

Untersuchungen zur generellen Stressantwort von *Bacillus subtilis* nach Einwirkung von Umweltstress und bei niedriger Temperatur

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

dem
Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Matthias Brigulla
aus Marburg / Lahn

Marburg / Lahn, 2003

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

**Erstgutachter: Prof. Dr. E. Bremer
Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Völker
Tag der mündlichen Prüfung:**

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	2
3. Einleitung	4
3.1. Das Hitzeschockstimulon.....	5
3.2. Die generelle Stressantwort von <i>Bacillus subtilis</i>	6
3.2.1. Multiple, unspezifische und vorsorgende Stressresistenz.....	7
3.2.2. Regulation des alternativen Sigmafaktors SigB.....	11
3.2.3. Vernetzung der generellen Stressantwort mit anderen Adaptationsantworten von <i>Bacillus subtilis</i>	16
3.3. Kälteschockantwort von <i>Bacillus subtilis</i>	16
3.4. Ziele dieser Arbeit.....	18
4. Mikroorganismen, Kultivierungsbedingungen und genetisches Material	19
4.1. Listen der verwendeten Mikroorganismen	19
4.2. Genetisches Material	21
4.2.1. Stammhaltung	22
4.3. Medien	22
4.3.1. Vollmedien	22
4.3.2. Minimalmedien	23
4.3.3. Medienzusätze	24
4.4. Kultivierungsbedingungen.....	25
4.4.1. Kultivierung für allgemeine Stressversuche	25
4.4.2. Kultivierung für Salz- und Osmostress	25
4.4.3. Kultivierung für das kontinuierliche Wachstum in der Kälte.....	26
5. Methoden	28
5.1. Sterilisation	28
5.2. Photometrische Messungen	28
5.2.1. Absorptionmessungen.....	28
5.2.2. Trübungsmessungen	28
5.3. Zellaufschluss	29
5.3.1. Lysozym.....	29
5.3.2. Toluol	29
5.3.3. Ultraschall und French Press	29
5.4. Isolation von Nukleinsäuren.....	30
5.4.1. Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i>	30
5.4.2. Präparation von Plasmid-DNA	31
5.4.3. Präparation von Gesamt-RNA mit der "Sauren Phenol"- Methode	31
5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen.....	33
5.5.1. Konzentrationsbestimmung und Qualitätsprüfung von RNA	33
5.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	34
5.6. DNA-Klonierung.....	34
5.6.1. Restriktion von DNA.....	34
5.6.2. Ligation von DNA	35
5.6.3. Transformation von <i>E. coli</i>	35

5.6.4. Transformation von <i>B. subtilis</i>	35
5.6.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	36
5.7. Separation von Nukleinsäuren und Proteinen.....	37
5.7.1. Agarose-Gelelektrophorese	38
5.7.2. "SDS-PAGE" - SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese.....	39
5.7.3. Zweidimensionale Trennung von Proteinen	40
5.7.4. Fraktionierung von Gesamtzellextrakten durch Gelchromatographie.....	42
5.8. Färbetechniken	43
5.8.1. DNA-Färbung mit Ethidiumbromid	43
5.8.2. DNA-Färbung mit SybrGold	44
5.8.3. Proteinnachweis durch Coomassieblau	44
5.8.4. Proteinnachweis durch Tinte.....	45
5.8.5. Proteinnachweis durch Silber.....	46
5.9. Blottingmethoden für Nukleinsäuren und Proteine.....	47
5.9.1. Herstellung von Digoxygenin-markierten RNA-Sonden durch „in vitro“- Transkription mit T7-Polymerase	47
5.9.2. Bindung der RNA an neutrale Nylon-Membranen durch „dot blotting“ ...	48
5.9.3. "Northern blotting"	49
5.9.4. Westernblotting und Immunodetektion.....	51
5.9.5. Chemifluoreszenz	53
5.9.6. cDNA-Macroarrays von <i>Bacillus subtilis</i>	53
5.9.7. „Phosphoimaging“	55
5.10. Mikroskopie.....	55
5.10.1. Phasenkontrastmikroskopie	56
5.10.2. Fluoreszenzmikroskopie	57
5.11. Reporterassays.....	57
5.11.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	57
5.11.2. "Green fluorescent protein"	58
5.11.3. Nachweis der Amylase-Aktivität.....	59
5.12. Verwendete Datenbanken und Programme.....	59
5.12.1. Computergestützte Auswertung von DNA - Makroarrays.....	59
5.12.2. Computergestützte Sequenzanalysen	60
6. Ergebnisse.....	62
6.1. Charakterisierung des Transkriptoms von <i>Bacillus subtilis</i> nach Einwirkung von Umweltstress	62
6.1.1. Auswahl der Stämme für die Analyse des Transkriptoms von <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	63
6.1.2. Analyse des Expressionsmusters SigB-abhängiger Gene	64
6.1.3. Expression der SigB-abhängigen Gene in der <i>rsbX</i> -Suppressormutante.....	67
6.1.4. Genomweite Promotorsuche mit Hilfe einer Konsensussequenz.....	68
6.1.5. Identifizierung SigB-abhängiger Gene	69
6.1.6. Genomweite Clusteranalyse der Stressantwort in <i>Bacillus subtilis</i>	77
6.1.7. Charakterisierung der SigB-unabhängigen Stressgene	78
6.1.8. Mögliche Lokalisation der spezifischen und generellen Stressproteine ..	84
6.1.9. Charakterisierung der salzinduzierten Aktivierung des ECF-Sigma- faktors SigW und seines kompletten Regulons	85
6.1.10. Expression des SigW-Regulons ist osmoinduziert.....	92
6.1.11. Rolle der Salzkonzentration bei der Expression des SigW-Regulons ...	95
6.1.12. Einfluss der osmoprotektiven Substanz Glyzinbetain auf die Expression des SigW-Regulons	97
6.1.13. Überlebensexperimente mit einer <i>sigW</i> -Mutante nach 10% Salzstress	98

6.2. Charakterisierung der Induktion der generellen Stressantwort von <i>Bacillus subtilis</i> während des Wachstums bei niedriger Temperatur	100
6.2.1. Analyse der Regulation der SigB-Aktivierung in SM-Medium	100
6.2.2. Medienunabhängige Aktivierung des alternativen Sigmafaktors SigB ..	102
6.2.3. Nutzung einer <i>gsiB::gfp</i> -Reporterfusion zur Studie der generellen Stressantwort.....	104
6.2.4. RsbV-unabhängige Expression der <i>gsiB-gfp</i> -Fusion bei verschiedenen Temperaturen	105
6.2.5. Medienunabhängige Induktion der <i>ctc::lacZ</i> -Fusion in einer <i>rsbV</i> -Mutante bei 16° C.....	107
6.2.6. IPTG-induzierte Expression von SigB bei niedriger Temperatur	107
6.2.7. Kälteinduktion des SigB-Regulons in Regulatormutanten der SigB-Aktivität.....	109
6.2.8. Wachstumsexperimente bei 15° C und 13° C	112
6.2.9. Phosphorylierungsstatus von RsbV bei niedriger Temperatur	114
6.2.10. Analyse der Komplexbildung bei 16° C mittels Gelfiltration.....	116
6.2.11. Prüfung einer Beteiligung von RelA an der Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur.	119
6.2.12. Niedrige Sporulationsfrequenz in der Kälte.....	120
7. Diskussion	122
7.1. Aufbau der Transkriptomstudie zur Induktion der generellen Stressantwort	122
7.1.1. Auswertung der Identifizierungsstrategien für die verschiedenen Stressantworten.....	123
7.1.2. Beurteilung der Funktionen neuer SigB-abhängiger Gene.....	125
7.1.3. Analyse der salzspezifischen Induktion des ECF-Sigmafaktors SigW ..	128
7.2. Generelle Stressantwort und niedrige Temperatur	131
7.2.1. Einordnung der kältespezifischen Anschaltung der generellen Stressantwort.....	133
7.2.2. RsbV-unabhängige Induktion der generellen Stressantwort	135
7.3. Ausblick	139
8. Literaturverzeichnis.....	141
9. Anhang.....	151

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
chDNA	chromosomale DNA
co	Kontrolle
DSM	Difco sporulation medium
GFP	green fluorescence protein
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosid
LB	Luria-Bertani Broth
MM	Minimalmedium
nt	Nukleotide
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
rel	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Scr	Screening
Sel	Selektion
Sp	Spizizen Minimalmedium
Tab	Tabelle
TD	Transduktion
TF	Transformation
Tn	Transposon
üN	über Nacht
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

Alle weiteren Abkürzungen wurden entsprechend dem Duden „Duden-Deutsches Universalwörterbuch“ (4.Auflage, 2001) und den IUPAC-IUB (Biochemical Nomenclature and Related Documents, 1978) verwendet.

2. Zusammenfassung

Der alternative Sigmafaktor SigB kontrolliert die Expression des generellen Stressregulons in *Bacillus subtilis*. Durch die Synthese von generellen Stressproteinen werden nicht-wachsende *B. subtilis*-Zellen mit einer unspezifischen, vielfältigen und vorsorgenden Resistenz gegen zukünftigen Stress ausgestattet.

Um die Funktion der generellen Stressantwort im Adaptationsnetzwerk dieses Gram-positiven Modellorganismus besser zu verstehen, wurden die Veränderungen im Transkriptom nach Einwirkung von Hitze, Salz und Ethanolstress analysiert. Diese Studie wurde mit DNA-Makroarrays durchgeführt, auf die PCR-Produkte aller 4107 Gene gespottet waren. Insgesamt konnten 124 SigB-abhängige Gene identifiziert werden. Darunter wurden 62 Gene neu dem SigB-Regulon zugeordnet und 62 schon zuvor beschriebene SigB-abhängige Gene bestätigt. Die genomweite Betrachtung des Transkriptionsprofils nach Umweltstress erlaubte auch eine Analyse der spezifischen Stressantworten von *B. subtilis* auf Hitze-, Salz- und Ethanolstress. Neu war die Induktion des ECF-Sigmafaktors SigW und seines Regulons nach 4% Salzstress. In „dot blot“-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Induktion des SigW-Regulons osmotisch bedingt war.

Außerdem wurde die Induktion der generellen Stressantwort bei niedriger Temperatur untersucht. Mit SigB-abhängigen LacZ- und GFP-Reporterfusionen konnte der Induktionsverlauf des SigB-Regulons in der Kälte beobachtet werden. Bei 37 °C wird das SigB-Regulon nach Umweltstress sofort, aber transient induziert. In der Kälte war dagegen eine langanhaltende Induktion der *ctc::lacZ*-Reporterfusion in der exponentiellen Phase zu sehen. Nach einem Maximum in der exponentiellen Wachstumsphase fiel die Induktion bis zum Übergang in die stationäre Phase langsam wieder ab, um dann auf einem erhöhten Level zu stagnieren.

Die Analyse verschiedener Regulatormutanten der SigB-Aktivität bestätigte den temperatursensitiven Phänotyp einer *sigB*-Mutante und dokumentierte die Wachstumsdefekte einer *rsbP*-Mutante und einer *rsbUP*-Mutante bei 15 °C, die vermutlich durch die schwache Induktion des SigB-Regulons in diesen Zellen verursacht waren. So stellte eine zusätzliche Deletion des Gens für den Anti-Antisigmafaktor RsbV in der *rsbUP*-Mutante die volle Induktion der Reporterfusion wieder her, wodurch ebenfalls der Wachstumsdefekt aufgehoben wurde. Die intensive, langanhaltende Induktion des generellen Stressregulons in der *rsbUPV*-Tripelmutante unterstützt die These eines

neuen Signaltransduktionsweges zur Aktivierung von SigB in der Kälte. In weiteren Arbeiten wird zu klären sein, ob in die Aktivierung von SigB in der Kälte weitere Proteine einbezogen sind oder für die Aktivierung eine intrinsische Instabilität des RsbW/SigB-Komplexes verantwortlich ist.

3. Einleitung

50 Jahre nach der Entdeckung der Doppelhelix hat die moderne Biologie viele Geheimnisse der Erbsubstanz enträtselt (Watson, 1953). So sind der Kode, mit dem die Erbinformation chiffriert ist, verstanden und die Sequenzen einer Vielzahl von Organismen bekannt (Crick, 1962; Khorana, 1977; Nirenberg, 1977). Jedoch hat die Entschlüsselung ganzer Genome, wie von *Escherichia coli* (Blattner, 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Initiative, 2000) oder des *Homo sapiens* (Venter, 2001) (Consortium, 2001) nicht die komplexen Interaktionen erklären können, die das Leben ausmachen. Von den ca. 4200 Genen, die in *E. coli* gefunden wurden, konnten gerade einmal 60% einem Protein mit bekannter oder möglicher Funktion zugeordnet werden (Blattner, 1997). Bei höheren Organismen wie uns Menschen mit 28.000-36.000 Genen ist der Anteil an bekannten Genprodukten und deren Rolle noch geringer ([Http://www.sanger.uk](http://www.sanger.uk), 2003), daher folgt der Analyse der genetischen Information jetzt eine funktionelle Beschreibung der Wechselwirkungen innerhalb der Lebewesen. Diese intra- und interzellulären Vernetzungen sind die ausbalancierte Konsequenz der Adaptation an einwirkende Umweltsignale. Eine Analyse dieser präzise regulierten Adaptationsnetzwerke scheint für einfache Modellsysteme und –organismen am aussichtsreichsten. Aufgrund ihrer geringeren Komplexität als einzellige Lebensform und ihrer großen Zelloberfläche im Vergleich zum Zellvolumen bieten Bakterien ideale Voraussetzungen für die Studie von regulatorischen Netzwerken, da sie ständig in engem Kontakt mit ihrer Umwelt stehen. Ein etablierter Modellorganismus ist das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis*. In seinem natürlichen Habitat ist dieser Prokaryont der Einwirkung verschiedenster Stress- (Temperaturschwankungen, Austrocknung und toxische Substanzen) und Mangelsituationen (Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- und Phosphatlimitationen) ausgesetzt, die das Wachstum hemmen. So erreicht *B. subtilis* unter optimalen Wachstumsbedingungen im Labor eine Generationszeit von 20–30 min. Die harschen und wechselnden Umwelteinflüsse in seinem Lebensraum, den oberen Bodenschichten, verlängern die Verdopplung der Zelle auf 50-100 Stunden (Hecker and Völker, 2001). Reichen die Nährstoffressourcen innerhalb seines Ökosystems nicht aus, so aktiviert dieses Bakterium ein sehr komplexes Zelldifferenzierungsprogramm, welches zur Bildung von multiresistenten Endosporen führt (Errington, 1993). Neben weiteren Adaptationsprozessen, wie der Chemotaxis (Stock, 1999), oder der „stringent

response“ (Cashel *et al.*, 1996) bildet *B. subtilis* unter Aminosäurehunger eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA aus, weshalb dieses Bakterium gut für genetische Experimente geeignet ist (Dubnau and Turgay, 2000). Die Apathogenität dieses Organismus macht ihn zusätzlich zu einem vorzüglichen Studienmodell für die potentiellen Anpassungsmechanismen verwandter, pathogener Gram-positiver Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, wie *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* oder *Listera monocytogenes*.

3.1. Das Hitzeschockstimulon

Die Analysen der verschiedenen Stress- und Adaptationsantworten auf verschiedene Stimuli haben gezeigt, dass in Reaktion auf einen Stressor zwei verschiedene Gruppen von Stressproteinen gebildet werden. Die eine Gruppe von Genen kodiert spezifische Stressproteine (SSP), die nur durch einen bestimmten Stressstimulus induziert werden. Sie sollen einen speziellen Schutz gegen den einwirkenden Stimulus vermitteln. Generelle Stressproteine (GSP) formen die zweite Gruppe, die als Antwort auf viele unterschiedliche Stressstimuli synthetisiert werden. Die GSP sollen allgemein vor Stress schützen und die Zelle unabhängig vom Stressfaktor an Stress- und Hungersituationen anpassen (Hecker *et al.*, 1996).

Sehr gut untersucht sind diese Schutzfunktionen für die Hitzeschockantwort von *E. coli*. Die spezifische Hitzeschockresistenz wird in diesem Gram-negativen Bakterium durch den alternativen Sigmafaktor Sig32 vermittelt (Yura *et al.*, 2000). Diese Untereinheit der RNA-Polymerase kontrolliert die transiente Transkription des Hitzeschockregulons aus molekularen Chaperonen (GroESL, DnaK) und ATP-abhängigen Proteasen (Lon, ClpX), die die Missfaltung und Aggregation von Proteinen verhindert und den Abbau von falschgefalteten Proteinen katalysiert. Gleichzeitig aktiviert Hitze einen weiteren alternativen Sigmafaktor SigS, der ein allgemeines Stressregulon reguliert, welches auch nach Glukoselimitation, Osmostress oder Kälteschock induziert wird (Hengge-Aronis, 2000).

Auch in *B. subtilis* setzt sich das Hitzeschockstimulon aus mehreren Regulons zusammen. Die Hitzeschockgene der Klasse I werden durch den negativen Regulator HrcA (heat regulation at CIRCE) kontrolliert (Yuan and Wong, 1995). Dieses Regulon besteht aus den beiden Chaperone-codierenden Operons *dnaK* und *groESL*. Vor dem Transkriptionsstart dieser Gene befindet sich ein „inverted repeat“ aus 9 bp und einem 9 bp langen „Spacer“. Dieses „inverted repeat“ wurde mehr als 80 mal in über 30 verschiedenen Organismen identifiziert und als „controlling inverted repeat of chaperon

expression“ (CIRCE) bezeichnet (Zuber and Schumann, 1994). Der Repressor HrcA bindet an dieses CIRCE-Element bei einer normalen Wachstumstemperatur von 37 °C, da er durch Interaktion mit der GroESL-Chaperonmaschine aktiviert wird. Ein auftretender Hitzeschock denaturiert viele Proteine und titriert die freien Chaperone aus, so dass HrcA nicht mehr in die aktive Form umgewandelt wird. Dieses Regulationsmodell erklärt sehr gut die transiente Expression der Hitzeschockgene der Klasse I (Schumann, 2000), weil der Repressor bei ausreichender Menge an den Chaperonen wieder renaturiert und aktiviert wird.

Die bei Hitzeschock aktivierte Protease ClpP und die regulatorischen ATPase-Untereinheiten ClpC und ClpE werden durch ein weiteres mit Hitze inaktiviertes Repressorprotein CtsR (controlling class III heat shock genes) kontrolliert. Der Repressor bindet als Dimer über ein „Helix-Turn-Helix“-Motiv an eine 7 bp lange CtsR-Box in der DNA (Derre *et al.*, 2000). Dabei stabilisiert das McsA-Protein den Repressor CtsR unter Nicht-Stressbedingungen. Nach Einwirkung von Hitze wird der Repressor durch McsB phosphoryliert, wodurch die Fähigkeit von CtsR an die DNA zu binden verhindert und die Expression der CtsR-reprimierten Gene induziert wird. Gleichzeitig ist der Repressor so für den Abbau durch die ClpCP-Protease markiert (Krüger, 2001).

In der Klasse IV sind alle hitzestressinduzierten Gene zusammengefasst, die nach Hitzeschock weder von SigB noch in *hrcA*- und *ctsR*-Mutanten induziert werden, für die aber der Mechanismus der Hitzeaktivierung bisher ungeklärt ist. Zu dieser Gruppe gehören *htrA*, *htpG* oder die Proteasegene *clpX* und *lonA* (Hecker and Völker, 2001).

3.2. Die generelle Stressantwort von *Bacillus subtilis*

Die meisten hitzeinduzierten Proteine werden aber durch den alternativen Sigmafaktor SigB kontrolliert und sind in der Klasse II der Hitzeschockgene zusammengefasst (Hecker *et al.*, 1996). Genau wie SigS in *E. coli* reguliert SigB in *B. subtilis* die Expression der generellen Stressgene, deren Produkte auf 2D-Gelen auch nach Einfluss anderer Stressoren, wie Salz, Ethanol, Glukoselimitation oder Phosphatmangel nachgewiesen wurden (Bernhardt *et al.*, 1997; Hecker and Völker, 1990; Völker *et al.*, 1994).

SigB wurde als erster alternativer Sigmafaktor 1979 von Haldenwang und Losick entdeckt. Die Funktion von SigB blieb lange Zeit unklar, da er keine Rolle in der Sporulation spielt und eine *sigB*-Mutante auch keinerlei Phänotyp während des exponentiellen Wachstums zeigt (Binnie *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987).

Erst als das Protein des schon zuvor als SigB-abhängig beschriebenen Gens *ctc* auf 2D-Gelen den generellen Stressproteinen zugeordnet werden konnte, wurde SigB mit der generellen Stressantwort in Verbindung gebracht (Völker *et al.*, 1992; Völker *et al.*, 1994). Ungefähr gleichzeitig fanden die Forscher um Bill Haldenwang, dass das *sigB*-Operon und *ctc* nach Einwirkung von Hitzestress verstärkt transkribiert werden (Benson and Haldenwang, 1993a). Außerdem wurde im Labor von Chester Price dokumentiert, dass *ctc* und *sigB* nicht nur nach Hunger, sondern durch verschiedene Stressoren induziert werden (Boylan *et al.*, 1993a).

Schon vorher wurde über die Beschreibung der Funktion von SigB-abhängigen Genen versucht die physiologische Aufgabe von SigB zu klären. Mit Hilfe einer Transposonmutagenese identifizierten Boylan *et al.* (1993b) acht SigB-abhängige Gene, die während der stationären Phase induziert wurden. In Anlehnung an SigS aus *E. coli* vermuteten sie, dass SigB ein Regulon der stationären Phase kontrolliert.

In darauf folgenden Proteomstudien wurden insgesamt 34 SigB-abhängige Proteine (Antelmann *et al.*, 1996; Antelmann *et al.*, 1997b; Bernhardt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1997; Völker *et al.*, 1994) und durch transkriptionelle Analysen weitere neun Mitglieder des Regulons identifiziert (Akbar and Price, 1996; Akbar *et al.*, 1999; Boylan *et al.*, 1991; Boylan *et al.*, 1993b; Varon *et al.*, 1993). Durch eine genomweite Promotorsuche kombiniert mit „slot blot“-Experimenten konnten Petersohn *et al.* (1999a) zusätzlich 24 potentielle generelle Stressproteine finden, so dass Ende der 90er Jahre ca. 75 Mitglieder des Regulons identifiziert waren.

3.2.1. Multiple, unspezifische und vorsorgende Stressresistenz

Anhand der bekannten Funktionen der generellen Stressproteine wird spekuliert, dass die generelle Stressantwort am Schutz vor oxidativem Stress, der Aufrechterhaltung der Redoxbalance bei Stress und Hunger, sowie der Anpassung an Salzstress und Hitzeschock beteiligt ist. Diese Schutzfunktion bezieht sich nicht nur auf DNA oder Proteine, sondern auch auf die Aufrechterhaltung der Zellintegrität durch Variation von Zellmembran und -hülle (Price, 2000). Besonders wichtig könnte die Rolle der generellen Stressantwort beim Schutz vor Radikalen sein, die durch oxidativen Stress produziert werden (Hecker and Völker, 1998). Die generelle Stressantwort wird selbst nicht durch oxidativen Stress induziert, aber Engelmann und Hecker (1996) zeigten, dass in Zellen unter Glukosemangel eine unspezifische Stressresistenz aufgebaut wird, die von SigB vermittelt wird.

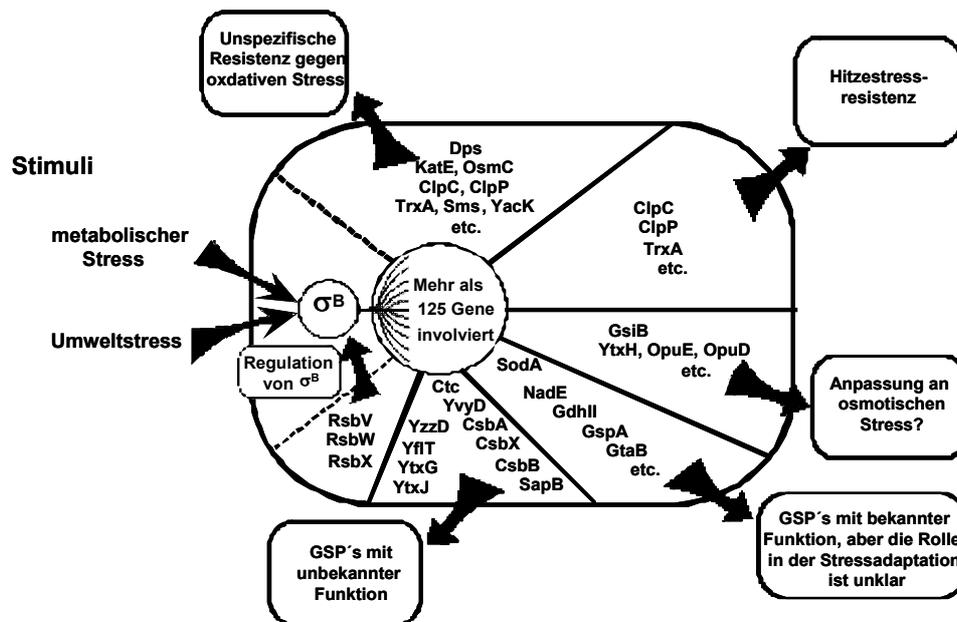


Abb. 3.1: Potentielle Funktionen der generellen Stressantwort (aus Hecker and Völker, 1998). Die generellen Stressproteine lassen sich grob in fünf funktionelle Gruppen einteilen, die teilweise miteinander überlappen.

An dieser generellen Reaktion gegen oxidativen Stress in der stationären Phase sind z.B. die SigB-abhängigen Katalasen KatX und KatB beteiligt, deren Aufgabe es ist, Radikale zu eliminieren. Ebenfalls in den Schutz der DNA vor Radikalen involviert scheinen die Proteine Sms und YacK, die im *clpC*-Operon kodiert sind (Krüger *et al.*, 1997). Hier überschneiden sich die unspezifische oxidative Stressresistenz und die Hitzeschockresistenz, weil durch beide Stressoren Proteine geschädigt werden. Die ATP-abhängigen Clp Proteasen sind hier am Abbau der denaturierten Proteine beteiligt (Krüger *et al.*, 1996). Das bei oxidativem Stress essentielle Dps wird ebenfalls von SigB transkribiert und scheint wichtig für den Schutz der DNA zu sein (Antelmann *et al.*, 1997a).

Auch bei der Adaptation an Wasser- bzw. Osmostress scheint die generelle Stressantwort beteiligt zu sein. So haben die beiden SigB-abhängigen Proteine GsiB und YtxH Ähnlichkeit zu pflanzlichen LEA-Proteinen, die eine Rolle bei Wasserstress spielen (Bray, 1993; Maul *et al.*, 1995; Varon *et al.*, 1996). Und mit dem Prolintransporter OpuE gehört ein Aufnahmesystem für osmotische Schutzsubstanzen zum SigB-Regulon (von Blohn *et al.*, 1997). Dieser Transporter unterliegt einer zusätzlichen SigA-abhängigen Kontrolle. Die Transkription von diesem Promotor ist genau auf die Stärke des osmotischen Stresses abgestimmt und hält das Expressionsniveau erhöht, solange der Osmostress einwirkt. Die Induktion über den SigB-Promotor ist nur transient und trägt nicht signifikant zur kontinuierlichen Expression der Langzeitadaptation an Osmostress bei (Spiegelhalter and Bremer, 1998).

In einer vierten Gruppe sind Proteine zusammengefasst, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte, aber deren Aufgabe in der Adaptation an Stress noch nicht geklärt ist. Dazu gehören NadE die NAD-Synthetase und NadC die Nikotinnukleotid-pyrophosphorylase, die vielleicht an der Aufrechterhaltung der NAD-Synthese unter Stress beteiligt sind oder über Redoxreaktionen die oxidative Stressresistenz unterstützen (Antelmann *et al.*, 1997b).

Eine neue Funktion ist durch die Beschreibung des *bmr*-Operons als Mitglied des SigB-Operons dazugekommen. Die Gene *bmrU* und *bmr* kodieren für ein „Multidrug-efflux“-System, das an der Exkretion toxischer Substanzen beteiligt ist (Petersohn *et al.*, 1999a).

Allerdings gibt es auch viele Proteine, für die keine biochemischen Funktionen beschrieben und auch Ähnlichkeiten zu anderen Proteinsequenzen nicht gefunden werden.

Aus der Studie der SigB-abhängigen Proteine ist zu erkennen, dass die generelle Stressantwort vielfältige Aufgaben in der Adaptation von *B. subtilis* an ungünstige Umweltbedingungen haben könnte. Schon Mitte der 80er Jahre haben Richter und Hecker (1986) diese nicht spezifische aber essentielle Schutzfunktion der generellen Stressproteine postuliert (1986). Die physiologische Relevanz dieser Funktionen ist mittlerweile durch intensive Mutantenstudien belegt.

In Experimenten zum Überleben von *B. subtilis* während starkem Hitze- (52 °C) und Salzstress (6% NaCl) entdeckten Hecker und Mitarbeiter (Völker *et al.*, 1992), dass eine Präadaptation von 30 min bei milden Stressbedingungen (48 °C oder 4% NaCl) das Überleben von nachfolgendem härterem Stress deutlich steigert. Auf 2D-Gelen war zu sehen, dass schon bei 48 °C oder 4% NaCl die spezifischen und generellen Stressproteine induziert wurden. Daraufhin untersuchten die Autoren, ob eine Präadaptation bei 48 °C auch das Überleben nach 6% NaCl steigert bzw. ein milder Salzstress eine unspezifische Hitzeresistenz bei 52 °C vermittelt. Eine Vorinkubation bei 48 °C rettete Zellen vor dem tödlichen Salzstress. Die Präadaptation mit 4% NaCl schützte die Bakterien nur teilweise vor einem starken Hitzeschock von 52 °C. Die Ursache für den nur teilweise erreichten Schutz vor Hitzeschock ist wahrscheinlich in der wichtigen Funktion der Chaperone zu sehen, die ausschließlich durch Hitze und Ethanol zu induzieren sind.

Dass SigB eine unspezifische Resistenz gegen oxidativen Stress vermittelt, demonstrieren Vergleiche einer *sigB*-Mutante mit einem Wildtyp, die während des exponentiellen Wachstums und in der stationären Phase unter Glukosemangel mit

10 mM H₂O₂ behandelt wurden. Schon während des exponentiellen Wachstums ist die Überlebensrate in der *sigB*-Mutante zehnmal geringer als im Wildtyp. Dieser Unterschied erhöht sich während der stationären Phase auf den Faktor 1000 (Engelmann and Hecker, 1996). Ähnliche Befunde ergab die Zugabe von Cumenehydroperoxid zu unter Glukosemangel gewachsenen Zellen. Hier war die *sigB*-Mutante 10-100fach sensitiver gegen oxidativen Stress als der Wildtyp. Dies unterstreicht die essentielle Rolle der generellen Stressantwort im Aufbau einer oxidativen Stressresistenz in hungernden Zellen (Antelmann *et al.*, 1996).

Die besondere Rolle von SigB für das Überleben von nicht wachsenden Zellen der stationären Phase nach Glukoselimitation belegen Gaidenko und Price (1998). Sie zeigen, dass eine *sigB*-Mutante nach fünf Tagen in einem sauren (pH 5) oder einem alkalischen Medium (pH 9) 10-20 mal sensitiver ist als der Wildtyp. Ein ähnliches Ergebnis dokumentierten sie nach 7-9% Ethanol im Medium. Allerdings fanden sie auch, dass SigB für die Anpassung an Hunger in Vollmedium nicht notwendig ist, da die *sigB*-Mutante ohne zusätzlichen Stress nicht sensitiver war als der Wildtyp. Der Verlust der generellen Stressantwort war für die Zellen unter Glukoselimitation bei niedrigen Wachstumsraten im Chemostaten sogar von Vorteil, weil die *sigB*-Mutante ohne zusätzlichen Stress hier besser wuchs als der Wildtyp (Schweder *et al.*, 1999). Dies könnte mit der höheren metabolischen Belastung des Wildtyps durch die Synthese der Stressproteine erklärt werden. Somit scheint die generelle Stressantwort nicht allgemein essentiell für das Überleben von nicht wachsenden *B. subtilis*-Zellen zu sein, sondern entscheidend für die Bewältigung von zusätzlich auftretendem Stress während des Wachstumsstops.

Den Einfluss einer Mutation in *sigB* auf das Überleben nach Einwirkung von Hitze, Salz und Ethanol zeigten Experimente die von Völker *et al.* (1999) ausgeführt wurden. Anhand dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass die generelle Stressantwort bei einer Wachstumshemmung benötigt wird, die durch das Wachstum verhindernde Stresskonzentrationen ausgelöst wird. Experimente mit 10% Salz, 9% Ethanol, Säurestress (pH 4,3), Hitze (54 °C) oder nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen bestätigten, dass die *sigB*-Mutante hier einen signifikanten Überlebensnachteil hat. Dieser Vorteil des Wildtyps im Überleben von besonders hartem Stress wurde noch drastischer, wenn die Zellen zuvor durch einen schwachen Stress mit SigB-abhängigen Proteinen beladen wurden (Völker *et al.*, 1999). Nach einer Präinkubation von 30 min bei 48 °C und einem darauffolgenden harten Hitzeschock von 54 °C hatte der Wildtyp einen klaren Vorteil gegenüber der *sigB*-Mutante, weil er ca. 5000fach besser überlebte.

Bei einem milden Hitzestress oder Salzstress hat eine *sigB*-Mutante noch keinen Wachstums- und Überlebensnachteil, obwohl das SigB-Regulon im Wildtyp schon induziert wird. Unter milden Stressbedingungen bieten die auf die Stressintensität genau abgestimmten spezifischen Stressantworten eine optimalere Adaptation. So ist z. B. bekannt, dass die Expression der Opu-Transporter für die Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen auf die Stärke des Osmostresses abgestimmt ist (Bremer and Krämer, 2000). Auch die Regulation des HrcA-Regulons während eines Hitzeschocks erlaubt diese Feinjustierung.

Zusammen mit den Funktionsbeschreibungen für die generellen Stressproteine lässt sich die physiologische Aufgabe von SigB so definieren: Die generelle Stressantwort stattet durch Stress oder Hunger nicht wachsende Zellen von *B. subtilis* mit einer vielfältigen, unspezifischen und vorsorgenden Stressresistenz aus.

