczA-ycbK*), über den T-Box-Mechanismus in Abhängigkeit des Levels unbeladener

tRNA^{Trp} exprimiert. Bei Tryptophanmangel kommt es somit zu einer verstärkten Transkription dieses Operons. Dieses Transkript weist charakteristische TRAP-Bindestellen auf und führt vermutlich auf Grund einer Blockade dieses negativ regulatorischen Proteins zu einer verstärkten Expression der Tryptophanbiosynthesegene (Sarsero *et al.*, 2000).

Das S-Box Kontrollsystem der Transkriptionstermination wird ebenso wie das T-Box System weit verbreitet in Gram-positiven Bakterien zur Kontrolle der Genexpression genutzt (Henkin, 2000). Bisher konnten 49 S-Box Leadersequenzen in den Genera *Bacillus*, *Clostridium*, *Carboxydotherrmus*, *Staphylococcus*, *Geobacter* und *Chlorobium* identifiziert werden. Mit Ausnahme von *Chlorobium* besitzen alle diese Organismen auch T-Box Leader. Das T-Box System kontrolliert verschiedene Aminoacyl-tRNA-Synthetase- und Aminosäurebiosynthesegene individuell in Abhängigkeit der Verfügbarkeit der jeweiligen Aminosäure. Das S-Box Regulon ist dagegen ein globales Kontrollsystem, das verschiedene in die Methionin- und Cysteinbiosynthese involvierte Gene koordiniert in Abhängigkeit von der Methioninverfügbarkeit reguliert. Die S-Box Gene zeichnen sich ebenso wie die Mitglieder der T-Box Familie durch den Besitz einer hochstrukturierten mRNA-Leaderregion aus. Dieser Leader variiert in seiner Länge von 180 bis 250 Nukleotiden. Der 3'-Teil des Leaders hat ebenfalls die Kapazität entweder eine Terminator- oder eine alternative Antiterminatorkonformation anzunehmen. Der 5'-Teil des Leaders ist dagegen in der Lage eine komplexe Anti-Antiterminatorstruktur zu formen. Unter Methioninmangelbedingungen kommt es zur Ausbildung eines Antiterminators, wobei ein 3'-Segment des Anti-Antiterminators eine Haarnadelstruktur mit dem 5'-Teil des Terminators bildet. Ist dagegen ausreichend Methionin vorhanden, bilden sich der Terminator und der Anti-Antiterminator aus, wofür die Sequenzabschnitte des Antiterminators erforderlich sind (Grundy und Henkin, 1998; Abb. 47).

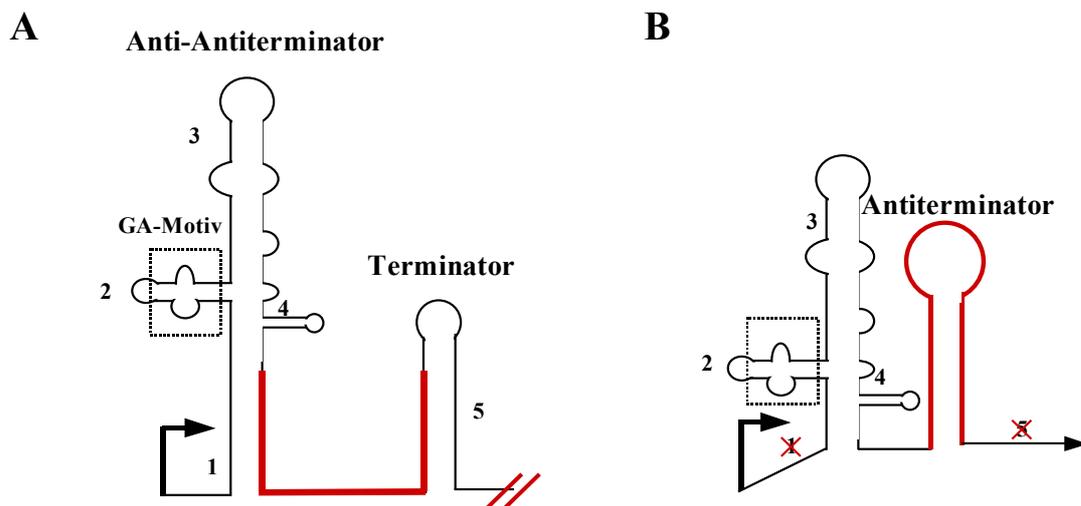


Abb. 47 Model der S-Box Leader mRNA verändert nach Winkler *et al.* (2001)

Die Zahlen bezeichnen die konservierten Sekundärstrukturelemente (Helices 1-5). Die gestrichelte Box kennzeichnet das GA-Motiv. **A.** Liegt ein hoher Methioninlevel in der Zelle vor, wird der Anti-Antiterminator (Helix 1) stabilisiert und verhindert so die Ausbildung des Antiterminators. Der Terminator (Helix 5) kann sich ausbilden, die Transkription endet. Die zur Ausbildung der Antiterminators benötigten Sequenzen sind in Rot gekennzeichnet. **B.** Bei niedrigem Methioninspiegel ist der Anti-Antiterminator destabilisiert und erlaubt so die Ausbildung des Antiterminators. Die Transkription kann erfolgen.

Ein essentieller Unterschied zwischen dem T-Box und dem S-Box System liegt in der molekularen Kontrolle der Termination. So führt eine Zerstörung konservierter Strukturen im T-Box Leader, mit Ausnahme des Terminators selbst, zu einem Verlust der Expression, da die für die Antitermination erforderliche Bindung der unbeladenen tRNA nicht mehr erfolgen kann. Die tRNA ist in diesem Falle ein positiver Effektor. Mutationen im S-Box Leader, mit Ausnahme des Antiterminators, führen dagegen zu einer konstitutiven Expression. Dies legt die Vermutung nahe, dass für die Termination in diesem Falle ein negativer Effektor erforderlich ist, der den Anti-Antiterminator stabilisiert (Grundy und Henkin, 1998; Henkin, 2000; Winkler *et al.*, 2001). Dieser putative negative Regulator und der molekulare Mechanismus, der eine Beurteilung der Methioninverfügbarkeit erlaubt, sind bisher jedoch unbekannt.

6.2 Positive Regulation: Stabilisierung des Antiterminators

Die *sac*-Gene aus *B. subtilis* kodieren für Enzyme, die für die Verstoffwechslung von Saccharose benötigt werden. Sie zeichnen sich durch eine Leaderregion aus, die alternative Terminator- und Antiterminatorkonformationen annehmen kann. Ist ausreichend Saccharose vorhanden, kommt es zu einer Stabilisierung der Antiterminatorkonformation durch das RNA-bindende, positiv regulatorische Protein SacY (van Tilbeurgh *et al.*, 1997).

Die Expression zahlreicher Aminoacyl-tRNA-Synthetase-, Aminosäurebiosynthese- und Aminosäuretransportergene wird in Gram-positiven Mikroorganismen offensichtlich über T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination kontrolliert (Grundy und Henkin, 1994; Henkin, 1994). Diese auch als T-Box-Familie bezeichneten Gene werden durch eine Limitation der jeweiligen Aminosäure, nicht jedoch durch generellen Aminosäuremangel induziert. Dabei erfolgt die Kontrolle der Expression unabhängig vom Promotor der Gene. Der Mechanismus, der diesem sogenannten T-Box-System zugrunde liegt, beruht auf der Kontrolle der Aktivität eines intrinsischen Terminators, der in der mRNA Leaderregionen, stromaufwärts der kodierenden Region, lokalisiert ist. Der Beladungszustand der zugehörigen tRNA ist dabei ein Maß für den Bedarf der Zelle an der jeweiligen Aminosäure. Die spezifische Interaktion der jeweiligen unbeladenen tRNA mit der Leader mRNA stabilisiert die Ausbildung einer Antiterminatorkonformation der Leader-mRNA und verhindert so die Ausbildung der konkurrierenden Terminatorstruktur, so dass die Transkription der Gene erfolgen kann (Abb. 3; Grundy und Henkin, 1993; Henkin, 1994).

7. Die Expression des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens sind dem Prolinbedarf der Zelle angepasst

Die Regulation der Prolinbiosynthese für anabole Zwecke erfolgt zum einen auf enzymatischer Ebene. Das erste Enzym des anabolen Syntheseweges, die γ -Glutamyl-Kinase ProB unterliegt einer Feedbackinhibition, was bedeutet, dass es in seiner Aktivität durch das Endprodukt Prolin allosterisch gehemmt wird (Abb. 21).

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist der anabole Prolinbiosyntheseweg zudem einer Regulation auf transkriptioneller Ebene unterworfen. Die Expression der Gene *proBA*

und *proI*, die für die drei für eine anabole Prolinbiosynthese benötigten Enzyme kodieren, wird über den Mechanismus der T-Box-abhängigen transkriptionellen Antitermination (Grundy und Henkin, 1993) spezifisch dem Prolinbedarf der Zelle angepasst. Diese Prolinbiosynthesegene sind damit der T-Box-Familie zuzuordnen. Während eine Prolinlimitation zu einer starken (11,7-fache) Induktion der *proBA* Expression führt, wird diese von allgemeinem Aminosäuremangel (Phenylalanin- und Tryptophanlimitation wurde getestet) offensichtlich nicht beeinflusst (Tab. 9; Abb. 24; Abb. 27A und 27C). Die Expression des *proI*-Gens wird unter Prolinhungerbedingungen ebenfalls (3,2-fach) induziert (Abb. 27B und 27D).

Im Rahmen des Genomprojektes wurde ein Prolyl-tRNA-Synthetasegen (*proS*) in *B. subtilis* identifiziert. Der stromaufwärts dieses Gens gelegene Bereich ist sehr kurz, so dass dieses Gen vermutlich mit dem vorausgehenden *yluC*-Gen, dessen Funktion unbekannt ist, ein Operon bildet. Es finden sich jedoch weder stromaufwärts dieses Gens, noch stromaufwärts von *proS* selbst, typische T-Box Primärsequenzelemente. Eine koordinierte Expression der Aminosäurebiosynthesegene und der zugehörigen Aminoacyl-tRNA-Synthetase, ein zum Beispiel für das *ilv-leu*-Operon und das *leuS*-Gen angewendetes Prinzip, liegt im Falle der Prolinbiosynthesegene vermutlich nicht vor.

7.1 Primärsequenz und Sekundärstruktur der *proBA*- und *proI*-Leader

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Transkriptionsstartpunkte des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens bestimmt und die zugehörigen putativen Promotoren identifiziert (Abb. 23). Die Transkription beider Gene erfolgt ausgehend von Promotoren, deren Erkennung vom vegetativen Sigmafaktor A (σ^A) aus *B. subtilis* abhängig ist. Wie für Mitglieder der T-Box-Familie typisch, weisen beide Gene ungewöhnlich lange 5'-Nichtkodierungsbereiche auf. Der Transkriptionsstartpunkt des *proBA*-Operons ist 269 bp und der des *proI*-Gens 268 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes lokalisiert. Die nicht-translatierten Leaderregionen dieser Gene sind damit im Vergleich etwas kürzer als die durchschnittlich 300 bp langen mRNA-Leader bisher untersuchter Gene. Diese Zahl repräsentiert allerdings einen Durchschnittswert und es gibt sowohl Beispiele für kürzere als auch für längere Leadersequenzen (Condon *et al.*, 1996a). Eine deutliche Ausnahme bildet das normalerweise stille *thrZ*-Gen, dessen Leader eine Länge von 800 bp aufweist (Putzer *et al.*, 1992). Dieses Gen trägt interessanterweise die T-Box-Terminatormotive T-Box-kontrollierter Gene in dreifacher Abfolge stromaufwärts des Startcodons. Die Präsenz dreier starker Transkriptionsterminatoren in Folge erklärt auch, warum dieses Gen unter normalen Wachstumsbedingungen nicht exprimiert wird (Putzer *et al.*, 1992; Gendron *et al.*, 1994; Condon *et al.*, 1996a).

