

**Charakterisierung der Rolle von genereller Stressantwort
und Sporulation bei der Anpassung von *Bacillus*-Stämmen
an den Standort Boden**



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

dem

Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Abdallah Bashir
aus Deir-Al Balah/ Palästina

Marburg/Lahn, 2004

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 05.08.2004

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Thauer
Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Völker
Tag der mündlichen Prüfung am: 13.08.2004

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG.....	3
2.1. Rolle und Funktion des alternativen Sigmafaktors SigB.....	4
2.2. Funktion der generellen Stressproteine in <i>B. subtilis</i>	5
2.3. Struktur des <i>sigB</i> -Operons.....	7
2.4. Morphologische Entstehung einer Spore.....	9
2.5. Regulation der Initiation der Sporulation	10
2.6. <i>B. subtilis</i> im Boden	17
3. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	20
4. MATERIAL UND METHODEN.....	21
4.1. Material.....	21
4.1.1. Laborgeräte.....	21
4.1.2. Chemikalien.....	22
4.1.3. Medien.....	24
4.1.4. Mikroorganismen	26
4.1.5. Antibiotika.....	27
4.2. Methoden.....	27
4.2.1. Methoden zur Isolation und Manipulation von DNA.....	27
4.2.2. Kultivierung der Bakterien	32
4.2.3. Biochemische Methoden	40
4.3. Arbeit mit Bodenmikrokosmen	51
4.3.1. Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens und der Bodenfeuchte	51
5. ERGEBNISSE.....	54
5.1. Bedeutung der generellen Stressantwort und der Sporulation für das Überleben von <i>B. subtilis</i> im Boden	54
5.1.1. Einfluss einer Präadaptation durch milden Salzschock auf das Überleben im Boden	55
5.1.2. Einfluss einer Zugabe von 1 % Glukose auf das Überleben und die Sporulation im Boden bei Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen.....	57
5.1.3. Überleben von <i>B. subtilis</i> -Stämmen in Boden mit hohem Salzgehalt (10 % NaCl) ...	58
5.2. Untersuchung zur Hemmung der Sporulation bei niedrigen Temperaturen.....	61
5.2.1. Aktivität der sporulationsspezifischen Sigmafaktoren bei 37 °C und 16 °C.....	61
5.2.2. Nachweis der Expression sporulationsspezifischer Gene mit Hilfe der „Northern- Blot“ Analyse	67
5.2.3. Liegt der Block der Sporulation bei niedriger Temperatur bei dem Sporulations- Sigmafaktor SigK?	70

5.2.4. Bestimmung der Sporulationskinetik und der <i>lacZ</i> -Aktivität von <i>B. subtilis</i> bei 13 °C	72
5.2.5. Das Überleben von <i>Bacillus</i> -Wildtypstämmen bei 13 °C	74
5.3. Proteomanalyse exponentiell wachsender und gestresster Zellen des <i>B. amyloliquefaciens</i> Stammes FZB42	75
5.3.1. Stressbehandlung des <i>B. amyloliquefaciens</i> Stammes FZB42	82
6. DISKUSSION	106
6.1. Rolle der generellen Stressantwort für das Überleben von <i>B. subtilis</i> im Boden.....	106
6.2. Analyse der Blockierung von Sporulation bei niedrigen Temperaturen	111
6.3. Proteomanalyse des <i>B. amyloliquefaciens</i> Stammes FZB42.....	116
7. LITERATURVERZEICHNIS	117
DANKSAGUNG	126
LEBENS LAUF	127
ERKLÄRUNG	128

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	Zweifach entionisiertes Wasser
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CFU	Kolonie-bildende Einheiten
CHAPS	3-[(3-Chlamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
ch. DNA	chromosomale DNA
Cm ^R	Chloramphenicol- Resistenz
2D	zweidimensional
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em ^R	Erythromycin- Resistenz
EtOH	Ethanol
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gsp,GSP	Generelles Stressprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
Km ^R	Kanamycin- Resistenz
Ko	Kontrolle
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
lin.	linearisiert
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time-Of-Flight-Massenspektrometrie
MU	Miller units
Mw	Molekular Masse
MWHK	Maximale Wasserhaltekapazität
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P _x	Promotor, der vom Sigmafaktor x erkannt wird
PAGE	Polyacryl-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sel.	Selektion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp ^R	Spectinomycin- Resistenz
Tab.	Tabelle
T ₀	Eintritt in die stationäre Phase
T _x	Zeitpunkt x Stunden oder Tage nach Eintritt in die stationäre Phase
TE	Tris-EDTA-Lösung
TF	Transformation
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Zusammenfassung

Bacillus subtilis ist im undurchwurzelten Boden mit einer nahezu permanenten Nährstofflimitation konfrontiert, die die Ausbildung geeigneter Anpassungsmechanismen erzwungen hat, zu denen die Sporulation und die Synthese einer ganzen Palette von Exoenzymen zählen. Unter für den Boden durchaus relevanten Bedingungen wie hoher Osmolarität, Sauerstofflimitation oder niedriger Zelldichte ist die Sporulation jedoch stark gehemmt, so dass dann folglich andere Strategien das Überleben von *B. subtilis* in Form vegetativer Zellen sichern müssen. Mit einer solchen unspezifischen, multiplen und vorsorglichen Stressresistenz können vegetative nichtwachsende Zellen beispielsweise durch die Expression des SigB-abhängigen generellen Stressregulons ausgestattet werden.

Die vorliegende Arbeit besteht aus drei miteinander verknüpften Teilen. Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Klärung der Frage, welchen Beitrag Sporulation und generelle Stressantwort für das Überleben von *B. subtilis* in Bodenmikrokosmen leisten. Bei einer Inkubation in undurchwurzeltem Grünlandboden bei 28 °C war infolge der Nährstofflimitation die Sporulation die bevorzugte Adaptationsreaktion, so dass die Population in den Bodenmikrokosmen nach wenigen Tagen ausschließlich in Form von Sporen vorlag. Unter diesen Bedingungen zeigte die Inaktivierung von *sigB* nur wenig Wirkung, so dass ein Wildtypstamm im Vergleich zur *sigB*-Mutante nur geringfügig besser überlebte (2- bis 4fach). Deutliche Unterschiede im Überleben zwischen Wildtyp und *sigB*-Mutante wurden jedoch dann beobachtet, wenn die unsterilen Bodenmikrokosmen mit präadaptierten Zellen beimpft wurden oder die Zellen in den Bodenmikrokosmen zusätzlich extremen Stressbedingungen ausgesetzt waren. Zu den effektiven Präadaptationen, die im Wildtyp vermutlich über die Vorbeladung mit generellen Stressproteinen zu einer Stressresistenz führten, gehören beispielsweise milder Hitzeschock (30 min 48 °C) und Salzstress (30 min 4 % NaCl). In Bodenmikrokosmen mit hohem Salzgehalt (1,7 M NaCl) wurde sogar ein bis zu 100fach besseres Überleben des Wildtypstammes gegenüber der *sigB*-Mutante beobachtet. Diese Befunde deuten damit an, dass die Induktion des generellen Stressregulons auch zum Überleben von *B. subtilis* im Boden beitragen kann.

Dieser experimentelle Ansatz lieferte auch den Befund, dass *B. subtilis* bei Inkubation im Boden bei 4 °C nicht mehr sporulieren konnte. Es war deshalb Ziel des zweiten Teils der Arbeit, dieses schon in der Diplomarbeit erhaltene überraschende Ergebnis durch Detailanalysen zu erhärten und den Block der Sporulation aufzuklären. In der Arbeit gelang der Nachweis, dass die Sporulation verschiedener *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* Stämme bei ökophysiologisch relevanten Temperaturen im Bereich von 16 °C bis 4 °C sowohl in Bodenmikrokosmen als auch in Schüttelkolbenversuchen gehemmt ist. Mit Hilfe von Reporterfusionen und Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass mit der

Reduzierung der Temperatur auf intermediäre Bereiche von 16 °C zunächst vermutlich eine Blockierung der Aktivierung des zweiten vorsporenspezifischen Sigmafaktors SigG zu verzeichnen war. Während bei dieser Temperatur mit Hilfe der Reporterfusionen noch eine Aktivierung der ersten beiden sporulationspezifischen Sigmafaktoren SigF und SigE nachzuweisen war, verhinderte die weitere Reduzierung der Temperatur auf 13 °C auch die Expression des SigF- und SigE-Regulons. Diese Befunde deuten an, dass mit der Absenkung der Wachstumstemperatur zuerst bei 16 °C die späte sporulationspezifische Genexpression unterdrückt wird und bei noch tieferen Temperaturen (<13 °C) die Initiation der Sporulation verhindert wird. Die Erkenntnis, dass die Sporulation bei niedrigen Temperaturen unterdrückt wird, ist ökophysiologisch interessant und es wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, zu klären, welche adaptiven Reaktionen für ein Überleben von *Bacillus*-Arten im Boden bei niedrigen Temperaturen bedeutsam sind.

Der dritte Teil der Arbeit war der Charakterisierung des *Bacillus amyloliquefaciens* Stammes FZB42 gewidmet, der die Fähigkeit besitzt, das Wachstum von Pflanzen zu fördern. Zunächst wurde gezeigt, dass auch in diesem Stamm die Sporulation bei niedrigen Temperaturen unterbunden ist. Weiterhin wurde eine erste orientierende Proteomkarte für diesen Stamm erstellt und der Einfluss verschiedener Umweltstimuli (Hitze, Salz, Ethanol, Nährstofflimitation, Kälte) auf das Proteinsynthesemuster dieses Stammes untersucht.

2. Einleitung

Bacillus subtilis ist ein Gram-positives apathogenes Bakterium, das im Jahr 1816 von Ehrlich als *Vibrio subtilis* entdeckt und nach der Beschreibung des Genus *Bacillus* von Chon im Jahr 1875 in *Bacillus subtilis* umbenannt wurde. Das Bakterium besiedelt die oberen Bodenschichten, gelangt aber über Oberflächenwasser auch in Brackwasser und Küstengewässer. *Bacillus*-Arten sind ebenfalls im Rhizosphärenboden anzutreffen. Einige Stämme dieses Organismus besitzen die Fähigkeit, Pflanzenwachstum zu fördern, indem sie wachstumsfördernde Pflanzenhormone wie Gibberellin und Indolylessigsäure (Broadbent et al., 1977; Turner & Beckmann 1991) sowie Peptide mit antifungalen Eigenschaften (Marten et al., 1999; Vandemark, 1995) bilden. Mittlerweile werden Stämme des Bakteriums kommerziell von Firmen wie Kodiak und Bayer zur Förderung des Pflanzenwachstums eingesetzt. *Bacillus subtilis* ist nicht nur ein Modellobjekt für die Grundlagenforschung, sondern besitzt auch erhebliche Bedeutung für biotechnologische Anwendungen. So werden industriell z. B. Enzyme wie β -Glucanase, Glutaminase und Metalloprotease mit Hilfe dieses Bakteriums hergestellt (Priest, 1989).

Die in seinem natürlichen Habitat auftretenden schwierigen Überlebensbedingungen beeinflussen das Wachstum von *B. subtilis* und führen dazu, dass sich *B. subtilis* im Boden meistens nur sehr langsam vermehrt oder das Wachstum gänzlich verhindert wird. Während *B. subtilis* unter Laborbedingungen in Vollmedium bei optimaler Temperatur, Nährstoff- und Sauerstoffversorgung eine Verdopplungszeit von 20-30 min erreicht, braucht das Bakterium im Boden dagegen 50 bis 100 Stunden für einen Vermehrungszyklus. *Bacillus subtilis* verfügt daher wie alle anderen Bakterien über ein ganzes Netzwerk von Adaptationsmechanismen, die eine Anpassung an extreme äußere Umweltbedingungen ermöglichen. Die Sporulation gilt als eine für Bodenmikroorganismen typische Adaptationsreaktion auf Nährstoffhunger.

Viele Gram-positive Bakterien sind dazu fähig, bei extremen Nährstofflimitationen Endosporen zu bilden. Verbessern sich aber die äußeren Umweltbedingungen, so keimen die Sporen innerhalb kurzer Zeit aus und bilden neue vegetative Zellen. Die Sporenbildung erfordert einen hohen Energieaufwand. Um den Sporulationsvorgang zunächst zu umgehen und damit die dazugehörige Energie zu sparen, nutzt das Bakterium andere Anpassungsmechanismen, die ihm bei diesen widrigen Bedingungen ein Überleben erlauben. Eine offensive Reaktion stellt die Produktion von Exoenzymen dar, die die Nutzung von alternativen Substanzen ermöglichen. Zu den offensiven Reaktionen gehört weiterhin die Induktion neuer Wege für die Erschließung alternativer Nährstoff- und Energiequellen

(Stickstoff oder Katabolitrepression) oder die Reaktion auf oxidativen Stress. Auf bestimmte Umweltstressarten kann *B. subtilis* mit der Bildung spezifischer Resistenzproteine reagieren. Ist das Bakterium oxidativem Stress ausgesetzt, bildet es spezifische Stressproteine, die die Zellkomponenten vor diesem Stress schützen (MgrA), oder Proteine, die die Auswirkung dieses Stresses neutralisieren (KatA), sowie Proteine, die durch diese Stressart entstandene Schäden reparieren (AhpC) (Bsat et al., 1996). Neben diesen spezifischen Stressadaptationsreaktionen hat *B. subtilis* ebenfalls die Möglichkeit, defensive Reaktionen wie die „stringent response“ oder die generelle Stressantwort zur Sicherung des Überlebens zu nutzen. Die generelle Stressantwort stellt als Reaktion auf wachstumsinhibierende Stimuli wie z. B. Hitzestress, pH-Stress, osmotischen Stress, Sauerstoffradikale oder Kältestress in *B. subtilis* eine ganz wichtige Anpassungsstrategie dar. Als globaler Regulator dieses generellen Stressregulons wurde der alternative Sigmafaktor SigB identifiziert (Völker et al., 1994; Benson und Haldenwang 1993b; Boylan et al., 1993a; Boylan et al., 1993b).

2.1. Rolle und Funktion des alternativen Sigmafaktors SigB

Die allgemeine Stressantwort wird hauptsächlich durch metabolischen und durch Umweltstress ausgelöst. Entscheidender Regulator dieser Stressantwort ist der alternative Sigmafaktor SigB. Der alternative Sigmafaktor SigB wurde schon vor etwa 25 Jahren von Haldenwang und Losick entdeckt (Haldenwang und Losick 1979, 1980). Anfang 1994 gelang es den Arbeitsgruppen von W.G. Haldenwang, M. Hecker und C.W. Price unabhängig voneinander den Nachweis zu führen, dass dieser alternative Sigmafaktor SigB in die Regulation der Genaktivität nach Einwirkung von Stressfaktoren wie Hitze, Salz, Ethanol oder Säurestress eingreift (Benson und Haldenwang, 1993c; Boylan et al., 1993a; Völker et al., 1994).

Durch verbesserte Methoden der 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit der Edman-Sequenzierung von Proteinen konnten viele generelle Stressproteine identifiziert werden (Antelmann et al., 1997; Bernhardt et al., 1997 und Völker et al., 1994). Allerdings sind nicht alle generellen Stressproteine SigB-abhängig. Eine kleine Gruppe von Proteinen zeigt auch in der SigB-Mutante eine Induktion bei Salz und Hitzeschock. Zu dieser Gruppe gehören die Proteaseuntereinheiten ClpC (Krüger et al., 1994), ClpP und ClpX (Gerth et al., 1996, 1998), die Alkylhydroperoxide-Reduktase AhpCF (Antelmann et al., 1996) und das Thioredoxin TrxA (Scharf et al., 1998). Diese Proteine werden den Klassen III und IV der

Hitzeschockproteine in *B. subtilis* zugeordnet, während die SigB-abhängigen generellen Stressproteine die Hitzeschockproteine der Klasse II bilden.

Die Stressinduktion der Hitzeschockproteine der Klasse III (ClpP und ClpE sowie ClpC-Operon) wird vom Repressor CtsR kontrolliert (Derre et al., 1999; Krüger et al., 1998). Die Stressinduktion der Gene der Klasse IV ist bisher nicht aufgeklärt, erfolgt aber unabhängig von den Regulatoren HrcA, CtsR und SigB.

2.2. Funktion der generellen Stressproteine in *B. subtilis*

Unter Laborbedingungen wurden schon detaillierte Studien zum Verhalten von Wildtypzellen und der *sigB*-Mutante nach Einwirkung von verschiedenen Stimuli wie Hitze-, Ethanol- und Salzstress ausgeführt. In Abwesenheit von physikalischem Stress oder nach mildem Stress besitzen Wildtypbakterien gegenüber *sigB*-Mutanten, die die generellen Stressproteine nicht mehr induzieren, keinen Überlebensvorteil. In glukoselimitierten Chemostaten verdrängte die *sigB*-Mutante bei niedrigen Wachstumsraten in Abwesenheit von zusätzlichem Stress sogar den Wildtyp, weil dieser vermutlich einen signifikanten Teil seiner Synthesekapazität für die Bildung von generellen Stressproteinen verschwendete (Schweder et al., 1999).

Die SigB-abhängige generelle Stressantwort gewinnt jedoch entscheidend an Bedeutung, wenn vegetative, nicht-sporulierte Zellen mit strengem, wachstumsverhinderndem Stress konfrontiert sind. Besonders deutlich wird dieser Effekt nach einer Präadaptation mit mildem Stress. Es ist dabei unerheblich, ob die Präadaptation mit dem gleichen Stress oder andersartigem Stress ausgeführt wird. Vergleicht man nun die Stressresistenz präadaptierter Wildtypzellen und der *sigB*-Mutante, so stellt man fest, dass der Wildtyp extremen Hitzeschock (54 °C), Salzstress (10 %) oder Ethanolstress (10 %) bis zu 1000-fach besser überlebt (Völker et al., 1999). Ähnlich schützende Effekte der SigB-Antwort konnte man auch für die Anpassung an oxidativen Stress (Engelmann und Hecker, 1996), wiederholtes Einfrieren und Auftauen (Völker et al., 1999) sowie die Ausbildung einer Resistenz von Zellen der stationären Phase gegen Alkalischock (Gaidenko und Price, 1998) nachweisen.

Unter Laborbedingungen stattet die Expression des SigB-abhängigen generellen Stressregulons demzufolge nichtwachsende, vegetative *Bacillus*-Zellen mit einer multiplen, vorsorglichen und unspezifischen Stressresistenz aus (Hecker und Völker, 2001; Price, 2000). Diese Antwort sorgt einerseits für Schutz vor akutem Stress und bereitet die Zellen andererseits auf die Auseinandersetzung mit Stressfaktoren vor, mit denen sie potentiell im Verlauf der Nichtwachstumsphase konfrontiert werden könnte (Hecker und Völker, 2001).

Die Stressproteine können in die folgenden Gruppen unterteilt werden (Hecker et al., 1996; Hecker und Völker, 2001; Price, 2000):

Stressabhängige Proteasen / ATPasen => ClpC und ClpP

Proteine, die zum Schutz vor oxidativem Stress dienen => Katalasen KatE und KatX, das Chaperon ClpC, Thioredoxin TrxA und Dps

Proteine, die der Adaptation an osmotischen bzw. Wasserstress dienen => Prolintransporter OpuE, der die Nutzung von Prolin als osmotische Schutzsubstanz in *B. subtilis* ermöglicht (von Blohn et al., 1997); weiterhin OpuD und vermutlich GsiB, das Ähnlichkeiten zu Austrocknungsschutzproteinen von Pflanzen zeigt (Maul, 1998; Stacy und Aalen, 1998).

Proteine mit bekannter Funktion, deren Rolle in der Stressadaptation unklar ist => GtaB, NadC, NadE und GdhII

Proteine, die keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweisen.

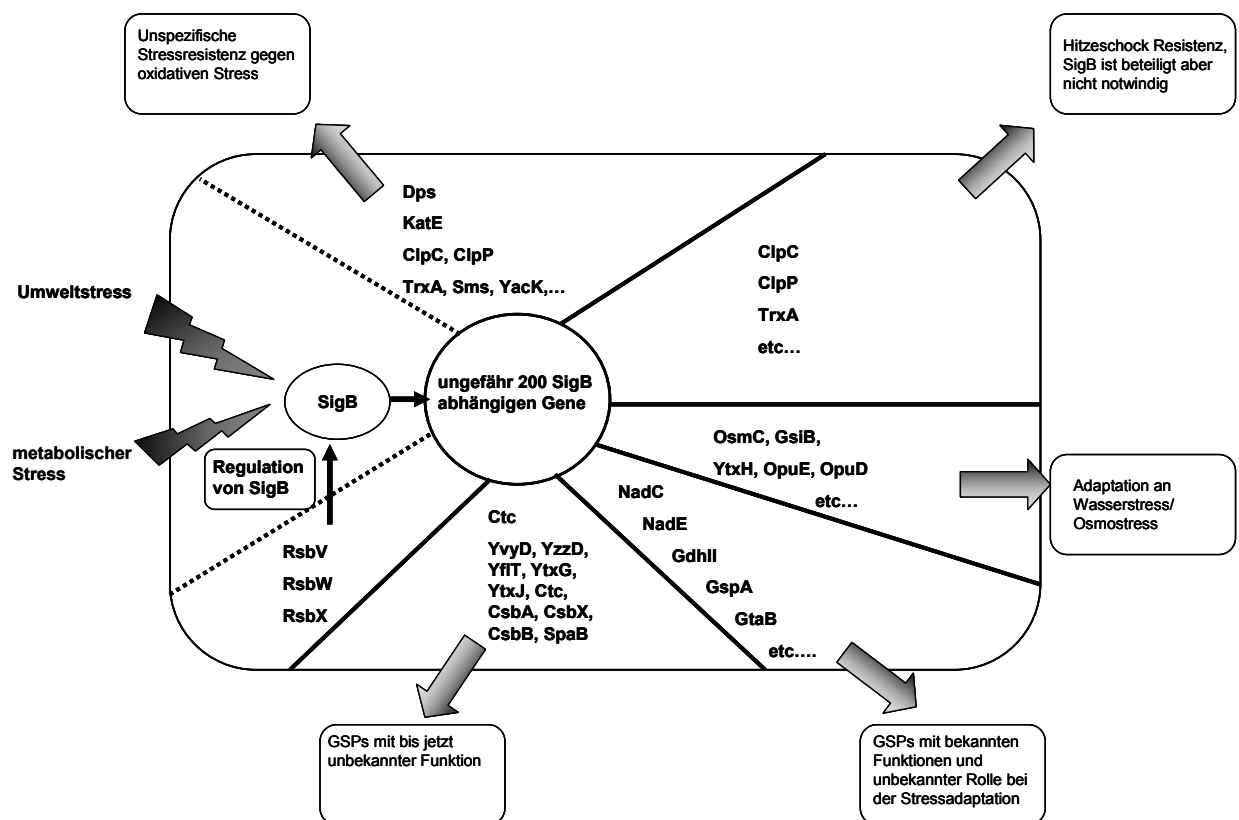


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Funktion SigB-abhängig induzierter genereller Stressproteine (modifiziert nach M. Hecker und U. Völker, 1998).

2.3. Struktur des *sigB*-Operons

Im Jahre 1979 wurde SigB in *Bacillus subtilis* als erster alternativer Sigmafaktor in Bakterien von Haldenwang und Losick entdeckt (Haldenwang und Losick, 1979, 1980). Der Sigmafaktor SigB wird vom siebten Gen des *sigB*-Operons kodiert, welches neben *sigB* sieben weitere Gene enthält (Kalman et al., 1990; Wise und Price, 1995). Die weiteren Gene des Operons (*rsbR*, *rsbT*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, und *rsbX*) kodieren Regulatoren der Aktivität des alternativen Sigmafaktors SigB (Abb. 2). Ein vegetativer Promoter (P_A) am Beginn des Operons, welcher von dem vegetativen Sigmafaktor SigA erkannt wird, sorgt für die Expression eines geringen Basalniveaus aller acht Proteine. Ein zweiter, SigB-abhängiger Promoter in der Mitte des Operons ermöglicht die verstärkte Transkription der Gene *rsbV*, *rsbW*, *sigB* und *rsbX* bei Stress und Hunger und damit die Autoregulation von SigB (Kalman et al., 1999; Wise et al., 1995; Boylan et al., 1993; Benson und Haldenwang, 1993; Boylan et al., 1993; und Völker et al., 1995).

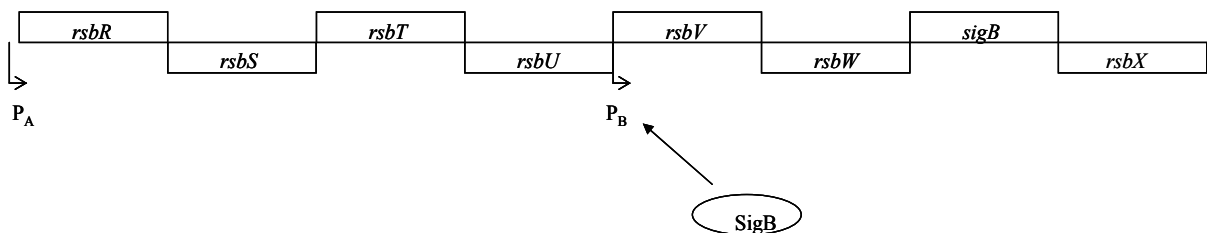


Abb. 2: Struktur des *sigB*-Operons. Der alternative Sigmafaktor SigB wird vom siebten Gen des Operons kodiert. Die weiteren Gene kodieren für Regulatoren der Aktivität des Sigmafaktors. Das Operon steht unter Kontrolle des vegetativen Sigmafaktors SigA (Promotor P_A). Eine erhöhte Expression der Gene *rsbV*, *rsbW*, *sigB* und *rsbX* bei Nährstoffmangel und Stress wird durch den SigB-abhängigen Promotor (P_B) ermöglicht.

Die Aktivität von SigB wird durch eine große Zahl von Regulationsproteinen reguliert, wobei viele Protein-Protein-Interaktionen in dieser Regulationskaskade mittels Serin- und Threonin-Phosphorylierung gesteuert werden (Haldenwang et al., 1995; Price et al., 2000). Unter exponentiellen Wachstumsbedingungen ist SigB durch die Bindung an den Anti-Sigmafaktor RsbW inaktiv (Benson und Haldenwang, 1993a). Diese Bindung kann unter Stress oder Energiemangelbedingungen durch den Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV aufgehoben werden (Dufour und Haldenwang, 1994; Völker, 1995).

Da RsbW entweder mit SigB oder RsbV, aber nicht mit beiden zeitgleich einen stabilen Komplex bilden kann, wechselt RsbW nach Stresseinwirkung aus der SigB-Bindung zu RsbV und der freigesetzte Sigmafaktor SigB kann dann an die Core-RNA-Polymerase binden (Benson und Haldenwang, 1993a). Ob ein RsbV/RsbW oder ein RsbW/SigB Komplex

vorliegt, hängt entscheidend von der posttranslationalen Modifikation von RsbV ab (Alper et al., 1996; Dufour und Haldenwang, 1994; Yang et al., 1996; Delumeau et al., 2002).

Das Regulationsprotein RsbW wirkt jedoch nicht nur als Anti-Sigmafaktor, sondern auch als RsbV-Kinase. Phosphoryliertes RsbV ist infolge veränderter Konformation nicht zur Bindung an RsbW fähig und deshalb inaktiv (Dufour und Haldenwang, 1994; Delumeau et al., 2002). Die Freisetzung von SigB und folglich die Expression des gesamten Stressregulons wird somit über das Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem RsbV reguliert (Abb. 3).

Bei Umweltstress, wie z. B. Hitzeschock, Salz, Säure und Ethanolstress (Völker et al., 1995b), kann SigB über die Phosphatase RsbU, deren spezifisches Substrat RsbV~P ist, induziert werden. RsbU ist in exponentiell wachsenden Zellen inaktiv und wird erst durch die Bindung des „switching“ Proteins RsbT aktiv. In Abwesenheit von Stress bleibt RsbT an das RsbS-Protein gebunden und RsbU bleibt inaktiv. RsbS bildet mit RsbR einen hochmolaren RsbS:RsbR Komplex, der RsbT bindet und somit die Aktivierung von RsbU durch RsbT verhindert (Chen et al., 2003). Nach Einwirkung von Umweltstress wird RsbS spezifisch durch RsbT phosphoryliert, welches dadurch frei wird. RsbT kann dann als Aktivator an RsbU binden. Das Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem RsbS wird außerdem auch durch die Phosphatase RsbX beeinflusst, welche RsbS dephosphoryliert. RsbX bewirkt als „Feedback-Inhibitor“ durch die Dephosphorylierung von RsbS einerseits, dass die Antwort transient ist, andererseits wird die Stärke der Antwort begrenzt (Smirnova et al., 1998, Völker et al., 1997). Die SigB-Antwort erreicht nach 10-40 Minuten ein Maximum und fällt dann auf das Basalniveau zurück (Boylan et al., 1993a; Maul et al., 1995; Völker et al., 1995b).

Die Aktivierung von SigB nach metabolischem Stress erfolgt über das RsbP-Protein. RsbP wird mit RsbQ in einem *rsbPQ*-Operon kodiert, dessen Promotor noch nicht bekannt ist. RsbP besitzt neben der carboxyterminalen Phosphatasedomäne eine aminoterminal PAS-Domäne, von der angenommen wird, dass mindestens ein Rest essentiell für die Antwort auf Energiestress ist. Ebenso ist die katalytische Aktivität von RsbQ essentiell für die Antwort auf Energiestress. Brody et al., 2001 sind der Meinung, dass RsbQ durch seine katalytische Aktivität eine Konformationsänderung in RsbP von der inaktiven zur aktiven Form bewirkt (Abb. 3).

produziert einen Sporenmantel (Coat), der an die äußere Membran der Vorspore angelagert wird. Nach Vollendung des Sporulationsprogramms lysiert die Mutterzelle und gibt die Spore frei (Abb. 4).

Die Position der Endospore variiert von zentral bis terminal, wobei stets nur eine Spore gebildet wird. Die Spore kann zentral (*B. megaterium*), zylindrisch (*B. subtilis*) oder terminal und rund kugelförmig (*B. sphaericus*) sein.

Im Cytoplasma der Vorspore werden „small acid-soluble spore“ Proteine (SASP) gebildet. Diese Proteine tragen zur Ausprägung der Resistenzeigenschaften der Spore bei (Setlow et al. 1995). Mit ihrer Bindung an das Sporechromosom führen sie zu dessen Kondensierung und somit zur Resistenz gegen UV-Strahlung. SASP dienen auch als Kohlenstoff- bzw. Energiespeicher, der beim Auskeimen der Spore genutzt wird.

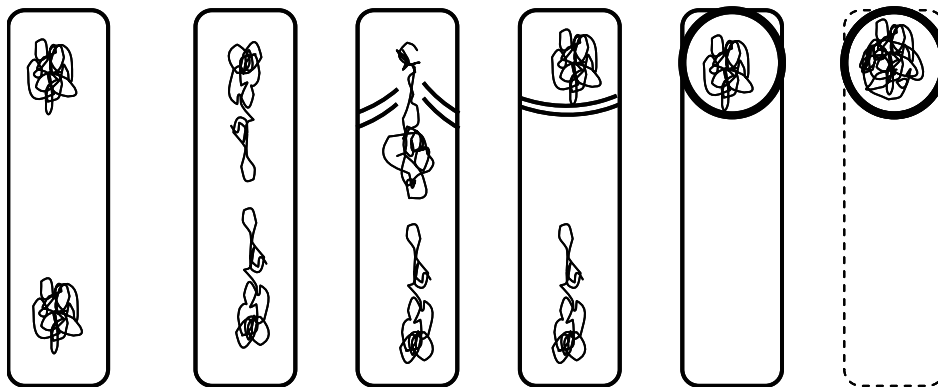


Abb. 4: Schematische Darstellung der Entstehung einer Spore.

2.5. Regulation der Initiation der Sporulation

Um die Initiation der Sporulation in Gang zu setzen, ist eine Reihe von Signalen erforderlich. Zu diesen gehören Signale aus dem Krebs-Zyklus, solche über den Grad der DNA-Schädigung, Zelldichtesignale und Signale, die auf Nährstofflimitation hinweisen.

Mangel an Kohlenstoff-, Phosphat-, und Stickstoffquellen induzieren die Sporulation vermutlich über eine Reduzierung des intrazellulären GTP-Spiegels. Die Konzentration an GTP und GDP fällt in sporulierenden Zellen ab. Signale wie eine hohe Zelldichte und ein intakter Krebs-Zyklus wirken stimulierend auf die Initiation der Sporulation. Inhibition der Replikation der DNA bzw. DNA-Schäden wirken dagegen hemmend auf die Sporulation.

Das Schlüsselement bei der Initiation der Sporulation ist der zentrale Transkriptionsregulator Spo0A. Spo0A greift jedoch nicht nur in die Regulation der Expression von Sporulationsgenen ein, sondern reguliert auch eine Vielzahl nicht mit der Sporulation verbundener Gene der stationären Phase. Spo0A kann z. B. die Transkription des „Transition-state-regulator“ AbrB hemmen. AbrB verhindert während des exponentiellen Wachstums die Expression von Genen, die gewöhnlich erst in der stationären Phase oder der frühen Phase der Sporulation transkribiert werden. Durch die Hemmung von AbrB durch Spo0A kann dann die Produktion der charakteristischen Proteine der stationären Phase beginnen (Hoch et al., 1993).

Die Initiation der Sporulation in *B. subtilis* ist von der Phosphorylierung des Transkriptionsregulators Spo0A abhängig (Abb. 5). Die Sporulation wird demnach über das Spo0A-Phosphorelay reguliert. Die Phosphorylierung eines Aspartatrestes am N-terminalen Ende überführt Spo0A in seine aktive Form Spo0A~P. An der Regulation der intrazellulären Spo0A~P-Konzentration sind viele Faktoren und Signale beteiligt. Viele dieser Signale spielen eine positive, manche jedoch eine negative Rolle im Phosphorelay. Als Folge der Wahrnehmung von Sporulationssignalen durch die Sensor-Kinasen KinA, KinB und KinC werden diese aktiv und phosphorylieren zunächst die Phosphattransferase Spo0F. Schon nach diesem Schritt tritt ein erster Kontrollmechanismus ins Licht: Die spezifischen Phosphatasen RapA und RapB können das soeben gebildete Spo0F~P dephosphorylieren und das vermeintliche Sporulationssignal kompensieren. Das Peptidhormon CSF dagegen, das bei hoher Zelldichte im Medium akkumuliert, inhibiert die Phosphatasen und verhindert so die Dephosphorylierung von Spo0F~P, so dass Spo0F~P die Phosphatgruppe über die Phosphoproteinphosphotransferase Spo0B schließlich an Spo0A weitergeben kann (Lazazzera und Grossman, 1998). Aber auch bei diesem Schritt kann ein zweiter Kontrollmechanismus auftreten. Ein kompetitiver Inhibitor Spo0A-N kann dann die Sporulation hemmen, indem er mit Spo0A um die Phosphorylierung durch Spo0B konkurriert. Voraussetzung für die hemmende Wirkung des Spo0A-N auf die Sporulation ist seine Expression in der Mutterzelle. Wird Spo0A-N in der Vorspore exprimiert, spielt er keine regulatorische Rolle bei dem Phosphorelay (Fujita und Losick, 2003). Ein dritter Kontrollmechanismus beruht auf der Modulierung der Spo0A~P Menge durch die Phosphatase Spo0E, die spezifisch Spo0A~P dephosphorylieren kann.

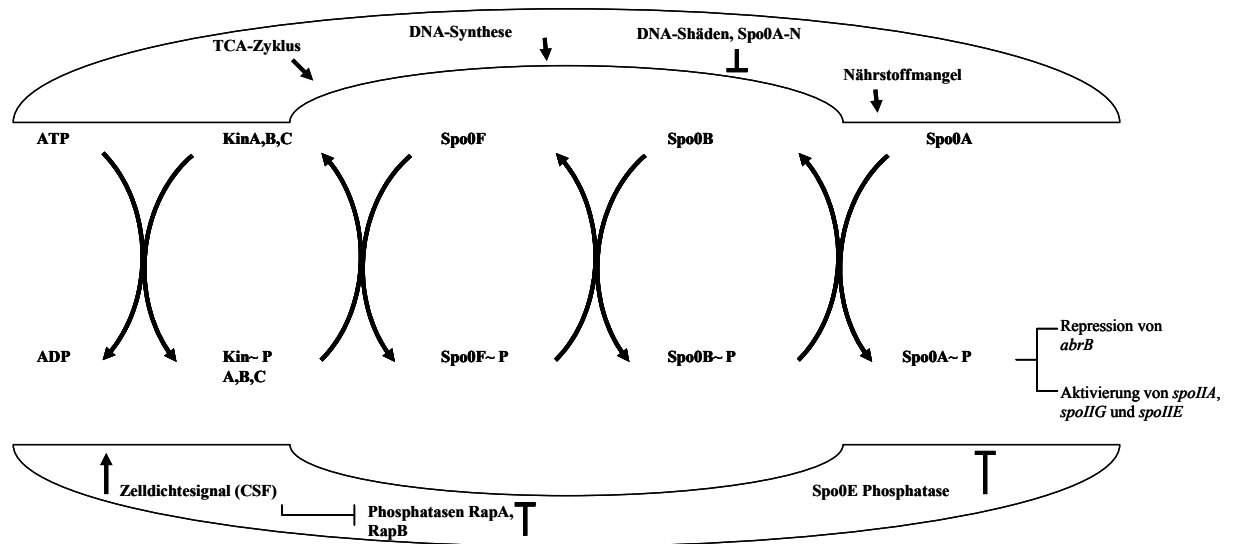


Abb. 5: Spo0A-Phosphorelay zur Regulation der Spo0A~P-Konzentration. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Faktoren und Signale, die an der Regulation der Spo0A~P Konzentration beteiligt sind. Pfeile mit Spitze (↑) bedeuten Aktivierung, Pfeile mit Barren (⊥) bedeuten Inhibition.

Die Akkumulation von Spo0A~P leitet die Sporulation ein und erlaubt im Zusammenspiel mit dem vegetativen Sigmafaktor SigA oder dem alternativen Sigmafaktor SigH eine sporulationsspezifische Genexpression. Die Expression des *spoIIE*-Gens sowie der *spoIIG*- und *spoIIA*-Operons ist dabei entscheidend, da deren Produkte in die räumliche und zeitliche Steuerung der Genexpression während der Sporulation eingreifen (Abb. 6).

Für die unterschiedliche Entwicklung der beiden Kompartimente sorgt eine differentielle Genexpression. Diese wird durch die kompartimentspezifischen Sigmafaktoren erreicht. In der Vorspore sind nacheinander SigF und SigG aktiv. Die Expression in der Mutterzelle wird zunächst durch SigE und danach durch SigK reguliert. Die Aktivierung der Sigmafaktoren in den beiden Kompartimenten beruht auf einer Kommunikation zwischen Vorspore und Sporenmutterzelle, die auch „Criss-Cross-Regulation“ genannt wird (Losick und Stragier, 1992).

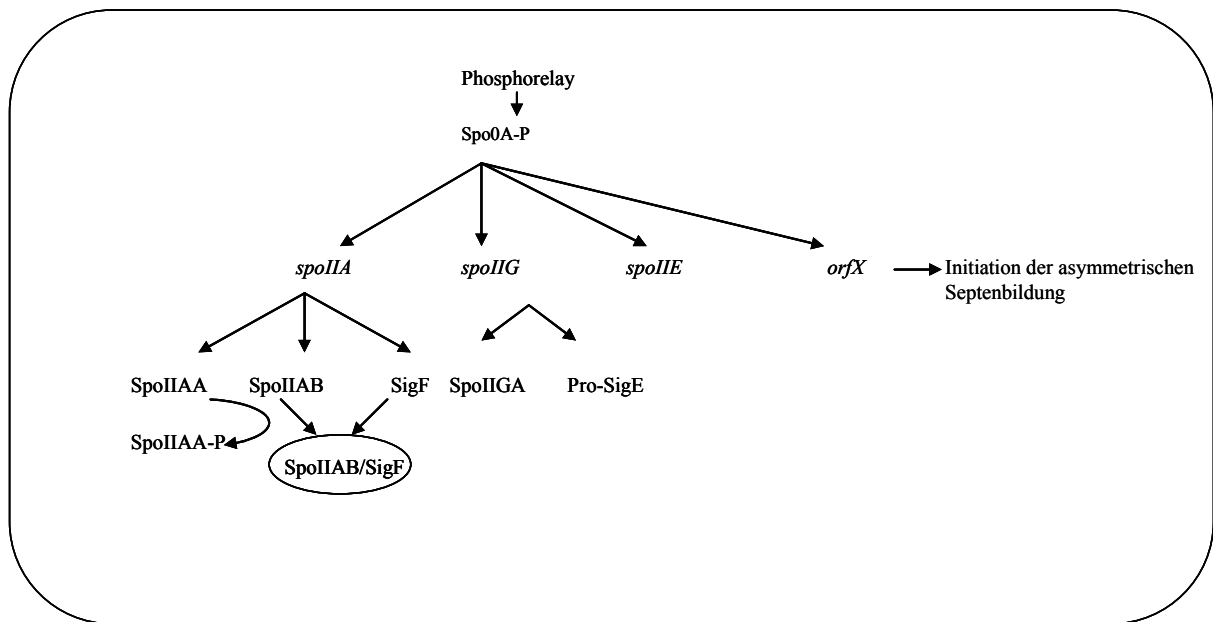


Abb. 6: Spo0A~P-abhängige Genexpression während der Initiation der Sporulation. Spo0A~P, das Ausgabesignal des Phosphorelays, führt zur Expression des spoIIE-Gens, des spoIIA- und des spoIIG-Operons. Es kommt zur Bildung von SigF, welches zunächst vor der Septenbildung durch den Anti-Sigmafaktor SpoIIAB in einem Komplex inaktiv gehalten wird. Die Phosphorylierung des Anti-Anti-Sigmafaktors SpoIIAA durch SpoIIAB führt zur Akkumulation von SpoIIAA~P. SpoIIE, Pro-SigE und die Protease SpoIIGA sind ebenfalls schon vor der Septumbildung vorhanden, aber inaktiv. Die Ausbildung des FtsZ-Rings ist essentiell für die Septumbildung. Ein noch nicht identifiziertes Spo0A-abhängig synthetisiertes Protein (ORF X) sorgt für die Lokalisierung des FtsZ-Rings in der Nähe der Zellpole. Dadurch wird die Bildung des asymmetrischen Septums eingeleitet.