3.2.2. Regulation des alternativen Sigmafaktors SigB

Der Transkriptionsfaktor SigB wird durch das siebte Gen eines acht Gene umfassenden Operons kodiert (Abb. 2.2). Alle anderen Gene dieser Transkriptionseinheit kodieren für Regulatoren der SigB-Aktivität. Vor dem ersten Gen *rsbR* ist ein vegetativer Promotor lokalisiert von dem aus das komplette Operon abgelesen wird (Wise and Price, 1995). Zwischen *rsbU* und *rsbV* befindet sich ein weiterer SigB-abhängiger Promotor, über den SigB die eigene Transkription stimuliert (positive Autoregulation) (Kalman *et al.*, 1990). Die genetische Organisation im stromabwärts gelegenen Teil ähnelt sehr stark der Genanordnung des *spoIIA*-Operons mit der Reihenfolge *spoIIAA-spoIIAB-spoIIAC*. Allerdings kodiert das *sigB*-Operon mit *rsbX* ein Gen mehr als das *spoIIA*-Operon. Letzteres kodiert den Sporulationssigmafaktor SigF und seine beiden Hauptregulatoren SpoIIAA und SpoIIAB. Sequenzvergleiche beweisen neben einer großen Sequenzähnlichkeit der beiden alternativen Sigmafaktoren eine hohe Identität zwischen RsbV-SpoIIAA (32%) und RsbW-SpoIIAB (27%) und lassen auf einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus für SigB und SigF schließen (Kalman *et al.*, 1990). Tatsächlich werden beide Sigmafaktoren nicht über ein Zweikomponentensystem kontrolliert, sondern durch die alternative Variante des „partner-switching“ (Garsin *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996). Mit dem Eintritt in die stationäre Phase werden die Proteine des *spoIIA*-Operons exprimiert, wobei der Anti-Antisigmafaktor SpoIIAA direkt durch die Kinaseaktivität des Antisigmafaktors SpoIIAB phosphoryliert wird. Gleichzeitig bindet SpoIIAB an SigF und blockiert die Interaktion des Sigmafaktors mit der RNA-Polymerase. Entscheidend für die Entlassung von SigF aus dem inhibierenden Komplex ist die Aktivität eines weiteren Proteins, der

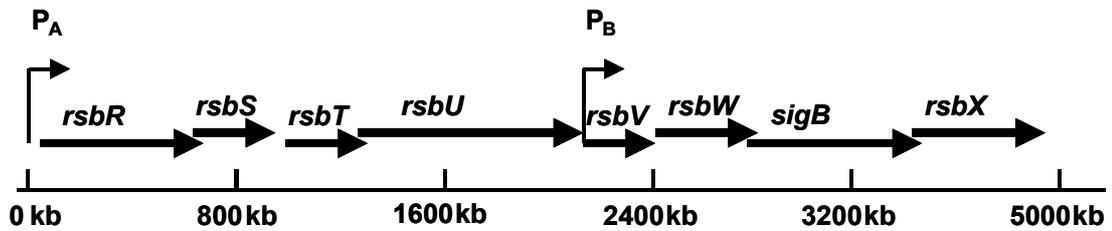


Abb. 3.2: Organisation des *sigB*-Operons von *B. subtilis*. Das Gen liegt in einem acht Gene umfassenden Operon. Die anderen sieben Genprodukte sind in die posttranslationale Kontrolle von SigB involviert. Die Abkürzung *rsb* in den Gennamen steht für „regulator of sigma B“. Der vegetative Promotor vor *rsbR* ist mit P_A markiert und erlaubt die Basalexpression des Operons. P_B ist ein interner, SigB-abhängiger Promotor.

Phosphatase SpoII E , die im Septum der Vorspore verankert ist. SpoII E katalysiert die Dephosphorylierung von SpoII A , das nun durch Bindung an den SpoII AB /SigF-Komplex den Antisigmafaktor zum Partnertausch („partner-switching“) veranlasst. Bei diesem Prozess kommt SigF frei und kann die Transkription des SigF-Regulons durch Assoziation an die Core-RNA-Polymerase beginnen. Die Bindung von SpoII AB an SigF erfordert ATP (Alper *et al.*, 1994). Durch die Phosphorylierung von SpoII A entsteht ein SpoII AB /ADP/SigF-Komplex, aus dem der Sigmafaktor leicht entkommt. Der langlebige SpoII AB /ADP-Komplex hat eine sehr hohe Affinität zu SpoII A und steht somit für die Inaktivierung von SigF nicht mehr zur Verfügung (Alper *et al.*, 1994; Min *et al.*, 1993). Allerdings wird die Transkription des SigF-Regulons vor Einzug des Septums durch einen hohen ATP-Spiegel und genügend freiem SpoII AB verhindert. Mit dem Einzug des Septums kommt die Phosphatase SpoII E hinzu, die phosphoryliertes SpoII A dephosphoryliert. Die ständige Reaktivierung des Anti-Antisigmafaktors hält SpoII AB im Phosphorylierungszyklus gefangen und SigF kann die Transkription des SigF-Regulons initiieren (Arigoni *et al.*, 1995; Pogliano *et al.*, 1997).

Auch die Aktivierung des generellen Stresssigmafaktors SigB erfolgt nach dem Prinzip des „partner-switch“. Allerdings spielen die Nukleotide ATP und ADP keine entscheidende Rolle bei der Komplexbildung (Alper *et al.*, 1994). Der Antisigmafaktor RsbW bindet ohne Nukleotide an den Sigmafaktor SigB und inaktiviert diesen während des exponentiellen Wachstums (Benson and Haldenwang, 1993b). Genau wie SpoII AB besitzt RsbW eine ATP-abhängige Kinaseaktivität, die der Inaktivierung des Anti-Antisigmafaktors RsbV durch Phosphorylierung dient (Dufour and Haldenwang, 1994; Völker *et al.*, 1996). Die entscheidende Reaktion zur Induktion des SigB-Regulons ist die Dephosphorylierung von RsbV~P, weil nur RsbV mit RsbW interagieren kann, um SigB aus dem inhibierenden Komplex zu entlassen.

Die Aktivierung des Anti-Antisigmafaktors erfolgt nach Umweltstress oder metabolischem Stress über zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege. Der

Mangel an Glukose, Phosphat, oder Sauerstoff initiiert die Dephosphorylierung von RsbV~P über die PP2C-Phosphatase RsbP. Diese Phosphatase ist ein Flavoprotein mit einer PAS-Domäne, über die dieses Protein in der Lage sein könnte den Energiezustand der Zelle zu messen (Vijay *et al.*, 2000).

Die Abkürzung PAS ist ein Akronym aus den drei Kürzeln der eukaryontischen Proteine, in denen diese Sensordomäne zuerst entdeckt wurde: „period clock protein“ (PER) aus Fruchtfliegen, „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT) aus Wirbeltieren und „single-minded protein“ (SIM) ebenfalls aus Fruchtfliegen. Im Gegensatz zu anderen Sensormodulen sind PAS-Domänen im Zytosol lokalisiert, um Veränderungen von Licht, Sauerstoff, und Redoxpotentialen zu bestimmen (Taylor and Zhulin, 1999).

Die Frage nach der Art des Signals, welches die PAS-Domäne in RsbP wahrnimmt, ist noch nicht geklärt. Aber die Aktivität der Phosphatase ist abhängig von RsbQ, einer α/β -Hydrolase. Mit dem „Hefe-TwoHybrid-System“ war eine deutliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachzuweisen (Brody, 2001). Beide Gene werden gemeinsam in einem Operon kodiert, das nicht der Stressinduktion unterliegt. Bei LacZ-Messungen mit einer *rsbQ*-Mutante wurde außerdem keine Aktivierung der SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Fusion nach Übergang in die stationäre Phase oder Glukoselimitation detektiert. Allerdings war eine deutliche LacZ-Aktivität nach Ethanol- und Salzstress zu messen. Genau wie RsbP ist RsbQ also ein positiver Regulator im metabolischen Stresssignaltransduktionsweg der SigB-Aktivität (Brody, 2001). Wie RsbQ in die Regulation der Phosphataseaktivität von RsbP eingreift ist unklar, allerdings glauben Brody *et al* (2001), dass RsbP selbst das Substrat von RsbQ sein könnte.

Vor der Entdeckung von RsbP wurde eine Abschwächung der Kinaseaktivität von RsbW durch sinkende ATP-Level für die Induktion der generellen Stressantwort nach metabolischem Stress verantwortlich gemacht. Diese Hypothese basiert auf der Abnahme des intrazellulären ATP-Levels nach metabolischem Stress, der erhöhten Aktivität von SigB in ATPase-Mutanten und dem Befund, dass RsbW große Mengen an ATP für eine effektive Phosphorylierung von RsbV *in vitro* benötigt (Alper *et al.*, 1996; Völker *et al.*, 1995b). Eine neue Analyse der Komplexzusammensetzung und –interaktion von RsbV, RsbW und SigB greift diese These wieder auf (Delumeau, 2002). Die Daten bestätigen, dass die Beeinflussung der Kinaseaktivität von RsbW durch den Abfall des ATP-Levels physiologisch relevant ist. Somit überprüft neben den Proteinen RsbP und RsbQ auch RsbW den Energielevel der Zelle. Mitentscheidend für die

Aktivierung von SigB ist die höhere Affinität von RsbW zu RsbV als zu SigB, weil durch eine Abnahme der Kinaseaktivität das Gleichgewicht zwischen RsbV und RsbV~P durch die Dephosphorylierung über RsbP zugunsten der aktiven Form verschoben wird (Delumeau, 2002). Somit kooperiert der Antisigmafaktor RsbW mit RsbP und RsbQ bei der Aktivierung von SigB nach Energiestress.

Die Einwirkung von Umweltstress führt zur Aktivierung einer anderen PP2C-Phosphatase RsbU, die RsbV~P dephosphoryliert (Völker *et al.*, 1995a; Yang *et al.*, 1996). Hier erfolgt die Signaltransduktion über eine zweite „partner-switch“-Kaskade zu der das Aktivatorprotein RsbT und der Antagonist RsbS gehören (Kang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996). Neue Daten zeigen, dass RsbS mit dem Modulatorprotein RsbR einen multimeren Komplex bildet, der RsbT durch Bindung inaktiviert. Die Bindung von RsbT an den RsbR/RsbS-Komplex ist nur stabil, solange RsbS nicht phosphoryliert wird. Allerdings hat RsbT eine Kinaseaktivität die gegen RsbS gerichtet ist. Ein aktuelles Modell geht davon aus, dass ohne die Einwirkung von Stress die dritte Phosphatase RsbX, die bisher nur als „Feedback“-Regulator in die Umweltstress-signaltransduktion einwirkte, den Effekt der Phosphorylierung von RsbS durch RsbT neutralisiert. Erst durch die stressbedingte Phosphorylierung von RsbR wird die Kinaseaktivität von RsbT gesteigert, so dass es sich aus dem Komplex mit RsbR/RsbS befreit und RsbU aktiviert (Chen, 2003). Neben den beschriebenen Proteinen greifen offenbar noch weitere Proteine in die Regulation der SigB-Aktivität ein (Gaidenko *et al.*, 1999). Deren präzise Funktion ist aber weit weniger gut verstanden. Aber es gibt eine Gruppe von paralogen Proteinen zu RsbR, deren Beteiligung an der Signaltransduktion nach Umweltstress bewiesen ist. Die Regulatoren YojH, YqhA, YkoB besitzen alle die konservierten Phosphorylierungsstellen aus RsbR und interagieren im „Hefe-TwoHybrid-System“ mit RsbS, RsbR und untereinander. Ein viertes Protein, YtvA, hat anstatt der Phosphorylierungsstellen eine PAS-Domäne und interagiert nur mit YqhA und RsbR. Alle diese Proteine scheinen in einem Komplex vorzuliegen, der an der Signalübertragung nach Umweltstress beteiligt ist (Akbar *et al.*, 2001). Zudem gibt es noch ein weiteres Protein, das an der Auflösung des RsbR/RsbS/RsbT-Komplexes beteiligt ist. Obg ist ein GTP-bindendes Protein, welches essentiell für das Wachstum von *B. subtilis* ist und an der Initiation der Sporulation beteiligt zu sein scheint (Kok, 1994; Vidwans, 1995). Bei der Regulation der generellen Stressantwort nimmt es an der Aktivierung von SigB nach Ethanol und Hitzestress teil und coeluiert in Gelfiltrationsexperimenten mit RsbR, RsbS und RsbT. In diesen Versuchen wurde außerdem nachgewiesen, dass Obg mit Ribosomen eluiert und speziell an das riboso-

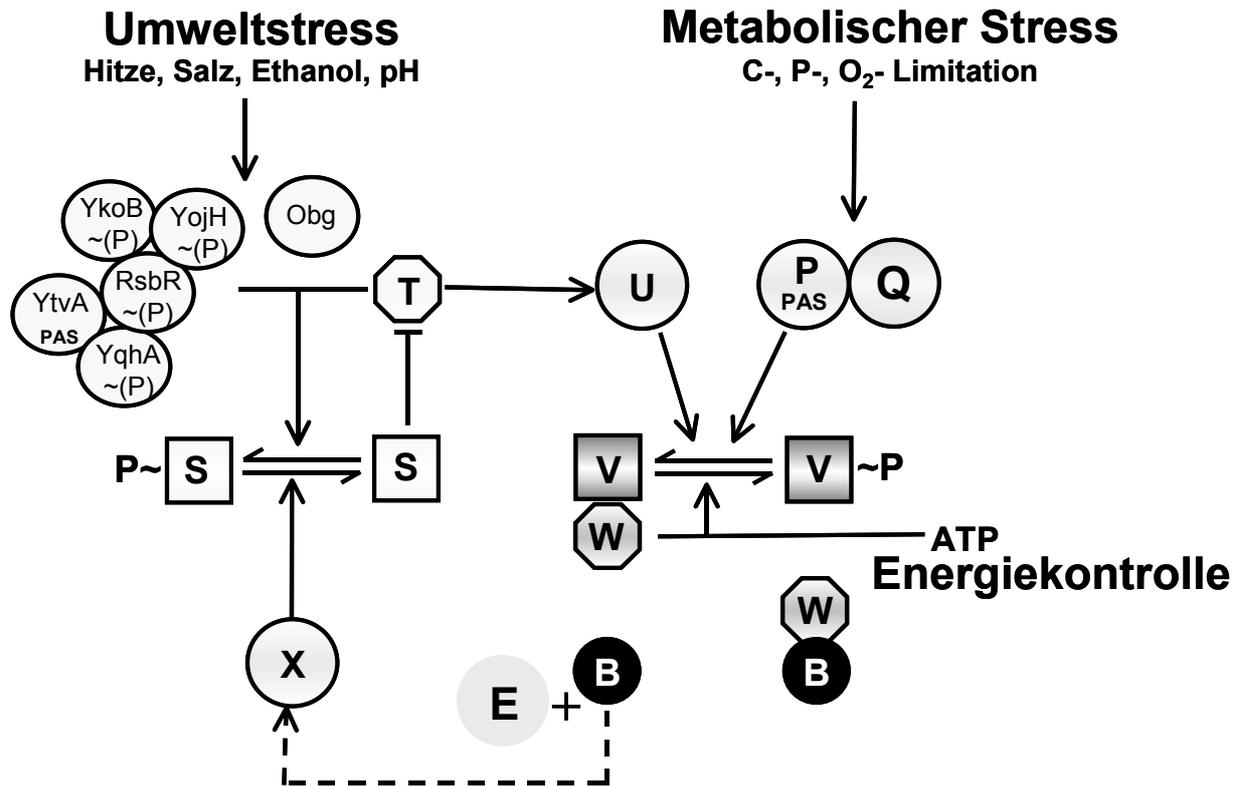


Abb. 3.3: Aktuelles Modell der Regulation der Aktivität des alternativen Stresssigmafaktors SigB. Während des exponentiellen Wachstums bindet RsbW (W) an SigB (B) und verhindert die Interaktion des Sigmafaktors mit der RNA-Polymerase (E) (Benson and Haldenwang, 1993b). Gleichzeitig wird RsbV (V) durch die Kinaseaktivität von RsbW phosphoryliert (Dufour and Haldenwang, 1994; Völker *et al.*, 1996). Die Schlüsselreaktion zur Aktivierung von SigB ist die Dephosphorylierung von RsbV durch eine der beiden PP2C-Phosphatasen RsbU (U) und RsbP (P) (Vijay *et al.*, 2000; Völker *et al.*, 1995a). An der Signaltransduktion nach metabolischem Stress ist neben RsbP noch die Hydrolase RsbQ (Q) beteiligt (Brody, 2001). Zusätzlich wird die Aktivierung von SigB durch metabolischen Stress über die Abnahme der RsbW-Kinaseaktivität bei sinkenden ATP-Mengen begünstigt (Alper *et al.*, 1996; Delumeau, 2002; Völker *et al.*, 1995b). Umweltstress aktiviert die Phosphatase RsbU über RsbT (T), das bei exponentiellem Wachstum am RsbR/RsbS-Komplex inaktiviert ist. Nach Einwirkung von externem Stress steigert RsbR~P die Kinaseaktivität von RsbT, was zur Phosphorylierung von RsbS und der Entlassung von RsbT aus dem RsbR-RsbS-Komplex führt (Chen, 2003). Das freie RsbT kann nun an RsbU binden und die Phosphataseaktivität stimulieren (Kang *et al.*, 1998). An der Aktivierung der Kinaseaktivität von RsbT scheinen noch die Proteine Obg, YkoB, YqhA, YojH und YtvA teilzunehmen (Akbar *et al.*, 2001; Scott and Haldenwang, 1999; Scott, 2000). Die dritte PP2C-Phosphatase RsbX (X) reaktiviert RsbS durch Dephosphorylierung (negative Autoregulation der SigB-Aktivität) (Smirnova *et al.*, 1998; Völker *et al.*, 1997).

male Protein L13 bindet (Scott and Haldenwang, 1999; Scott, 2000). Diese Befunde gaben den Hinweis, dass das Ribosom an der Signalwahrnehmung für Umweltstress in *B. subtilis* beteiligt sein könnte. Erhärtet wurden diese Ergebnisse durch Experimente in denen Mutanten, die das ribosomale Protein L11 (RlpK) verloren haben, keine Anschaltung von SigB nach Umweltstress aufweisen (Zhang *et al.*, 2001).

Das RsbX-Protein wirkt in diesem System als homöopathischer „Feedback“-Regulator, um die Zelle vor zu hohen, letalen SigB-Mengen zu schützen (Smirnova *et al.*, 1998; Völker *et al.*, 1997).

3.2.3. Vernetzung der generellen Stressantwort mit anderen Adaptationsantworten von *Bacillus subtilis*

Die Fülle der spezifischen und nicht spezifischen Stress- und Adaptationsantworten, wie Proteolyse, Kompetenz, Chemotaxis, Antibiotikasyntese oder Sporulation, erfordert eine präzise Abstimmung, die sich in der Organisation eines komplizierten regulatorischen Netzwerkes manifestiert. Schon die Analyse des Hitzeschockstimulons hat gezeigt, dass auch der generelle Stresssigmafaktor SigB nicht isoliert, sondern in Kooperation mit anderen Regulatoren, wie HcrA oder CtsR reagiert. Deutlich wird die Vernetzung der einzelnen Antworten durch die Gene, die einer doppelten oder mehrfachen Kontrolle durch verschiedene globale Regulatoren unterliegen. So werden die Proteaseuntereinheiten ClpP und ClpC von SigB und CtsR kontrolliert. Aber diese beiden Proteine verbinden die generelle Stressantwort auch mit der Kompetenzentwicklung, weil sie in die Regulation von ComK und in die Chemotaxis durch die positive Regulation von SigD eingreifen (Msadek *et al.*, 1994; Msadek *et al.*, 1998). Über die gemeinsame Kontrolle von *yvyD* und des *ytxGHJ*-Operons ist SigB mit SigH verbunden, dem ersten alternativen Sigmafaktor der Sporulationskaskade (Drzewiecki *et al.*, 1998; Varon *et al.*, 1996). Eine weitere Verknüpfung zur Sporulation besteht über *katX*. Das Katalasegen wird außer durch SigB während der Einwirkung von unterschiedlichen Stressoren, in der Vospore durch SigF transkribiert (Petersohn *et al.*, 1999b).

Das Gen *ydjC* steht unter der doppelten Kontrolle von SigB und des „extracytoplasmatic function“-Sigmafaktors SigW (Petersohn *et al.*, 1999a). Dieser ist einer von sieben alternativen Sigmafaktoren in *B. subtilis*, die durch extrazytoplasmatische Signale aktiviert werden. Diese ECF-Sigmafaktoren werden durch einen membranengebundenen Antisigmafaktor kontrolliert, der über einen Signaltransduktionsmechanismus im Periplasma reguliert ist (Raivio, 2001). Über SigW ist bekannt, dass er nach Alkalistress induziert wird und ein Regulon transkribiert, das an der Detoxifizierung der Zelle beteiligt zu sein scheint (Huang *et al.*, 1998; Wiegert, 2001).

3.3. Kälteschockantwort von *Bacillus subtilis*

Die Untersuchungen zum Einfluss von Temperaturschwankungen auf Organismen mündeten meistens in der Analyse der Hitzeschockantworten, da hohe Temperaturen auffälligere Schäden, wie denaturierte Proteine, in Zellen hervorrufen. Aber gerade in den Böden unserer Breitengrade sind in der Erde lebende Bakterien

häufiger niedrigen Temperaturen bis unter den Gefrierpunkt ausgesetzt als den Hitzeschock induzierenden Temperaturen von über 40 °C (Inouye, 1999).

Ein Temperaturabfall von 37 °C auf 15 °C erfordert neben der Anpassung der Membranviskosität auch eine Adaptation der DNA-Topologie, um die Translation und Replikation zu gewährleisten. Aber auch die Proteinbiosynthese und die Aktivität vieler Enzyme leiden unter einem plötzlichen Kälteeinbruch (Graumann and Marahiel, 1996; Jones, 1994).

Um die Ribosomenaktivität der niedrigen Temperatur anzupassen, werden innerhalb der ersten Stunde nach dem Kälteeinbruch die „cold induced proteins“ (CIP) verstärkt translatiert. Zu dieser Gruppe gehören auch die „cold shock proteins“ (CSP), die wahrscheinlich als RNA-Chaperone agieren. Sie verhindern die Ausbildung von Sekundärstrukturen in mRNAs und passen so die Translation an die Kälte an. Die verstärkte transiente Synthese dieser Proteine beruht nicht nur auf einer verstärkten Induktion der Transkription von Kälteschockgenen, sondern wird vor allem mit einer besseren Zugänglichkeit ihrer schon vor einem Temperatureinbruch vorhandenen mRNA für die noch nicht kälteadaptierten Ribosomen erklärt (Graumann and Marahiel, 1999).

Über einen längeren Zeitraum werden die „cold acclimatisation proteins“ (CAP) auf einem höheren Level translatiert. Dazu gehören Translationsfaktoren, wie EF-G und EFTu, die ebenfalls an der Kälteanpassung der Ribosomen beteiligt sind. Die verringerte Enzymaktivität der vegetativen Proteine GlnA, AroF, oder GuaB wird durch die Erhöhung ihrer Menge kompensiert (Graumann and Marahiel, 1999).

Da die Faltungenergie der Proteine bei Kälte stark erniedrigt ist, unterstützt *B. subtilis* den Zusammenbau von Proteinen durch die Propylisomerasen und den Triggerfaktor TF, die auch zu den CAPs gezählt werden (Göthel, 1998; Graumann, 1996).

Insgesamt macht die Proteinbiosynthese in der Kälte nur ungefähr $\frac{1}{5}$ der Synthesekapazität bei 37 °C aus. Dies erklärt die schwache Induktion von CIP`s und CAP`s.

Für die Anpassung der DNA an niedrige Temperaturen scheint die Gyrase verantwortlich zu sein. Sie führt negative Supercoils in die DNA ein, um die Zugänglichkeit der Nukleinsäure für Helikasen und die RNA-Polymerase zu verbessern (Grau, 1994).

Die Integrität der Zellmembran wird hauptsächlich durch die Erhöhung des Anteils von anteiso-verzweigten Fettsäuren erreicht. Dies geschieht durch eine von Iso-

leucin abhängigen Neusynthese anteiso-verzweigter Fettsäuren (Klein *et al.*, 1999). Zusätzlich wird der Anteil an ungesättigten Fettsäuren durch die Oxidation von gesättigten Fettsäuren in der Membran durch die Acyllipiddesaturase Des erhöht, die über ein Zweikomponentensystem reguliert wird (Aguilar *et al.*, 1999). Entscheidend ist die Aufrechterhaltung des flüssig-kristallinen Zustandes der Membran, um die Funktionen der eingelagerten Enzyme und Transporter aufrecht zu halten. In *E. coli* wird nur der Anteil an ungesättigten Fettsäuren durch Neusynthese erhöht, um die Integrität der Lipiddoppelschicht zu gewährleisten (Cronan, 1996).

3.4. Ziele dieser Arbeit

Unter Verwendung von DNA-Makroarrays sollte die Stressantwort des Bodenbakteriums *B. subtilis* nach Hitze-, Salz- und Ethanolstress untersucht werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung neuer SigB-abhängiger Gene zur weitergehenden Beschreibung der Funktionen der generellen Stressantwort im Adaptationsnetzwerk dieses Gram-positiven Modellorganismus.

Des Weiteren sollte durch die Beschreibung der kältebedingten Aktivierung des alternativen Sigmafaktors die Bedeutung der generellen Stressantwort analysiert werden. Dabei sollte durch den Gebrauch einer SigB-abhängigen LacZ- und einer GFP-Fusion der Expressionsverlauf dieser neuen, induzierenden Umweltbedingung verfolgt werden. Zusätzlich sollte der Regulationsmechanismus mit verschiedenen Methoden untersucht werden.

4. Mikroorganismen, Kultivierungsbedingungen und genetisches Material

4.1. Listen der verwendeten Mikroorganismen

Tab. 4.1: *Bacillus subtilis*-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Konstruktion	Resistenzen	Referenz
168	<i>trpC2</i>	UV-Bestrahlung		Burkholder & Giles, 1947
PY22	<i>trpC2</i>			(Youngman)
TW30	<i>relA::ery</i> (MLS ^r)	TF JH642 mit linearisiertem pK _O relA	Ery ^r	(Wendrich and Marahiel, 1997)
BCE2	<i>trpC2 sigH::cat</i>	TF 168 mit chDNA	Cat ^r	(Eymann, 2001)
BCE4	<i>trpC2 relA::ery</i> (MLS ^r)	TF 168 mit chDNA TW30	Ery ^r	(Eymann, 2001)
BSA46	<i>trpC2</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TD Spß <i>ctc::lacZ</i> in PY22	Cat ^r , Ery ^r	(Benson and Haldenwang, 1992)
BSA70	<i>trpC2 rsbU::kan</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSA46 mit linearisiertem pAK33	Km ^r , Cat ^r , Ery ^r	(Benson and Haldenwang, 1992)
BSA73	<i>trpC2 rsbU::kan</i> <i>rsbV312</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSA46 mit lin.pV312 Sel.: Km ^r ; Scr.: weiße Kolonien auf LB, Southern	Km ^r , Cat ^r , Ery ^r	(Benson and Haldenwang, 1992)
BSA115	<i>trpC2 rsbU::kan</i> P _{B28} ::P _{SPAC} <i>rsbW313</i> pTet-I Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSA46 mit lin. pWSPAC Sel.: Km ^r ; Scr.: Southern TF mit pTETI Sel.: Tet ^r	Km ^r , Tet ^r , Cat ^r , Ery ^r	(Völker <i>et al.</i> , 1995)
BSA386	<i>trpC2 rsbX::spc sup20a</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>		Cat ^r , Ery ^r , Spc ^r	(Petersohn, 2001)
BSM21	<i>trpC2 rsbU::kan</i>	TF 168 mit chDNA BSA70 Sel.: Km ^r ; Scr.: PCR chDNA und Southern	Km ^r	(Völker, 2000)
BSM22	<i>trpC2 rsbU::kan</i> <i>rsbV312</i>	TF 168 mit chDNA BSA73 Sel.: Km ^r ; Scr.: PCR chDNA und <i>EcoRI</i> -Schnittstelle in <i>rsbV312</i> mit Southern	Km ^r	(Völker, 2000)
BSM24	<i>trpC2 rsbV312</i> <i>rsbX::pWH25</i>	TF 168 mit chDNA BSA158 Sel.: Spc ^r ; Scr.: PCR chDNA und Southern	Spc ^r	(Völker, 2000)
BSM29	<i>trpC2 sigB::spec</i>	TF 168 mit chDNA BSM201 Sel.: Spc ^r ; Scr.: PCR chDNA und Southern	Spc ^r	(Völker, 2000)
BSM30	<i>trpC2 rsbP::spec</i>	TF 168 mit chDNA BSM14 Sel.: Spc ^r ; Scr.: Spc ^r	Spc ^r	(Völker, 2000)
BSM149	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kan</i>	TF BSM21 mit chDNA BSM30 Sel.: Spc ^r ; Scr.: Spc ^r , Km ^r	Spc ^r , Km ^r	(Krisp, 2002)
BSM150	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kan</i> <i>rsbV312</i>	TF BSM22 mit chDNA BSM30 Sel.: Spc ^r ; Scr.: Spc ^r , Km ^r	Spc ^r , Km ^r	(Krisp, 2002)
BSM151	<i>trpC2</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF 168 mit chDNA BSA46 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Em ^r	Cat ^r , Ery ^r	(Krisp, 2002)
BSM152	<i>trpC2 rsbP::spec</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSM30 mit chDNA BSA46 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Ery ^r	Cat ^r , Ery ^r	(Krisp, 2002)
BSM153	<i>trpC2 rsbU::kan</i> <i>rsbP::spec</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSM149 mit chDNA BSA46 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Ery ^r Km ^r	Cat ^r , Ery ^r , Km ^r , Spc ^r	(Krisp, 2002)
BSM154	<i>trpC2 rsbU::kan</i> Spß	TF BSM21 mit chDNA BSA46	Cat ^r , Ery ^r , Km ^r	(Krisp, 2002)

BSM155	<i>ctc::lacZ</i> <i>trpC2 rsbV312</i> <i>rsbX::pWH25 Spß</i> <i>ctc::lacZ</i>	Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Ery ^r , Km ^r TF BSM24 mit chDNA BSA46 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Spc ^r ,	Cat ^r , Spc ^r	(Krisp, 2002)
BSM156	<i>trpC2 sigB::spec</i> Spß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSM29 mit chDNA BSA46 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Ery ^r ,	Cat ^r , Ery ^r	(Krisp, 2002)
BSM201	<i>trpC2 rsbP::spec</i>	TF PY22 mit pAV01 Sel.: Spc ^r	Spc ^r	(Brigulla, 1999)
BSM202	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kana</i>	TF BSM 201 with chDNA BSA 70 Sel.: Km ^r ; Scr.: Spc ^r Km ^r	Spc ^r , Km ^r	(Brigulla, 1999)
BSM208	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>amyE::erm(gsiB::bgaB)</i>	TF BSM201 mit pMB01 C Ery ^r ; Scr.: Ery ^r , AmyE ⁻ , X-Gal ⁺	Spc ^r , Ery ^r	(Brigulla, 1999)
BSM215	<i>trpC2</i> <i>amyE::erm(gsiB::bgaB)</i>	TF PY22 mit chDNA BSM208 Sel.: Ery ^r ; Scr.: Ery ^r , Spc ^s , AmyE ⁻ , X-Gal ⁺	Ery ^r	(Brigulla, 1999)
BSM227	<i>trpC2</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF PY22 mit pGK30 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , AmyE ⁻ , Fluoreszenzmikroskopie, Phosphoimaging	Cat ^r	(Brigulla, 1999)
BSM263	<i>trpC2 sigW::neo</i>	TF 168 mit chDNA 168sigW:neo Sel.: Kan ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^r	Kan ^r	(Wiegert, 2001)
BSM264	<i>trpC2 sigW::kan</i> <i>sigB::spec</i>	TF BSM263 mit chDNA BSM29	Kan ^r , Spc ^r	diese Arbeit.
BSM265	<i>trpC2 sigW::kan</i>	TF PY22 mit chDNA BSM263	Kan ^r	diese Arbeit.
BSM266	<i>trpC2 sigB::spec</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM227 with chDNA BSM29 Sel.: Spc ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^r	Spc ^r , Cat ^r	diese Arbeit
BSM267	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kan rsbV312</i> SPß <i>ctc::lacZ</i>	TF BSM152 mit chDNA BSA73 Sel.: Kan ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^r	Spc ^r , Ery ^r , Kmr, Cat ^r	diese Arbeit
BSM268	<i>trpC2 sigB::spec</i> <i>amyE::erm(gsiB::bgaB)</i>	TF BSM29 mit chDNA BSM215 Sel.: Spc ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^r	Spc ^r , Ery ^r	diese Arbeit
BSM269	<i>trpC2</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF 168 mit chDNA BSM227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^s Cat ^r	Cat ^r	diese Arbeit
BSM275	<i>trpC2 rsbV312</i> <i>rsbX::pWH24</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM24 mit chDNA BSM227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^s , Cat ^r	Spc ^r , Cat ^r	diese Arbeit
BSM276	<i>trpC2 sigB::spec</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM29 mit chDNA BSM227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^s , Cat ^r	Spc ^r , Cat ^r	diese Arbeit
BSM277	<i>trpC2 rsbU::kan</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM21 mit chDNA BSM227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Km ^r , Ery ^s , Cat ^r	Km ^r , Cat ^r	diese Arbeit
BSM278	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM30 mit chDNA BSM227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Spc ^r , Ery ^s , Cat ^r	Spc ^r , Cat ^r	diese Arbeit
BSM279	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kan rsbV312</i>	TF BSM22 mit chDNA BSM202 Sel.: Spc ^r Scr.: Spc ^r Ery ^s Km ^r	Spc ^r , Km ^r	diese Arbeit
BSM280	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kan rsbV312</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM279 mit chDNA BSM227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Spc ^r , Ery ^s , Km ^r	Spc ^r , Cat ^r , Km ^r	diese Arbeit
BSM281	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>rsbU::kan</i> <i>amyE::cat(gsiB::gfp)</i>	TF BSM149 mit chDNA BSM 227 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Ery ^s , Km ^r , Spc ^r , Stärkehydrolyse	Spc ^r , Cat ^r , Km ^r	diese Arbeit
BSM282	<i>trpC2 relA::ery</i>	TF 168 mit chDNA BCE4 Sel.: Ery ^r ; Scr.: Spc ^s , Ery ^r , Km ^s	Ery ^r	diese Arbeit
BSM283	<i>trpC2 rsbP::spec</i> <i>relA::ery</i>	TF BSM201 mit chDNA BCE4 Sel.: Ery ^r Scr.: Spc ^r , Ery ^r , Km ^s	Spc ^r , Ery ^r	diese Arbeit
BSM284	<i>trpC2 trpC2 rsbV312</i> <i>rsbX::pWH25 relA::ery</i>	TF BSM24 mit chDNA BCE4 Sel.: Ery ^r Scr.: Spc ^r , Ery ^r , Km ^s	Spc ^r , Ery ^r	diese Arbeit
BSM285	<i>trpC2 sigB::spec</i> <i>sigH::cat</i>	TF BSM29 mit chDNA BCE2 Sel.: Cat ^r ; Scr.: Cat ^r , Spc ^r , Ery ^s Km ^s	Spc ^r , Cat ^r	diese Arbeit

Tab. 4.2: *Escherichia coli* - Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Resistenzen	Referenz
TG2	F ⁻ <i>traD36 lacI^f Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/ supE hsdΔ5 thi Δ(lac-pro) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet^R)</i>	Tet ^f	(Bethesda Research Laboratories) (Stratgene)
XL-10 gold	Tet ^R Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qΔM15Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]^A</i>	Tet ^f Cat ^f	(Bethesda Research Laboratories) (Invitrogen)
JM110	F ⁻ <i>traD36 lacI^f Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/ rpsL(Str^R) thr leu thi-1 lacY galK galT ara fhuA dam dcat supE44 Δ(lac-pro)</i>	Str ^f	(Bethesda Research Laboratories) (Invitrogen)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Amp ^f Kan ^f	(Invitrogen)

4.2. Genetisches Material

Tab. 4.3: Plasmide

Signatur	genetische Merkmale	Vektor	Referenz
pAV01	<i>rsbP::spec amp</i>	pBluKSP	(Völker, 1999)
pFSB79	<i>amyE::cat(gfp) amp</i>	pFSB1	(Spiegelhalter, 1997)
pGK30	<i>amyE::(gsiB::gfp)cat amp</i>	pFSB79	(Kuhnke, 2000)

Tab. 4.4: Primer

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
<i>amyE</i> -for	CGGTATGTGATTGTGAAGC	Amplifizierung der <i>amyE</i> -Region
<i>amyE</i> -rev	CAAATGCAGACAATATCAGC	Amplifizierung der <i>amyE</i> -Region
<i>gsiB</i> -T7-primer	TTACGACTCACTTAGGGAGGTCGTTGTT GCGGGCGT	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>gsiB</i>
UV140	GAGACCCGGGTTTTGTTTGTAAAGAA TTG	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>gsiB</i>
<i>sigB</i> -T7-primer	TAATACGACTCACTTAGGGAGGTTAACTC CACGAGG	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>sigB</i>
<i>sigB</i> mal5	ACACAACCATCAAAAACACTACG	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>sigB</i>
<i>sigW</i> -sense	CAGGATGCATTTGCGGACA	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>sigW</i>
<i>sigW</i> -T7	ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCTGCCT CTGTGA	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>sigW</i>
<i>spoVG</i> -fwd2	TGGTGAACACTGTGGAAGT	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>spoVG</i>
<i>spoVG</i> -T7-rev2	TAATACGACTCACTATAGGCTTATGTCAG CCCTTTC	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>spoVG</i>
<i>yceC</i> -for	GTGTGGCAATTTCTTTAG	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>yceC</i>
<i>yceC</i> -T7-rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTATC GTTTGTGCCTTCA	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>yceC</i>
<i>yfhLM</i> -forward	CAACAGTGTGTACGGATAC	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>yfhLM</i>
<i>yfhLM</i> -rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGACTGGAAG TATGCGATATAC	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>yfhLM</i>
<i>yoxA</i> -rev	TGATTGTTGTCCCTGAGTG	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>yoxA</i>
<i>yoxA</i> -T7-fwd	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATAACG AGCTTTC	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>yoxA</i>

<i>ytxG</i> -rev	TCCTGCAGCAAGGAGGTTT	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>ytxG</i>
<i>ytxG</i> -T7-fwd	TAATACGACTCACTATAGGGCTGATTTT TCTTTTGC	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>ytxG</i>
<i>yuaG</i> -northern-fwd	GTAATAAAAATGTTCATGTCG	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>yuaG</i>
<i>yuaG</i> -northern-rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGGC GAAGAATTTCTTTTCTTC	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>yuaG</i>
<i>yvyD</i> -rev	ATGAACTATAACATCAGAGGA	Forwardprimer zur Amplifikation von <i>yvyD</i>
<i>yvyD</i> -T7-fwd	TAATACGACTCACTATAGGGTTCAGTCG GTTCAATTAAGC	Reverseprimer zur Amplifikation von <i>yvyD</i>

4.2.1. Stammhaltung

Zur Stammhaltung von *B. subtilis* wurden DSM-Agarplatten verwendet, weil *B. subtilis* auf diesem Medium sporuliert und so bei RT überdauert.