Im 3'-Teil der Leader beider Prolinbiosynthesegene ist ein typischer intrinsischer Transkriptionsterminator lokalisiert. Die Distanz zwischen dem Terminator und dem Translationsinitiationscodon variiert innerhalb der T-Box Familie sehr. Sie reicht von 17 Nukleotiden, im Falle des *thrZ*-Gens, bis zu 85 Nukleotiden bei dem *leuS*-Gen (Grandoni *et al.*, 1992; Putzer *et al.*, 1992; Gendron *et al.*, 1994). Im *proBA*-Leader ist der Terminator 33 bp und im *proI*-Leader 30 bp stromaufwärts des ATG-Startcodons lokalisiert (Abb. 22A und 22B). Die 5'-Hälfte des Terminators ist komplementär zur T-Box, dem bedeutsamsten, konservierten primären

Sequenzelement innerhalb der T-Box Familie (Rollins *et al.*, 1997). Ein Großteil der T-Box Sequenz ist an der Ausbildung des Antiterminators beteiligt. Das zentrale Segment der T-Box (5'-UGGNACC-3') bildet eine Schleife an der Seite des Terminators, während die flankierenden Bereiche mit einer konservierten Sequenz in der 5'-Hälfte des Terminators basenpaaren. Vier der sieben Basen in der Antiterminatorschleife basenpaaren mit dem Akzeptorende der unbeladenen tRNA (Grundy *et al.*, 1994). Die verbleibenden Basen (ACC) sind hochkonserviert und finden sich auch in der T-Box Sequenz der beiden Prolinbiosynthesegene (Abb. 22A und 22B). Die im Leader des *proI*-Gens vorliegende T-Box Sequenz (Abb. 23B) entspricht perfekt der Konsensussequenz (5'-AANNNGGGTGGNACCNCG-3'; N steht für ein beliebiges Nukleotid). Die T-Box Sequenz, die dem *proBA*-Operon vorangeht, weist dagegen ein vom Konsens abweichendes Nukleotid auf. An Stelle des ersten, hochkonservierten Guanins ist ein Adenin lokalisiert (Chopin *et al.*, 1998; Abb. 23A). Diese Variation wurde auch in den T-Box Sequenzen des *valS*- und *trp*-Gens aus *L. casei* und des *valS*-Gens aus *B. stearothermophilus* gefunden (Grundy und Henkin, 1994). Die Basenpaarung zur Ausbildung der Antiterminatorkonformation ist auf Grund kompensatorischer C zu U Substitutionen auf der anderen Seite der Helices jedoch in allen Fällen weiterhin gewährleistet (Abb. 22A). Obwohl die T-Box des *proI*-Gens dem Konsensus entspricht, ist die Basenpaarung zur Ausbildung des Antiterminators nicht optimal (Abb. 22B). Gegenüber des ersten hochkonservierten Guanins innerhalb der T-Box findet sich in der Antiterminatorkonformation nur ein Uracil (Abb. 22B).

Zusätzlich zu der T-Box und der dazu komplementären Sequenz im 5'-Teil des Terminatorstammes, gibt es weitere hochkonservierte Primärsequenzelemente in den meisten mRNA-Leadern. Es konnte gezeigt werden, dass zudem die in einer Schleife der „Specifierdomäne“ lokalisierte AG-Box, die GNUG-Box an der Spitze der „Specifierdomäne“ und die circa 40 bis 50 Nukleotide stromaufwärts der T-Box lokalisierte F-Box *in vivo* für eine effiziente Antitermination in den diesbezüglich untersuchten Genen absolut erforderlich sind (Rollins *et al.*, 1997).

Die F-Box (5'-CCGUUA-3') ist das zweitwichtigste Primärsequenzelement neben der T-Box (Grundy und Henkin, 1993; Henkin, 1994). Das erste C innerhalb der F-Box ist nur moderat konserviert, während die anderen Basen in *Bacillus* Spezies und so auch im *proBA*-Operon und dem *proI*-Gen hochkonserviert sind (Abb. 23A und 23B). Im *tyrS*-Leader aus *B. subtilis* ist die F-Box innerhalb einer Helix der zweiten Haarnadelstruktur nach dem Leader lokalisiert, während sie in den Leaderregionen der Prolinbiosynthesegene offensichtlich in der Schleife an der Spitze dieser Struktur liegt (Abb. 22A und 22B). Punktmutationen, welche die Sekundärstruktur innerhalb dieser Region im *tyrS*-Gen zerstören, haben eine ebenso dramatische Reduktion der Expression zur Folge, wie Mutationen in der Primärsequenz (Rollins *et al.*, 1997). Die F-Box Sequenz zeigt in anderen Gram-positiven Genen eine weitaus größere Varianz und ist beispielsweise im *ileS*-Gen aus *S. aureus* und dem *argS*-Gen aus *C. glutamicum* und *B. lactofermentum* gar nicht vorhanden (Grundy und Henkin, 1994; Rollins *et al.*, 1997).

Die AG-Box (5'-CAGAGA-3') ist in einer inneren Schleife der „Specifierdomäne“ lokalisiert und grenzt am 3'-Ende an eine helikale Region. In dieser Position findet sie sich auch im *proBA*- und *proI*-Leader, wobei sich an Stelle des zu 55 % konservierten Cytosins im *proI*-Leader ein

Adenin befindet (Abb. 22A und 22B). Die AG-Box ist weit weniger konserviert als die F-Box, jedoch für eine effiziente Antitermination ebenfalls bedeutsam (Henkin, 1994; Rollin *et al.*, 1997).

Die GNUG-Box (5'-GNUG-3') ist dagegen innerhalb der T-Box Familie hochkonserviert und für die Antitermination absolut erforderlich. Eine Ausnahme bilden die *argS*-Gene aus *B. lactofermentum* und *C. glutamicum*, welche keine GNUG-Box aufweisen (Grundy und Henkin 1994; Rollins *et al.*, 1997). Diese Sequenz findet sich in den Leaderregionen der Prolinbiosynthesegene in der beschriebenen Position (Abb. 22A und 22B).

Ein weiteres primäres Sequenzelement, die AGUA-BoxI, findet sich in einer Schleife, die dem „Specifiercodon“ gegenüber liegt. Diese Sequenz findet sich auch im *proBA*- und *proI*-Leader (Abb. 22A und 22B), ist jedoch nicht besonders hoch konserviert und fehlt beispielsweise im *pheS*- und *thrS*-Leader aus *B. subtilis*. Eine zweite AGUA-Box (AGUA-BoxII) ist in der Schleife der zweiten Haarnadelstruktur lokalisiert. Sie fehlt in beiden Prolinbiosynthesegen-Leadersequenzen und ist auch im *pheS*- und *leuS*-Leader aus *B. subtilis* nicht vorhanden. Auf Grund seiner relativ geringen Konservierung und einem nur moderaten Effekt von Punktmutationen innerhalb dieser Region, wird diesem Primärstrukturelement nur eine relativ geringe Bedeutung für die Antitermination zugemessen (Rollins *et al.*, 1997).

Bei der Betrachtung der Sekundärstruktur verschiedener Leader fällt auf, dass einige von ihnen, wie zum Beispiel der *ilv-leu*-Leader aus *B. subtilis*, neben der Specifierdomäne und der Antiterminator- oder alternativen Terminatorstruktur, nur zwei weitere Haarnadelschleifen aufweisen und die ungepaarten Bereich zwischen diesen Helices zum Teil sehr lang sind. Im Falle des *proBA*- und *proI*-Leaders konnten dagegen drei Sekundärstrukturschleifen identifiziert werden (Abb. 22A und 22B). Dies scheint auch für zahlreiche andere Gene der T-Box Familie der Fall zu sein, woraus sich das von Chopin *et al.* (1998) aufgestellte Sekundärstrukturmodell ergibt, dem der *proBA*- und der *proI*-Leader sehr gut entsprechen (Abb. 22A und 22B). Dabei bleibt zu bedenken, dass fast alle bisher aufgestellten Sekundärstrukturen ausschließlich auf Primärsequenzvergleichen, genetischen Experimenten und computergestützter Berechnungen minimaler freier Energien beruhen. Die einzige bisher mit Hilfe chemischer und enzymatischer Modifikationen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigte Sekundärstruktur, ist die der *thrS*-Leaderregion (Luo *et al.*, 1998). Diese kommt allerdings dem von Chopin *et al.* (1998) aufgestellten Sekundärstrukturmodell sehr nahe.

Vergleichende Sequenzanalysen haben ergeben, dass es ein weiteres RNA-Sekundärstrukturelement, das sogenannte GA-Motiv, gibt. Dieses Motiv ist interessanterweise sowohl in T-Box als auch in S-Box Leadersequenzen hochkonserviert (Winkler *et al.*, 2001). Es besteht aus zwei kurzen Helices, die durch eine asymmetrische interne Schleife voneinander getrennt sind und einer GA-Dinukleotidsequenz, die auf beiden Seiten der Schleife hochkonserviert ist (Abb. 48). Das GA-Motiv ist im T-Box Leader an der Basis der Specifierdomäne und in der Helix 2 der S-Box Leader lokalisiert (Abb. 47). Es ist offensichtlich in allen S-Box Leadern konserviert und wurde in 140 der bisher identifizierten 200 putativen T-Box Leadersequenzen gefunden. Basierend auf diesen 140 Sequenzen wurde ein Konsensus für dieses hochkonservierte Sequenzmotiv im T-Box Leader abgeleitet (Winkler *et al.*, 2001; Abb. 48A). Das GA-Motiv findet sich auch an der Basis der Specifierdomäne im *proBA*-Leader (Abb. 22A und 48B). Im *proI*-Leader ist es dagegen

nicht vorhanden (Abb. 22B). Im *proBA*-Leader kommt es zur Ausbildung der zwei charakteristischen kurzen Helices im Bereich von Nukleotid 13 bis 25 und Nukleotid 105 bis 114 nach dem Transkriptionsstartpunkt. Das GA-Motiv entspricht dabei perfekt der von Winkler *et al.* (2001) aufgestellten Konsensussequenz (Abb. 48). Mit Hilfe von Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass dieses Strukturmotiv essentiell für die transkriptionelle Regulation sowohl des T-Box als auch des S-Box Systems ist. Bisher konnte allerdings noch nicht nachgewiesen werden, welches oder ob überhaupt ein Protein an dieses Motiv bindet. Im T-Box Leader könnte das GA-Motiv zudem an der Wechselwirkung der Specifierdomäne mit der unbeladenen tRNA beteiligt sein (Winkler *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der oberen Helix A des GA-Motivs im *proBA*-Leader die zu 90 % konservierten Purine '5-CCU-3' gegen die Purine '5-UUC-3' ausgetauscht (Tab. 9). Dabei kommt es zu einer weitgehenden Zerstörung der Helix A. Diese Mutation wurde in eine transkriptionelle *proB-treA* Fusion eingeführt und die entstehende $\Phi(\textit{proB-treA})_3$ Fusion als Einzelkopie in den *amyE*-Genort eines prolinauxotrophen *B. subtilis*-Stammes eingebracht. In dem entstehenden *B. subtilis*-Stamm JSB31 Mut2 konnte die Expression der *proB-treA* Fusion nicht mehr durch Prolin hunger induziert werden (Tab. 9; Abb. 26). Es ist ungeklärt, ob dieser Regulationsverlust allein auf der Zerstörung des GA-Motivs beruht, oder ob das „Specifiercodon“ auf Grund der fehlenden Helix A nicht mehr in eine günstige Position zum Anticodon der tRNA gebracht werden kann.