Der erste Sigmafaktor, der im Laufe der Sporulation in der Vorspore aktiviert wird, ist der Sigmafaktor SigF. Das *spoIIA*-Operon wird vor der Bildung des Septums transkribiert und umfasst die Gene *spoIIAA*, *spoIIAB* und *spoIIAC*. Der Sigmafaktor SigF (*spoIIAC*-Produkt) wird zuerst durch den Anti-Sigmafaktor SpoIIAB blockiert. Die Bindung beider Proteine erfordert ATP und als Folge der Blockierung von SigF bleiben SigF abhängige Gene stumm (Duncan et al., 1996; Magnin et al., 1997). Der Anti-Anti-Sigmafaktor SpoIIAA wird für die Freilassung von SigF benötigt. Vor der Bildung des Septums wird SpoIIAA durch die SpoIIAB-Kinaseaktivität phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Alper et al., 1994; Min et al., 1993). Nach der Bildung des Septums wird die SpoIIAA~P-Phosphatase SpoIIE aktiviert. Diese Phosphatase sorgt für neues, unphosphoryliertes SpoIIAA, welches dann einen Komplex mit dem SpoIIAB bildet und lässt somit SigF frei (Arigoni et al., 1995; Pogliano et al., 1997). SigF bindet an die Core-RNA-Polymerase und führt damit zur Transkription des SigF-Regulons in der Vorspore. In der Mutterzelle bleibt die Expression des SigF-Regulons aus, da SigF immer noch im Komplex mit SpoIIAB vorliegt.

Mit der detaillierten Beantwortung der Frage, wie eine geringere Aktivität von SpoIIAB in der Vorspore erreicht wird, haben sich die Arbeitsgruppen von R. Losick und M. Yudkin beschäftigt. Beide Gruppen schlagen sehr ähnliche Modelle für die Regulation der SigF-Aktivität vor, die sich nur in Teilkomponenten unterscheiden.

Modell 1 (Pan et al., 2001): Die Gene für *sigF*, *spoIIAA* und *spoIIAB* liegen in einer Region des Chromosoms, welche zuletzt in die Vorspore transportiert wird. SpoIIAB kann zwar in Mutterzelle und Spore gleichermaßen durch die ClpC-Protease abgebaut werden (Pan et al., 2000), in der Vorspore kann aber durch die „transiente genetische Asymmetrie“ kein SpoIIAB nachgebildet werden, um das abgebaute SpoIIAB zu ersetzen (Dworkin und Losick, 2001). Somit verringert sich die Menge des negativen Regulators durch diesen Effekt spezifisch in der Vorspore. Verstärkt wird dieser Effekt dadurch, dass SpoIIAB in der Vorspore in einem stabilen SpoIIAA/SpoIIAB-Komplex gefangen wird. Vor der Synthese des Septums hält SpoIIAB den Sigmafaktor SigF in einem SigF/SpoIIAB-ATP-Komplex inaktiv. Durch eine Reaktion von SpoIIAA mit diesem Komplex wird ein SpoIIAA~P gebildet. Die Umwandlung von ATP in ADP erzeugt eine Konformationsänderung bei SpoIIAB, so dass SpoIIAB SigF nicht mehr binden kann. Dabei erhöht ADP die Affinität von SpoIIAB zu einem weiteren Molekül SpoIIAA, was zu einem langlebigen SpoIIAA/SpoIIAB-ADP-Komplex führt (Abb. 7). Beide Phänomene gemeinsam bewirken die Freilassung von SigF und damit die Expression des SigF-Regulons.

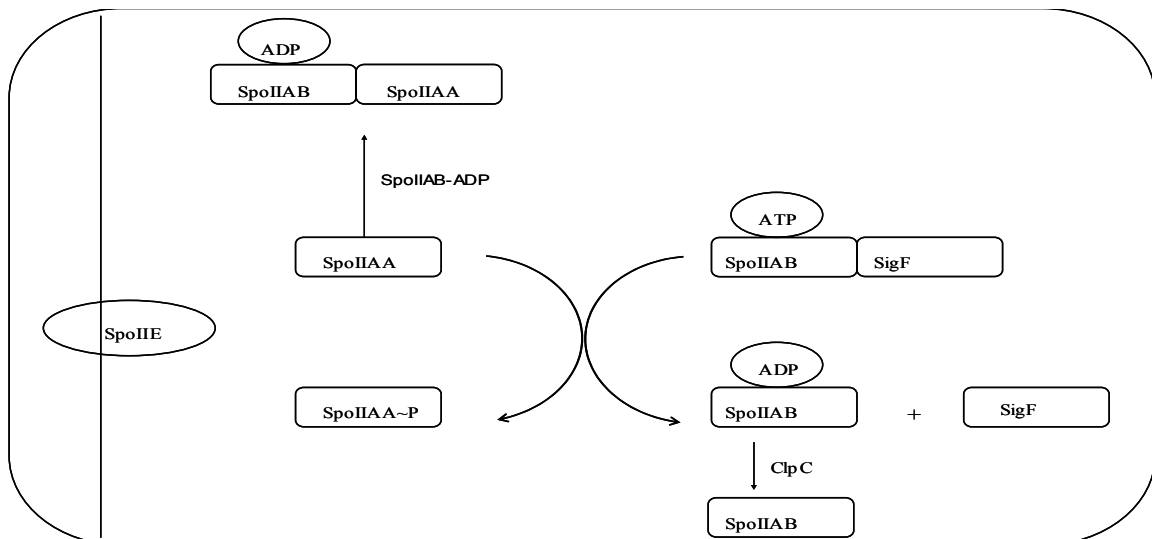


Abb. 7: Modell der SigF-Regulation (Pan et al., 2001)

Modell 2. Yudkin und Mitarbeiter (Lee et al., 2000): Sie konnten zeigen, dass die Affinität von SpoIIAB zu ATP und ADP gleich hoch ist und schlugen folgendes Modell für die

Regulation von SigF durch Phosphorylierung von SpoIIAA vor: Wenn ein Molekül SpoIIAB in Anwesenheit von ATP die Phosphorylierung von SpoIIAA katalysiert, entsteht neben SpoIIAA~P ein SpoIIAB-ADP-Komplex. Dieser Komplex kann wieder ein neues SpoIIAA Molekül binden und bildet dabei einen tertiären Komplex, SpoIIAA/SpoIIAB-ADP. Dieses langlebige Intermediat sorgt dafür, dass SpoIIAB nicht zur Inhibierung von SigF zur Verfügung steht (Abb. 8, Lee et al., 2000).

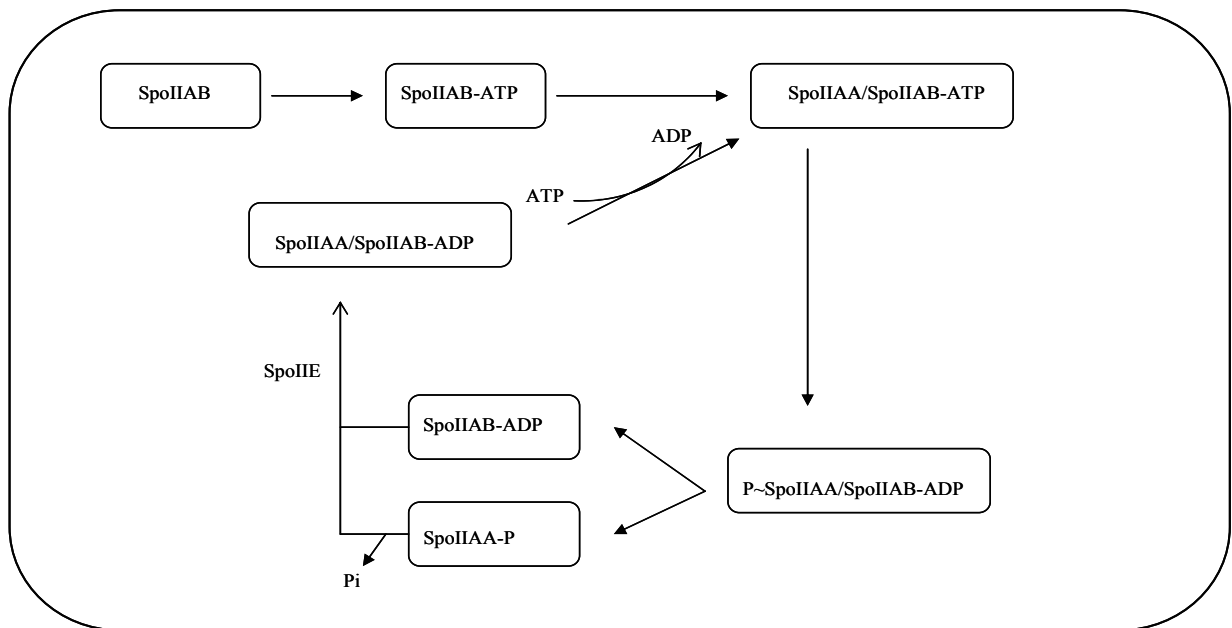


Abb. 8: Modell der SigF-Regulation (Lee et al., 2000)

Der zweite Sigmafaktor, der im Laufe der Sporulation aktiviert wird, ist der Sigmafaktor SigE. Die Aktivierung von SigE in der Mutterzelle ist an die Transkription des SigF-Regulons gekoppelt. SigE liegt zunächst als membranständiges inaktives pro-SigE Protein vor. Nach der Septumbildung steuert ein SigF abhängig synthetisiertes Protein SpoIIR (Karow et al., 1995) die Abspaltung von 27 Aminosäuren am N-Terminus von pro-SigE und zwar durch die Protease SpoIIGA und führt damit zur Aktivierung von SigE.

Bevor die Vorspore von der Mutterzelle vollständig umwachsen wurde, wird das Gen *spoIIIG* (SigG) in der Vorspore von SigF erkannt. Der Sigmafaktor SigG wird aber zuerst von dem Anti-Sigmafaktor SpoIIAB in einem Komplex inaktiv gehalten. Vermutlich ist die Proteolyse des Anti-Sigmafaktors SpoIIAB erforderlich, um SigG aus dessen Umklammerung zu befreien und die zweite Gruppe vorsporenspezifischer Gene zu exprimieren (Kirchmann et al., 1993). Der Abbau von SpoIIAB findet anscheinend erst nach der Transkription des *spoIIIA*-

Operons in der Mutterzelle statt, und ist ein weiterer Beweis für die Kommunikation zwischen den beiden Kompartimenten (Kellner et al., 1996).

Neue Experimente, die sich mit der Untersuchung der Bindung von SigG mit den Anti-Sigmafaktor SpoIIAB beschäftigen, zeigen, dass die Bindung von SpoIIAB mit dem Sigmafaktor SigG viel schwächer als die Bindung mit dem Sigmafaktor SigF ist, und dass die Menge von SpoIIAB in der Zeit, zu der SigG synthetisiert wird, klein ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass wahrscheinlich ein weiterer Mechanismus an der Regulation der SigG-Aktivität beteiligt sein muss (Evan et al., 2003).

Die späte Genexpression in der Mutterzelle ist das Resultat der Aktivierung von SigK. SigK wird erst nach der Transkription der SigG-abhängigen Gene in der Vorspore durch Prozessierung aktiviert (Stragier et al., 1995) (Abb. 9).

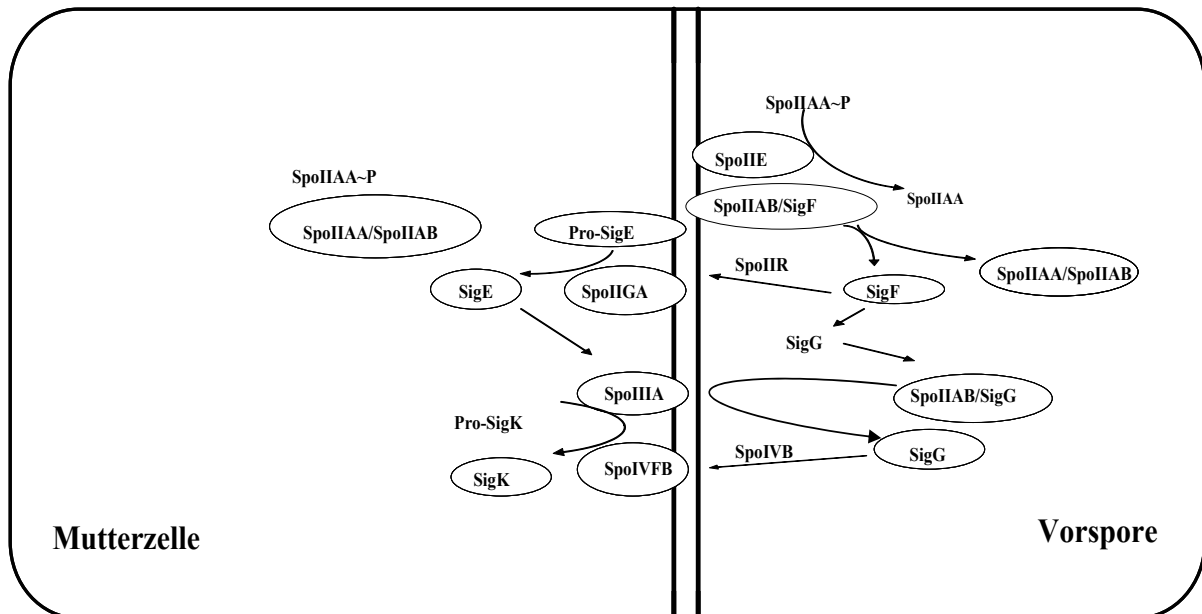


Abb. 9: Steuerung der Aktivität der Sporulations-Sigmafaktoren nach der Bildung des asymmetrischen Septums. Sowohl in der Vorspore als auch in der Sporenmutterzelle wird SigF durch den Anti-Sigmafaktor SpoIIAB in einem inaktiven Komplex gehalten. Dieser Anti-Sigmafaktor kann in der Vorspore durch den von SpoIIIE dephosphorylierten Anti-Anti-Sigmafaktor SpoIIAA in einem SpoIIAA-SpoIIAB-ADP-Komplex deaktiviert werden. Die Aktivierung von SigF in der Vorspore bewirkt die Produktion des Signalproteins SpoIIIR, das die im Septum lokalisierte Protease SpoIIIGA stimuliert. Die Protease spaltet das ebenfalls am Septum lokalisierte Pro-SigE und entlässt den aktiven Sigmafaktor SigE in die Mutterzelle. Nachdem die Vorspore von der Mutterzellmembran umhüllt wurde, wird in der Vorspore der zweite Sigmafaktor SigG aktiv. Das Gen für SigG wird unter der Kontrolle von SigF transkribiert und unterliegt zusätzlich einer positiven Autoregulation. Die Aktivierung von SigG setzt die SigE-abhängige Transkription des spoIIIA Operons in der Mutterzelle voraus. Zur Entstehung des zweiten mutterzellspezifischen Sigmafaktors SigK ist eine Umorganisation des Chromosoms der Mutterzelle notwendig, die durch das SigE-abhängige DNA-Bindeprotein SpoIIID kontrolliert wird. Es entsteht Pro-SigK, welches durch die im Septum befindliche Protease SpoIVFB in den aktiven Sigmafaktor SigK überführt wird. Die Aktivität von SpoIVFB wird durch das SigG-abhängig exprimierte Signalprotein SpoIVB aus der Vorspore kontrolliert.

2.6. *Bacillus subtilis* im Boden

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Überleben von *B. subtilis* in Bodenmikrokosmen. Der Boden stellt ein physikalisch und chemisch stark strukturiertes mikrobielles Habitat dar, welches aus festen, flüssigen und gasförmigen Anteilen besteht. Die chemische Zusammensetzung aus organischen Bestandteilen, wie Resten und Ausscheidungen von Pflanzen und Tieren und daraus gebildeten Huminstoffen, sowie anorganischen Bestandteilen, wie verschiedenen Silikaten, Tonen und anderen Mineralen, bedingt eine hohe Variabilität der verschiedenen Bodenarten und Mikrokosmen innerhalb eines Bodens (Stotzky, 1997).

Häufig werden aufgrund der Nährstoffverfügbarkeit für Bodenorganismen zwei Habitate unterschieden, zum einen undurchwurzelter Boden und zum anderem die Rhizosphäre (Van Elsas und Van Overbeek, 1993). Als Rhizosphäre bezeichnet man im Allgemeinen die Bodenzone, die durch die Pflanzenwurzel beeinflusst wird und sich von der Wurzeloberfläche bis einige Millimeter in den Boden erstreckt. Ihre Ausdehnung hängt damit von der Länge der Wurzelhaare und der Diffusivität der Pflanzenexsudate ab (Campbell und Greaves, 1990). Die Rhizosphäre ist reich an bioverfügbaren Nährstoffen, weil insbesondere mit den Pflanzenexsudaten ständig ein Gemisch verschiedener niedermolekularer Verbindungen wie Aminosäuren und Kohlenhydrate bereitgestellt wird (Lynch und Whipps, 1990). Undurchwurzelter Boden ist dagegen, wenn er nicht gedüngt wurde, arm an bioverfügbaren Nährstoffen.

Neben der Nährstoffverfügbarkeit haben physikalische Parameter wie Temperatur und Feuchtigkeit Einfluss auf das Leben von Mikroorganismen. Beide Parameter unterliegen räumlichen und zeitlichen Schwankungen und verlangen deshalb von den Mikroorganismen eine hohe Anpassungsfähigkeit.

Als natürliche Anpassungsmechanismen gegen die typische Nährstofflimitation in seiner Umgebung entwickelt *Bacillus subtilis* geeignete Abwehrmechanismen. Die Auseinandersetzung mit der für undurchwurzelten Boden beinahe typischen Nährstofflimitation hat die Ausbildung geeigneter Anpassungsmechanismen erzwungen, zu denen die Sporulation und die Synthese einer ganzen Palette von Exoenzymen zu zählen sind. Die Sporulation ist jedoch bei hoher Osmolarität, Sauerstoffknappheit und niedriger Zelldichte stark gehemmt. Unter diesen Bedingungen müssen folglich andere Strategien das Überleben von *B. subtilis* in Form vegetativer Zellen sichern. Beispielsweise könnte dabei das eben diskutierte, mehr als 150 Gene umfassende SigB-abhängige, generelle Stressregulon

eine Rolle spielen, da es nichtwachsende Zellen mit einer unspezifischen, multiplen und vorsorglichen Stressresistenz ausrüstet. Im Gegensatz zu den detaillierten Untersuchungen, die für *B. subtilis* unter Laborbedingungen ausgeführt wurden, liegen zu Wachstum und Vermehrung von Bacillusarten im natürlichen Habitat Boden nur sehr begrenzte Kenntnisse vor. Selbst so entscheidende Fragen, wo und wann im Boden überhaupt wirkliche Vermehrung vorkommt, sind bisher nicht beantwortet. Um den Beitrag von Sporulation und genereller Stressantwort zum Überleben im Boden näher zu beleuchten, wurde im Laufe der Doktorarbeit von Frau Kuhnke und meiner Diplomarbeit das Überdauern eines prototrophen Wildtypstammes und seiner isogenen *sigB*-Mutante im Bodenmikrokosmen beobachtet.

Mit dem Vergleich der Proteinsynthesprofile eines Laborstammes und von aus verschiedenen natürlichen Habitaten isolierten *Bacillus*-Wildstämmen gelang Frau Kuhnke der Nachweis, dass die generelle Stressantwort in allen untersuchten Stämmen konserviert ist (Kuhnke, 2000). Bei einer Inkubation in Grünlandboden bei 28 °C zeigte der Wildtypstamm nur ein geringfügig besseres Überleben als die *sigB*-Mutante (2-4fach, Abb. 10A, Bashir, 2001). Auch eine Vorinkubation bei 48 °C, die im Wildtyp eine Akkumulation von generellen Stressproteinen auslöst, vergrößerte den Unterschied zwischen Wildtyp und *sigB*-Mutante nur unwesentlich (8fach, Abb. 10B, Bashir, 2001). Beide Stämme sporulierten gleichermaßen innerhalb von 2-3 Tagen und überlebten dauerhaft in Form von Sporen. Eine Abschätzung der Rolle der generellen Stressantwort und der Sporulation bei Inkubation im Boden bei niedrigen Temperaturen (4 °C) schien ökophysiologisch interessant, da in Mitteleuropa im Verlauf eines Jahres solche Temperaturen vorkommen. Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Professor E. Bremer (Marburg) durchgeführte Proteomanalysen von *Bacillus*-Kulturen, die bei niedriger Temperatur (15 °C) kultiviert wurden, zeigten eine kontinuierliche Expression des SigB-abhängigen generellen Stressregulons (Brigulla et al., 2003). Es erschien deshalb lohnenswert, das Überleben von Wildtypzellen und *sigB*-Mutanten bei niedriger Temperatur vergleichend zu untersuchen. Diese Serie von Experimenten lieferte zunächst den überraschenden Befund, dass *B. subtilis* bei Inkubation im Boden bei 4 °C nicht mehr sporulieren konnte. Die Sporulationsfrequenz lag mindestens um den Faktor 100 niedriger als bei 37 °C. Zunächst wurde jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und *sigB*-Mutante deutlich (Abb. 10C, Bashir, 2001). Die Präadaptation der Zellen bei 48 °C für 30 min zeigte jedoch drastische Auswirkungen auf das Überleben von Wildtypzellen gegenüber der *sigB*- Mutante. Die *sigB*-Mutante tolerierte diese Vorinkubation wesentlich schlechter als der Wildtyp (Abb. 10D, Bashir, 2001). Folglich schien es gerechtfertigt, die Hypothese aufzustellen, dass die generelle

Stressantwort vermutlich auch im natürlichen Habitat zum Überdauern von *B. subtilis* in Form vegetativer Zellen beiträgt.

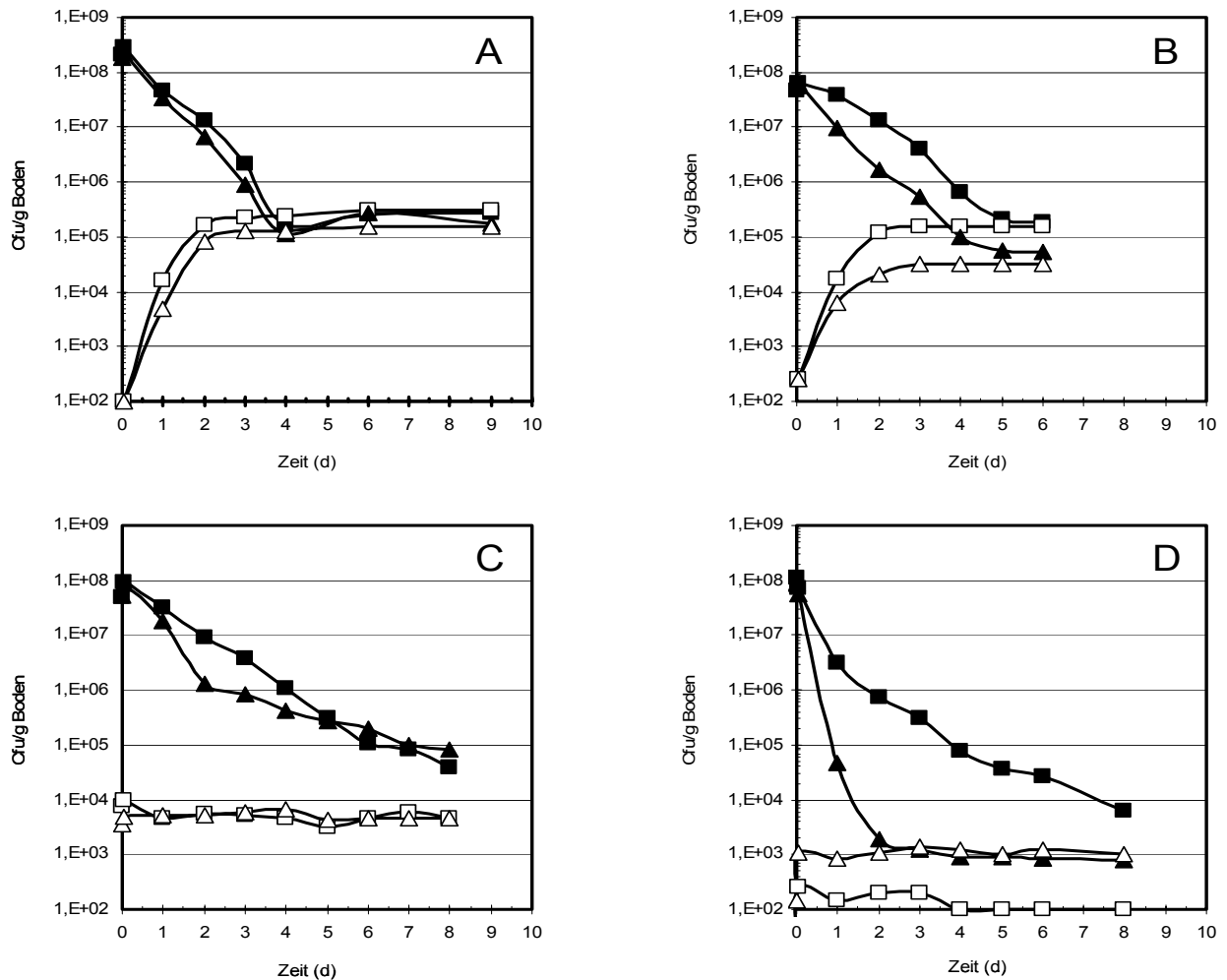


Abb. 10: Überleben und Sporulation von *B. subtilis* in Grünlandboden bei 28 °C, ohne Präadaptation (A), mit Präadaptation durch milden Hitzeschock (B) und bei 4 °C ohne Präadaptation (C) sowie mit Präadaptation durch milden Hitzeschock (D). Der Wildtypstamm BSM88 und die isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden bei 37 °C in Minimalmedium mit ÜN-Supplementation kultiviert, in der exponentiellen Phase durch Zentrifugation geerntet, mit PBS gewaschen sowie in PBS aufgenommen. Die Bodenmikrokosmen wurden mit einem Gemisch aus Zellen beider Stämme beimpft und bei 28 °C kultiviert. Es wurde eine Bodenfeuchte von 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Die Zellzahl wurde nach Extraktion der Bakterien aus dem Boden durch Plattieren auf LB-Agar mit Kanamycin oder Spectinomycin bestimmt. Die Abbildung zeigt die Werte eines der beiden sich gleichenden Experimente. Geschlossene Symbole repräsentieren die Lebendzellzahl, offene Symbole den Sporentiter. ■-Wildtyp-Stamm; ▲-*sigB*-Mutante.

3. Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit besteht aus drei Teilen. Der erste Teil ist eine Fortsetzung der Untersuchungen der Diplomarbeit zur Bedeutung von Sporulation und genereller Stressantwort für das Überleben prototropher *Bacillus subtilis*-Stämme in Bodenmikrokosmen. Dabei sollte das Überleben von *B. subtilis* nach Behandlung mit Salzstress untersucht werden. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Untersuchung der Blockierung der Sporulation bei niedrigen Temperaturen. Dabei werden die Aktivitäten aller Sigmafaktoren, die an der Sporulation beteiligt sind, untersucht.

Im dritten Teil der Arbeit wird der aus dem Boden isolierte *Bacillus amyloliquefaciens*-Stamm FZB42 untersucht. Dabei wird der Stamm verschiedenen Stressarten ausgesetzt und sein Proteinmuster durch 2D-Gelanalyse mit dem Proteinmuster von *B. subtilis* verglichen.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerätetyp	Hersteller
Autoklav Certoklav	HMC
DNA-Elektrophoresekammern	Bio-Rad, Hoefer
Filter für Spritzen	Merck
Gelschüttler	GFL
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Biometra
IEF-Kammer Multiphor	Amersham Biosciences
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma
Kühlzentrifuge RC 26 Plus	Sorvall
Magnetrührer MR2002	Heidolph
Mikrowelle	AEG
Minicycler™	Biozym
Nitrocellulosemembran PROTRAN	Schleicher & Schuell
pH-Messgerät Mettler Toledo	Mettler
Phosphorimager MD STORM 860	Molecular Dynamics
Photometer Ultrospec 4000	Amersham Biosciences
Protein-Elektrophoresekammer (2D)	ESA
Protein-Elektrophoresekammer (2D) Protean Plus Dodeca Cell	Bio-Rad
Protein-Elektrophoresekammern (1D)	Bio-Rad, Sigma
Rotor-SS-34 (10-50 ml)	Sorvall
Rotor-SLA3000 (250-500 ml)	Sorvall
Rotor-GSA (50-100 ml)	Sorvall
Schüttelwasserbäder GFL1086, SS40-D, OLS2000	GFL, Grant
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick
Speed-Vac CON1000	LTF Labortechnik
Thermoblock QBT2	Grant
Thermocycler	Progene
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultraschallgerät Labsonic U	B. Braun
Ultrazentrifuge Centricon T-1080	Kendro Instruments
UZ-Rotor-EFT80.1 (2 ml)	Kendro Instruments
UZ-Rotor-Ti-75 (10 ml)	Kendro Instruments
Vakuumpumpen	Vacuubrand
Vortex	Heidolph
Zentrifuge Sorvall RC26 Plus	Sorvall

4.1.2. Chemikalien**Tabelle 2: Chemikalienliste**

Substanz	Hersteller
Aceton	Merck
Acetonitril	Merck
Acrylamid 40 %	Amersham Biosciences
Agar	Gibco
Agarose	Gibco
Ampicillin	Sigma
APS	Amersham Biosciences
Bacto Tryptone	Sigma
Biorad-Protein-Assay	Bio-Rad
Bis-Acrylamid 2 %	Amersham Biosciences
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Sigma
Casamino acids	Sigma
CHAPS	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Sigma
Citric acid, Na-Salt	Merck
Coomassie-Brillant-Blau G 250	Merck
D-Glucose	Sigma
Dry Strip Cover Fluid	Amersham Biosciences
DTT (für Rehydratisierung.)	Amersham Biosciences
ECF-Substrat	Amersham Biosciences
EDTA	Boehringer Mannheim
Erythromycin	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
FeCl ₃ x 6H ₂ O	Merck
FeSO ₄ x 7H ₂ O	Sigma
Ficoll 400	Roche
Formaldehyd 37 %	Sigma
Formamid	Sigma
Glycerol 87 %	Amersham Biosciences
Glycin	Roth
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma
Harnstoff	Sigma
HCl	Merck

Hefeextrakt	Sigma
Iodoacetamid	Sigma
Kanamycin	Sigma
K_2HPO_4	Sigma
KCl	Sigma
KH_2PO_4	Sigma
L-Alanin	Sigma
L-Arginin	Sigma
LB-Agar	Sigma
LB-Broth	Sigma
L-Histidin	Sigma
L-Lysin	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
Lysozym	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
$MgSO_4 \times 7H_2O$	Sigma
$MnCl_2 \times 4H_2O$	Sigma
$MnSO_4$	Sigma
MOPS	Boehringer Mannheim
N,N-Dimethylformamid	Sigma
Na_2CO_3	Merck
Na_2HPO_4	Sigma
$Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$	Sigma
$Na_3-Citrat \times 2H_2O$	Merck
Na-Borat	Sigma
NaCl	Sigma
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	Sigma
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	Merck
NaN_3	Sigma
NaOH	Sigma
N-Lauroylsarcosin	Sigma
Nutrient Broth	Difco
ONPG	Sigma
Pharmalyte 3-10	Amersham Biosciences
Phenol	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
PMSF	Boehringer Mannheim
SDS	Merck
Spectinomycin	Sigma
Sucrose	Sigma
TEMED	Amersham Biosciences

Thioharnstoff	Sigma
Tris-Base	Sigma
Trypton	Sigma
Tryptophan	Sigma
Xylen-Cyanol	Sigma
X-Gal	BioTech Trade und Service GmbH
Yeast Extract	Sigma

4.1.3. Medien

4.1.3.1. Minimalmedium zur Kultivierung von *B. subtilis* (Stülke et al., 1993)

Das Basalmedium besteht aus folgenden Komponenten:

0,015 M	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,008 M	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,027 M	KCl
0,007 M	Na ₃ Citrat x 2H ₂ O
0,050 M	Tris-HCl

Der pH-Wert des Mediums wird vor dem Autoklavieren auf 7,5 eingestellt. Das Basalmedium wird vor der Verwendung entsprechend dem Versuchsziel unterschiedlich supplementiert. Der Zusatz von Aminosäuren erfolgte nach Bedarf entsprechend der Auxotrophie des verwendeten Stammes.

Supplemente:

Chemikalien	Konzentration der Stammlösung	üN-Medium	Aminosäure-Limitation	Glucose-Limitation
KH ₂ PO ₄	0,2 M	0,6 mM	0,6 mM	0,6 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1 M	2 mM	2 mM	2 mM
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 mM	0,001 mM	0,001 mM	0,001 mM
MnSO ₄ x 4H ₂ O	25 mM	0,01 mM	0,01 mM	0,01 mM
Glutaminsäure	0,5 M	4,5 mM	4,5 mM	4,5 mM
Glucose % (w/v)	20 %	0,2 %	0,2 %	0,05 %
erforderliche Aminosäure	8 mg/ml	160 µg/l	13,3 µg/l	160 µg/l
z. B. Tryptophan	8 mg/ml (39 mM)	0,78 mM	0,065 mM	0,78 mM

4.1.3.2. Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) zur Anzucht von *E. coli* und *B. subtilis*

Das Medium wurde als Fertigmedium von der Firma Sigma bezogen und setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 5 g/l NaCl
- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l Trypton

4.1.3.3. Difco Sporulation Medium (DSM)

Das Medium wird hauptsächlich für die Stammhaltung von *B. subtilis* auf Agarplatten (15 g/l Agarzusatz) verwendet. Die *B. subtilis*-Zellen können auf diesem Medium sporulieren und dadurch mehrere Monate bei RT überleben. Damit die Agarplatten nicht austrocknen und einige Wochen gelagert werden können, werden sie mit Parafilm abgedichtet.

Das Grundmedium ist wie folgt zusammengesetzt:

Nutrient broth	8 g
KCl	1 g
MgSO ₄	0,25 g
Seradest	ad 1L

Nach dem Abkühlen wurden die folgenden Supplemente steril zugesetzt:

Supplemente	Pro 1 L Grundmedium
1 mM MnCl ₂	1 ml
0,1 mM FeSO ₄	1 ml
100 mM CaCl ₂	1 ml

Für 1 Liter Grundmedium werden 15 g Agar zugesetzt, um DSM-Agarplatten herzustellen.

4.1.4. Mikroorganismen

4.1.4.1. *Bacillus subtilis*-Stämme

Tabelle 3: *Bacillus subtilis*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/ Konstruktion	Resistenzen
168	<i>trpC2</i>	M. Hecker, Greifswald	-
FSB5	<i>trpC2 pheA1 ΔsigB::spec</i>	(Spiegelhalter and Bremer, 1998)	Spc ^r
SMY	prototroph	W. Haldenwang, San Antonio, TX	-
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	W. Haldenwang, San Antonio, TX	-
MB24	<i>trpC2 metC3</i>	A.O.Henriques, Lissabon, Portugal	-
BSM88	<i>kana::P_A rsbR</i>	TF von SMY mit ch. DNA aus BSM04	Km ^r
BSM89	<i>sigB::spec</i>	TF von SMY mit ch. DNA aus FSB5	Spc ^r
MO1657	<i>trpC2 pheA</i> <i>sspE::lacZ in amyE</i>	TF mit lin. Plasmid; Reporter für SigG-Aktivität	Cm ^r
MO1679	<i>trpC2 pheA</i> <i>spoIID::lacZ in amyE</i>	TF mit lin. Plasmid; Reporter für SigE-Aktivität	Cm ^r
MO2051	<i>trpC2 pheA</i> <i>spoIIQ::lacZ in amyE</i>	TF mit lin. Plasmid; Reporter für SigF-Aktivität	Cm ^r
Marb20	<i>trpC2 pheA1 SPβgerE-lacZ</i>	TD mit SPβ-Phage; Reporter für SigK-Aktivität	Erm ^r
Marb29	<i>trpC2 pheA1 bofA::cat</i>	BofA ^r	Cm ^r
Marb30	<i>trpC2pheA1,bofA::cat</i> <i>ΔspoIIIG::spc</i>	Erhöhte Aktivität von SigK	Spc ^r , Cm ^r
BSM316	<i>trpC2 pheA1 bofA::cat SPβgerE-lacZ</i>	TF von Marb29 mit ch. DNA aus Mar20, Reporter für SigK-Aktivität	Cm ^r
BSM317	<i>trpC2pheA1,bofA::cat</i> <i>ΔspoIIIG::spc SPβgerE-lacZ</i>	TF von Marb30 mit ch. DNA aus Marb20	Spc ^r , Cm ^r , Erm ^r
AH3786	<i>trpC2metC3,ΔspoIIIG, ΔamyE::spoIIIG, sspE::sspE-lacZ, Neo, Spc, Spo+</i>	A.O.Henriques, Lissabon, Portugal	Spc ^r , Neo ^r
AH3787	<i>trpC2metC3,ΔspoIIIG, ΔamyE::spoIIIGE156K, sspE::sspE-lacZ, Neo, Spc, Spo+</i>	A.O.Henriques, Lissabon, Portugal	Spc ^r , Neo ^r
FZB24	Bodenisolat, antagonistisch gegenüber <i>Pythium ultimum</i>	Batinic et al., 1998	
NRI	Bodenisolat aus der Rhizosphäre von <i>Anthyllis cytosoides</i>	Requena et al., 1999	
FZB42	Wildtyp, Bodenisolat von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FZB Berlin	

4.1.5. Antibiotika

Antibiotika wurden den entsprechenden Medien zur Selektion in folgenden Konzentrationen zugesetzt.

Antibiotika In <i>B. subtilis</i>	Stammlösung mg/ml	Endkonzentration µg/ml	Gelöst in
Spectinomycin	50	200	Seradest
Kanamycin	20	20	Seradest
Chloromphenicol	5	5	Ethanol
Erythromycin	10	1	Ethanol
Cycloheximid	10	100	Seradest

4.2. Methoden

4.2.1. Methoden zur Isolation und Manipulation von DNA

4.2.1.1. Mini-Isolation von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Um die chromosomale DNA aus *B. subtilis* zu isolieren, wurden die gewünschten *Bacillus*-Stämme in LB-Medium als Übernacht-Kultur gezogen. Die Zellen (1,5 ml) wurden dann für 5 min bei 4 °C bei 10.000 rpm zentrifugiert und pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer 2 resuspendiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte eine Zugabe von 400 µl Puffer 4 und eine Inkubation für 1 bis 2 Stunden bei RT auf einem Taumelschüttler. Nach 1-2 Stunden wurden zur Entproteinierung 600 µl Phenol (mit 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 gesättigt) zugegeben und das Gemisch weitere 1-2 Stunden auf dem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurde nach Zentrifugation (10.000 rpm, 4 °C, 5 min) die obere wässrige, die DNA enthaltende Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 2 Volumina 96 % eiskalten Ethanol und vorsichtiges Mischen auf Eis für 10 min gefällt. Die sichtbaren stecknadelkopfgroßen DNA-Klumpen wurden vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 10-20 min bei RT getrocknet und schließlich in 100 µl A. bidest gelöst.

Puffer 2:

0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml
1 M Tris-HCl pH 8,0	1 ml
<i>A. bidest</i>	7 ml
Lysozym	5 mg/ml

Puffer 4:

1 M Tris-HCl	0,1 ml
5 M NaCl	0,2 ml
10 % SDS	1,0 ml
<i>A.bidest</i>	8,7 ml

4.2.1.2. PCR-Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion wird für die Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte benutzt. Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94 °C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf etwa fünf Grad unterhalb des T_m 's der Primer gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht.

Das typische PCR-Programm sah folgende Bedingungen vor: eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94 °C, 30 Zyklen bestehend aus jeweils 30 sec bei 94 °C, 30 sec bei T_m minus fünf Grad und 90 sec bei 72 °C, und eine finale Elongation von 5 min bei 72 °C, um sicher zu gehen, dass die Polymerase die letzte Amplifikation vollständig ausführt. Anschließend wurde die Reaktion auf 4 °C gekühlt.

Formulierung der PCR-Primer

Die Primer werden speziell für die gewünschte Amplifikation maßgeschneidert, da das Gelingen der Amplifikation stark von ihnen abhängt. Deswegen sind bestimmte Regeln bei der Ableitung der Primer zu beachten. PCR-Primer wurden so formuliert, dass sich eine 14-18 Basen lange ununterbrochene Überlappung mit der gewünschten Sequenz ergab. Primerpaare wurden so gewählt, dass die Annealing-Temperatur möglichst übereinstimmte und keine zufällige Paarung oder Hybridisierung der Primer miteinander aufgrund von Sequenzhomologien auftreten konnte. Die Primer sollten nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Als Faustregel für die Ermittlung der Annealing-Temperatur diente die Formel:

$$T_m = 2x (A+T) + 4x (G+C) - 5 \text{ °C}$$

Reaktionsansatz für Taq-RCR

	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	Ansatz für 50 µl
Reaktionspuffer	10 x	1 x	5 µl
dATP	10 mM	200 µM	1 µl
dCTP	10 mM	200 µM	1 µl
dGTP	10 mM	200 µM	1 µl
dTTP	10 mM	200 µM	1 µl
H ₂ O			28-32 µl
Template (DNA)			0,5-1 µl
Primer 1 (for)	10 pmol/µl	0,25µM	1,25µl
Primer 2 (rev)	10 pmol/µl	0,25µM	1,25µl
Taq-Polymerase	U/µl		0,3 µl
Mineralöl			25 µl

4.2.1.3. Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme spielen bei der Klonierung von der DNA eine wichtige Rolle. Sie werden für den Standardverdau von DNA bzw. für den Verdau von PCR-Fragmenten genutzt. Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen palindromische Sequenzen von 4-8 Basenpaaren und ermöglichen die sequenzspezifische Spaltung von DNA unter Erzeugung von Basenüberhängen (sticky ends) oder glatten Enden (blunt ends). Man kann einen Restriktionsverdau durchführen, indem man sich aus der Enzymaktivitätsliste des Herstellers den passenden Puffer aussucht, DNA, Wasser, Puffer und Enzym zusammenpipettiert, mischt und das Ganze für 1-2 Stunden bei der entsprechenden Temperatur (häufig 37 °C) inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

4.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient durch Größenbestimmung der Überprüfung von Plasmid-Präparationen und der Kontrolle von DNA-Restriktionen. Die Agarose (0,8-1,5 %) wird in TBE-Elektrophoresepuffer durch Erhitzen gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Mit Hilfe eines Kammes wird ein Gel mit Taschen gegossen, das man nach Erkalten in eine Elektrophoresekammer gibt. Die DNA-Lösung wird mit Probenpuffer versetzt, in die Taschen pipettiert und eine Spannung von 50 bis 80 V angelegt. Zur Größenbestimmung wird ein

Größenmarker mit aufgetragen („1 kb-ladder“ Gibco BRL, Karlsruhe). Die DNA Fragmente werden mit UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Videoanlage (Biotech, Fischer) dokumentiert.