E. coli wurde nach Inkubation auf LB-Platten mit oder ohne Antibiotikum bei 4°C gelagert. Von allen verwendeten Stämmen wurden Glycerinkulturen zur Langzeithaltung bei -70°C gelagert. Dazu wurde 1 ml einer frischen Kultur in der exponentiellen Phase mit 0,8 ml 50 %igem Glycerin gemischt und eingefroren.

Die Reinheit der Kulturen wurde mikroskopisch, über die Koloniemorphologie und molekularbiologisch durch Überprüfung der Resistenzenkassetten sichergestellt.

4.3. Medien

4.3.1. Vollmedien

Das Fertigmedium nach Luria-Bertani (LB) (Sigma, Deisenhofen) wurde standardmäßig zur Kultivierung der Bakterien verwendet. Für die Herstellung fester Medien wurde Luria-Bertani-Agar (Sigma, Deisenhofen) benutzt oder 15 g Agar/l (Sigma, Deisenhofen) in das entsprechende Medium gegeben. Substanzen, die nach dem Autoklavieren zugeben wurden, waren entweder sterilfiltriert oder autoklaviert. Diese Supplemente wurden erst nach Abkühlung des Agar auf 50°C steril zu geben. Das Sporulationsmedium DSM wurde für Experimente zur Untersuchung der generellen Stressantwort bei niedriger Temperatur verwendet. Das Medium 2xYT („double yeast tryptone“) wurde für die üN-Kulturen der Salz- und Osmostressversuche benötigt.

E. coli-Zellen wurden nach der Elektroporation in SOC-Medium inkubiert.

Tab. 4.5: Zusammensetzung der Vollmedien

SOC	Menge	Supplemente	
Bacto Tryptone*	20,0 g/l	MgSO ₄ * 2 M	10,0 ml/l
Bacto Yeast Extract*	5,0 g/l	Glukose* 2 M	10,0 ml/l
NaCl*	0,58 g/l		
KCl*	0,1 g/l		

*(Sigma, Deisenhofen)

DSM	Menge	Supplemente	Menge
Nutrient Broth*	8,0 g/l	MnCl ₂ * 1,0 mM	1,0 ml/l
KCl*	1,0 g/l	FeSO ₄ * 0,1 mM	1,0 ml/l
MgSO ₄ *	0,25 g/l	CaCl ₂ * 100,0 mM	1,0 ml/l

*(Sigma, Deisenhofen)

2xYT	Menge
Bacto Tryptone*	16,0 g/l
Bacto Yeast Extract*	10,0 g/l
NaCl*	5,0 g/l
mit 5 N NaOH auf pH= 7,0 einstellen	

*(Sigma, Deisenhofen)

4.3.2. Minimalmedien

Falls die physiologischen Untersuchungen es erforderten, wurde mit einem von Stülke beschriebenen leicht modifizierten Minimalmedium gearbeitet (Belitsky, 1980; Stülke *et al.*, 1993).

Tab. 4.6: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Stülke *et al.* (1993)

Grundmedium	Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	2,0 g/l
MgSO ₄ *	2,0 g/l
KCl*	2,0 g/l
Na ₃ Citrat**	2,0 g/l
Tris/HCl*	6,06 g/l
auf pH 7,5 einstellen	

*(Sigma, Deisenhofen) ** (Merck, Darmstadt)

Tab. 4.7: Supplemente für das Minimalmedium nach Stülke *et al.* (1993)

Supplemente	Stammlösung	üN-Medium	Aminosäure-limitation	Glukose-limitation
KH ₂ PO ₄ *	200,0 mM	0,6 mM	0,6 mM	0,6 mM
Lysin*-Lsg.	39,0 mM	0,78 mM	0,065 mM	0,78 mM
Tryptophan*-Lsg.	43,0 mM	0,86 mM	0,072 mM	0,86 mM
Glutamat*-Lsg.	500,0 mM	4,5 mM	4,5 mM	4,5 mM
CaCl ₂ *-Lsg.	500,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM
FeSO ₄ *-Lsg.	1,0 M	0,001 mM	0,001 mM	0,001 mM
MnCl ₂ *-Lsg.	1,0 M	0,01 mM	0,01 mM	0,01 mM
Glukose* [% (w/v)]	20,0 %	0,2 %	0,2 %	0,05 %

*(Sigma, Deisenhofen)

Alle Kälteexperimente wurden in definiertem SM-Medium durchgeführt (Anagnostopoulos and Spizizen, 1961).

Tab. 4.8: Grundmedium und Spurenelementelösung für das SM-Mediums

Grundmedium x 5	Menge	Supplemente x 100	Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	5,0 g	CaCl ₂ *	0,055 g
K ₂ HPO ₄ *	35,0 g	FeCl ₃ x 6H ₂ O**	0,0135 g
KH ₂ PO ₄ *	15,0 g	MnCl ₂ x 4 H ₂ O**	0,01 g
Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O*	2,5 g	ZnCl ₂ **	0,017 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O*	0,5 g	CuCl ₂ x 6H ₂ O**	0,0043 g
Ention. H ₂ O	475,0 ml	CoCl ₂ x 6H ₂ O**	0,006 g
		Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O**	0,006 g
		Ention. H ₂ O	100,0 ml

*(Sigma, Deisenhofen) **(Merck, Darmstadt)

Tab. 4.9: Zusammensetzung des SM-Mediums

SMM x 1 (100 ml)	Menge
Grundmedium x 5	19,0 ml
Spurenelemente x100	1,0 ml
Glukose* (50%)	1,0 ml
Tryptophan* (5 mg/ml)	0,4 ml
Ention. H ₂ O	auf 100 ml auffüllen

*(Sigma, Deisenhofen)

4.3.3. Medienzusätze

In dieser Arbeit wurde zum Ansetzen aller Medien und Lösungen doppelentionisiertes Wasser benutzt. Dafür wurde das Wasser in Marburg nach einer zentralen Entionisierung über eine weitere Ionenaustauschssäule (Seradest S1500, USF Elga Seral) geschickt. In Greifswald wurde doppelt entionisiertes Wasser verwendet, dass ebenfalls über Ionenaustauscher (Mischbett Wasservollentsalzer, Hartmann Medizin und Labortechnik) entsalzt wurde.

Tab. 4.10: Antibiotika und andere Medienzusätze

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin*	100,0 mg/ml	100,0 µg/ml	entionisiertes H ₂ O
Chloramphenicol*	5,0 mg/ml	5,0 µg/ml	96% Ethanol
Kanamycin*	20,0 mg/ml	20,0 µg/ml	entionisiertes H ₂ O
Kanamycin ^a	200,0 mg/ml	800,0 µg/ml	entionisiertes H ₂ O
Erythromycin*	1,0 mg/ml	1,0 µg/ml	96% Ethanol
Erythromycin ^a	400,0 mg/ml	800,0 µg/ml	96% Ethanol
IPTG**	1,0 M	1,0 mM	entionisiertes H ₂ O
X-Gal**	20,0 mg/ml	120,0 µg/ml	Dimethylformamid

*(Sigma, Deisenhofen) **(BTS; St.Leon-Rot)

^azur Hemmung der Translation in den Proben der Stressexperimente mit der *gsiB::gfp*-Fusion

4.4. Kultivierungsbedingungen

4.4.1. Kultivierung für allgemeine Stressversuche

LB-Medium (5 ml) in Reagenzgläsern wurde mit einer Einzelkolonie von einer DSM-Agarplatte inokuliert. Antibiotika wurden in den in Tab. 3.10 genannten Konzentrationen bei Bedarf zugegeben. Diese Vorkulturen wurden bei 37 °C auf einem Roller wenigstens 8 h inkubiert. Für die Übernachtskultur wurden 20 ml Aminosäure-(AS)-supplementiertes Minimalmedium in 200 ml Erlenmeyerkolben mit Zellen aus der Vorkultur 1:10000 angeimpft und bei 37 °C, sowie 200 rpm angezogen (Schüttelwasserbäder GFL1086, SS40-D, OLS200, GFL Grant). Die AS-Limitation verhindert bei Eintritt in die stationäre Phase die SigB-Aktivierung, so dass erhöhte SigB-Level in der üN-Kultur vermieden wurden, die den Versuch beeinträchtigt hätten. Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden vorgewärmte Medien auf $OD_{540} = 0,05$ angeimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte bei $OD_{540} = 0,3-0,4$ die Induktion des SigB-Regulons mit 1 mM IPTG oder bei Ethanolstress mit 4% Ethanol (v/v) und bei Salzstress mit 4% NaCl (w/v). Hitzestress wurde bei einer Temperatur von 48 °C gesetzt. Dazu wurde die Hälfte der Kultur zum Zeitpunkt der Induktion in vorgeheizte Kolben eines 48 °C-Wasserbades umgesetzt und die andere Hälfte weiter bei 37 °C geschüttelt. Glukoselimitationsversuche wurden immer in entsprechend supplementiertem Minimalmedium durchgeführt.

4.4.2. Kultivierung für Salz- und Osmostress

Für alle Salz- und Osmostressversuche wurde das Minimalmedium nach Stülke *et al.* (1993) ohne Glutamat verwendet, da in *Bacillus subtilis* Glutamat eine Vorstufe für die osmoprotektive Aminosäure Prolin ist.

Zum Animpfen der 5 ml LB-Vorkultur mit entsprechendem Antibiotika wurde eine sporulierte Einzelkolonie von DSM-Agarplatten verwendet. Die Reagenzgläser wurden bei 37°C auf einem Roller wenigstens 8 h inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 100 µl in 20 ml 2xYT überimpft und über Nacht bei 37 °C und 90 rpm in einem Wasserbad inkubiert. Für das eigentliche Experiment wurde Minimalmedium mit Zellen aus der üN-Kultur auf eine $OD_{540} = 0,05$ eingestellt und in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C und 125 rpm inkubiert. Für die Osmostressversuche wurden die Zellen bei einer $OD_{540} = 0,3$ mit 0,3 M NaCl, 0,35 M KCl, 0,5 M Saccharose oder 0,42 M Glycerin behandelt. Die angegebenen Konzentrationen üben auf die Zellen den gleichen osmotischen Druck

aus, weil die Substanzen bei dieser Konzentration die gleiche Osmolalität besitzen. Die Osmolalität wurde über ein Osmometer bestimmt.

Mit Salzkonzentrationen von 0,2 M, 0,7 M oder 1,2 M wurden die Zellen ebenfalls bei einer $OD_{540} = 0,3$ gestresst. Einem hypoosmotischen Schock wurden die Zellen ausgesetzt, indem sie in Minimalmedium mit 0,8 M Salz bis zu einer $OD_{540} = 1,0$ wuchsen. Bei dieser optischen Dichte wurden die Zellen mit vorgewärmtem Medium ohne NaCl auf eine $OD_{540} = 0,1$ verdünnt und so die Salzkonzentration um den Faktor 10 verringert.

Durch Zugabe von 1 mM Glyzinbetain in das Minimalmedium, wurde der Einfluss dieser osmoprotektiven Substanz auf die Genexpression untersucht.

In den Überlebensversuchen nach harschem Salzstress wurden die Zellen bei einer $OD_{540} = 0,4$ mit 10% NaCl geschockt. Vor und nach der Zugabe von NaCl wurden 1 ml Proben entnommen, die mit 0,9%iger NaCl-Lösung (pH 7,0) jeweils 1:10 verdünnt wurden. Von jedem Schritt bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} wurden 200 μ l mit Glasperlen auf LB-Agar ausplattiert und $\bar{u}N$ bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien gezählt.

4.4.3. Kultivierung für das kontinuierliche Wachstum in der Kälte

Die Untersuchungen zur Anschaltung des generellen Stressregulons bei kontinuierlichem Wachstum in der Kälte wurden in dem definierten Minimalmedium SMM durchgeführt. Aus einer LB-Vorkultur wurden 150 μ l Zellsuspension in 30 ml SM-Medium umgesetzt und bei 37 °C mit 90 rpm in einem Schüttelwasserbad über Nacht inkubiert. Mit diesen Übernachtskulturen wurden je 100 ml SMM auf eine $OD_{540} = 0,1$ angeimpft, die in einem Wasserbad bei 37 °C und 117 rpm geschüttelt wurden. Eine lange „lag“-Phase in diesem Minimalmedium konnte vermieden werden, wenn die Zellen aus den Übernachtskulturen umgesetzt wurden, bevor sie eine $OD_{540} = 2,0$ erreicht hatten. In diesen Kulturen wurden die Zellen auf eine $OD_{540} = 0,5$ angezogen. Diese exponentiell wachsenden Zellen wurden in 500 ml Kolben mit 37 °C warmen SMM auf eine $OD_{540} = 0,1$ eingestellt. Das Endvolumen der Kulturen betrug ca. 150 ml, die nun in einem Schüttelinkubator (Innova 4230, New Brunswick) bei 16 °C und 210 rpm inkubiert wurden. Die Entnahme von Zellsuspension zur Messung der optische Dichte und die Probenentnahme erfolgten immer bei RT unter sterilen Bedingungen an einer Brennerflamme. Diese Prozedur wurde immer sehr zügig durchgeführt, um die Kältekulturen möglichst kurz der erhöhten Umgebungstemperatur auszusetzen.

Für die Gelfiltrationsexperimente wurden die Kulturen genauso angezogen wie zuvor beschrieben. Nur wurde das Kulturvolumen auf 1,5 l pro Kältekultur erhöht. Die Volumina der Vorkulturen wurden ebenfalls entsprechend vergrößert. Die Kulturen wurden bei einer $OD_{540} = 1,0$ auf Eis geerntet und bei 4 °C und 10000 rpm (Rotor GSA, Sorvall RC-26, Sorvall) für 10 min sedimentiert. Die erhaltenen Pellets wurden in 2 ml Gelfiltrationspuffer mit PMSF (Merck, Darmstadt) resuspendiert, in einem 50 ml Falcon (Sarstedt, Nümbrecht) vereinigt, und wieder bei 4 °C und 8000 rpm (Rotor 12549, Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) für 5 min sedimentiert. Nach der Sedimentation wurden die Pellets bei -20 °C eingelagert.

Das gleiche Volumen (1,5 l) hatten auch die 37 °C-Kulturen und die mit 4% Ethanol gestressten Kulturen, die über die Gelfiltration analysiert werden sollten. Die 37 °C-Kulturen wurden auch bei einer $OD_{540} = 1,0$ geerntet. Der Ethanolstress wurde bei einer $OD_{540} = 0,8$ gesetzt und die Zellen 10 min danach sofort mit Eis in den Zentrifugenbechern heruntergekühlt und sedimentiert. Die Probenbearbeitung erfolgte wie bei den 16 °C-Kulturen.

Zur Aufnahme der Fluoreszenz einer *gsiB::gfp*-Reporterfusion wurden die Proben immer in SMM gewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz durch das Medium so gering wie möglich zu halten.

5. Methoden

5.1. Sterilisation

Medien wurden bei 1,2 bar Überdruck und 121°C autoklaviert. Die Ausgleichszeit für 1 l betrug 20 min. Glasgeräte wurden im Trockenschrank für 3 h bei 180 °C sterilisiert.

5.2. Photometrische Messungen

5.2.1. Absorptionsmessungen

Zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Proteinen oder Nukleinsäuren wurden Absorptionsmessungen benutzt. Im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich beruhen die Absorptionsvorgänge auf elektronischen Übergängen im Makromolekül. Die optische Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$\ln I_0/I = A = -\epsilon cd$$

I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichtes

I = Intensität des gemessenen Lichtes

A = Absorption

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient ($\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)

d = Länge der Messstrecke (cm)

c = Konzentration der absorbierenden Moleküle ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Dieses Gesetz gilt nur für ideale Lösungen.

5.2.2. Trübungsmessungen

Die Trübungsmessung wurde zur Abschätzung der Bakterienkonzentration eingesetzt. Als Trübung bezeichnet man die Ablenkung von Licht an in einem Medium suspendierten kleinen Teilchen. Zur Dokumentation des Wachstums von *Bacillus subtilis* wurde die Zunahme der Trübung bei 540 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Dazu wurde 1 ml Bakteriensuspension in Plastikküvetten (Roth, Karlsruhe) pipettiert und die optische Dichte gegen einen Blindwert aus unbewachsenem Medium bestimmt.

5.3. Zellaufschluss

Der Aufschluss von Bakterienzellen beruht meistens auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand und der Zellmembran. Allerdings gibt es auch Aufschlussverfahren bei denen die Zellen durch Enzyme (z.B. Lysozym) oder die Einwirkung von chemischen Substanzen geöffnet werden können. Die Wahl der richtigen Aufschlussmethode richtet sich dabei nach den Erfordernissen der anstehenden molekularbiologischen und biochemischen Analysen, da durch den Zellaufschluss nicht nur die morphologische, sondern auch die biochemische Integrität der zellulären Komponenten beschädigt werden kann. Diese Einsicht bestimmt auch die Wahl des Aufschlusspuffers, der die intrazellulären Bestandteile schützen soll vor:

- dem Abbau durch Hydrolasen / Proteasen
- der Aggregation und
- dem Verlust der biologischen Aktivität (Funktion).

5.3.1. Lysozym

Das von Alexander Flemming entdeckte Lysozym spaltet den Polysaccharidanteil der bakteriellen Zellwand. Infolge des hohen osmotischen Druckes platzen die Zellen. Die Lyse von Gram-positiven Zellen wird häufig mit Lysozym durchgeführt, da diese eine sehr dicke Peptidoglykanschicht besitzen. Hier wurde Lysozym zu Aufschluss von Zellen für die Isolation von Nukleinsäuren verwendet, weil dieser enzymatische Aufschluss die Stabilität und Form von DNA und RNA nicht beeinflusst.

5.3.2. Toluol

Eine Kombination aus chemischer und mechanischer Lyse wurde für die Messung der LacZ-Aktivität in dieser Arbeit verwendet. Als organisches Lösungsmittel entwässert Toluol die Zellen sehr schnell. Dabei werden die Lipide in die organische Phase extrahiert und so die Zellwände zerstört. Die Destruktion der Zellwände wurde noch durch ein 2x 20 s dauerndes Vortexen unterstützt.

5.3.3. Ultraschall und French Press

Eine Methode, welche die enzymatische Funktion und molekulare Integrität der meisten Enzyme nicht beeinflussen sollte, ist der Zellaufschluss durch Ultraschall. Hier werden über einen Metallstab Ultraschallwellen im Frequenzbereich von 10-40 kHz in die Suspension geleitet, so verursachte Druckveränderungen lassen die Zellen einfach aufbrechen. Für die durchgeführten proteinchemischen Arbeiten wurden die Zellen in Gelfiltrationspuffer mit dem Proteasehemmer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde 3x 30 s mit 50 W beschallt. Bei der Ultraschallbehandlung entsteht im hohen Maße Wärme, deshalb wurde der Zellaufschluss in einem Eisbad durchgeführt und zwischen jeder Beschallung eine Pause von 30 s eingehalten.

Eine zweite Methode, die zum Aufschluss von Zellextrakten verwendet wurde, war die Nutzung einer French Press (AmlnCo, USA). Mit Lysozym vorbehandelte Zellen wurden unter hohem Druck durch eine sehr enge Öffnung gepresst. Die auftretenden Scherkräfte zerreißen die Zellwände und Zellmembranen.

Ein Nachteil beider Methoden ist, dass DNA durch die Druckschwankungen und auftretenden Scherkräfte fragmentiert wird, weshalb diese Methoden nicht zur Isolation von Nukleinsäuren genutzt werden sollten.

5.4. Isolation von Nukleinsäuren

5.4.1. Präparation von chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis*

Von einer üN-Kultur wurden 1,5 ml durch 5 minütige Sedimentation bei 10000 rpm und 4 °C (Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) geerntet, in 200 µl Puffer 2 resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert (Aufschluss). Dann wurde 400 µl Puffer 4 hinzugegeben und die Suspension 1-2 h auf einem Taumelschüttler bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 600 µl Phenol wurde die Suspension weitere 1-2 h bei RT auf dem Taumelschüttler gemischt und bei 10000 rpm und 4 °C für 5 min (Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) in Phasen getrennt. Die wässrige, DNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 2 Volumina 96%igem eiskaltem Ethanol und vorsichtigem Mischen, wurde die DNA auf Eis gefällt (10 min). Das sichtbare, stecknadelkopfgroße DNA-Pellet wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für 10–20 min getrocknet. Das durchsichtige trockene Pellet wurde in 100 µl ention. H₂O resuspendiert.

Tab. 5.1: Lösungen für die DNA-Isolation

Puffer 2	Menge	Endkonz.	Puffer 4	Menge	Endkonz.
EDTA ^{**} 0,5 M (pH 8)	2,0 ml	100,0 mM	Tris-HCl [*] 1 M (pH8)	0,1 ml	10 mM
Tris-HCl [*] 1 M (pH 8)	1,0 ml	100,0 mM	NaCl [*] 5 M	0,2 ml	100 mM
Lysozym [*]	5,0 mg/ml	0,5%	SDS ^{***} 10%	1,0 ml	1%
ention.H ₂ O	7,0 ml		ention.H ₂ O	8,7 ml	

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Roche, Mannheim) ^{***}(Merck, Darmstadt)

5.4.2. Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mittels der von Birnboim (1979) beschriebenen alkalischen Lyse in abgewandelter Form extrahiert.

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert (10000 rpm, 3 min, 4° C; Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) in 200 µl Lösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 400 µl frisch hergestellte Lösung II (alkalische Lyse) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde klar und viskös. Neutralisiert wurde mit 300 µl 7,5 M NH₄-Acetat (Sigma, Deisenhofen) pH 7,8 durch kurzes Schwenken des Eppendorfgefäßes. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA durch Sedimentation getrennt (15.000 rpm, 4°C, 15 min, Kühlzentrifuge 2K15, Sigma). Der klare Überstand wurde ohne Flocken in ein neues Eppendorfcup überführt und mit 0,6 Volumen Isopropanol für 10 min gefällt. Nach erneuter Sedimentation (10 min, 15.000 rpm, 4°C, Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) wurde der Überstand vollständig entfernt. Das durchsichtige Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in der Vakuumzentrifuge (Speed-Vac CON 1000, LTF Labortechnik) getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pellet in 30 µl Tris/HCl plus 1 µl 1:10 verdünnter RNase (Roche, Mannheim) aufgenommen und nach 30 minütiger Inkubation bei -20°C gelagert.

Tab. 5.2: Lösungen für die Plasmid-Isolation

Lösung I	Endkonz.	Lösung II (alkalische Lyse)	Endkonz.
Glukose*	50,0 mM	NaOH*	0,2 N
Tris/HCl* 1 M (pH 8)	25,0 mM	SDS*** 10%	1,0 %
EDTA** 0,5 M (pH 8)	10,0 mM		
Lysozym*	0,4 %		

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roche, Mannheim) *** (Merck, Darmstadt)

5.4.3. Präparation von Gesamt-RNA mit der "Sauren Phenol"- Methode

Die Zellernte zur Isolierung von RNA wurde auf „Killing“-Eis durchgeführt, um RNA-Abbau vorzubeugen. Dazu wurden 15 ml „Killing“-Puffer in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei – 80 °C eingefroren. Kurz vor der Zellernte wurde das Eis zertrümmert, damit eine möglichst große kühlende Fläche entstand. Vor und nach der Stressinduktion wurden Proben auf „Killing“-Eis geerntet und für 5 min bei 4 °C und 10000 rpm (Rotor SS-34, Sorvall RC-26, Sorvall) sedimentiert. Das Probenvolumen entsprach dabei 15 OD-Einheiten. Die pelletierten Zellen wurden dann in 1 ml „Killing“-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgesetzt und für weitere 3 min

bei 4 °C und 15000 rpm (Rotor 12548, Kühlzentrifuge 2K15, Sigma) sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellpellets bei – 80 °C gelagert.

Tab. 5.3: „Killing“-Puffer

„Killing“-Puffer	Menge	Endkonz.
1M Tris-HCl [*] pH7,5	20,0 ml	20 mM
1M MgCl ₂ [*]	5,0 ml	5 mM
2M NaN ₃ [*]	10,0 ml	20 mM
DEPC-ention H ₂ O	auf 1 l auffüllen	

^{*}(Sigma, Deisenhofen)

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen mit Lysozym behandelt und die entstandenen Protoplasten, die nur noch von der Plasmamembran umhüllt waren, in einer heißen SDS-Lösung lysiert. In der folgenden Phenolbehandlung wurden die Proteine denaturiert. Die Trennung der phenolischen Phase von der wässrigen Phase durch Sedimentation führte auch zu einer Trennung der RNA von Proteinen und DNA. Die RNA ging in die wässrige Phase, während die hochmolekulare DNA von den denaturierten Proteinen an der Phasengrenze gehalten wurde. Einem Abbau der sehr instabilen RNA sollte durch die Arbeit bei sehr niedrigen (Lysozymbehandlung auf Eis) bzw. sehr hohen Temperaturen (Denaturierung der RNasen durch Phenol und Hitze) vorgebeugt werden.

Die tiefgefrorenen Zellpellets wurden in 1 ml Lysislösung I resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (20 mg/ml) 5 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurden neue Reaktionsgefäße mit 270 µl Lysislösung II und 30 µl 10 %iger SDS-Lösung gefüllt und auf 95 °C in einem Thermoblock aufgeheizt.

Die Protoplasten wurden bei 8000 rpm und 4 °C für 5 min sedimentiert, unverzüglich in 300 µl Lysislösung II resuspendiert und für eine 5 minütige Inkubation bei 95 °C mit dem Lysislösung II/SDS-Gemisch vereinigt.

Danach wurde das Gemisch mit 600 µl saurer, Citrat-gepufferter Phenol-Lösung pH= 4,4 (Sigma, Deisenhofen) versetzt und für weitere 5 min in einem Schüttler (Eppendorf, Hamburg) gemischt. Nach 5 min Sedimentation bei RT und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Pico, Heraeus) wurde die phenolische von der wässrigen Phase getrennt. Die RNA-haltige Oberphase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und die Phenolbehandlung wiederholt. Nach der zweiten Phenolbehandlung wurde die Oberphase mit 600 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt und noch mal für 5 min geschüttelt und sedimentiert. Nun wurde der Oberphase ein Volumen Ether zugegeben. Das Gemisch wurde für weitere 5 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend

2 min bei RT und 12000 rpm sedimentiert. Die untere Phase wurde in ein anderes Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 min in einen 65 °C heißen Thermoblock gestellt, damit der restliche Ether verdampfte. Dem Gemisch wurden 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 96% Ethanol zugesetzt, um die RNA zu fällen. Dies erfolgte bei –80 °C für 30 min oder über Nacht. Dann wurde die RNA bei 15000 rpm und 4 °C für 15 min sedimentiert. Nach dem Trocknen des Pellets in der SpeedVac wurde es in 100 µl RNase–freiem Wasser (Ambion, USA) gelöst und die RNA bei –80 °C gelagert.

Tab. 5.4: Lösungen für die RNA-Isolation

Lysislösung I	Endkonz.	Lysislösung II	Endkonz.
Saccharose*	25,0 %	NaCl ** 5M	200 mM
Tris/HCl ** 1M (pH 8)	50,0 mM	EDTA ** 0,5 M (pH 8)	3 mM
EDTA ** 0,5 M (pH 8)	0,25 mM		

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Ambion, USA)

5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen wurde meistens mit spektrometrischen Methoden ermittelt. Das Absorptionsspektrum dieser Makromoleküle wird durch ihre chemische Struktur und das umgebene Lösungsmittel bestimmt. Eine ungefähre Abschätzung der Konzentration von DNA war auch in Agarosegelen mit definierten Markerbanden möglich.

5.5.1. Konzentrationsbestimmung und Qualitätsprüfung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Ein definiertes Volumen der RNA-Lösung wurde mit 1 ml DEPC-ention. H₂O in Quarzküvetten pipettiert, gemischt und gegen einen DEPC-ention. H₂O-Kontrollwert im Photometer (Ultrospec 4000, Amersham Biosciences, Freiburg) bei $\lambda = 260$ nm gemessen, da Nukleinsäuren UV-Licht mit einem Maximum bei 260 nm absorbieren. Die Konzentration der Nukleinsäuren ist zur Absorption proportional, wobei eine A₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml entspricht. Die Konzentration (c) errechnet sich dann wie folgt:

$$c = A_{260} \times 40$$

Der Quotient der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm erlaubt eine Aussage über die Reinheit der RNA und sollte über 1,8 liegen (max. 2,0).

Zusätzlich wurde eine Qualitätsbestimmung mittels der "Lab-on-a-chip"-Technologie (Agilent, USA) durchgeführt. Mit Hilfe eines nukleinsäurebindenden Fluoreszenzfarbstoffs wird hier das Verhältnis der 16S rRNA zur 23S rRNA bestimmt. Die Auftrennung der RNA erfolgt dabei über eine Kapillarelektrophorese.

DEPC-ention H₂O: 1000 ml ention H₂O + 1 ml DEPC (RNase-Inhibitor; Roth, Karlsruhe) über Nacht inkubieren; autoklavieren.

5.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Quantifizierungsmethode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brillantblau von 465 nm auf 595 nm nach Bindung an Proteine. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Pipettierarbeit bei diesem Test ist gering und die Farbreaktion in 2 min abgeschlossen. Allerdings findet die Reaktion in saurem Milieu statt, in dem viele Proteine ausfallen. Außerdem stören Puffer mit Triton-X-100, SDS und Chaps die Reaktion.

Für den Test wurde das Fertigreagenz von Biorad (München) in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Vor der Quantifizierung unbekannter Proben wurde immer eine Eichreihe (1-20 µg/ml) mit BSA als Standardprotein aufgenommen. Anhand dieser Eichreihe war es möglich die Proteinkonzentration in den Zellextrakten zu bestimmen.

5.6. DNA-Klonierung

Alle Schritte einer Klonierungen wurden vor ihrer praktischen Ausführung virtuell mit der Vector NTI -Software (Informax, USA) ausgeführt und überprüft. Mit Hilfe dieses Programms wurden auch alle sequenzspezifischen Primer abgeleitet.

5.6.1. Restriktion von DNA

Für Klonierungen wurden Plasmide mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Reaktionsansätze wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer angesetzt, und bei einer für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Bei einem Doppelverdau wurde der Puffer so gewählt, das beide Enzyme mindestens zu 75% schneiden konnten. Bei nacheinander durchgeführten Verdauen wurde erst das Enzym mit dem niedrigeren Salzgehalt eingesetzt und nach dem Umpuffern des Ansatzes das Enzym mit dem höheren Salzgehalt. Pro µg DNA wurden 2-4 Enzymeinheiten eingesetzt. Die vollständige Restriktion wurde im Agarosegel überprüft.

5.6.2. Ligation von DNA

Bei der Klonierung wurden der linearisierte Vektor und das Insert miteinander ligiert. Die Ligation der geschnittenen Plasmide wurde mit dem Rapid-Ligation-Kit (Roche, Mannheim) in 2 h oder mit T4-Ligase über Nacht bei 16 °C in Ligationspuffer durchgeführt. Zur Erhöhung der Frequenz rekombinanter Plasmide wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt. Für einige Klonierungen wurde der "TA Cloning-Kit" oder Zero Blunt II Cloning Kit (Invitrogen, USA) verwendet.

5.6.3. Transformation von *E. coli*

Bei einer Elektroporation werden die TG2-Zellen kurzzeitig einer hohen elektrischen Spannung ausgesetzt, wobei sich wahrscheinlich Poren in der Zellwand bilden, welche eine erleichterte Aufnahme von DNA erlauben.

Um kompetente Zellen herzustellen, wurden 500 ml Zellen einer exponentiellen Kultur sedimentiert (20 min). Das Pellet wurde zweimal mit 500 ml sterilem Eiswasser gewaschen und in 40 ml 10%igem Glycerin (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgenommen. Nach jedem Schritt wurde jeweils bei 4000 rpm, 4°C, 10 min (GSA-Rotor, Sorvall RC-26, Sorvall) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in identischem Volumen 10%igem Glycerin resuspendiert.

Zur Elektroporation wurden Küvetten (BioRad, München) mit 0,1 cm Elektrodenspalt verwendet. Es wurden 40 µl Zellen und 1 µl Ligationsgemisch in eine eisgekühlte Küvette pipettiert und sofort im Gene-Pulser mit Puls Controller (BioRad, München) bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω elektroporiert. Die Zeitkonstante sollte zwischen 4,0 und 4,5 liegen. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Es wurden 200 µl je LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde Wasser statt des Ligationsgemisch eingesetzt, und als Positivkontrolle diente ein Standardvektor ohne Insert.

Zur Transformation der ultrakompetenten *E. coli*-Zellen XL-10 Gold (Stratagene, USA) wurde das vom Hersteller empfohlene Protokoll benutzt.

5.6.4. Transformation von *B. subtilis*

B. subtilis wurde mit der Zwei-Schritt-Methode (Yasbin, 1973) transformiert. Diese Methode berücksichtigt, dass *B. subtilis* unter Aminosäuremangel eine natürliche Kompetenz ausbildet. Bei den Experimenten wurde die Tryptophanauxotrophie der verwendeten Stämme ausgenutzt.