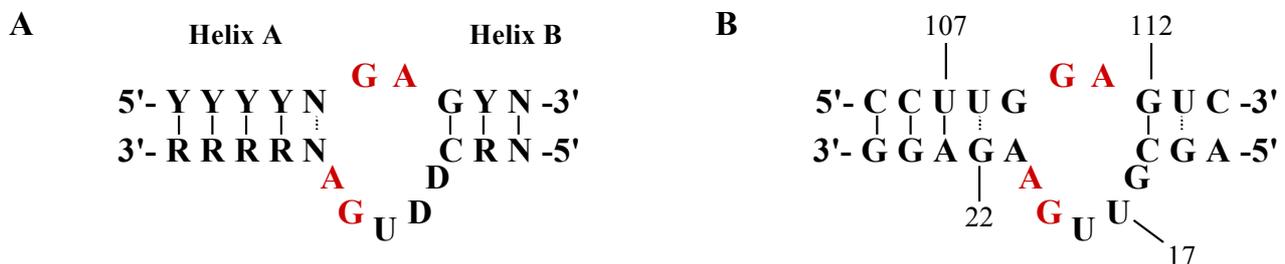


Abb. 48 Das GA-Motiv im *proBA*-Leader

A. Konsensus-GA-Motiv im T-Box Leader nach Winkler *et al.* (2001). R = G, A; Y = C, U; D = G, A, U; N = beliebiges Nukleotid **B.** GA-Motiv des *proBA*-Leaders. Die Zahlen geben die Position der Nucleotide relativ zum Transkriptionsstartpunkt an. Sie entsprechen der für Abb. 22A verwendeten Nummerierung. Die mehr als 90 % konservierten GA-Sequenzen sind in rot dargestellt.

7.2 Die Rolle des „Specifiercodons“ im *proBA*- und *proI*-Leader

Für den Mechanismus der transkriptionellen Antitermination konnten zwei Stellen der Wechselwirkung zwischen tRNA und Leader mRNA nachgewiesen werden. Die erste ist zwischen der Anticodonschleife der unbeladenen tRNA und dem „Specifiercodon“, und die zweite ist zwischen dem 5'-CCA-3' Akzeptorende der tRNA und der hochkonservierten 5'-UGG-3' Sequenz innerhalb der T-Box (Grundy und Henkin, 1993; Grundy *et al.*, 1994).

Sowohl im *proBA*- als auch im *proI*-Leader befindet sich das „Specifiercodon“ an der definierten Position in einer Schleife an der Basis der „Specifierdomäne“ (Abb. 22A und 22B). Es handelt sich dabei in beiden Fällen um ein 5'-CCU-3'-Triplett (Pro), was sehr ungewöhnlich ist. Obwohl verschiedene Codons spezifisch für eine bestimmte Aminosäure stehen können, tragen alle „Specifiercodons“ ein hochkonserviertes C an der dritten „Wobble“-Position, mit Ausnahme des *valS*-Gens aus *L. casei* und der *trp*- und *trpS*-Gene aus *B. subtilis*, bei welchen UGG das einzig mögliche Tryptophancodon ist (Grundy und Henkin, 1994; Condon, 1996). Die Auswahl eines C an der dritten Position im „Specifiercodon“ der T-Box Gene korreliert dabei in *B. subtilis* nicht mit der Präferenz für bestimmte Codons („codon usage“) während der Translation (Perriere *et al.*, 1994; Rollins *et al.*, 1997). Es konnte an zwei Beispielen gezeigt werden, dass ein Austausch dieses Cytosin gegen ein alternatives Nukleotid, unter Erhalt der Kodierung für dieselbe Aminosäure, zu einem dramatischen Abfall der Induktion führt. Dies war zum einen der Fall bei dem *thrS*-Gen, bei welchem das ACC-Codon gegen ACA ausgetauscht wurde (Putzer *et al.*, 1995), als auch beim Austausch des CUC-Codons gegen ein CUU-Codon im *ilv-leu*-Operon (Marta *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das C in dieser Position wichtig für die Bindung der unbeladenen tRNA ist. So könnte zum Beispiel eine G-C Basenpaarung an dieser Position die Codon-Anticodon Wechselwirkung stabilisieren. Das würde jedoch voraussagen, dass ein G an dieser Position eben so häufig vertreten sein müsste. Es gibt allerdings nur wenige tRNAs in *B. subtilis* die ein C in der ersten Position des Anticodons aufweisen. Das CCU-„Specifiercodon“ im *proBA*- und *proI*-Leader ist ebenfalls kein bei der Translation bevorzugtes Codon für Prolin. Im Hinblick auf die „codon usage“ wurde für *B. subtilis* CCA als optimales Prolincodon vorausgesagt (Kanaya *et al.*, 1999).

Da in *B. subtilis* nur eine tRNA^{Pro}_{UGG} und eine tRNA^{Pro}_{GGG} identifiziert wurden, ist das 5'-CCU-3'-Specifiercodon im *proBA*- und *proI*-Leader erstaunlicherweise zu keinem dieser Prolinanticodons vollständig komplementär, (Chopin *et al.*, 1998). Die tRNA^{Pro}_{UGG} gehört nach einer von Kanaya *et al.* (1999) gemachten Untersuchung zu einer der häufigsten tRNAs in *B. subtilis* und sie erkennt neben CCA als optimalem Codon, nachweislich auch CCG und CCU. Dies beweist, dass eine Antitermination auch in Abwesenheit einer perfekten Codon-Anticodon Interaktion stattfinden kann, was auf einem dem „Wobbling“ ähnlichen Phänomen beruhen könnte. Zudem bestärkt dieser Befund die Hypothese, dass weit mehr mRNA-Leader und tRNA Determinanten an einer effektiven Wechselwirkung beteiligt sind. In diesem Zusammenhang ist der folgende Befund interessant. Das *hisS aspS*-Operon kodiert für zwei Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unterschiedlicher Spezifität. In dem Leader dieses Operons findet sich ein AAC-„Specifiercodon“, das zu keinem der Anticodons der tRNA^{His} und tRNA^{Asp} aus *B. subtilis* vollständig komplementär ist. Eine Regulation kann jedoch durch beide tRNAs in Abhängigkeit von Histidin und Aspartat erfolgen (Chopin *et al.*, 1998).

In allen untersuchten Leadern ist das Specifiercodon von der nächsten helikalen Region durch nur ein Nukleotid getrennt (Grundy und Henkin, 1993). Dieses dem „Specifiercodon“ stromabwärts unmittelbar folgende Nukleotid ist entweder ein Guanin oder ein Adenin, was mit dem unmittelbar stromaufwärts des Anticodons gelegenen, hochkonservierten Uracil in allen tRNAs korreliert (Putzer *et al.*, 1995a). Sowohl im *proBA*, als auch im *proI*-Leader findet sich an dieser Stelle ein

Guanin. Im *proI*-Leader ist das Specifiercodon allerdings durch ein weiteres Nukleotid von der stromabwärts gelegenen helikalen Region getrennt (Abb. 22A und 22B).

Die auf Sequenzvergleichen beruhende Position des CCU „Specifiercodons“ im *proBA*-Leader und dessen Relevanz für eine spezifische Induktion der *proBA*-Expression durch Polinlimitation wurde durch eine gezielte Mutagenese an dieser Stelle bestätigt. Der Austausch der *proBA*-„Specifiersequenz“ gegen ein Phenylalanincodon (UUC) führte zu einem Abfall der Basalaktivität und einem vollständigen Verlust der Induktion durch Prolinlimitation (Tab. 9; Abb. 26). Es kam jedoch zu einer Spezifitätsveränderung dahingehend, dass die im Specifiercodon veränderte $\Phi(\textit{proB-treA})2$ -Fusion durch Phenylalaninlimitation (6,7-fach) induziert werden konnte (Tab. 9; Abb. 25). Die Identität des Triplets an der „Specifierposition“ im *proBA*-Leader determiniert somit eindeutig die Spezifität der Antwort. Die maximale Induktion dieser Fusion durch Phenylalaninhunger ist geringer als die für die Wildtyp $\Phi(\textit{proB-treA})1$ -Fusion ermittelte maximale Induktion durch eine Prolinlimitation (Tab. 9). Eine ähnliche Veränderung der Spezifität wurde auch bei dem Austausch des UUC-Codons (Phenylalanin) im *pheS*-Leader gegen ein ACC (Threonin) (Putzer *et al.*, 1995a) und bei einem Austausch des CUC-Codons (Leucin) im *ilv-leu*-Leader gegen UUC (Phenylalanin), CGC (Arginin) oder UAC (Tyrosin) (Marta *et al.*, 1996) beobachtet. In allen Fällen ist die Induktion durch eine heterologe Aminosäure deutlich geringer als die durch die ursprüngliche Aminosäure. Dieser Befund lässt vermuten, dass noch weitere Primärsequenzelemente, oder Sekundärstrukturmerkmale des Leaders und der tRNA in die Spezifizierung der Antwort involviert sind.

7.3 Die Rolle der tRNA

Neben den bereits oben im Detail diskutierten Sequenzelementen der Leader-mRNA und des Anticodons, haben auch weitere tRNA-Determinanten an der Spezifizierung der *proBA*-Expression teil.

Die zweite nachweisliche Basenpaarung neben der „Specifiercodon“-Anticodon Basenpaarung, zwischen dem mRNA-Leader und der tRNA erfolgt zwischen der 5'-UGGN-3' Sequenz in einer seitlichen Schleife des Aniterminators und dem dazu komplementären 5'-NCCA-3' Akzeptorende der unbeladenen tRNA (Grundy und Henkin, 1993). Die stromaufwärts des CCA am 3'-Ende der tRNA lokalisierte sogenannte Diskriminatorbase (N) basenpaart mit dem Nukleotid das in der T-Box dem UGG vorausgeht und stabilisiert so die Wechselwirkung zwischen dem Akzeptorende der unbeladenen tRNA und der T-Box (Grundy *et al.*, 1994; Putzer *et al.*, 1995b). Es gibt dabei eine Kovarianz zwischen der Diskriminatorbase innerhalb des tRNA-Akzeptorendes und der hochvariablen Position (N) innerhalb der T-Box. Mutationen in dieser variablen Position innerhalb der Antiterminators können durch die korrespondierenden Veränderungen in tRNA supprimiert werden (Grundy *et al.*, 1994; Rollins *et al.*, 1997). Die Diskriminatorbase ist ein wichtiges Element für die Identität vieler tRNAs. Mutationen in dieser Position verhindern in der Regel eine Acylierung der tRNA durch die zugehörige tRNA-Synthetase (Sherman *et al.*, 1992). An der Stelle der Diskriminatorbase findet sich in der tRNA^{Pro}_{UGG} und der tRNA^{Phe}_{GAA} ein Adenin, das in der Lage ist mit dem Uracil an der korrespondierenden Position in der T-Box des *proBA* und *proI*-Leaders zu paaren (Abb. 22A und 22B).