10-facher TBE-Puffer:

Komponente	Menge bzw. Vol. für 1 L	Konzentration
Tris/HCl	108 g	0,9 M
Borsäure	55 g	0,9 M
0,5 M EDTA pH 8,0	40 ml	20 mM

6-facher Probenpuffer:

Komponente	Anteil (w/v)
Bromphenolblau	0,25 %
Xylen-Cyanol FF	0,25 %
Ficoll 400	15 %

4.2.1.5. Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmiden erfolgt entweder nach der Methode von Kushner (Kushner, 1978) oder durch Elektrotransformation nach Hanahan (Hanahan et al., 1991).

Elektrotransformation von *E. coli* nach Hanahan

Die *E. coli* Zellen wurden in 5 ml LB-Medium als ÜN-Kultur kultiviert. Am nächsten Tag wurden 500 µl der ÜN-Kultur in 150 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₅₄₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 10 min mit 5000 rpm bei 4 °C geerntet und durch mehrere Waschschrte mit eisgekühlter 10 %iger steriler Glycerinlösung für die Elektrotransformation vorbereitet. Zunächst erfolgte ein Waschschrte mit einem Kulturvolumen (150 ml) Glycerinlösung, jeweils nach Zentrifugation weitere mit einem halben (75 ml) und einem Fünfzigstel Glycerinlösung (3 ml). Schließlich wurden die Zellen in einem Fünfhundertstel (300 µl) des ursprünglichen Kulturvolumens aufgenommen und die Zellsuspension in Aliquots von 50 µl portioniert. Die Zellen werden entweder direkt transformiert oder bis zur Transformation bei - 80 °C gelagert. Transformiert wird mit 0,5 bis 1 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω mittels Gene Pulser™

mit Pulse Controller. Unmittelbar nach erfolgter Transformation werden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. 100 bis 200 µl Zellen werden anschließend auf LB-Agar mit Ampicillin ausplattiert.

SOC-Medium:

20 g Bacto Tryptone
5 g Bacto Yeast Extrakt
0,58 g NaCl
0,19 g KCl ad 1L <i>A.bidest</i>

4.2.1.6. Transformation von *B. subtilis*

Die *B. subtilis* Zellen werden in 5 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag werden 200 µl der ÜN-Kultur in 20 ml GM1 bei 37 °C im Wasserbad bei 150 rpm geschüttelt. Die OD wird dann bei 540 nm alle 30 min gemessen. 90 min nach Erreichen der stationären Phase (T_0) wird 1 ml der Kultur in 9 ml vorgewärmtem (37 °C) GM2 verdünnt und für 2 Stunden im Wasserbad geschüttelt. Nach der Inkubation wird zu 500 µl der kompetenten Zellen 1-5 µl Plasmid oder chromosomale DNA gegeben. Die Transformation sollte dann durch eine Inkubation bei 37 °C für 30 min mit langsamem Schütteln erfolgen. Ausplattieren der transformierten Zellen auf Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum stellt den letzten Schritt der Transformation dar.

1- Bott und Wilson salts (B&W Salts)

$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	16,2 g
KH_2PO_4	7,6 g
Trinatriumcitrat	1 g
$(NH_4)_2SO_4$	6 g
Ad 1 L dH_2O ; pH auf 6,7 einstellen	

2- 5x B&W Aminosäuren (100 ml)

2,5 mg/ml der folgende Aminosäure mischen und mit dH_2O auf 100 ml auffüllen

trp	arg	lys
gly	met	his
val	thr	asp

3- Growth Medium 1 (GM1)

B&W salts	96 ml
0,1M MgSO ₄	1 ml
50 % Glucose	1 ml
10 % Hefeextrakt	1 ml
5x B&W Aminosäuren	1 ml

4- Growth Medium 2 (GM2)

GM1	9,65 ml
50 mM CaCl ₂	50 µl
0,1 M MgCl ₂	250 µl
Ad 100 ml mit dH ₂ O auffüllen	

4.2.2. Kultivierung der Bakterien**4.2.2.1. Wachstums-, Kultivierungs- und Stressbedingungen**

Vorkulturen wurden im Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter ständigem Schütteln (200 rpm) kultiviert oder in Röhrchen auf dem Roller angezogen. Antibiotika wurden in den oben genannten Konzentrationen bei Bedarf zugegeben. Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden vorgewärmte Medien auf OD₅₄₀ zwischen 0,05 und 0,1 beimpft. Im Einzelnen wurden die Bakterienkulturen folgenden Behandlungen unterzogen: Die Ethanol-Endkonzentration bei Ethanolstress betrug 4 % und bei Salzstress 3 %. Der Salzstress wurde mit einer 4 M NaCl-Stammlösung eingestellt. Hitzestress wurde bei einer Endtemperatur von 48 °C gesetzt. Kulturmengen bis 200 ml wurden in vorgewärmte Kolben in ein 48 °C-Wasserbad umgesetzt. Kältestress wurde zur Abgrenzung von „Kälteschock“ „Wachstum in der Kälte“ genannt und bei 13 °C oder 16 °C durchgeführt.

4.2.2.2. Wachstum in der Kälte

Zur Untersuchung des Kältewachstums wurden die verschiedenen Wildtypstämme und *Bacillus*-Mutanten in DSM bei 16 °C und 13 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick) kultiviert, wobei das Kolbenvolumen mindestens dreifach größer war als das Kulturvolumen, um O₂-Mangel zu vermeiden. Bei der für das Experiment bestimmten Kultur wurde auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet. Für die Übernachtskultur wurden 20 ml LB in 100 ml-Kolben mit einer Kolonie von einer frischen LB-Platte beimpft. Die

Übernachtukturen wurden in Anwesenheit von Antibiotika wachsen gelassen. Morgens wurde aus dieser Kultur, welche eine $OD_{540} < 2$ haben sollte (dies garantierte eine kurze lag-Phase), eine Übertag (ÜT)-Vorkultur auf OD_{540} von 0,1 angeimpft und bis OD_{540} 0,5 bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde diese Kultur auf OD_{540} 0,1 verdünnt und bei 16 °C oder 13 °C weiter inkubiert. Der Zeitpunkt des Umsetzens wurde in allen folgenden Experimenten als T_0 angesehen.

4.2.2.3. Zellernte für die Gesamt-RNA-Isolation

Die Zellernte wurde auf Killing-Eis durchgeführt, um möglichem RNA-Abbau vorzubeugen. Dazu wurden 15 ml Killing-Puffer in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Die Röhrchen wurden liegend eingefroren, um eine größere Oberfläche zu erhalten. Es wurden 15 ml der Bakterienkultur auf das Killing-Eis gegeben und für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C (Rotor SS-34, Sorvall RC-26, Sorval) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1ml Killing-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgesetzt und noch mal 3 min bei 4 °C und 15.000 rpm (Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4: Killing-Puffer

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Stammlösung für 1L
Tris-HCl pH 7,5	1 M	20mM	20 ml
MgCl ₂	1 M	5 mM	5 ml
NaN ₃	2 M	20 mM	10 ml
DEPC-Wassr			Auf 1 L auffüllen

4.2.2.4. Zell- Lyse

Das Zellpellet wird in 200 µl Killing-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein mit N₂ gefülltes Teflongefäß pipettiert. Eine mechanische Zellzerstörung erfolgt dann mit einer Kugelmühle für 2 min bei 2600 rpm. Die zerstörten Zellen werden dann in 4 ml Lysislösung resuspendiert (vorgewärmt auf 50 °C). Die Proben können jetzt entweder bei -80 °C gelagert oder für die Isolation der Gesamt-RNA durch die Saure-Phenol-Methode verwendet werden.

Lyse-Lösung:

118,16 g Guanidiniumthiocyanat (Endkonzentration: 4 M)
2,08 ml 3 M Na-Acetat, pH 5,2 (Endkonzentration: 0,025M)
12,5 ml 10 % N-Lauroylsarcosin (Endkonzentration :0,5 %)
1 M β -Mercaptoethanol (optional)
Ad 250 ml dest. Wasser

4.2.2.5. Gesamt-RNA-Isolation nach der "Sauren- Phenol"- Methode

Die tiefgefrorenen Zellysate (je 1 ml) wurden mit 1 ml saurer Phenol-Lösung versetzt, auf einem Schüttler (Eppendorf) bei 1.600 rpm aufgetaut und dann weitere 5 min geschüttelt. 5 min Zentrifugation bei 12.000 rpm ermöglicht die Trennung der wässrigen von der phenolischen Phase und sedimentiert dabei Zelltrümmer und ausgefallene Proteine in einer Interphase. Es wurde dann 950 μ l der wässrigen Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Erneut wurde dann ein gleiches Volumen an saurer Phenollösung zugegeben, 5 min auf dem Schüttler bei 1.600 rpm inkubiert und anschließend 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.

Die dann der wässrigen Phase entnommenen 850 μ l wurden mit gleichem Volumen Chloroform-IAA-Gemisch versetzt. Erneut erfolgt eine 5 minütige Inkubation auf dem Schüttler (1.600 rpm) und eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm. 700 μ l der wässrigen Phase wurden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70 μ l 3 M Natrium-Acetat (pH 5,5) sowie 1 ml Isopropanol gut gemischt. Die Fällung der RNA erfolgt üN bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach wurde die RNA durch Zentrifugation mit 15.300 rpm für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde danach wiederholt. Nach restlosem Abnehmen des Überstands wurde das Pellet 1 min in der Speed-Vac getrocknet und anschließend mit 25 μ l nukleasefreiem Wasser (Ambion) durch 10 min Inkubation bei Raumtemperatur gelöst. Die vier Aliquots derselben Probe wurden vereinigt und die Konzentration der RNA-Lösung wurde bestimmt. Die Lagerung der RNA-Lösungen erfolgte bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 5: saure Phenollösung und Chloroform-Gemisch

Komponente	Volumen für Phenollösung	Volumen für Chloroform-Gemisch
Roti-Aqua-Phenol pH 4,5-5,0	250 ml	
Chloroform	240 ml	240 ml
Isoamylalkohol (IAA)	10 ml	10 ml

- Die sterile Phenollösung wurde mit nukleasefreiem Wasser abgesättigt.
- Das Chloroformgemisch wurde mit nukleasefreiem Tris/ HCl pH 8,8 äquilibriert.

4.2.2.6. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Ein definiertes Volumen der RNA-Lösung (100 µl) wurde dafür in 1 ml DEPC-Seradest pipettiert, gemischt und gegen einen DEPC-Seradest-Kontrollwert in Quarzküvetten im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Nukleinsäuren in den Proben haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und die noch vorhandenen Proteine absorbieren bei 280 nm. Die Konzentration der Nukleinsäure ist proportional zur Absorption und eine Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml. Die RNA-Konzentration der Probe (c) berechnet sich wie folgt: $c = A_{260} * 40 / x$ µl, wobei x das Volumen der eingesetzten Probe darstellt. Der Quotient der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm erlaubt eine Aussage zur Reinheit der RNA. Er sollte nicht unter 1,7 liegen, da ein hoher Proteinanteil in der Probe die Markierung der RNA oder die cDNA-Synthese behindern kann.

4.2.2.7. RNA Hybridisierung

4.2.2.7.1 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden mit dem Strip-EZ Kit (Ambion)

Der Strip-EZ Kit erlaubt eine schonende Entfernung der Sonden von den hybridisierten und detektierten „Northern-Blot“-Membranen. Der Einbau eines modifizierten CTPs in das Transkript fügt Sollbruchstellen ein. An diesen Stellen kann das Transkript nach der Detektion spezifisch gespalten werden. Dadurch entstehen kleine Bruchstücke, die besser und unter milderen Bedingungen von der Ziel-RNA abgelöst werden können.

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden 1 µg DNA, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl 10 mM GTP, 1 µl modifiziertes 2 mM CTP, 0,65 µl 10 mM UTP und 0,35 µl 10 mM DIG-UTP mit 2 µl 10x Transkriptionspuffer versetzt und mit Seradest auf 18 µl aufgefüllt. Dazu wurden 2 µl T7-

Polymerasegemisch (T7-Polymerase und RNase-Inhibitor, Ambion) oder 1 µl T3-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und 1 µl RNase-Inhibitor (Sigma, Deisenhofen) pipettiert. Dieser Reaktionsansatz wurde kurz zentrifugiert und danach für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 µl DNase (RNase-frei) und einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C entfernt. Diese Reaktion wurde mit 2 µl EDTA-Lösung (0,2 M pH 8,0) gestoppt. Die RNA wurde nicht gefällt, sondern nach dem Sondentest mit 5 ml Hybridisierungslösung vermischt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

4.2.2.7.2 Sondentest

Um die Qualität der Sonden und damit die Stärke der DIG-Markierung zu überprüfen, wurden die hergestellten Sonden getestet. Aus den Markierungsansätzen wurde jeweils 1 µl entnommen und in 10 x SSC seriell in 1:10er Schritten bis zu 1:1.000.000 verdünnt. Jeweils 2 µl dieser Verdünnungen wurden auf eine Nylonmembran (Biodyne Plus, Pall) getropft und an diese mit UV-Licht im UV-Cross-Linker oder durch Inkubation für eine Stunde bei 120 °C gebunden. Diese Membran wurde mit einem anti-DIG Antikörper inkubiert, gewaschen und dann mit einem Fluoreszenzsubstrat wie später beschrieben detektiert.

Tabelle 6: 10 x SSC

Komponente	Menge für 1 L 10 x SSC	Konzentration
NaCl	86,6 g	1,5 M
Na-Citrat	44,1 g	0,15 M

In 800 ml DEPC-Seradest lösen

pH-Wert auf 7,0 (mit NaOH) einstellen

mit DEPC-Seradest auf 1 L auffüllen und danach autoklavieren

4.2.2.7.3 Verwendete Sonden

Tabelle 7: DIG-Sonden

Ziel mRNA	Herstellung „template“-DNA	RNA-Polymerase
spoIID	PCR	T7
spoIIQ	PCR	T7
sspE	PCR	T7
spoIIIG	PCR	T7

4.2.2.7.4 Slot-Blot-Hybridisierung

Bei der „Slot-Blot“-Methode wird die zu untersuchende RNA durch ein Vakuum mit Hilfe einer Apparatur (Biorad, Höfer) auf eine Nylonmembran gesaugt. Auf dieser Nylonmembran

wird sie dann mit UV-Licht oder durch Inkubation bei 120 °C für 1 Stunde fixiert. Zunächst war es notwendig, die RNA in 10 x SSC auf eine Konzentration von 5 µg/ml zu verdünnen. Danach wurde die RNA auf eine zuvor mit DEPC-Seradest angefeuchtete, in der Apparatur fixierte Membran jeweils als Doppelpot aufgetragen. Es erwies sich als günstig, 100 µl RNA-Lösung pro Dot zu verwenden, da somit eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet war und die RNA-Menge mit 0,5 µg noch im linearen Bindungs- bzw. Hybridisierungsbereich der Membran lag. Nachdem sich die gewünschte Anzahl an Proben auf der Membran befand, wurde die Membran aus der Apparatur genommen und die RNA entweder mit dem UV-Cross-Linker oder durch Inkubation bei 120 °C für 1 Stunde fixiert. Nach der Fixierung konnte die Membran zur Hybridisierung verwandt oder zwischen Whatmanpapier bei RT gelagert werden.

4.2.2.7.5 Denaturierende RNA-Elektrophorese/Northernblotting

Bei dieser Methode wird die RNA auf einem denaturierenden Gel nach der Größe aufgetrennt und danach auf eine Nylonmembran geblottet, auf welcher sie mit UV-Licht fixiert wird. Die spätere Hybridisierung mit DIG-markierten RNA Sonden liefert Informationen über die Größe und die Integrität des Transkriptes in der aufgetragenen Probe. Abbauprodukte als Folge der Wirkung der RNasen waren leicht als Schleier unterhalb der eigentlichen Bande des Transkriptes zu erkennen. Für das denaturierende Gel wurden 6 g Agarose mit 292 ml sterilem DEPC-Seradest, und 4 ml 10 x MOPS-Puffer aufgeköcht und anschließend auf 60 °C heruntergekühlt. Danach wurden 68 ml 35 %iges Formaldehyd untergemischt und das Gel wurde gegossen. Nach etwa einer Stunde war die Agarose ausgehärtet und die Gel-Kämme wurden entfernt. Das Gel wurde in die Gelkammer gelegt und mit Laufpuffer überschichtet. In der Zwischenzeit wurden die RNA-Proben auf eine Konzentration von 7,5 µg RNA/10 µl mit sterilem DEPC-Seradest verdünnt. Dann wurden sie mit einem Volumen RNA-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Nach dem Denaturieren wurden sie kurz in der Kühlzentrifuge bei 4 °C herunterzentrifugiert und vor dem Auftragen auf Eis gestellt. Pro Geltasche wurden 7,5 µl RNA aufgetragen. Um die Größe des Transkriptes nach der Detektion bestimmen zu können, wurde ein DIG-markierter RNA-Marker (Roche, Mannheim) benutzt. Dieser wurde vor dem Auftragen ebenfalls mit RNA-Probenpuffer versetzt und bei 65 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgt für 2-3 Stunden bei 120-140 V und 400 mA. Nachdem der erste Farbmarker ca. 2/3 der Laufstrecke zurückgelegt hatte, wurde das Gel entnommen und auf eine vorgefertigte Nylonmembran (Biodyne Plus, Pall) in die Vakuumblotapparatur (Vacuumblotting System VacuGen XL) gelegt. Das

Vakuum wurde angelegt und 50 mM NaOH, 10 mM NaCl auf das Gel gegeben, um große RNAs partiell zu hydrolysieren und ihren Transfer auf die Membran zu verbessern. Nach 5 Minuten wurde die NaOH-Lösung gegen 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 ersetzt, um die überschüssige Denaturierungslösung zu entfernen (5 min Neutralisierung). Anschließend wurde die Neutralisierungslösung gegen 20 x SSC ausgetauscht und die RNA für 2-3 Stunden auf die Membran geblottet. Danach wurde die RNA mit dem UV-Linker auf der Membran fixiert und mit DIG-markierten Sonden detektiert.

Tabelle 8: 10 x MOPS-Puffer

Komponente	Menge (für 1L Ansatz)	Endkonzentration
MOPS	41,8 g	200 mM
Na-Acetat	4,1 g	50 mM
EDTA pH 7,0	3,72 g	10 mM

Tabelle 9: RNA-Probenpuffer

Komponente	Menge bzw. Volumen (für 10 ml Ansatz)
10x MOPS	2 ml
Formamid	6,5 ml
Formaldehyd (37%)	1,2 ml
Sucrose (50 % Stammlösung)	0,4 ml
Bromophenolblau	20 mg
Xylencyanol	20 mg

4.2.2.7.6 Hybridisierung und Detektion der membrangebundenen RNA durch Chemiefluoreszenz.

Die auf den Nylonmembranen fixierte Gesamt-RNA wird hierbei mit den Digoxygenin-markierten RNA-Sonden hybridisiert.

Zunächst findet eine Prähybridisierung der Membranen statt. Dazu wurden diese mit 5 ml Hybridisierungslösung in einer zuvor mit DEPC-Wasser behandelten Hybridisierungsflasche eine Stunde bei Rotation im Hybridisierungsöfen (Biometra) bei 68 °C inkubiert. Danach wird die Hybridisierungslösung durch zuvor denaturierte (10 min bei 95 °C) Sondenlösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt ÜN bei 68 °C (ca. 12-16 h). Die Sondenlösungen wurden dann wieder abgenommen und bis zu einer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Auf die Hybridisierung folgten verschiedene Waschschritte und die Inkubation mit anti-Digoxygenin-Antikörpern, die mit Alkalischer Phosphatase markiert waren.

Tabelle 10: Wasch- und Inkubationsschritte nach der Hybridisierung

Schritt	Lösung	Volumen	Dauer	Temperatur
1.	2 x SSC, 0,1% SDS	50 – 100 ml	5 min	RT
2.	2 x SSC, 0,1% SDS	50 – 100 ml	5 min	RT
3.	0,2 x SSC, 0,1% SDS	50 – 100 ml	15 min	68°C
4.	0,2 x SSC, 0,1% SDS	50 – 100 ml	15 min	68°C
5.	Puffer 1	50 – 100 ml	1 min	RT
6.	Puffer 2	50 ml	30 min	RT
7.	Puffer 2 mit 4µl AP-markiertem Anti-Digoxigenin-Antikörper	40 ml	30 min	RT
8.	Puffer 1	50 – 100 ml	15 min	RT
9.	Puffer 2	50 – 100 ml	15 min	RT

Tabelle 11: Hybridisierungslösung

Komponente	Menge für 250 ml
Formamid	100 ml
20 X SSC	50 ml
Blockingreagenz	4 g
N-Lauroyl-Sarcosinat	0.2 g
SDS	14 g

- Für 10 x SSC wurde 500 ml mit DEPC-Wasser auf 1 l aufgefüllt

Tabelle 12: SSC-Puffer (20 x und 10 x)

Komponente	Menge für 250 ml	Endkonzentration
NaCl	175,3 g	3 M
Na-Citrat	88,2 g	0,3 M

- Die Menge der Komponenten wurden in ca. 800 ml DEPC-Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, mit DEPC-Wasser auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
- Für 10 x SSC wurde 500 ml mit DEPC-Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Tabelle 13: Waschlösungen

Komponenten	2 x SSC, 0,1 % SDS	0,2 x SSC, 0,1 % SDS
20 x SSC	100 ml	10 ml
10 % SDS	10 ml	10 ml

- Mit DEPC-Wasser wurden die Lösungen auf 1 l aufgefüllt.

Tabelle 14: 10 x Puffer 1

Komponenten	Menge für 1 l	Endkonzentration
Maleinsäure	116,1 g	1 M
NaCl	87,66 g	1,5 M

- Die Komponenten wurden unter Rühren in 900 ml DEPC-Wasser gelöst.
- Mit NaOH wurde der pH-Wert der Lösung auf pH 7,5 eingestellt.
- Mit DEPC-Wasser wurde die Lösung auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Tabelle 15: 10 % Blockingreagenz

Komponente	Menge für 1 l
Blockingreagenz	10 g
1 x Puffer 1	100 ml

- Der Ansatz wurde eine Stunde bei 50 °C gerührt und anschließend autoklaviert.

Tabelle 16: Puffer 2

Komponente	Menge für 1 l
10 % Blockingreagenz	50 ml
1 x Puffer 2	450 ml

4.2.2.7.7 Detektion der an die Nylonmembran gebundenen RNA

Die Filter werden nun mit der Pinzette in 0.1 M Tris-Puffer pH 9.5 gelegt, kurz mit sauberem Filterpapier getrocknet (Rückseite) und sofort auf einer Folie dem Attophos-Substrat benetzt (12 μ l pro cm^2 ; 0,5 ml Substrat reichen pro „slot-blot-Filter“). Die Umsetzung des Substrates durch den an die RNA gebundenen, mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper führt zu einem fluoreszierenden Produkt, welches durch den Laser des Fluorimagers angeregt wird. Das emittierte Licht wird gemessen und mit dem Programm **Image Quant** der Firma Amersham Biosciences quantifiziert

4.2.3. Biochemische Methoden

4.2.3.1. Zellaufschluss

Die Kulturen wurden in zur Hälfte mit Eis gefüllten Bechern geerntet, um die Produktion von Stressproteinen während der Ernte zu vermeiden. Nach dem Zentrifugieren (15 min, 4 °C, 6000 rpm, SLA3000-Rotor) wurde das Pellet in GF-Puffer (mit PMSF-Zusatz als Proteaseinhibitor) gewaschen. Das Waschpuffervolumen betrug 5 % des Kulturvolumens. Nach der Rezentrifugation wurde das Pellet in 1-5 ml desselben Puffers resuspendiert und durch Ultraschall (4 x 20 sek mit je 2 min Pause) aufgeschlossen. Die Proben wurden nach der Proteinbestimmung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.3.2. Proteinfällung

Für einige Anwendungen war es nötig, größere Volumina zu fällen oder umzupuffern. Nach einer Proteinbestimmung wurde die entsprechende Menge Rohextrakt mit 2 Vol 99 %igem, kaltem Ethanol versetzt, 30 min bei -80 °C oder ÜN bei -20 °C gefällt. Durch 30 min Zentrifugation mit 15.000 rpm bei 4 °C wurden die Proteine anschließend pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde kurz in der Speed Vac getrocknet und in 20 μ l Probenpuffer aufgenommen. Die Probe wurde entweder gleich auf ein Gel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

4.2.3.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung wurde nach (Bradford, 1976) mit dem Biorad-Proteinassay durchgeführt. Als Standard diente fertig gelöstes Rinderserumalbumin (BSA =>1 mg/ml). Es wurden geeignete Proteinmengen mit 200 µl Bradfordreagenz (ad. 1 ml Seradest) für 15 min inkubiert. Durch Bindung von Protein an Coomassie Brillantblau wurde eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm induziert und dann bei der letztgenannten Wellenlänge bestimmt.

4.2.3.4. SDS-PAGE (Laemmli 1970)

Die SDS-PAGE diente zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht. Es wurden 10 %ige und 12,5 %ige Gele verwendet. Die Auftrennung wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaubande das untere Gelende erreicht hatte. Die Laufgeschwindigkeiten sind tabellarisch zusammengefasst. Als Marker wurde vorgefärbter Proteinmarker von MBI Fermentas eingesetzt. Von den Rohextrakten wurde pro Spur 60 µg Protein (1:1 in Probenpuffergemisch, für 6 min bei 97 °C denaturiert) aufgetragen. Die Gele wurden über Nacht auf dem Gelschüttler in Färbelösung inkubiert und dann entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Tabelle 17: Mengen und Zusammensetzung für 4 SDS-Midi-Gele (10 x 14 cm)

12,5 % SDS-Trenngel	Vol	Endkonz.	Sammelgel	Vol	Endkonz.
40 % Acrylamid	34,1 ml	12,5 %	40 % Acrylamid	1,8 ml	3,6 %
2 % Bisacrylamid	18,2 ml	0,33 %	2 % Bisacrylamid	0,9 ml	0,09 %
4 x Trenngelpuffer	28 ml	380 mM	4 x Sammelgelpuffer	5 ml	125 mM
Seradest	ad. 110 ml		Seradest	ad. 20 ml	
20 % APS	150 µl		20 % APS	160 µl	
TEMED	70 µl		TEMED	40 µl	

10 % SDS-Trenngel	Vol	Endkonz.
40 % Acrylamid	27,3 ml	10 %
2 % Bisacrylamid	14,6 ml	0,265 %
4 x Trenngelpuffer	28 ml	380 mM
Seradest	ad. 110 ml	
20 % APS	150 µl	
TEMED	70 µl	

Tabelle 18: Puffer für SDS-PAGE

4 x Trenngelpuffer		4x Sammelgelpuffer	
Tris/HCl pH 8,8	1,5 M	Tris/HCl pH 6,8	500 mM
SDS	0,4 %	SDS	0,4 %

Tabelle 19: 2 x Ladepuffer für Proteine

Komponente	Vol	Endkonz.
98 % Mercaptoethanol	2,5 ml	5 %
10 % SDS	10 ml	2 %
87 % Glycerol	11,5 ml	20 %
4 x Sammelgelpuffer	12,5 ml	125 mM
Seradest	ad. 50 ml	
+Spatelspitze Bromphenolblau		

Tabelle 20: Laufpuffer für SDS-PAGE

1 x Laufpuffer	Menge/Vol	Endkonz.
Tris/HCl	3 g	25 mM
Glycin	14,4 g	190 mM
10 %SDS	10 ml	0,1 %
Seradest	ad 1L	

Tabelle 21: allg. Daten zur SDS-PAGE

Gele	Gelgröße	mA für Gellauf	Markermenge
Mini	5 cm x 7 cm	20-30 mA	5 µl
Midi	10 cm x 14 cm	25 mA	10 µl
Maxi	10 cm x 28 cm	25 mA	10 µl

4.2.3.5. 2D-Proteinelektrophorese

Bei der 2D-Proteinelektrophorese werden die Proteine in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Dazu werden immobilisierte pH-Gradienten (IPG-Streifen) mit einem pH-Bereich, in welchem die interessanten Proteine liegen, verwendet. Der Streifen wird dann in der zweiten Dimension auf ein SDS-Gel (19 cm x 23 cm) oder ein Minigel (5 cm x 7 cm) aufgelegt. Unter Spannung wandern die Proteine aus dem Streifen ins Gel und werden dort entsprechend der denaturierenden Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Erste Dimension

IEF

Die IEF (isoelektrische Fokussierung) wurde mit kommerziellen 7 cm- und 18 cm-Streifen (Amersham Biosciences) mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden nach Zellernte und -aufschluss in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen, da für die erste Dimension die Ionenkonzentration möglichst gering sein sollte.

Einhydratisierung

Die Proteinproben für die Mini-2D- und 2D-Gele wurden in Rehydratisierungslösung aufgenommen und in die Schlitz eines zum Einhydratisieren verwendeten Acrylglasbrettchens pipettiert. Die Streifen wurden nach Abziehen der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten auf die Lösung in den Schlitz gelegt. Um einer Verdunstung des Wassers und somit der Kristallisierung des Harnstoffs vorzubeugen, wurde die Streifen vollständig mit Mineralöl (Dry Strip Cover Fluid von Amersham Biosciences) bedeckt und zusätzlich eine Glasplatte auf das Acrylbrettchen gelegt. Das Einhydratisieren erfolgte für mindestens 24 h, da bei kürzerer Rehydratisierungszeit die größeren Proteine nicht in genügender Menge in die IPGs diffundieren.

Tabelle 22: Rehydratisierungslösung für 8 IPG-Streifen

Komponente	Menge/Vol	Endkonz. der 4 ml Stocklösung
Harnstoff	1,92 g	6,1 M
ThioHarnstoff	0,61 g	1,5 M
CHAPS	80 mg	25 mM
Pharmalyte 3-10	52,5 µl	1,33 %
DTT	17,5 mg	30 mM
Seradest	ad. 4ml	
Bromphenolblau	Spatelspitze	

Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit der Multiphor II-Apparatur (Amersham Biosciences). Durch vorsichtiges Abspülen wurde der restliche Harnstoff mit Seradest von den Streifen entfernt und die Streifen mit feuchtem Filterpapier kurz abgetrocknet. Dann konnten die Streifen in die Apparatur eingelegt werden (saure Seite zum Pluspol). Zusätzlich zu den beiden Elektrodenstreifen an den Gelenken wurde an der basischen Seite ein mit DTT (500 μ l, 15 mM) getränkter Elektrodenstreifen aufgelegt. Beide Streifenenden wurden mit nassem Whatmanpapier bedeckt, um eventuell vorhandene Salze aufzunehmen. Die Streifen wurden vor dem Lauf mit Mineralöl bedeckt. Der Lauf erfolgte bei 20 °C. Das Stromversorgungsgerät (EPL-35S00-XL) wurde nach dem folgenden Schema (Tab. 23) programmiert. Dabei wurde, wie gekennzeichnet, jeweils ein linearer Gradient Stufe eins und drei angelegt.

Tabelle 23: Multiphorprogramm für 18 cm IPG-Streifen (Sven Hövel 2002)

Stufe	V	mA	W	Vh
1. Gradient	500	1	5	500
2.	500	1	5	2500
3. Gradient	3500	1	5	10000
4.	3500	1	5	35000

Aufbewahrung der Proben

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen, die nicht sofort für die zweite Dimension verwendet wurden, in Acrylglasbrettchen bei -20 °C gelagert.

2.Dimension: SDS-PAGE

Äquilibrierung

Die Bedingungen zur Äquilibrierung der IPG-Streifen sind kritisch, da einerseits eine minimale Diffusion der Proteine und andererseits einen möglichst vollständigen Übergang der Proteine von den IPG-Streifen auf die SDS-Gele zu erreichen. Die Streifen wurden für die zweite Dimension je 15 min zunächst in Lösung A und dann in Lösung B auf dem Schüttler bei RT äquilibriert.

Tabelle 24: Äquibrierungslösung für IPG-Streifen

Komponente	Lösung A		Lösung B	
	Menge/Vol	Endkonz.	Menge/Vol	Endkonz.
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 ml	50 mM	2,5ml	50 mM
Harnstoff	9 g	6 M	9 g	6 M
Glycerol	8,6 ml	30 %	8,6 ml	30 %
10 % SDS	10 ml	4 %	10 ml	4 %
Seradest	ad. 25 ml		ad. 25 ml	
DTT	87,5 mg	0,023 M		
Iodoacetamid			1,125 g	0,21 M
Bromphenolblau			Spatelspitze	

Tabelle 25: Zusammensetzung der 2D-Gele

12,5 % SDS-Trenngel für 6 2D-Gele			Sammelgel für 6 2D-Gele		
Komponente	Vol	Endkonz.	Komponente	Vol	Endkonz.
40 % Acrylamid	167,55 ml	12,18 %	40 % Acrylamid	5,4 ml	3,6 %
2 % Bis-Acrylamid	89,5 ml	0,32 %	2 % Bis-Acrylamid	2,7 ml	0,09 %
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	137,5 ml	375 mM	4 x Sammelgelpuffer	15 ml	125 mM
10 % SDS	5,5 ml	0,1 %	Seradest	ad. 60 ml	
Seradest	ad. 550 ml		10 % APS	220 µl	
10 % APS	1,4 ml		TEMED	33 µl	
TEMED	275 µl				

4.2.3.6. Proteinnachweis durch Gelfärbung

4.2.3.6.1 Silberfärbung nach Blum et al. 1987 (modifiziert von Schütz, 1998)

Die Silberfärbung, welche sensitiver als die mit Coomassie Brillantblau ist, wurde zur Detektion von 2D-Gelen mit 100 µg Beladung verwendet. Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei 1-5 ng. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttler oder unter gleichmäßigem Schwenken per Hand. Die einzelnen Schritte sind in Tab. 26 aufgeführt. Fixierer, Sensitivierer und Entwickler wurden frisch angesetzt.

Tabelle 26: Schritte der Silberfärbung

	Schritt	Dauer
1	Fixierung	mindestens 1h oder üN
2	Waschen	3 x 20 min
3	Sensitivierung	1 min
4	Waschen	3 x 20 sek
5	Silberfärbung	20 min
6	Waschen	3 x 20 sek
7	Entwicklung	1-3 min
8	Abstoppen	30 min
-Lagerung in Seradest bis zum Scannen		

Tabelle 27: Fixierer für Silberfärbung

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Methanol	500 ml	50 %
Essigsäure	120 ml	12 %
37 % Formaldehyd	0,5 ml	0,05 %
Seradest	ad. 1 l	

Tabelle 28: Lösung für Silberfärbung

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
AgNO ₃	2 g	0,2 % (w/v)
37 % Formaldehyd	0,75 ml	0,075 %
Seradest	ad. 1 l	

Tabelle 29: Entwickler für Silberfärbung

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Na ₂ CO ₃	60 g	16,7 %
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	4 mg	
37 % Formaldehyd	0,5 ml	0,05 %
Seradest	ad. 1 l	

Tabelle 30: Stopplösung für Silberfärbung

Komponente	Menge/Vol	Endkonz.
Glycin	10 g	1 %
Seradest	ad. 1 l	

4.2.3.6.2 Färbung von Gelen mit Coomassie Brillantblau

Die Gele wurden mit ca. 250 ml in 40 % EtOH, 10 % Essigsäure für 1 bis 2 Stunden fixiert. Nach der Fixierung folgten 2 Waschschrirte mit jeweils für H₂O 10 min. Die Gele wurden nach den Waschschrirten ÜN in Colloidal Coomassie Lösung (CCS) gefärbt. Bevor die Gele in Folien eingeschweißt wurden, wurden sie zweimal für 15 min mit 20 % Methanol und anschließend zweimal für eine Stunde mit Wasser gewaschen. Alle Inkubationsschrirte erfolgten auf dem Schüttler.

Coomassie Brillant Blau Lösung (CBB-stock)

5g Coomassie Brillant Blau G-250 auf 100 ml mit A. dest auffüllen

Colloidal Coomassie Färbelösung (CCD-stock)

50 g (NH₄)₂SO₄

6 ml 85 %ige Phosphorsäure, *ad.* 490 ml A. dest;

10 ml CBB-stock einsetzen

Colloidal Coomassie Lösung (immer frisch ansetzen!!!)

200 ml CCD-stock

50 ml Methanol

4.2.3.6.3 2D-SDS-PAGE mit Fluoreszenzmarkierten Proben (DIGE)

Vorbereitung der Proteinextrakte

Die Extrakte sollten:

- eine Proteinkonzentration von mindestens 1 mg/ml und
- einen pH-Wert von 8-9 aufweisen.

pH-Wert einstellen

Bei einem Experiment mit zwei Proben und einer dreimaligen Trennung jeder Probe werden je 250 µg des zu verwendenden Extraktes, wenn nötig mit Lichrosolv-Wasser auf 50 µl aufgefüllt (nach der pH-Wert Einstellung müssen noch 225 µg Protein übrig sein). Jetzt wird dem Extrakt 1 µl entnommen und auf einen pH-Papierstreifen aufgetropft. Zum Einstellen wird nun ggf. 1 µl einer 50 mM NaOH-Lösung zugegeben. Nach einmaligem Vortexen wird der pH-Wert erneut bestimmt.

Die Entnahme und Zugabe müssen protokolliert werden, damit die Proteinkonzentration des Extraktes hinterher errechnet werden kann.

Durchführung der Fluoreszenzmarkierung - Vorbereitung der Fluoreszenzfarbstoffe

Die Farbstoffe werden in Dimethylformamid (DMF) angesetzt, das wasserfrei und frisch sein muss. Nach Öffnung der Flasche ist diese bei 4 °C aufzubewahren und sollte nicht länger als drei Monate benutzt werden. Die Farbstoffe sind lichtempfindlich und müssen daher dunkel gelagert werden. Auch die Markierung der Extrakte muss im Dunkeln durchgeführt werden.

Die Farbstoffe werden mit DMF versetzt, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 nmol/µl entsteht. Diese kann bis zu ihrem Verfallsdatum bei -20 °C gelagert werden, sollte aber so schnell wie möglich verwendet werden. Diese Stammlösung wird abermals mit DMF verdünnt, so dass eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 400 pmol/µl entsteht. Diese Arbeitslösung sollte nur in kleinen Mengen angesetzt werden, weil der Farbstoff in dieser Lösung nur etwa eine Woche stabil bleibt.

Markierung der Extrakte

Es werden 150 µg des Extraktes von Probe 1 und Probe 2 in je ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und mit 3 µl Arbeitslösung des jeweiligen Farbstoffs (Cy3 oder Cy5) versetzt (400 pmol Farbstoff/50 µg Protein). Als interne Kontrolle werden 75 µg des Extraktes von Probe 1 und Probe 2 in ein weiteres Reaktionsgefäß gegeben und mit Cy2 Arbeitslösung versetzt.

Pipettierschema

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
150 µg bzw. 2* 75 µg (Kontrolle)			
Cy-Farbstoff (je 1200 pmol)	3 µl Cy3	3 µl Cy5	3 µl Cy2
	Kurz vortexen, anzentrifugieren, 30 min im Dunkeln auf Eis inkubieren		
10 mM L-Lysin Lösung	3 µl	3 µl	3 µl
	Kurz vortexen, anzentrifugieren, 10 min im Dunkeln auf Eis inkubieren		
Endvolumen			
Gesamtvolumen nach Vereinigung			
Rehydratisierungslösung ad 1260 µl (420 µl je Strip)			
Rehydratisierung	1 Stunde im Dunkeln bei RT schütteln		

4.2.3.7. β-Galaktosidase-Assay

Der β-Galaktosidase-Assay ist ein gut etablierter Reportergennachweis. Der Kultur wurden 3 ml Probe steril entnommen. 1 ml Zellen wurden bei 4 °C, 5 min, 15.000 rpm geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert. Während der Zentrifugation wird von 1 ml Probe in der entsprechenden Verdünnung die OD bei 540 nm bestimmt. Die eingefrorenen Pellets wurden unmittelbar vor Durchführung der Bestimmung in 800 µl Z-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Toluol wurden die Zellen durch 2 x 20 s

Vortexen (dazwischen 2 min Pause) permeabilisiert. Danach erfolgt eine 5 min-Inkubation bei RT. Die Reaktionen werden im 10-Sekundentakt durch Zugabe von 200 μ l ONPG-Lösung gestartet. Die Start- und Endzeiten werden notiert. Die Inkubation erfolgte im 37 °C-Wasserbad bis zum Eintritt einer gut messbaren Gelbfärbung. Da bei den Kälteproben häufig eine zu schnelle Färbung eintrat, wurden diese Proben 1:10 in Z-Puffer verdünnt, gevortext und dann mit ONPG-Lösung gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l Na_2CO_3 -Lösung im 15 Sekundentakt abgestoppt. Nach dem Abstoppen aller Proben werden die Zelltrümmer durch kurzes Zentrifugieren bei RT pelletiert. Die Farbtintensitäten der Überstände werden bei 420 nm bestimmt. Dabei diente das Assaypuffer ONPG-Gemisch ohne Zellextrakt als Leerwert.