Das definierte Minimalmedium GM1 von Bott und Wilson wurde mit Zellen einer Übernachtskultur auf eine $OD_{540} = 0,1$ angeimpft. Die Zellen wurden in diesem Medium

bis 90 min nach dem Übergang in die Stationäre Phase bei 37 °C und 100 rpm in einem Schüttelwasserbad (GFL1086, SS40-D, OLS200, GFL Grant) inkubiert. Dann wurde 1 ml dieser Kultur in 9 ml vorgewärmtes Medium GM 2 umgesetzt. Nach weiteren 2 h bei 37 °C und 100 rpm, wurden 0,5 ml dieser Bakteriensuspension mit 3-4 µl Plasmid-DNA oder 1-2 µl chromosomaler DNA in einem sterilen Gefäß gemischt. Dieses Transformationsgemisch wurde für 1 h bei 37 °C langsam (50 rpm) (Schüttelwasserbäder GFL1086, SS40-D, OLS200, GFL Grant) geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf Selektivplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Tab. 5.5: Lösungen für die Transformation von *Bacillus subtilis*

B&W salts	Menge	Endkonz.	B&W Aminosäuren		
NH ₄ (SO ₄) ₂ *	6,0 g	45,0 mM	Tryptophan*	Methionin*	Asparagin*
KH ₂ PO ₄ *	7,6 g	56,0 mM	Arginin*	Histidin*	Glyzin*
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O*	16,2 g	93,0 mM	Lysin*	Valin*	Threonin*
Na ₃ -Citrat**	1,0 g	3,4 mM			
ention. H ₂ O	1,0 l	pH auf 6,7 einstellen	von jeder Aminosäure 2,5 mg / ml		

*(Sigma, Deisenhofen) **(Merck, Darmstadt)

Tab. 5.6: Medien für die Transformation von *Bacillus subtilis*

GM1	Menge	Endkonz.	GM2	Menge	Endkonz.
B&W salts	96,0 ml		GM1	9,65 ml	
Glukose* 50% (w/v)	1,0 ml	5,0%	CaCl ₂ * 50 mM	0,05 ml	250,0 µM
MgSO ₄ * 100 mM	1,0 ml	1,0 mM	MgCl ₂ * 100 mM	0,25 ml	2,5 mM
Hefeextrakt* 10%	1,0 ml	0,1 %			
B&W Aminosäuren	1,0 ml	0,25 mg/ml			

*(Sigma, Deisenhofen) **(Merck, Darmstadt)

5.6.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine "*in vitro*"- Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Reaktionsprinzip der Replikation beruht. Die heute vielfach eingesetzte und automatisierte PCR-Technologie wurde 1984 von K. B. Mullis entdeckt (Saiki, 1985). Die Methode setzt sich aus drei Teilschritten zusammen:

1. Denaturierung: Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge (94 °C)
2. Annealing: Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die Matrizen-DNA (~50 °C)
3. Polymerisation: Kopie und Vervielfältigung der Matrize (72 °C)

Entscheidend für die Effizienz einer PCR sind die Enzymkonzentration, die Konzentration an Desoxynukleotiden und die Ionenkonzentration. Die Optimierung der Amplifikation einer spezifischen Sequenz ist zudem abhängig von der Beschaffenheit der DNA-Matrize, der Temperatur und Zeit in den einzelnen Teilschritten, der Primerkonzentration, dem pH-Wert und der Zyklenzahl.

Diese Methode wurde hier zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten aus *Bacillus subtilis* 168 oder PY22 eingesetzt, welche zur Konstruktion von Deletionsmutanten in diesem Organismus verwendet wurden. Die PCR wurde im Thermocycler (T-Gradient, Biometra) mit Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) nach einem angepassten PCR-Standardprotokoll von White (1993) durchgeführt. Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen über 2500 nt wurde der Expand High Fidelity PCR-Kit (Roche, Mannheim) mit einem Taq/Pfu-Polymerasemix verwendet. Für Sequenzreaktionen wurde die PCR mit der „proofreading“-Polymerase "ProofStart" (Qiagen, Freiburg) durchgeführt. Die sequenzspezifischen Primer wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI 5.0-8.0 (Informax, USA) abgeleitet und bei den Firmen MWG (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) bestellt. Die Hybridisierungstemperatur wurde nach folgender Formel errechnet und in einer Gradienten-PCR optimiert.

$$4 \times \text{Anzahl (G/C)} + 2 \times \text{Anzahl (A/T)} = \text{Hybridisierungstemp. eines Primers}$$

Tab. 5.7: Standardbedingungen der PCR

Parameter der PCR		Standardprotokoll	
Enzymkonzentration	1 - 2,5 Units	1. Denaturierung	94 °C 3 min
Desoxynukleotide	20 - 200 µM	2. Denaturierung	94 °C 1 min
Magnesiumkonzentration	1,2 - 2,5 mM	3. Annealing	50 – 60 °C 1 min
Ionenkonzentration	40 mM NaCl	4. Extension	72 °C 1000 bp / min
	50 mM KCl	5. 30x Schritt 2 - 4 wiederholen	
pH-Wert	8,8	6. Extension	72 °C 1000 bp / min
DNA-Konformation	lineare, kleine	7. Konservierung	4 °C ∞
Denaturierung	30 - 60 s bei 90 – 94 °C		
Primer-Konzentration	0,025 - 0,2 µM		
Annealing-Temperatur	5 °C unter dem Schmelzpunkt des Primers		1min
Polymerisation	1 min bei 72 °C		
Zyklenzahl	25 - 30		

5.7. Separation von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Auftrennung der molekularbiologisch interessanten Moleküle erfolgte hauptsächlich durch Gelelektrophorese. Da Proteine und Nukleinsäuren geladene oder ionisierbare Gruppen enthalten können sie gut durch ein elektrisches Feld dirigiert werden. Als Trägermatrix dienen dabei gelbildende Substanzen, wie Agarose, Polyacrylamid oder Stärke. Durch die Wahl des Trägermaterials, der Porengröße und des Vernetzungsgrades bewegen sich Moleküle unterschiedlicher Größe bei gleicher Ladung unterschiedlich schnell im Gel (Molekularsiebeffekt).

5.7.1. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein lineares Polysaccharid, welches aus Seetang extrahiert wird. Die durch Aufkochen geschmolzene Agarose bildet während des Erstarrens eine homogene Gelmatrix aus. DNA wurde zur Kontrolle und Größenbestimmung in 0,7%igen, ethidiumbromidhaltigen TBE-Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 2001) aufgetrennt (Elektrophoresekammern für DNA-Separationen, Biorad). Die Proben wurden mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt, der Ficoll 400 zum Beschweren der Probe enthielt. Außerdem waren Farbstoffe enthalten, um den Elektrophoreselauf zu verfolgen.

Als Größenmarker wurde eine 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Karlsruhe oder MBI Fermentas, St.Leon-Rot) genutzt. Für die Größenabschätzung nativer Plasmide dienten Plasmide bekannter Größe. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Biotec-Fischer) unter UV- Licht bei 302 nm.

Tab. 5.8: DNA-Elektrophoresepuffer

10-fach TBE-Puffer	Menge	Endkonz.	6-fach Ladepuffer	Endkonz.
Tris/HCl*	108 g/l	900 mM	Bromphenolblau*	0,25 %
Borsäure*	55 g/l	900 mM	Xylen-Cyanol FF*	0,25 %
EDTA* 0,5 M (pH 8)	40 ml	10 mM	Ficoll 400*	15,0 %
Ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen			

* (Sigma, Deisenhofen)

Die Auftrennung von RNA für Northernblotanalysen erfolgte in denaturierenden Agarosegelen, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Aggregaten zu verhindern. Für das denaturierende Gel wurden 6 g Agarose mit 292 ml sterilem, DEPC-behandeltem, entionisiertem Wasser und 40 ml 10x MOPS-Puffer aufgekocht und anschließend auf 60 °C heruntergekühlt. Erst jetzt wurden 68 ml 35%iges Formaldehyd untergemischt und das Gel in einem Gelschlitten gegossen. Die Agarose war nach ca. 1 h ausgehärtet, so dass die Kämme entfernt werden konnten. Das Gel wurde nun in einer Gelkammer mit Laufpuffer (1x MOPS) überschichtet. In der Zwischenzeit wurden 7,5 µg RNA/10 µl mit dem gleichen Volumen RNA-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben kurz bei 4 °C sedimentiert und auf Eis gestellt. Zur Größenbestimmung nach der Detektion lief ein DIG-markierter RNA-Marker (Merck, Darmstadt) mit. Die Auftrennung erfolgte für 2-3 h bei 120-140 V und 400 mA.

Tab. 5.9: RNA-Elektrophoresepuffer

MOPS 10x	Menge	Endkonz.	RNA - Probenpuffer	Menge	Endkonz.
MOPS**	41,8 g	200 mM	MOPS 10x	2,0 ml	2,0%
Na-Acetat*	4,1 g	50 mM	Formamid*	6,5 ml	650,0 mM
EDTA**	3,72 g	10 mM	Formaldehyd* 37%	1,2 ml	4,5%
ention. H ₂ O	1,0 l		Saccharose* 50%	0,4 ml	2,0%
			Bis-Phenolblau*	20,0 mg	
			Xylen-Cyanol FF*	20,0 mg	
			ention. H ₂ O	auf 10 ml auffüllen	

*(Sigma, Deisenhofen) ** (Roche, Mannheim)

5.7.2. "SDS-PAGE" - SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Das Monomer Acrylamid bildet in einer Kettenreaktion Polymere aus, die mit bifunktionellem N,N'-Methylen-bisacrylamid zu einer Gelmatrix quervernetzt werden, dem Polyacrylamid. Die Kettenreaktion wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Zweikomponenten-Redoxsystem) gestartet. Die denaturierende Gelelektrophorese wird hier zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer apparenten Molekülmasse verwendet. Die Proteine wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x Probenpuffer gemischt und für 5-15 min bei 90 °C denaturiert. Auf die mittelgroßen Gele (14 x 10 cm) wurden 50 µg Protein/Tasche und auf die kleinen Gele (7 x 5 cm) 30 µg Protein/Tasche aufgetragen. Die mittelgroßen Gele wurden einem Strom von 20-25 mA und die kleinen einem von 10-15 mA ausgesetzt.

Tab. 5.10: Proteinelektrophoresepuffer

Trenngelpuffer 4x	Menge	Endkonz.	Sammelpuffer 4x	Menge	Endkonz.
Tris/HCl*	182,0 g	1,5 M	Tris/HCl*	60,0 g	0,5 M
SDS** 20%	40,0 ml	0,4 %	SDS** 20%	40,0 ml	0,4 %
ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen		ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen	
pH 8,8 einstellen			pH 6,8 einstellen		

*(Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe,)

Tab. 5.11: Zusammensetzung der Acrylamidgele

Trenngel 12,5%	Menge	Sammelgel 5%	Menge
Acrylamidmix* 37,5 : 1	8,5 ml	Acrylamidmix* 37,5 : 1	0,9 ml
Trenngelpuffer* 4x	7,0 ml	Sammelpuffer* 4x	2,5 ml
entionisiertes H ₂ O	12,5 ml	entionisiertes H ₂ O	6,6 ml
Ammoniumperoxodisulfat** 20%	50,0 µl	Ammoniumperoxodisulfat** 20%	20,0 µl
TEMED**	25,0 µl	TEMED**	10,0 µl

*(Appllichem, Darmstadt)

**(Merck, Darmstadt)

Tab. 5.12: 2x Proteinprobenpuffer

Substanzen	Menge	Endkonz.
Glyzerin ^{**} 87%	20,0 ml	17,4%
β - Mercaptoethanol [*] 98%	5,0 ml	5,0%
Bromphenolblau [*]	Spatelspitze	
Sammelgelpuffer 4x	25,0 ml	1x
Ention. H ₂ O	auf 100 ml auffüllen	

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Amersham Biosciences, Freiburg)

Tab. 5.13: 1x Laufpuffer für „SDS-PAGE“

Substanzen	Menge	Endkonz.
Glyzin [*]	14,4 g	25,0 mM
Tris / HCl [*]	3,0 g	190,0 mM
SDS 10% ^{**}	10,0 ml	0,1%
Ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen	

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Roth, Karlsruhe,)

5.7.3. Zweidimensionale Trennung von Proteinen

Diese Technik zur Analyse komplexer Proteinextrakte wurde 1975 von O'Farrell und Klose zeitgleich entwickelt. Die Kombination zweier unterschiedlicher Trennprinzipien ermöglicht die Auflösung von mehr als 1000 Proteinen auf einer Fläche von ca. 13 x 14 cm². In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, erfolgt die Trennung der Proteine in einem pH-Gradienten nach dem isoelektrischen Punkt, während in der zweiten Dimension, der „SDS-PAGE“, die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden.

Bevor die erste Dimension durchgeführt werden kann, muss das Protein in die Gelmatrix der immobilisierten pH-Gradientenstreifen (IPG-Streifen, 7 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) einhydratisieren. Für die hier verwendeten Minigele (7 cm x 5 cm) wurden 20 μ g Gesamtprotein in 105 μ l Rehydratisierungslösung aufgenommen. Für die Rehydratisierung wurden insgesamt 135 μ l in die Vertiefungen eines Acrylglasbrettchens pipettiert. Die Streifen mit einem pH-Gradienten von 4-7 wurden mit der Gelseite nach unten in die Lösung gelegt. Die Streifen wurden dann vollständig mit Mineralöl überzogen und mit einer Glasplatte abgedeckt, um eine Verdunstung der Rehydratisierungslösung und ein Auskristallisieren des Harnstoffs zu verhindern. Die Rehydratisierung wurde bei RT ausgeführt, bis die komplette Lösung in die Streifen diffundiert war, um sicher zu gehen, dass auch große Proteine komplett aufgenommen wurden (ca.18 h). Mit entionisiertem Wasser wurde der restliche Harnstoff von den Streifen entfernt, die dann zum Abtropfen kurz auf ein feuchtes Filterpapier gelegt wurden. Jetzt konnten die Streifen mit der sauren Seite zum Pluspol in die Multiphor II-

Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt werden. Auf die Streifenenden wurden mit entionisiertem Wasser befeuchtete Filterpapierstreifen gelegt, um eventuell vorhandene Salze aufzunehmen. Zusätzlich wurde auf die basische Seite ein weiterer Filterpapierstreifen gelegt, der mit 500 μ l 15 mM DTT getränkt war. Nun wurden die Elektroden auf den Wasser getränkten Filterpapierstreifen befestigt und Mineralöl über die Streifen gegossen. Das Spannungsgerät EPL-35S00-XL (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde auf das in Tab. 5.14 stehende Programm eingestellt und der Lauf bei konstanten 20 °C ausgeführt. Nach der isoelektrischen Fokussierung konnten die Streifen bei -20 °C zur Lagerung eingefroren.

Die fokussierten IPG-Streifen mussten vor dem Einsatz in der zweiten Dimension äquilibriert werden, damit die Proteine möglichst vollständig in das SDS-Gel einlaufen. Deshalb sollten die Streifen nur für 15 min in Lösung A und dann in Lösung B bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (GFL, Grant) inkubiert werden.

Für die Auftrennung nach der Molekülmasse wurden die Streifen mit den fokussierten Proteinen auf zuvor gegossene 12,5%ige SDS-Gele gelegt. Die Trennung wurde horizontal in der Protean 3 Cell (Biorad, München) mit 50 mA pro Gel bei konstanten 10 °C durchgeführt. Der Lauf dauerte ungefähr 1 h und wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Tab. 5.14: Rehydratisierungslösung für 2D-Gele

Substanzen	Menge	Endkonz.
Harnstoff ^{**}	1,92 g	6,1 M
Thioharnstoff [*]	0,61 g	1,5 M
Chaps [*]	0,081 g	25,0 mM
Pharmalyte 3-10 ^{***}	52,5 μ l	1,33%
DTT ^{***}	17,5 mg	30 mM
Bromphenolblau [*]	Spatelspitze	
Ention. H ₂ O	auf 3 ml auffüllen	

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Merck, Darmstadt) ^{***}(Amersham Biosciences, Freiburg)

Tab. 5.15: Programm zur isoelektrischen Fokussierung von 7,5 cm IPG – Streifen

Stufe	V	mA	W	Vh
1. Gradient	500	2	5	500
2.	500	2	5	500
3. Gradient	3500	2	5	5000
4.	3500	2	5	8000

Tab. 5.16: Äquilibrierungslösung für 2D-Gele

Substanzen	Lösung A	Endkonz.	Lösung B	Endkonz.
Tris/HCl* 0,5 M (pH 6,8)	2,5 ml	50 mM	2,5 ml	50 mM
Harnstoff	9,0 g	6 M	9,0 g	6 M
Glyzerin****	8,6 ml	30%	8,6 ml	30%
SDS***** 10%	10,0 ml	4%	10,0 ml	4%
DTT	87,5 mg	23 mM		
Jodacetamid*			1,125 g	210 mM
Bromphenolblau			Spatelspitze	
Ention. H ₂ O	auf 25,0 ml auffüllen		auf 25,0 ml auffüllen	

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roche, Mannheim) *** (Merck, Darmstadt) **** (Amersham Biosciences, Freiburg) ***** (Roth, Karlsruhe)

5.7.4. Fraktionierung von Gesamtzellextrakten durch Gelchromatographie

Mit Hilfe dieser Methode können Moleküle aufgrund ihrer verschiedenen Größe voneinander separiert werden. Als Trägermaterialien werden kleine, poröse Perlen eingesetzt, die hauptsächlich aus natürlichen Polysacchariden, wie Dextran oder Agarose, teilweise aber auch aus Polyacrylamiden hergestellt sind. Durch eine gezielte Quervernetzung werden Perlennetze mit definierten Porengrößen erhalten. Aufgrund des hohen Hydroxylgruppenanteils in den Polysaccharidketten ist das Polymer stark hydrophil und quillt in wässriger Lösung zu einer gelartigen Masse auf. Moleküle die größer als die größten Poren dieser Gelmatrix sind, gelangen nicht in das Gellinnere, während kleinere Moleküle ihrer Größe entsprechend einen mehr oder weniger großen Teil des Gels durchqueren. Passiert ein Gemisch unterschiedlich großer Substanzen eine solche Gelsäule, eluieren erst die großen Moleküle aus der Säule und zum Schluss die kleinsten. Das hier zur Geltung kommende Größenausschlussverfahren wurde in dieser Arbeit zur Analyse von "*in vivo*" gebildeten Proteinkomplexen angewandt. Dabei war es entscheidend, dass die Zellextrakte nach dem Aufschluss der Zellen bis zum Auftragen auf die Säule nicht wieder eingefroren wurden, um eine Zerstörung der vorhandenen Komplexe zu vermeiden.

Zur Fraktionierung von Gesamtzellextrakten von *Bacillus subtilis* wurde die Gelfiltrationssäule HiLoad 16/60 Sephadex 200 prepgrade (Amersham Biosciences, Freiburg) mit einem Fraktionierungsbereich von 10 - 600 kDa verwendet. Diese Säule wurde an ein Äkta "Purifer"-System (Amersham Biosciences, Freiburg), welches über die Steuerungssoftware Unicon 4.0 kontrolliert wurde, angeschlossen. Nach der Äquilibrierung mit mehreren Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer, wurde die Säule mit fünf unterschiedlichen Standardproteinen geeicht, um ein Elutionsprofil der Säule zu erstellen.

Die bei -20 °C eingelagerten Zellpellets von 1,5 l Kulturvolumen wurden in 4 ml GF-Puffer vollständig resuspendiert und wie unter 5.3.3 beschrieben behandelt. Die Zelltrümmer wurden in zwei Sedimentationsschritten vom Extrakt getrennt. Zuerst wurde die Suspension in einer Kühlzentrifuge für 15 min bei 8000 rpm und 4 °C sedimentiert. Die restlichen Zellwand- und Membranfragmente trennte die Ultrazentrifuge bei 10000 g innerhalb 1 h bei 4 °C von der zytosolischen Suspension. Der zytosolischen Suspension wurden 750 µl entnommen, um auf jeden Westernblot eine Spur mit dem zytosolischen Zellextrakt als Marker für die Proteine RsbV, RsbW und SigB aufzutragen.

Zur chromatographischen Trennung wurden 2,2 ml des Zellextraktes auf die Säule gebracht. Die Elution erfolgte bei einer kontinuierlichen Flussrate von 0,5 ml/min und einem Druck von ca. 0,45 MPa. Ein komplettes Säulenvolumen wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt. Für die Komplexanalyse wurden die Fraktionen 40-106 auf Westernblots untersucht. Dafür mussten von jeder Fraktion 200 µl mit 400 µl abs. Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt werden. Auf eine halbstündige Sedimentation bei 15000 rpm und 4 °C folgte eine Inkubation von 20 min in einer SpeedVac, um das restliche Ethanol zu entfernen. Das Proteinpellet wurde in 80 µl entionisiertes H₂O und 80 µl 2x SDS - Probenpuffer aufgenommen und bis zur „SDS-PAGE“ bei -20 °C gelagert.

Tab. 5.17: Puffer für die Gelfiltration

Substanzen	Menge	Endkonz.
Tris/HCl* 1 M (pH 8)	20,0 ml	10,0 mM
EDTA* 0,5 M (pH 8)	4,0 ml	1,0 mM
MgCl ₂ *	4,0 g	10,0 mM
DTT**	0,924 g	3,0 mM
NaCl***	5,84 g	50,0 mM
PMSF in abs. Ethanol	100,0 ml	0,3 mg/ml
Ention. H ₂ O	1875,0 ml	0,3 mg/ml

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Amersham Biosciences, Freiburg) *** (Roth, Karlsruhe)

5.8. Färbetechniken

5.8.1. DNA-Färbung mit Ethidiumbromid

Die gängigste Methode um Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, ist eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Es interkaliert zwischen den Basen von einzel- und doppelsträngigen Nukleinsäuren, wo es fixiert wird und seine Fluoreszenz gegenüber dem freien Ethidiumbromid erhöht. Dabei wird UV-Licht (254 - 366 nm) von dem Nukleinsäure-Ethidiumkomplex absorbiert, und Energie im Bereich

von 590 nm (orange-rot) emittiert. Die untere Nachweisgrenze für ethidiumgefärbte DNA in Agarosegelen liegt bei 10 ng. Für die hier verwendeten Agarosegele wurde die Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) im Verhältnis 1:18000 eingesetzt.

5.8.2. DNA-Färbung mit SybrGold

Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist zehnmals sensitiver als Ethidiumbromid und wird ebenfalls zur Anfärbung von einzel- und doppelsträngigen Nukleinsäuren verwendet. SybrGold bindet an das Phosphatrückgrat von DNA und RNA und zeigt eine über 1000-fache Steigerung der Fluoreszenz im Komplex mit Nukleinsäuren. In dieser Arbeit wurde SybrGold verwendet um DNA aus Agarosegelen auszuschneiden. Im Vergleich zu Ethidiumbromid absorbiert SybrGold nicht nur im UV Bereich (~ 300 nm), sondern auch Blaulicht (~ 495 nm) und emittiert Energie bei 537 nm. Somit konnten die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert werden, ohne der schädlichen UV-Strahlung ausgesetzt zu werden. Als Blaulichtquelle diente der "Flu-o blue"-Schirm von Biorad (München). Die Färbung wurde hier immer nach dem Gellauf mit einer Färbelösung aus 20 ml 1 x TAE mit 2 µl SybrGold für 100 ml Gele durchgeführt.

Tab. 5.18: 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Substanzen	Menge	Endkonz.
Tris*	242,0 g	2,0 M
Eisessig**	57,1 ml	1,0 M
EDTA* 0,5 M (pH 8)	100,0 ml	0,05 M
Ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen	

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe)

5.8.3. Proteinnachweis durch Coomassieblau

Coomassie ist ein Triphenylmethan und färbt unspezifisch fast alle Proteine. Dieser Farbstoff wird auch beim Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung verwendet. Der Detektionsbereich dieser Färbung liegt bei 100 ng - 1 µg. Damit ist die Coomassiefärbung schwächer als die Silberfärbung. Der Vorteil dieser Färbung ist, dass sie reversibel ist.

In dieser Arbeit wurde der Farbstoff PhastGel-Blue R350 eingesetzt, um Proteine in der „SDS-PAGE“ sichtbar zu machen. Die Gele wurden über Nacht in einer Glasschale mit Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Der Anteil an R350 betrug in dieser Lösung 0,02%, von der so viel eingesetzt wurde, dass die Gele gut mit Flüssigkeit bedeckt waren. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung gegen eine Entfärbelösung ausgetauscht und wieder solange auf einem Schüttler inkubiert, bis der Hintergrund des Gels farblos war.

Tab. 5.19: 10x Coomassie-Stammlösung

Substanzen	Menge	
PhastGel-Blue R350*	1 Tablette	
Ention. H ₂ O	80 ml	10 min rühren bis die Tablette aufgelöst ist
Methanol**	120 ml	weitere 15 min rühren

* (Amersham Biosciences, Freiburg) ** (Roth, Karlsruhe)

Lösung durch einen Faltenfilter filtrieren und bei 4 °C aufbewahren (1 Monat haltbar)

Tab. 5.20: Coomassie-Färbelösung für Proteine

Substanzen	Menge	Endkonz.
Coomassie-Stammlsg. 10x	100ml	1x
Methanol**	270 ml	27%
Eisessig*	90 ml	9%
Ention. H ₂ O	540 ml	

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.21: Entfärbelösung für die Coomassie-Färbung

Substanzen	Menge	Endkonz.
Methanol**	270 ml	27%
Eisessig*	90 ml	9%
Ention. H ₂ O	640 ml	

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe)

5.8.4. Proteinnachweis durch Tinte

Die Färbung mit Tinte ist eine Methode zur unspezifischen Schnelldetektion von auf PMSF-Membranen oder Nitrozellulosemembranen geblotteten Proteinen. Die Filter werden 15 min bei RT in einer Färbelösung geschwenkt. Die Tinte haftet an den Proteinen und markiert die Lage der Proteine blau auf der Membran.

Ein weiterer Vorteil ist die Reversibilität der Färbung. Die Filter können nach Schwenken in Entfärber komplett entfärbt werden, so dass die Proteine für weitere Applikationen wie Immundetektionen wieder zugänglich sind. In dieser Arbeit wurde die Qualität der geblotteten 2D-Gele mit Hilfe dieser Färbung überprüft.

Tab. 5.22: PBS-Puffer für die Tintenfärbung

Substanzen	Menge	Endkonz.
NaCl**	8,0 g	137,0 mM
KCl*	0,2 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ *	1,44 g	10,0 mM
NaH ₂ PO ₄ *	0,24 g	2,9 mM
Ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen; pH 7,4 einstellen	

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.23: Tintenfärbelösung für Proteine

Substanzen	Menge	Endkonz.
PBS	250,0 ml	
Tween 20**	125,0 µl	0,05%
Eisessig*	2,5 ml	10,0%
Pelikan Tinte Nr. 4001	250,0µl	0,1%

*(Sigma, Deisenhofen) **(Amersham Biosciences, Freiburg)

Der Entfärber besteht aus der Färbelösung ohne Eisessig und Tinte.

5.8.5. Proteinnachweis durch Silber

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Durch alkalisches Formaldehyd wird das komplexierte Ag^+ zu Ag reduziert. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 50-100 pg Protein pro Bande. Das Problem bei der Silberfärbung ist, dass sie nicht quantitativ ist und Proteine nicht spezifisch anfärbt, sondern auch Nukleinsäuren, Lipide, Liposaccharide und Glykolipide. Außerdem sind silbergefärbte Proteine kaum weiteren Analysen zugänglich. Trotzdem wird diese Färbung wegen der hohen Sensitivität sehr häufig für qualitative Analysen verwendet.

Die Färbeprozedur dauerte ungefähr 3-4 h. Zuerst wurden die Gele für 1 h mit einer Fixierungslösung behandelt und dann 2x 20 min mit 50% Ethanol gewaschen. Als nächstes folgte die 1 minütige Sensitivierung mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Der Sensitivierer wurde in drei kurzen Wäschen mit entionisiertem Wasser wieder entfernt und die Gele für 20 min in der Silberfärbelösung inkubiert. Das überschüssige Silber wurde dann wieder in drei kurzen Wäschen mit entionisiertem Wasser entfernt. Nun wurden die Gele mit einer K_2CO_3 -Lösung entwickelt. Diese Reaktion wurde mit 1% Glyzin kurz abgestoppt und der restliche Entwickler durch kurzes Waschen mit entionisiertem Wasser entfernt. In einem zweiten Abstoppschritt wurden die Gele für 10-30 min in 1% Glyzin gegeben und zum Schluss ebenfalls für 30 min in entionisiertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Gele wurden in Plastikfolie eingeschweißt, gescannt und bei 4 °C gelagert.

Sensitivierungslösung: 0.02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}^*$ (0,2 g/l)

Waschlösung: 50 % vergällter Ethanol**

Stopplösung: 1% Glyzin***

*(Sigma, Deisenhofen) **(Merck, Darmstadt) *** (Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.24 : Fixierlösung für die Silberfärbung

Substanzen	Menge	Endkonz.
verg. EtOH ^{**}	500,0 ml	50,0%
Eisessig ^{***}	120,0 ml	12,0%
Formaldehyd [*] 37%	0,5 ml	0,05 %
Ention. H ₂ O	380,0 ml	Lösung frisch ansetzen

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Merck, Darmstadt) ^{***}(Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.25: Silberfärbelösung für die Silberfärbung

Substanzen	Menge	Endkonz.
Silbernitrat ^{**}	2,0 g	0,2 % (w/v)
Formaldehyd [*] 37%	0,75 ml	0,075 %
Ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen	Lösung frisch ansetzen

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Appllichem, Darmstadt)

Tab. 5.26: Entwicklungslösung für die Silberfärbung

Substanzen	Menge	Endkonz.
Na ₂ CO ₃ ^{**}	60,0 g	
Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O ^{**}	4,0 mg	
Formaldehyd [*] 37%	0,5 ml	0,05 %
Ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen	Lösung frisch ansetzen

^{*}(Sigma, Deisenhofen) ^{**}(Merck, Darmstadt)

5.9. Blottingmethoden für Nukleinsäuren und Proteine

5.9.1. Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durch „*in vitro*“- Transkription mit T7-Polymerase

Markierte RNA-Proben wurden durch „*in vitro*“-Transkription von DNA hergestellt. Die T7- RNA-Polymerase synthetisierte die Sonde unter Verwendung von Digoxigenin-UTP als Substrat. Dabei wurden ca. 1 µg „template“-DNA in die Reaktion eingesetzt, was zu einer Ausbeute von ungefähr 10 µg Dig-markierter RNA führte. Die eingesetzte DNA wurde vorher über die hier vorgestellte DNA-Isolationsmethode (5.4.1) gereinigt. Zur Herstellung der Sonden wurde der DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) verwendet.

Für die Markierungsreaktion einer „antisense“ RNA-Sonde wurden entweder linearisierte Plasmide, oder PCR-Fragmente eingesetzt. In beiden Varianten musste sich am 3`Ende der zu markierenden DNA-Fragmente ein in Richtung der Fragmente zeigender Promotor für die T7-Polymerase befinden.

Tab. 5.27 Antisense-RNA-Sonden

Sonde	Primer / Plasmid	Größe	RNA-Polymerase
<i>gsiB</i> -Sonde	UV 140 / <i>gsiB</i> -T ₇ -primer	469 bp	T ₇
<i>opuAA</i> -Sonde	<i>opuAA</i> for195 / <i>opuAA</i> rev696 T ₇	501 bp	T ₇
<i>sigB</i> -Sonde	<i>sigBmal</i> / <i>sigB</i> -T ₇ -primer	808 bp	T ₇
<i>sigW</i> -Sonde	<i>sigW</i> -sense / <i>sigW</i> -T ₇	505 bp	T ₇
<i>spoVG</i> -Sonde	<i>spoVG</i> -fwd2 / <i>spoVG</i> -T ₇ -rev2	368 bp	T ₇
<i>tufA</i> -Sonde	pKSP- <i>tufA</i>	921 bp	T ₇
<i>yceC</i> -Sonde	<i>yceC</i> -for / <i>yceC</i> -T ₇ -rev	591 bp	T ₇
<i>yfhLM</i> -Sonde	<i>yfhLM</i> -for / <i>yfhLM</i> -T ₇ -rev	473 bp	T ₇
<i>yoxA</i> -Sonde	<i>yoxA</i> -T ₇ -fwd / <i>yoxA</i> -rev	515 bp	T ₇
<i>yuaG</i> -Sonde	<i>yuaG</i> -northern-fwd / <i>yuaG</i> -northern-rev-T ₇	823 bp	T ₇
<i>ytxG</i> -Sonde	<i>ytxG</i> -T ₇ -fwd / <i>ytxG</i> -rev	466 bp	T ₇
<i>yvyD</i> -Sonde	<i>yvyD</i> -T ₇ -fwd / <i>yvyD</i> -rev	587 bp	T ₇

Zu 1 µg DNA wurden auf Eis 2 µl NTP-Markierungsgemisch, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 18 µl steriles, ention. H₂O, 2 µl T₇-Polymerase und 2 µl RNase-Inhibitor pipettiert.

Dieser Reaktionsansatz wurde nach 2 s langer Sedimentation (Biofuge pico, Heraeus) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrizen-DNA durch Zugabe von 2 µl DNase I (RNase-frei), während einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C entfernt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung (0,2 M pH 8,0) gestoppt. Die markierte RNA wurde danach mit Hilfe von 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl Ethanol bei -80 °C für mindestens 30 min gefällt und anschließend bei 15300 rpm, 15 min und 4 °C sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 50 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und kurz im Vakuum getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl DEPC-ention. H₂O und 1 µl RNase-Inhibitor löste sich das RNA-Pellet während einer Inkubation von 30 min bei 37 °C.

Teilmengen (ca. 30 µl) der erhaltenen 100 µl Sonden-Lösung wurden zu 5 ml Hybridisierungslösung pipettiert, vermischt und bei -20 °C aufbewahrt. Das zu verwendende Volumen kann durch Testen der Sonde, d.h. Bestimmung der Effektivität der Digoxigenin-Markierung, bestimmt werden.

5.9.2. Bindung der RNA an neutrale Nylon-Membranen durch „dot blotting“

Für die Filterbindung wurden von jeder Probe zwei Parallelen mit 0,5 µg RNA in 100 µl 10x SSC mittels „dot blot“-Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine Nylonmembran (Biodyne Plus, Pall) aufgetragen. Die ermittelten Konzentrationen der Extrakte zugrunde legend, können für alle Proben die Volumina errechnet werden, die gleiche Mengen RNA enthalten.

Nach kurzem Trocknen an der Luft erfolgte ein UV-Licht-vermitteltes „crosslinking“ (120 mJ) der RNA an die Membran (UV Stratalinker 2400, Stratagene). Bis zur Hybridisierung können die Membranen zwischen Filterpapier in Plastikbeuteln aufbewahrt werden.

5.9.3. “Northern blotting“

Hierbei wird die RNA der Größe nach auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt und dann auf eine Nylonmembran transferiert. Der Gellauf wurde beendet, nachdem der erste Farbmaler des Probenpuffers ca. $\frac{2}{3}$ des Gels zurückgelegt hatte. Das Gel wurde entnommen und luftblasenfrei auf eine Nylonmembran (Biodyne Plus, Pall) in der Vakuumblotapparatur (Vacuumblotting System VacuGen XL) gelegt. Das Vakuum wurde angelegt und 50 mM NaOH, 10 mM NaCl auf das Gel geschüttet, um die RNA teilweise zu hydrolysieren und den Transfer großer RNA-Moleküle auf die Membran zu verbessern. Nach 5 min wurde die Hydrolyselösung gegen 100 mM Tris/HCl (pH 7,4) ausgetauscht. Wiederum 5 min später wurde diese Neutralisierungslösung gegen 20x SSC ausgewechselt, mit der die RNA über einen Zeitraum von 2-3 h auf die Membran geblottet wurde. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch UV-Licht (120 mJ) in einen UV - Linker (Stratagene, USA)

Die so durch Blotting an die Membran gebundene Gesamt-mRNA wurde nun mit Digoxygenin-markierten Antisense-RNA-Sonden hybridisiert. Dazu wurden die Filter zunächst in mit DEPC-ention. H₂O behandelten Hybridisierungsflaschen (Biometra, Göttingen) für 1 h bei 68 °C im Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen) mit Hybridisierungslösung vorinkubiert. Anschließend wurde diese Lösung durch die zuvor 10 min bei 95 °C denaturierte Sondenlösung ausgetauscht, so dass die Sonden bei 68 °C über Nacht mit den Proben hybridisieren konnten (mind. 12 h). Danach wurden die Sonden zurück in die entsprechenden Röhrchen gegossen und bis zur nächsten Anwendung bei -20 °C gelagert.