In Experimenten zu der tryptophanabhängigen Expression des *trp*-Operons aus *L. lactis* (van de Guchte *et al.*, 1998) konnte gezeigt werden, dass der T- und der D-Arm der tRNA^{Trp} wichtig für die Erkennung komplementärer Strukturen im *trp*-Leadertranskript sind (van de Guchte, 2001). In dieser Studie konnten auch für weitere Gene aus *L. lactis*, aber auch für das *proBA*-Operon und das *proI*-Gen aus *B. subtilis*, kurze komplementäre Bereiche zwischen der „Specifierdomäne“ und dem D-Arm der zugehörigen tRNA, und der unmittelbar stromaufwärts der Antiterminatorstruktur gelegenen Haarnadelstruktur und dem T-Arm der tRNA ausfindig gemacht werden (van de Guchte, 2001; Abb. 49). Die Angaben für diese Gene beruhen allerdings bisher ausschließlich auf Sequenzvergleichen. Es fällt dabei auf, dass es zwischen der tRNA^{Pro}_{UGG} und dem *proBA*-Leader deutlich weniger komplementäre Basen gibt als zwischen der tRNA^{Pro}_{UGG} und dem *proI*-Leader (Abb. 49A und 49B). Zwischen der tRNA^{Phe}_{GAA} und dem *proBA*-Leader gibt es nur noch 5 Möglichkeiten der Basenpaarung innerhalb der D- und T-Armregion der tRNA (Abb. 49A). Dies könnte unter anderem eine Erklärung für das deutlich geringere Niveau der Induktion durch Phenylalaninlimitation nach einem Austausch des „Specifiercodons“ sein (Tab. 9).

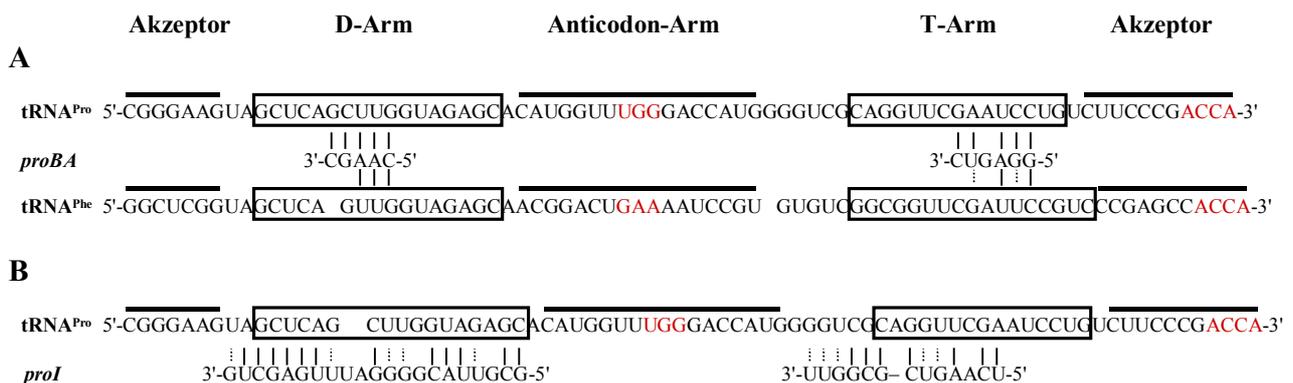


Abb. 49 Komplementäre Sequenzen zwischen dem *proBA*- und *proI*-Leader und der tRNA^{Pro}_{UGG} und der tRNA^{Phe}_{GAA} (verändert nach van de Guchte *et al.*, 2001)

A. Sequenzalignment zwischen der tRNA^{Pro}_{UGG} bzw. der tRNA^{Phe}_{GAA} und einem Fragment von Position 170 bis 174 und einem Fragment von Position 109 bis 114 im *proBA*-Leader **B.** Sequenzalignment zwischen der tRNA^{Pro}_{UGG} und einem Fragment von Position 153 bis 173 und einem Fragment von Position 119 bis 131 im *proI*-Leader. Mögliche Basenpaarungen sind durch einen Strich markiert. Das jeweilige Anticodon der tRNA ist rot markiert.

7.4 Prozessierung der *proBA*-Leader mRNA

Mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die *proBA*-Leaderregion unter Prolinhungerbedingungen prozessiert wird (Abb. 28), während dieser zusätzliche Level genetischer Regulation bei dem *proI*-Gen nicht zum tragen kommt (Abb. 29). Eine Prozessierung der Leaderregion konnte bisher für die *thrS*-, *tyrS*-, *thrZ*-, *serS*-, *trpS*- und *ilv-leu*-Gene aus *B. subtilis* nachgewiesen werden. Die exakte Lokalisation der Schnittstelle schwankt dabei von System zu System. Sie liegt jedoch stets zwischen der T-Box und dem Terminator (Condon *et al.*, 1996a; Condon *et al.*, 1996b). Für das *thrS*-Gen aus *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die

Prozessierung verstärkt unter Threoninmangelbedingungen stattfindet, was vermuten lässt, dass der Schnitt in der Antiterminatorkonformation der Leader mRNA erfolgt (Condon *et al.*, 1996b). In dieser Konformation liegt die Schnittstelle für die Prozessierung des *thrS*-Leaders in einer Schleife an der Spitze des Antiterminators (Condon *et al.*, 1996b). Laut Northern-Blot-Analysen findet auch die Prozessierung des *proBA*-Leaders ausschließlich unter Prolinhungerbedingungen statt (Abb. 28). Die genaue Schnittstelle wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Die Auswahl der für den Northernblot verwendeten Sonden schließt jedoch aus, dass das detektierte, prozessierte Transkript noch stromaufwärts des Terminators gelegene Sequenzen des *proBA*-Leaders trägt, da dieses Transkript mit der Leader spezifischen Sonde 2, deren 5'-Ende in der T-Box lokalisiert ist, nicht detektiert wurde (Abb. 28). Eine Entfernung des Leaders an der beschriebenen Position, erlaubte eine anschließende Rückfaltung der stabilen Terminatorstruktur. Das „reife“ *proBA*-Transkript besäße dann einen Terminator am 5'-Ende und am 3'-Ende. Für das prozessierte *thrS*-Transkript konnte eine 5-fach höhere Stabilität als für das Gesamttranskript nachgewiesen werden (Condon *et al.*, 1996b). Im Vergleich zum *thrS*-Gen, für das ein Anteil der prozessierten *thrS*-mRNA an der gesamten nicht-terminierten *thrS*-mRNA von 86 % ermittelt wurde (Condon *et al.*, 1996b), macht die prozessierte *proBA*-mRNA nur einen Anteil von 33 % an der gesamten nicht-terminierten *proBA*-mRNA aus (Abb. 28).

Die Prozessierung und anschließende Stabilisierung des *proBA*-Transkriptes trägt somit höchstwahrscheinlich, neben der Induktion der Expression durch transkriptionelle Antitermination, zum Gesamtlevel der *proBA*-Expression unter Prolinhungerbedingungen bei.

7.5 Einfluss der T-Box abhängigen Kontrolle der *proBA*- und der *proI*-Expression auf die Prolinbiosynthese in *B. subtilis*

Die Aktivität der γ -Glutamyl-Kinase ProB ist in *B. subtilis* über eine Feedbackkontrolle dem Prolinlevel in der Zelle angepasst. Die Expression des *proBA*-Operons wird zudem auf transkriptioneller Ebene, dem Prolinbedarf der Zelle entsprechend, reguliert. Es gibt somit offensichtlich eine doppelte Kontrolle, die die *B. subtilis*-Zelle davor schützt unter Normalbedingungen unnötig Prolin zu synthetisieren. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit diese Kontrolle auch die „gewollte“ Akkumulation großer Prolinmengen unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen beeinflusst. Das ProB-Enzym wird unter diesen Bedingungen von dem ProJ-Enzym ersetzt und ist selbst vermutlich auf Grund des hohen intrazellulären Prolin pools in seiner enzymatischen Funktion fast vollständig gehemmt. Da ProA jedoch den zweiten Schritt der Prolinbiosynthese in beiden Wegen katalysiert, muss unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen eine ausreichende Menge dieses Enzyms zur Verfügung stehen. Die Expression des *proBA*-Operons ist unter diesen Bedingungen weder induziert noch reprimiert (Abb. 13A), wie man auf Grund des T-Box-Mechanismus erwarten könnte. Es ist jedoch auch fraglich, inwieweit das akkumulierte Prolin unter hochosmolaren Bedingungen überhaupt zur Beladung der tRNAs zur Verfügung steht, oder die Prolyl-tRNA-Synthetase aktiv ist. Es könnte ebenfalls sein, dass das ProA-Enzym unter hochosmolaren Bedingungen aktiver ist, dies beruht bisher jedoch ausschließlich auf Spekulationen.

Northern-Blot-Analysen haben eindeutig gezeigt, dass unter Prolinhungerbedingungen ebenfalls eine verstärkte Expression des *proI*-Gens erfolgt (Abb. 27). Zudem konnten alle

Primärsequenzelemente und Sekundärstrukturmerkmale T-Box abhängiger Gene identifiziert werden (Abb. 22B, 23B und 23D). Ein abschließender Beweis für eine Kontrolle der Transkription dieses Gens durch T-Box abhängige transkriptionelle Antitermination könnte jedoch nur durch einen Austausch des putativen „Specifiercodons“ im *proI*-Leader erbracht werden. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit *proI*-*treA* Reporterfusionen analog zu den für *proBA* beschriebenen Fusionsstämmen konstruiert. Die im Northern-Blot nachgewiesene Induktion der Expression durch Prolinlimitation konnte jedoch nicht verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der Anwesenheit charakteristischer hochkonservierter Elemente innerhalb des *proI*-Leaders, der hohen Primärsequenzidentität von 64 % (Abb. 50) und der deutlichen Sekundärstrukturidentität (Abb. 22) zum *proBA*-Leader, unterliegt höchstwahrscheinlich auch das *proI*-Gen einer Regulation durch transkriptionelle Antitermination. Die Induktion durch Prolinhunger ist dabei jedoch deutlich geringer (Abb. 27) und auch der zusätzliche Level dieser Regulation durch Prozessierung des Primärtranskriptes ist für das *proI*-Gen nicht verwirklicht (Abb. 29).

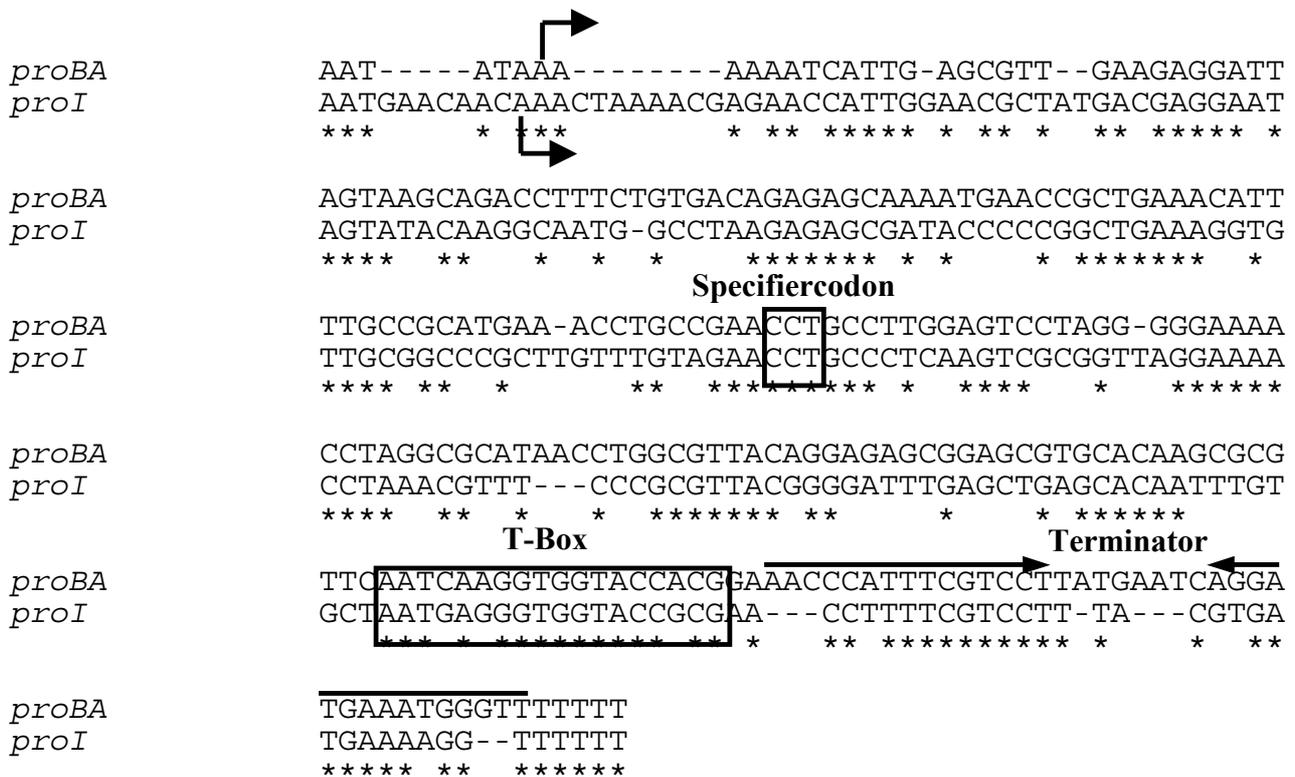


Abb. 50 Nukleotidsequenzvergleich zwischen dem *proBA*- und dem *proI*-5'-Nichtkodierungsbereich