Die Aktivität der β -Galaktosidase wird in Miller-Units angegeben:

[1000 x A420/ (Zeit [min] x Vol [ml] x A540nm)]

Tabelle 31: Puffer zur Messung der β -Galaktosidaseaktivität

Z-Puffer		ONPG-Lösung	
Na_2HPO_4	60 mM	ONPG	4 mg/ml in Z-Puffer, frisch ansetzen
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	40 mM		
KCl	10 mM		
MgSO_4	1 mM	Na ₂ CO ₃ -Lösung	
β -Mercaptoethanol (frisch dazu)	50 mM	Na ₂ CO ₃	1M in Seradest
pH 7,0 einstellen, nicht autoklavieren, 4 °C			

4.3. Arbeit mit Bodenmikrokosmen

Bei der vergleichenden Analyse der Überlebensfähigkeit von Wildtypstämmen und Stämmen mit Mutationen wurden mit unterschiedlichen Resistenzkassetten markierte Wildtypstämme und Mutanten im Gemisch (1:1) in den unsterilen Boden eingebracht und die Lebendzellzahl (LZZ) bzw. Sporentiter zu verschiedenen Zeiten nach der Bodenbeimpfung bestimmt. Der Nachweis erfolgte nach Aufschlammung der Bakterien durch Plattieren auf Selektivmedien, die zur Kontraselektion gegen Pilze auch Cycloheximid enthielten. Gleichzeitig war durch Abtötung der vegetativen Zellen durch Behandlung bei 80 °C für 30 min die Sporulationsfrequenz zu bestimmen, um einen Eindruck von der Bedeutung der Sporulation und alternativer Strategien für das Überleben unter den gewählten Bedingungen im Boden zu gewinnen.

4.3.1. Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens und der Bodenfeuchte

Zur Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens wurden 10 ml Glasbechergläser verwendet. Die Bechergläser wurden gewogen, dann bis knapp unter den Rand mit Boden gefüllt und erneut gewogen. Der Boden wurde anschließend bis zur Sättigung mit Wasser befeuchtet, wobei überschüssiges Wasser durch Umkehren der Becher auf einem Vliespapierstapel und Whatmanpapier entfernt wurde. Die mit wassergesättigtem Boden gefüllten Becher wurden erneut gewogen und zwei Tage bei 105 °C getrocknet. Anschließend wurde das Gewicht des getrockneten Bodens bestimmt. Die maximale Wasserhaltekapazität und die aktuelle Bodenfeuchte des eingesetzten Bodens wurden aus den gemessenen Werten errechnet. Die maximale Wasserhaltekapazität ergibt sich dabei aus dem Wassergehalt von wassergesättigtem Boden (in g) bezogen auf das Trockengewicht des Bodens, die Bodenfeuchte aus dem Wassergehalt des ungetrockneten Bodens (in g) bezogen auf das Trockengewicht des Bodens.

Die Maximale Wasserhaltekapazität betrug 0,413 g H₂O/g Boden (trocken).

Die Bodenfeuchte betrug 0,106 g H₂O/g Boden.

4.3.1.1. Zellanzucht und Inokulierung

Die üN-Kultivierung des verwendeten *Bacillus*-Stammes und der isogenen Mutanten erfolgte in Minimal-Medium mit Glukoseüberschuss (üN-Supplementation), um die Sporulation

weitgehend zu unterbinden. Am Morgen wurde vortemperiertes Minimalmedium (üN-Supplementation) mit der üN-Kultur beimpft und bis zu einer OD₅₄₀ von etwa 0,4 kultiviert. Je Stamm wurden ca. 80 ml (etwa 32 OD-Einheiten) durch 10 min Zentrifugation bei 5.000 rpm bei 20 °C steril geerntet, in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) resuspendiert und die Zellen beider Stämme gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in PBS aufgenommen. Greiner-Röhrchen mit je 1 g Boden wurden mit je 200 µl der Zellsuspension beimpft und gewogen. Gleichzeitig wurden unbeimpfte Kontrollen mit der gleichen Bodenfeuchte hergestellt und gewogen. Alle Röhrchen wurden bei 28 °C, 16 °C und 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das verdunstete Wasser wurde täglich ergänzt, so dass die Bodenfeuchte auf einem Wert von etwa 40-50 % der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens gehalten wurde.

4.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl der inokulierten Bacillen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Bacillen aus dem Boden extrahiert und je zwei Verdünnungsreihen in PBS hergestellt.

Um die Bakterienzellen aus dem Boden zurückzugewinnen, wurde die entsprechende Bodenprobe in 9 ml 0,1 %iger Natriumcholatlösung aufgeschlämmt. Nach Zusatz von 0,2 g Chelating Resin sowie 0,25 g Polyethylenglycol wurde eine Stunde bei 220 rpm und 37 °C geschüttelt. Nach einminütiger Sedimentation der groben Bodenbestandteile wurde der Überstand der Suspension in ein neues Reagenzglas überführt. Davon wurden nach Schütteln 0,5 ml entnommen und mit 4,5 ml PBS gemischt. Für weitere Verdünnungen wurden jeweils 0,1 ml Lösung mit 0,9 ml PBS in Eppendorf-Gefäßen gemischt. Von passenden Verdünnungen wurden pro Verdünnungsreihe je 100 µl je Platte mit Glasperlen verteilt.

Um die Anzahl der sporulierten Zellen im Boden zu bestimmen, wurden geeignete Verdünnungen einer 30 minütigen Hitzebehandlung in einem auf 80 °C erhitzten Wasserbad unterzogen und ebenfalls ausplattiert. Die Plattierung erfolgte auf LB-Agar mit Zusatz je eines selektiven Antibiotikums sowie Cycloheximid zur Hemmung von Pilzwuchs. Der verwendete Wildtypstamm ist durch eine Kanamycin-Kassette upstream des *sigB*-Operons markiert, die isogene *sigB*-Mutante durch eine Spectinomycin-Kassette. Die Platten mit Kanamycin wurden ca. 15 Stunden bei 37 °C inkubiert, Platten mit Spectinomycin ca. 17 Stunden. Durch die so optimierte Inkubationsdauer der Agarplatten konnte der Hintergrund von im Boden vorhandenen antibiotika-resistenten Keimen (ca. 10⁴ CFU/g Boden) bei

kritischen Verdünnungsstufen unterdrückt werden, denn die Wachstumsrate der endogenen Bakterien war auf LB-Platten geringer als die der inokulierten Bacillen.

Als Ausgangszellzahl wurde der Zelltiter der Animpflösung bestimmt. Dazu wurden drei Reihen aufeinanderfolgender 1:10-Verdünnungen in PBS hergestellt (beginnend mit 100 µl Zellsuspension + 900 µl PBS). Von jeder gewählten Verdünnungsstufe werden je zwei Platten pro Selektionsmedium hergestellt. Eine Stunde nach Animpfen der Mikrokosmen wurde die erste Bodenprobe extrahiert.

Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
NaH ₂ PO ₄	0,2 g
Ad 1 L dH ₂ O; pH auf 7,2 einstellen	

5. Ergebnisse

5.1. Bedeutung der generellen Stressantwort und der Sporulation für das Überleben von *B. subtilis* im Boden

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse für die Untersuchung der Bedeutung der generellen Stressantwort und der Sporulation für das Überleben von *B. subtilis* im Boden beschrieben. Für diese Untersuchungen wurden im Labor gut charakterisierte Stämme eingesetzt, um Vergleiche zwischen Versuchen unter definierten Bedingungen in Flüssigmedium mit den Versuchen im Boden zu ermöglichen. Die im Labor untersuchten *Bacillus*-Stämme zeichnen sich zudem durch leichte Transformierbarkeit aus. Mutanten sowie mit Antibiotikaresistenzen markierte Stämme sind deshalb relativ einfach herzustellen. Die Bodenmikrokosmen wurden jeweils mit einem Gemisch aus einem Wildtypstamm und einer isogenen Mutante beimpft, die durch eine Kanamycinresistenz- (Wildtyp) bzw. Spectinomycinkassette (*sigB*-Mutante) markiert waren. In diesen Versuchen wurden prototrophe Stämme verwendet, die durch Transformation des Laborstammes SMY mit den bereits verwendeten Antibiotika-Markern hergestellt wurden. Aminosäure-auxotrophe Stämme wurden bewusst nicht eingesetzt, da sie infolge im Boden fehlender Aminosäuren vermutlich überhaupt nicht wachsen würden oder zwangsläufig mit der Sporulation beginnen müssten.

Alle Bakterien für die Mikrokosmenversuche wurden im Schüttelkolben in Medium mit Glukose- und Aminosäureüberschuss (üN-Supplementation) angezogen, um die Sporulation zu unterdrücken und somit möglichst wenige Sporen in den Boden einzubringen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden solche Kulturen durch Zentrifugation geerntet, mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen und in der entsprechenden Menge PBS aufgenommen. Der Boden wurde mit einem 1:1 Gemisch aus Wildtypzellen und Mutanten beimpft. Eine Bestimmung der Lebendzell- und Sporenzahl des Inokulums lieferte die Ausgangstiter. Eine Stunde nach Beimpfen des Bodens wurde die erste Bodenprobe aus der Versuchsreihe entnommen und die Bakterien-/Sporenzahl bestimmt. Üblicherweise lag die Zahl der nach einer Stunde reextrahierten Bakterien zwischen 80 und 100 %. Durch das gewählte Aufschlammvolumen (10ml) und das für die Ausplattierung gewählte Plattiervolumen (100 µl) lag die geringste, noch bestimmbare Zellzahl bei 10² Zellen pro g Boden.

Die in der Doktorarbeit von Grit Kuhnke bzw. in meiner Diplomarbeit erhobenen Befunde sollten durch weitere Experimente erhärtet werden. Dazu waren andere, vermutlich

ökophysiologisch relevantere Präadaptationen, wie z. B. Vorinkubation durch milden Salzstress, zu testen, um die Funktion des generellen Stressregulons für das Überleben in unsterilem Boden zu untermauern. Der erste Teil dieser Arbeit hatte sich mit der Untersuchung des Effekts der Vorbelastung mit Stressproteinen durch milden Salzschock (4% NaCl für 30 min) auf das Überleben von *B. subtilis* und die isogene *sigB*-Mutante im Boden beschäftigt.

5.1.1. Einfluss einer Präadaptation durch milden Salzschock auf das Überleben im Boden

Aus Versuchen in Flüssigmedium war bekannt, dass *B. subtilis* nach Präadaptation durch milden Stress starken wachstumsverhindernden Stress wesentlich besser überstehen kann (Völker et al., 1999). Dabei hatte sich gezeigt, dass den generellen Stressproteinen bei dieser Präadaptation eine besondere Bedeutung zukommt. Aus diesem Grund habe ich in meiner Diplomarbeit den Einfluss der Vorbelastung der Wildtypzellen und der *sigB*-Mutante mit Stressproteinen durch Vorbehandlung mit mildem Hitzeschock (48 °C für 30 min) untersucht (siehe Abb. 10B in der Einleitung). Um die Analyse der Funktion des generellen Stressregulons zu erweitern, wurden die Zellen einer ökophysiologisch relevanten Präadaptation in Form einer Vorinkubation durch milden Salzstress ausgesetzt und danach in Bodenmikrokosmen bei 28 °C, 16 °C und 4 °C inkubiert.

Der in den bisherigen Versuchen verwendete Wildtypstamm BSM88 sowie seine isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden dazu in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{540} = 0,3$) für 30 min einem milden Salzstress von 4 % NaCl ausgesetzt. Diese milde Vorbehandlung verursacht kein Absterben der Wildtypzellen oder der *sigB*-Mutante. In diesem Versuch zeigte sich, dass bei Inkubation der Bodenmikrokosmen bei 28 °C die Lebendzellzahl des Wildtypstammes etwa langsamer abnahm als die der *sigB*-Mutante (Abb. 11A). Der Wildtypstamm zeigte im Vergleich zur *sigB*-Mutante nach 2 Tagen eine etwa 8fach höhere Gesamtzellzahl. Beide Stämme haben entsprechend unserer Erwartung sporuliert und nach 6 Tagen waren nur noch Sporen zu finden. Der Sporentiter lag im Wildtypstamm, vermutlich verursacht durch das bessere Überleben, 8fach höher als in der *sigB*-Mutante. Die Stressproteine könnten also unter diesen spezifischen Bedingungen zu einer Verbesserung der Sporulationsfrequenz beitragen.

Da für europäische Verhältnisse 16 °C mindestens ebenso ökophysiologisch relevant sind wie 28 °C, war es sinnvoll, den Versuch auch bei dieser Temperatur durchzuführen. Der

Wildtypstamm und die *sigB*-Mutante wurden ebenso in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert, während der exponentiellen Wachstumsphase für 30 min mit 4 % NaCl behandelt und schließlich bei 16 °C in Bodenmikrokosmen inkubiert. In keinem der beiden Stämme wurde die Sporulation ausgelöst und wiederum überlebte der Wildtypstamm etwa 8fach besser als die *sigB*-Mutante (Abb. 11B).

Schließlich wurde nach Vorbeladung mit Stressproteinen auch eine Inkubation der beiden Stämme bei 4 °C getestet, um auch den Effekt sehr niedriger Temperaturen auf das Überleben von Wildtyp und *sigB*-Mutante zu prüfen. Der Wildtypstamm und die *sigB*-Mutante wurden wiederum in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert, während der exponentiellen Wachstumsphase für 30 min 4 % NaCl ausgesetzt und schließlich bei 4 °C in Bodenmikrokosmen inkubiert. Wie bei der Inkubation bei 16 °C war die Sporulation bei der Inkubation der Bodenmikrokosmen bei 4 °C gehemmt. Der Wildtypstamm überlebte etwa 10fach besser als die *sigB*-Mutante. Nach 4 Tagen lag die *sigB*-Mutante nur in Form der mit dem Inokulum eingebrachten Sporen vor. Die Vorbeladung des Wildtypstammes mit Stressproteinen erlaubte ihm, bis zu 8 Tage in Form vegetativer Zellen zu überleben (Abb. 11C).

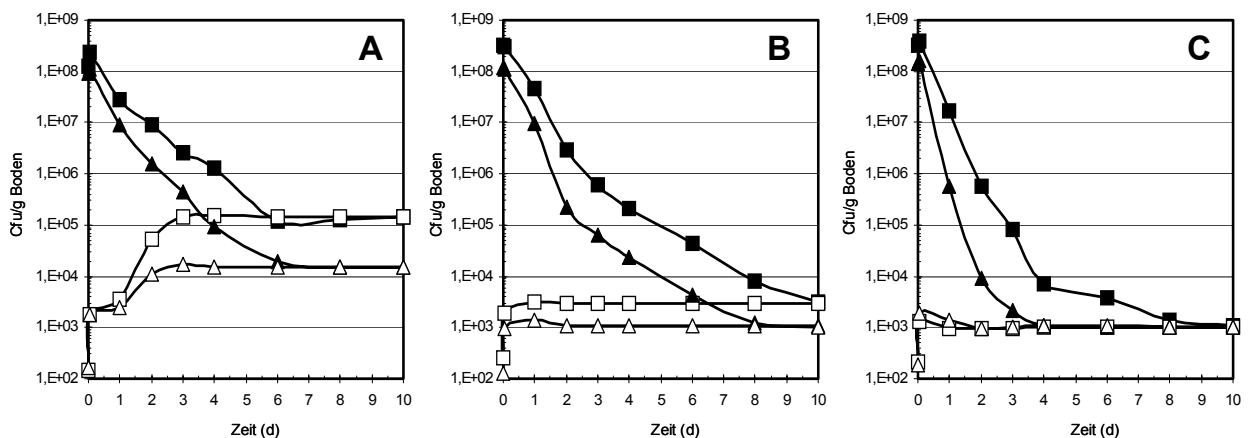


Abb. 11: Überleben und Sporulation des *B. subtilis*-Wildtypstammes BSM88 und seiner isogenen *sigB*-Mutante in Grünlandboden nach Präadaptation durch milden Salzstress. Der Wildtypstamm BSM88 und die isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden bei 37 °C in Minimalmedium mit ÜN-Supplementation kultiviert und in der exponentiellen Phase für 30 min einem milden Salzstress (4 % NaCl für 30 min) unterzogen. Nach Ernte durch Zentrifugation und Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS aufgenommen. Die Bodenmikrokosmen wurden mit einem Gemisch aus Zellen beider Stämme beimpft und bei 28 °C (A), 16 °C (B) und bei 4 °C (C) kultiviert. Es wurde eine Bodenfeuchte von 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Die Zellzahl wurde nach Extraktion der Bakterien aus dem Boden durch Plattieren auf LB-Agar mit Kanamycin oder Spectinomycin bestimmt. Geschlossene Symbole repräsentieren die Lebendzellzahl, offene Symbole den Sporentiter. ■-Wildtyp-Stamm; ▲-*sigB*-Mutante.

5.1.2. Einfluss einer Zugabe von 1 % Glukose auf das Überleben und die Sporulation im Boden bei Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen

Hier wurde die Rolle eines sporulationshemmenden Faktors auf das Überleben von Wildtypzellen und der *sigB*-Mutante untersucht. In Gegenwart von Glukose ist *B. subtilis* zur Vermehrung fähig und daher wird die Sporulation hier als nicht notwendig unterdrückt.

Der Wildtypstamm BSM88 sowie seine isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden dazu in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet und in 1 % glukosehaltiger PBS aufgenommen und nach Beimpfung bei 28 °C in Bodenmikrokosmen inkubiert. Bei diesem Versuch war nur ein geringer Unterschied zwischen Wildtypzellen und der *sigB*-Mutante zu beobachten. Der Wildtyp überlebte etwa 2fach besser als die *sigB*-Mutante, wobei die beiden Stämme nach 4 Tagen in Form von Sporen zu finden waren. Die Sporulation im Boden war im Vergleich ohne Glukosezugabe um einen Tag verzögert (Abb. 12A). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellen die im Boden vorhandene Glukose zunächst für ihre Vermehrung bzw. das Wachstum genutzt haben. Wahrscheinlich war die Glukose nach einem Tag vollständig verbraucht, so dass die Zellen danach unter Nährstofflimitation litten, was zur Auslösung der Sporulation bei dieser Inkubationstemperatur führte (Abb. 12A).

Die Sporulation war verhindert, wenn beide Stämme in 1 % glukosehaltiger PBS aufgenommen und bei 16 °C inkubiert wurden. Auch in diesem Experiment wurde nur ein geringer Effekt der generellen Stressantwort gemessen. Der Wildtyp überlebte etwa 4fach besser als die *sigB*-Mutante (Abb. 12B).

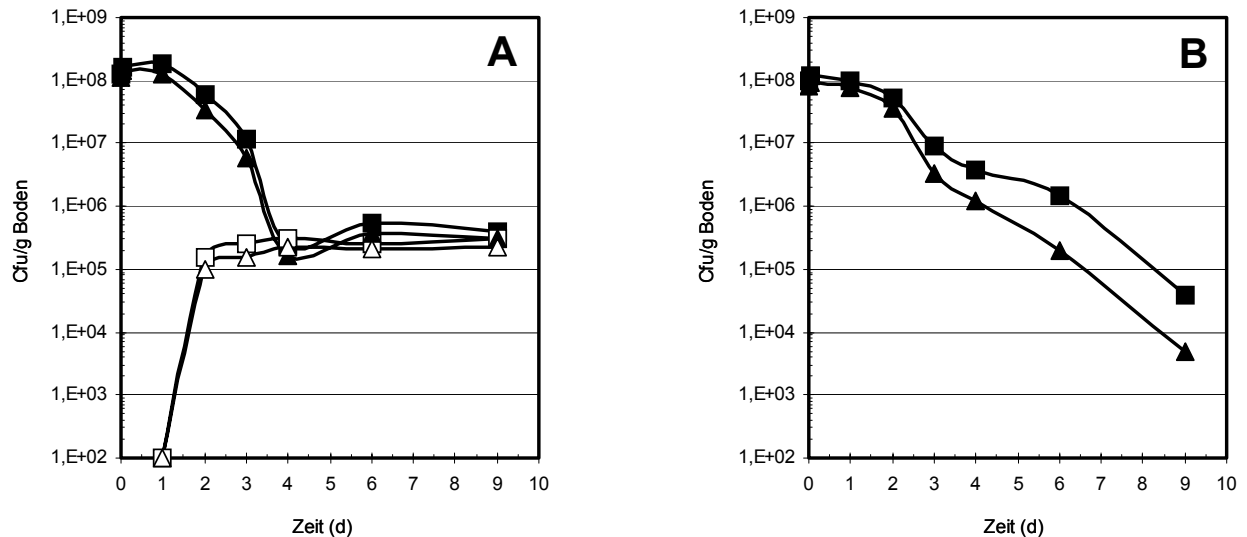


Abb. 12: Überleben des *B. subtilis*-Wildtypstammes BSM88 und seiner isogenen *sigB*-Mutante in Grünlandboden nach Aufnahme in 1 % glukosehaltiger PBS bei 28 °C (A) und 16 °C (B). Der Wildtypstamm BSM88 und die isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden bei 37 °C in Minimalmedium mit ÜN-Supplementation kultiviert, in der exponentiellen Phase durch Zentrifugation und Waschen mit PBS geerntet. Die Zellen wurden dann in 1 % glukosehaltiger PBS aufgenommen. Die Bodenmikrokosmen wurden mit einem Gemisch aus Zellen beider Stämme beimpft und bei 28 °C (A) und 16 °C (B) kultiviert. Es wurde eine Bodenfeuchte von 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Die Zellzahl wurde nach Extraktion der Bakterien aus dem Boden durch Plattieren auf LB-Agar mit Kanamycin oder Spectinomycin bestimmt. Geschlossene Symbole repräsentieren die Lebendzellzahl, offene Symbole den Sporentiter. Die Abbildung zeigt die Werte eines der beiden sich gleichenden Experimente. ■-Wildtyp-Stamm; ▲-*sigB*-Mutante.

5.1.3. Überleben von *B. subtilis*-Stämmen in Boden mit hohem Salzgehalt (10 % NaCl)

In meiner Diplomarbeit gelang es den Nachweis zu führen, dass *B. subtilis* bei niedrigen Temperaturen nicht sporulieren kann. Unter Laborbedingungen ist in Flüssigkulturen die Sporulation auch unter Sauerstoffmangel und höherer Salzkonzentration unterdrückt (Hoffmann et al., 1995 und Ruzal et al., 1998). Um das Überleben von *B. subtilis* und die Rolle der generellen Stressantwort auch unter Hochsalzbedingungen zu klären, wurden die Zellen in 10 % NaCl aufgenommen, in den Boden gebracht, bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und ihr Überleben verfolgt. Eine erste Analyse des Überlebens von *B. subtilis* in Bodenmikrokosmen mit hohem Salzgehalt (1,7 M NaCl im Bodenwasser) wurde im Jahre 2000 von Frau Kuhnke vorgelegt. Diese Versuche deuteten bereits an, dass hohe Salzkonzentrationen im Bodenwasser auch in Bodenmikrokosmen die Sporulation unterdrücken, wobei jedoch nur geringe Überlebensvorteile des Wildtypstammes gegenüber der *sigB*-Mutante zu verzeichnen waren.

Ermuntert durch die Unterschiede, die beim Überleben von Wildtypzellen und *sigB*-Mutante bei Inkubation bei niedriger Temperatur beobachtet wurden, haben wir die Anpassung von

Bacillus-Zellen in Bodenmikrokosmen mit hohem Salzgehalt einer erneuten Detailanalyse unterzogen.

Die Zellen wurden dafür wie üblich in Minimalmedium kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in einer PBS-Lösung, die 1,8 M NaCl enthielt, aufgenommen. Durch Beimpfung des Bodens ergab sich dann durch Verdünnen mit dem Bodenwasser eine NaCl-Konzentration von 1,7 M. Für diese Salzkonzentration wurde bereits von Frau Kuhnke gezeigt, dass beide Zelltypen über mehrere Tage vorwiegend als vegetative Zellen überleben (Kuhnke 2000, Doktorarbeit). In der neuen Versuchsserie sollte nun der Einfluss hoher Salzkonzentration bei verschiedenen Inkubationstemperaturen analysiert werden.

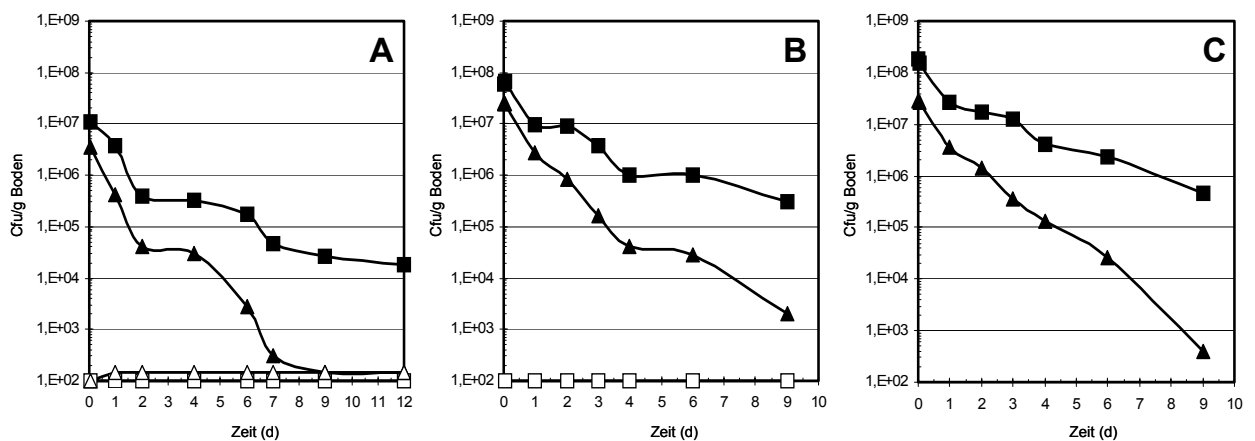


Abb. 13: Überleben des *B. subtilis*-Wildtypstammes BSM88 und seiner isogenen *sigB*-Mutante in Grünlandboden mit 10 % NaCl bei 28 °C (A), 16 °C (B) sowie nach Vorbeladung durch 4 % NaCl für 30 min und Inkubation bei 28 °C (C). Der Wildtypstamm BSM88 und die isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden bei 37 °C in Minimalmedium mit ÜN-Supplementation kultiviert, in der exponentiellen Phase durch Zentrifugation und Waschen mit PBS geerntet. Die Zellen wurden dann in 10 % NaCl-haltiger PBS aufgenommen. Die Bodenmikrokosmen wurden mit einem Gemisch aus Zellen beider Stämme beimpft und bei 28 °C (A) und 16 °C (B) sowie nach Vorbeladung durch 4 % NaCl für 30 min und Inkubation bei 28 °C (C) inkubiert. Es wurde eine Bodenfeuchte von 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Die Zellzahl wurde nach Extraktion der Bakterien aus dem Boden durch Ausplattieren auf LB-Agar mit Kanamycin oder Spectinomycin bestimmt. Geschlossene Symbole repräsentieren die Lebendzellzahl, offene Symbole den Sporentiter. ■-Wildtyp-Stamm; ▲-*sigB*-Mutante.

Der Wildtypstamm BSM88 sowie seine isogene *sigB*-Mutante BSM89 wurden dazu in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet und in 10 % NaCl-haltiger PBS aufgenommen. Bei so hoher Salzkonzentration war bei anschließender Inkubation der Bodenmikrokosmen bei 28 °C zu sehen, dass die Expression des SigB-Regulons den Wildtypzellen einen zusätzlichen Schutz verlieh. Der Wildtypstamm zeigte nach 2 Tagen ein etwa 10fach besseres Überleben als die *sigB*-Mutante; nach 6 Tagen überlebten die Wildtypzellen etwa 20fach und nach 9 Tagen etwa 100fach besser als die *sigB*-Mutante (Abb. 13A).

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden der Wildtypstamm und die *sigB*-Mutante in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert, während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, in 10 % NaCl-haltiger PBS aufgenommen und diesmal bei 16 °C inkubiert. In beiden Stämmen wurde wie erwartet keine Sporulation ausgelöst und die Lebendzellzahlbestimmungen ergaben, dass der Wildtypstamm im Laufe der Zeit etwa 100fach besser als die *sigB*-Mutante überlebte (Abb. 13B).

Eine Vorbeladung der Wildtypzellen mit Stressproteinen durch 4 % NaCl-Schock vor der Aufnahme in 10 % NaCl-haltiger PBS führt zu keiner weiteren Verstärkung des Unterschiedes zwischen Wildtypzellen und der *sigB*-Mutante. Der Wildtypstamm überlebte auch nach Präadaptation mit 4 % NaCl im Verlauf des Experiments etwa 100fach besser als die *sigB*-Mutante (Abb. 13C). Die ermittelte Zelldichte nach dem Animpfen lag für die *sigB*-Mutante unter diesen Bedingungen niedriger als für den Wildtyp, obwohl die eingesetzte Zellmenge (geschätzt anhand der OD-Einheiten der Vorkulturen bei OD₅₄₀) bei beiden Stämmen gleich war (Abb. 13A und C). Dieser Unterschied lässt sich vermutlich damit erklären, dass die *sigB*-Mutante den osmotischen Stress weniger gut kompensieren konnte. Die Zellen waren schätzungsweise für 10 Minuten der 10 % NaCl-Lösung ausgesetzt, wodurch offenbar bereits ein Teil der Zellen abstarb. Diese Erklärung wird erhärtet durch Befunde von Völker et al. (1999), die das Überleben von Wildtypzellen und *sigB*-Mutante bei Salzstress in Flüssigkultur untersucht haben. Sie fanden, dass die Überlebensrate einer exponentiell wachsenden *sigB*-Mutante, die 20 min einem 10 %igem NaCl-Stress ausgesetzt war, auf etwa 1/1000 sinkt. Im Boden scheint die Wirkung von Salzstress dann jedoch geringer zu sein, da die Abnahme der Zellzahl hier langsamer verläuft.

5.2. Untersuchung zur Hemmung der Sporulation bei niedrigen Temperaturen

Die Bodenexperimente lieferten zunächst den überraschenden Befund, dass Bakterien bei Inkubation im Boden bei 4 °C nicht mehr sporulieren (siehe Einleitung, Abb.10). Um diese interessanten Ergebnisse zu stützen, wurden Experimente mit Schüttelkolbenkulturen, die bei niedrigen Temperaturen (16 °C und 13 °C) kultiviert wurden, durchgeführt. Das Ziel dieser Versuche war festzustellen, ob die Sporulation auch in Schüttelkulturen bei niedrigen Temperaturen unterdrückt ist. Da bei der Sporulation in *B. subtilis* vier spezifische Sigmafaktoren beteiligt sind, war es auch interessant zu untersuchen, welche dieser Sigmafaktoren bei niedrigen Temperaturen in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Es war daher sehr nützlich, die Aktivität aller vier Sigmafaktoren bei Wachstum bei niedrigen Temperaturen zu messen. Dazu wurde eine Reihe von Stämmen verwendet, die spezifische *lacZ*-Reporterfusionen für die vier spezifischen Sporulations-Sigmafaktoren SigF (MO2051=> *spoIIQ::lacZ*), SigE (MO1679=> *spoIID::lacZ*), SigG (MO1657=> *sspE::lacZ*) und SigK (Marb20=> *gerE::lacZ*) trugen.

5.2.1. Aktivität der sporulationsspezifischen Sigmafaktoren bei 37 °C und 16 °C

5.2.1.1. Analyse der Sporulation in DSM bei 37 °C und 16 °C

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Difco Sporulationsmedium (DSM). Vorkulturen der Derivate des *B. subtilis*-Laborstammes JH642 wurden im Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter ständigem Schütteln (200 rpm) kultiviert oder in Röhrchen auf dem Roller angezogen. Antibiotika wurden in der entsprechenden Menge oder Konzentration zugegeben. Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden vorgewärmte Medien auf eine OD₅₄₀ zwischen 0,05 und 0,1 angeimpft. Um die Sporulation der Stämme zu verfolgen, wurde 1 ml der Zellen einen Tag nach dem Start des Experimentes entnommen und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Geeignete Verdünnungen der Zellsuspension wurden einer 30 minütigen Hitzebehandlung in einem auf 80 °C erhitzten Wasserbad unterzogen und für die Bestimmung des Sporentiters ausplattiert. Die Zellen nutzten bei der optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C die vorhandenen Nährstoff- bzw. Energiequellen zur Vermehrung und initiierten nach Eintritt in die stationäre Phase die Sporulation. 24 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase waren fast alle Nährstoffe und Energiequellen verbraucht, so dass die Zellen bei 37 °C zu mehr als 70 % in Form von Sporen zu finden waren (Abb. 14).

Zur Untersuchung des Verhaltens bei niedriger Temperatur wurden die verschiedenen Stämme in DSM bei 16 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick) kultiviert, wobei das Kolbenvolumen mindestens dreifach größer war als das Kulturvolumen, um Sauerstoffmangel zu vermeiden (siehe 4.2.2.2). Um die Sporulationskinetik zu bestimmen, wurden täglich 1 ml der Zellen entnommen und die Anzahl der lebenden und der sporulierten Zellen bestimmt. Um die Anzahl der Sporen zu bestimmen, wurden geeignete Verdünnungen einer 30 minütigen Hitzebehandlung in einem auf 80 °C erhitzten Wasserbad unterzogen und ebenfalls ausplattiert. Bei der Analyse der Befunde fiel auf, dass nur 1 % der Zellen sporulieren konnten. Weiterhin konnte bei 16 °C eine kontinuierliche Abnahme sowohl der optischen Dichte als auch der Lebendzellzahl aller vier Stämme beobachtet werden, so dass 14 Tage nach Experimentsbeginn bei drei Stämmen nur noch etwa 1 % der maximalen Zellzahl vorlag. Diese Restzahl von 1 % lag ausnahmslos in Form von Sporen vor. Beim vierten Stamm (Marb20, *gerE::lacZ*) fiel dieses Absterben geringer aus, so dass am Ende des Experiments noch etwa 10 % der maximalen Zellzahl gemessen wurde, wovon etwa 2 % als Sporen vorlagen (Abb. 14). Somit war die Sporulation bei 16 °C in Schüttelkulturen genauso wie im Boden reduziert. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der Reporterfusionen sollte detaillierte Informationen über die Aktivität der einzelnen sporulationsspezifischen Sigmafaktoren während des Wachstums bei 37 °C bzw. 16 °C liefern.

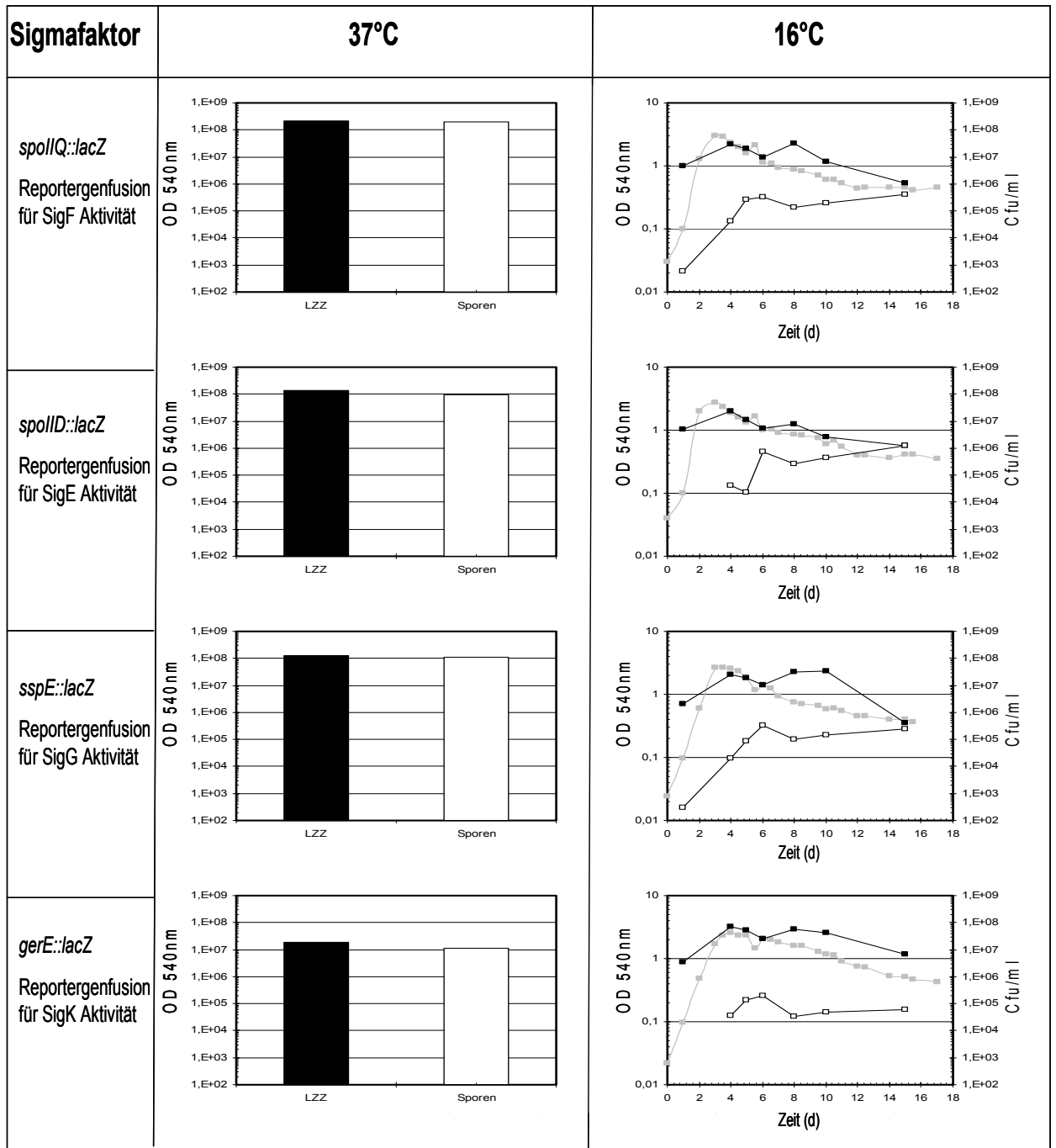


Abb. 14: Überleben und Sporulation der JH642-Stämme bei 37 °C und bei 16 °C. Die Zellen der JH642-Derivate (MO2051=> *spoIIQ::lacZ*), (MO1679=> *spoIID::lacZ*), (MO1657=> *sspE::lacZ*) und (Marb20=> *gerE::lacZ*) wurden in DSM bei 37 °C und bei 16 °C kultiviert. Eine Probe wurde 24 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase (37 °C) entnommen, und für die Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) und der Sporen verwendet. Bei 16 °C wurden die Proben täglich entnommen und analysiert (■ LZZ; □ Sporen; ■ Wachstum).

5.2.1.2. Bestimmung der Aktivität der sporulationsspezifischen Sigmafaktoren SigF, SigE, SigG und SigK bei 37 °C und 16 °C

Die Kultivierung der Bakterien für die Bestimmung der Sporulationskinetik und *lacZ*-Aktivität der Reporterfusionen wurde in Difco Sporulationsmedium (DSM) durchgeführt. Vorkulturen der JH642 Stämme wurden im Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter ständigem Schütteln (200 rpm) kultiviert oder in Röhrchen auf dem Roller angezogen. Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden vorgewärmte Medien auf OD₅₄₀ zwischen 0,05 und 0,1 angeimpft. Um die *lacZ*-Aktivität in den Stämmen zu messen, wurde 1 ml der Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C, 5 min, 15.000 rpm in bestimmtem Zeitabstand geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der vier Stämme zeigte, dass alle Sporulationsgene bei 37 °C aktiv sind. Der erste Sigmafaktor, der im Laufe der Sporulation in der Vorspore aktiviert wird, ist der Sporulationssigmafaktor SigF. Viele Gene unterliegen der Kontrolle durch SigF. Ein typisches Beispiel ist *spoIIQ*. Die Aktivierung von SigF in DSM ließ die *spoIIQ*-Expression steigen. Die Aktivität von SigF war eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase zu sehen (Abb. 15). Der zweite Sigmafaktor, der im Laufe der Sporulation aktiviert wird, ist der Sigmafaktor SigE. Die Aktivierung von SigE in der Mutterzelle ist an die Transkription des SigF-Regulons gekoppelt. Die Aktivierung von SigE in DSM ließ ebenso die *spoIID*-Expression steigen, die ungefähr 90 min nach Eintritt in die stationäre Phase zu erkennen war (Abb. 15). Bevor die Vorspore von der Mutterzelle vollständig umwachsen wurde, wurde das Gen *spoIIIG* (SigG) in der Vorspore von SigF gelesen und transkribiert. Die Aktivität von SigG ließ die *sspE*-Expression etwa 120 min nach Eintritt in die stationäre Phase steigen (Abb. 15). Die späte Genexpression in der Mutterzelle ist das Resultat der Aktivierung von SigK. SigK wird erst nach der Transkription SigG-abhängiger Gene in der Vorspore durch Prozessing aktiviert. Die Aktivierung von SigK ließ die *gerE*-Expression etwa 180 min nach Eintritt in die stationäre Phase steigen (Abb. 15). Diese Ergebnisse stimmen überein mit der Bestimmung des Expressionsprofils von Markergenen der einzelnen Sporulationsregulons im *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 (Steil 2000).