Die auf die Hybridisierung folgenden verschiedenen Waschschrirte und die Inkubation mit dem AP-markierten Anti-Dig-Antikörper sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tab. 5.28: Hybridisierungsschritte

	Lösung	Vol. / Fl.	Dauer	Temp.
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 4 µl AP-markiertem Anti-Dig-Antikörper**	40 ml	30 min	RT
8.	Puffer 1	50 – 100 ml	15 min	RT
9.	Puffer 1	50 – 100 ml	15 min	RT

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Merck, Darmstadt)

Nach Beendigung aller Waschschriffe wurden die Filter mit einer Pinzette für 10–20 s in 0,1 M Tris-Puffer pH 9,5 gelegt, anschließend sofort auf einer Folie mit dem ECF-Substrat (Amersham Biosciences, Freiburg) benetzt (von der Firma empfohlenes Volumen: 12 µl pro cm²) und auf der Glasoberfläche des Fluorimagers platziert.

Der MD STORM 860 (Amersham Biosciences, Freiburg) scannte die Filter im Modus „Blue Chemifluorescence“ mit einer Auflösung von 100 µm, wobei ein Laser das fluoreszierende Produkt anregte. Das emittierte Licht wurde von einem Photomultiplier gemessen und als digitalisiertes Bild in dem Programm ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics/ Amersham Biosciences, Freiburg) visualisiert und quantifiziert. Bei der Quantifizierung wurde darauf geachtet, dass die Bestimmung im linearen Bereich des Photomultipliers erfolgte. Dazu wurden die Filter zu verschiedenen Zeiten nach Substratzugabe gescannt und eine im linearen Bereich liegende Aufnahme ausgewertet. Die weitere Datenauswertung erfolgte mit der Officekomponente Excel (Microsoft, USA).

Tab. 5.29: Hybridisierungslösung für „dot“- und „northern-blotting“

Substanzen	Menge	Endkonz.
Formamid*	100,0 ml	0,5 M
SSC 20x	50,0 ml	5x
Blocking reagent**	4,0 g	2%
N-Lauroylsarcosin* 10 %	2,0 ml	0,1%
SDS***	14,0 g	0,2 M
DEPC-ention. H ₂ O	auf 200 ml auffüllen	

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roche, Mannheim) *** (Roth, Karlsruhe)

nicht autoklavieren! Bei 4 °C aufbewahren.

Tab. 5.30: 20x SSC

Substanzen	Menge	Endkonz.
NaCl*	175,3 g	3,0 M
Na-Citrat*	88,2 g	0,3 M
DEPC-ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen; pH = 7,0; autoklavieren	

*(Sigma, Deisenhofen)

Tab. 5.31: Waschlösungen für „dot“- und „northern-blotting

2x SSC 0,1 % SDS	Menge	Endkonz.	0,2x SSC 0,1 % SDS	Menge	Endkonz.
SSC 20x	100,0 ml	2x	SSC 20x	10,0 ml	0,2x
SDS* 10%	10,0 ml	0,1%	SDS* 10%	10,0 ml	0,1%
DEPC-ention H ₂ O	890,0 ml		DEPC-ention H ₂ O	980,0 ml	

*(Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.32: 10x Puffer 1

Substanzen	Menge	Endkonz.
Maleinsäure**	116,1 g	1,0 M
NaCl*	87,7 g	1,5 M
DEPC-ention. H ₂ O	auf 1 l auffüllen; pH 7,5; autoklavieren	

*(Roth, Karlsruhe)

**(Merck, Darmstadt)

unter Rühren in 900 ml DEPC-ention. H₂O lösen, NaOH-Plätzchen (Sigma, Deisenhofen) zur pH-Einstellung nutzen.

10 % Blockingreagenz: 10 g Blockingreagenz (Roche, Mannheim) in eine Flasche einwiegen und mit 1x Puffer 1 auffüllen, bei 50 °C 1 h lang rühren und danach autoklavieren; bei 4 °C aufbewahren.

Tab. 5.33: Reaktionspuffer 2 für die Dig-Interaktion

Substanzen	Menge	Endkonz.
Blockingreagenz 10%	50 ml	1%
Puffer1 1x	450 ml	

steril in sterile Flasche abfüllen, gut rühren; bei 4 °C aufbewahren

5.9.4. Westernblotting und Immunodetektion

Der Transfer von Proteinen auf eine Membran bietet die Chance ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch zu identifizieren und seine Menge zu quantifizieren. Entscheidend für diese Methode ist ein spezifischer Antikörper für das Protein.

Durch „SDS-PAGE“ aufgetrennte Proteinextrakte wurden über Elektrotransfer auf einer positiv geladenen Nitrozellulosemembran (Protean, Schleicher & Schuell) immobilisiert. Dazu wurde das Gel mit der Membran in einer Art Sandwich aus Filterpapier und Filzmatten über Nacht bei 4 °C in einer Blottingkammer mit

Transferpuffer einem Strom von 100 mA ausgesetzt. Durch die hohe Proteinbindungskapazität der Membran wurden die Proteine positionsgenau aus dem Gel auf die Nitrozellulose übertragen.

Die Detektion spezifischer Proteine auf der Membran erfolgte durch monoklonale Antikörper gegen diese Proteine. Die Oberfläche der Membran wurde vor der Antikörperreaktion mit 5% Milchpulver in 1x Blotto 1 h geblockt, um unspezifische Reaktionen der Antikörper mit der Membran zu verhindern. Die Antikörper wurden in den unten angegebenen Mengen mit 1x Blotto gemischt, in dem 2,5% Milchpulver gelöst waren. Die Filter wurden dann mit dieser primären Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt und 2 h auf einem Schüttler (GFL1086, SS40-D, OLS200, GFL Grant) bei 300 rpm und RT fixiert. Nach dieser Inkubation wurde der primäre Antikörper durch zweimaliges Waschen (10 min) mit 2,5% Milchpulver in 1x Blotto entfernt. Die Inkubation des sekundären Antikörpers mit dem Blot erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie für die primären Antikörper beschrieben. Ungebundener sekundärer Antikörper konnte durch dreimaliges Waschen für 10 min mit entionisiertem Wasser entfernt werden. Die Antikörper-markierten Proteine auf dem Blot konnten durch eine Chemifluoreszenzreaktion sichtbar gemacht werden, da an den sekundären Antikörper das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt war.

Tab. 5.34: Transferpuffer für den Nasstransfer von Proteinen

Substanzen	Menge	Endkonz.	Blotto 10x	Menge	Endkonz.
Tris/HCl*	9,73 g	20 mM	Tris/HCl	60,5 g	0,5 M
Glyzin**	45,07 g	150 mM	NaCl**	87,7 g	1,5 M
Methanol**	800,0 ml	20%	ention. H ₂ O	1,0 l	
ention. H ₂ O	3,2 l		pH auf 7,6 einstellen		

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.35: Verwendete Antikörperkonzentrationen

Primäre Antikörper		Sekundäre Antikörper*	
Anit-SigB (H106-14B5-3G6)	1:100	Anti-Mouse	1:2000
Anti-RsbW (H110-3A7-3C8)	1:25		
Anti-RsbV (H110-13C6-3D4)	1:25		
Anti-RsbU (H126-1C10-4C10)	1:200		
Anti-RsbS (H129-2T12-2B2)	1:500		
Anti-Ctc (polyklonal)	1:25000	Anti-Rabbit	1:2000

* (Biorad, München)

5.9.5. Chemifluoreszenz

Das für die Detektion von Westernblots und Northernblots eingesetzte Chemifluoreszenzsubstrat ECF (Amersham Biosciences, Freiburg) wird durch die antikörpergebundene alkalische Phosphatase in ein hochfluoreszierendes Produkt umgewandelt. Die Anregung erfolgt bei 440 nm und die Emission bei 560 nm. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 2–4 ng für Proteine mit einem linearen Bereich von bis zu 20facher Signalintensität und bei 0,25 pg für Nukleinsäuren mit einem linearen Bereich von bis zu 50facher Signalintensität.

5.9.6. cDNA-Makroarrays von *Bacillus subtilis*

Eine Methode zur Untersuchung des Transkriptoms eines Organismus ist die Herstellung von markierter cDNA aus dem isolierten RNA-Pool der Zelle. Für die hier durchgeführten Transkriptomanalysen wurde in die cDNA [α -³³P]-dCTP eingebaut und anschließend auf DNA-Makroarrays hybridisiert. Diese von Sigma-Genosys Ltd. produzierten Arrays enthielten die 4107 bekannten Gene von *Bacillus subtilis*.

Für die Synthese von cDNA wurden 2 µg RNA eingesetzt, die mit 3 µl 5x Hybridisierungspuffer, 4 µl Primer (Genosys, Sigma) gemischt und RNase-freiem Wasser auf 30 µl aufgefüllt wurde. Dieses Gemisch wurde für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach einer kurzen Sedimentation in der Tischzentrifuge (Pico, Heraeus) wurde ein Primerannealing bei 50 °C für 1 h durchgeführt. Nach einer weiteren kurzen Sedimentation wurden dem Reaktionsansatz 6 µl 5x Superscript Puffer (GibcoBRL, Karlsruhe), 3 µl 100 mM DTT, 0,75 µl Nukleotidmix, 4-5 µl [α -³³P]-dCTP (> 3000 Ci / mmol; Amersham Biosciences, Freiburg) und 2 µl Superscript II-Polymerase (GibcoBRL, Karlsruhe) hinzugefügt. Nun wurde das Gemisch für die cDNA-Synthese 1 h bei 42 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch eine 15 minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt.

Nun wurden dem Reaktionsansatz 1 µl 10% SDS, 1 µl 0,5 M EDTA, 3 µl 3 M NaOH hinzugefügt, um die Matrizen-RNA durch 30 min alkalische Hydrolyse bei 65 °C zu entfernen. Dies war notwendig, damit die Matrizen-RNA bei der Hybridisierung nicht wieder die cDNA bindet und so eine Bindung an die fixierte DNA auf der Membran verhindert. Durch Neutralisation mit 10 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,0) und 2 µl 2 N HCl wurde die alkalische Hydrolyse beendet. Dem Reaktionsgemisch wurden 0,5 µl entnommen und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt. Die Radioaktivität des Gesamtgemisches wurde mit Hilfe eines Szintillationszähler bestimmt. Nach Zugabe von 0,5 µl Carrier-tRNA (Sigma, Deisenhofen), 5 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 60 µl Isopropanol wurde die cDNA bei -20 °C 1 h gefällt und für 15 min bei 15000 rpm in

einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen und in 60 µl sterilem ention. H₂O resuspendiert. Hier wurden wieder 0,5 µl entnommen in Szintillationflüssigkeit aufgenommen und die Radioaktivität bestimmt. Der restliche Ansatz wurde bei -20 °C gelagert. Anhand der bestimmten Radioaktivitäten konnte die Einbaurrate von [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP ermittelt werden. Für die Hybridisierung auf den DNA-Array wurden nur cDNA-Synthesen verwendet, die eine Einbaurrate für [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP von über 50% hatten.

Vor der Hybridisierung wurden die Arrays für 2 h mit 5 ml Prähybridisierungslösung bei 65 °C inkubiert. Die radioaktiv markierte cDNA wurde mit 3 ml Hybridisierungslösung gemischt und gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C für ca. 16 h. Dann wurden die Filter zweimal 5 min bei RT mit ungefähr 200 ml 2x SSC, 0,1% SDS und darauf zweimal für 20 min bei 65 °C mit ca. 200 ml 65 °C heißem 0,2X SSC, 0,1% SDS gewaschen. Als nächstes wurden die Arrays aus den Hybridisierungsflaschen auf Whatmanpapier (Biometra, Göttingen) mit Klarsichtfolie befestigt. Die radioaktiv markierten Makroarrays wurden für 96 h auf einen "Phosphoscreen" gelegt, um auf der Schirmoberfläche ein Spiegelbild des Arrays zu erzeugen. Dieses Bild wurde mit dem Fluorimager MD STORM 860 (Molecular Dynamics, USA) mit einer Auflösung von 50 µm/Pixel gescannt und im Programm ImageQuant (Molecular Dynamics, USA) weiterbearbeitet.

Die radioaktiv markierte cDNA konnte von den Makroarrays entfernt werden. Dazu wurden die Membranen mit 800 ml einer kochenden Striplösung in einer Mikrowelle für 20 min gekocht. Normalerweise gelang es mehr als 95% der zuvor gemessenen Radioaktivität zu entfernen, so dass die Arrays 6-7 mal verwendet werden konnten. Danach nahm die Signalstärke allerdings deutlich ab, so dass weitere Hybridisierungen mit diesen Membranen nicht sinnvoll waren.

Tab. 5.36: Denhardt Lösung 50x

Substanzen	Menge	Endkonz.
Ficoll 400*	5,0 g	12,5 µM
Polyvinylpyrrolidon *	5,0 g	14,0 µM
Rinderserumalbumin *	5,0 g	1,0%
DEPC-ention H ₂ O	500,0 ml	Lagerung bei -20 °C

* (Sigma, Deisenhofen) ** (Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.37: 5x Hybridisierungslösung für DNA-Arrayhybridisierungen

Substanzen	Menge	Endkonz.
Denhardt Lösung 50x	10,0 ml	5x
SDS** 20%	10,0 ml	2%
SSC 10x	50,0 ml	5x
DEPC-ention H ₂ O	auf 100 ml auffüllen	Lagerung bei -20 °C

*(Sigma, Deisenhofen)

**(Roth, Karlsruhe)

Tab. 5.38: Prähybridisierungslösung für DNA-Arrayhybridisierungen

Substanzen	Menge	Endkonz.
Hybridisierungslösung 5x	5,0 ml	5x
Heringssperma-DNA*	500,0 µg	100 µg/ml

*(Sigma, Deisenhofen)

Tab. 5.39: Striplösung für DNA-Arrayhybridisierungen

Substanzen	Menge	Endkonz.
SDS** 20%	200 ml	1%
Tris/HCl* 1M (pH 8,0)	40 ml	10 mM
EDTA* 0,5 M	8 ml	1 mM
Ention H ₂ O	auf 4 l auffüllen	

*(Sigma, Deisenhofen)

**(Roth, Karlsruhe)

5.9.7. „Phosphoimaging“

Die radioaktive Markierung war jahrelang die häufigste Methode zur Visualisierung von Biomolekülen. Bei den radioaktiv markierten DNA-Makroarrays wurde zur Bildentwicklung die Methode des „Phosphoimaging“ angewendet. Die Filter wurden direkt auf mit lichtsensitivem Phosphor beschichtete Platten gelegt. Die emittierte Energie wurde in einem Europiummantel gespeichert. Die Platten wurden dann mit einem Laser gescannt und die herausgelösten Photonen in Form eines Bildes gesammelt. Der Vorteil dieser Methode lag in der hohen Sensitivität und dem großen linearen Bereich von 5 Größenordnungen.

5.10. Mikroskopie

In der Lichtmikroskopie erfolgt die Vergrößerung von Objekten durch zwei optische Systeme. Das Objektiv erzeugt ein vergrößertes, seitenverkehrtes, reelles Projektionsbild des beobachteten Objektes. Die Lupe vergrößert das Zwischenbild zum virtuellen Endbild.

Bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie wird eine Lochblende in die Zwischenbildebene eingebaut, die nur das Licht einer Ebene sammelt und sämtliches Licht aus anderen Ebenen absorbiert. Das so vom Detektor aufgenommene Bild zeigt

nur eine Ebene des Objektes. Durch Verschiebung der Fokusebene können einzelne Bilder zu dreidimensionalen Abbildungen zusammengesetzt werden.

In Marburg wurden die Aufnahmen mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Axiolab, Zeiss) und einer computergesteuerten CCD- Kamera (Zeiss, Jena) gemacht.

In Greifswald wurde ein konfokales Laserscanningmikroskop (Eclipse TE 300, Nikon) mit einer CCD-Kamera (Nikon, Japan) für die Fluoreszenzbilder verwendet. Ein Phasenkontrastobjektiv war nicht vorhanden. Das Mikroskop wurde mit der VoxCellScan-Software (VisiTech, England) gesteuert.

5.10.1. Phasenkontrastmikroskopie

Nach der Abbe'schen Theorie entsteht ein mikroskopisches Bild durch die Interferenz von ungebeugtem Umgebungslicht (Hauptmaximum) mit dem am Objekt gebeugten Licht (Nebenmaximum) in der Zwischenbildebene. Beim Durchdringen eines Objektes wird Licht absorbiert, d.h. die Amplitude des Lichtes wird verkleinert. Also entscheidet der Kontrast, ob ein Objekt für den Betrachter sichtbar ist oder nicht.

Mikroorganismen sind sehr kontrastarme Objekte, die im Hellfeld nur sehr schlecht wahrgenommen werden können. Sie verändern die Amplitude des Lichtes nicht, bewirken aber wegen ihres höheren Brechungsindex eine Phasenverschiebung des am Objekt gebeugten Lichts gegenüber dem Umgebungslicht.

Das Phasenkontrastverfahren erlaubt die kontrastreiche Darstellung von durchsichtigen, kontrastarmen Objekten. Dabei wird die Phasenverschiebung, die durch das Objekt verursacht wurde, korrigiert, so dass die Interferenz zwischen ungebeugtem Umgebungslicht und am Objekt gebeugtem Licht verstärkt wird. Diese Aufgabe übernimmt der Phasenring, der in der hinteren Brennebene des Objektivs justiert ist. Der ringförmige Belag besteht aus einem höher brechenden, lichtabsorbierenden Material, das die Phase des Umgebungslichts um bis zu 270° verschiebt und gleichzeitig die Amplitude verkleinert.

In dieser Arbeit wurde die Phasenkontrastmikroskopie eingesetzt, um Bilder von *Bacillus subtilis* zu erstellen. Die Aufnahmen wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv bei einer Vergrößerung von 1000:1, mit einer Ph3-Ringblende, einer Belichtungszeit 1 s und einer Auflösung von 1039x1039 Pixeln gemacht.

Die mikroskopischen Präparate waren auf 1%iger "low melting"-Agarose (SeaPlaque GTG, Biozym) immobilisiert. Entscheidend für die Qualität der Aufnahmen war, dass die Agarose in eine Vertiefung auf dem Objektträger eingelassen wurde. Der Kontrast der Bilder von Objektträgern ohne Vertiefung mit aufgetopfter Agarose war sehr schwach.

5.10.2. Fluoreszenzmikroskopie

Mit Fluoreszenzmikroskopie wurde die Expression einer *gsiB::gfp*-Fusion in *Bacillus subtilis*-Stämmen nachgewiesen. Das Anregungsmaximum des verwendeten GFP+ von Dr. Michael Niederweiß (Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) (Scholz *et al.*, 2000) liegt bei 488 nm und das Emissionsmaximum bei 510 nm. Die Fluoreszenz wurde mit einem 450-490/FT510/LP520 Filterset beobachtet. Die Digitalisierung erfolgte mit dem Programm Axiovision 4.0 (Zeiss, Jena). Die Belichtungszeit betrug je nach Lampe 2–5 s mit einer Auflösung von 1039x1039 Pixeln.

Die Fluoreszenzbilder von den *relA*-Mutanten wurden in Greifswald mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Nikon, Japan) aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 5 s. Für die Aufnahmen wurden die Bakterien immer auf 1%iger "low melting"-Agarose (SeaPlaque GTG, Biozym) auf einem Objektträger mit Vertiefung immobilisiert.

5.11. Reporterassays

5.11.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Das Enzym β -Galaktosidase aus *E. coli* wird vom ersten Gen des *lac*-Operons codiert. Es katalysiert die Hydrolyse von Laktose in Glukose und Galaktose. Allerdings interagiert dieses Enzym auch mit einer Reihe von synthetischen Laktoseanaloga. Die Umsetzung des chromogenen o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid in gelbes o-Nitrophenol kann durch eine Absorptionsmessung bei 420nm quantifiziert werden. Die Enzymaktivität wird durch das Anhängen von Aminosäuren nicht beeinflusst. Außerdem kann die β -Galaktosidase nicht nur in anderen Bakterienarten synthetisiert werden, sondern auch in einer Vielzahl von eukaryontischen Zellen. Ein Nachteil der β -Galaktosidase aus *E. coli* ist, dass dieses Enzym nicht hitzestabil ist.

Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der *ctc::lacZ*-Fusion wurden 1,0 ml Proben entnommen. Die in einem Eppendorfgefäß durch Sedimentation geernteten Zellen wurden zunächst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesammelt. Unmittelbar vor der Durchführung der Bestimmung wurden die Pellets in 0,9 ml Z-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μl Toluol wurden die Zellen durch 20 s langes Schütteln auf einem Vortexer (Vortex Genie 2, Scientific Industries) permeabilisiert. Nach weiteren 5 min Inkubation bei RT wurde die Nachweisreaktion im Abstand von 10 s durch Zugabe von 200 μl Substrat (ONPG-Lösung) gestartet und im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad inkubiert. Nach Eintritt einer deutlichen Gelbfärbung wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,5 ml Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt und die genaue Reaktionszeit notiert (Kenney, 1987). Auf eine

zweiminütige Sedimentation (Biofuge pico, Heraeus) der Zelltrümmer folgte die Messung der Intensität der Gelbfärbung im Spektralphotometer (Ultrospec 4000, Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 420 nm.

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller Units angegeben:

$$\text{Miller units} = [1000 \times A_{420} / (\text{Zeit}[\text{min}] \times \text{Volumen} [\text{ml}] \times \text{OD}_{540})]$$

Die LacZ-Proben der Kälteexperimente mussten wegen der hohen LacZ-Aktivität in der Kälte verdünnt werden. Von den 1 ml Proben wurden 50 μ l in 850 μ l Z-Puffer eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt und der Verdünnungsfaktor in die Formel einbezogen.

Tab. 5.40: Z-Puffer

Substanzen	Menge	Endkonz.	
Na ₂ HPO ₄ *	8,52 g	60,0 mM	
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O*	5,52 g	40,0 mM	
KCl*	0,75 g	10,0 mM	Der pH-Wert muss auf 7,0 eingestellt werden.
MgSO ₄ *	0,25 g	1,0 mM	
β -Mercaptoethanol*	2,7 ml	40,0 mM	Der Puffer wird nicht autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.
ention. H ₂ O	1,0 l		

ONPG*-Lösung: 4 mg ONPG je ml Z-Puffer

Na₂CO₃*-Lösung: 1 M Na₂CO₃ in ention. H₂O.

*(Sigma, Deisenhofen)

5.11.2. "Green fluorescent protein"

Das grünfluoreszierende Protein stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Im Mantel dieser Scyphozoa fluoresziert GFP nur, wenn es mit dem Kalzium-bindenden Photoprotein Aequorin interagiert.

Als Reporter in der Molekularbiologie wird es vor allem eingesetzt, weil es auch unter rauen Bedingungen, wie hohe Temperaturen, extremem pH oder Harnstoffeinwirkung stabil ist und fluoresziert. Auch faltet sich dieses Protein problemlos in Hefen und Bakterien durch eine autokatalytische, intramolekulare Reaktion zu einem funktionsfähigen Fluorophor. Das Chromophor ist ein cyclisches Hexapeptid. Die Zyklisierung erfolgt über eine posttranslationale Modifikation an den Resten Ser65, Tyr66 und Gly67, welche die Fluoreszenzeigenschaften entscheidend beeinflussen. In dieser Arbeit wurde GFP+, eine Variante des Wildtyp GFP mit dem Austausch S65T,

eingesetzt (Scholz *et al.*, 2000). Diese Form fluoresziert 4–6 mal stärker als das normale GFP.

5.11.3. Nachweis der Amylase-Aktivität

Ein Charakteristikum von *Bacillus spp.* ist der Besitz einer Amylase, mit der dieses Bakterium in der Lage ist, Stärke zu hydrolysieren. Das kodierende Gen für die Amylase ist *amyE*. Zum Nachweis der Integration der Reporterfusion *gsiB::gfp* in *amyE* wurden Zellen auf Stärke-Platten ausgestrichen und bei 37 °C üN inkubiert. Nach Abwaschen der gewachsenen Kolonien wurden auf den kurz getrockneten Platten 200 µl Jod-Jodkalium-Lösung ausplattiert. Durch diese Behandlung bekam der Agar eine blauschwarze Farbe, die durch die Einlagerung der Jodmoleküle in die Hohlräume zwischen den spiralisierten Glukoseeinheiten entstand. Der Agar verfärbte sich nicht, wenn die Stärke durch eine intakte Amylase von den Zellen abgebaut wurde. Auf diese Weise konnte zwischen Kolonien mit intakten oder defektem *amyE*-Gen unterschieden werden.

Tab. 5.41: Lugol'sche Lösung

Substanzen	Endkonz.
Kaliumjodid*	1,0 %
Jod*	0,5 %

* (Sigma, Deisenhofen)

5.12. Verwendete Datenbanken und Programme

5.12.1. Computergestützte Auswertung von DNA - Makroarrays

Die eingescannten Arrays konnten direkt in das Programm ArrayVision 4.0 (Imaging Research Ind., USA) importiert werden, mit dem eine Quantifizierung der Hybridisierungssignale durchgeführt wurde.

Um verschiedene Hybridisierungen miteinander vergleichen zu können, wurde in diesem Programm die normalisierte Intensität eines jeden Spots berechnet. Zuvor wurde allerdings der Hintergrund von den Signalen abgezogen. Dieser wurde als Median, der die Spots umgebenden Fläche bestimmt. Die eigentliche Normalisierung der Spotintensitäten beinhaltete zwei Schritte. Zuerst wurde die Intensität des Durchschnittspot bestimmt, der sich als Quotient der Summe aller Spotintensitäten ergab. Die normalisierte Intensität eines einzelnen Spots ergab sich dann durch die Division der individuellen Spotintensität ohne Hintergrund und der Intensität des errechneten Durchschnittspot.

Die so erhaltene normalisierte Intensität eines Spots wurde eingesetzt, um für das entsprechende Gen einen normalisierten Durchschnittswert aus allen Replika einer

Bedingung zu erstellen. Zur Vermeidung von extremen Intensitätsverhältnissen für Gene nahe oder unter der Detektionsgrenze, wurde der normalisierte Durchschnittspot willkürlich auf einen Wert gesetzt, der einem „signal-to-noise“-Verhältnis von zwei entsprach.

Mit diesen Durchschnittswerten wurden die Expressionsverhältnisse für folgende Vergleiche in Microsoft Excel 2000 berechnet.

1. gestresst 10 min wt vs. exponentiell wachsende Zellen wt
2. gestresst 10 min *sigB* vs. exponentiell wachsende Zellen *sigB*-Mutante
3. gestresst 10 min wt vs. gestresst 10 min *sigB*-Mutante
4. gestresst 60 min *rsbX*-Suppressormutante vs. gestresst 60 min *sigB*-Mutante

Zur Identifizierung stressabhängiger Gene wurden die ermittelten Expressionsverhältnisse in das Programm Genespring 3.2.12 (Silicon Genetics, Redwood City, Calif.) geladen und analysiert.

5.12.2. Computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzvergleiche zur funktionellen Charakterisierung der identifizierten Stressproteine wurden mit einem Blast 2.0-Algorithmus durchgeführt (Altschul and Koonin, 1998). Dabei wurde die Ähnlichkeit von Proteinen mit Hilfe der BLOSSUM62-Matrix in einer nicht redundanten SWALL Proteindatenbank analysiert. Die Proteinsequenzen wurden aus der SubtiList-Datenbank (<http://genolist.pastuer.fr/subtiList>) am Pasteur-Institut (Paris) bezogen.

Für die Suche nach potentiellen Signalsequenzen wurde der im Internet zur Verfügung gestellte SignalP-Algorithmus (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) verwendet (Nielsen *et al.*, 1997). Die erhaltenen Analysen wurden mit der Publikation zum Sekretom von *Bacillus subtilis* von (Tjalsma *et al.*, 2000) verglichen. Potentielle transmembranspannende Domänen in den Proteinsequenzen wurden durch die Anwendung der "dense alignment surface"-Methode identifiziert und durch den Vergleich der Daten mit den Ergebnissen einer auf einem "hidden markov"-Modell basierenden Methode von Sonnhammer *et al.* (1998) verifiziert (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>).

Die genomweite Suche nach Promotoren wurde mit dem Programm MotivFinder1.0 (Decodon, Greifswald) ausgeführt. Hier konnte mit Hilfe bekannter Promotoren eine Konsensussequenz erstellt werden und eine Genomdatenbank von *Bacillus subtilis* nach entsprechenden Sequenzen durchsucht werden.

Zur Auswertung und Präsentation der Daten und Bilder wurden die Officesoftwarekomponenten Powerpoint, Excel und Word (Microsoft, USA) sowie das Programm Photoshop 6.0 (Adobe, USA) benutzt.

6. Ergebnisse

6.1. Charakterisierung des Transkriptoms von *Bacillus subtilis* nach Einwirkung von Umweltstress

In verschiedenen Ansätzen konnten in den vergangenen Jahren immer neue SigB-abhängige Gene identifiziert werden (Akbar and Price, 1996; Boylan *et al.*, 1991; Hecker *et al.*, 1988; Hecker and Völker, 1990; Petersohn *et al.*, 1999a; Petersohn *et al.*, 1999b; Richter and Hecker, 1986). Neben umfangreichen Studien zum Phänotyp einer *sigB*-Mutante (Engelmann and Hecker, 1996; Gaidenko and Price, 1998; Völker *et al.*, 1999) haben diese Experimente entscheidend dazu beigetragen die Funktion des SigB-Regulons innerhalb der Zelle zu definieren. Da die generelle Stressantwort die Zellen mit einer vielfältigen, unspezifischen und vorbeugenden Stressresistenz in Erwartung zukünftigen Stresses ausstattet, könnte das SigB-Regulon für nicht wachsende Zellen neben der Sporulation eine Alternative zur Sicherung des Überlebens unter ungünstigen Umweltbedingungen sein (Hecker and Völker, 2001). Eine genomweite Transkriptomstudie zur Identifizierung weiterer Stressgene erschien daher sinnvoll, um die genaue Aufgabe des SigB-Regulons im Stressmanagement der Zelle besser zu verstehen. Die Veränderungen im Transkriptionsmuster von *B. subtilis* wurden nach Einwirkung von 4% Ethanolstress, 4% NaCl-Stress und Hitzestress (48 °C) mit Hilfe von DNA-Makroarrays analysiert, auf denen PCR-Produkte der 4107 offenen Leserahmen des Genoms von *B. subtilis* aufgespottet waren. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Hecker von der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt, um durch die Arbeit in zwei unabhängigen Laboren eine größtmögliche Signifikanz der Daten zu sichern. Die Arrayexperimente nach Salz, Ethanol und Hitze mit dem *B. subtilis* Wildtypstamm 168 und der isogenen *sigB*-Mutante ML6 führte Anja Petersohn durch. Anhand dieser 21 Arrayhybridisierungen konnte die Induktion im Wildtyp und in der *sigB*-Mutante vor und 10 min nach Einwirkung der Stimuli Salz, Hitze und Ethanol analysiert werden.

Für die Arrayanalysen dieser Arbeit wurden der *B. subtilis* Wildtyp BSA 46 und die isogene *sigB*-Mutante BSA 272 verwendet. Zusätzlich wurde die Regulatormutante BSA 386 in diese Experimente einbezogen, in der die Unterschiede zur *sigB*-Mutante deutlicher ausgeprägt waren als im Wildtyp. In den 11 einbezogenen Arrayanalysen

wurden die Veränderungen im Transkriptom nach 4% Ethanolstress analysiert. Verglichen wurden dabei die Spotintensitäten des ungestressten Wildtyps mit denen des für 10 min mit Ethanol gestressten Wildtyps und die Spotintensitäten der Regulatormutante BSA386 und der *sigB*-Mutante BSA272 nach 60 min Ethanolstress. Die bioinformatische Auswertung aller Arrayexperimente, die Promotoranalyse und die Beschreibung des SigW-Regulons wurden im Rahmen dieser Arbeit realisiert.

6.1.1. Auswahl der Stämme für die Analyse des Transkriptoms von *Bacillus subtilis*

Vor der Durchführung der Arrayhybridisierungen wurden die Stämme für die Transkriptomanalyse ausgesucht. Neben dem *B. subtilis* Wildtypstamm BSA46 wurde die *sigB*-Mutante BSA272 ausgewählt, weil das wesentliche Ziel dieser Transkriptomuntersuchungen die Identifizierung neuer Mitglieder des SigB-Regulons war. Mit der gleichen Intention wurde die Regulatormutante BSA386 in die Experimente einbezogen.

Diese Regulatormutante BSA386 hat eine Deletion im Gen *rsbX*, das für den „Feedback“-Regulator RsbX des Signaltransduktionsweges zur Aktivierung von SigB nach Umweltstress, kodiert. Eine Deletion von *rsbX* führt zu einem stark erhöhten Basallevel von SigB während des exponentiellen Wachstums und einer konstitutiven Anschaltung des SigB-Regulons nach Einwirkung von Umweltstress. Normalerweise ist diese Überproduktion von generellen Stressproteinen tödlich für die Zelle, da entweder die generellen Stressproteine eine toxische Wirkung auf die Zelle haben, oder aber andere essentielle Proteine nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden können (Völker *et al.*, 1995a).

Im Labor von Bill Haldenwang in San Antonio, Texas, USA konnten Mitte der 90er Jahre Suppressormutanten isoliert werden, die eine stark erhöhte Expression des SigB-Regulons aufwiesen, aber lebensfähig waren (Smirnova, 1998; Völker *et al.*, 1995a).

Um einen Eindruck von der Expression genereller Stressgene in diesen drei Stämmen nach 4% Ethanolstress zu gewinnen, wurde eine Northernblotanalyse für das generelle Stressgen *gsiB* durchgeführt (Abb.6.1).

Bei *gsiB* handelt es sich um eines der am stärksten induzierten Mitglieder des generellen Stressregulons (Maul *et al.*, 1995), welches ursprünglich als „glucose starvation induced gene“ beschrieben wurde (Mueller *et al.*, 1992). Später gelang der Nachweis, dass dieses Gen nur von einem SigB-abhängigen Promotor aus transkribiert wird (Maul *et al.*, 1995).

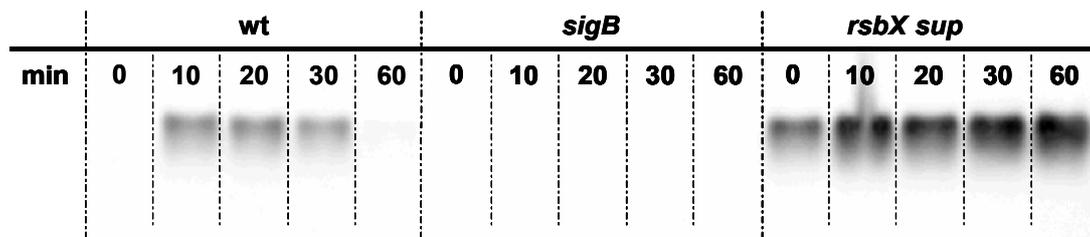


Abb. 6.1: Northernblotanalyse der Expression des SigB-abhängigen Gens *gsiB*. Die Zellen eines *B. subtilis* Wildtypstammes (BSA46), einer *sigB*-Mutante (BSM272) und einer *rsbX*-Suppressormutante (BSA386) wurden in Vollmedium (LB) kultiviert und in der exp. Wachstumsphase mit 4% Ethanol (v/v) gestresst. Über einen Zeitraum von 1 h wurden Proben zur RNA-Isolation entnommen. Zur Überprüfung des Expressionsmusters wurden 7,5 µg RNA/Spur elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und die *gsiB*-mRNA mit einer Dig-markierten *gsiB*-Antisense-RNA-Sonde nachgewiesen.