Der jeweilige Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil markiert. Das „Specifiercodon“ und die T-Box sind durch einen Rahmen markiert. Der intrinsische Transkriptionsterminator ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Identische Nukleotide sind durch einen Stern markiert.

Die im Vergleich zu dem *proBA*-Operon deutlich geringere maximale Induktion könnte auf der Existenz dreier alternativer Gene beruhen, die in *B. subtilis* für Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen kodieren (Belitsky *et al.*, 2001). Die Expression des *proI*-Gens ist nicht essentiell für die anabole Prolinbiosynthese in *B. subtilis* (Abb. 6C). Das ProI-Enzym kann in seiner Funktion

somit von einer der drei weiteren Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktasen (ProG, ProH und ComER) ersetzt werden. Die Expression des *proA*-Gens hingegen ist essentiell für *B. subtilis*, was eine stärkere Induktion und stringenter Kontrolle der *proBA*-Expression durch Prolinhunger rechtfertigt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Agre, P., Brown, D. und Nielsen, S. (1995). Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 472-483.

Alia, P. S. P. und Mohanty, P. (1993). Proline in relation to free radical production in seedlings of *Brassica juncea*. *Plant Soil* **155/156**, 497-500.

Alia, P. S. P. und Mohanty, P. (1997). Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *J Photochem Photobiol B* **38**, 253-257.

Almansouri, M., Kinet, J. M. und Lutts, S. (1999). Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. *J Plant Physiol* **154**, 743-752.

Altendorf, K. und Epstein, W. (1994). Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Cell Physiol Biochem* **4**, 160-168.

Altendorf, K., Gassel, M., Puppe, W., Mollenkamp, T., Zeeck, A., Boddien, C., Fendler, K., Bamberg, E. und Drose, S. (1998). Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Acta Physiol Scand* **643**, 137-146.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

Amezaga, M. R. und Booth, I. R. (1999). Osmoprotection of *Escherichia coli* by peptone is mediated by the uptake and accumulation of free proline but not of proline-containing peptides. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5272-5278.

Amezaga, M. R., Davidson, I., McLaggan, D., Verheul, A., Abee, T. und Booth, I. R. (1995). The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology* **141**, 41-49.

Amezaga-Johnstone, M. R., McLaggan, D. und Booth, I. R. (1999). Surviving osmotic stress: the role of natural food components in limiting preservative action. In Y. H. Roos, R. B. Leslie und P. J. Lillford (Herausg.), *Water management in the design and distribution of quality foods*, S. 325-351. Technomic Publishing Company Inc, Lancaster, Pa.

Anagnostopoulos, C., Piggot, P. J. und Hoch, J. A. (1994). The genetic map of *Bacillus subtilis*. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*, S. 425-461. ASM Press, Washington D. C.

Arakawa, T. und Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biochem J* **47**, 411-414.

Arst, H. N., Jones, S. A. und Bailey, C. R. (1981). A method for the selection of deletion mutations in the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res* **38**, 171-195.

- Auble, D. T. und de Haseth, P. L. (1988).** Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Influence of DNA structure in the spacer separating the -10 and -35 regions. *J Mol Biol* **202**, 471-482.
- Babitzke, P. und Yanofsky, C. (1993).** Reconstitution of *Bacillus subtilis* *trp* attenuation *in vitro* with TRAP, the *trp* RNA-binding attenuation protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 133-137.
- Bachmann, B. J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Rev* **54**, 130-197.
- Barron, A., May, G., Bremer, E. und Villarejo, M. (1986).** Regulation of envelope protein composition during adaption to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **167**, 433-438.
- Baskakov, I. und Bolen, D. W. (1998).** Forcing Thermodynamically Unfolded Proteins to Fold. *J Biol Chem* **273**, 4831-4834.
- Belitsky, B. R. (2002).** Biosynthesis of amino acids of the glutamate and aspartate families, alanine, and polyamines. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, S. 203-231. ASM Press, Washington, D. C.
- Belitsky, B. R., Brill, J., Bremer, E. und Sonenshein, A. L. (2001).** Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**, 4389-4392.
- Bernhardt, J., Völker, U., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H. und Hecker, M. (1997).** Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* - a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**, 999-1017.
- Bird, T. H., Grimsley, J. K., Hoch, J. A. und Spiegelman, G. B. (1993).** Phosphorylation of Spo0A activates its stimulation of *in vitro* transcription from the *Bacillus subtilis* *spoIIIG* operon. *Mol Microbiol* **9**, 741-749.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979).** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bligh, E. G. und Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Blount, P., Schroeder, M. J. und Kung, C. (1997).** Mutations in a bacterial mechanosensitive channel change the cellular response to osmotic stress. *J Biol Chem* **272**, 32150-32157.
- Boch, J., Kempf, B. und Bremer, E. (1994).** Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**, 5364-5371.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. und Bremer, E. (1996).** Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**, 5121-5129.
- Boiangiu, C. (2001).** (persönliche Mitteilung).
- Bolen, D. W. und Baskakov, I. V. (2001).** The osmophobic effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**, 955-963.

- Booth, I. R. und Louis, P. (1999).** Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 166-169.
- Bourot, S., Sire, O., Trautwetter, A., Touze, T., Wu, L. F., Blanco, C. und Bernard, T. (2000).** Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 1050-1056.
- Bovell, C. R., Packer, L. und Helgerson, R. (1963).** Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochim Biophys Acta* **75**, 257-266.
- Boyer, J. S. (1982).** Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443-448.
- Brandon, L., Dorus, S., Epstein, W., Altendorf, K. und Jung, K. (2000).** Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the *kdp* ATPase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**, 1086-1092.
- Bremer, E. (2002).** Adaptation to changing osmolality. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, S. 385-391. ASM Press, Washington, D. C.
- Bremer, E. und Krämer, R. (2000).** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In G. Storz und R. Hengge-Aronis (Herausg.), *Bacterial stress responses*, S. 79-97. ASM Press, Washington, D. C.
- Brill, J. (1998).** Molekulare und physiologische Charakterisierung der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Brosius, M. (1999).** Osmotische Kontrolle der Strukturgene des hochaffinen Glicin Betain Transportsystems OpuA in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**, 803-846.
- Calamita, G. (2000).** The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol Microbiol* **37**, 254-262.
- Calamita, G., Kempf, B., Bonhivers, M., Bishai, W. R., Bremer, E. und Agre, P. (1998).** Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3627-3631.
- Campanile, C., Forlani, G., Basso, A. L., Marasco, R., Ricca, E., Sacco, M., Ferrara, L. und De Felice, M. (1993).** Identification and characterization of the *proBA* operon of *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 519-522.
- Campbell, A. (1962).** Episomes. *Adv Genet* **11**, 101.
- Canovas, D., Vargas, C., Calderon, M. I., Ventosa, A. und Nieto, J. J. (1998).** Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol* **21**, 487-497.

- Canovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Rhodes, D., Ventosa, A. und Nieto, J. J. (1997).** Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**, 25794-25801.
- Carpita, N. C. (1985).** Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant Physiol* **79**, 485-488.
- Chang, A. C. und Cohen, S. N. (1978).** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**, 1141-1156.
- Chang, B. Y., Shyu, Y. T. und Doi, R. H. (1992).** The interaction between *Bacillus subtilis* sigmaA factor and RNA polymerase with promoters. *Biochimie* **74**, 601-612.
- Cheggour, A., Fanuel, L., Duez, C., Joris, B., Bouillenne, F., Devreese, B., van Driessche, G., Van Beeumen, J., Frere, J. M. und Goffin, C. (2000).** The *dppA* gene of *Bacillus subtilis* encodes a new D-aminopeptidase. *Mol Microbiol* **38**, 504-513.
- Chen, D. M., Keiper, F. J. und Defilippis, L. F. (1998).** Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture. *J Plant Physiol* **152**, 555-563.
- Chiang, H. H. und Dandekar, A. M. (1991).** The regulation of proline accumulation at low water potentials in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Suppl* **96**, 108.
- Chopin, A., Biaudet, V. und Ehrlich, S. D. (1998).** Analysis of the *Bacillus subtilis* genome sequence reveals nine new T-box leaders. *Mol Microbiol* **29**, 662-664.
- Chou, I. T., Chen, C. T. und Kao, C. H. (1991).** Characteristics of the induction of the accumulation of proline by abscisic acid isobutyric acid in detached rice leaves. *Plant Cell Physiol* **32**, 269-272.
- Condon, C., Grunberg-Manago, M. und Putzer, H. (1996a).** Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **78**, 381-389.
- Condon, C., Putzer, H. und Grunberg-Manago, M. (1996b).** Processing of the leader mRNA plays a major role in the induction of *thrS* expression following threonine starvation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6992-6997.
- Condon, C., Putzer, H., Luo, D. und Grunberg-Manago, M. (1997).** Processing of the *Bacillus subtilis* *thrS* leader mRNA is RNase E-dependent in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **268**, 235-242.
- Conter, A., Menchon, C. und Gutierrez, C. (1997).** Role of DNA supercoiling and RpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol* **273**, 75-83.
- Corcuera, L. J., Hintz, M. und Pahlich, E. (1989).** Proline metabolism in *Solanum tuberosum* cell suspension cultures under water stress. *J Plant Physiol* **134**, 290-293.
- Costilow, R. N. und Laycock, L. (1971).** Ornithine cyclase (deaminating). Purification of a protein that converts ornithine to proline and definition of the optimal assay conditions. *J Biol Chem* **246**, 6655-6660.

- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. und Record, M. T. (2000).** Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: Implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of "osmotic stress" experiments *in vitro*. *Biochemistry* **39**, 4455-4471.
- Csonka, L. N. (1982).** A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. *J Bacteriol* **151**, 1433-1443.
- 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**, 2374-2378.
- Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Review* **53**, 121-147.
- Csonka, L. N. und Hanson, A. D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**, 569-606.
- Csonka, L. N. und Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, S. 1210-1223. ASM Press, Washington, D. C.
- Csonka, L. N., Gelvin, S. B., Goodner, B. W., Orser, C. S., Siemieniak, D. und Slightom, J. L. (1988).** Nucleotide sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* **64**, 199-205.
- Cutting, S. M. und Vander Horn, P. B. (1990).** Genetic analysis. In C. R. Harwood und S. M. Cutting (Herausg.), *Molecular biological methods for Bacillus*, S. 27-74. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, UK.
- da Costa, M. S., Santos, H. und Galinski, E. A. (1998).** An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv in Biochem Eng Biotechnol* **61**, 117-153.
- Dandekar, A. M. und Uratsu, S. L. (1988).** A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J Bacteriol* **170**, 5943-5945.
- Dattananda, C. S., Rajkumari, K. und Gowrishankar, J. (1991).** Multiple mechanisms contribute to osmotic inducibility of *proU* operon expression in *Escherichia coli*: demonstration of two osmoreponsive promoters and of a negative regulatory element within the first structural gene. *J Bacteriol* **173**, 7481-7490.
- Davies, M. J., Fu, S. L. und Dean, R. T. (1995).** Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Biochem J* **305**, 643-649.
- Delauney, A. J. und Verma, D. P. (1990).** A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol Gen Genet* **221**, 299-305.

- Delauney, A. J. und Verma, D. P. (1993).** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* **4**, 215-223.
- Delauney, A. J., Hu, C. A., Kishor, P. B. und Verma, D. P. (1993).** Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem* **268**, 18673-18678.
- Derbarbouille, M., Arnaud, M., Fuet, A., Klier, A. und Rapoport, G. (1990).** The *sacT* gene regulating the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J Bacteriol* **172**, 3966-3973.
- Ding, Q., Kusano, S., Villarejo, M. und Ishihama, A. (1995).** Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase by ionic strength: differential recognition of osmoregulated promoters by E sigma D and E sigma S holoenzymes. *Mol Microbiol* **16**, 649-656.
- Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H.-P. und Mandrand-Berthelot, M.-A. (1994).** Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **13**, 775-786.
- Ekena, K. und Maloy, S. (1990).** Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: how do cells avoid a futile cycle ? *Mol Gen Genet* **220**, 492-494.
- Errington, J. (1993).** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev* **57**, 1-33.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. und Youngman, P. (2000).** The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8063-8068.
- Ferrari, F. A., Nguyen, A., Lang, D. und Hoch, J. A. (1983).** Construction and properties of an integrable plasmid for *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **154**, 1513-1515.
- Ferretti, J. J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A. N., Kenton, S., Lai, H. S., Lin, S. P., Qian, Y., Jia, H. G., Najjar, F. Z., Ren, Q., Zhu, H., Song, L., White, J., Yuan, X., Clifton, S. W., Roe, B. A. und McLaughlin, R. (2001).** Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4658-4663.
- Fisher, S. H. (1993).** Utilization of amino acids and other nitrogen-containing compounds. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*, S. 221-228. ASM Press, Washington, D. C.
- Fisher, S. H. und Sonenshein, A. L. (1991).** Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 107-135.
- Fletcher, S. A. und Csonka, L. N. (1995).** Fine-structure analysis of the transcriptional silencer of the *proU* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**, 4508-4513.
- Fougère, F. und Le Rudulier, D. (1990).** Uptake of glycine betaine and its analogues by bacteroids of *Rhizobium meliloti*. *J Gen Microbiol* **136**, 157-163.

- Fougère, F., Le Rudulier, D. und Streeter, J. G. (1991).** Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **1228-1236**.
- Fraser, K. R., Harvie, D., Coote, P. J. und O'Byrne, C. P. (2000).** Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4696-4704.
- Furbass, R., Gocht, M., Zuber, P. und Marahiel, M. A. (1991).** Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. *Mol Gen Genet* **225**, 347-354.
- Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 95-108.
- Gallori, E., Bazzicalupo, M., Parisi, B., Pedaggi, G. und Polsinelli, M. (1978).** Resistance to (L)-azetidin-2-carboxylic acid in *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun* **85**, 1518-1525.
- Garcia de Castro, A. und Tunnacliffe, A. (2000).** Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. *FEBS Lett* **487**, 199-202.
- Gendron, N., Putzer, H. und Grunberg-Manago, M. (1994).** Expression of both *Bacillus subtilis* threonyl-tRNA synthetase genes is autogenously regulated. *J Bacteriol* **176**, 486-494.
- Gish, W. und States, D. J. (1993).** Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-272.
- Göller, K., Ofer, A. und Galinski, E. A. (1998).** Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 293-300.
- Gotsche, S. und Dahl, M. K. (1995).** Purification and characterization of the phospho- α -(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **177**, 2721-2726.
- Gould, G. W. und Measures, J. C. (1977).** Water relations in single cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **278**, 151-166.
- Gowrishankar, J. und Manna, D. (1996).** How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? *Genetica* **97**, 363-378.
- Grandoni, J. A., Zahler, S. A. und Calvo, J. M. (1992).** Transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**, 3212-3219.
- Graupner, M. und White, R. H. (2001).** *Methanococcus jannaschii* generates L-proline by cyclization of L-ornithine. *J Bacteriol* **183**, 5203-5205.
- Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L. und Wood, J. M. (1986).** Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **166**, 253-259.
- Grundy, F. J. und Henkin, T. M. (1993).** tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *Bacillus subtilis*. *Cell* **74**, 475-482.

- Grundy, F. J. und Henkin, T. M. (1994).** Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *J Mol Biol* **235**, 798-804.
- Grundy, F. J. und Henkin, T. M. (1998).** The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **30**, 737-749.
- Grundy, F. J. und Henkin, T. M. (1999).** A regulatory system hitherto found only in Gram-positive bacteria in a Gram-negative bacterium that grows only in co-culture with a *Bacillus* strain. *Mol Microbiol* **33**, 667-672.
- Grundy, F. J., Rollins, S. M. und Henkin, T. M. (1994).** Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis tyrS* gene: a new role for the discriminator base. *J Bacteriol* **176**, 4518-4526.
- Grundy, F. J., Collins, J. A., Rollins, S. M. und Henkin, T. M. (2000).** tRNA determinants for transcription antitermination of the *Bacillus subtilis tyrS* gene. *RNA* **6**, 1131-1141.
- Guérout-Fleury, A. M., Shazand, K., Frandsen, N. und Stragier, P. (1995).** Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**, 335-336.
- Guillouet, S. und Engasser, J. M. (1995a).** Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 315-320.
- Guillouet, S. und Engasser, J. M. (1995b).** Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure - Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**, 496-500.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. und Bremer, E. (1995).** The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **246**, 783-786.
- Hahn, J., Inamine, G., Kozlov, Y. und Dubnau, D. (1993).** Characterization of *comE*, a late competence operon of *Bacillus subtilis* required for the binding and uptake of transforming DNA. *Mol Microbiol* **10**, 99-111.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 577.
- Handler, J. S. und Kwon, H. M. (1993).** Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonocity. *Am J Physiol* **265**, C1449-1455.
- Harwood, C. R. und Archibald, A. R. (1990).** Growth, maintenance and general techniques. In C. R. Harwood und S. M. Cutting (Herausg.), *Molecular biological methods for Bacillus*, S. 1-26. John Wiley & Sons, Inc. Chichester, UK.
- Hecker, M. und Völker, U. (2001).** General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microbial Physiol* **44**, 35-91.

- Hecker, M., Schumann, W. und Völker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 417-428.
- Heermann, R., Altendorf, K. und Jung, K. (2000).** The hydrophilic N-terminal domain complements the membrane-anchored C-terminal domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 17080-17085.
- Helfert, C., Gotsche, S. und Dahl, M. K. (1995).** Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho-alpha(1,1)glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol Microbiol* **16**, 111-120.
- Helmann, J. D. (1995).** Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucl Acids Res* **23**, 2351-2360.
- Helmann, J. D. und Moran, C. P. (2002).** RNA polymerase and sigma factors. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, S. 289-312. ASM Press, Washington, D. C.
- Hengge-Aronis, R. (1996).** Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, S. 1497-1512. ASM Press, Washington, D. C.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmel, M. und Boos, W. (1991).** Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 7918-7924.
- Henkin, T. M. (1994).** tRNA-directed transcription antitermination. *Mol Microbiol* **13**, 381-387.
- Henkin, T. M. (1996).** Control of transcription termination in prokaryotes. *Annu Rev Genet* **30**, 35-57.
- Henkin, T. M. (2000).** Transcription termination control in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **3**, 149-153.
- Henkin, T. M. und Sonenshein, A. L. (1987).** Mutations of the *Escherichia coli lacUV5* promoter resulting in increased expression in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **209**, 467-474.
- Henkin, T. M., Glass, B. L. und Grundy, F. J. (1992).** Analysis of the *Bacillus subtilis tyrS* gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. *J Bacteriol* **174**, 1299-1306.
- Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L., Booth, I. R., May, G. und Bremer, E. (1988).** A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**, 569-584.
- Hiles, I. D., Powell, L. M. und Higgins, C. F. (1987).** Peptide transport in *Salmonella typhimurium*: molecular cloning and characterization of the oligopeptide permease genes. *Mol Gen Genet* **206**, 101-109.

- Holtmann, G. (1999).** Kaliumaufnahme in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. und Verma, D. P. (2000).** Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* **122**, 1129-1136.
- Hu, C. A., Delauney, A. J. und Verma, D. P. (1992).** A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9354-9358.
- Hua, X. J., Vandecotte, B., Vanmontagu, M. und Verbruggen, N. (1997).** Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **114**, 1215-1224.
- Iakobashvili, R. und Lapidot, A. (1999).** Low temperature cycled PCR protocol for Klenow fragment of DNA polymerase I in the presence of proline. *Nucl Acids Res* **27**, 1566-1568.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchishinozaki, K., Wada, K. und Shinozaki, K. (1997).** Characterization of the gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol* **33**, 857-865.
- Inamine, G. S. und Dubnau, D. (1995).** ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J Bacteriol* **177**, 3045-3051.
- Ingraham, J. L. und Marr, A. G. (1996).** Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, S. 1570-1578. ASM Press, Washington, D. C.
- Itaya, M. (1992).** Construction of a novel tetracycline resistance gene cassette useful as a marker of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Biosci Biotech Biochem* **56**, 685-686.
- Jebbar, M., von Blohn, C. und Bremer, E. (1997).** Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett* **154**, 325-330.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. und Kjellbom, P. (2000).** The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 324-342.
- Juillard, V., Guillot, A., Le Bars, D. und Gripon, J. C. (1998).** Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1230-1236.
- Kaasen, I., McDougall, J. und Strøm, A. R. (1994).** Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase phosphatase complex. *Gene* **145**, 9-15.

- Kaasen, I., Falkenberg, P., Stryvold, O. B. und R., S. A. (1992).** Molecular cloning and physical mapping of the *otsAB* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: Evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J Bacteriol* **174**, 889-898.
- Kanaya, S., Yamada, Y., Kudo, Y. und Ikemura, T. (1999).** Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* **238**, 143-155.
- Kappes, R. und Bremer, E. (1998).** Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and γ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**, 83-90.
- Kappes, R. M., Kempf, B. und Bremer, E. (1996).** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**, 5071-5079.
- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. und 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**, 203-216.
- Kawahara, Y., Ohsumi, T., Yoshihara, Y. und Ikeda, S. (1989).** Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric biol Chem* **53**, 2475-2479.
- Kemble, A. R. und McPherson, H. T. (1954).** Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem J* **58**, 46-59.
- Kempf, B. und Bremer, E. (1995).** OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**, 16701-16713.
- Kempf, B. und Bremer, E. (1998a).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**, 319-330.
- Kempf, B. und Bremer, E. (1998b).** Stress responses of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: uptake and synthesis of osmoprotectants. *J Biosci* **23**, 447-455.
- Kempf, B., Gade, J. und 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**, 6213-6220.
- Killham, K. und Firestone, M. K. (1984).** Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces indigenus* to saline soils. *Appl Environ Microbiol* **47**, 301-306.
- Kirst, G. O. (1990).** Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**.
- Kirst, G. O. (1996).** Osmotic adjustment in phytoplankton and macroalgae. In R. P. Kiene (Herausg.), *Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds*, S. 121-129. Plenum Press, N. Y.