Für eine weitere Serie von Experimenten wurden die verschiedenen Derivate des *B. subtilis*-Laborstammes JH642 in DSM bei 16 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick) kultiviert. Um die *lacZ*-Aktivität in den Stämmen zu messen, wurde wiederum 1 ml der Zellen bei 4 °C, 5 min und 15.000 rpm in bestimmtem Zeitabstand geerntet, der Überstand

verworfen und das Pellet für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der Reporterfusionen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der vier sporulationsspezifischen Sigmafaktoren lieferte dann den überraschenden Befund, dass lediglich die LacZ-Aktivität der SigG- und SigK-abhängigen Fusionen deutlich reduziert war. Die Aktivierung von SigF und SigE in DSM ließ auch bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine starke *spoIIQ*-, und *spoIID*-Expression erkennen. Die hohe β -Galaktosidase-Aktivität erreichte in beiden Fällen ein Maximum von ca. 400 Miller units. Diese Expressionsmaxima der SigF- und SigE-abhängigen Reportergene *spoIIQ* und *spoIID* wurden etwa 2-3 Tage nach Eintritt in die stationäre Phase beobachtet. Nur wenig verzögert war eine schwache Steigerung der Expression der SigG-abhängigen *sspE::lacZ*-Fusion und der SigK-abhängigen *gerE::lacZ*-Fusion zu beobachten (Abb. 15). Das Maximum lag jedoch bei lediglich etwa 50 Miller units. Ein Vergleich der Expressionsdaten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ zeigte, dass die Aktivität der SigF- und SigE-abhängigen Fusionen bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ viel höher ausfiel als bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die SigG- und SigK-abhängigen *sspE::lacZ* und *gerE::lacZ*-Fusionen zeigten genau das entgegengesetzte Bild. Daraus wurde geschlossen, dass der bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ beobachtete Block der Sporulation vermutlich bei der Aktivierung von SigG zu suchen ist. Die extrem hohen Aktivitäten der *spoIIQ* und *spoIID*-Fusionen bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ deuteten jedoch gleichzeitig an, dass die Aktivität der β -Galaktosidase bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ deutlich erhöht sein könnte. Eine mit steigender Temperatur absinkende Aktivität der *E. coli*- β -Galaktosidase in *B. subtilis* wurde in der Literatur schon mehrfach dokumentiert (Völker et al., 1995a; Stoss et al., 1997) Man könnte also im Umkehrschluß vermuten, dass die β -Galaktosidase bei niedriger Temperatur stabilisiert wird. Es war daher notwendig, die Daten aus dem β -Galaktosidase-Assay bei niedrigen Temperaturen durch andere unabhängige Methoden zu stützen. Um die erhaltenen Befunde zu bestätigen, wurde die „Northern-Blot“-Hybridisierung zum Nachweis der mRNA typischer Sporulationsgene eingesetzt.

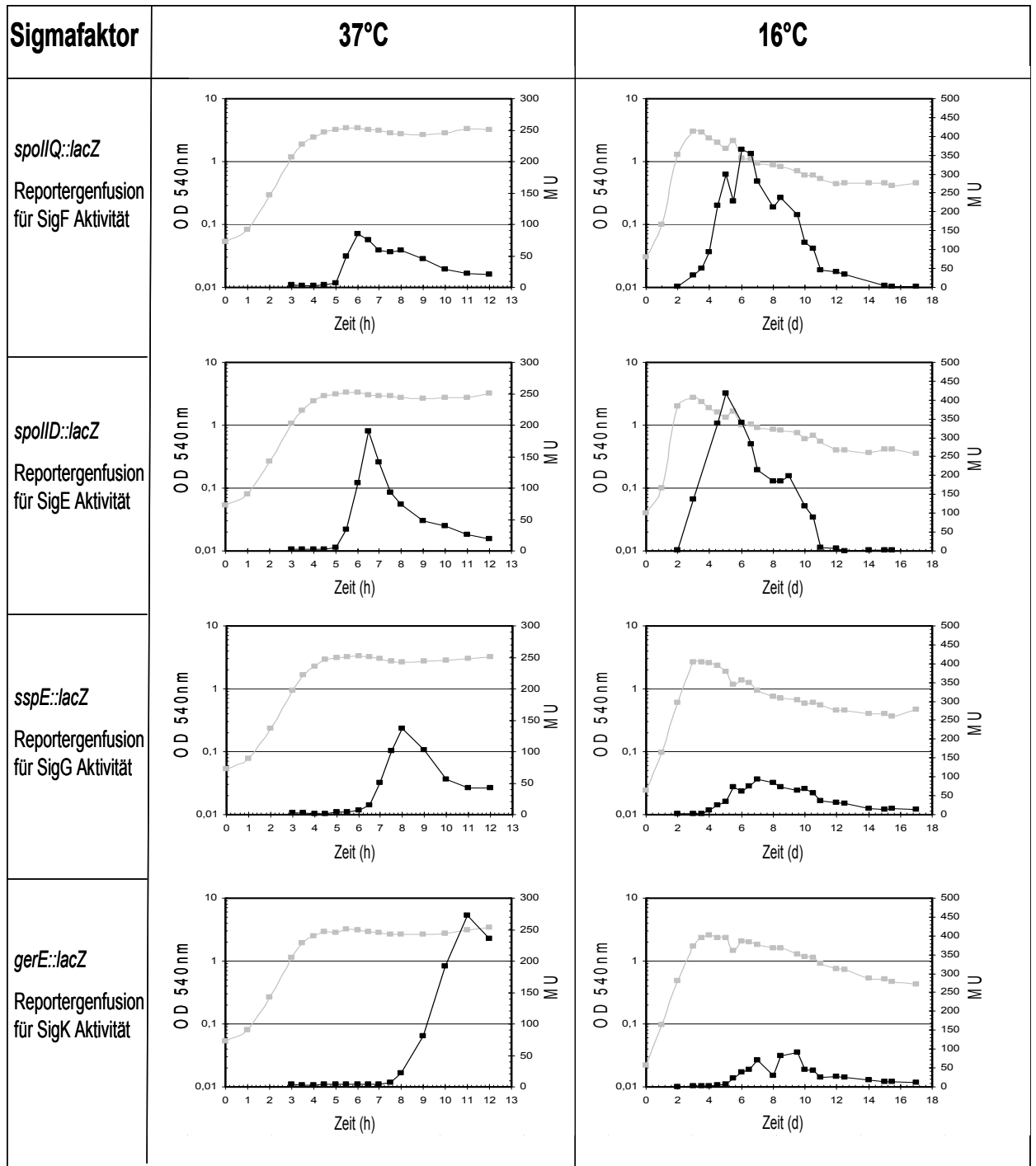


Abb. 15: Messung der Aktivität der vier sporulationsspezifischen Sigmafaktoren bei 37 °C und bei 16 °C. Die Zellen der JH642-Derivate (MO2051=> *spoIIQ::lacZ*), (MO1679=> *spoIID::lacZ*), (MO1657=> *sspE::lacZ*) und (Marb20=> *gerE::lacZ*) wurden in DSM bei 37 °C und bei 16 °C kultiviert. Proben wurden in regelmäßigem Abstand nach Eintritt in die stationäre Phase (37 °C) entnommen und für den β -Galaktosidase-Assay verwendet. Bei 16 °C wurden die Proben täglich entnommen und analysiert (■ Miller units; ■ Wachstum).

5.2.2. Nachweis der Expression sporulationsspezifischer Gene mit Hilfe der „Northern-Blot“ Analyse

Die „Northern-Blot“-Methode wurde angewandt, um die transkriptionelle Aktivität der verschiedenen Sporulations-Sigmafaktoren zu bestimmen. Es wurde eine Kultur des Wildtypstammes JH642 in DSM bei 37 °C kultiviert. Proben wurden zu geeigneten Zeitpunkten nach Eintritt in die stationäre Phase (T_0) entnommen. Die RNA wurde isoliert und eine „Northern-Blot“-Analyse durchgeführt. Für den Nachweis sporulationsspezifischer Gene wurden dann DIG-markierte Sonden gegen das SigF abhängige Gen *spoIIQ*, gegen das für SigG kodierende *spoIII*G und gegen das SigG-abhängige Gen *sspE* verwendet (Abb. 16). Die Analyse des mRNA-Profiles zeigte in Zellen, die bei 37 °C kultiviert wurden, 60 Minuten nach Eintritt in die stationäre Phase (T_0) eine Induktion von *spoIIQ*. Die Induktion von *spoIII*G und *sspE* erfolgte 120 Minuten nach T_0 .

Gleichzeitig wurde eine JH642-Kultur in DSM bei 16 °C kultiviert, wobei Proben in täglichem Abstand nach Eintritt in die stationäre Phase (T_0) entnommen wurden. Auch hier wurde RNA isoliert und für „Northern-Blot“-Analysen verwertet. Der Blot mit DIG-markierten Sonden wurde für dieselben Gene, die bei 37 °C analysiert wurden, ausgeführt. Diese Analyse zeigte eine Induktion von *spoIIQ* einen Tag nach Eintritt in die stationäre Phase (T_0), während die Induktion von *spoIII*G bei T_1 noch relativ schwach war und bei T_2 dann deutlich zu sehen war. Eine stark reduzierte Expression von *sspE* deutete bereits im β -Galaktosidase-Reporterassay darauf hin, dass der Block der Sporulation bei 16 °C wahrscheinlich bei der Aktivierung des Sporulationssigmafaktors SigG liegt (Abb. 15). Die „Northern-Blot“-Analyse ergab in Übereinstimmung mit diesen Vorbefunden nur ein sehr schwaches *sspE*-spezifisches Signal mit RNA, die am 3. Tag nach dem Übergang in die stationäre Phase bei 16 °C isoliert wurde. Da die Proben der bei 16 °C und 37 °C gezogenen Kulturen auf demselben Filter hybridisiert wurden, war auch ein Vergleich der Intensitäten der Signale möglich. Dieser Vergleich ergab bei 37 °C und 16 °C etwa gleich starke Intensitäten für die *spoIIQ*- und *spoIII*G-spezifischen Signale. Lediglich die *sspE*-spezifischen Signale fielen bei 16 °C erheblich niedriger aus als bei 37 °C (Abb. 16).

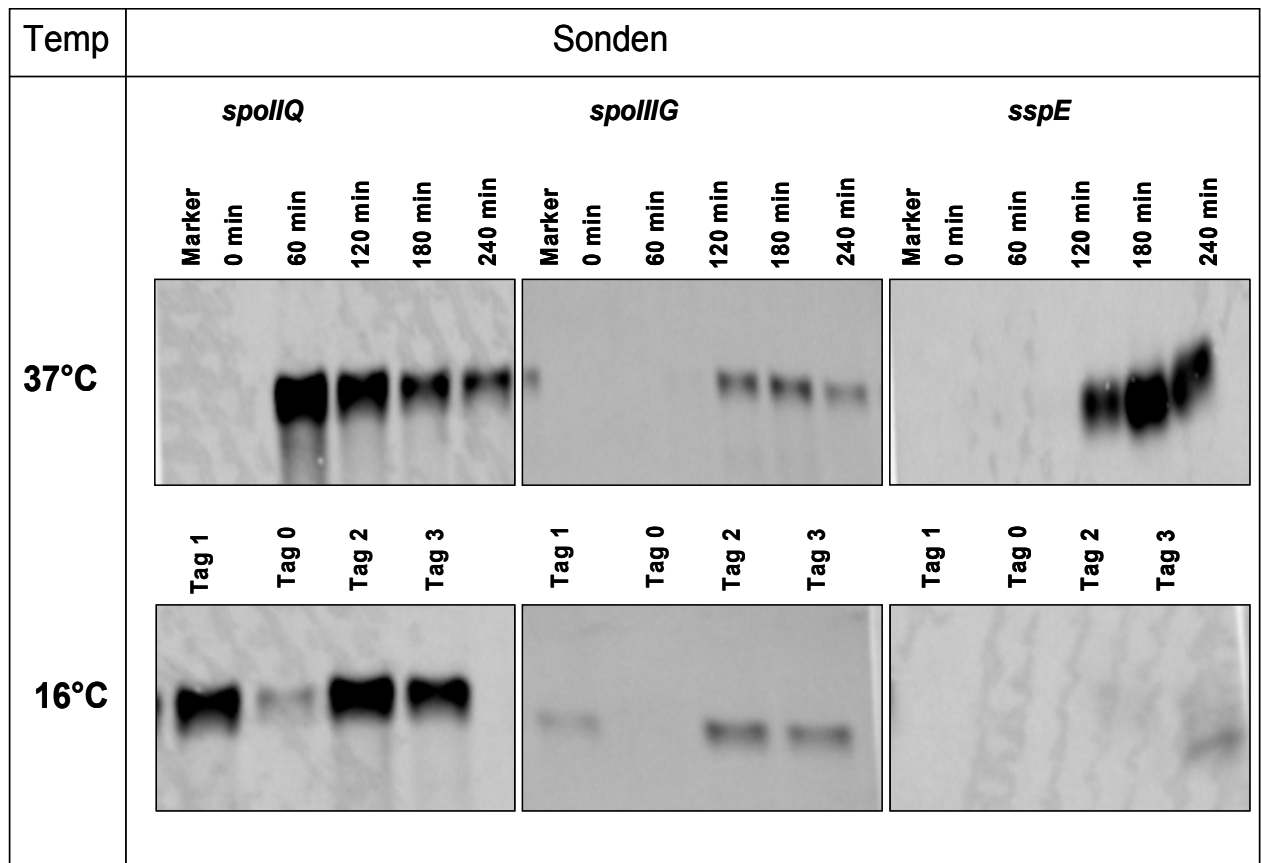


Abb. 16: „Northern-Blot“-Analyse von *spoIID*, *spoIIIG* und *sspE* im Wildtypstamm JH642. Die Bakterien wurden in DSM bei 37 °C und 16 °C kultiviert. Die Proben wurden zu den in der Abbildung gezeigten Zeiten entnommen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, aufgetragen auf ein Agarose-Formaldehyd-Gel und nach Auftrennung dann auf eine Nylon-Membran fixiert. Spezifische Sonden (*spoIIQ*, *spoIIIG* und *sspE*) wurden zum Nachweis der Expression spezifischer Gene eingesetzt.

In der Einleitung wurde bereits geschildert, dass die Aktivierung von SigG einen komplizierten Prozess darstellt, der auf verschiedenen Stufen kontrolliert wird. Vermutlich wird der Sigmafaktor SigG zuerst von dem Anti-Sigmafaktor SpoIIAB in einem Komplex inaktiv gehalten. Die bereits publizierten Daten deuten an, dass die Proteolyse des Anti-Sigmafaktors SpoIIAB erforderlich ist, um SigG aus dessen Umklammerung zu befreien und die zweite Gruppe vorskorenspezifischer Gene zu exprimieren. Auf morphologischer Ebene wird die SigG-Aktivierung durch wenigstens zwei Schritte kontrolliert. Zum einen ist die Expression des *spoIIIA*-Operons erforderlich. Zum anderen ist ein vollständiges Umwachsen der Vorskore von der Mutterzelle für die Aktivierung von SigG notwendig.

Um der Hypothese nachzugehen, dass eine veränderte Interaktion von SigG mit SpoIIAB bei 16 °C an der Verhinderung der SigG-Aktivierung bei 16 °C beteiligt ist, wurden zwei Stämme eingesetzt, die sich lediglich durch eine ortsspezifische Mutation in *spoIIIG* unterscheiden. Bei der *spoIIIG*-Mutante (AH3787; *trpC2metC3 ΔspoIIIG ΔamyE::spoIIIGE156K sspE-lacZ*) ist durch die Punktmutation in SigG (E156K) die Bindung des Anti-Sigmafaktors SpoIIAB an

den Sigmafaktor SigG gestört, so dass es nicht zur Bildung eines inaktivierenden SpoIIAB/SigG Komplexes kommen kann. Die Mutation in SigG hat zur Folge, dass SigG in dieser Mutante ständig frei und in aktiver Form vorhanden ist. Zum Vergleich wurde ein Stamm mitgeführt, der in *amyE* ein Wildtypallel trägt (AH3786). Erwartet wurde hier, dass die Zellen der Mutante bei Wachstum bei niedrigen Temperaturen (16 °C) wegen des Vorhandenseins von freiem SigG sporulieren können. Zwar zeigten die β -Galaktosidasebestimmungen eine höhere transkriptionelle SigG-Aktivität bei intermediärer Temperatur (16 °C) in der SigG-Mutante. Die Mutation in SigG führte aber unerwarteterweise nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Sporulationsfrequenz (Abb. 17).

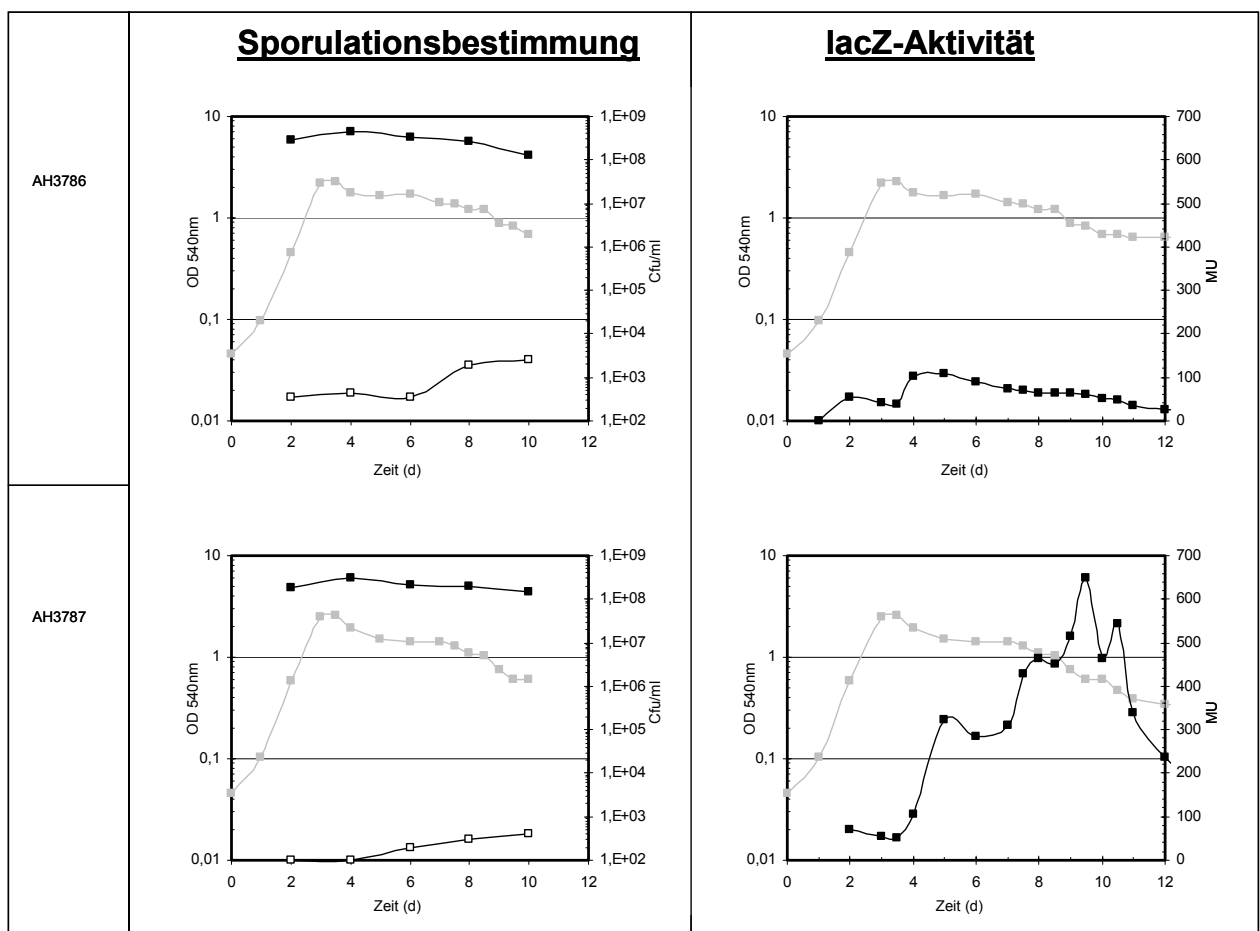


Abb. 17: Überleben, Sporulation und SigG-Aktivität in *B. subtilis*-Stämmen mit unterschiedlichen *sigG*-Allelen. Die *B. subtilis*-Stämme AH3786 (*trpC2metC3 ΔspoIIIG ΔamyE::spoIIIG sspE-lacZ*) und AH3787 (*trpC2metC3 ΔspoIIIG ΔamyE::spoIIIGE156K sspE-lacZ*) wurden in DSM bei 16 °C kultiviert. Die Proben wurden täglich entnommen und für die Bestimmung von Lebendzellzahl, Sporentiter und für die Messung der *sspE::lacZ* Aktivität bei 16 °C verwendet (■ LZZ; ■ Miller Units, □ Sporen; ■ Wachstum).

Die Informationen aus der Abbildung 17 deuteten darauf hin, dass auch die Aufhebung der Komplexierung von SigG durch SpoIIAB die Hemmung der Sporulation bei 16 °C nicht aufheben kann. Neue Experimente, die sich mit der Untersuchung der Bindung von SigG mit

seinem Anti-Sigmafaktor SpoIIAB beschäftigen, zeigen, dass die Bindung von SpoIIAB mit dem Sigmafaktor SigG viel schwächer als die Bindung mit dem Sigmafaktor SigF ist und dass die Menge von SpoIIAB in der Zeit, wo SigG synthetisiert wird, gering ist. Solche Ereignisse weisen darauf hin, dass wahrscheinlich ein weiterer Mechanismus bei der Regulation der SigG-Aktivität beteiligt sein muss (Evan et al. 2003).

Andererseits könnten die in Abb. 17 dargestellten Ergebnisse auch darauf hindeuten, dass neben der Aktivierung von SigG bei niedrigen Temperaturen ein weiterer Schritt blockiert ist - vermutlich die Aktivierung von SigK.

5.2.3. Liegt der Block der Sporulation bei niedriger Temperatur bei dem Sporulations-Sigmafaktor SigK?

Die Daten, die in den mit dem Stamm AH3787 durchgeführten Experimenten erhoben wurden, widersprechen der Vermutung, dass die Blockierung der Sporulation bei niedriger Temperatur allein durch die stabile Bindung von SpoIIAB an SigG verursacht ist. Da aber noch ein Sigmafaktor nach SigG bei der Sporulation aktiv wird (SigK), wäre es möglich, dass zusätzlich bei niedriger Temperatur auch die Aktivität dieses Sigmafaktors SigK beeinflusst wird. Es wurden daher zusätzliche Versuche durchgeführt, in denen die Aktivität von SigK bei niedriger Temperatur gemessen wurde. Dazu wurden Stämme verwendet, die eine Expression von SigK unabhängig von der SigG-Aktivität erlauben. Die Stämme tragen eine Mutation in *bofA* (*trpC2 pheA1 bofA::cat*), einem Gen, das zur negativen Kontrolle der Aktivität von SigK beiträgt. Zusätzlich wurde ein zweiter Stamm in die Analyse einbezogen, der neben der *bofA*-Mutation auch eine *sigG*-Mutation trägt (*trpC2 pheA1 bofA::cat ΔspoIIIG::spc*). In dieser Doppelmutante beobachtet man bei 37 °C typischerweise eine stark erhöhte Expression von SigK-abhängigen Genen, wie z. B. *gerE*.

Um die Aktivität von SigK in beiden Stämmen zu messen, wurde chromosomale DNA aus dem Stamm Marb20 isoliert und in die beiden Stämme transformiert. Die chromosomale DNA enthält eine *gerE::lacZ*-Fusion, die unter Kontrolle von SigK steht.

Die beiden Stämme (BSM316, BSM317) wurden bei 16 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick) kultiviert. Proben wurden täglich entnommen und für die Sporulationskinetik und den β -Galaktosidase-Assay verwendet.

Abb. 18 macht deutlich, dass der Stamm BSM316 (*bofA*-Mutante) 1 % Sporen bildete, während die Doppelmutante BSM317 (*spoIIIG/bofA*-Mutante) keine Sporen bildete. Der Grund für das komplette Ausbleiben der Sporenbildung in der Doppelmutante ist mit

ziemlicher Sicherheit der Defekt in SigG. Die beiden Stämme zeigten trotz der Einführung der *bofA*-Mutation und der damit umgangenen Notwendigkeit von SigG für die SigK-Aktivierung keine deutliche β -Galaktosidase-Aktivität, was die Vermutung erhärtet, dass die Blockierung der Sporulation bei niedriger Temperatur auch auf eine mangelhafte Aktivierung von SigK zurückzuführen ist.

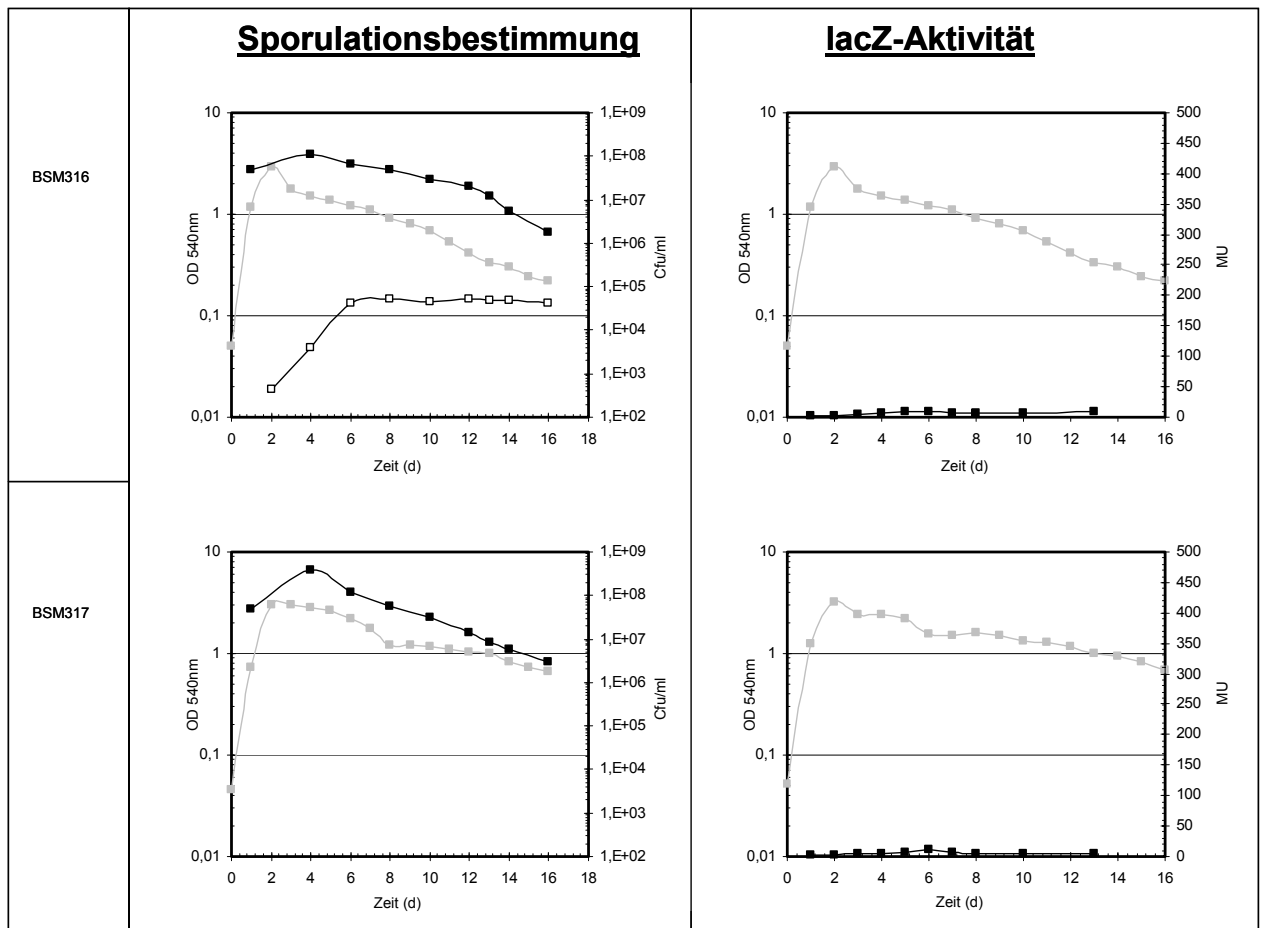


Abb. 18: Überleben, Sporulation und SigK-Aktivität in *B. subtilis*-Stämmen mit einer *bofA* Mutation (BSM316) oder einer *sigG/bofA* Doppelmutation (BSM317) bei 16 °C. Die *B. subtilis*-Stämme BSM316 (*trpC2 pheA1 bofA::cat, SPβgerE-lacZ*) und BSM317 (*trpC2 pheA1 bofA::cat ΔspoIIIG::spc, SPβgerE-lacZ*) wurden in DSM bei 16 °C kultiviert. Die Proben wurden täglich entnommen und für die Bestimmung von Lebendzellzahl, Sporentiter und für die Messung der *gerE::lacZ* Aktivität verwendet. (■ LZZ; ■ Miller Units, □ Sporen; ■ Wachstum).

5.2.4. Bestimmung der Sporulationskinetik und der *lacZ*-Aktivität von *B. subtilis*

bei 13 °C

Das Wachstum von *B. subtilis* bei intermediärer Temperatur (16 °C) zeigte, dass die Sporulation bei dieser Temperatur deutlich reduziert ist. Die Analysen der Aktivität aller vier sporulationsspezifischen Sigmafaktoren ergaben, dass nur die ersten beiden Sporulations-Sigmafaktoren SigF und SigE bei dieser Temperatur aktiv sind. Die β -Galaktosidase-Aktivität erreichte bei SigF und SigE ein Maximum von ca. 350 Miller units. Die Aktivierung von SigG und SigK in DSM war bei 16 °C nur begrenzt möglich, so dass die Aktivität der *sspE*- und *gerE*-Fusionen auf maximal 50-70 Miller units gesteigert werden konnte (Abb. 15). Die erhobenen Daten deuten an, dass sowohl die Aktivierung von SigG als auch die von SigK bei 16 °C ineffizient verläuft.

Es wurde daher eine weitere Serie von Versuchen durchgeführt, in denen geklärt werden sollte, wie die Aktivität der vier sporulationsspezifischen Sigmafaktoren bei noch niedrigeren Temperaturen, die aber noch ein Wachstum zulassen, reguliert wird.

Bei diesem Versuch wurden wieder die Stämme (siehe Abb. 14 und 15) verwendet, die die spezifischen *lacZ*-Reportergenfusionen für die vier spezifischen Sporulations-Sigmafaktoren tragen. Sie wurden jedoch in DSM bei 13 °C kultiviert.

Keiner der vier Stämme hat bei dieser Temperatur Sporen gebildet (Abb. 19). Teilweise neigten die Stämme bei längerer Kultivierung bei 13 °C jedoch zur Zelllyse. Eine β -Galaktosidase-Aktivitätsmessung zeigte, dass weder bei den ersten Sigmafaktoren SigF und SigE noch bei den späten Sigmafaktoren SigG und SigK eine Aktivität nachzuweisen war.

Dies erhärtet die Vermutung, dass bei der intermediären Temperatur (16 °C) nur die ersten beiden Sigmafaktoren aktiv sind. Bei noch niedrigeren Temperaturen (13 °C) bleiben aber alle spezifischen Sporulations-Sigmafaktoren inaktiv und die Sporulation ist folglich komplett unterdrückt.

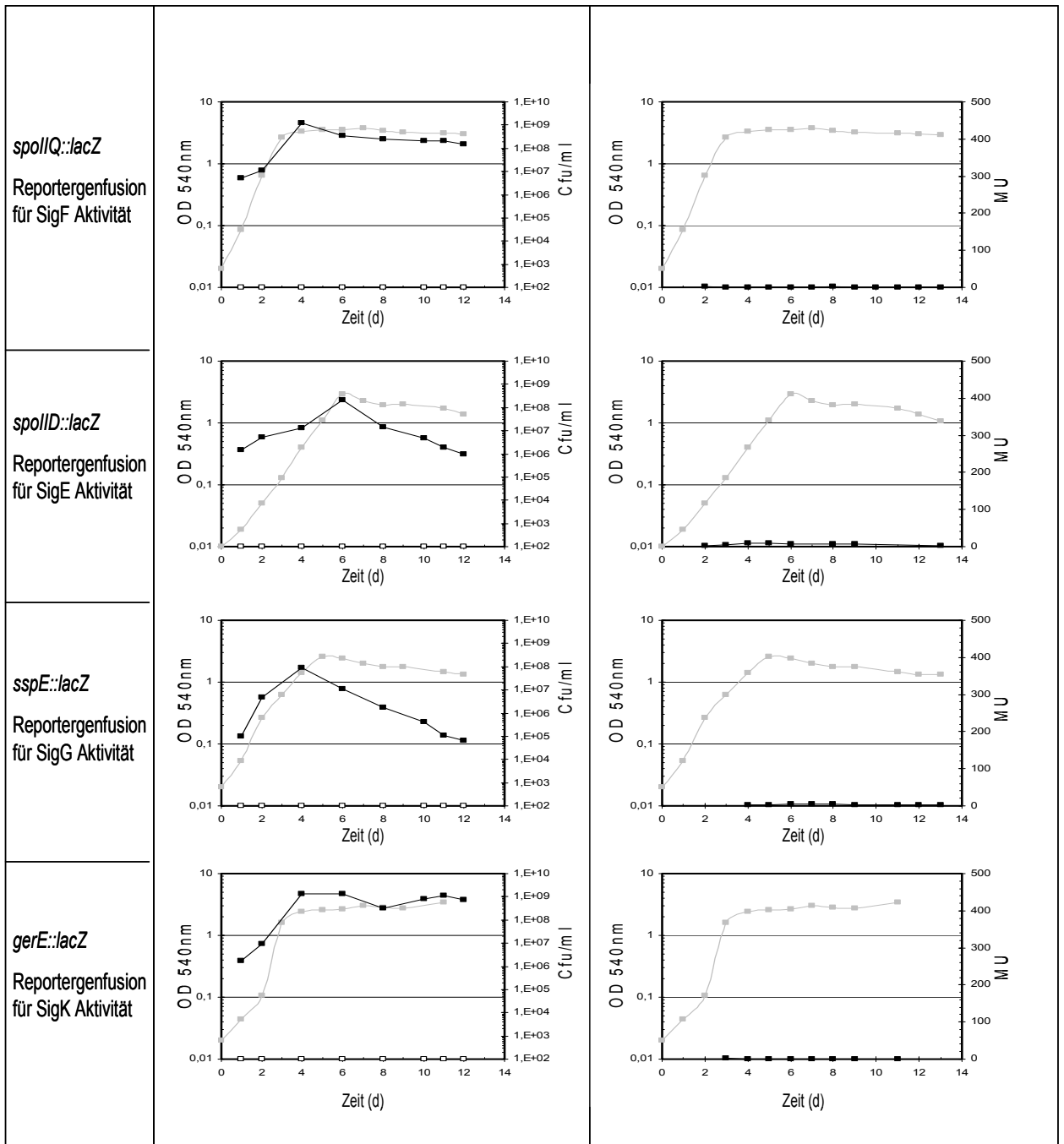


Abb. 19: Überleben, Sporulation und Aktivität der vier sporulationspezifischen Sigmafaktoren bei 13 °C. Die Zellen der JH642 Derivate (MO2051=> *spoIIQ::lacZ*), (MO1679=> *spoIID::lacZ*), (MO1657=> *sspE::lacZ*) und (Marb20=> *gerE::lacZ*) wurden in DSM bei 13 °C kultiviert. Die Proben wurden täglich entnommen und für die Bestimmung von Lebendzellzahl, Sporentiter und für die Messung der *lacZ*-Aktivität bei 13 °C verwendet (■ LZZ; ■ Miller Units, □ Sporen; ■ Wachstum).

5.2.5. Das Überleben von *Bacillus*-Wildtypstämmen bei 13 °C

Da bislang alle Versuche mit Derivaten der Laborstämme JH642 und SMY durchgeführt wurden, war es wichtig, den Effekt der niedrigen Temperatur auf das Überleben von Wildtypstämmen zu untersuchen. Die *B. subtilis*-Stämme FZB24 und NRI sowie der *B. amyloliquefaciens*-Stamm FZB42 wurden in DSM bei 13 °C kultiviert und das Überleben sowie die Sporulation beobachtet. Alle drei Stämme konnten bei 13 °C noch wachsen. Die Sporulation war in FZB24 und NRI deutlich reduziert und bei FZB42 vollständig gehemmt. Die Stämme überlebten jedoch in Form von vegetativen Zellen, wobei ihre Lebendzellzahl im Laufe der Zeit kontinuierlich absank (Abb. 20).

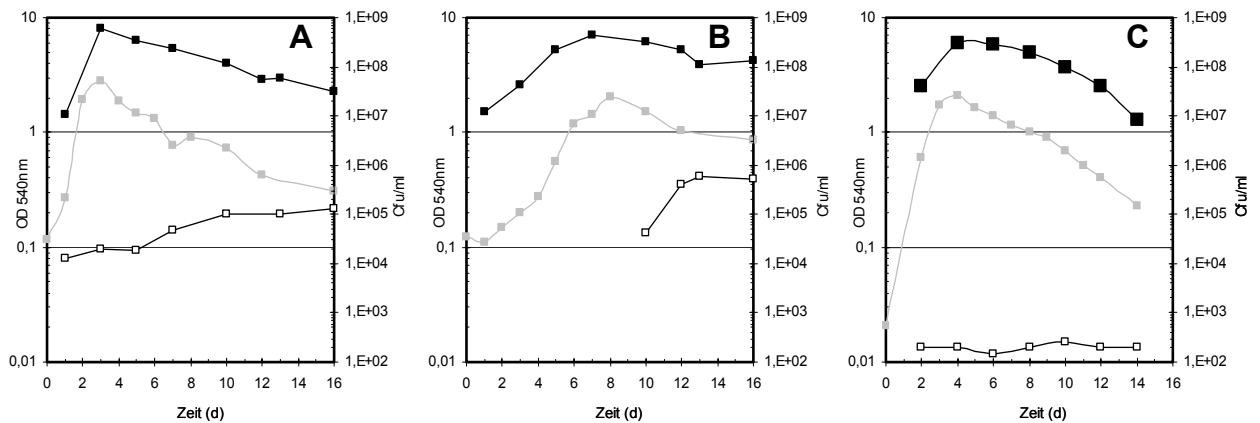


Abb. 20: Überleben und Sporulation der *B. subtilis*-Wildtypstämme FZB 24 (A), NRI (B) und des *Bacillus amyloliquefaciens*-Stammes FZB42(C) bei 13 °C. Die Zellen wurden in DSM bei 13 °C kultiviert. Die Proben wurden täglich nach Eintritt in die stationäre Phase entnommen und für die Bestimmung von Lebendzellzahl (LZZ) und Sporentiter verwendet (■ LZZ, □ Sporen; ■ Wachstum).

5.3. Proteomanalyse exponentiell wachsender und gestresster Zellen des *Bacillus amyloliquefaciens* Stammes FZB42

Der Umweltstamm *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 besitzt die Fähigkeit, das Wachstum von Pflanzen zu fördern, indem er Cyclopeptide und extrazelluläre Enzyme produziert, die antifungal, antibakteriell oder antiviral wirken können (Idriss et al., 2002).

In dem vom BMBF geförderten Genomik-Netzwerk Göttingen werden industriell bedeutsame Bakterien einer Genom-Analyse unterzogen. Einer der Cluster beschäftigt sich mit industriell relevanten *Bacillus*-Arten. In diesem Themenbereich wird neben *Bacillus licheniformis* als Enzymproduzenten auch der das Pflanzenwachstum stimulierende *Bacillus amyloliquefaciens* Stamm FZB42 untersucht. Man erhofft sich aus der Genom-Analyse dieses Bakterienstammes neue Erkenntnisse zur Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Gram-positive Bakterien. Das Genom von FZB42 wurde in Göttingen im Labor von Professor Gerhard Gottschalk sequenziert. Das Genom ist zum jetzigen Zeitpunkt zu 95% sequenziert und in der momentan vorliegenden Sequenz konnten 4307 ORFs entdeckt und davon 3249 zugeordnet werden. Mit dem Abschluss der Sequenzierung und der vollständigen Annotation des Genoms ist noch in diesem Jahr zu rechnen.

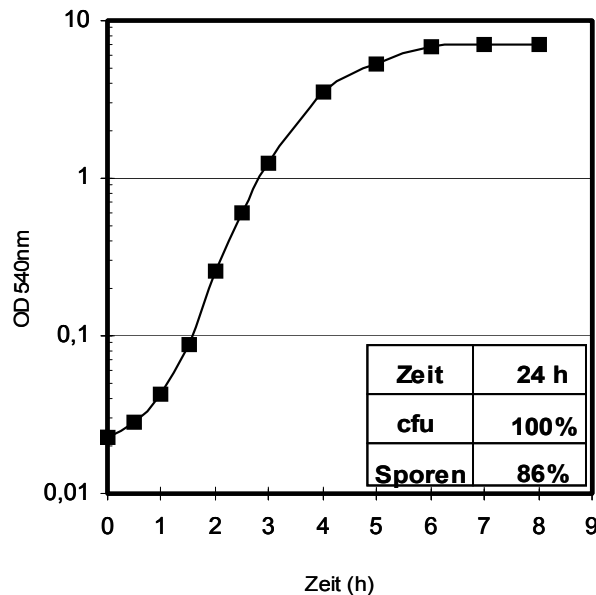


Abb. 21: Wachstum und Sporulation des *B. amyloliquefaciens* Wildtypstammes FZB42 in DSM bei 37°C. Die Zellen wurden in DSM bei 37 °C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde durch die Messung der optischen Dichte bestimmt. Eine Probe wurde 24 Stunden nach Eintritt in der stationären Phase entnommen und für die Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) und der Sporen verwertet.

In Berlin wird von der Arbeitsgruppe um Professor Rainer Borriss die Produktion von Lipopeptiden, die bei der Bekämpfung von Bakterien und Pilzen eine entscheidende Rolle

spielen sollen, untersucht. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Untersuchung der Stressantworten dieses Stammes, die durch Behandlung mit verschiedenen Stressarten wie Salz, Ethanol, Hitze und Kälte ausgelöst werden können.

Vorkulturen von FZB42 wurden im Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter ständigem Schütteln kultiviert. Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden vorgewärmte Medien auf OD₅₄₀ zwischen 0,05 und 0,1 in DSM angeimpft. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte verfolgt, wobei die Zellen in diesem Medium bei 37 °C bis zu einer OD₅₄₀ 5,5 wuchsen und 24 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase 86 % der Zellen als Sporen vorlagen (Abb. 21).

Vor der eigentlichen Charakterisierung der Stressantworten von FZB42 erfolgte eine detaillierte Analyse von Zellen der exponentiellen Phase, um zunächst eine Muster-Proteomkarte dieses *B. amyloliquefaciens*-Stammes zu erzeugen. Ziel dieser Proteomkarte vegetativer Zellen ist die Identifizierung und Annotation einer großen Zahl von Stoffwechsellenzymen, um dann in der Folge den Einfluss von Stressbehandlungen auf den Basisstoffwechsel dieses Stammes abschätzen zu können. Abb. 22 zeigt das Proteinstreifenmuster von FZB42 bei einer OD₅₄₀ von 0,4. Die Proteinstreifen wurden mit einem Spotcutter (Biorad) ausgeschnitten, im Gel mit Trypsin verdaut und nach Extraktion der Peptide durch MALDI-TOF-Analyse identifiziert. Die identifizierten Proteinstreifen sind in der Tabelle 32 zusammengefasst. Da die komplette Genomsequenz von FZB42 derzeit noch nicht verfügbar und insbesondere die Annotation noch als vorläufig zu betrachten ist, wurden die erhaltenen Kandidaten zusätzlich zur Absicherung per BLAST/FASTA-Vergleich mit der *B. subtilis*-Sequenz verglichen. Viele der in *B. amyloliquefaciens* identifizierten Proteine haben erwartungsgemäß Homologe in *B. subtilis* (Tabelle 32).