Das Basalniveau von *gsiB* ist sehr niedrig und konnte im Wildtyp nicht detektiert werden (Abb. 6.1). Erst nach Einwirkung von 4% Ethanol war ein deutliches Transkript zu detektieren. Das höchste Expressionsniveau wurde 10 min nach Zugabe von Ethanol registriert. Nach 30 min war eine Abnahme der Expression sichtbar und 60 min nach der Ethanolzugabe war das *gsiB*-Transkript im wt nicht mehr zu detektieren. Dieses transiente Expressionsmuster ist typisch für SigB-abhängige Stressgene (Boylan *et al.*, 1993; Völker *et al.*, 1995b)

In der *sigB*-Mutante konnte kein Transkript nachgewiesen werden. In der *rsbX*-Suppressormutante war das Basalniveau an *gsiB* deutlich erhöht. Hier konnte schon vor dem Stress ein *gsiB*-spezifisches Transkript nachgewiesen werden. Die Expression wurde durch Zugabe von 4% Ethanol noch einmal gesteigert. Im Gegensatz zur Expression im Wildtyp nahm in der *rsbX*-Suppressormutante die Transkription von *gsiB* über einen Zeitraum von 1 h nicht mehr ab, was darauf schließen lässt, dass in diesem Stamm das generelle Stressregulon konstitutiv exprimiert wurde. Dieses Experiment zeigte, dass eine vergleichende Transkriptomanalyse zur Suche nach weiteren Mitgliedern des SigB-Regulons mit den ausgesuchten Stämmen gut durchführbar ist.

6.1.2. Analyse des Expressionsmusters SigB-abhängiger Gene

Für die Charakterisierung des Transkriptoms von *B. subtilis* nach Einwirkung von Umweltstress wurden kommerziell erhältliche DNA-Makroarrays verwendet, auf denen PCR-Produkte von allen zu diesem Zeitpunkt annotierten Leserahmen aus *B. subtilis* gespottet waren. Verglichen wurden die Transkriptionsmuster von exponentiell wachsenden Zellen mit den Mustern von Zellen, die einem milden Ethanolstress (4% v/v) ausgesetzt wurden. In die Studie wurden aus Zellen isolierte RNA-Proben eingesetzt, die dem Stress für 10 min ausgesetzt waren, um die maximale Induktion der

SigB-abhängigen Transkription zu diesem Zeitpunkt zu nutzen. Bei den Untersuchungen mit der *rsbX*-Suppressormutante wurden die Zellen für 1 h mit 4% Ethanol inkubiert, weil es neben der erhöhten Transkription von Stressgenen auch zu einer Akkumulation der Transkripte kam.

Eine visuelle Überprüfung der Experimente konnte durch Falschfarbendarstellungen, wie in Abb. 6.2 gezeigt, vorgenommen werden. Dafür wurden die Arraybilder in einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop, Adobe) invertiert. Die Schwärzung der Spots auf dem Array mit der Probe aus unbehandelten Zellen wurde in Grün und die des Arrays mit der Probe aus gestressten Zellen wurde in Rot umgewandelt. Durch die Überlagerung der beiden Arraybilder wurden die Farben aus beiden Spots ineinandergeblendet. Die daraus entstehenden Farbübergänge grün-gelb-rot spiegeln die Expressionsveränderungen in den beiden Experimenten wider. Der Arrayausschnitt zeigt, dass die bekannten SigB-abhängigen Gene *ctc*, *ywzA*, *ysnF* und *gsiB* rot angefärbt sind, dies bedeutet, dass diese generellen Stressgene in den ethanolgestressten Zellen stärker exprimiert wurden, als in den exponentiell gewachsenen Zellen.

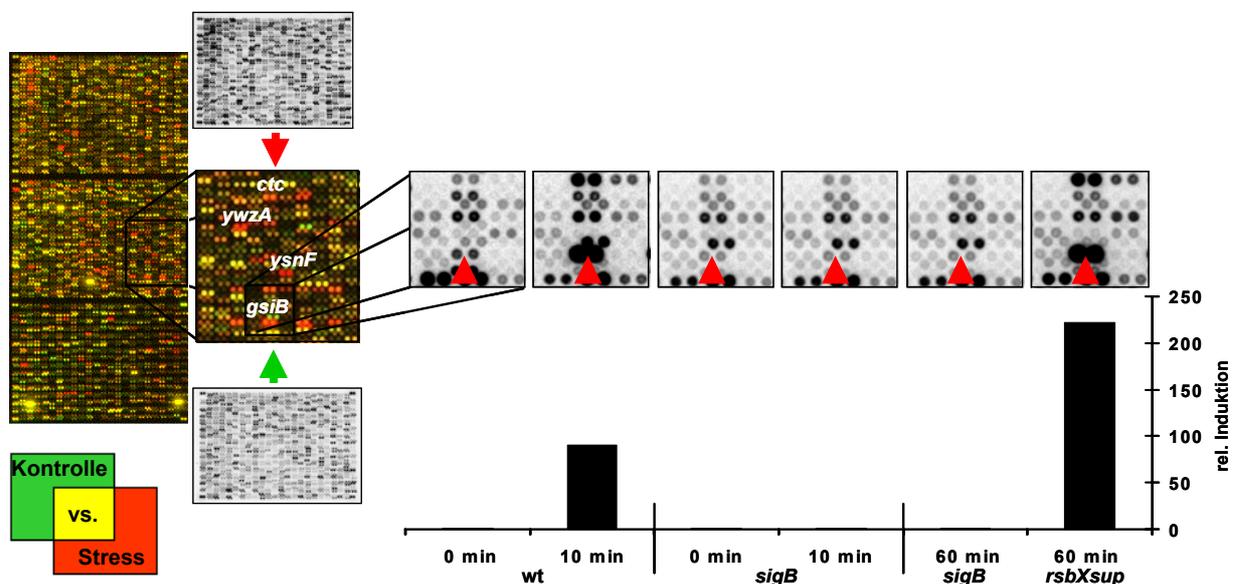


Abb. 6.2: Expressionsmuster des generellen Stressgens *gsiB* auf DNA-Makroarrays. Auf der linken Seite ist ein kompletter DNA-Makroarray als Falschfarbendarstellung abgebildet. Diese Darstellung ist das Resultat einer Überlagerung der spezifischen Hybridisierungssignale von Arrayhybridisierungen mit radioaktivmarkierter cDNA aus ethanolgestressten Wildtypzellen (rot) und unbehandelten Wildtypzellen (grün). Zur Analyse des Transkriptom von *B. subtilis* wurden kommerziell erworbene DNA-Makroarrays verwendet, auf die PCR-Produkte von 4107 Genen aus dem *B. subtilis*- Genom gespottet waren. Gene deren Expression durch die Zugabe des Stressors Ethanol induziert wurden, erscheinen rot. Der Ausschnitt zeigt, dass SigB-abhängige Gene, wie *ctc*, *ywzA*, *ysnF* oder *gsiB*, deutlich induziert sind. Im Fokus der rechten Ausschnitte steht das Expressionsmuster des generellen Stressgens *gsiB* (▲) nach verschiedenen Kultivierungen, welches exemplarisch die Suchkriterien für weitere Mitglieder der generellen Stressantwort vorstellt. Das Diagramm zeigt die rel. Induktion der *gsiB*-Transkription, die aus den oben gezeigten Arrayhybridisierungen ermittelt wurden.

Die im rechten Teil der Abb. 6.2 dargestellten Ausschnitte zeigen die Schwärzung der Spots für das Gen *gsiB*. Hier ist zu sehen, dass in den Arrayhybridisierungen das gleiche Expressionsmuster für *gsiB* gefunden wurde, wie zuvor in der Northern-blotanalyse. Im darunter abgebildeten Diagramm wurden die Intensitäten dieser Spots als relative Induktion der Expression von *gsiB* kalkuliert. Miteinander verglichen wurden in dieser Graphik die normalisierten Spotintensitäten von wt 0 min und wt 10 min, sowie *sigB* 0 min und *sigB* 10 min bzw. *sigB* 60 min und *rsbXsup* 60 min nach 4% Ethanolstress. Die Induktion des generellen Stressproteins *gsiB* war hier in der *rsbX*-Suppressormutante 2,5 mal höher als im Wildtyp nach 10 min Ethanolstress. Vor der weiteren Quantifizierung der Arraydaten wurde die Reproduzierbarkeit der einzelnen Arrayhybridisierungen kontrolliert. Dazu wurden die normalisierten Spotintensitäten aller Spots der einzelnen Hybridisierungen in „Scatterplots“ gegeneinander aufgetragen und der Pearson-Korrelationskoeffizient für die einzelnen Vergleiche bestimmt. In Abb. 6.3 ist zu sehen, dass die Gegenüberstellung der Spotintensitäten aus zwei unabhängigen Kultivierungen der gleichen Bedingung zu keiner signifikanten Abweichung der aufgetragenen Punkte von der Diagonalen führte, was bedeutet, dass die detektierten Spotintensitäten in unabhängigen Kultivierungen gut reproduzierbar waren. Dies spiegelte sich auch in einem hohen Pearsonkorrelationskoeffizienten ($r=0,992$) wieder, der für diesen Vergleich berechnet wurde. Die deutlich niedrigeren Pearsonkorrelationskoeffizienten der Vergleiche der Spotintensitäten eines ethanolgestressten Wildtyps gegen die Spotintensitäten eines unbehandelten Wildtyps ($r=0,8995$; Abb. 6.3 B) bzw. einer ethanolbehandelten *sigB*-Mutante ($r=0,9266$; Abb. 6.3 C) unterstreichen die signifikanten Veränderungen im

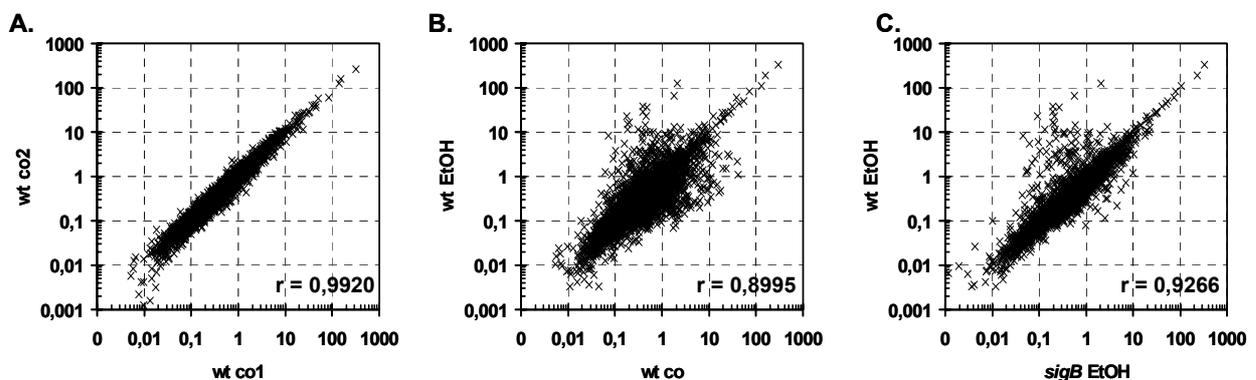


Abb. 6.3: Scatterplotvergleiche der normalisierten Spotintensitäten aller Spots. (A) Normalisierte Spotintensitäten aus zwei Hybridisierungen von zwei unabhängigen, während der exponentiellen Wachstumsphase gewonnenen Proben eines Wildtypstammes (wt co1 versus wt co2). (B) Gegenüberstellung der normalisierten Spotintensitäten der Hybridisierungen eines unbehandelten Wildtyps und eines mit 4% ethanolgestressten Wildtyps (wt co vs. wt EtOH). (C) Vergleich der normalisierten Spotintensitäten der Hybridisierungen von ethanolgestresstem Wildtyp mit ethanolgestresster *sigB*-Mutante (wt EtOH vs. *sigB* EtOH). Der Pearson-Korrelationskoeffizienten ist durch r angegeben.

Transkriptionsprofil der gegenübergestellten Bedingungen. In den Scatterplots dieser Vergleiche konnten ethanolinduzierte und reprimierte Gengruppen differenziert werden. Die Gruppe der potentiell SigB-abhängigen generellen Stressgene ist im Scatterplot 6.3 C über der Diagonalen zu sehen.

6.1.3. Expression der SigB-abhängigen Gene in der *rsbX*-Suppressormutante

In Abb. 6.4 ist eine weitere Variante des Scatterblots dargestellt. Hier sind die \log_2 -Werte der Expressionsdaten der normalisierten Spotintensitäten zweier unabhängiger Vergleiche gegeneinander aufgetragen. Die Graphiken zeigen deutlich, dass die alleinig SigB-abhängigen Gene in der *rsbX*-Suppressormutante und im Wildtyp nach Ethanolstress stark induziert wurden. Somit eignete sich die *rsbX*-Suppressormutante genauso gut zur Identifizierung SigB-abhängiger Gene wie der Wildtyp. Dem gegenübergestellt ist die Gruppe der doppelt kontrollierten Gene, die neben der Abhängigkeit von SigB zusätzlich durch einen weiteren Regulator kontrolliert werden. Dieser Kreis von Genen hatte kein ausschließlich SigB-bestimmtes Expressionsprofil und wurde durch Ethanol auch in der *sigB*-Mutante induziert. Daher sind die doppelkontrollierten Gene im Graphen B um die Mitte gruppiert.

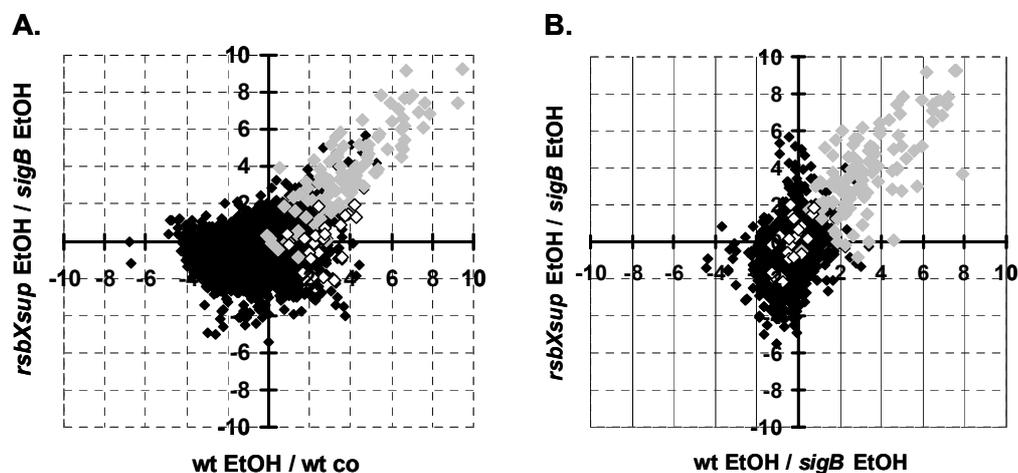


Abb. 6.4: Identifizierung SigB-abhängiger Gene durch den Vergleich Ethanolinduktion in Wildtyp und Mutantenstämmen. In diesen Scatterblots sind die \log_2 -Werte der Induktionsfaktoren aufgetragen. (A) Gegenüberstellung der \log_2 -Werte *rsbXsup* EtOH/*sigB* EtOH gegen *wt* EtOH/*wt co*. (B) Vergleich der \log_2 -Werte *rsbXsup* EtOH/*sigB* EtOH gegen *wt* EtOH/*sigB* EtOH. \square alle restlichen Gene, \square nur SigB-induzierte Gene, \square SigB-abhängige Gene mit einer zusätzlichen Kontrolle

6.1.4. Genomweite Promotorsuche mit Hilfe einer Konsensussequenz

Ein SigB-abhängiges Expressionsmuster war nur ein Indiz für die Einordnung eines Gens in das SigB-abhängige generelle Stressregulon. Ein weiteres entscheidendes Merkmal eines generellen Stressgens ist ein SigB-abhängiger Promotor, der für die Transkription dieses Gens verantwortlich sein muss.

Um alle potentiellen SigB-abhängigen Promotoren im Genom von *B. subtilis* zu identifizieren, wurde anhand der experimentell verifizierten SigB-abhängigen Promotoren in Tab. 6.1 mit Hilfe des Computerprogramms MotifFinder (Decodon GmbH, Greifswald) eine Konsensussequenz für einen SigB-abhängigen Promotor bestimmt.

Diese Konsensussequenz wurde mit dem kompletten Genom von *B. subtilis* verglichen. Die Stringenz der Suche konnte definiert werden, indem eine maximal zulässige Abweichung von der optimalen Promotorsequenz in der Nukleotidfolge festgelegt wurde. Außerdem musste der potentielle Promotor innerhalb der ersten 200 bp vor dem Startcodon der translatierten Sequenz liegen. Alle gefundenen möglichen SigB-abhängigen Promotoren wurden mit den Daten aus der DNA-Makroarrayanalyse verglichen und so die hier vorgestellten Mitglieder des SigB-abhängigen generellen Stressregulons identifiziert.

Tab. 6.1: SigB-abhängige Promotoren

Gen	- 35	12-14 Spacer	-10
<i>bmrU</i>	SEQ: cttc (GTTTAc)	tgcttacagaaaaa	(GGGgAT) tata
<i>clpC</i>	SEQ: tcag (GTTTTg)	tgaccgggaaaaat	(GGaAAT)aatg
<i>ctc</i>	SEQ: cgag (GTTTAA)	atccttatcgttat	(GGGTAT)tggt
<i>dps</i>	SEQ: agag (GTTTTA)	gcgtagatattaa-	(GGGTAT)acat
<i>gsiB</i>	SEQ: gttt (GTTTAA)	aagaattgtgagc-	(GGGAAT)acaa
<i>gspA</i>	SEQ: acgt (GTTTAT)	ttttttgaaaaa--	(GGGTAT)gtaa
<i>gtaB</i>	SEQ: aaat (GTgTAA)	aaacatatgaaaa	(GGGTAA)atgt
<i>katB</i>	SEQ: agca (GTTTAT)	atgaagaacgccac	(GGGTAA)atgt
<i>rsbV</i>	SEQ: aaag (GTTTAA)	cgtctgtcagacga	(GGGTAT)aaag
<i>trxA</i>	SEQ: tcag (GTTTTA)	aaacagctccggca	(GGGcAT)ggta
<i>ydaD</i>	SEQ: ccat (GTTTAT)	ccaaagagtgtgtg	(aGGTAc)acaa
<i>ydaG</i>	SEQ: tctt (GTTTAA)	atcttccccgatg	(tGGAAA)agta
<i>ydaP</i>	SEQ: ccgg (GTTTTA)	aagcctttctcctg	(tGGTAT)tgaa
<i>osmC</i>	SEQ: gcat (GTTTAA)	aaagatcagaaa--	(GGGAAA)tata
<i>ytxH</i>	SEQ: acat (GTTTAT)	gattgaagaaaac-	(GGGTAA)acag
<i>csbA</i>	SEQ: tggT (GaTTgA)	ttttggctgaaaag	(GGGTAT)ggtg
<i>yvyD</i>	SEQ: ttat (GTTTcA)	gcaggtattgtaaa	(GGGTAA)aaga
<i>yhdF</i>	SEQ: tggc (GTTTAT)	tcatttctgtcgtg	(tGGTAA)cgtt
<i>yacL</i>	SEQ: tttc (GgTTAA)	aaccttatgaatac	(GGGgAT)atta
<i>yjbC</i>	SEQ: ggct (GTTTAA)	acaagaagaaatg-	(GGGTAT)atct
Konsensus	GTTTWW	- 12-14 bp	- GGGWAW

Alle hier aufgeführten Promotoren wurden experimentell durch Primerextension oder Nuklease S1-Kartierung bestätigt. Die -35 Box und die -10 Box sind eingeklammert und konservierte Nukleotide sind gross und abweichende Nukleotide klein geschrieben. Im angegebenen Konsensus sind die variablen Nukleotide durch die entsprechende IUB-Konnotation ersetzt (W= T / A / G / C).

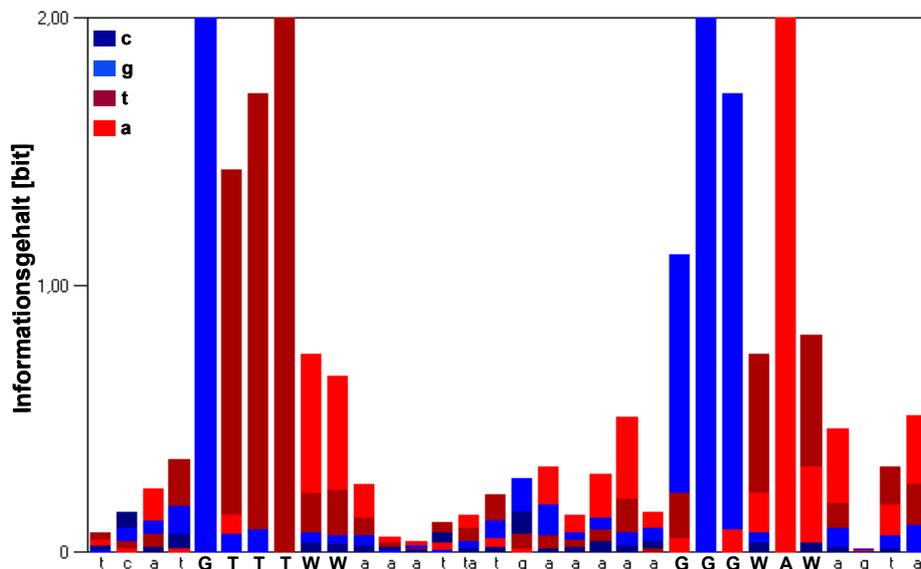


Abb. 6.5: Genomweite Suche nach SigB-abhängigen Promotoren mit Hilfe einer Konsensussequenz. Aus den in Tab. 6.1 aufgezählten Promotoren wurde in dem Programm MotifFinder 2.0 (Decodon GmbH, Greifswald) eine Konsensussequenz für SigB-abhängige Promotoren ermittelt. Das abgebildete Balkendiagramm ist die graphische Auswertung der Promotorsequenzanalyse. Die Höhe eines Balkens zeigt die Konservierung einer Position in der Sequenz. Über den Farbkode wird dargestellt, welches Nukleotid an dieser Stelle vorkommt. Die Ausbreitung der Farbe innerhalb eines Balkens zeigt den Anteil eines Nukleotides an der Konservierung dieser Position in bit an. Die variablen Nukleotide sind durch die entsprechende IUB-Konnotation ersetzt (W= T / A / G / C). Diese Konsensussequenz wurde gegen das komplette Genom von *B. subtilis* abgeglichen, um alle potentiellen SigB-abhängigen Promotoren zu identifizieren.

6.1.5. Identifizierung SigB-abhängiger Gene

Insgesamt wurden für diese Transkriptomstudie 32 Arrayhybridisierungen ausgeführt, um eine umfangreiche Analyse der Veränderungen in der Genexpression von *B. subtilis* nach der Einwirkung von Hitze, Salz oder Ethanol vorzunehmen. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Analysen der Stämme BSA46, BSA272 und BSA386 vor und nach Einwirkung von Ethanol wurden in die Analysen auch die von Anja Petersohn aus dem Labor von Prof. M. Hecker erhobenen Daten zur Adaptation der Stämme *Bacillus subtilis* 168 (wt) und ML6 (*sigB*-Mutante) an die 10minütige Einwirkung von 4% NaCl, 48 °C und 4% Ethanol einbezogen. Mit Hilfe des kompletten Datensatzes und in Kombination mit der Promotoranalyse wurde ein Gen als SigB-abhängig definiert, wenn es folgende Kriterien erfüllte:

- I. Induktion der Expression im Wildtyp muss in zwei von den drei Stressbedingungen (Hitze, Salz und Ethanol) mehr als zweifach sein
- II. Induktion im Vergleich zwischen dem Wildtyp und der *sigB*-Mutante nach 10 min Stress (Ethanol, Hitze, Salz) bzw. der *rsbX*-Suppressormutante und der *sigB*-Mutante nach 60 min Ethanolstress muss in drei von vier Bedingungen wenigstens um den Faktor zwei steigen.
- III. Lokalisation eines SigB-abhängigen Promotors vor dem Gen.

Diese Bedingungen erfüllten 100 Gene, die in Tab. 6.3 zusammengefasst sind. Unter diesen 100 Genen wurden 50 der schon vorher bekannten 75 SigB-abhängigen Gene gefunden. Dazu gehörten neben *sigB* auch die drei Regulatoren der SigB-Aktivität *rsbV*, *rsbW* und *rsbX*, die alle in einem Operon mit *sigB* lokalisiert sind (Benson and Haldenwang, 1993a; Kalman *et al.*, 1990), oder das erste bekannte SigB-abhängige Gen *ctc* (Moran *et al.*, 1981).

Zusätzlich konnten 50 weitere Mitglieder des generellen Stressregulons identifiziert werden, deren biologische Funktion vielfach noch unbekannt ist.

Allerdings konnten einige SigB-abhängige Gene unter den definierten Kriterien nicht gefunden werden, da diese doppelt kontrollierten Gene auch einer SigB-unabhängigen Stressregulation unterliegen und daher in der *sigB*-Mutante nicht unbedingt signifikant schwächer induziert wurden als im Wildtyp. Um auch diese Gruppe von Genen zu finden, wurde ein weiteres Suchprotokoll erstellt. Danach wurde ein Gen als ein SigB-abhängiges generelles Stressgen mit einer zusätzlichen SigB-unabhängigen Regulation definiert, wenn es die folgenden Bedingungen erfüllte:

- I. zweifache Stressinduktion im Wildtyp und der *sigB*-Mutante durch zwei der drei Stressfaktoren Hitze, Salz oder Ethanol
- II. Potentieller SigB-abhängiger Promotor vor dem Gen.

In Tab. 6.4 sind die 24 Gene zusammengefasst, die diese Kriterien erfüllten. Unter diesen Genen wurden weitere 11 schon vorher bekannte SigB-abhängige Gene gefunden. Zu dieser Gruppe gehören *yvyD*, das unter der zusätzlichen Kontrolle des Sigmafaktors SigH steht (Drzewiecki *et al.*, 1998), oder *clpP* und das *clpC*-Operon, die außer durch SigB von dem globalen Repressorprotein CtsR reguliert werden (Gerth *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 1996). Außerdem konnten 13 weitere mögliche SigB-abhängige Gene mit einer zusätzlichen SigB-unabhängigen Stressregulation identifiziert werden. Eines davon ist *sodA*, das für eine Superoxiddismutase in *B. subtilis* kodiert.

Die Induktionswerte für die gefundenen generellen Stressgene liegen zwischen zweifach und mehreren 100fach. Diese extremen Unterschiede in den Induktionswerten entstehen dadurch, dass SigB während des exponentiellen Wachstums durch den Antisigmafaktor RsbW inaktiviert wird. Das Basalniveau von alleinigen SigB-abhängigen Genen ist daher sehr niedrig (siehe Abb. 6.1). Die Induktion nach Stresseinwirkung ist dann bei gleicher SigB-Aktivität, wesentlich stärker, als bei einem Gen, welches zusätzlich durch den vegetativen Sigmafaktor SigA transkribiert wird. Diese Gene haben schon während des exponentiellen Wachstums ein höheres Basalniveau, weshalb die Induktion durch SigB schwächer ausfällt.

Tab. 6.2: Wiederfindungsrate bekannter Mitglieder des SigB-Regulons auf den DNA-Makroarrays

Identifikationsstrategie	Anzahl der bekannten Gene	Anzahl der bestätigten Gene
Proteomanalyse	34	31 (+3) ^b
Promotor-/ Oligoscreening	24	12 (+2)
Tn-Mutagenese	8	6
Andere	19	10 (+6)
Gesamt	75^a	51 (+11)

^aEinige Gene wurden durch mehrere Strategien zeitgleich dem SigB-Regulon zugeordnet. Dadurch ist die Anzahl der bekannten SigB-Gene kleiner als die Summe, der durch die einzelnen Strategien identifizierten Kandidaten. ^bDie in Klammern stehenden Zahlen repräsentieren doppeltkontrollierte Gene, die einer zusätzlichen SigB-unabhängigen Kontrolle unterliegen.

In einigen Fällen erfüllten nicht alle Gene eines Operons die oben genannten Kriterien. Wenn diese Kandidaten von Genen flankiert wurden, die ein klares Induktionsmuster hatten, oder die Operonstruktur experimentell bestätigt war, wurden diese Gene in die Tabellen mit aufgenommen.

Insgesamt konnten in dieser Transkriptomanalyse 124 potentielle SigB-abhängige Gene identifiziert werden. Von 75 schon vor dieser Studie bekannten SigB-abhängigen Genen konnten 62 wieder als SigB-abhängig definiert werden (Tab.6.2). Dabei konnten alle Gene wiedergefunden werden, die zuvor in Proteomstudien als SigB-abhängig definiert wurden (Antelmann *et al.*, 1995; Antelmann *et al.*, 1997; Bernhardt *et al.*, 1997; Hecker *et al.*, 1988; Hecker and Völker, 1990; Petersohn *et al.*, 1999a; Richter and Hecker, 1986). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da in Proteomexperimenten hauptsächlich Gene detektiert wurden, die eine starke Expression und eine klare transkriptionelle Induktion zeigten. Auch konnten fast alle Gene, die zuvor in Transkriptionsstudien (Hecker and Völker, 1998; Price, 2000) oder durch eine Transposonmutagenese (Boylan *et al.*, 1991; Boylan *et al.*, 1993) charakterisiert wurden, bestätigt werden. Allerdings konnten nur 14 von eigentlich 24 Genen, die in einem Promotor- und Oligonukleotidscreening als SigB-abhängig beschrieben wurden, in dieser Studie als generelle Stressgene identifiziert werden (Petersohn *et al.*, 1999b). Die Ursache für diese geringe Wiederfindungsrate ist nicht klar.

In dieser Transkriptomstudie konnten folgende 13 zuvor als SigB-abhängig beschriebene Gene nicht bestätigt werden: *aldY*, *csbA*, *csbB*, *opuE*, *ydbP*, *ydhK*, *yotK*, *yoxA*, *ypuB*, *yqhA*, *yqhQ*, *yrvD* und *ytkL*.

Bei diesen handelt es sich vielleicht um Falschpositive, die in früheren Studien beschrieben wurden. Genauso wenig kann ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Qualität des PCR-Produktes auf der Membran oder der Primer für die cDNA-Synthese für die fehlende Identifizierung verantwortlich sind. Bei dem Gen *opuE* ist dies

mit Sicherheit der Fall, da die SigB-Abhängigkeit dieses Gen eindeutig gezeigt wurde (Spiegelhalter and Bremer, 1998).

Die Anwendung strenger Definitionen für die Unterscheidung hat den Vorteil, dass die Anzahl der Falschpositiven reduziert wird, allerdings erhöht sich auch der Anteil der Falschnegativen. Die folgende Gruppe von 38 Genen verfehlte die Kriterien der SigB-Abhängigkeit in dieser Studie nur knapp, weil entweder der Promotor nicht konserviert genug war, oder die Induktionswerte nicht in allen Punkten ausreichten: *arol*, *mtrA*, *purK*, *rbfA*, *spollQ*, *yabK*, *yacO*, *yazC*, *ycsE*, *ycdF*, *yddS*, *yeaC*, *yerD*, *yfjB*, *yfkC*, *yfkT*, *yfmG*, *yfmK*, *ygxA*, *yhdE*, *ykrS*, *ykrT*, *ykyB*, *ykzC*, *yrrU*, *ysdB*, *ytzB*, *ytzE*, *yumB*, *yusD*, *yusS*, *yutK*, *yvaM*, *ywdJ*, *ywdL*, *ywlB* und *ywmF*.

Innerhalb dieser Gruppe ist in weiteren Experimenten nach möglichen Falschnegativen zu suchen.

Zusammengefasst wurden 83% der schon bekannten generellen Stressgene durch die hier angewandten Suchkriterien verifiziert und 62 neue SigB-abhängige Gene beschrieben.