- Kishor, P. B. K., Hong, Z. L., Miao, G. H., Hu, C. A. A. und Verma, D. P. S. (1995).** Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* **108**, 1387-1394.
- Ko, R. und Smith, L. T. (1999).** Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4040-4048.
- Koch, A. L. (1982).** On the growth and form of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **128**, 2527-2540.
- Koch, A. L. (1984).** Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic stress. *J Bacteriol* **159**, 919-924.
- Kohl, D. H., Schubert, K. R., Carter, M. B., Hagedorn, C. H. und Schearer, G. (1988).** Proline metabolism in N_2 -fixing root nodules: energy transfer and regulation of synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2036-2040.
- Koide, A. und Hoch, J. A. (1994).** Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. *Mol Microbiol* **13**, 417-426.
- Koo, S. P., Higgins, C. F. und Booth, I. R. (1991).** Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J Gen Microbiol* **137**, 2617-2625.
- Kosuge, T. und Hoshino, T. (1998).** Construction of a proline-producing mutant of the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4328-4332.
- Kuhlmann, A. U. und Bremer, E. (2001).** Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* (in revision).
- Kuhlmann, A. U. (2001).** (persönliche Mitteilung).
- Kumar, A., Malloch, R. A., Fujita, N., Smillie, D. A., Ishihama, A. und Hayward, R. S. (1993).** The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* σ^{70} is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J Mol Biol* **232**, 406-418.
- 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. und Danchin, A. (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
- Kunte, J., Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1993).** A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *J Microbiol Meth* **17**, 129-136.
- Lamark, T., Røkenes, T. P., McDougall, J. und Strøm, A. R. (1996).** The complex *bet* promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J Bacteriol* **178**, 1655-1662.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J. und Strøm, A. R. (1991).** DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 1049-1064.

- Landick, R. und Yanofsky, C. (1987).** Transcription attenuation. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, S. 1276-1301. Am Soc Microbiol, Washington, D. C.
- Larher, F., Rotivalgarnier, N., Lemesle, P., Plasman, M. und Bouchereau, A. (1996).** The glycine betaine inhibitory effect on the osmoinduced proline response of rape leaf discs. *Plant Science* **113**, 21-31.
- Le Rudulier, D., Strøm, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T. und Valentine, R. C. (1984).** Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**, 1064-1068.
- Lee, S.-K., Yu, S.-L., Alexander, H. und Alexander, S. (1996).** Increasing the specificity of colony hybridization when using heterologous probes. *BioTechniques* **21**, 630-632.
- Leisinger, T. (1996).** Biosynthesis of proline. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, S. 434-441. ASM Press, Washington, D. C.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. und 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**, 1730-1737.
- Li, C., Boileau, A. J., Kung, C. und Adler, J. (1988).** Osmotaxis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9451-9455.
- Limauro, D., Falciatore, A., Basso, A. L., Forlani, G. und De Felice, M. (1996).** Proline biosynthesis in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the *proBA* operon and its products. *Microbiology* **142**, 3275-3282.
- Lippert, K. und Galinski, A. A. (1992).** Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 61-65.
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. und Sparling, R. (1998).** Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**, 707-717.
- Louis, P. und Galinski, E. A. (1997).** Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**, 1141-1149.
- Lucht, J. M. und Bremer, E. (1994).** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol Lett* **14**, 3-20.
- Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B. und Bremer, E. (1994).** Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 6578-6586.

- Luo, D., Condon, C., Grunberg-Manago, M. und Putzer, H. (1998).** *In vitro* and *in vivo* secondary structure probing of the *thrS* leader in *Bacillus subtilis*. *Nucl Acids Res* **26**, 5379-5387.
- Madkour, M. A., Smith, L. T. und Smith, G. M. (1990).** Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2876-2881.
- Marinus, M. G., Carraway, M., Frey, A. Z., Brown, L. und Arraj, J. A. (1983).** Insertion mutations in the *dam* gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **192**, 288-289.
- Marta, P. T., Ladner, R. D. und Grandoni, J. A. (1996).** A CUC triplet confers leucine-dependent regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon. *J Bacteriol* **178**, 2150-2153.
- Martin, D. D., Ciulla, R. D. und Roberts, M. F. (1999).** Osmoadaptation in *Archaea*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1815-1825.
- Martinac, B. (2001).** Mechanosensitive channels in prokaryotes. *Cell Physiol Biochem* **11**, 61-76.
- Massarelli, I., Forlani, G., Ricca, E. und De Felice, M. (2000).** Enhanced and feedback-resistant γ -glutamyl kinase activity of an *Escherichia coli* transformant carrying a mutated *proB* gene of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **182**, 143-147.
- Mathiopoulos, C. und Sonenshein, A. L. (1989).** Identification of *Bacillus subtilis* genes expressed early during sporulation. *Mol Microbiol* **3**, 1071-1081.
- Mathiopoulos, C., Mueller, J. P., Slack, F. J., Murphy, C. G., Patankar, S., Bukusoglu, G. und Sonenshein, A. L. (1991).** A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. *Mol Microbiol* **5**, 1903-1913.
- Maurel, L. (1997).** Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 399-429.
- Maxwell, S. A. und Davis, G. E. (2000).** Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13009-13014.
- McLaggan, D., Logan, T. M., Lynn, D. G. und Epstein, W. (1990).** Involvement of gamma-glutamyl peptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 3631-3636.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T. und Epstein, W. (1994).** Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 1911-1917.
- Measures, J. C. (1975).** Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**, 398-400.
- Mellies, J., Brems, R. und Villarejo, M. (1994).** The *Escherichia coli* *proU* promoter element and its contribution to osmotically signalled transcription activation. *J Bacteriol* **176**, 3638-3645.
- Meury, J. (1988).** Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **149**, 232-239.

- Miller, J. H. (1992).** *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Miller, K. J. und Wood, J. M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 101-136.
- Mitchell, P. und Moyle, J. (1956).** Osmotic function and structure in bacteria. *Symp soc Gen Microbiol* **6**, 150-180.
- Moe, P. C., Blount, P. und Kung, C. (1998).** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol Microbiol* **28**, 583-592.
- Moran, C. P., Jr., Lang, N., LeGrice, S. F. J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A. L., Pero, J. und Losick, R. (1982).** Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **186**, 339-346.
- Moses, S. (1999).** Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Muth, W. L. und Costilow, R. N. (1974).** Ornithine cyclase (deaminating) III. Mechanism of the conversion of ornithine to proline. *J Biol Chem* **249**, 7463-7467.
- Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T. und Bakker, E. P. (1998).** KtrAB, a new type of bacterial K⁺-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **180**, 3491-3494.
- Nau-Wagner, G. (1999).** Physiologische und genetische Untersuchungen zur Biosynthese und Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Nau-Wagner, G., Boch, J., Le Good, J. A. und Bremer, E. (1999).** High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 560-568.
- Nevoigt, E. und Stahl, U. (1997).** Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 231-241.
- Niaudet, B. und Ehrlich, S. D. (1982).** Insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis*: mechanism and use in gene cloning. *Gene* **19**, 277-284.
- Nyyssölä, A., Kerovuo, J., Kaukinen, P., von Weymarn, N. und Reinikainen, T. (2000).** Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem* **275**, 22196-22201.
- Ogura, M., Kawata-Mukai, M., Itaya, M., Takio, K. und Tanaka, T. (1994).** Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**, 5673-5680.
- Omori, K., Suzuki, S., Imai, Y. und Komatsubara, S. (1992).** Analysis of the mutant *proBA* operon from a proline-producing strain of *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* **138**, 693-699.

- Ordal, G. W., Villani, D. P. und Gibson, K. J. (1977).** Amino acid chemoreceptors of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **129**, 156-165.
- Overdier, D. G., Olson, E. R., Erickson, B. D., Ederer, M. M. und Csonka, L. N. (1989).** Nucleotide sequence of the transcriptional control region of the osmotically regulated *proU* operon of *Salmonella typhimurium* and identification of the 5' endpoint of the *proU* mRNA. *J Bacteriol* **171**, 4694-4706.
- Owen-Hughes, T. A., Pavitt, G. D., Santos, D. S., Sidebotham, J. M., Hulton, C. S. J., Hinton, J. C. D. und Higgins, C. F. (1992).** The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* **71**, 255-265.
- Ozoline, O. N., Deev, A. A. und Arkhipova, M. V. (1997).** Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucl Acids Res* **25**, 4703-4709.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K. und Saier, M. H. (1998).** Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol* **277**, 573-592.
- Peng, Z., Lu, Q. und Verma, D. P. (1996).** Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet* **253**, 334-341.
- Perego, M., Spiegelman, G. B. und Hoch, J. A. (1988).** Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **2**, 689-699.
- Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallagher, M. P. und Hoch, J. A. (1991).** The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol Microbiol* **5**, 173-185.
- Perriere, G., Gouy, M. und Gojobori, T. (1994).** NRSUB - a non-redundant data base for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucl Acids Res* **22**, 5525-5529.
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, 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**, 5229-5234.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Kramer, R. und 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**, 6005-6012.
- Peters, P., Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1990).** The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**, 157-162.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U. und Hecker, M. (2001).** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**, 5617-5631.

- Poolman, B. und 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.
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. und Agre, P. (1992).** Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385-387.
- Price, C. W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C. K. und Youngman, P. (2001).** Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **41**, 757-774.
- Priest, F. G. (1993).** Systematics and ecology of *Bacillus*. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*, S. 3-16. ASM Press, Washington, D. C.
- Putzer, H., Gendron, N. und Grunberg-Manago, M. (1992).** Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J* **11**, 3117-3127.
- Putzer, H., Grunberg-Manago, M. und Springer, M. (1995a).** Bacterial aminoacyl-tRNA synthetases: genes and regulation of expression. In D. Söll und U. RajBhandary (Herausg.), *tRNA: structure, biosynthesis, and function*, S. 293-333. ASM Press, Washington, D. C.
- Putzer, H., Laalami, S., Brakhage, A. A., Condon, C. und Grunberg-Manago, M. (1995b).** Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation. *Mol Microbiol* **16**, 709-718.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W. und Sonenshein, A. L. (2001).** *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* **15**, 1093-1103.
- Reizer, J., Reizer, A. und Saier, M. H. (1994).** A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta* **1197**, 133-166.
- Remaut, H., Bompard-Gilles, C., Goffin, C., Frere, J. M. und Van Beeumen, J. (2001).** Structure of the *Bacillus subtilis* D-aminopeptidase DppA reveals a novel self-compartmentalizing protease. *Nature Struct Biol* **8**, 674-678.
- Roberts, J. W. (1993).** RNA and protein elements of *Escherichia coli* and λ transcription antitermination complexes. *Cell* **72**, 653-655.
- Roberts, M. F. (2000).** Osmoadaptation and osmoregulation in *Archaea*. *Front Biosci* **5**, 796-812.
- Rollins, S. M., Grundy, F. J. und Henkin, T. M. (1997).** Analysis of *cis*-acting sequence and structural elements required for antitermination of the *Bacillus subtilis* *tyrS* Gene. *Mol Microbiol* **25**, 411-421.
- Roosens, N. H., Thu, T. T., Iskandar, H. M. und Jacobs, M. (1998).** Isolation of the ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **117**, 263-271.

- Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D. und Gotz, F. (1999).** The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A: genetic and physiological characterization. *J Bacteriol* **181**, 2273-2278.
- Rozwadowski, K. L., Khachatourians, G. G. und Selvaraj, G. (1991).** Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 472-478.
- Rudner, D. Z., LeDeaux, J. R., Ireton, K. und Grossman, A. D. (1991).** The *spo0K* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J Bacteriol* **173**, 1388-1398.
- Rushlow, K. E., Deutch, A. H. und Smith, C. J. (1985).** Identification of a mutation that relieves γ -glutamyl kinase from allosteric feedback inhibition by proline. *Gene* **39**, 109-112.
- Ruzal, S. M., López, C., Rivas, E. und Sánchez-Rivas, C. (1998).** Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **36**, 75-79.
- Saier, M. H., Goldman, S. R., Maile, R. R., Moreno, M. S., Weyler, W., Yang, N. und Paulsen, I. T. (2002).** Overall transport capabilities of *Bacillus subtilis*. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, S. 113-128. ASM Press, Washington, D. C.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. E. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Samuel, D., Kumar, T. K. S., Ganesh, G., Jayaraman, G., Yang, P. W., Chang, M. M., Trivedi, V. D., Wang, S. L., Hwang, K. C., Chang, D. K. und Yu, C. (2000).** Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci* **9**, 344-352.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Sarsero, J. P., Merino, E. und Yanofsky, C. (2000).** A *Bacillus subtilis* operon containing genes of unknown function senses tRNA^{Trp} charging and regulates expression of the genes of tryptophan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2656-2661.
- Schöck, F. und Dahl, M. (1996).** Analysis of DNA flanking the *treA* gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific enzyme II^{Trp} and a potential regulator of the trehalose operon. *Gene* **175**, 59-63.
- Schöck, F., Gotsche, S. und Dahl, M. K. (1996).** Vectors using the phospho- α -(1,1)-glucosidase-encoding gene *treA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene* **170**, 77-80.
- Serror, P. und Sonenshein, A. L. (1996).** Interaction of CodY, a novel *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, with the *dpp* promoter region. *Mol Microbiol* **20**, 843-852.

- Severin, J., Wohlfarth, A. und Galinski, E. A. (1992).** The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**, 1629-1638.
- Sherman, J. M., Rogers, K., Rogers, M. J. und Soll, D. (1992).** Synthetase competition and tRNA content determine the *in vivo* identity of tRNA discriminator mutants. *J Mol Biol* **228**, 1055-1062.
- Slack, F. J., Mueller, J. P. und Sonenshein, A. L. (1993).** Mutations that relieve nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *J Bacteriol* **175**, 4605-4614.
- Slack, F. J., Serror, P., Joyce, E. und Sonenshein, A. (1995).** A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol Microbiol* **15**, 689-702.
- Slack, F. J., Mueller, J. P., Strauch, M. A., Mathiopoulos, C. und Sonenshein, A. L. (1991).** Transcriptional regulation of a *Bacillus subtilis* dipeptide transport operon. *Mol Microbiol* **5**, 1915-1925.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. und Hill, C. (2001a).** Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2571-2577.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. und Hill, C. (2001b).** Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: Effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4560-4565.
- Sleator, R. D., Wouters, J., Gahan, C. G. M., Abee, T. und Hill, C. (2001c).** Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2692-2698.
- Smirnoff, N. und Cumbes, Q. J. (1989).** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057-1060.
- Smirnova, N., Scott, J., Völker, U. und Haldenwang, W. G. (1998).** Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *sigB* operon mutations that suppress the loss of the negative regulator RsbX. *J Bacteriol* **180**, 3671-3680.
- Smith, C. J., Deutch, A. H. und Rushlow, K. E. (1984).** Purification and characteristics of a γ -glutamyl kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. *J Bacteriol* **157**, 545-551.
- Smith, L. T. (1985).** Characterization of a γ -glutamyl kinase from *Escherichia coli* that confers proline overproduction and osmotic tolerance. *J Bacteriol* **164**, 1088-1093.
- Smith, L. T. und Smith, G. M. (1989).** An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **171**, 4714-4717.
- Spiegelhalter, F. und Bremer, E. (1998).** Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress responsive promoters. *Mol Microbiol* **29**, 285-296.

- Spiegelhalter, F. (1999).** Die transkriptionell kontrollierte Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis* am Beispiel der Prolin- und Glycin-Betain-Transportsysteme OpuE und OpuD. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Spizizen, J. (1958).** Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**, 1072-1078.
- Steil, L. (2000).** Identifizierung und Charakterisierung sporulationsspezifischer Gene in *Bacillus subtilis* mit Hilfe der DNA-Array Technik. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Stines, A. P., Naylor, D. J., Hoj, P. B. und van Heeswijk, R. (1999).** Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiol* **120**, 923-931.
- Stragier, P. und Losick, R. (1996).** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Ann Rev Genet* **30**, 297-341.
- Strauch, M. A. und Hoch, J. A. (1993).** Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol Microbiol* **7**, 337-342.
- Strauch, M. A., Spiegelman, G. B., Perego, M., Johnson, W. C., Burbulys, D. und Hoch, J. A. (1989).** The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO J* **8**, 1615-1621.
- Strøm, A. R. und Kaasen, I. (1993).** Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol* **8**, 205-210.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R. und Kung, C. (1994).** A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* **368**, 265-268.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M. J., Booth, I. R. und Higgins, C. F. (1986).** Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J Bacteriol* **168**, 805-814.
- Szoke, A., Miao, G. H., Hong, Z. und Verma, D. P. S. (1992).** Subcellular location of pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiol* **99**, 1642-1649.
- Taiz, L. (1984).** Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Ann Rev Plant Physiol* **35**, 585-657.
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., HIRAMA, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S. und Horikoshi, K. (2000).** Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucl Acids Res* **28**, 4317-4331.
- Timasheff, S. N. (1998).** In dilute solution, osmotic stress is a restricted case of preferential interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7363-7367.
- Townsend, D. E., Kaenjak, A., Jayaswal, R. K. und Wilkinson, B. J. (1996).** Proline is biosynthesized from arginine in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **142**, 1491-1497.

- Trüper, H. G. und Galinski, E., A. (1990).** Biosynthesis and fate of compatible solutes in extremely halophilic phototrophic eubacteria. *FEMS Microbiol Rev* **75**, 247-254.
- Vagner, V., Dervyn, E. und Ehrlich, S. D. (1998).** A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **144**, 3097-3104.
- van de Guchte, M., Ehrlich, D. S. und Chopin, A. (1998).** tRNA^{Trp} as a key element of antitermination in the *Lactococcus lactis trp* operon. *Mol Microbiol* **29**, 61-74.
- van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. und Chopin, A. (2001).** Identity elements in tRNA-mediated transcription antitermination: implication of tRNA D- and T-arms in mRNA recognition. *Microbiology* **147**, 1223-1233.
- van Tilbeurgh, H., Manival, X., Aymerich, S., Lhoste, J. M., Dumas, C. und Kochoyan, M. (1997).** Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**, 5030-5036.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. und Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 504-544.
- Verbruggen, N., Villarreal, R. und Van Montagu, M. (1993).** Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **103**, 771-781.
- Verbruggen, N., Hua, X. J., May, M. und Van Montagu, M. (1996).** Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8787-8791.
- Verheul, A., Rombouts, F. M. und Abee, T. (1998).** Utilization of oligopeptides by *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1059-1065.
- Verheul, A., Hagting, A., Amezaga, M. R., Booth, I. R., Rombouts, F. M. und Abee, T. (1995).** A di- and tripeptide transport system can supply *Listeria monocytogenes* Scott A with amino acids essential for growth. *Appl Environ Microbiol* **61**, 226-233.
- Verma, D. P. S. (1999).** Osmotic stress tolerance in plants: role of proline and sulfur metabolisms. In K. Shinozaki und K. Yamaguchi-Shinozaki (Herausg.), *Molecular Responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants*, S. 153-168. R. G. Landes Company, Georgetown, TX.
- Verslues, P. E. und Sharp, R. E. (1999).** Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol* **119**, 1349-1360.
- Vogel, H. J. und Davis, B. D. (1952).** Glutamic- γ -semialdehyde and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid, intermediates in the biosynthesis of proline. *J Am Chem Soc* **74**, 109-112.
- Völker, U., Maul, B. und Hecker, M. (1999).** Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 3942-3948.
- von Blohn, C. (1997).** Die Rolle des Transportsystems OpuE in *Bacillus subtilis* bei der Homöostase von Prolin unter hochosmotischen Umweltbedingungen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.

- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M. und Bremer, E. (1997).** Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25**, 175-187.
- Voskuil, M. I. und Chambliss, G. H. (1998).** The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. *Nucl Acids Res* **26**, 3584-3590.
- Voskuil, M. I., Voepel, K. und Chambliss, G. H. (1995).** The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**, 271-279.
- Vuillard, L., Rabilloud, T. und Goldberg, M. E. (1998).** Interactions of non detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate *in vitro* protein renaturation. *Eur J Biochem* **256**, 128-135.
- Whatmore, A. M. und Reed, R. H. (1990).** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136**, 2521-2526.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. (1990).** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**, 2527-2535.
- White, B. A. (1993).** PCR protocols. In J. M. Walker (Herausg.), *Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Winkler, W. C., Grundy, F. J., Murphy, B. A. und Henkin, T. M. (2001).** The GA motif: an RNA element common to bacterial antitermination systems, rRNA, and eukaryotic RNAs. *RNA* **7**, 1165-1172.
- Wong, L. S., Johnson, M. S., Sandberg, L. B. und Taylor, B. L. (1995).** Amino acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**, 4342-4349.
- Wood, J. M. (1987).** Membrane association of proline dehydrogenase in *Escherichia coli* is redox dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 373-377.
- Wood, J. M. (1988).** Proline porters effect the utilization for proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J Membrane Biol* **106**, 183-202.
- Wood, J. M. (1999).** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 230-262.
- Yamada, M., Kubo, M., Miyake, T., Sakaguchi, R., Higo, Y. und Imanaka, T. (1991).** Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: construction of strong promoters in *E. coli*. *Gene* **99**, 109-114.
- Yan, D., Ikeda, T. P., Shauger, A. E. und Kustu, S. (1996).** Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6527-6531.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y. und Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J* **7**, 751-760.

Zhang, C. S., Lu, Q. und Verma, D. P. (1995). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem* **270**, 20491-20496.

Zhilana, T. N. und Zavarzin, G. A. (1990). Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **87**, 315-322.

Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**, 48-52.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Marburg/Lahn, Dezember 2001

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Bremer, zum einen für die Überlassung des Themas, aber vor allem für seine hervorragende Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und das beständige Interesse an diesem Thema. Auch für die phantasievolle Namensgebung, die von Jungforscher über „Spicegirl“ bis zu Frau Dr. in spe reichte, möchte ich mich an dieser Stelle einmal bedanken.

Bei meinen Laborkollegen der AG Bremer möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Ratschläge und technischen Hilfestellungen bedanken. Ganz besonderer Dank gilt Gudrun Holtmann für die gute Atmosphäre im ersten Labor, die Mensagänge und den Ausgleich im Vitakraft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD. Dr. Putzer und seiner Arbeitsgruppe am Institut de Biologie Physico-Chimique in Paris für die Gastfreundschaft, die hervorragende Unterstützung und die vielen wertvollen Tipps zum Umgang mit RNA.

Mein persönlicher Dank und größter Dank gilt meinen Eltern, meinen Freunden und vor allem Sören, die mich stets motiviert und unterstützt haben.