Die Erstellung der Musterkarte exponentiell wachsender Zellen von *B. amyloliquefaciens* offenbarte auch einige Schwächen, die darauf zurückzuführen sind, dass die Sequenzierung und Annotation dieses Genoms zum Zeitpunkt dieser Analysen noch nicht abgeschlossen waren und deshalb mit einer vorläufigen Arbeitsfassung gearbeitet werden musste. Datenbankvergleiche der erhaltenen Peptidmassenfingerprints ergaben im Vergleich mit der *B. amyloliquefaciens*-Datenbank oft keinen signifikanten Treffer, während die nachfolgende vergleichende Suche mit der *B. subtilis*-Datenbank sofort signifikante Treffer lieferte. Dieser Befund deutet an, dass diese Proteine entweder von Bereichen kodiert werden, die noch nicht sequenziert sind oder dass die bislang durchgeführte automatische Annotation nicht vollständig alle potentiell kodierten Proteine erfasst. Dass die automatische Annotation

kritisch betrachtet werden muss, wurde auch dadurch erhärtet, dass die anschließend durchgeführten Sequenzvergleiche der *B. amyloliquefaciens*-Proteinsequenzen in der Regel *B. subtilis*-Homologe mit einem hohen Grad an Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit lieferten, die funktionelle Annotation aber zum Teil deutlich unterschiedlich war. Dieser Befund unterstreicht die Notwendigkeit zur manuellen Überprüfung automatischer Annotationen, die in Göttingen selbstverständlich nach Abschluss der Sequenzierung und automatischen Annotation vorgenommen werden wird. Um die Schwächen der momentan vorliegenden Arbeitsfassung auszugleichen wurde in den in dieser Arbeit dargestellten Tabellen prinzipiell auf die Annotation aus der *B. subtilis*-Datenbank „SubtiList“ zurückgegriffen. Es ist klar, dass diese Lösung nur einen Kompromiss darstellt, da dadurch nur in *B. amyloliquefaciens* vorkommende Enzyme momentan nicht eindeutig zugewiesen werden können. Deshalb müssen die erhaltenen massenspektrometrischen Daten nach Vorliegen der endgültigen Genomsequenz und Annotation noch einmal mit der *B. amyloliquefaciens*-Datenbank abschließend verglichen werden.

Die in Tabelle 32 zusammengefassten Ergebnisse verdeutlichen, dass neben abundanten Stressproteinen wie GroEL, AhpC und AhpF vor allem Stoffwechsellzyme, die in wachsenden Zellen in großer Menge benötigt werden, identifiziert wurden. Vertreten sind hier neben den Komponenten der Translationsmaschinerie (Elongationsfaktoren und einigen ribosomalen Proteinen) vor allem Glykolyse, Tricarbonsäurezyklus und Energiegewinnung (ATPase).

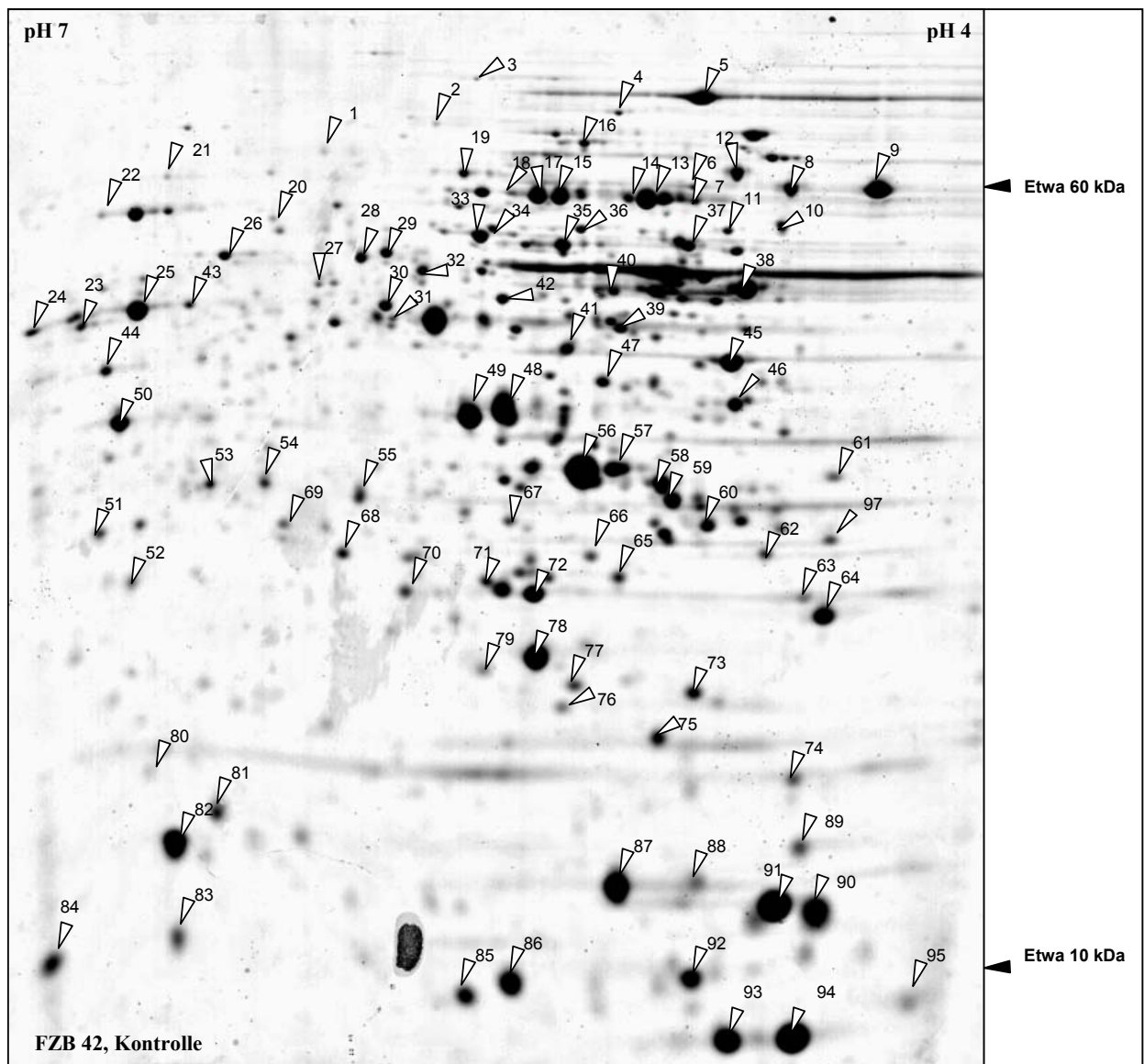


Abb. 22: Proteinmuster des *B. amyloliquefaciens* Wildtypstammes FZB42 von Zellen, die in der exponentiellen Phase geerntet wurden. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{540} von 0,4 kultiviert und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Gewinnung des Proteinrohextraktes erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die in der zweidimensionalen Proteingelelektrophorese aufgetrennte Menge von Proteinen betrug 500 μ g. Die Proteinmuster wurden durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Für die massenspektrometrische Analyse ausgewählte Proteine sind durch Pfeilspitzen markiert und nummeriert (vgl. Tabelle 32).

Tabelle. 32: Liste der identifizierten *B. amyloliquefaciens*-Proteine

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
1	BG10532	SdhA	succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	65308	52	13
2	RBAM01558	YkqC	unknown;	61680	111	18
3	RBAM03518	SecA	preprotein translocase subunit (ATPase)	95231	71	19
4	RBAM03139	PnpA	polynucleotide phosphorylase (PNPase)	79135	105	21
5	BG11939	FusA	elongation factor G	76496	104	18
6	RBAM03260	GuaA	GMP synthetase	47759	120	18
7	BG10210	PdhD	pyruvate dehydrogenase	49702	64	12
8	BG10423	GroEL	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	85	14
9	RBAM03871	Tig	trigger factor (prolyl isomerase)	45738	123	13
10	BG10423	GroEL	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	64	12
11	RBAM00030	AhpF	alkyl hydroperoxide reductase (large subunit) / NADH dehydrogenase	54826	59	12
12	BG10423	GroEL	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	131	16
13	BG10210	PdhD	pyruvate dehydrogenase	49702	122	15
14	BG10210	PdhD	pyruvate dehydrogenase	49702	64	12
15	RBAM02168	PdhC	pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit)	47564	109	11
16	RBAM01192	Pyk	pyruvate kinase	62182	62	13
18	RBAM03001	YurX	similar to unknown proteins	48265	54	11
19	RBAM01753	Pgm	phosphoglycerate mutase	58882	52	12
21	RBAM01558	YkqC	unknown	61680	111	18
23	RBAM00184	MtlD	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	41139	97	15
25	RBAM02166	PdhA	pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit)	41337	82	12
29	RBAM01543	MurAA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	46618	118	17
30	RBAM00625	Ald	L-alanine dehydrogenase	39824	116	15
31	RBAM00565	YugJ	unknown; similar to NADH-dependent butanol dehydrogenase	27258	67	6

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
32	RBAM03964	ArgH	argininosuccinate lyase	51693	53	11
33	RBAM01551	AtpA	ATP synthase (subunit alpha)	54690	124	17
34	RBAM03921	GatA	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit A)	52601	152	20
35	BG11840	MetK	S-adenosylmethionine synthetase	44016	64	11
36	RBAM03923	GatB	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit B)	53420	92	16
37	RBAM01548	AtpD	ATP synthase (subunit beta)	51908	152	17
38	RBAM01750	Eno	enolase	46588	131	18
39	RBAM00675	SucC	succinyl-CoA synthetase (beta subunit)	42539	134	19
40	RBAM00425	TufA	elongation factor Tu	37438	84	11
41	RBAM03836	MreB	cell-shape determining protein	35768	100	15
42	RBAM03967	AckA	acetate kinase	46898	136	19
43	RBAM02166	PdhA	pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit)	41337	69	11
44	RBAM01193	PfkA	6-phosphofructokinase	34240	75	12
45	RBAM02167	PdhB	pyruvate dehydrogenase (E1 beta subunit)	35505	156	15
46	RBAM02732	Pta	phosphotransacetylase	34737	55	9
47	RBAM01183	Mdh	malate dehydrogenase	34685	101	10
48	BG19025	Tsf	elongation factor Ts	32334	98	11
49	RBAM01956	FbaA	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	36116	125	9
50	BG19004	RpsB	ribosomal protein S2	27950	91	8
52	RBAM02477	YfhC	unknown; similar to unknown proteins	22309	84	6
53	RBAM04082	FabI	enoyl-acyl carrier protein reductase	27833	85	12
54	BG10393	DegU	two-component response regulator involved in degradative enzyme and competence regulation	25850	128	14
55	RBAM02246	YkwC	unknown; similar to 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	23703	80	10
56	RBAM03523	Hag	flagellin protein	29491	118	12
57	BG10897	TpiA	triose phosphate isomerase	27013	183	11
58	RBAM03523	Hag	flagellin protein	29491	128	11
59	BG14011	YurY	unknown; similar to ABC transporter (ATP-binding protein)	29013	135	13

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
60	RBAM03939	Adk	adenylate kinase	24092	98	9
61	BG10014	PpaC	inorganic pyrophosphatase	33968	73	11
62	RBAM03775	RpsD	ribosomal protein S4 (BS4)	22882	52	8
64	BG11385	AhpC	alkyl hydroperoxide reductase (small subunit)	20614	68	9
65	BG19016	ClpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (class III heat-shock protein)	21668	55	5
66	BG12581	DeoD	purine nucleoside phosphorylase	25362	59	5
67	BG12675	PyrH	uridylylate kinase	26066	110	11
68	RBAM03078	YvaB	unknown; similar to NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	23336	93	9
69	RBAM04082	FabI	enoyl-acyl carrier protein reductase	27833	108	11
70	RBAM04028	YtiB	unknown; similar to carbonic anhydrase	21309	105	9
71	RBAM01955	YwjH	unknown; similar to transaldolase (pentose phosphate)	23055	129	11
72	RBAM03618	SodA	superoxide dismutase	22365	146	10
75	RBAM03969	Tpx	probable thiol peroxidase	18148	58	7
77	RBAM03294	Ssb	single-strand DNA-binding protein	19248	59	6
83	BG10100	AbrB	transcriptional pleiotropic regulator of transition state genes	10766	82	4
84	RBAM03775	RpsD	ribosomal protein S4 (BS4)	22882	86	6
86	BG10049	RpsF	ribosomal protein S6 (BS9)	11118	65	3
91	BG10726	RplL	ribosomal protein L12 (BL9)	12743	199	4

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Oft konnte dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Sequenzierung noch nicht abgeschlossen ist und gerade die Annotation noch der Vervollständigung bedarf. In diesen Fällen ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. Für Fälle, in denen kein *B. subtilis*-Homolog existiert, muss der Abschluss der Sequenzierung/Annotation abgewartet werden. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen, da sich die Annotation in der vorliegenden Arbeitsfassung einfach noch als zu fehlerhaft erwies. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis*-Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben.

5.3.1. Stressbehandlung des *Bacillus amyloliquefaciens* Stammes FZB42

Proteomanalysen sollten Aufschluss darüber geben, ob die generelle Stressantwort auch im kürzlich aus dem Boden isolierten Stamm *B. amyloliquefaciens* FZB42 zu finden ist. Charakteristisch für die generelle Stressantwort ist, dass eine Gruppe von Proteinen unter unterschiedlichen Stressbedingungen wie Hitzeschock, Ethanolchock und unter Energiemangelbedingungen induziert wird (Hecker und Völker 1998). In diesem Teil der Arbeit wurden die Proteinmuster von FZB42 unter normalen Wachstumsbedingungen und nach Stressbehandlung verglichen. Dazu wurden die Zellen, nachdem sie eine OD₅₄₀ von 0,3 erreicht hatten, für eine Stunde folgenden Behandlungen unterzogen:

Hitze-Stress (48 °C),
Ethanol-Stress (4 %) und
NaCl-Stress (4 %).

Die Behandlung von FZB42 mit Ethanol- und Salzstress hat zur Verlangsamung des Wachstums geführt. Dadurch haben die Zellen nach einstündiger Stressbehandlung mit 4 % NaCl und 4 % EtOH nur eine OD₅₄₀ von 0,46 und OD₅₄₀ 0,52 erreicht. Zum Vergleich wurden exponentiell wachsende Zellen bei einer OD₅₄₀ von 0,4 und eine Stunde später bei einer OD₅₄₀ von 1,27 entnommen. Die zusätzliche Kontrolle war notwendig, da Zellen bei Hitzeschock von 48 °C nahezu ungehindert weiter wuchsen und eine Stunde später sogar eine OD₅₄₀ von 1,32 erreicht hatten.

Zunächst wurden die Veränderungen im Proteinmuster von FZB42 nach einer Stressbehandlung mit 4 % NaCl untersucht. Proben aus exponentiell wachsenden Zellen (OD₅₄₀ 0,4) und salzgestressten Zellen, die eine OD₅₄₀ von 0,46 erreicht hatten, wurden durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinmuster durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Das Proteinmuster der beiden Proben wurde mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D in Falschfarben (Blau: Kontrolle „OD₅₄₀ 0,4“; Orange: salzgestresste Probe) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die vor und nach Stressbehandlung in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Nach Salzstress induzierte Proteine sind an ihrer Orange-Färbung erkennbar und solche, die nach Stresseinwirkung in verminderter Menge auftreten, sind blau eingefärbt.

Die quantitativen Analysen des nach Salzstress veränderten Proteinmusters von FZB42 ergaben, dass mindestens 36 Proteine durch die Salzbehandlung induziert wurden (Abb. 23 und Tabelle 33). Dagegen waren 12 Proteine reprimiert (Abb. 23 und Tabelle 33). Durch die

massenspektrometrische Analyse der tryptischen Verdauung dieser Proteinspots konnten 22 induzierte und 4 reprimierte Proteine identifiziert werden. Genauso wie bei der Erstellung der Masterkarte zeigte sich bei der Identifizierung der Stressproteine, dass die Annotation der *B. amyloliquefaciens*-Sequenz vielfach noch als vorläufig zu betrachten ist, da den Proteinen kaum Funktionen zugewiesen wurden. Um dieses Defizit auszugleichen, wurden die gefundenen Kandidatenproteine ebenfalls per BLAST- bzw. FASTA-Vergleich noch einmal mit der SubtiList-Datenbank (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) verglichen. Zur Gruppe der induzierten Proteine gehörten erstaunlicherweise nur zwei Proteine, die in *B. subtilis* als σ^B -abhängige generelle Stressproteine schon bekannt sind. *Mdh* steht unter der Kontrolle von SigB und kodiert für die Malatdehydrogenase. Ein zweites Protein, das der Kontrolle durch SigB unterliegt, ist YfkM, wobei diesem Protein auch in *B. subtilis* bislang keine Funktion zugewiesen werden konnte. YugJ ist ein weiteres Protein, das als generelles Stressprotein bekannt ist und in *B. amyloliquefaciens* nach Behandlung der Zellen mit Salzstress induziert war. Für dieses Protein ist bisher aber keine Kontrolle durch den alternativen Sigmafaktor SigB bekannt. Ebenfalls durch Salzstress induziert wurde die ATPase Untereinheit ClpX der Clp-Protease.

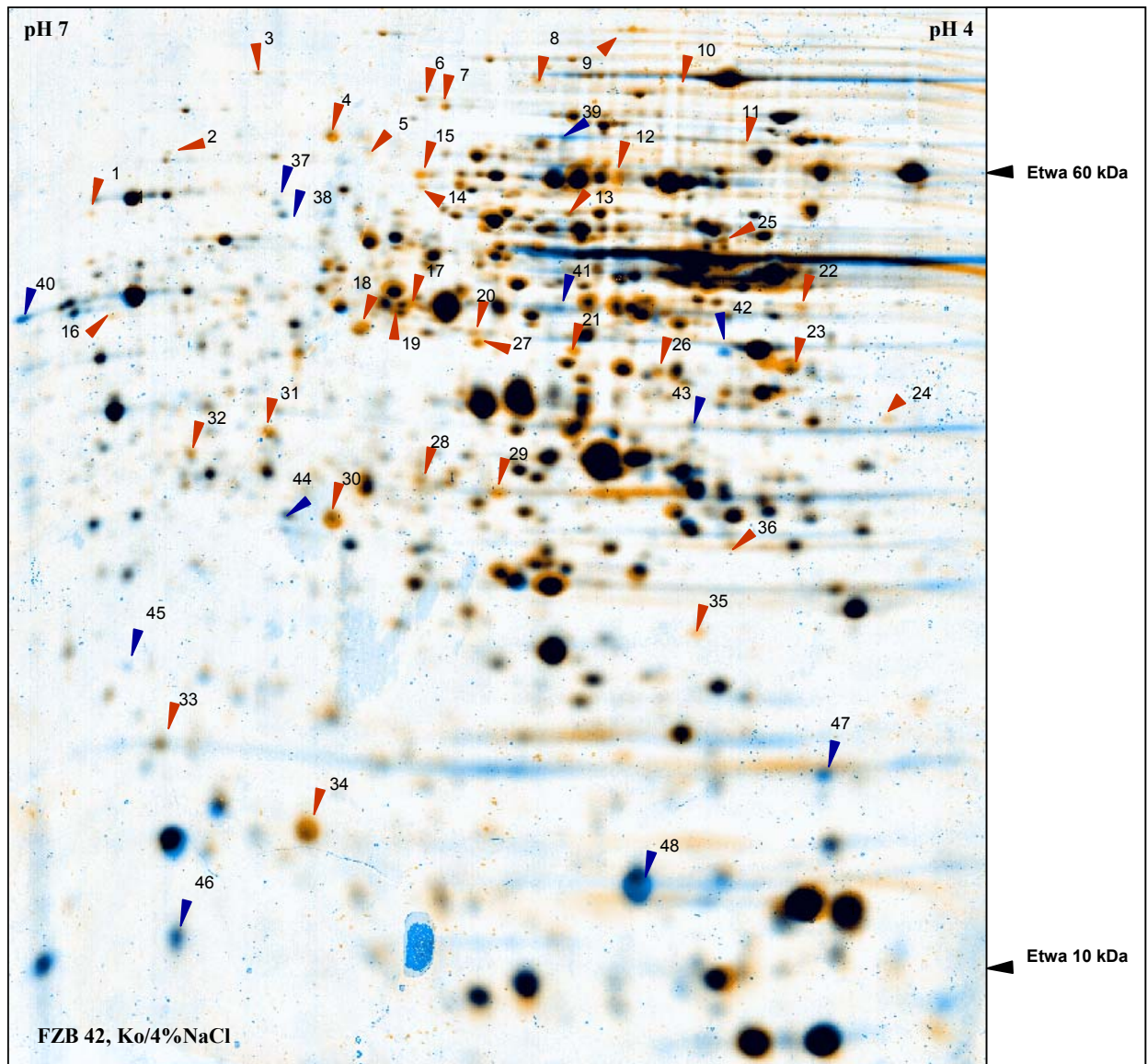


Abb. 23: Analyse des Einflusses von Salzstress auf das Proteinmuster von *B. amyloliquefaciens* FZB42.

Proben aus exponentiell wachsenden Zellen und salzgestressten Zellen wurden durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinmuster durch kolloidale Coomassie-Brillantblau Färbung sichtbar gemacht. Mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D wurden die Proteinmuster in Falschfarben (Blau: Kontrolle „OD₅₄₀ 0,4“; Orange: salzgestresste Probe) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die vor und nach Stressbehandlung in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Nach Salzstress induzierte Proteine sind an ihrer Orange-Färbung erkennbar und solche, die nach Stresseinwirkung in verminderter Menge auftreten, sind blau eingefärbt. Die mit Pfeilen markierten und nummerierten Proteine wurden für eine MS-Analyse und Identifizierung ausgewählt.

Tabelle 33: Liste der nach Salzstress im Vergleich zur Kontrolle in veränderter Menge auftretenden *B. amyloliquefaciens*-Proteine

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Generelle Stressproteine	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
Durch Salzstress induzierte Proteine							
4	RBAM02368	SdhA	-	succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	65033	284	25
5	RBAM03573	GcvPB	-	probable glycine decarboxylase (subunit 2)	55646	61	7
7	RBAM01943	ThrS	-	threonyl-tRNA synthetase (major)	74799	74	12
8	BG13344	YlaG	-	unknown; similar to GTP-binding elongation factor	68346	68	10
10	RBAM03913	LigA	-	DNA ligase (NAD-dependent)	75190	63	11
11	RBAM01455	PtsI	-	PTS enzyme I	47807	100	11
12	RBAM03663	OdhB	-	2-oxoglutarate dehydrogenase (dihydrolipoamide transsuccinylase, E2 subunit)	32541	76	6
13	RBAM01430	LpdV	-	probable branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E3 subunit (dihydrolipoamide dehydrogenase)	50118	96	11
15	RBAM02692	NarH	-	nitrate reductase (beta subunit)	51142	100	9
16	RBAM01321	HemE	-	uroporphyrinogen III decarboxylase	41476	73	10
17	RBAM00625	Ald	-	L-alanine dehydrogenase	39824	260	16
18	RBAM01849	ManA	-	putative mannose-6-phosphate isomerase	35951	266	14
19	BG12364	YugJ	Regulation ungeklärt	unknown; similar to NADH-dependent butanol dehydrogenase	42706	102	8
20	RBAM03854	HemB	-	delta-aminolevulinic acid dehydratase	37191	68	9
23	RBAM02167	PdhB	-	pyruvate dehydrogenase (E1 beta subunit)	35505	286	13
25	RBAM03870	ClpX	-	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (class III heat-shock protein)	46218	193	12
26	RBAM01183	Mdh	SigB-abhängig	malate dehydrogenase	34685	73	8
27	RBAM00297	GalE	-	UDP-glucose 4-epimerase	39356	198	11
28	RBAM04020	MenB	-	dihydroxynapthoic acid synthetase	30642	88	8
29	RBAM02734	Ywfl	-	unknown	26545	76	5
34	BG10282	Ndk	-	nucleoside diphosphate kinase	16948	64	4

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Generelle Stressproteine	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
35	BG12929	YfkM	SigB-abhängig	unknown	18852	70	2
<i>Durch Salzstress reprimierte Proteine</i>							
41	RBAM02166	PdhA	-	pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	55273	60	5
42	BG13836	YtcQ	-	unknown; similar to lipoprotein	41337	52	12
44	RBAM04082	FabI	-	enoyl-acyl carrier protein reductase	27833	108	11
46	BG10100	AbrB	-	transcriptional pleiotropic regulator of transition state genes	10766	82	4

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Wenn dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden konnte, ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis*-Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben.

Die zweite Stressbehandlung, der die *B. amyloliquefaciens* Zellen ausgesetzt wurden, war 4 % EtOH. Proben aus exponentiell wachsenden Zellen (OD_{540} 0,4) und Ethanol-gestressten Zellen, die nach einstündiger Stressbehandlung eine OD_{540} von 0,54 erreicht hatten, wurden durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinmuster durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Das Proteinmuster der beiden Proben wurde wiederum mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D in Falschfarben (Blau: Kontrolle „ OD_{540} 0,4“; Orange: ethanolgestresste Probe) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die vor und nach Stressbehandlung in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Nach Ethanolstress induzierte Proteine sind an ihrer Orange-Färbung erkennbar und solche, die nach Stresseinwirkung in verminderter Menge auftreten, sind blau eingefärbt.

Die quantitativen Analysen des nach Ethanolstress veränderten Proteinmusters von FZB42 (Abb. 24) ergaben, dass mindestens 23 Proteine durch die Ethanolbehandlung induziert wurden. 12 Proteine waren reprimiert (Tabelle 34). Zu den 9 identifizierten induzierten Proteinen gehörten auch die Hitzeschockproteine DnaK und GroEL. Beide unterliegen in *B. subtilis* der Kontrolle durch den HrcA-Repressor und für *B. subtilis* war auch schon eine Induktion durch Ethanolstress beobachtet worden (Mogk et al., 1998). Ähnlich zur Behandlung der Zellen mit 4 % NaCl waren nach der Ethanolbehandlung überraschenderweise kaum σ^B -abhängige generelle Stressproteine als induziert zu identifizieren. Als einziges potentiell Mitglied des SigB-Regulons wurde YkgB, ein Protein mit bislang nicht geklärter Funktion, identifiziert. YugI ist schon in *B. subtilis* als ein durch verschiedene Stressarten induziertes Protein aufgefallen, wobei bisher jedoch keine detaillierten Arbeiten zur Klärung der Stressinduktion von *yugI* ausgeführt wurden.

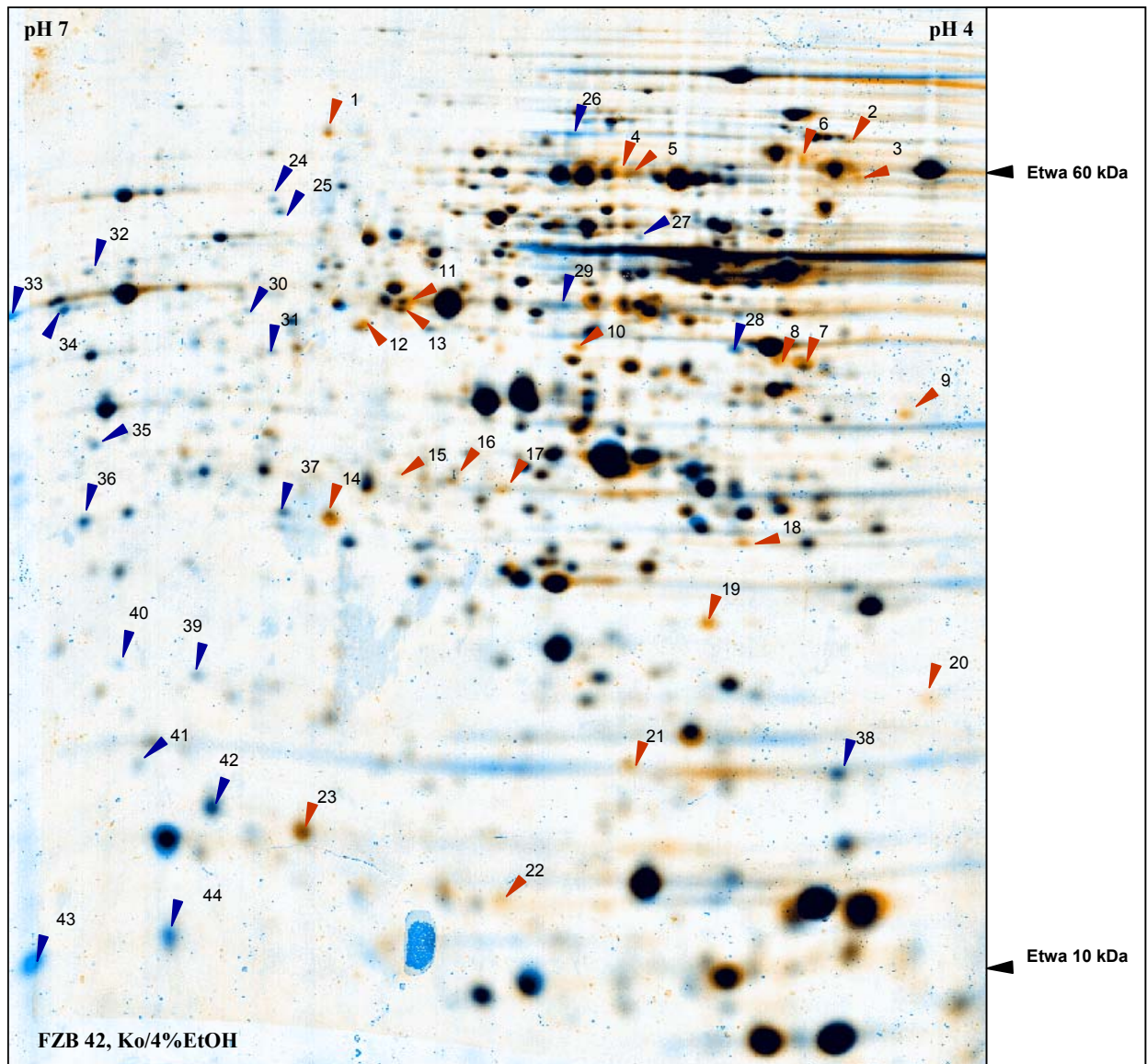


Abb. 24: Analyse des Einflusses von Ethanolstress auf das Proteinmuster von *B. amyloliquefaciens* FZB42. Proben aus exponentiell wachsenden und ethanolgestressten Zellen wurden durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinmuster durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D wurden die Proteinmuster in Falschfarben (Blau: Kontrolle „OD₅₄₀ 0,4“; Orange: ethanolgestresste Probe) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die vor und nach Stressbehandlung in gleicher Intensität vorlagen sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Nach Ethanolstress induzierte Proteine fallen durch ihre Orange-Färbung auf und solche, die nach Stresseinwirkung in verminderter Menge auftreten, sind blau eingefärbt. Die mit Pfeilen markierten und nummerierten Proteine wurden für eine MS-Analyse und Identifizierung ausgewählt.

Tabelle 34: Liste der nach Ethanolstress im Vergleich zur Kontrolle in veränderter Menge auftretenden *B. amyloliquefaciens* -Proteine

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Stressproteine	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
Durch Ethanolstress induzierte Proteine							
1	RBAM02368	SdhA	-	succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	65033	215	22
2	BG10664	DnaK	HrcA-Regulon	class I heat-shock protein (molecular chaperone)	65962	78	6
3	BG10423	GroEL	HrcA-Regulon	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	108	12
6	BG10423	GroEL	HrcA-Regulon	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	82	10
10	RBAM00954	Ldh	-	L-lactate dehydrogenase	34475	90	6
11	RBAM00934	YkgB	SigB-Regulon	unknown	38540	62	8
12	RBAM01849	ManA	-	putative mannose-6-phosphate isomerase	35951	206	16
13	RBAM00565	YugJ	Regulator- unbekannt	unknown; similar to NADH-dependent butanol dehydrogenase	27258	74	5
16	RBAM02734	Ywfl	-	unknown	26545	77	5
Durch Ethanolstress reprimierte Proteine							
28	BG13836	YtcQ	-	unknown; similar to lipoprotein	41337	52	12
29	RBAM02166	PdhA	-	pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	55273	60	5
34	RBAM00184	MtdD	-	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	41139	97	15
37	RBAM04082	FabI	-	enoyl-acyl carrier protein reductase	27833	108	11
43	RBAM03775	RpsD	-	ribosomal protein S4 (BS4)	22882	86	6
44	BG10100	AbrB	-	transcriptional pleiotropic regulator of transition state genes	10766	82	4

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Wenn dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden konnte, ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis*-Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben.

Mit dem Ziel der Identifizierung von Hitzeschockproteinen wurden *B. amyloliquefaciens*-Zellen in einem dritten Teil des Experiments einer einstündigen Hitzebehandlung bei 48 °C ausgesetzt. Proben unbehandelter Kontrollzellen und hitzestresser Zellen wurden bei einer OD₅₄₀ von etwa 1,3 geerntet und Proteinrohextrakte hergestellt. Nach Auftrennung der Proteingemische durch zweidimensionale Proteingelektrophorese wurden die Proteinmuster durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Wie bei der Bearbeitung der salzgestressten und der ethanolgestressten Proben wurde auch hier das Proteinmuster der beiden Proben mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D in Falschfarben (Blau: Kontrolle „OD₅₄₀ 1,3“; Orange: hitzestresser Probe) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die vor und nach Stressbehandlung in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Nach Hitzestress induzierte Proteine sind orange und solche, die nach Stresseinwirkung in verminderter Menge auftreten sind, blau eingefärbt (Abb. 25).

Die Hitzebehandlung der Zellen von FZB42 führte zur Induktion von etwa 34 Proteinen. 11 Proteine wurden nach der Hitzebehandlung reprimiert. In diesem Fall gelang leider nur die Identifizierung von 5 induzierten und von 2 reprimierten Proteinen. Die Ergebnisse dieser Identifizierung, die in der Tabelle 35 dargestellt sind, zeigen, dass zu den induzierten Proteinen erwartungsgemäß auch die Hitzeschockproteine GroEL und DnaK gehören. Beide sind Mitglieder der Klasse I der Hitzeschockproteine, deren Hitzeinduktion durch Inaktivierung des Repressors HrcA vermittelt wird. Die geringe Zahl der identifizierten Proteine ist vermutlich dafür verantwortlich, dass nach der Hitzebehandlung keine Mitglieder des potentiellen SigB-Regulons von *B. amyloliquefaciens* als induziert gefunden wurden.

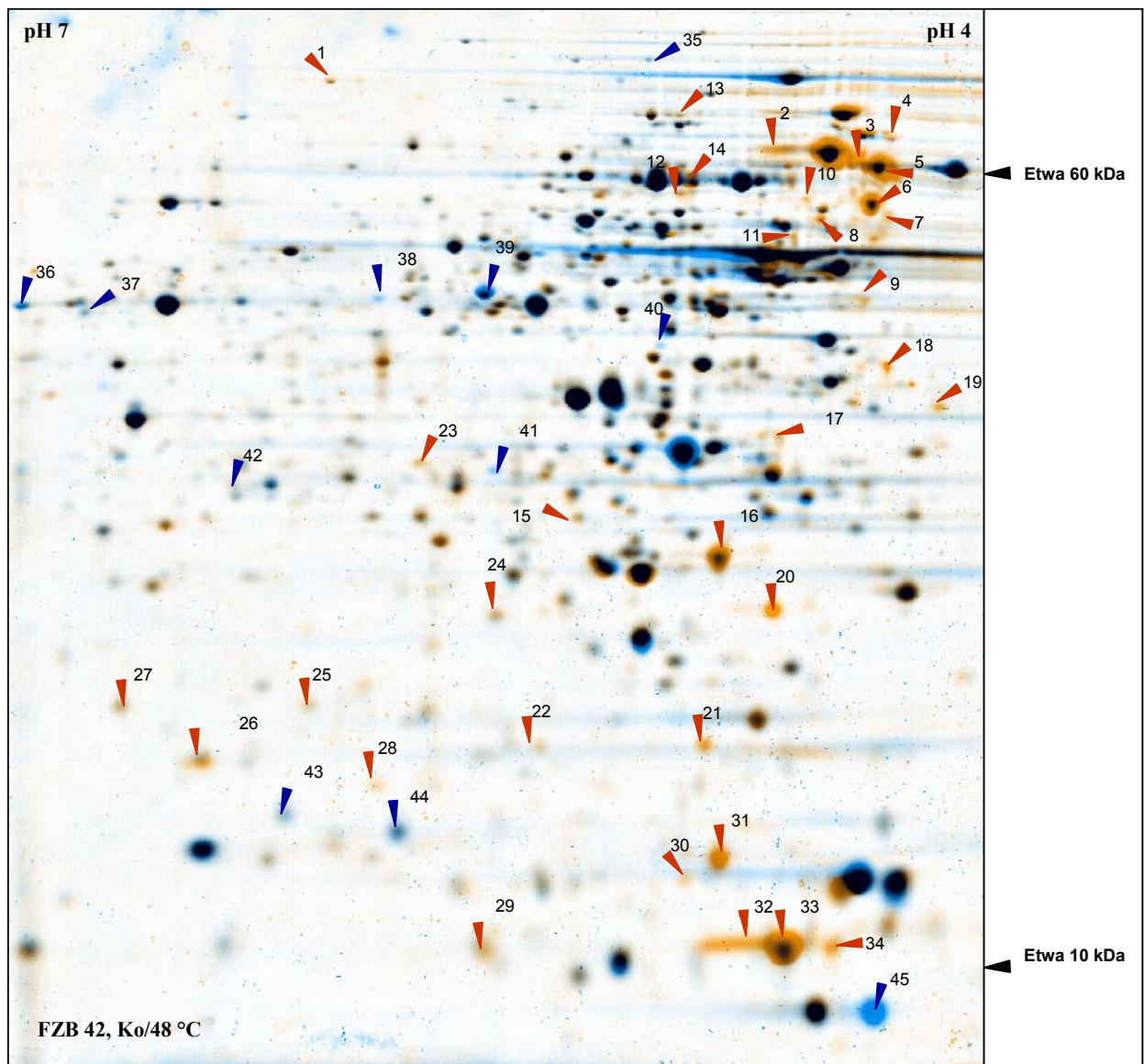


Abb. 25: Analyse des Einflusses von Hitzestress auf das Proteinmuster von *B. amyloliquefaciens* FZB42. Unbehandelte Kontrollzellen und für eine Stunde einem Hitzeschock von 48 °C ausgesetzte Zellen wurden bei der gleichen optischen Dichte geerntet und aus ihnen wurden Proteinrohextrakte hergestellt. Diese wurden in der Folge durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinmuster durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D wurden die Proteinmuster in Falschfarben (Blau: Kontrolle „OD₅₄₀ 1,3“; Orange: hitzestressierte Probe) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die vor und nach Stressbehandlung in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Nach Hitzestress induzierte Proteine sind in ihrer orangen Färbung erkennbar und solche, die nach Stresseinwirkung in verminderter Menge auftreten, sind blau eingefärbt. Die mit Pfeilen markierten und nummerierten Proteine wurden für eine MS-Analyse und Identifizierung ausgewählt.

Tabelle 35: Liste der nach Hitzeschock im Vergleich zur Kontrolle in veränderter Menge auftretenden *B. amyloliquefaciens*-Proteine

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homologe ^c	Stressproteine	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
<i>Hitzestress induzierte Proteine</i>							
3	BG10423	GroEL	HrcA-Regulon	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	116	13
4	BG10664	DnaK	HrcA-Regulon	class I heat-shock protein (molecular chaperone)	65962	90	8
5	BG10423	GroEL	HrcA-Regulon	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	210	14
8	RBAM03870	ClpX		ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (class III heat-shock protein)	46218	100	10
10	RBAM02905	GltX		glutamyl-tRNA synthetase	55942	80	12
<i>Hitzestress reprimierte Proteine</i>							
37	RBAM00184	MtID		mannitol-1-phosphate dehydrogenase	41139	97	15
39	RBAM00625	Ald		L-alanine dehydrogenase	39824	116	15

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Wenn dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden konnte, ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis* Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben.

Im ersten Teil meiner Dissertationsschrift habe ich mich insbesondere mit der Anpassung von *B. subtilis* an Wachstum bei niedriger Temperatur befasst und Befunde dafür vorlegen können, dass bei niedriger Temperatur die Fähigkeit zur Sporulation beeinträchtigt ist und stattdessen andere Adaptationsstrategien eine Schutzfunktion übernehmen müssen. SigB-Mutanten zeigten in Vergleichen mit dem Wildtyp in der Regel eine stärkere Sensitivität. In jüngster Zeit wurde durch mehrere Gruppen (Brigulla et al., 2003, Mendez et al., 2004) auf eine Beteiligung der SigB-abhängigen generellen Stressantwort bei der Adaptation von *B. subtilis* an Wachstum bei niedriger Temperatur hingewiesen. Um die Rolle von Sporulation und genereller Stressantwort bei der Adaptation von *B. amyloliquefaciens* an Wachstum bei niedriger Temperatur einer globalen Analyse zu unterziehen, wurde eine weitere Proteomanalyse ausgeführt. Dazu wurden die Zellen in DSM bei 13 °C und 37 °C kultiviert. Bei einer OD₅₄₀ von 0,8 und T₄ wurden Aliquots der Kulturen geerntet, aufgeschlossen und anschließend ihre Proteinkonzentration bestimmt. Die Kultivierung der Zellen bei 37 °C sollte einerseits als Kontrolle für die bei 13 °C wachsende Kultur genutzt werden und außerdem durch Probenentnahme in der exponentiellen und der stationären Phase eine Abschätzung der Fähigkeit zur Sporulation erlauben. Die Arbeitshypothese bestand darin, dass bei 13 °C eine verstärkte Expression des SigB-Regulons und eine Repression der Sporulation erwartet wurde.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben sollten die Proteinmuster diesmal durch differentielle in Gel-Fluoreszenz-Elektrophorese (2D-DIGE) analysiert werden. Diese innovative Methode macht es möglich, gleichzeitig zwei Proben auf demselben Gel zusammen mit einem Standardgemisch aufzutragen und elektrophoretisch zu trennen. Sie basiert auf den spezifischen Eigenschaften von drei CyDye™ DIGE-Fluoreszenzfarben Cy2, Cy3 und Cy5. Die drei Farbstoffe führen zu gleichartigen Veränderungen der Masse und der Ladung der Proteine, so dass sie gemeinsam im Gemisch eingesetzt werden können. Zwei der Farbstoffe - üblicherweise Cy3 und Cy5 - werden zur Markierung von zwei Proben eingesetzt. Der dritte Farbstoff (Cy2) wird zur Markierung eines Standards, der aus einem Gemisch aller zu analysierenden Proben besteht, genutzt. Mit diesen drei Farbstoffen markierte Proben werden nun gemischt und gemeinsam auf einem Gel aufgetrennt. Anschließend können mit einem speziellen Scanner, der über drei Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen verfügt, alle drei Muster separat ausgelesen werden. Durch diese Vorgehensweise ergeben sich zwei entscheidende Vorteile. Einerseits können die zu analysierenden Proben auf einem Gel ohne Laufunterschiede miteinander verglichen werden. Andererseits erhält man durch die Cy2-Probe einen internen Standard für jedes Protein.