Tab. 6.3: Liste der SigB-abhängigen generellen Stressgene

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	regulatorische Region / potentielle Promotorsequenz ^c		Induktionwerte				
		Operonstruktur	bestätigt ^d	EIOH 10min / co	EIOH wt / sigB	Hitze wt/sigB	Salz wt/sigB	EIOH wt/sigB
<i>yaah</i>	cortical fragment-lytic enzyme SleL - <i>B. cereus</i> (E=e-120)	pot. <i>yaah/H</i> operon		4.3	3.3	1.9	3.0	7.4
<i>yaal</i>	isochorismatase (EntB) homolog - <i>A. fulgidus</i> (E=1e-21)	caaa GGTTTTT tcattgcctcaaaaa GGCTAC catat-N ₃₃ - TTG		16	15	2.1	3.5	19
ctc	probable ribosomal protein L25 - <i>P. aeruginosa</i> (E=1e-18)	cgag GGTTTAA atcctttatcgtttat GGTAT tgtttgtaaat (A) g		8.2	27	9.1	84	21
<i>spoVC</i>	peptidyl-tRNA hydrolase (Plh) - stageV sporulation protein C (E=1e-106)	ctc spoVC operon		+	+	2.1	3.2	2.7
<i>ybdT</i>	fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450 (CypC) (E>1e-180)	gtc GAAGA Taaactgtgaaataag GGTAA aaag-N ₁₇ - ATG		6.5	6.3	4.2	4.1	39
<i>ybyB</i>	unknown conserved protein BH2666 - <i>B. halodurans</i> (E=7e-08)	acag GGTTAG caattt.ccaaa CGGAA Tgata-N ₃₈ - ATG		40	120	53	117	273
<i>ycbK</i>	probable integral membrane protein CJ0860 - <i>C. jejuni</i> (E=2e-07)	aaag GGTTA Tttctgactgctca GGAT acgc-N ₅₅ - ATG		8.0	6.3	2.5	6.3	1.2
<i>ycbP</i>	conserved hypothetical protein YndM - <i>B. subtilis</i> (E=6e-11)	taag GGTTAA ttttt.acattt AGGAA Ttata-N ₃₄ - ATG		20	31	14	23	12
<i>ycdf</i>	glucose 1-dehydrogenase II - <i>B. megaterium</i> (E=2e-66)	tgct GGTTT Caactcogaaaa GGTAT tttc-N ₃₅ - ATG		16	15	6.3	21	191
<i>ycdG</i>	oligo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10) - <i>B. thermoglucosidasius</i> (E>1e-180)	pot. <i>ycdFG</i> operon		7.4	5.2	2.1	3.2	22
<i>nadE</i>	NH3-dependent NAD+ synthetase (EC 6.3.5.1)	tcatt GAATCA tttttccattgatt GGAAA tgatcagt (A) ata		3.2	2.3	1.4	8.7	3.1
<i>ydaD</i>	hypothetical oxidoreductase YhdF - <i>B. subtilis</i> (E=e-113)	ccat GGTAT ccaagagtggtg AGGTAC acaacaaa (TA) ga		132	110	16	59	168
<i>ydae</i>	no similarity	ydaDE operon		+	+	9.9	36	7.3
<i>ydaG</i>	probable general stress protein 26 - <i>D. radiodurans</i> (E=7e-04)	tctt GGTTAA atcttcccggatg TGAAA agtaaacag (C) gga		6.4	9.0	3.4	15	59
<i>ydap</i>	pyruvate dehydrogenase related protein - <i>T. acidophilum</i> (E=e-103)	ccgg GGTTTAA agccttctcctg GGTAT tgaaaaaa (GG) aa		22	30	9.8	18	155
<i>ydas</i>	conserved hypothetical membrane protein YwZA - <i>B. subtilis</i> (E=5e-06)	aaag GGTTTCC aaaatgatcagagc GGTAT tgat-N ₂₉ - ATG		5.3	3.2	1.4	2.7	6.7
<i>ydaT</i>	no similarity	atgc GGTTT Tattttt.cacctgc GGTAC catt-N ₂₇ - ATG		3.9	3.6	2.4	4.4	9.6
<i>gsiB</i>	embryonic abundant protein Em1 - <i>Arabidopsis. thaliana</i> (E=4e-18)	gttt GGTTAA aaagaat.tgtgagc GGAA Tacaacaac (CA) ac		61	64	16	44	263
<i>ydbD</i>	manganese-containing catalase BH2190 - <i>B. halodurans</i> (E=e-102)	tttc GGTAT ctttttt.atcgatc GGAA Tataa-N ₃₁ - ATG		83	75	9.8	18	454
<i>rsbV</i>	anti-anti-sigma factor of SigB	aaag GGTTAA acgtctgtcagacga GGTAT aaagccaact (A) g		4.8	6.0	4.6	15	12
<i>rsbW</i>	switch protein/serine kinase, anti-sigma factor of SigB	<i>rsbVW sigB/rsbX</i> operon		+	+	3.8	13	18
<i>sigB</i>	RNA polymerase general stress sigma factor	<i>rsbVW sigB/rsbX</i> operon		+	+	7.3	8.7	51
<i>rsbX</i>	PP2C-type serine phosphatase	<i>rsbVW sigB/rsbX</i> operon		+	+	15	8.2	16
<i>yfiI</i>	anion-binding protein homolog YfiE - <i>B. subtilis</i> (E>e-180)	tgtt GGTGA gccttgattttt TGAAA gaaag-N ₃₄ - ATG		5.6	12	2.3	6.8	14
<i>yfiH</i>	unknown conserved protein BH2390 - <i>B. halodurans</i> (E=5e-08)	atct GGTTCA aggtaaa.gacgatc GGTAT gaaa-N ₃₃ - ATG		105	202	58	283	646
<i>yfiA</i>	amino acid transporter BH4033 - <i>B. halodurans</i> (E=8e-68)	gcag GGTTAA ccctcccaattgtc AGTAA agca-N ₂₈ - ATG		13	5.5	2.2	2.5	11
<i>yfiKM</i>	general stress protein BH3025 - <i>B. halodurans</i> (E=3e-64)	aaag GGTTA Tgtttttccatctat GGAAA tgat-N ₂₅ - ATG		3.3	5.2	2.7	7.4	3.6
<i>yfiJ</i>	protein-tyrosine-phosphatase BH2238 - <i>B. halodurans</i> (E=5e-46)	gaat GGTTAT tttagt.gtggctg GGTAG atg-N ₃₆ - ATG		24	26	5.9	17	171
<i>yfiK</i>	no similarity	gaag GGTTCT tttttgagaaatag GGGCAA agaa-N ₁₇ - ATG		11	8.7	2.1	14	6.0
<i>yfiH</i>	hypothetical protein YfiH - <i>B. cereus</i> (E=5e-59)	pot. <i>yfiK/JH</i> operon		21	14	3.0	38	11
<i>yfiD</i>	no similarity	pot. <i>yfiK/JH</i> operon		4.3	3.3	1.3	3.7	8.5
<i>yfiE</i>	no similarity	pot. <i>yfiH/FED</i> operon		6.8	4.9	3.2	7.1	9.2
<i>yfiF</i>	no similarity	pot. <i>yfiH/FED</i> operon		2.3	2.9	1.5	2.2	4.9
<i>yfiH</i>	cell division inhibitor SLR1223 - <i>Synechocystis</i> sp. (E=6e-54)	acgc GGTTTCT ttttat.taccaatg AGTAA agta-N ₃₀ - ATG		4.0	2.8	1.9	2.7	3.9
<i>yfiK</i>	conserved hypothetical protein YwsB - <i>B. subtilis</i> (E=1e-22)	ttat GGTTG cttttgcaaac GGAA Tagga-N ₈₄ - TTG		8.5	11	7.2	52	43
<i>yfiL</i>	hypothetical protein YvaZ - <i>B. subtilis</i> (E=5e-05)	pot. <i>yfiH/KLM</i> operon		5.3	3.4	2.0	1.8	1.2
<i>yfiM</i>	epoxide hydrolase-related protein DR2549 - <i>D. radiodurans</i> (E=9e-61)	pot. <i>yfiH/KLM</i> operon		9.8	3.4	2.7	2.1	1.5
<i>yhcM</i>	Orf DG1040 (fragment) - <i>D. discoideum</i> (E=4e-06)	taacc GGTTA ttttgtctaacagag GGAAA aatat-N ₂₃ - ATG		8.9	7.3	2.1	5.6	52
<i>ygbX</i>	CmpX - <i>P. fluorescens</i> (E=6e-10)	atct GGTTG ctttttg.gataagt GGTAA aacac-N ₃₁ - TTG		27	21	6.2	18	90

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	regulatorische Region / potentielle Promotorsequenz ^c		Operon struktur		Induktionwerte						
		bestätigt ^e	EOH 10min / co	EOH wt / sigB	Hitze wt/sigB	Salz wt/sigB	rsbX/supB	EOH				
yhdF	oxidoreductase (short chain DH)(Red.)			tgccGTTTAA	tcattctctgctgTGGTAA	cggttcagct (A) tc	m	11	5.1	2.1	2.4	0.9
yhdN	probable oxidoreductase	BH1511 - <i>B. halodurans</i> (E=e-104)		aaagGTTTAA	ccattctccagagGGGAAA	agat-N ₂₅ -ATG	m	2.9	8.8	4.9	9.4	32
yheK	YxiE - <i>B. subtilis</i> (E=5e-12)			aaagGTTTAA	ttgtgtt.caaatccGGGTAG	tagt-N ₃₀ -ATG	m	8.1	13	5.1	28	33
yhxD	ribitol dehydrogenase - <i>Z. mobilis</i> (E=6e-66)			acatGTTTTT	ctgtcttatgctcagGGGTAC	acat-N ₃₅ -ATG	m	4.8	7.9	2.4	1.9	15
yitT	unknown conserved protein	BH2916 - <i>B. halodurans</i> (E= 6e-99)		tcgtGTTTCA	aatattt.gttttaaGGGAAA	acat-N ₃₀ -ATG	m	6.2	4.9	1.2	5.1	7.9
yjcE	no similarity			tgccGTTTTA	caagaaa....acacGGGTAT	cgcg-N ₁₂₂ -ATG	m	3.2	6.3	3.8	36	5.7
yjcB	no similarity			ggctGTTTAA	acaaga.agaaatggGGTAT	atct-N ₃₈ -ATG	m	37	38	4.8	12	36
yjgC	formate dehydrogenase homolog	YrhE - <i>B. subtilis</i> (E>e-180)		glatGTTTTA	ttgagttgtgtaaGGGAAC	tga-N ₄₀ -ATG	1	34	24	5.2	17	47
yjgD	conserved hypothetical protein	YrhD - <i>B. subtilis</i> (E=4e-11)					2	83	88	18	64	120
ykgA	hypothetical protein	BH1779 - <i>B. halodurans</i> (E=3e-64)		aatGTTTTAA	tgattttcatgatgaGGGAAT	aaata-N ₃₃ -ATG	m	20	26	3.8	11	6.7
ykzA	organic hydroperoxide resistance protein	Chr - <i>P. aeruginosa</i> (E=2e-21)		gcacGTTTTA	aaaagat.cagaaaGGGAA	atataacaact (A) g	m	79	147	36	162	238
yknA	putative deoxycytidylate deaminase - <i>C. arifintum</i> (E=1e-27)			gaatGTTTCT	ttgtcatt..cttttcGGCTAT	acta-N ₂₉ -ATG	m	4.1	4.1	1.4	2.0	2.1
ykuT	unknown conserved protein	BH2666 - <i>B. halodurans</i> (E=4e-72)		aaacGTTTTA	acatggtctatgacacGGTAA	actag-N ₃₈ -ATG	m	2.0	1.7	3.2	9.9	2.5
yklZ	unknown conserved protein	BH2636 - <i>B. halodurans</i> (E=2e-06)		gcgcGTTTTA	agtagaggaatgTGGTAA	ataaa-N ₁₃₉ -ATG	m	13	24	10	6.5	17
ykpP	unknown conserved protein	BH2412 - <i>B. halodurans</i> (E=2e-21)		agaaGTTTTCA	caagcttgaatTGGTAT	taca-N ₇₁ -GTTG	m	4.6	10	1.6	2.3	18
ymzB	unknown conserved protein	BH1784 - <i>B. halodurans</i> (E=5e-04)		ttccGTTTAA	aaagatgcagcaatGGGAAT	tagta-N ₂₄ -TTG	m	6.1	9.2	1.4	2.7	23
yoxC	no similarity			ttctGATTAA	aaaaaac.ggatacagGGTAA	tac-N ₂₀ -ATG	m	16	26	3.4	10	14
yocB	no similarity			tcagGTTTGA	tcgctttt.ttaagagAGGAAA	aaaga-N ₃₀ -ATG	m	29	31	12	7.4	60
yock	DnaK suppressor	DksA - <i>C. pneumoniae</i> (E=3e-16)		ccatGTTTGA	cagaag.gcaaaacGGGAAA	cagg-N ₂₀ -ATG	m	14	36	5.3	3.0	27
yocK	multidrug resistance protein			cttcGTTTAC	tgcttacagaaaaaGGGGAT	tataaaccc (A) ga	1	5.8	3.8	1.2	4.4	3.3
bmr^a	multidrug-efflux transporter			bmrU bmr bmrR operon			2	1.1	1.1	1.1	2.7	0.7
bmrR^a	transcriptional regulator (MerR family)			bmrU bmr bmrR operon			3	4.3	1.5	1.1	1.5	3.4
yqxl	Mg ²⁺ and Co ²⁺ transport protein	CorA - <i>A. aeolicus</i> (E=2e-11)		actGTTTTAG	tgagcgc.ggttattGGGCAA	tttaa-N ₃₃ -ATG	m	8.0	11	3.6	12	25
yqhB	putative membrane protein with hemolysin domain	- <i>C. jejuni</i> (E=3e-68)		acatGTTTTA	ttgagcattttccaggtTGGTAT	ggaa-N ₂₉ -ATG	m	5.2	6.7	3.0	6.0	12
yqgZ	arsenate reductase	BH3485 - <i>B. halodurans</i> (E=3e-16)		aatGTTTTAA	aatgaaaaatgatcccGGGTAG	ttat-N ₃₇ -ATG	m	5.4	101	76	257	337
bofC	forespore regulator of the sigma-K checkpoint			pot. csbX bofC operon			2	5.2	6.4	2.7	3.6	60
csbX	alpha-ketoglutarate permease			acagGATTAC	caattccagcaagcttGGGTAT	tatactccatt (G) a	1	7.9	8.9	4.0	4.3	5.1
ysnF	hypothetical protein	DR1314 - <i>D. radiodurans</i> (E=1e-13)		ttttGTTTAA	ttccaaa.gaacagcGGGAA	ttaca-N ₄₆ -ATG	m	116	194	16	40	398
ytxJ	general stress protein	BH3013 - <i>B. halodurans</i> (E=7e-11)		yxGHJ operon			3	8.8	5.6	5.4	23	5.2
ytxH	seed maturation protein	PM30 - <i>Glycine max</i> (E=6e-04)		yxGHJ operon			2	7.7	4.4	7.4	26	6.8
ytxG	general stress protein	BH3245 - <i>B. halodurans</i> (E=2e-19)		yxGHJ operon			1	7.7	5.0	10	38	5.7
dps	DNA-protecting protein			agagGTTTTA	tgattgattga.agaaaaGGGTAA	aacagcag (T) atat	m	20	47	11	111	31
yfiA	ribosomal protein	L31 - <i>B. halodurans</i> (E=9e-30)		agagGTTTTA	tgctgtg.atattaaGGGTAT	acatagctcat (A) t	m	13	25	6.1	16	1.0
ytaB	ORF168 protein	- <i>A. rubrum</i> (E=6e-07)		tgagGTTTTA	tgatgtg.aaacagagGGGAAG	gata-N ₇₅ -ATG	m	9.3	12	2.6	12	28
yugu	unknown conserved protein	BH3498 - <i>B. halodurans</i> (E=7e-22)		ggggGTTTTGA	tatttataagataaaGGGTAA	tttaa-N ₂₁ -ATG	m	3.0	3.2	1.9	3.5	3.8
yuza	hypothetical conserved protein	BH3345 - <i>B. halodurans</i> (E=7e-48)		gatGTTTTA	tttttccaaggtttaaGGGAAA	agaag-N ₁₁₃ -ATG	m	13	11	2.6	3.4	1.6
yvre	senescence marker protein	30 (SMP30-fam.) - <i>Xenopus laevis</i> (E=2e-50)		agtGTTTTG	ccacct.cttttccGGGAA	taaca-N ₃₂ -ATG	m	12	12	4.0	14	33
ywG	hypothetical 19.6 kDa protein	- <i>B. amyloliquefaciens</i> (E=1e-53)		ttgagATTAC	aaatacatgagcagGGGTAT	gcct-N ₃₆ -TTG	m	10	7.0	3.8	5.1	0.9
ywaA	hypothetical oxidoreductase	YdgJ - <i>E. coli</i> (E=2e-76)		ttagGTTTTA	ccatttggatcaggaGGGTAT	ataac-N ₃₅ -GTTG	m	10	12	6.3	13	20
ywaJ	3'-to-5' exonuclease	RNase R		ywAK yvaJ operon			2	7.1	5.1	1.7	3.0	12
ywAK	carboxylesterase precursor	(EC 3.1.1.1) - <i>B. stearothermophilus</i> (E=2-107)		aaacGTTTTT	ttctgattaaactTGGAAA	acta-N ₂₈ -ATG	1	6.6	7.8	1.5	3.5	10
gtaB	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	(EC 2.7.7.9)		aaatGTTTAA	aaaaaatattgaaaaGGGTAA	aatgtctgt (A) gt	m	5.2	4.4	2.0	6.1	4.6

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	regulatorische Region / potentielle Promotorsequenz ^c	Operon struktur	Induktionwerte				
				EtOH 10min / co	EtOH wt / sigB	Hitze wt/sigB	Salz wt/sigB	rsbX/supB
<i>ywtG</i>	D-xylose-proton symporter XylT - <i>L. brevis</i> (E= e-113)	aaagGTTTAAAtggccggaaaaagaGGCTAAaaga-N ₆₀ -ATG	m	4.7	4.5	1.8	3.5	7.9
<i>ywsB</i>	hypothetical protein YfhK - <i>B. subtilis</i> (E=2e-22)	tgatGTTTAAggaacctggataaacGTGAATagag-N ₄₂ -ATG	m	18	61	20	159	60
<i>csbD</i>	no similarity	gaatGTTTATtgctc.tcagatcGGGAAGtttaa-N ₃₄ -ATG	m	60	240	66	245	21
<i>ywmE</i>	no similarity	atgGTTTAAaaacag.tttgggcGGGATgata-N ₂₁ -ATG	m	8.4	6.5	3.1	4.1	6.3
<i>ywjC</i>	no similarity	atagGTTTACgacttgctcagctttGGGAACtttag-N ₃₆ -ATG	m	7.2	16	10	13	6.9
<i>ywiE</i>	cardiolipin synthetase BH2858 - <i>B. halodurans</i> (E=e-115)	caagGTTTATcgtattagaaaaaagAGGTTAAataca-N ₃₂ -ATG	m	2.4	2.3	1.3	2.6	2.6
<i>ywzA</i>	conserved hypothetical protein YdaS - <i>B. subtilis</i> (E=2e-06)	agtgGTTTATctttatatacaaaaaagAGGAATgata-N ₁₃₀ -ATG	m	88	140	29	208	459
<i>gspA</i>	putative glycosyl transferase LgtC - <i>P. multocida</i> (E=6e-30)	acgtGTTTATttttt.gaaaaaGGGTATgtaacttgt (A) ca	m	42	88	33	57	395
<i>yxzF</i>	no similarity	pot.yxJ yxzF Operon	2	2.6	2.3	1.6	2.0	1.3
<i>yxJ</i>	N-methylpurine-DNA glycosylase - <i>Mus musculus</i> (E=3-e21)	agccGTTTtttttttgat.ctgcttcGGGAATggat-N ₃₆ -GTG	1	4.2	3.2	1.6	3.0	5.3
<i>katX</i>	catalase X (EC 1.11.1.6)	ggctGTTTAAaaaattcttcattcaGGGAATattgttac (C) gt	m	5.2	3.8	1.6	2.0	11
<i>yxkO</i>	hypothetical protein TM0922 - <i>T. maritima</i> (E=2-e30)	ttttGTTTCAaaaagaaaggggacAGGAAAAaata-N ₂₇ -ATG	m	3.9	2.4	2.0	2.1	37
<i>yxIS</i>	no similarity	<i>katB</i> <i>yxIS</i> operon	2	3.6	4.0	3.0	7.9	9.2
<i>katB</i>	catalase 2 (EC 1.11.1.6)	agcaGTTTATatgaagaaccaccGGGTTAAatgtgctgt (A) ga	1	2.2	2.1	1.3	2.6	11
<i>csbC</i>	metabolite transport protein homolog YwtG - <i>B. subtilis</i> (E=e-115)	aaatGTTTCAaaatgagatagagaaatGGTACTtaact (A) ttaa	m	4.3	3.6	2.2	6.6	7.3
<i>yxbG</i>	probable short-chain dehydrogenase PA1649 - <i>P. aeruginosa</i> (E=1e-30)	gcacGTTTATcactgc.acatagcGGGAAGacaa-N ₂₃ -ATG	m	2.7	2.0	1.4	3.0	8.7
<i>yxnA</i>	glucose 1-dehydrogenase II (EC 1.1.1.47) - <i>B. megaterium</i> (E= 4e-24)	agggGTTAAGacccttc.cgggatggGGTAAatgta-N ₂₉ -ATG	m	4.8	3.1	1.6	3.1	23
<i>yxaB</i>	EpsL - <i>S. thermophilus</i> (E=4e-32)	caatGCATATgcccctctcttttGGGTAGagac-N ₄₅ -ATG	m	8.5	8.5	1.9	3.6	7.1
<i>yycD</i>	no similarity	gateGTTTTCGgacagtaacaaggcGGGAAAAaattg-N ₂₇ -ATG	m	33	34	8.3	14	104

^aDie Gene sind nach ihrer Reihenfolge im Genom von *B. subtilis* geordnet. In fetten Buchstaben sind die Gene hervorgehoben, die schon vor dieser DNA Makroarrayanalyse aus der Literatur als SigB-abhängig bekannt waren.

^bDie Funktion der kodierten Proteine wurde angegeben, wenn sie durch genetische oder biochemische Daten gestützt ist. Ansonsten ist der nächste Homologe des kodierten Proteins genannt. In Klammern sind die E-Werte aufgeführt, die über eine BLAST2.0-Datenbanksuche mit einer BLOSSUM 62 Matrix gegen eine nicht redundante SWALL Proteindatenbank erhalten wurden. Mit „No similarity“ sind E-Werte bezeichnet, die über e-03 lagen.

^cDie vermuteten -35 und -10 Regionen der potentiellen SigB-abhängigen Promotoren und das mögliche Startkodon sind fett hervorgehoben. Die experimentell bestimmten 5'Enden der mRNAs sind in Klammern fett angezeigt.

^dMögliche Operonstrukturen wurden aus dem Genom von *B. subtilis* abgeleitet. m= monocistronisch; die Zahl bezeichnet die Position des Gens im potentiellen Operon. Die Reihenfolge der Zahlen eines Operons zeigt die Orientierung der Gene in Bezug auf die Replikationsrichtung des Chromosoms an. Ein Plus zeigt an, dass die Operonstruktur durch einen Northernblot verifiziert war.

^eDie Spotintensitäten wurden kalkuliert, indem die normalisierten Hybridisierungssignale von individuellen Genen in den induzierten Proben oder im gestressten Wildtyp durch die relativen Intensitäten der unbehandelten Kontrollen geteilt wurden. Sie sind Durchschnittswerte aus wenigstens zwei unabhängigen Hybridisierungen. EtOH 10 min/co, die Induktionswerte stammen aus dem Vergleich zwischen RNA aus einem Wildtyp vor und nach 10 min 4% Ethanolstress (v/v); EtOH, Hitze oder Salz wt/sigB, diese Werte entstanden bei dem Vergleich der RNA aus dem Wildtyp mit der sigB- Mutante nach 10 min 4% Ethanolstress (v/v), 48° C oder 4% NaCl-Stress (w/v); EtOH rsbX/sigB, diese Werte wurden erhalten bei dem Vergleich der RNA aus der rsbX-Suppressormutante (BSA386) mit der sigB-Mutante (BSM272) nach 60 min 4% Ethanolstress (v/v).

^gGene, die innerhalb eines Operons liegen, aber nicht die strengen Expressionskriterien erfüllen, sind mit aufgeführt, wenn die flankierenden Gene ein SigB-abhängiges Expressionsmuster zeigen, oder die Struktur des Operons durch einen Northernblot bestätigt war.

Tab. 6.4: Liste der SigB-abhängigen generellen Stressgene, die einer zusätzlichen σ^B -unabhängigen Regulation unterliegen

Gen ^a	Regulatorische Region / potentielle Promotersequenz ^c		Operonstruktur	Induktionswerte ^f						
	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	(E-Wert) ^b		wt	sigB					
<i>cisR</i>	negativ transcriptional regulator of class III stress genes		tccagGTTTGTGGGccgggaaaaat GGAAAT aatgaagg (A) t (A)	EH	Hitz	Satz	Hitz	Satz		
<i>mcsA</i>	modulator of CtsR repression		<i>cisR mcsAB clipC sms yacK</i> operon	+	9.0	10	4.2	6.5	8.1	2.8
<i>mcsB</i>	modulator of CtsR repression		<i>cisR mcsAB clipC sms yacK</i> operon	+	3.3	5.4	1.9	4.3	4.4	1.5
<i>clipC</i>	class III stress response-related ATPase		<i>cisR yacHl clipC sms yacK</i> operon	+	10	16	5.4	14	15	3.4
<i>sms</i>	DNA repair protein homolog BH0104 - <i>B. halodurans</i> (E=e-178)		<i>cisR yacHl clipC sms yacK</i> operon	+	5.8	19	5.0	7.4	13	2.3
<i>yacK</i>	DNA binding prot. SCE9403 - <i>S. coelicolor</i> (E=1e-80)		<i>cisR yacHl clipC sms yacK</i> operon	+	6.2	4.6	4.2	4.5	3.0	3.2
<i>yacL</i>	put. glutamyl-tRNA-transferase - <i>L. monocytogenes</i> (E=e-108)		<i>cisR yacHl clipC sms yacK</i> operon	+	3.5	3.2	3.7	4.5	2.2	3.3
<i>yceC</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=2e-43)		tttcGGTTAAacccttatgaatcGGGTATattaatggt (G) gtt	m	2.4	3.2	2.5	2.5	2.2	1.9
<i>yceD</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=7e-63)		aaacGTATATattag. aatttacGGCTTAtttt-N ₆₁ -GTG	1	2.9	1.9	9.6	6.1	2.2	12
<i>yceE</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=1e-74)		pot. yceCDEFVGH operon	2	3.2	1.8	6.8	5.7	1.7	8.8
<i>yceF</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=4e-28)		pot. yceCDEFVGH operon	3	2.7	1.4	6.2	8.3	2.5	12
<i>yceG</i>	toxic anion resistance protein YkoY - <i>B. subtilis</i> (E=1e-125)		pot. yceCDEFVGH operon	4	2.1	1.6	5.2	4.0	1.6	7.3
<i>yceH</i>	tellurite resistance protein TelA - <i>R. sphaeroides</i> (E= 1e-30)		pot. yceCDEFVGH operon	5	2.7	3.2	6.8	4.1	3.0	7.9
<i>ycnH</i>	tellurite resistance protein TelA - <i>R. sphaeroides</i> (E= 1e-30)		pot. yceCDEFVGH operon	6	1.7	2.5	4.9	3.6	3.1	9.6
<i>yjbC</i>	succinate-semialdehyde DH GabD - <i>B. halodurans</i> (E=e-141)		aaacGATATACttttgc.tgcacagcGGGAATtaacggtta (A) tacc	m	13	6.3	4.5	11	4.0	2.0
<i>yjbD</i>	conserved protein BH2863 - <i>B. halodurans</i> (E=8e-21)		ggctGTTTAAacaaga. agaaatGGGTATatctaaaagt (A) tg	1	+	8.9	3.8	9.2	18	3.2
<i>yjvD</i>	conserved protein BH2861 - <i>B. halodurans</i> (E=1e-56)		<i>yjvCD</i> operon	2	+	4.8	2.3	2.7	5.6	4.1
<i>yjvD</i>	no similarity		tacgGTTTTTtattcatgaaaaaa AGGAAT taact-N ₄₀ -ATG	m	2.2	2.3	1.6	3.4	1.8	2.5
<i>yjvL</i>	probable hydrolase PA2934 - <i>P. aeruginosa</i> (E=2e-05)		ccctGTTCAA ta cagaa. agagctGGTAATgccc-N ₁₀₄ -ATG	m	5.1	5.6	2.0	9.4	5.2	2.8
<i>sodA</i>	superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)		gcagGTTTAA tg ggccagatattccGGTTAAagtg-N ₁₃₂ -ATG	m	5.3	3.1	3.0	5.4	3.7	1.3
<i>yraA</i>	intracellular proteinase I PfpI - <i>P. furiosus</i> (E=4e-28)		gattGATAT tt ccacattgttaataGGTTAGtcct-N ₁₁₈ -ATG	m	6.9	3.6	3.5	9.1	3.2	2.0
<i>trxA</i>	thioredoxin		tcagGTTTTAAaaccagctccggcaGGGCATgggtaagtac (A) tg	m	+	6.9	3.9	4.8	2.9	1.7
<i>yjvN</i>	putative morphine dehydrogenase YtbE - <i>B. subtilis</i> (E=e-116)		aagcGATAT TA ttgggtatcgctgagAGGAATgtga-N ₄₄ -GTG	m	3.1	6.1	2.8	7.6	7.4	2.4
<i>clipP</i>	ATP-dep. Cip protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)		gatGTTTGA acc ccctgtatttttggGAAAtgggaaaa (AG) a	m	+	2.6	17	5.1	4.9	18
<i>yjvD</i>	ribosomal protein S30AE family - <i>B. halodurans</i> (E=7e-62)		ttatGTTTCA gc caggaaattgttaaaGGGTAAaagagaaat (A) ga	m	+	4.6	2.1	2.0	8.5	0.5

^aDie Gene sind nach ihrer Reihenfolge im Genom von *B. subtilis* geordnet. In fetten Buchstaben sind die Gene gekennzeichnet, die schon vor dieser DNA-Makroarrayanalyse aus der Literatur als SigB-abhängig bekannt waren.

^bDie Funktion der kodierten Proteine wurde angegeben, wenn sie durch genetische oder biochemische Daten gestützt ist. Ansonsten ist der nächste Homologe des kodierten Proteins genannt. In Klammern sind die E-Werte angegeben, die über eine BLAST2.0-Datenbanksuche mit einer BLOSSUM 62 Matrix gegen eine nicht redundante SWALL Proteinatendatenbank erhalten wurden. Mit „No similarity“ sind E-Werte bezeichnet, die über e-03 lagen.

^cDie vermuteten -35 und -10 Regionen der potentiellen SigB-abhängigen Promotoren und das mögliche Startkodon sind fett hervorgehoben. Die experimentell bestimmten 5'Enden der mRNAs sind in Klammern fett angezeigt.

^dMögliche Operonstrukturen wurden aus dem Genom von *B. subtilis* abgeleitet. m= monocistronisch; Die Zahl bezeichnet die Position des Gens im potentiellen Operon. Die Reihenfolge der Zahlen eines Operons zeigt die Orientierung der Gene in Bezug auf die Replikationsrichtung des Chromosoms an.

^eEin Plus zeigt an, dass die Operonstruktur durch einen Northernblot verifiziert wurde.

^fDie Spotintensitäten wurden kalkuliert, indem die normalisierten Hybridisierungssignale von individuellen Genen in den induzierten Proben des gestressten Wildtyps oder der sigB-Mutante durch die relativen Intensitäten der unbehandelten Kontrollen geteilt wurden.

6.1.6. Genomweite Clusteranalyse der Stressantwort in *Bacillus subtilis*

Die genomweite Clusteranalyse in Abb. 6.6 zeigt, dass Gene, die einer gemeinsamen Regulation unterliegen, sehr ähnliche Expressionsmuster haben und sich daher in Gruppen zusammenfassen lassen. In diesem Cluster (Abb. 6.6) ist die Standardkorrelation der Expressionsmuster aller 4107 Gene von *B. subtilis* nach Ethanol-, Salz- und Hitzestress wiedergegeben. Die Farben dokumentieren die Expressionshöhe jedes einzelnen Gens in den verschiedenen Vergleichen. Grün deutet auf eine niedrige Expression und rot auf ein hohes Expressionsniveau hin. Die Vergrößerungen belegen, dass Gene, wie *gsiB*, *ywzA*, *csbX*, *bofC* und *ydbD*, bei den angewandten Kultivierungsbedingungen das gleiche Expressionsmuster zeigen. Alle diese Gene werden durch den generellen Stresssigmafaktor SigB reguliert. Aber nicht nur für das SigB-Regulon lässt sich eine Clusterbildung belegen. Auch andere globale Regulatoren, wie der ECF-Sigmafaktor SigW, manifestieren den Eindruck, dass

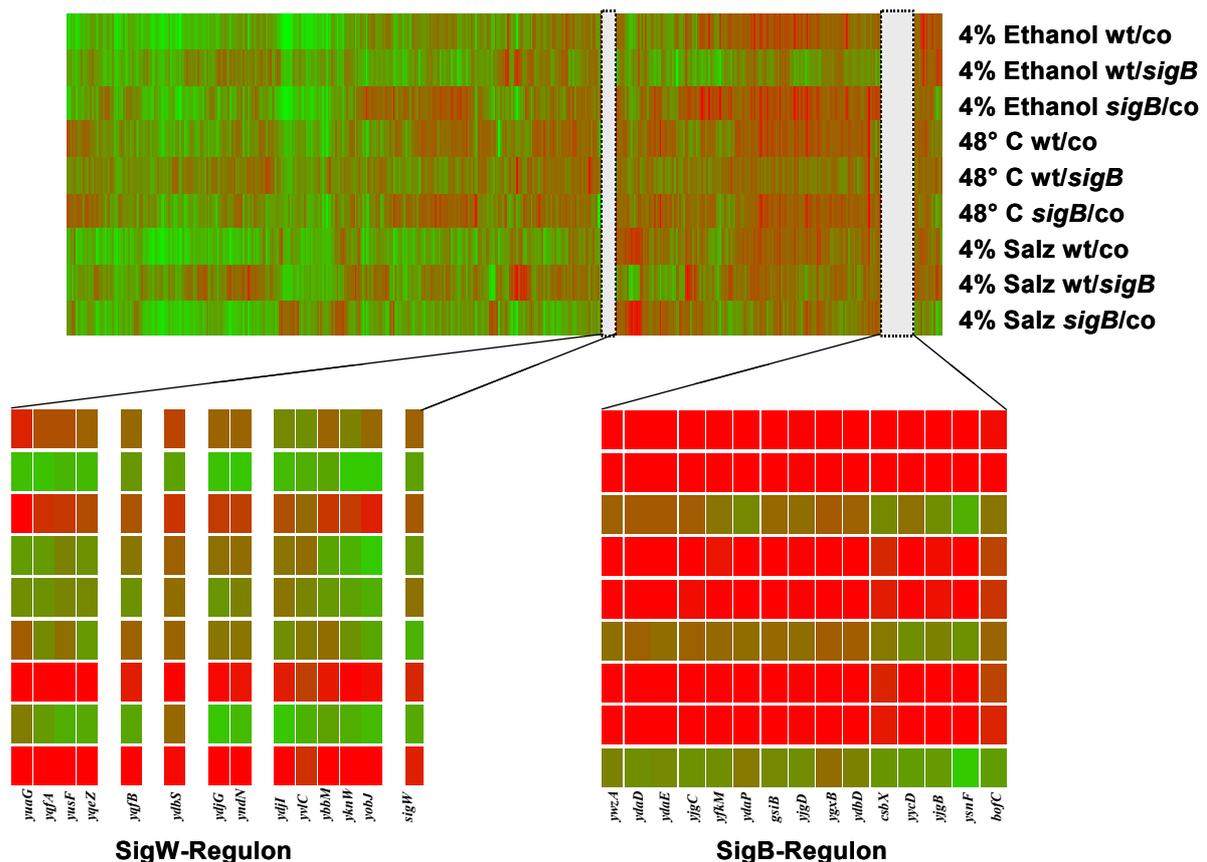


Abb. 6.6: Genomweite Clusteranalyse der Expression für die 4107 Gene von *B. subtilis*. Die einzelnen Gene sind nach der Ähnlichkeit ihres Expressionsniveaus unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen geordnet (Standardkorrelation). Der Farbverlauf von grün (niedrig) nach rot (hoch) spiegelt die Expressionsstärke der einzelnen Gene wider. Die SigB-abhängigen generellen Stressgene zeigen eine hohe Ähnlichkeit in der Expression unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen 4% Ethanol, Hitze (48 °C) und 4% NaCl. Auch andere Gene, die einer gemeinsamen Regulation unterliegen, liegen in einer Gruppe, wie die Gene, die durch den ECF-Sigmafaktor SigW reguliert werden.

Gene, die einer gemeinsamen Kontrolle unterliegen, ein einheitliches Expressionsmuster aufweisen (Abb. 6.6)

6.1.7. Charakterisierung der SigB-unabhängigen Stressgene

Die Clusteranalyse weist ebenfalls darauf hin, dass diese Arrayanalyse auch ein umfassendes Bild der SigB-unabhängigen Stressantwort von *B. subtilis* nach Ethanol-, Hitze- und Salzstress zeichnet. So ist zu erkennen, dass auch viele Stressgene in der *sigB*-Mutante nach der Einwirkung von Stress teilweise sogar stärker induziert wurden als im Wildtyp. Die Verteilung der Stressgene im Venndiagramm (Abb. 6.7) dokumentiert, dass es nicht nur Gene gibt, die spezifisch durch einen der Stressoren Ethanol, Salz oder Hitze induziert wurden. So zeigten sieben dieser SigB-unabhängigen Stressgene im Wildtyp und in der *sigB*-Mutante mindestens eine zweifache Induktion durch alle drei Stressarten. Der Mechanismus für die Induktion dieser Stressgene ist bisher unklar, genauso wie die biochemische Funktion der meisten ihrer Genprodukte.

Insgesamt 17 Gene wurden wenigstens 2,5fach nach Hitze und Ethanol induziert. Dazu gehören auch die Operons der Klasse I-Hitzeschockproteine GroEL und Dnak, die beide von dem HrcA-Repressorprotein kontrolliert werden. Das Signal für die Induktion dieser Operons ist die Akkumulation falschgefalteter und denaturierter Proteine. Die Funktion und der Induktionsmechanismus für die weiteren Mitglieder dieser Gruppe sind bisher nicht bekannt.

Interessanterweise wurden keine Gene gefunden die gemeinsam nach Salz- und Ethanolstress bzw. nach Salz- und Hitzestress induziert waren. Dieser Befund impliziert, dass Ethanol und Hitze ähnliche, zelluläre Signale produzieren könnten.