Dieser Standard erlaubt eine statistische Auswertung der Ergebnisse und einen hervorragenden Intergelvergleich, da man für jedes Gel ein Bild mit identischem Muster (Standard) erhält. Mit dieser DIGE-Technologie sind also viel bessere Auswertungen als mit konventionellen Techniken möglich. Gerade bei der Analyse eukaryotischer Proben bringt diese Technologie entscheidende Verbesserungen, da die Unterschiede im Vergleich zu bakteriellen Proben oft viel geringer ausfallen und meist nur unter Verwendung dieser neuen Technik zuverlässige Auswertungen möglich sind.

Als interner Standard wurde hier ein Gemisch aus allen vier Proben des Experiments (OD_{540} 0,8 und OD_{540} T_4 , jeweils bei 13 °C und 37 °C) verwendet. Nach dem Scannen der Gele mit dem Typhon-Scanner wurden die Proteinmuster zusätzlich für die anschließende massenspektrometrische Analyse durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Das Proteinmuster der beiden Proben wurde mit Hilfe einer speziellen Version des Programmpaketes Delta 2D analysiert, das ebenfalls die Einbeziehung des internen Standards erlaubt.

In der ersten Reihe der Versuche wurden die Proteinproben von Zellen, die bei 37 °C kultiviert wurden, verglichen. Mit dem Vergleich von Proben aus der exponentiellen und stationären Phase (T_4) sollte hauptsächlich bestimmt werden, welche Sporulationsgene bei T_4 induziert sind. Proteine, die in der exponentiellen Phase und in der stationären Phase in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar (Abb. 26). Proteine, die in der exponentiellen Phase verstärkt auftreten, sind an ihrer Orange-Färbung erkennbar und solche, die in der stationären Phase in erhöhter Menge auftreten, sind blau eingefärbt. Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten fällt auf, dass sich die Proteinmuster exponentiell wachsender und hungernder Zellen erwartungsgemäß massiv unterscheiden. Die Anzahl blauer oder oranger Spots überwiegt eindeutig gegenüber schwarz eingefärbten Proteinspots. Eine Auswahl der in Abb. 26 zwischen exponentieller und stationärer Phase in veränderter Menge vorkommenden Proteinspots wurde markiert und für die anschließende massenspektrometrische Analyse ausgewählt. Die erhaltenen Befunde sind in Tabelle 36 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit der Erwartung findet man in der stationären Phase Proteine, die neue Nährstoffe verfügbar machen können (Vpr, YhxB, LicH), oder die Katalase KatA, die den nichtwachsenden Zellen Schutz vor oxidativem Stress bietet. In der stationären Phase reprimiert sind vor allem Proteine, die für ein intensives Wachstum notwendig sind, wie zum Beispiel Komponenten des Tricarbonsäurezyklus (CitZ, CitG, Mdh) und des Translationsapparates (FusA, Tig) aber auch Stressproteine wie GroEL, SodA, ClpP und AhpC. Unter den in der stationären Phase verstärkt auftretenden Proteinen waren so gut wie

keine Sporulationsproteine zu finden. Dieser Befund ist umso mehr überraschend, als eine Bestimmung des Sporulationstiters 24 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase ergab, dass etwa 70 % der Zellen als Sporen vorlagen. In *B. subtilis* ist die Expression von Sporulationsgenen bereits 60 bis 90 Minuten nach dem Übergang in die stationäre Phase zu beobachten. Entweder werden die Sporulationsgene in *B. amyloliquefaciens* verspätet exprimiert oder die Proteine hatten zum Zeitpunkt T_4 trotz beginnender Synthese noch nicht die für den Nachweis notwendige Menge erreicht. Ganz eindeutig ist die Zahl der identifizierten Proteinspots noch auszudehnen, um die entsprechenden Sporulationsproteine der SigF- und SigE-Regulons nachweisen zu können.

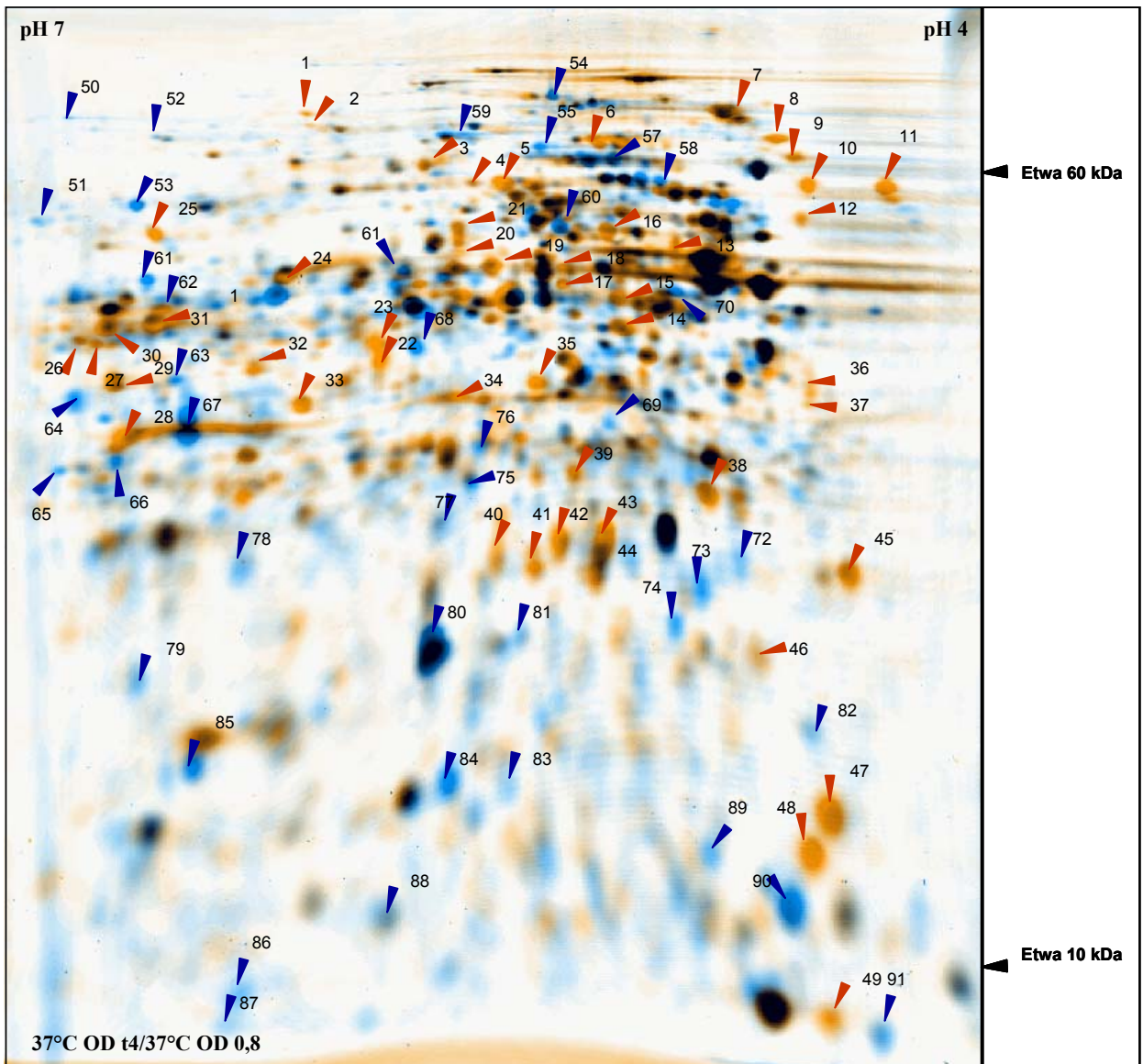


Abb. 26: Vergleich der Proteinmuster von *B. amyloliquefaciens* FZB42-Zellen der exponentiellen und stationären Phase (37 °C). Proben aus der stationären und exponentiellen Phase wurden durch zweidimensionale differenzielle Proteingelelektrophorese (2D-DIGE) aufgetrennt und die Proteinmuster mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D in Falschfarben (Blau: stationäre Phase T₄; Orange: Proteinextrakt aus der exponentiellen Phase „OD₅₄₀ 0,8“) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die in der exponentiellen und stationären Phase in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. In der stationären Phase vermehrt vorkommende Proteine sind an ihrer Orange-Färbung erkennbar und solche, die in verminderter Menge auftreten, sind blau eingefärbt. Die mit Pfeilen markierten und nummerierten Proteine wurden für eine MS-Analyse und Identifizierung ausgewählt.

Tabelle 36: Vergleich der Proteinmuster von *B. amyloliquefaciens* Zellen (37 °C) der exponentiellen und stationären Phase (T₄).

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> -Homologe ^c	Funktion ^d	Spo-Proteine	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
<i>Proteine, die in der stationären Phase in erhöhter Menge auftraten</i>							
53	RBAM01444	KatA	vegetative catalase 1	-	54699	69	5
59	RBAM02335	Vpr	minor extracellular serine protease	-	74178	170	13
56	RBAM01075	Tkt	transketolase	-	72299	68	6
57	RBAM02423	YhxB	unknown; similar to phosphomannomutase	-	46818	67	6
58	BG14007	YurU	unknown	-	52696	93	8
59	RBAM00246	LicH	6-phospho-beta-glucosidase	SigE	48619	66	6
60	RBAM01388	MmgE	unknown	-	56007	103	9
61	RBAM02613	YcgN	unknown; similar to 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-	56608	141	11
70	RBAM01756	Pgk	phosphoglycerate kinase	-	42164	56	5
<i>Proteine, die in der stationären Phase in reduzierter Menge auftraten</i>							
3	RBAM01186	CitZ	citrate synthase II (major)	-	42577	53	5
5	RBAM00111	YngJ	unknown; similar to butyryl-CoA dehydrogenase	SigE	40774	160	11
6	RBAM02613	YcgN	unknown; similar to 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-	48265	176	15
7	BG11939	FusA	elongation factor G	-	76496	143	11
11	RBAM03871	Tig	Trigger factor	-	45738	64	5
9,10,12	BG10423	GroEL	class I heat-shock protein (chaperonin)	-	57389	131	11
20	RBAM03048	CitG	fumarate hydratase	-	50574	57	5
25	RBAM02166	PdhA	pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	-	41337	170	9
28	RBAM01344	ComER	non-essential gene for competence	SigE	30077	71	5
34	RBAM00767	HutG	formiminoglutamate hydrolase	-	36858	70	5
39	BG19016	ClpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (class III heat-shock protein)	-	21668	115	6
38	BG11385	AhpC	alkyl hydroperoxide reductase (small subunit)	-	20614	67	5
45	RBAM03618	SodA	superoxide dismutase	-	22365	70	6

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> -Homologe ^c	Funktion ^d	Spo-Proteine	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
43	RBAM01955	YwjH	similar to transaldolase (pentose phosphate)	-	23055	77	4
41	RBAM04097	YjcG	unknown	-	19460	92	6
14	RBAM01432	Bcd	leucine dehydrogenase	-	34685	114	9
15	RBAM01183	Mdh	malate dehydrogenase	-	41694	102	8

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Wenn dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden konnte, ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis*-Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben.

In Schüttelkolbenversuchen wurde kürzlich durch Kombination von Proteomanalysen, Western-Blot-Analyse und *sigB*-abhängiger Reportergenfusionen gezeigt, dass in *B. subtilis* eine permanent erhöhte Expression des SigB-Regulons bei kontinuierlichem Wachstum bei niedrigen Temperaturen (15 °C) (Brigulla et al., 2003) auftritt. Méndez et al. konnten eine im Vergleich zu 37 °C erhöhte Expression von SigB-abhängigen Genen sogar schon bei 20°C beobachten (Méndez et al., 2004).

Um den Effekt niedriger Temperatur auf die Induktion des SigB-Regulons im *B. amyloliquefaciens* Stamm FZB42 zu untersuchen, wurden die Zellen bei 13 °C kultiviert, bei einer OD₅₄₀ von 0,8 geerntet, aufgeschlossen und die Proteinkonzentration bestimmt. Diese Probe wurde einer vergleichenden Analyse mit Zellen, die in der exponentiellen Phase bei Kultivierung bei 37 °C geerntet wurden, unterzogen. Die beiden Proben wurden wiederum mit DIGE-Fluoreszenzfarben gefärbt und zusammen elektrophoretisch getrennt. Nach Auswertung mit dem Programm DELTA 2D sind Proteine, die in der exponentiellen Phase bei 13 °C und bei 37 °C in gleicher Intensität vorlagen, an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Proteine, die bei 13 °C verstärkt vorkommen, sind orange gefärbt und solche, die in der exponentiellen Phase bei 37 °C in erhöhter Menge auftreten, sind blau eingefärbt (Abb. 27). Eine Auswahl der Spots mit veränderter Intensität wurde für die Identifizierung durch massenspektrometrische Analyse ausgewählt.

Der visuelle Vergleich der Proteinmuster offenbarte bereits, dass im Vergleich zu *B. subtilis* nur eine relativ kleine Zahl von Proteinen bei niedriger Temperatur in erhöhter Menge auftrat. In *B. subtilis* wurden von Brigulla et al. wenigstens 110 Proteinen gefunden, deren Menge bei 15 °C im Vergleich zu 37 °C erhöht war (Brigulla et al., 2003). Leif Steil aus unserer Arbeitsgruppe konnte inzwischen mit weiteren Experimenten noch weitere kältere regulierte Proteinspots lokalisieren und mehr als 150 davon durch massenspektrometrische Analysen identifizieren (Steil et al., persönliche Mitteilung).

Im Rahmen der hier beschriebenen Analyse wurden für *B. amyloliquefaciens* bisher nur wenige differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Die vorläufigen Befunde sind in Tabelle 37 zusammengefasst. Ein Vergleich der hier als kalteinduziert bzw. -reprimiert gefundenen Proteine mit bereits publizierten genomweiten Expressionsanalysen (Beckering et al., 2002; Kaan et al., 2002) und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Bremer erhobenen, bisher nicht publizierten Daten (Budde und Steil, unveröffentlichte Daten) zeigt, dass die in *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* von der Kältere regulierten Proteingruppen durchaus überlappen (Tab. 37).

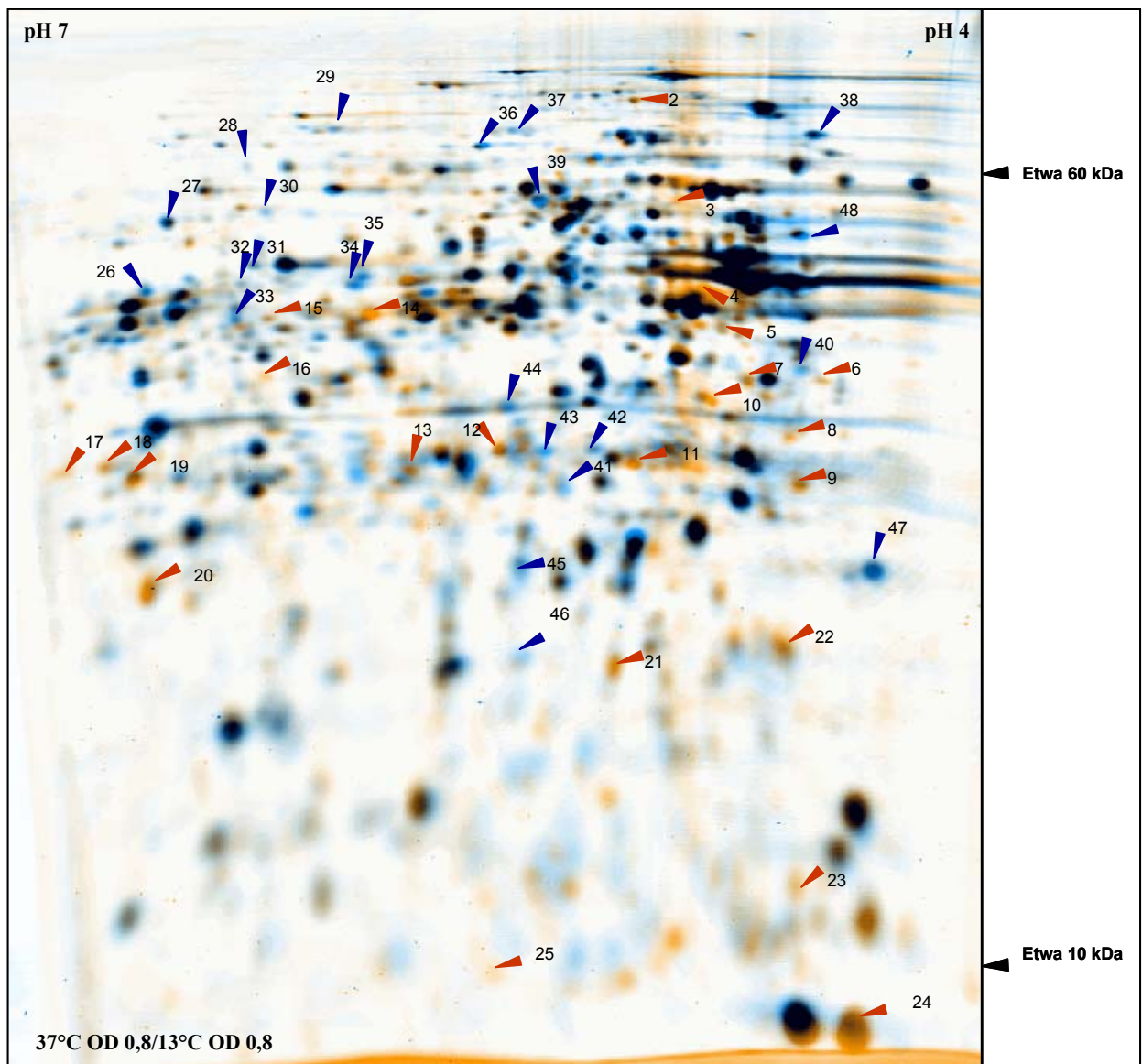


Abb. 27: Proteinmuster von exponentiell bei 37 °C und 13 °C wachsenden Zellen des *B. amyloliquefaciens* Stammes FZB42. Aus Kulturen, die bei 37 °C oder 13 °C inkubiert wurden, wurden in der exponentiellen Phase Proben entnommen und die gewonnenen Proteinrohextrakte nach Markierung mit Cy-Dyes durch zweidimensionale Proteingelelektrophorese (2D-DIGE) aufgetrennt. Mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D wurden die Proteinmuster in Falschfarben (Blau: Proteinmuster der exponentiellen Phase bei 37 °C; Orange: Proteinmuster der exponentiellen Phase bei 13 °C) eingefärbt und zur Deckung gebracht. Proteine, die in der exponentiellen Phase sowohl bei 37 °C als auch bei 13 °C in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Kälte-induzierte Proteine sind orange eingefärbt und solche, die bei 13°C nur in verminderter Menge auftraten, sind blau eingefärbt. Mit Pfeilen markierte Proteine wurden für die MS-Analyse ausgewählt.

Tabelle 37: Vergleich der Proteinmuster der exponentiellen Phase bei Kultivierung bei 37 °C und 13 °C.

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homolog ^c	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
bei niedriger Temperatur induziert Proteine						
4	RBAM02386	Ddl	D-alanyl-D-alanine ligase A	40748	150	10
5	RBAM02167	PdhB*	pyruvate dehydrogenase (E1 beta subunit)	35505	162	13
22	RBAM03416	GreA	transcription elongation factor	17348	57	4
23	BG10422	GroES	class I heat-shock protein (chaperonin)	10170	65	4
bei niedriger Temperatur reduziert vorkommende Proteine						
27	RBAM01788	AppA	oligopeptide ABC transporter (oligopeptide-binding protein)	63390	118	11
35	RBAM02751	RocA	pyrroline-5 carboxylate dehydrogenase	57692	116	10
29	RBAM00846	SerA*	phosphoglycerate dehydrogenase	56514	95	8
36	RBAM03324	RpoC	RNA polymerase (beta' subunit)	135602	56	6
38	BG10664	DnaK*	class I heat-shock protein (molecular chaperone)	65962	63	7
48	RBAM01548	AtpD*	ATP synthase (subunit beta)	51908	141	13
40	RBAM02201	AcoB	acetoin dehydrogenase E1 component (TPP-dependent beta subunit)	36822	89	6
43	RBAM00919	DppA	D-alanyl-aminopeptidase	30251	57	4

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Wenn dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden konnte, ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis*-Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben. Proteine, die in bereits publizierten Studien bzw. in bisher nicht veröffentlichten Analysen (Budde und Steil, persönliche Mitteilung) durch eine kältevermittelte Regulation der Proteinmenge aufgefallen sind, sind durch einen Stern neben der Proteinbezeichnung markiert.

Zusätzlich zum Vergleich der Proteinmuster von Zellen der exponentiellen Phase wurde auch der Unterschied im Proteinprofil von Zellen der stationären Phase untersucht. Dazu wurden Zellen verglichen, die entweder bei 37 °C vier Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase oder bei 13 °C 4 Tage nach Eintritt in die stationäre Phase geerntet wurden. Die unterschiedlichen Probenentnahmezeiten waren dadurch zwingend notwendig, dass die Kulturen bei beiden Temperaturen sehr unterschiedliche Wachstumsraten aufwiesen. Die Probenentnahmezeiten wurden bezogen auf die Wachstumsrate bei der jeweiligen Temperatur ermittelt, so dass die vier Stunden bei 37 °C etwa den 4 Tagen der stationären Phase bei 13 °C entsprechen.

Die beiden Proben wurden mit den DIGE-Fluoreszenzfarben Cy3 und Cy5 markiert und im selben Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Proteine, die in der stationären Phase bei 13 °C und bei 37 °C in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Proteine, die in der exponentiellen Phase bei 13 °C induziert (37 °C reprimiert) sind, sind orange gefärbt und solche, die in der exponentiellen Phase bei 13 °C in verminderter Menge auftraten (37 °C induziert), sind blau eingefärbt. Eine Reihe von Spots wurde mit Pfeilen markiert, nummeriert und anschließend per MS-Analyse identifiziert (Abb. 28 und Tabelle 38).

Die cytosolischen Proteinprofile von Zellen der stationären Phase, die bei 13 °C bzw. bei 37 °C kultiviert wurden, unterschieden sich dramatisch. Dieser Befund ist umso überraschender, da ja schon zuvor festgestellt wurde, dass in der T₄-Probe der 37 °C-Kultur keine Sporulationsproteine nachgewiesen worden waren. Bislang wurde nur ein kleiner Teil der verändert exprimierten Proteine identifiziert. Wenngleich auffällt, dass es gute Übereinstimmungen zu zuvor als kältereguliert beobachteten Proteinen gibt, ist mit dem limitierten Datensatz bislang noch keine klare physiologische Interpretation der Unterschiede möglich. Es sind deshalb weiterführende Analysen, insbesondere eine weitere Identifizierung betroffener Proteinspots notwendig, um einen besseren physiologischen Vergleich zu ermöglichen.

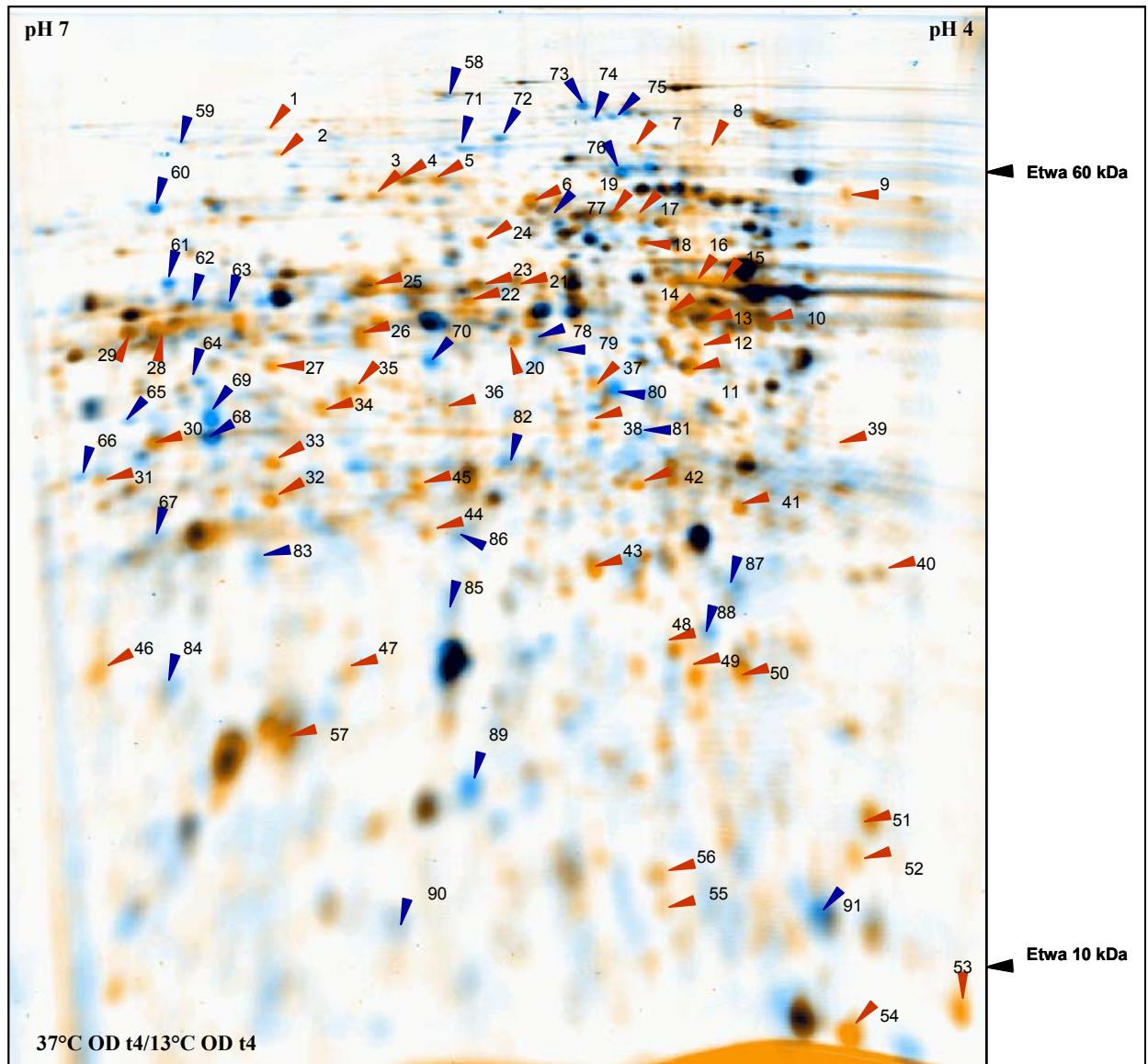


Abb. 28: Proteinmuster von Zellen der stationären Phase, die bei 37 °C bzw. 13 °C kultiviert wurden. Proben, die nach Kultivierung des *B. amyloliquefaciens* Stammes FZB42 bei 37 °C bzw. 13 °C in der stationären Phase (T_4) entnommen wurden, wurden nach Zellaufschluss und Markierung durch Cy-Dyes durch zweidimensionale Proteingelektrophorese (2D-DIGE) aufgetrennt und die Proteinmuster mit Hilfe des Programmpaketes Delta 2D verglichen. Die Proteinmuster sind in Falschfarben (Blau: Proteinextrakt aus der stationären Phase bei 37 °C; Orange: Proteinextrakt aus der stationären Phase bei 13 °C) dargestellt. Proteine, die in der stationären Phase sowohl bei 37 °C als auch bei 13 °C in gleicher Intensität vorlagen, sind an ihrer schwarzen Färbung erkennbar. Kälte-induzierte Proteine sind an ihrer Orange-Färbung erkennbar und solche, die in verminderter Menge bei der niedrigen Temperatur auftraten, sind blau eingefärbt. Die mit Pfeilen markierten und nummerierten Proteine wurden für eine MS-Analyse ausgewählt.

Tabelle 38: Vergleich der Proteinmuster der stationären Phase (T₄) bei Kultivierung bei 37 °C und 13 °C

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homolog ^c	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
Bei niedriger Temperatur akkumulierte Proteine						
1	RBAM01558	YkqC	unknown; similar to unknown proteins	61680	179	15
2	BG10944	GlyA	serine hydroxymethyltransferase	45461	71	7
6	RBAM02999	Csd*	probable cysteine desulfurase	44755	133	10
7	RBAM01075	Tkt*	transketolase	44438	84	8
8	RBAM03139	PnpA*	polynucleotide phosphorylase (PNPase)	79135	154	15
19	RBAM02168	PdhC	pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit)	52696	98	9
17	BG14007	YurU	unknown	53420	71	7
18	RBAM03923	GatB*	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit B)	47564	161	14
9	BG10423	GroEL*	class I heat-shock protein (chaperonin)	57389	142	13
10	RBAM00494	RpoA	RNA polymerase (alpha subunit)	34792	59	5
14	RBAM00675	SucC	succinyl-CoA synthetase (beta subunit)	42539	56	6
20	BG10412	FbaA*	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	30381	96	8
42	RBAM03523	Hag*	flagellin protein	29491	172	12
50	RBAM03969	Tpx*	probable thiol peroxidase	18148	182	6
51	BG10726	RplL	ribosomal protein L12 (BL9)	12743	131	4
52	BG11531	CspD*	cold-shock protein	7305	72	1
Bei niedriger Temperatur in reduzierter Menge vorkommende Proteine						
58	RBAM03664	OdhA	2-oxoglutarate dehydrogenase (E1subunit)	92725	191	18
71	RBAM02368	SdhA	succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	65033	276	22
76	RBAM01430	LpdV*	probable branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase E3 subunit (dihydrolipoamide dehydrogenase)	50118	70	7
77	RBAM03048	CitG*	fumarate hydratase	50574	53	5
78	BG10412	FbaA*	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	30381	111	9
79	BG19025	Tsf*	elongation factor Ts	32334	103	9
80	RBAM01183	Mdh	malate dehydrogenase	34685	84	8

Spot-Nr. ^a	Annotationsnummer ^b	<i>B. subtilis</i> Homolog ^c	Funktion ^d	MW (Da)	Score ^e	Anzahl der Peptide ^f
87	RBAM03969	Tpx*	probable thiol peroxidase	18148	79	5
91	BG11531	CspD*	cold-shock protein	7305	83	1

^aDie Nummerierung der Spots ist mit den Nummern auf dem Gel identisch. ^bDie Annotationsnummer entspricht in der Regel der von der Göttinger Arbeitsgruppe für *B. amyloliquefaciens* zunächst zugewiesenen Bezeichnung (RBAMxxxxx). Wenn dem Peptidmassenfingerprint trotz guter Qualität kein entsprechendes *B. amyloliquefaciens*-Protein zugewiesen werden konnte, ist das entsprechende *B. subtilis*-Homolog (BGxxxxxx) aufgeführt. ^cDie Proteinbezeichnung wurde prinzipiell vom homologen Protein aus *B. subtilis* übernommen. ^dDie funktionelle Einordnung der Proteine erfolgte anhand der in der *B. subtilis*-Datenbank SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) vorgeschlagenen Funktion. ^eDie Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit *B. amyloliquefaciens*- und *B. subtilis*-Datenbanken mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Ein Score von größer als 52 entspricht damit einem $p < 0,05$ und wird üblicherweise bei Proteomanalysen als signifikant angesehen. ^fZur besseren Bewertung der Ergebnisse ist zusätzlich auch die Anzahl der identifizierten Peptide angegeben.

Proteine, die in bereits publizierten Studien bzw. in bisher nicht veröffentlichten Analysen (Budde und Steil, persönliche Mitteilung) durch eine kältevermittelte Regulation der Proteinmenge aufgefallen sind, sind durch einen Stern neben der Proteinbezeichnung markiert.

6. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit besteht aus drei Teilen. Im ersten Teil wurde die Bedeutung der generellen Stressantwort und der Sporulation für das Überleben von *Bacillus subtilis* im Boden untersucht. Dabei wurden Überleben und Sporulation von Wildtypzellen und *sigB*-Mutanten in Bodenmikrokosmen untersucht und dokumentiert. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Blockierung der Sporulation bei niedrigen Temperaturen. Dazu wurden JH642-Derivate verwendet, die spezifische *lacZ*-Reporterfusionen für die vier spezifischen Sporulationssigmafaktoren SigF (*spoIIQ::lacZ*), SigE (*spoIID::lacZ*), SigG (*sspE::lacZ*) und SigK (*gerE::lacZ*) tragen. Im letzten Teil der Arbeit wurden Stressantworten in dem das Pflanzenwachstum stimulierenden Stamm *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 untersucht. Proteomanalysen sollten Aufschluss darüber geben, ob die in *B. subtilis*-Laborstämmen vorhandenen Stressantworten auch in diesem Stamm zu finden sind.

6.1. Rolle der generellen Stressantwort für das Überleben von *Bacillus subtilis* im Boden

B. subtilis verfügt wie andere Bakterien über ein ganzes Netzwerk von Adaptationsreaktionen, das eine Anpassung an widrige Umweltbedingungen erlaubt. Dieses Netzwerk ist eigentlich eine Reflexion der Umweltbedingungen, die im natürlichen Habitat das Wachstum der Mikroorganismen in Grenzen halten. Zu diesen Adaptationsreaktionen gehören die *sigB*-abhängige generelle Stressantwort und die Sporulation. Arbeiten und Versuche in verschiedenen Arbeitsgruppen zeigten, dass die vom SigB-Regulon kodierten Proteine sowohl unter Bedingungen eines Energiemangels wie Glukose-, Phosphat- und Sauerstofflimitation als auch durch verschiedene Umweltstimuli wie Hitze-, Ethanol-, Säure- und osmotischen Stress induziert werden (Hecker und Völker, 1990; Boylan et al., 1993; Benson und Haldenwang, 1993b; Völker et al., 1994; Hecker et al., 1996; Price, 2000; Hecker und Völker, 2001). Die generellen Stressproteine sind für *B. subtilis* insbesondere dann bedeutsam, wenn die Zellen so starkem Stress ausgesetzt sind, dass ein weiteres Wachstum der Zellen nicht möglich ist (Gaidenko et al., 1998; Völker et al., 1999). Beispiele solcher wachstumsverhindernden Bedingungen sind auf exponentiell wachsende Zellen ausgeübter harscher Salzstress (10 % NaCl), starke Hitze (54 °C), drastischer Ethanolstress (10 % EtOH) und starker Säurestress (Absenkung des pH auf 4,3) sowie wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Eine Präadaptation mit einem schwachen gleichen, aber auch mit einem andersartigen Stress (Kreuzadaptation) bewirkt durch das breite Induktionsspektrum

dieser Proteingruppe eine Akkumulation der Proteine vor dem harschen Stress und kann somit das Überleben von Wildtypzellen weiter verbessern. In *sigB*-Mutanten ist eine Vorbeladung mit generellen Stressproteinen nicht möglich und die Verbesserung des Schutzes bleibt aus (Völker et al., 1999).

B. subtilis verfügt mit der Sporulation über einen effektiven, langfristigen Überdauerungsmechanismus. Es ist allerdings ebenfalls bekannt, dass die Sporulation unter bestimmten, ökophysiologisch durchaus relevanten Umweltbedingungen wie z. B. Anaerobiose oder hochosmolaren Bedingungen gehemmt ist (Hoffmann et al., 1995; Ruzal et al., 1998). Bei niedriger Zelldichte ist die Sporulationsfrequenz ebenfalls deutlich geringer (Grossman und Losick, 1988). Insbesondere unter diesen Bedingungen wäre eine Alternative zur Sporulation erforderlich und die Spekulation, dass die generelle Stressantwort damit in Verbindung stehen könnte, ist nahe liegend. Vermutlich sind diese alternativen Überdauerungsstrategien jedoch nicht alleinig SigB-abhängig. So induziert Aminosäurelimitation beispielsweise keine generelle Stressantwort, führt aber zur Auslösung der „stringent response“ und Ausbildung von Kompetenz zur Aufnahme von DNA in *B. subtilis* (Dubnau und Turgay, 2000; Hecker und Völker, 2001).

In unserer Arbeitsgruppe hat sich bereits Frau Kuhnke in ihrer Dissertation mit der Beantwortung der Frage beschäftigt, welche Rolle die alternative Stressantwort und die Sporulation beim Überleben von *B. subtilis* im Boden spielen. Sie hat dazu den leicht transformierbaren prototrophen Wildtypstamm BSM88 und seine isogene *sigB*-Mutante, BSM89, in nicht sterile Bodenmikrokosmen gebracht und deren Überleben beobachtet. In ihrer Arbeit konnte Frau Kuhnke zeigen, dass der Wildtypstamm bei Inkubation in Grünlandboden bei 28 °C unter aeroben Bedingungen nur ein geringfügig besseres Überleben gegenüber der *sigB*-Mutante zeigte. Die beiden Stämme fingen direkt nach ihrer Einbringung in den Boden an zu sporulieren. Trotz der geringfügig höheren Überlebensrate für den Wildtyp gegenüber der *sigB*-Mutante war die Sporulation die bevorzugte Reaktion von *B. subtilis* auf die im experimentellen System vorgefundenen Bedingungen. Diese Befunde konnte ich in meiner Diplomarbeit mit der Nutzung der beiden Stämme bestätigen (Abb. 10A, Einleitung).

Durch Präadaptation mit mildem Stress vor dem Umsetzen in den Boden könnte man jedoch eine Vorbeladung von Wildtypzellen mit Stressproteinen erreichen und so gegebenenfalls die Effekte verstärken. Erste Hinweise auf eine potentielle Rolle der generellen Stressantwort ergaben Versuche, in denen die beiden Stämme vor dem Aussetzen in den Boden für 30 min einem milden Hitzeschock (48 °C) ausgesetzt wurden (Kuhnke, 2000; Bashir, 2001). Nach

der Präadaptation durch diesen milden Hitzeschock konnte ein etwa 10facher Überlebensvorteil des Wildtypstammes gegenüber der *sigB*-Mutante festgestellt werden. Ungeachtet des Einflusses der SigB-abhängigen generellen Stressantwort nahm die Lebendzellzahl beider Stämme bei gleichzeitiger Sporulation kontinuierlich auf etwa 0,1 – 0,5 % der Ausgangszellzahl ab. Gleichzeitig nahm der Anteil der Sporen an der Zellzahl zu und erreichte schließlich nach drei Tagen die Größenordnung der Gesamtzellzahl (60-100 % Sporenteil, Abb. 10 B, Einleitung).

Um unsere Kenntnisse zur potentiellen Funktion des generellen Stressregulons für das Überleben von *B. subtilis* in unsterilem Boden zu erweitern, wurden die beiden Stämme in dieser Arbeit einer ökophysiologisch relevanten Präadaptation durch milden Salzstress (4 % NaCl) für 30 min ausgesetzt. Diese milde Vorbehandlung wurde so ausgewählt, da sie einerseits zur Induktion des Stressregulons im Wildtyp führt, andererseits aber noch kein Absterben von Zellen weder im Wildtyp noch in der *sigB*-Mutante verursacht. Nach Beimpfung der Bodenmikrokosmen zeigte sich in diesem Versuch, dass die Lebendzellzahl des Wildtypstammes etwas langsamer abnahm als die der *sigB*-Mutante (Abb. 11A). Der Wildtypstamm zeigte nach 2 Tagen eine etwa 8fach bessere Überlebensrate und einen etwa 8fach höheren Sporentiter im Vergleich zur *sigB*-Mutante. Beide Stämme waren nach 6 Tagen wiederum nur in Form von Sporen zu finden. Man könnte also zu dem Schluss kommen, dass das generelle Stressregulon unter diesen spezifischen Bedingungen durch Verbesserung der Fitness der Zellen indirekt zu einem erhöhten Sporentiter führt.

Die generelle Stressantwort stellt möglicherweise eine Alternative zur Sporulation dar und ist deshalb vermutlich unter sporulationshemmenden Bedingungen besonders bedeutsam (Hecker und Völker, 2000; Price et al., 2000 und 2002). Die vergleichende Untersuchung von Wildtyp- und *sigB*-Mutantenzellen wurde deshalb auch auf die sporulationshemmenden Bedingungen ausgedehnt. Glukose wird von *B. subtilis* als bevorzugte C- und Energiequelle im Energie-Stoffwechsel genutzt und dient daher im Überschuss als Signal für ein zufriedenstellendes Nährstoffangebot, das die Sporulation in *B. subtilis* unterdrückt. Die Wildtypzellen und die *sigB*-Mutante wurden daher in 1 % Glukose enthaltender PBS-Lösung aufgenommen und der Boden innerhalb von etwa 10 min beimpft. Diese Behandlung verzögerte die Sporulation jedoch lediglich um einen Tag. Wahrscheinlich war die Glukose nach einem Tag vollständig verbraucht, so dass die Zellen danach unter Nährstofflimitation litten, was bei 28 °C zur Auslösung der Sporulation führte (Abb. 12A).

Die Sporulation war in Schüttelkolbenversuchen auch unter Sauerstoffmangel und höheren Salzkonzentrationen unterdrückt (Hoffmann et al., 1995 und Ruzal et al., 1998). Deshalb

wurde in dieser Arbeit auch die Rolle alternativer Stressantworten auf das Überleben von *B. subtilis* bei höheren Salzkonzentrationen (10 % NaCl) einer genauen Analyse unterzogen. Die Wildtypzellen und die *sigB*- Mutante wurden in 10 % NaCl enthaltender PBS-Lösung aufgenommen. Bei dieser höheren Salzkonzentration war zu beobachten, dass die SigB-abhängige generelle Stressantwort den Wildtypzellen einen besseren Schutz verliehen hat. Der Wildtypstamm zeigte nach 2 Tagen eine etwa 10fach bessere Überlebensrate als die *sigB*-Mutante, nach 6 Tagen überlebten die Wildtypzellen etwa 20fach und nach 9 Tagen sogar 100fach besser als die *sigB*-Mutante (Abb. 13A). Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau hatte Frau Kuhnke erste Hinweise für ein etwa 10faches besseres Überleben des Wildtypstammes gegenüber der *sigB*-Mutante vorlegen können (Kuhnke, 2000). Die hier beobachteten Effekte sind noch deutlicher und untermauern die Rolle der generellen Stressantwort bei der Auseinandersetzung von *B. subtilis* mit Stressbedingungen in Bodenmikrokosmen.

Bis vor kurzem wurde der generellen Stressantwort bei der Temperaturadaptation lediglich eine Rolle bei der Anpassung an drastischen Hitzeschock zugeschrieben (Benson und Haldenwang, 1993; Völker et al., 1995; Völker et al., 1999). Mit Hilfe von Proteom- und Western-Blot-Analysen sowie mit Reporterfusionen konnte im letzten Jahr jedoch der Beweis geführt werden, dass das SigB-Regulon in *Bacillus*-Zellen bei Wachstum bei niedrigen Temperaturen (15 °C) kontinuierlich auf hohem Niveau exprimiert ist (Brigulla et al., 2003). Außerdem zeigten *sigB*-Mutanten bei 15 °C im Vergleich zum Wildtyp einen deutlichen Wachstumsnachteil (Brigulla et al., 2003). Um die Rolle der generellen Stressantwort für das Überleben von *B. subtilis* in Bodenmikrokosmen bei niedrigen Temperaturen zu untersuchen, sind Wildtypzellen und *sigB*-Mutanten in den Boden eingebracht und bei niedriger Temperatur inkubiert worden. Dieser experimentelle Ansatz war auch deshalb interessant, da Temperaturen zwischen 4 °C und 20 °C in Mitteleuropa als ökophysiologisch relevant anzusehen sind.

Bereits die erste Serie dieser Versuche hatte gezeigt, dass die Bakterienzellen in Bodenmikrokosmen bei Inkubation bei niedriger Temperatur (4 °C) nicht mehr sporulieren konnten (Abb. 10C, Einleitung, Bashir, 2001). Ein Vergleich des Wildtypstammes und der *sigB*-Mutante zeigte zunächst auch beim Einbringen der Zellen in Bodenmikrokosmen und bei Inkubation bei 4 °C keinen Vorteil im Überleben des Wildtypstammes gegenüber der *sigB*-Mutante. Die Präinkubation der Zellen bei 48 °C für 30 min zeigte jedoch drastische Auswirkungen auf die anschließende Inkubation bei 4 °C (Abb. 10D, Bashir, 2001). Der Wildtyp überlebte deutlich besser, während die *sigB*-Mutante den drastischen Temperatursprung von 48 °C auf 4 °C nicht verkraftete und ihre Lebendzellzahl rasch auf den

Sporentiter abfiel. Entweder stattet die Beladung des Wildtyps diesen mit besseren Eigenschaften für das Überleben bei 4 °C an sich aus oder sie befähigt zu einem besseren Überleben des Temperatursprungs. Das etwa gleiche Absinken der Lebendzellzahl des Wildtyps mit und ohne Präadaptation bei 48 °C (Abb. 10C und 10D, Einleitung) macht es wahrscheinlich, dass die SigB-abhängigen Stressproteine bei plötzlichem Temperatursprung in die Kälte schützen. Diese ersten Befunde sind durch weitere detaillierte Experimente erhärtet worden. Beispielsweise wurden beide Stämme nach Vorbeladung mit Stressproteinen durch 30 minütige Behandlung mit 4 % NaCl sowohl bei 28 °C (Abb. 11A), bei 16 °C (Abb. 11B) als auch bei 4 °C (Abb. 11D) inkubiert. Die Sporulation war bei 16 °C und 4 °C in beiden Stämmen unterdrückt und der Wildtypstamm überlebte etwa 10fach besser als die *SigB*-Mutante. Da die Inhibition der Sporulation bei niedrigen Temperaturen eine für *Bacillus* völlig neue Entdeckung darstellt, sollte diese einer genaueren Analyse unterzogen werden. Die Inkubation bei intermediären Temperaturen von 16 °C war insofern wichtig, als bei 4 °C in Schüttelkolben auch kein Wachstum mehr möglich ist und der Sporulationsdefekt dadurch unspezifisch durch die zu niedrige Temperatur hätte verursacht sein können. Bei 16 °C und 13 °C ist in Schüttelkolbenversuchen sehr wohl noch ein Wachstum möglich (Abb. 14, 16 und 19), so dass ein genereller Wachstumsdefekt als Ursache für die bei niedriger Temperatur verhinderte Sporulation ausfällt.

Eine Hemmung der Sporulation war also einerseits durch Verwendung von Mikrokosmen mit hoher Salzkonzentration (Abb. 13) und andererseits durch Inkubation bei Temperaturen unterhalb von 16 °C (Abb. 10, 11) möglich. In einem weiteren Experiment wurde deshalb der kombinatorische Effekt von hoher Salzkonzentration und niedriger Inkubationstemperatur getestet. Erwartungsgemäß war die Bildung von hitzeresistenten Sporen nicht nachweisbar. Die Kombination von Inkubation bei 16°C und 1,7 M NaCl führte zu einem etwa 100fachen Unterschied im Überleben von Wildtyp und *sigB*-Mutante, die nur eine deutlich schwächere Stressresistenz entwickeln konnte (Abb. 13B). Etwas unerwartet fiel bei der Verwendung von Boden mit hoher Salzkonzentration (1,7 M NaCl) die Lebendzellzahl im Versuchsverlauf nicht bis auf den Sporentiter ab. Ein Teil der Populationen (sowohl Wildtyp als auch *sigB*-Mutante) überlebte den gesamten Versuchszeitraum in Form vegetativer Zellen (Abb. 13B). Ein ähnliches Phänomen wurde ebenfalls beobachtet, wenn der Exposition mit 1,7 M NaCl ein kurzzeitige 30minütige Präinkubation mit etwa 0,7 M (4 %) NaCl vorausging (Abb. 13C). Da neben dem Wildtyp auch ein Teil der *sigB*-Mutantenpopulation den Versuchsverlauf in Form vegetativer Zellen überlebte, muss man davon ausgehen, dass neben der generellen Stressantwort auch SigB-unabhängige Adaptationsreaktionen eine wichtige Schutzfunktion

übernehmen. Bei der Auseinandersetzung mit hohen Salzkonzentrationen ist hier mit Sicherheit eine wichtige Funktion für die im Labor von Prof. Dr. E. Bremer untersuchte spezifische Osmoschutzantwort zu vermuten (Bremer und Krämer, 2000; Bremer, 2002). In diesem Zusammenhang wäre es sicher lohnenswert, Mutanten, in denen einzelne *opu*-Gene/-Operons inaktiviert wurden, einer vergleichenden phänotypischen Analyse in dem Mikrokosmensystem zu unterziehen.

Zusammenfassend kann man für diesen Teil der Arbeit folgendes Resümee ziehen:

- i.) Bei Inkubation bei Temperaturen um 28 °C leiten die Zellen infolge der Nährstofflimitation die Sporulation ein, die damit bei hoher Temperatur die entscheidende Überlebensstrategie in Bodenmikrokosmen darstellt.
- ii.) Die Sporulation ist in Bodenmikrokosmen nicht nur bei Anaerobiose und unter Hochsalzbedingungen, sondern auch bei Inkubation bei niedrigen Temperaturen (< 16 °C) verhindert.
- iii.) Sind die Zellen zusätzlich zur Nährstofflimitation noch mit Stressbedingungen konfrontiert, übernehmen andere adaptive Reaktionen eine Schutzfunktion und sichern das Überleben vegetativer Zellen. Die beim Vergleich von *sigB*-Mutante und Wildtyp erhaltenen Befunde wiesen darauf hin, dass die generelle Stressantwort unter diesen Bedingungen auch in Bodenmikrokosmen eine allgemeine Schutzfunktion ausübt.

6.2. Analyse der Blockierung von Sporulation bei niedrigen Temperaturen

Der zweite Teil dieser Arbeit hat sich damit beschäftigt, die mit den Bodenmikrokosmen erhaltenen Befunde zur Hemmung der Sporulation bei niedrigen Temperaturen in Schüttelkolbenversuchen einer genaueren Analyse zu unterziehen. Versuche mit verschiedenen *B. subtilis*-Laborstämmen zeigten sehr schnell, dass die Sporulationsfrequenz aller getesteten Stämme in DSM, einem gängigen Sporulationsmedium, bei Inkubation bei niedriger Temperatur signifikant reduziert ist (Abb. 14). Während bei 37 °C über 70 % der Zellen innerhalb von 24 Stunden als hitzeresistente Sporen vorliegen, erreichte der Sporentiter bei 16 °C im Mittel 1 % der Ausgangslebendzellzahl (Abb. 14). Dass am Ende des Versuchszeitraumes nur Sporen vorlagen, ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Lebendzellzahl bis auf das Sporenniveau absank. Bei weiterer Reduzierung der Wachstumstemperatur auf 13 °C war im Schüttelkolben selbst in DSM die Bildung hitzeresistenter Sporen komplett unterdrückt (Abb. 19).

Nachdem geklärt war, dass bei Inkubation bei niedriger Temperatur die Sporenbildung nicht mehr effizient durchzuführen ist, galt es den Ort der Blockierung im Sporulationsprogramm zu lokalisieren. Die Initiation der Sporulation ist in *B. subtilis* von der Phosphorylierung des Transkriptions-Regulators Spo0A abhängig. Der Phosphorylierungsgrad von Spo0A wird über den Spo0A-Phosphorelay reguliert, der damit eine Vielzahl von Signalen interpretiert und eine auf die jeweilige Umweltsituation angepasste Menge von Spo0A~P bereitstellt. Für die unterschiedliche Entwicklung der Mutterzelle und der Vorspore sorgt in der Folge eine differentielle Genexpression, die vor allem durch kompartmentspezifische Sigmafaktoren erreicht wird. In der Vorspore sind nacheinander SigF und SigG aktiv. Die Expression in der Mutterzelle wird zunächst durch SigE und danach durch SigK reguliert. Die Aktivierung der Sigmafaktoren in den beiden Kompartimenten beruht auf einer Kommunikation zwischen Vorspore und Sporenmutterzelle, die auch „Criss-Cross-Regulation“ genannt wird (Losick und Stragier, 1992).

In der Diskussion wurde bereits darauf eingegangen, dass in Schüttelkolbenversuchen von anderen Autoren bereits eine Hemmung der Sporulation durch hohe Salzkonzentrationen (Ruzal et al., 1998) und durch Anaerobiose (Hoffmann et al., 1995) beobachtet wurde. In beiden Fällen war eine Blockierung im Stadium II zu verzeichnen, die auf eine Hemmung der Aktivität der frühen Sporulationssigmafaktoren zurückzuführen war (Ruzal et al., 1998; Hoffmann et al., 1995). Die Blockierung fand also offensichtlich in einem sehr frühen Stadium vermutlich über eine Hemmung der Phosphorylierung von Spo0A statt. Dieser frühe Block ist auch ökonomisch sinnvoll, da er eine Verschwendung wertvoller Ressourcen verhindert. Es schien nun interessant zu prüfen, an welcher Stelle die Sporulation bei niedriger Temperatur blockiert wird. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden spezifische *lacZ*-Reporterfusionen für die Bestimmung der Aktivität der vier spezifischen Sporulationssigmafaktoren SigF (*spoIIQ::lacZ*), SigE (*spoIID::lacZ*), SigG (*sspE::lacZ*) und SigK (*gerE::lacZ*) genutzt. Alle diese Stämme sind JH642-Derivate und die *lacZ*-Reporterfusionen dienten als Indikator der Sigmafaktoraktivität während der Sporulation. Alle vier Stämme wiesen 24 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase einen Sporentiter von etwa 80 % auf (Abb. 14). Die Bestimmung der Reporterfusionen zeigte bei 37 °C das typische, für die vier Sigmafaktoren erwartete temporäre Induktionsbild (Abb. 15). Der erste Sigmafaktor, der im Laufe der Sporulation in der Vorspore aktiviert wird, ist der Sporulationssigmafaktor SigF. Die Aktivität von SigF war eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase zu bestimmen. Zeitlich nur wenig verzögert war eine Aktivierung von SigE, vermutlich in der Sporenmutterzelle, zu beobachten. Bevor die Vorspore von der Mutterzelle

vollständig umwachsen ist, wird das Gen *spoIIIG* (kodiert SigG) in der Vospore von SigF transkribiert. Die Aktivität von SigG (*sspE-lacZ*-Expression) war demnach etwa 120 min nach Eintritt in die stationäre Phase detektierbar. Als letzter Sigmafaktor wurde SigK in der Sporenmutterzelle etwa 180 min nach Eintritt in die stationäre Phase aktiviert.

Bei Inkubation der Stämme bei 16 °C erreichte der Sporentiter gerade einmal 1 % der Ausgangslebendzellzahl (Abb. 14). Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Sporulationssigmafaktoren zeigte ein zu 37 °C deutlich verschiedenes Bild. Verursacht durch die bei 16 °C geringere Wachstumsrate war die Aktivität der Sigmafaktoren zeitlich verzögert zu beobachten. Die Aktivierung von SigF und SigE erfolgte bei 16 °C in der gleichen Reihenfolge wie bei 37 °C. Die Aktivitätswerte der Reporterfusionen lagen bei 16 °C aber etwa 2- bis 3fach höher als bei 37 °C, wobei jedoch das transiente Induktionsbild der Fusionen erhalten blieb. Erstaunlicherweise war für die SigG- und SigK-abhängigen Reporterfusionen bei 16 °C im gesamten Experimentverlauf nur noch eine geringe transiente Induktion zu beobachten. Betrachtet man diese Induktion vergleichend mit der bei 16 °C sogar höheren Induktion der SigF- und SigE-abhängigen Reporterfusionen, so muss man zu dem Schluss kommen, dass bei 16 °C in der Schüttelkultur in der Tat nur eine marginale SigG- und SigK-Aktivität zu bestimmen war (Abb. 15). Die Unterschiede in der Aktivität der SigF- und SigE-abhängigen LacZ-Reporterfusionen, die bei Messungen bei 16 °C und 37 °C bestimmt wurden, könnte dadurch verursacht sein, dass die β -Galaktosidase aus *E. coli* bei niedrigen Temperaturen in *B. subtilis* viel stabiler ist als bei 37°C. Eine mit steigender Temperatur abnehmende Stabilität der *E. coli*- β -Galaktosidase in *B. subtilis* wurde in der Literatur schon mehrfach dokumentiert (Völker et al. 1995a, Schrögel und Allmansberger, 1997). Es war daher notwendig, die Daten aus dem β -Galaktosidaseassay bei niedrigen Temperaturen durch andere unabhängige Methoden zu stützen. Um die erhaltenen Befunde zu bestätigen, wurde die „Northern-Blot“-Hybridisierung zum Nachweis der mRNA typischer Sporulationsgene eingesetzt. Diese Analyse ergab, dass für die SigF-abhängigen Gene *spoIIQ* und *spoIIIG*, welches SigG kodiert, bei 37°C und bei 16°C etwa gleiche hohe Mengen an Transkripten vorhanden sind (Abb. 16). Die simultan ausgeführte Bestimmung der Menge des SigG-abhängiges Gens *sspE* zeigte jedoch ein anderes Bild. Wenn auch keine genaue Quantifizierung erfolgte, ist bei Betrachtung der Abbildung 16 doch deutlich zu erkennen, dass in Zellen die bei 16 °C kultiviert wurden für dieses Gen viel weniger mRNA gebildet wurde als in der bei 37 °C vermehrten Kultur.

Diese „Northern-Blot“-Analyse erhärtete damit den initialen Befund der Reporterassays, wonach die Aktivität von SigG in der 16 °C-Kultur deutlich reduziert ist. Da in der Kultur Sporen noch mit einer Frequenz von etwa 1 % gebildet werden, kann man zu dem Schluss kommen, dass SigG im Gegensatz zu SigF und SigE bei 16 °C nur noch in einem kleinen Teil der Population voll aktiv ist und nur dieser Teil der Population das Sporulationsprogramm mit der Bildung hitzeresistenter Sporen abschließen kann.

Die Aktivierung von SigG ist ein komplizierter Prozess, der auf verschiedenen Stufen kontrolliert wird. Einerseits ist für die Aktivierung von SigG eine Expression von *spoIIIA* und *spoIIJ* nach dem Umwachsen der Vospore notwendig (Serrano et al., 2003). Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass der Anti-Sigmafaktor SpoIIAB durch Bildung eines stabilen Komplexes an der zeitweisen Inaktivierung von SigG durch Komplexbildung beteiligt sein könnte (Kirchman et al., 1993; Kellner et al., 1996). Neuere Befunde von Serrano et al. (2004) deuten jedoch an, dass zumindest bei 37°C entgegen den bisherigen Annahmen auch noch andere Mechanismen als die bloße Komplexbildung von SigG mit SpoIIAB die zeitlich abgestimmte Aktivierung von SigG erreichen.

Um die Hypothese zu prüfen, dass eine veränderte Interaktion von SigG mit SpoIIAB an der Verhinderung der SigG-Aktivierung bei 16°C beteiligt ist, wurden zwei Stämme eingesetzt, die sich lediglich durch eine ortsspezifische Mutation in *spoIIIG* unterscheiden. Bei der *spoIIIG*-Mutante (AH3787; *trpC2metC3 ΔspoIIIG ΔamyE::spoIIIGE156K sspE-lacZ*) ist durch die Punktmutation in SigG (E156K) die Bindung des Anti-Sigmafaktors SpoIIAB an den Sigmafaktor SigG gestört, so dass es nicht zur Bildung eines inaktivierenden SpoIIAB/SigG Komplexes kommen kann (Serrano et al., 2004). Die Mutation in SigG hat zur Folge, dass SigG in dieser Mutante ständig frei und in aktiver Form vorhanden ist. Zum Vergleich wurde ein Stamm mitgeführt, der in *amyE* ein Wildtypallel trägt (AH3786). Hier wird erwartet, dass die Zellen der Mutante bei Wachstum bei niedrigen Temperaturen (16 °C) wegen des Vorhandenseins von freiem SigG die SigG-abhängigen Gene mit hoher Intensität transkribieren können. Diese erhöhte Aktivität der SigG-abhängigen *sspE-lacZ*-Fusion wurde im direkten Vergleich beider Stämme bei 16 °C dann auch tatsächlich bestimmt (Abb. 17). Allerdings führte die Erhöhung der SigG-Aktivität nicht zu einer Steigerung der Sporulationsfrequenz.

Dieser Befund deutete an, dass in der Kälte neben der Aktivierung von SigG auch die Aktivierung des letzten sporulationspezifischen Sigmafaktors SigK gestört sein könnte. In einem weiteren Experiment wurde deshalb die Aktivierung von SigK bei 16 °C unabhängig von der Aktivität von SigG bestimmt. Um dieses Ziel erreichen zu können, wurde ein

spezifischer Stamm genutzt, in dem *bofA*, ein Gen, das für einen negativen Regulator der SigK-Aktivität kodiert, zerstört ist. Dieser Stamm entfaltet bei 37 °C auch in Abwesenheit von SigG volle SigK-Aktivität. Bei Kultivierung bei 16 °C konnte selbst in der *bofA*-Mutante keine nennenswerte Aktivität der SigK-abhängigen *gerE-lacZ*-Fusion bestimmt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass bei der intermediären Temperatur von 16 °C nicht nur die Aktivierung von SigG sondern auch die von SigK gestört ist.

Der physiologische Vorteil der Hemmung der Sporenbildung mitten im Sporulationsprogramm ist jedoch nicht einfach zu erschließen, da die Zellen ja mehr als 300 sporulationsspezifische Gene, die zu den SigF- und SigE-Regulons gehören, ohne Aussicht auf Vollendung des Sporulationsprogramms induzieren und damit wertvolle Ressourcen verschwenden. Um zu einem besseren Verständnis dieses Phänomens zu kommen, wurde daher eine weitere Serie von Versuchen durchgeführt, in denen geklärt werden sollte, wie die Aktivität der vier sporulationsspezifischen Sigmafaktoren bei noch niedrigeren Temperaturen (13 °C), die aber noch ein Wachstum zulassen, reguliert wird. Überraschenderweise war nun in keinem der vier Stämme mehr ein Aktivierung sporulationsspezifischer Genexpression zu verzeichnen (Abb. 19), so dass bei 13 °C von einer Blockierung der Initiation der Sporulation auszugehen ist.

Dieser experimentelle Abschnitt der Dissertation lässt sich damit folgendermaßen zusammenfassen:

- i.) Bei einer Absenkung der Wachstumstemperatur ist bei den untersuchten Stämmen unterhalb von 16 °C nur noch eine ineffiziente Sporulation möglich.
- ii.) In einem intermediären Temperaturbereich um 16 °C ist zunächst die Aktivierung der späten Sporulationssigmafaktoren SigG und SigK gestört und die Bildung hitzeresistenter Sporen ist von nahezu 100 % der Population auf weniger als 1 % reduziert.
- iii.) Bei einer weiteren Reduzierung der Temperatur dicht an das Wachstumstemperaturminimum der Stämme ist eine komplette Blockierung der Aktivierung aller vier sporulationsspezifischen Sigmafaktoren zu verzeichnen und die Bildung hitzeresistenter Sporen ist nicht mehr nachweisbar.

Zusätzlich zur hier für die Inkubation bei niedriger Temperatur beschriebenen Hemmung der Sporenbildung soll abschließend noch darauf verwiesen werden, dass offenbar auch die Sporenkeimung bei niedrigen Temperaturen nur sehr ineffizient abläuft (A. Dreisbach, unveröffentlichte Daten).

6.3. Proteomanalyse des *Bacillus amyloliquefaciens* Stammes FZB42

Der dritte Teil der Arbeit widmete sich der Proteomanalyse des *B. amyloliquefaciens* Stammes FZB42. Dieser in Berlin am Forschungszentrum für Biotechnologie isolierte Umweltstamm besitzt die Fähigkeit, das Wachstum von Pflanzen zu fördern, vermutlich indem er Cyclopeptide und extrazelluläre Enzyme produziert, die antifungal, antibakteriell oder antiviral wirken (Idriss et al., 2002).

Man erhofft sich von der Genom- und funktionellen Analyse dieses Bakterienstammes neue Erkenntnisse zur Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Gram-positive Bakterien. Die Genomsequenzierung dieses Bakterienstammes ist zum jetzigen Zeitpunkt nahezu abgeschlossen und in der hier vorliegenden Arbeitsfassung konnten 4307 ORFs entdeckt und davon 3249 zugeordnet werden (Koumoutsis et al., 2004). In dieser Arbeit wurde mit der Erstellung einer Proteomkarte von *B. amyloliquefaciens* FZB42 begonnen (Abb. 22). Bislang wurden in exponentiell wachsenden Zellen 60 verschiedene Proteine identifiziert (Tabelle 32). Zusätzlich wurden erste Proteomanalysen der Adaptationsreaktionen dieses Stammes auf die Behandlung mit verschiedenen Stimuli wie Salz, Ethanol, Hitze und Kälte durchgeführt. Aufgrund der relativ geringen Zahl durch massenspektrometrische Analysen identifizierter Proteine sind die Arbeiten zur Charakterisierung der Stressantworten noch als sehr vorläufig einzustufen. Vermutlich ist das auch die Ursache dafür, dass entgegen der Arbeitshypothese bislang nur vereinzelt SigB-abhängige generelle Stressproteine identifiziert werden konnten. In Zukunft wird man sich bei der funktionellen Charakterisierung dieses Bakterienstammes insbesondere auf die Gene bzw. Proteine konzentrieren, die nur in ihm vorkommen oder die ein außergewöhnliches Expressionsmuster aufweisen.

7. Literaturverzeichnis

- Akbar, S., Gaidenko, T. A., Kang, C. M., O'Reilly, M., Devine, K. M. and Price, C. W. (2001) New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 1329-38.
- Alper, S., Dufour, A., Garsin, D. A., Duncan, L. and Losick, R. (1996) Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 260, 165-177.
- Alper, S., Duncan, L. and Losick, R. (1994) An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* 77, 195-205.
- Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R. and M. Hecker. (1996). General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J. Bacteriol.* 178(22), 6571-6578
- Arigoni, F., Pogliano, K., Webb, C. D., Stragier, P. and Losick, R. (1995) Localization of protein implicated in establishment of cell type to sites of asymmetric division. *Science* 270, 637-640.
- Beckerling, C. L., Steil, L., Weber, M. H., Volker, U., and Marahiel, M. A. (2002) Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 6395-6402
- Benson, A. K. and Haldenwang, W. G. (1993a) *Bacillus subtilis* σ^B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 2330-2334.
- Benson, A. K. and Haldenwang, W. G. (1993b) Regulation of σ^B levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 2347-56.
- Bremer, E. and Krämer, R. (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, p. 79-97. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*. ASM, Washington, D. C.
- Bremer, E. (2002) Adaptation to changing osmolarity, p. 385-391. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis and its closest relatives. From genes to cells*. ASM Press, Washington, D. C.
- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Völker, A., Bremer, E. and Völker, U. (2003) Chill Induction of the SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Its Contribution to Low-Temperature Adaptation. *J. Bacteriol.* 185, 4305-4314.

- Broadbent, P. B., Waterworth, K. F. and Waterworth, Y. (1977) Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and non-treated soil. *Phytopathol.* 67, 1027-1034.
- Bsat, N., Chen, L., and Helmann, J. D. (1996) Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J. Bacteriol.* 178, 6579-6586
- Campbell, R. and Greaves, P. M. (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In J. M. Lynch (ed.), *The Rhizosphere*. Wiley, Chichester.
- Chen, C., Lewis, R. J., Harris, R., Yudkin, M. D. and Delumeau, O. (2003) A supramolecular complex in the environmental stress signalling pathway of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 49, 1657-1669.
- Delumeau, O., Lewis, J. R. and M. D. Yudkin. (2002) Protein-protein interactions that regulate the energy stress activation of sigma(B) in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184(20):5583-5589.
- Derre, I., Rapoport, G. and Msadek, T. (1999) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 31, 117-132.
- Dubnau, D. and Turgay, K. (2000). In "Bacterial stress responses." (G. Storz and R. Hengge-Aronis, eds.), pp. 249-260. ASM, Washington, D. C.
- Dufour, A. and Haldenwang, W. G. (1994) Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* 176, 1813-1820.
- Duncan, L. and Losick, R. (1993) SpoIIAB is an anti- σ factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein σ^F from *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 2325-2329.
- Duncan, L., Alper, S. and Losick, R. (1996) SpoIIAA governs the release of the cell-type specific transcription factor σ^F from its anti-sigma factor SpoIIAB. *J. Mol. Biol.* 260, 147-164.
- Dworkin, J. and Losick, R. (2001) Differential gene expression governed by chromosomal spatial asymmetry. *Cell* 3. 339-346
- Engelmann, S. and Hecker, M. (1996) Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* *sigB* mutants and the role of *kata* and *katE*. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 63-69.
- Errington, J. (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1-33.

- Evan, L., Clarkson, J., Yudkin, M. D., Errington, J. and Feucht, A. (2003) Analysis of the Interaction between the Transcription Factor σ^G and the Anti-Sigma Factor SpoIIAB of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185, 4615-4619.
- Eymann, C. and Hecker, M. (2001) Induktion of σ^B -dependent general stress genes by amino acid starvation in a *spo0H* mutant of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 221-227.
- Fujita, M. and Losick, R. (2003) The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes and Development* 17, 1166-1174.
- Ferrari, E., Howard, S. M. H. and Hoch, J. A. (1986) Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J. Bacteriol.* 170, 289-295.
- Gaidenko, T. A. and Price, C. W. (1998) General stress transcription factor- σ^B and sporulation transcription factor- σ^H each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. *J. Bacteriol.* 180, 3730-3733.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R. and Marahiel, M. A. (1996) Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 4611-4619.
- Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. (1999) Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 203-209.
- Grossman, A. and Losick, R. (1988) Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 4369-4373.
- Guedon, E., Moore, C. M, Que, Q., Wang, T., Ye, W. R. and Helmann, D. J. (2003) The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and σ^B regulons. *J. Mol. Biol.* 49, 1477-1491.
- Haldenwang, W. G. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59, 1-30.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R. (1991) Plasmid transformation of *E. coli* and other bacteria. *Meth. Enzymol.* 204, 63.
- Harwood, C. R. and Wipat, A. (1996) Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS.* 389, 84-87
- Hecker, M., Schumann, W. and Völker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19, 417-428.
- Hecker, M. and Völker, U. (1990) General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 197-213.
- Hecker, M. and Völker, U. (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* 44, 35-91.

- Hensel, M. (1998) Whole genome scan for habitat-specific genes by signature-tagged mutagenesis. *Electrophoresis* 19, 608-12.
- Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E. and Holden, D. W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269, 400-3.
- Hoch, J. A. (1995) In "Two-component signal transduction." (J. A. Hoch and T. J. Silhavy, eds.), pp. 129-144. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Hoch, J. A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 165-170.
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C. and Jahn, D. (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 219-225.
- Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U. and Bremer, E. (2001) High-Salinity-Induced Iron Limitation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 718-727.
- Kaan, T., Homuth, G., Mader, U., Bandow, J., and Schweder, T. (2002) Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Mikrobiologie* 148, 3441-55
- Kalman, S., Duncan, M. L., Thomas, S. M. and Price, C. W. (1990) Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 172, 5575-5585.
- Kang, C. M., Vijay, K. and Price, C. W. (1998) Serine kinase activity of a *Bacillus subtilis* switch protein is required to transduce environmental stress signals but not to activate its target PP2C phosphatase. *Mol. Microbiol.* 30, 189-196.
- Karow, M. L., Glaser, P. and Piggot, P. J. (1995) Identification of a gene, *spoIIR*, that links the activation of σ^E to the transcriptional activity of σ^F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 2012-2016.
- Kellner, E. M., Decatur, A. and Moran, C. P. (1996) Two-stage regulation of an anti-sigma factor determines developmental fate during bacterial endospore formation. *Mol. Microbiol.* 21, 913-924.
- Kirchman, P. A., DeGrazia, H., Kellner, E. M. and Moran, C. P., Jr. (1993) Forespore-specific disappearance of the sigma-factor antagonist SpoIIAB: implications for its role in determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 8, 663-71.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and Zablotowicz, M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7, 39-44.

- Koumoutsi, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J. and Borriss, R. (2004) Structural and functional Characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 4, 1084-1096.
- Krüger, E. and Hecker, M. (1998) The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J. Bacteriol.* 180, 6681-6688.
- Kuhnke, G. (2000) Untersuchungen zur Bedeutung der generellen Streßantwort für das Überleben von *Bacillus subtilis* im Boden. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg.*
- Kushner, S. R. (1978) In "Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering." (H. W. Boyer and S. Nicosia, eds.), pp. 17. Elsevier, Amsterdam, Milan.
- Lazazzera, B. A. and Grossman, A. D. (1998) The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* 6, 288-294.
- Lee, C. S., Lucet, I. and Yudkin, M. D. (2000) Fate of the SpoIIAB*-ADP liberated after SpoIIAB phosphorylates SpoIIAA of *Bacillus subtilis*. *Cell* 21. 6250-6253
- Losick, R. and Stragier, P. (1992) Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature* 355, 601-4.
- Lynch, J. M. and Whipps (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant soil.* 121, 1-10
- Magnin, T., Lord, M. and Yudkin, M. D. (1997) Contribution of partner switching and SpoIIAA cycling to regulation of σ^F activity in sporulating *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 3922-3927.
- Marten, P., Bruckner, S. and Luth, P. (1999) Plant growth promotion of different cultivated plants and biological control of soil-borne phytopathogenic fungi by *Bacillus subtilis* strain B2G. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 106, 74-81.
- Maul, B. (1998). Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
- Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S. and Hecker, M. (1995) σ^B -dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Gen.* 248, 114-120.
- Méndez., B. M., Orsaria, M. L., Philippe, V., Pedrido, E. M. and Grau, R. R. (2004) Novel Roles of the Master Transcription Factors Spo0A and for Survival and Sporulation of *Bacillus subtilis* at Low Growth Temperature. *J. Bacteriol.* 186, 989-1000.

- Min, K. T., Hilditch, C. M., Diederich, B., Errington, J. and Yudkin, M. D. (1993) σ^F , the first compartment-specific transcription factor of *B. subtilis*, is regulated by an anti-sigma factor that is also a protein kinase. *Cell* 74, 735-742.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F. X. and Schumann, W. (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 16, 4579-4590.
- Mogk, A., Völker, A., Engelmann, S., Hecker, M., Schumann, W. and Völker, U. (1998) Non-native proteins signal induction of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J. Bacteriol.* 180, 2895-2900.
- Pan, Q. Garsin, D. A. and Losick, R. (2001) Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *B. subtilis*. *Cell* 8, 837-883.
- Pandey, A. and Palni, L. M. S. (1997) *Bacillus* species - the dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiol. Res.* 152, 359-365.
- Pastor-González, E. J., Hobbs, C. E. and Losick, R. (2003) Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science* 301, 510-513.
- Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Höper, D., Koburger, T., Völker, U. and Hecker, M. (1999a) Identification of σ^B -dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J. Bacteriol.* 181, 5718-5724.
- Petersohn, A., Engelmann, S., Setlow, P. and Hecker, M. (1999b) The *katX* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of σ^B and σ^F . *Mol. Gen. Gen.* 262, 173-179.
- Pogliano, K., Hofmeister, A. E. M. and Losick, R. (1997) Disappearance of the σ^E transcription factor from the forespore and the SpoIIE phosphatase from the mother cell contributes to establishment of cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 3331-3341.
- Priest, F. G. (1989) Products and applications. In C. R. Harwood (ed.), *Bacillus*, Biotechnology Handbooks Vol. 2. Plenum press, New York & London.
- Price, C. W. (2000). In "Bacterial stress responses." (G. Storz and R. Hengge-Aronis, eds.), pp. 179-197. ASM, Washington, D.C.
- Ruzal, S. M., Lopez, C., Rivas, E. and Sanchez-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.

- Ryder, M. H., Yan, Z. N., Terrace, T. E., Rovira, A. D., Tang, W. H. and Correll, R. L. (1999) Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. *Soil Biol. Biochem.* 31, 19-29.
- Sambrook, J., Fritsch, J. and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition". Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U. and Hecker M. (1998) Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 1869-1877.
- Schrögel, O. and Allmansberger, R. (1997) Optimisation of the BgaB reporter system: determination of transcriptional regulation of stress responsive genes in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:237-243.
- Schumann, W. (2000) Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism. *Adv. Biochem Eng. Biotechnol.* 67, 1-33.
- Schweder, T., Kolyschkow, A., Völker, U. and Hecker, M. (1999) Analysis of the expression and function of the σ^B -dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during slow growth. *Arch. Microbiol.* 171, 439-443.
- Scott, J. M., Ju, J. L., Mitchell, T. and Haldenwang, W. G. (2000) The *Bacillus subtilis* GTP binding protein Obg and regulators of the σ^B stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J. Bacteriol.* 182, 2771-2777.
- Setlow, P. (1995) Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 29-54
- Sharp, D. M. and Pogliano, K. (2002) Role of Cell-Specific SpoIIIE Assembly in polarity of DNA Transfer. *Science* 295, 137-139.
- Smirnova, N., Scott, J., Völker, U. and Haldenwang, W. (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, I. (1993). In "*Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria." (A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick, eds.), pp. 785-800. ASM, Washington D.C.
- Sonenshein, A. L. (2000a). In "Bacterial stress responses." (G. Storz and R. Hengge-Aronis, eds.), pp. 199-215. ASM, Washington, D.C.
- Sonenshein, A. L. (2000b). In "Prokaryotic development." (Y. V. Brun and L. J. Shimkets, eds.), pp. 133-150. ASM, Washington, D. C.

- Spiegelhalter, F. and Bremer, E. (1998) Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis* - contributions of the σ^A - and σ^B -dependent stress-responsive promoters. *Mol. Microbiol.* 29, 285-296.
- Stacy, R. A. and Aalen, R. B. (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta* 206, 476-8.
- Steil, L. (2000) Identifizierung und Charakterisierung sporulationsspezifischer Gene in *Bacillus subtilis* mit Hilfe der DNA-Array Technik. *Laboratorium für Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg*.
- Stoss, O., Mogk, A. and Schumann, W. (1997) Integrative vector for constructing single-copy translational fusions between regulatory regions of *Bacillus subtilis* and the *bgab* reporter gene encoding a heat-stable β -galactosidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 49-54
- Stotzky, G. (1997) Soil as an environment for microbial life. In J. D. v. Elsas, J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc, New York
- Stülke, J., Hanschke, R. and Hecker, M. (1993) Temporal activation of beta-glucanase synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2041-2045.
- Sunania, V., Kishore, V., Shekhawat, G. S. and Kumar, M. (1997) Control of bacterial wilt of potatoes in naturally infested soils by bacterial antagonists. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Plant Disease and Protection* 104(4), 362-369.
- Turner, J. T. and Backman, P. A. (1991) Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75, 347-353.
- Van Elsas, J. D. and Van Overbeek, S. L. (1993) Bacterial responses to soil stimuli. In S. Kjellberg (ed.), *Starvation in bacteria*. Plenum Press, New York
- Vandemark, G. J. (1995) Biological control of *Botrytis cinerea* by use of *Pseudomonas corrugata* and *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.* 85, 1117.
- Vijay, K., Brody, M. S., Fredlund, E. and Price, C. W. (2000) A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 35, 180-188.

- Völker, U., Luo, T. Q., Smirnova, N. and Haldenwang, W. (1997) Stress activation of *Bacillus subtilis* σ^B can occur in the absence of the σ^B negative regulator RsbX. *J. Bacteriol.* 179, 1980-1984.
- Völker, U., Maul, B. and Hecker, M. (1999) Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 3942-3948.
- Völker, U., Völker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A. and Haldenwang, W. G. (1995) Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* 177, 3771-3780.
- Von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M. and 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.
- Vullo, D. L., Coto, C. E. and Sineriz, F. (1991) Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2392-4.
- Wise, A. A. and Price, C. W. (1995) Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor σ^B in response to environmental signals. *J. Bacteriol.* 177, 123-133.
- Yang, X. F., Kang, C. M., Brody, M. S. and Price, C. W. (1996) Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes & Dev.* 10, 2265-2275.
- Zhang, S., Scott, J. M. and Haldenwang, W. G. (2001) Loss of ribosomal protein L11 blocks stress activation of the *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B . *J. Bacteriol.* 183, 2316-2321.

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Völker für die interessante Themenstellung, die Diskussionsbereitschaft und die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Thauer danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität und am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg. Ich bedanke mich auch für die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel, Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Disseration.

Herrn Prof. Dr. Michael Hecker aus Greiswald danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit im Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

Frau Alexandra Schütz danke ich besonders für die Unterstützung bei der Untersuchung der generellen Stressantwort nach Vorinkubation bei niedriger Temperatur im Boden.

Frau Dr. Andrea Völker, Frau Annette Dreisbach und Frau Maren Depke danke ich für die Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit.

Herrn Leif Steil danke ich dafür, dass er mir mit Rat und Tat bei Computerarbeiten zur Seite stand.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Den Arbeitsgruppen Bremer und Buckel in Marburg danke ich für die Hilfe bei der Bewältigung der Probleme des Laboralltags.

Dem World University Service danke ich für die finanzielle Unterstützung meines gesamten Studiums in Deutschland.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Eltern, die mich bei dieser Arbeit seelisch unterstützt haben.

LEBENS LAUF**Persönliche Daten**

Name	Abdallah Bashir
Geburtsdatum	18.11.1975
Geburtsort	Deir AL-Balah /Palästina
Staatsangehörigkeit	Palästinenser
Familienstand	Ledig

Schulbildung

1980-1986	Grundschule in Saudi Arabia
1986-1989	Mittelschule in Saudi Arabia
1989-1992	Secondary School „Gymnasium“ in Saudi Arabia
1992	Abitur

Hochschulausbildung

Sept. 1992- Juni 1996	Studium der Mikrobiologie/Chemie an der Al-Azhar Universität Gaza
Aug. 1996	Bachelor of Science an der Al-Azhar Universität
Okt. 1996-Okt. 1997	Deutsch-Sprachkurs in Marburg
1997	Anerkennung des „Bachelor of Science“ als Vordiplom
Okt. 1997- Okt. 2000	Studium der Biologie an der Philipps- Universität Marburg
März 2000	Diplomprüfung in den Fächern: 1 - Mikrobiologie als Hauptfach 2 - Genetik als erstes Nebenfach 3 - Biochemie als zweites Nebenfach 4 - Virologie als drittes Nebenfach
15. Mai 2000-3. Mai 2001	Anfertigung einer Diplomarbeit in der AG von PD Dr. Uwe Völker mit dem Titel: „Charakterisierung neuer Sporulationsgene und Analyse der Rolle von Sporulation und genereller Stressantwort für das Überleben prototropher <i>Bacillus subtilis</i> Stämme in Bodenmikrokosmen“
Seit 05. Juni 2001	Promotion in der AG von Prof. Dr. Uwe Völker mit dem Titel „Charakterisierung der Rolle von genereller Stressantwort und Sporulation bei der Anpassung von Bacillus-Stämmen an den Standort Boden“

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation
„Charakterisierung der Rolle von genereller Stressantwort und Sporulation bei der Anpassung
von Bacillus-Stämmen an den Standort Boden“
selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir
ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, den

Abdallah Bashir