Nach 4% Ethanolstress konnte eine neue Gruppe von spezifischen Stressgenen definiert werden, da bisher keine Gene beschrieben wurden, die nur nach Ethanolstress induziert wurden. Dieser Kreis umfasst 16 Gene, die im Wildtyp und in der *sigB*-Mutante wenigstens dreifach induziert waren. Die meisten Gene dieser Gruppe zeigen keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Genen. Auch der Induktionsmechanismus und die Funktion bei der Adaptation an Ethanolstress muss erst noch analysiert werden. Die einzigen ethanolinduzierten Gene mit bekannter Funktion *ureAB* unterliegen einer komplexen Kontrolle. Ein 10minütiger Hitzeschock von 48 °C führte zu einer spezifischen Induktion von insgesamt sieben Genen, die mindestens 2,5fach induziert wurden. Als einziges bekanntes Gen fällt *clpE* in diese Klasse. Es gehört zu den Klasse III-Hitzeschockproteinen, die alle durch das Repressorprotein CtsR kontrolliert werden.

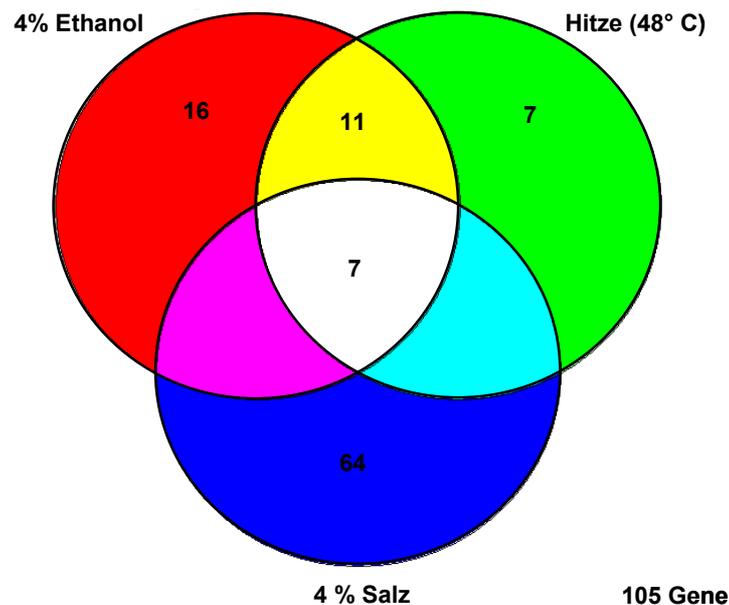


Abb. 6.7: Schematische Darstellung SigB-unabhängiger Stressgeninduktion. Das Venndia-gramm zeigt, wieviele SigB-unabhängige Stressgene durch die Stimuli 4% Ethanol, Hitze 48 °C und 4% Salz induziert werden.

Die anderen Klasse III-Hitzeschockproteine werden außer über CtsR zusätzlich von SigB kontrolliert und sind in Tab. 6.4 aufgezählt.

Die größte Gruppe der stressspezifisch induzierten Gene wurde nach 4% Salzstress ermittelt. Insgesamt 64 Gene zeigten wenigstens eine dreifache Induktion im Wildtyp und in der *sigB*-Mutante, nachdem die Zellen einer Salzkonzentration von 4% für 10 min ausgesetzt waren. Neben den osmoregulierten Operons der ABC-Transportersysteme OpuA, OpuB, OpuC, und den Prolinsyntheseenzymen ProH und ProJ (Bremer and Krämer, 2000), wurde ebenfalls das *gbsAB*-Operon nach Salzstress induziert. Dieses Operon kodiert die Enzyme für die Umwandlung von Cholin in die osmoprotektive Substanz Glyzinbetain (Boch *et al.*, 1996).

Die überraschendste Entdeckung bei der Analyse der salzspezifisch induzierten Gene war die Induktion des kompletten SigW-Regulons. SigW gehört zu den sieben ECF-Sigmafaktoren von *B. subtilis*, die durch extrazytoplasmatische Signale aktiviert werden und hauptsächlich Gene mit einer Funktion bei der Sekretion und Aufnahme von Molekülen regulieren (Glaser *et al.*, 1993).

Da in dieser Studie nur die stressabhängige Induktion nach Ethanol-, Salz- und Hitzeeinfluss untersucht wurde und die anderer Stressoren, wie Säure, NaOH oder Glukoselimitation vernachlässigt wurde, muss davon ausgegangen werden, dass noch weitere Überlappungen in der Induktion der Stressgene existieren. Somit ist die

Bezeichnung der stressspezifischen Induktion nicht exklusiv zu verstehen, sondern auf die hier durchgeführte Analyse anzuwenden. So werden die Alkylhydroperoxidreduktasegene *ahpF* und *aphC* auch durch Peroxid induziert (Antelmann *et al.*, 1996).

Insgesamt wurden 105 SigB-unabhängig induzierte Stressgene nach der Einwirkung von Ethanol, Salz und Hitze gefunden, die in Tab. 6.5 zusammengestellt sind.

Tab. 6.5 Induktion von σ^B -unabhängigen Stressgenen in *B. subtilis*

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	Regulator/ Sigmafaktor ^c	Operon struktur	Induktionwerte ^d						
				wt	sigB					
				EtOH	Hitze	Salz	EtOH	Hitze	Salz	
Anschaltung nach EtOH-, Hitze- und Salzschock – unabhängig von SigB										
<i>murG</i>	undecaprenyl-PP-MURNAC-pentapeptide-UDPGLCNAC GLCNAC transferase									
<i>sacC</i>	levanase (EC 3.2.1.65)	CcpA LevR	m	2.5	2.7	2.3	2.9	2.2	2.5	
<i>yugJ</i>	butanol dehydrogenase (EC 1.1.1.-) - <i>C. acetobutylicum</i> (E=1e-97)		m	3.2	4.4	3.2	4.1	4.4	4.9	
<i>yutG</i>	low temperature requirement C protein - <i>B. halodurans</i> (E=4e-51)		m	3.7	6.7	5.1	6.3	5.0	2.7	
<i>ywoA</i>	probable bacitracin transport permease BcrC - <i>B. licheniformis</i> (E=4e-17)		m	2.2	8.4	3.9	3.0	7.6	2.4	
<i>ywnF</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=6e-05)		m	2.5	3.1	2.0	4.1	2.5	2.4	
<i>ywaC</i>	GTP pyrophosphokinase - <i>B. halodurans</i> (E=4e-36)		m	4.7	5.0	5.9	6.0	3.5	3.1	
				2.4	3.2	2.3	4.3	2.9	5.1	
Anschaltung nach EtOH-, Hitzeschock – unabhängig von SigB										
<i>groES</i>	class I heat-shock protein (chaperonin)	HrcA	1	7.2	11	1.0	16	16	1.6	
<i>groEL</i>	class I heat-shock protein (chaperonin)		2	5.0	14	1.3	11	18	1.9	
<i>yhfA</i>	transporter – <i>B. cereus</i> (E=e-115)		2	2.5	3.7	1.3	2.8	3.4	1.3	
<i>yhfI</i>	metal-dependent hydrolase – <i>B. cereus</i> (E=2e-79)		1	2.6	2.7	1.1	3.4	2.6	0.8	
<i>yhfJ</i>	lipote-protein ligase - <i>B. halodurans</i> (E=e-136)		2	2.8	3.2	1.2	3.3	2.8	0.8	
<i>yhfK</i>	unknown conserved protein BH1520 - <i>B. halodurans</i> (E=3e-32)		3	3.3	3.0	1.9	5.2	2.8	1.3	
<i>yitW</i>	dTDP-4-keto-l-rhamnose reductase RmlD - <i>S. mutans</i> (E=3e-31)		m	3.2	2.9	1.2	4.0	2.7	1.2	
<i>yjbG</i>	oligopeptidase F homolog - <i>B. subtilis</i> (E>3e-180)		m	4.3	4.1	1.8	4.6	2.8	1.2	
<i>ykuV</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=1e-59)		m	2.6	3.1	1.3	2.5	2.6	0.8	
<i>yoeB</i>	NADH dehydrogenase – <i>B. cereus</i> (E=4e-59)		m	7.4	20	1.5	17	6.0	0.7	
<i>yqkF</i>	oxidoreductase BH1011 - <i>B. halodurans</i> (E=e-102)		m	6.7	4.0	1.8	6.9	2.8	1.1	
<i>yqiG</i>	NADH oxidase - <i>T. brockii</i> (E=2e-45)		m	2.5	4.6	1.7	5.1	5.4	1.6	
<i>hrcA</i> ⁹	transcriptional repressor of class I heat-shock genes	HrcA	1	5.2	7.8	5	6.8	7.6	8.6	
<i>grpE</i>	heat-shock protein (HSP-70 cofactor)		2	2.8	3.9	1.8	4.9	4.3	2.8	
<i>dnaK</i> ⁹	molecular chaperone		3	1.4	5.5	1.8	3.2	6.4	3.7	
<i>yvrD</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase - <i>S. meliloti</i> (E=1e-30)		m	3.1	4.8	2.4	4.0	4.3	1.5	
<i>ioIS</i>	ion channel homolog YccK - <i>B. subtilis</i> (E=3e-94)		m	2.6	3.1	1.8	3.9	3.2	1.0	
Anschaltung nach Hitzeschock – unabhängig von SigB										
<i>ycnD</i>	NADPH-flavin oxidoreductase - <i>B. halodurans</i> (E=4e-49)		m	1.4	4.1	2.1	1.9	4.1	1.6	
<i>yjeA</i>	peptidoglycan GlnAC deacetylase - <i>S. pneumoniae</i> (E=1e-48)		m	0.6	6.2	0.6	0.9	6.6	0.7	
<i>clpE</i>	ATP-dependent Clp protease-like (class III stress gene)	CtsR	m	1.0	12	1.2	2.3	15	4.4	

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	Regulator/ Sigmafaktor ^c	Operon struktur	Induktionwerte ^d					
				EtOH	Hitze	Salz	sigB		
<i>yjyM</i>	NADH oxidase - <i>B. halodurans</i> (E=e-126)		m	1.6	6.5	1.4	2.3	5.4	1.1
<i>yrkF</i>	ORF H0532 - <i>Halobacterium</i> sp. (E=5e-13)		3	1.2	9.0	2.8	5.7	6.1	1.8
<i>yrkE</i>	hypothetical protein - <i>S. aureus</i> (E=5e-36)		2	1.0	4.7	2.2	3.1	3.5	1.2
<i>yrkD</i>	hypothetical protein - <i>S. aureus</i> (E=5e-14)		1	0.8	3.5	1.5	2.8	3.4	1.1
Anschaltung nach EtOH – unabhängig von SigB									
<i>ygaC</i>	ABC-transporter (ATP-binding protein) <i>O. iheyensis</i> (E=e-107)		m	3.1	1.2	2.3	3.2	1.2	2.8
<i>yhcX</i>	nitrilase-related protein - <i>D. radiodurans</i> (E=1e-32)		2	3.8	2.5	2.2	3.9	1.8	1.2
<i>yhgB</i>	no similarity		1	3.4	1.1	2.0	3.7	1.0	1.7
<i>ykgB</i>	hypothetical protein YadB - <i>L. lactis</i> (E=1e-60)		m	4.9	1.9	1.6	3.8	1.8	0.7
<i>yktC</i>	myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase homolog - <i>B. subtilis</i> (E=e-153)		1	3.4	1.6	2.7	3.4	1.3	1.1
<i>yplA</i>	alpha-acetolactate synthase Als - <i>L. lactis</i> (E=9e-34)		1	4.2	2.2	1.9	6.7	1.0	1.8
<i>yzfF</i>	no similarity		1	3.2	1.9	2.3	3.7	1.8	2.1
<i>yrzG</i>	no similarity		2	3.1	1.6	2.6	5.6	1.7	2.4
<i>yfkL</i>	lactamase B (metallo-lactamase superfamily) – <i>B. anthracis</i> (E=1e-94)		m	3.8	2.4	2.0	3.1	1.3	0.9
<i>ytxK</i>	adenine-specific methyltransferase – <i>B. cereus</i> (E=4e-91)		m	3.6	1.2	0.9	5.9	1.3	0.7
<i>yuaE</i>	no similarity		m	4.3	2.5	2.2	6.5	1.9	1.5
<i>yvqH</i>	phage shock protein A - <i>E. coli</i> (E=8e-07)		2	3.6	1.1	0.6	2.3	1.2	0.9
<i>yvqI</i>	no similarity		1	3.4	1.6	1.3	1.6	1.5	0.9
<i>yvgW</i>	cation-transporting ATPase, P-type (PacS) PAB0626 - <i>P. abyssi</i> (E=0.0)		m	3.5	1.4	1.0	4.0	1.6	0.8
<i>ureB</i>	urease (gamma subunit) (EC 3.5.1.5)	SigA SigH	1	3.8	0.8	0.8	3.2	0.7	0.6
<i>ureA</i>	urease (beta subunit) (EC 3.5.1.5)	CodY GlnR TnrA	2	4.4	1.3	1.4	3.5	1.0	0.9
Anschaltung nach Salzschock – unabhängig von SigB									
<i>yaaN</i>	tellurite resistance protein - <i>R. sphaeroides</i> (E=2e-50)	SigW	2	1.4	1.3	4.7	2.2	1.2	5.7
<i>sigW</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor	SigW	1	1.3	0.8	3.3	1.4	0.7	3.7
<i>ybbM</i>	anti-sigmafactor of SigW		2	1.2	0.6	4.2	2.7	1.2	8.6
<i>ybfA</i>	ribosomal protein S18 alanine acetyltransferase homolog - <i>A. fulgidus</i> (E=1e-06)		m	2.2	1.9	3.7	3.8	2.1	6.0
<i>opuAA^g</i>	glycine betaine ABC transporter (ATP-binding protein)	SigA	1	0.3	0.4	2.2	0.6	0.4	3.6
<i>opuAB^g</i>	glycine betaine ABC transporter (permease)		2	0.8	0.9	1.9	0.7	0.7	2.9
<i>opuAC</i>	glycine betaine ABC transporter (glycine betaine-binding protein)		3	0.3	0.6	3.2	0.6	0.5	4.0
<i>ydbS</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=3e-28)	SigW	1	2.1	1.3	6.7	2.8	1.3	5.3
<i>ydbT</i>	unknown conserved protein BH1721 - <i>B. halodurans</i> (E=9e-68)		2	1.4	0.8	7.1	2.2	0.7	4.9
<i>ydjF</i>	phage shock protein A - <i>D. radiodurans</i> (E=4e-20)	pot. SigW	m	2.3	0.9	9.1	3.9	1.1	14
<i>ydjG</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=6e-74)	pot. SigW	1	1.2	1.1	5.5	2.4	1.3	9.6
<i>ydjH</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=2e-11)		2	1.5	1.5	3.0	1.8	1.3	4.5

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	Regulator/ Sigmafaktor ^c	Operon struktur	Induktionwerte					
				FOH	Hitz	Salz	FOH		
				wt					
				sigB					
			Northerngesagt ^d	FOH	Hitz	Salz	FOH	Hitz	Salz
			bestätigt ^e						
<i>gbsB</i> ^g	alcohol dehydrogenase	SigA	2	+ 1.0	1.1	2.0	1.0	1.2	3.8
<i>gbsA</i>	glycine betaine aldehyde dehydrogenase		1	+ 1.0	1.7	4.6	1.2	2.1	15
<i>mrpB</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter BH1318 - <i>B. halodurans</i> (E=2e-26)		m	0.8	1.7	3.1	0.7	1.6	6.9
<i>opuBD</i> ^g	choline ABC transporter (membrane protein)	SigA	4	+ 1.2	1.2	2.6	0.9	1.2	4.2
<i>opuBC</i> ^g	choline ABC transporter (choline-binding protein)		3	+ 0.6	0.7	2.9	0.8	1.0	9.4
<i>opuBB</i>	choline ABC transporter (membrane protein)		2	+ 0.9	1.0	3.0	1.0	1.0	5.3
<i>opuBA</i>	choline ABC transporter (ATP-binding protein)		1	+ 0.5	0.7	3.3	0.7	1.0	12
<i>opuCD</i> ^g	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)	SigA	4	+ 4.3	0.8	2.6	0.3	0.8	3.2
<i>opuCC</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (binding protein)		3	+ 0.3	0.7	15	0.5	1.0	28
<i>opuCB</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)		2	+ 0.7	0.9	9.8	1.2	1.1	16
<i>opuCA</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)		1	+ 0.4	0.9	13	0.4	0.9	15
<i>yvID</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=4e-23)	SigW	4	1.5	1.2	6.0	2.7	1.3	9.3
<i>yvIC</i> ^g	unknown conserved protein BH3592 - <i>B. halodurans</i> (E=3e-11)		3	0.9	1.3	2.3	1.2	1.1	2.9
<i>yvIB</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=4e-63)		2	2.7	1.3	7.2	3.4	1.2	11
<i>yvIA</i>	no similarity		1	2.0	1.3	6.1	3.1	1.3	9.2
<i>yxJl</i>	hypothetical protein SCGD3.06 - <i>S. coelicolor</i> (E=2e-05)	SigW	m	1.1	0.5	3.2	1.2	0.6	4.8
<i>ahpF</i>	alkyl hydroperoxide reductase (large subunit) (EC 1.6.99.3)	SigA	2	+ 0.9	1.7	3.7	1.0	1.6	3.6
<i>ahpC</i> ^g	alkyl hydroperoxide reductase (small subunit) (EC 1.6.4.-)		1	+ 0.7	2.1	2.8	1.0	2.0	3.4

^aDie Gene sind nach ihrer Reihenfolge im Genom von *B. subtilis* geordnet. In fetten Buchstaben sind die Gene gekennzeichnet, deren Induktion durch den zugeordneten Stimulus schon bekannt war.

^bDie Funktion der kodierten Proteine wurde angegeben, wenn sie durch genetische oder biochemische Daten gestützt ist. Ansonsten ist der nächste Homologe des kodierten Proteins genannt. In Klammern sind die E-Werte aufgeführt, die über eine BLAST2.0-Datenbanksuche mit einer BLOSSUM62 Matrix gegen eine nicht redundante SWALL Proteindatenbank erhalten wurden. Mit „No similarity“ sind E-Werte bezeichnet, die über e-03 lagen.

^cMögliche Operonstrukturen wurden aus dem Genom von *B. subtilis* abgeleitet. m= monocistronisch; die Zahl bezeichnet die Position des Gens im potentiellen Operon. Die Reihenfolge der Zahlen eines Operons zeigt die Orientierung der Gene in Bezug auf die Replikationsrichtung des Chromosoms an.

^dEin Plus zeigt an, dass die Operonstruktur durch einen Northernblot verifiziert wurde.

^eDie Spotintensitäten wurden kalkuliert, indem die normalisierten Hybridisierungssignale von individuellen Genen in den induzierten Proben vom gestressten Wildtyp oder der sigB-Mutante durch die relativen Intensitäten der unbehandelten Kontrollen geteilt wurden. Sie sind Durchschnittswerte aus wenigstens zwei unabhängigen Hybridisierungen.

^fGene, die innerhalb eines Operons liegen, aber nicht die strengen Expressionskriterien erfüllen sind mit aufgelistet, wenn die flankierenden Gene ein SigB-abhängiges Expressionsmuster zeigen, oder die Struktur des Operons durch einen Northernblot bestätigt war.

6.1.8. Mögliche Lokalisation der spezifischen und generellen Stressproteine

Die Lokalisation eines Proteins ist wichtig für seine Funktion im Organismus. Basierend auf der „dense-alignment-surface“-Methode bzw. der THHMM-Methode von Sonnhammer *et al.* (1998) und dem SignalP-Algorithmus von Nielsen *et al.* (1997) wurde eine Vorhersage der Lokalisation der identifizierten spezifischen und generellen Stressproteine versucht. Alle aufgeführten Transmembrandomänen wurden sowohl in der THHMM-Methode als auch mit der „dense-alignment-surface“-Methode gefunden. Die mit dem SignalP-Algorithmus gefundenen Signalsequenzen mussten in der Veröffentlichung von Tjalsma *et al.* (2000) über das Sekretom von *B. subtilis* bestätigt sein. Die Analysen zur Lokalisationsvorhersage der Stressproteine sind in den Tab. 6.6 und 6.7 zusammengefasst.

Unter den generellen Stressproteinen wurden 25 Proteine gefunden, die wenigstens eine potentielle Transmembranhelix hatten. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass SigB auch an der Aufrechterhaltung der Membranintegrität während des Einflusses von Stress beteiligt ist. In der Sequenz von sechs generellen Stressproteinen wurde eine Signalsequenz gefunden. Bei vier dieser Proteine handelt es sich um mögliche Lipoproteine, die wahrscheinlich außen an der Zytoplasmamembran befestigt sind. Während die zwei anderen Proteine BofC und YjgB sekretiert zu werden scheinen.

Die meisten der 31 spezifischen Stressproteine mit transmembranspannenden Domänen wurden nach Salzstress induziert. Unter diesen 27 spezifischen Stressproteinen mit Transmembrandomänen werden 18 Gene durch den ECF-Sigmafaktor SigW reguliert. Dazu gehören der in der Membran verankerte Antisigmafaktor YbbM und die potentielle Permease YthQ mit acht möglichen Transmembrandomänen.

Tab. 6.6: Vorhergesagte extrazelluläre spezifische und generelle Stressproteine

Proteinklasse	Proteine ^a
Vorhergesagte Lipoproteine	SacC, YfhK^b , YobJ, YoxC , YpuA, YvgO , YwsB , YvIA
Vorhergesagte extracelluläre Proteine	BofC , OpuAC, OpuBC, OpuCC, YjgB , YknX

^aAlle Proteinsequenzen der stressinduzierten Gene wurden unter Anwendung des SignalP-Algorithmus auf potentielle Signalsequenzen überprüft. Zusätzlich wurden die gefundenen möglichen extrazellulären Proteine mit der veröffentlichten, genomweiten Analyse über das Sekretom von *B. subtilis* von (Tjalsma *et al.*, 2000) verglichen.

^bFett gedruckt sind die Proteine hervorgehoben, die eine SigB-abhängige Synthese zeigen.

Tab. 6.7: Spez. und generelle Stressproteine mit potentiellen membranspannenden Domänen

MSD ^a	Proteine ^b
1	YbbM, YbyB^c , YdjG, YpuD , YqfB, YtxG , YtxH , YuaG, YviC, YxzE
2	YdbS, YdjH, YfhL , YjcE , YobJ, YqfA, YqxL , YrvD , YteJ, YuzA , YviA, YxiS
3	YdaS , YkuT , YrkA, YuaF, YviD, Yvql, YwrE
4	MrpB, YcbP , YfiA , YknZ, YqeZ, YqhB , YwoA
5	OpuBB, OpuCB, OpuCD, YdbT, YfnI , YitT , YknW, YtaB
6	YfkH
7	YvgW
8	YceF , YthQ
11	YdaR, YgxB , YhaU, YhfA, YwtG
12	Bmr , CsbC , CsbX

^aDie Anzahl der membranspannenden Helices (MSD) wurde entweder durch die „dense alignment surface“-Methode oder einer von Sonnhammer *et al.* (1998) eingeführten Methode, die auf einem „hidden markov“ Modell basiert, bestimmt.

^bProteine, die nur eine oder zwei potentielle Transmembrandomänen enthalten, wurden nur dann als mögliche Membranproteine bezeichnet, wenn die membranspannenden Helices durch beide Algorithmen vorhergesagt wurden.

^cMit fetten Buchstaben sind die Proteine hervorgehoben, die eine SigB-abhängige Synthese zeigen.

Das SigW-abhängige Protein YobJ scheint für ein Lipoprotein zu kodieren und das Protein YknX ist ein mögliches extrazelluläres Protein. Die beschriebenen putativen Funktionen einiger Stressgene unterstützten die Ergebnisse der Lokalisationsanalyse der Stressproteine. Somit untermauern diese Befunde, dass das SigW-Regulons an der Detoxifizierung der Zelle beteiligt ist.

6.1.9. Charakterisierung der salzinduzierten Aktivierung des ECF-Sigmafaktors SigW und seines kompletten Regulons

Die Aktivierung des ECF-Sigmafaktors SigW nach 4% Salzstress war die überraschendste Entdeckung bei der Analyse der SigB-unabhängigen Stressantworten. Die Rolle der ECF-Sigmafaktoren in *B. subtilis* ist noch nicht gut verstanden und bis zu diesem Zeitpunkt war nur bekannt, dass Alkalistress die Induktion des SigW-Regulons stimuliert (Wiegert, 2001). Deshalb hatten wir großes Interesse daran, die durch salzinduzierte Expression des SigW-Regulons genauer zu charakterisieren. Anhand der Transkriptomdaten über die Stressantwort von *B. subtilis* nach Einfluss von Ethanol, Hitze und Salz, wurde mit Hilfe der bekannten und schon auf den Arrays lokalisierten SigW-abhängigen Gene ein Induktionsprofil für SigW-abhängige Gene erstellt (Abb. 6.8). Dabei lies sich erkennen, dass die Induktion in der *sigB*-Mutante nach 4% Salzstress im Vergleich zum Wildtyp leicht stärker war. Dies kann mit der fehlenden Konkurrenz von SigB und SigW um die RNA-Polymerase erklärt werden. Zudem war zu sehen, dass auch nach 4% Ethanolstress eine geringe Induktion des SigW-Regulons stattfand. Allerdings wurden nicht alle SigW-abhängigen Gene durch Ethanol induziert.

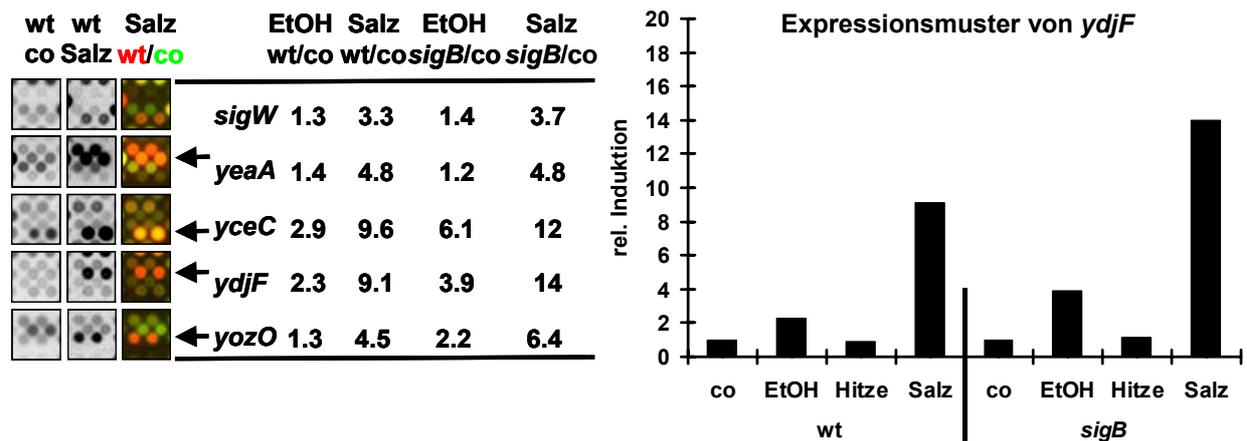


Abb. 6.8: Induktionsmuster des SigW-Regulons. Die Makroarrayausschnitte und die Falschfarbendarstellungen aus Hybridisierungen mit radioaktiv markierter cDNA von exponentiell wachsenden Wildtypzellen (wt co; grün) und mit 4% NaCl-gestressten Zellen (wt Salz; rot) demonstrieren die Induktion der Expression von *sigW* und Mitgliedern des SigW-Regulons. Zusätzlich sind die ermittelten Induktionsfaktoren für die Stimuli EtOH wt/co, Salz wt/co, EtOH *sigB*/co und Salz *sigB*/co angegeben. Die Abkürzung co steht hier für den unbehandelten Wildtyp (BSM 46) bzw. die unbehandelte *sigB*-Mutante (BSM 272). Das Diagramm zeigt das aus den ermittelten Induktionswerten abgeleitete Expressionsmuster für das SigW-Regulon am Beispiel von *ydjF*, welches zur Identifizierung weiterer SigW-abhängiger Gene verwendet wurde.

Daher ist nicht auszuschließen, dass die ethanolbedingte Induktion einiger SigW-abhängiger Gene einer zusätzlichen SigW-unabhängigen Kontrolle unterliegt. Deshalb wurde hier nur von einer salzabhängigen Aktivierung des ECF-Sigmafaktors SigW ausgegangen. Anhand des erarbeiteten Induktionsmusters wurden die Arraydaten nach weiteren Mitgliedern des SigW-Regulon untersucht. Außerdem wurde eine Analyse nach dem Muster des SigB-Promotors durchgeführt. Für die Formulierung einer SigW-abhängigen Konsensussequenz wurden 17 experimentell bestätigte SigW-abhängige Promotoren analysiert (Tab. 6.8). Danach wurde wieder das komplette Genom von *B. subtilis* auf diese Konsensussequenz hin untersucht (Abb. 6.9). Auch bei dieser Promotorsuche durften die potentiellen –35 und –10 Boxen höchstens 200 bp vom Translationsstart entfernt sein. Somit wurden in dieser Studie Gene, die im Wildtyp und in der *sigB*-Mutante nach 4% Salzstress wenigstens eine Induktion von 2,3 zeigten und vor denen ein potentieller SigW-abhängiger Promotor lokalisiert war, als SigW-abhängig definiert. Insgesamt konnten 44 SigW-abhängige Gene gefunden werden, die nach Salzstress induziert waren (Tab 6.9). Neben 24 schon zuvor beschriebenen Mitgliedern des SigW-Regulons, wurden 20 weitere Gene als SigW-abhängig charakterisiert. Die meisten Gene dieser Gruppe codieren für potentielle Transporter oder Resistenzgene, wie das *ythQP*-Operon oder *ydjP*. Diese möglichen Funktionen stützen die These, dass das SigW-Regulon neben der Produktion von Antibiotika, auch an der Detoxifizierung der Zelle beteiligt ist.

Tab. 6.8: Promotorsequenzen von SigW-abhängigen Genen

GEN	-35	Spacer	-10
<i>xpaC</i>	aaga (TGAAAC)	ttgtttaaggattgaa-	(CGTA) gtag
<i>sigW</i>	aaat (TGAAAC)	cttttgaaacgaagct-	(CGTA) taca
<i>ydbS</i>	agaa (cGAAAC)	ctttctgtaaaagaga-	(CGTA) taaa
<i>ydjF</i>	aaag (TGAAAC)	ttttaacgataataaat	(aGTA) tatg
<i>yeaA</i>	ttta (TGAAAC)	ctttggccctatttat-	(CGTA) ttac
<i>yjoB</i>	ggga (TGAAAC)	aaaatgctatgtcaat-	(CGTA) tata
<i>yknW</i>	aaca (TGAAAC)	tttttgatatccttcc-	(CGTA) ctat
<i>yndN</i>	tgta (TGAAAC)	tttcttatgaaaaagt	(CGTA) tatg
<i>yoaF</i>	ataa (TGAAAC)	ccggagtatgccaagcc	(CGTA) taac
<i>yobJ</i>	tata (TGAAAC)	cttttttattttagcc-	(CGTA) ttaa
<i>yozO</i>	atat (TGAAAC)	ttttttctctatatgtg	(CGTA) ttac
<i>yqeZ</i>	aaaa (TGAAAC)	ctttgatacatttgta	(CGTA) tgaa
<i>ytel</i>	gaag (TGAAAC)	atttttcatattgaat-	(CGTA) taat
<i>ythP</i>	ttaa (aGAAAC)	tttttttattctattt-	(CGTA) gtaa
<i>yuaF</i>	atth (TGAAAC)	ttttcccagggtgtct-	(CGTA) taaa
<i>yviA</i>	aatt (TGAAAC)	ctgaagagattttaaa-	(CGTA) taaa
<i>ywrE</i>	ttta (TGAAAC)	gtttttcctttttctt-	(CGTA) taaa
Konsensus	TGAAAC -	16-17 bp	CGTA

Alle hier aufgeführten Promotoren wurden experimentell durch Primerextension oder Nuclease S1-Verdaue bestätigt. Die -35 Box und die -10 Box sind eingeklammert und konservierte Nukleotide sind gross und abweichende Nukleotide sind klein geschrieben.

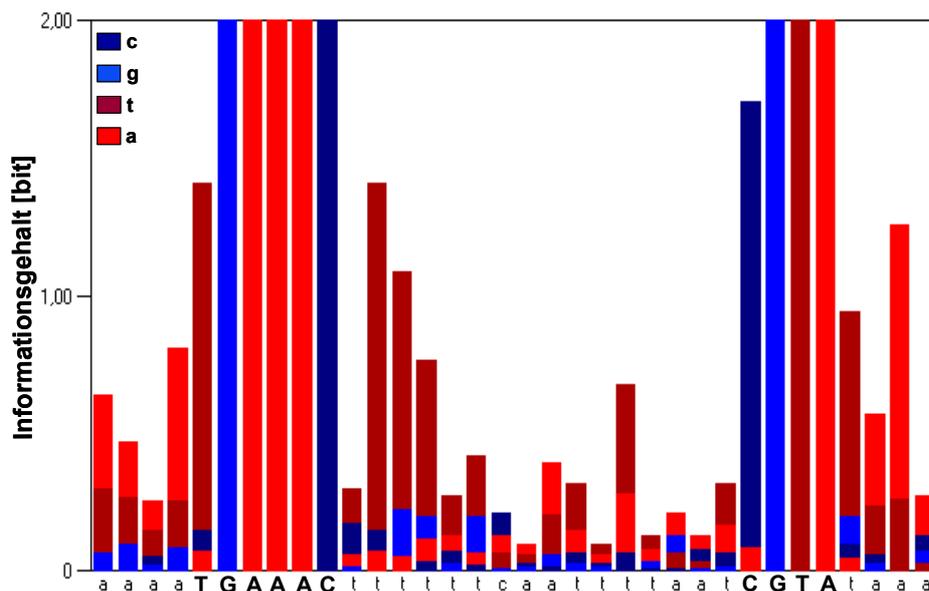


Abb. 6.9: Genomweite Suche nach SigW-abhängigen Promotoren mit Hilfe einer Konsensussequenz. Aus den in Tab. 6.8 aufgezählten 17 Promotoren wurde in dem Programm MotivFinder 2.0 (Decodon GmbH, Greifswald) eine Konsensussequenz für SigW-abhängige Promotoren ermittelt. Das abgebildete Balkendiagramm ist die graphische Auswertung der Promotorsequenzanalyse. Die Höhe eines Balkens zeigt die Konservierung einer Position in der Sequenz. Über den Farbkode wird dargestellt, welches Nukleotid an dieser Stelle vorkommt. Die Ausbreitung der Farbe innerhalb eines Balkens zeigt den Anteil eines Nukleotides am Informationsgehalt dieser Position an. Diese Konsensussequenz wurde gegen das komplette Genom von *B. subtilis* abgeglichen, um alle potentiellen SigW-abhängigen Promotoren zu identifizieren.

Tab.6.9: Induktion des SigW-Regulons in *B. subtilis* nach Salz- / Ethanolstress

Gen ^a	Funktio/n/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	regulatorische Region / potentielle Promotorsequenzen ^c		Induktionswerte ^d	
		wt	sigB	wt	sigB
<i>xpaC</i>	5-bromo-4-chloroindolyl phosphate hydrolysis protein	1.4	2.3	1.6	2.3
<i>yaaN</i>	tellurite resistance protein TelA - <i>R. sphaeroides</i> (E=2e-50)	1.4	4.7	2.2	5.7
<i>sigW</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor	1.3	3.3	1.4	3.7
<i>ybbM</i>	anti-sigma factor	1.2	4.2	2.7	8.6
<i>yceC</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=2e-43)	2.9	9.6	6.1	12
<i>yceD</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=7e-63)	3.2	6.8	5.7	8.8
<i>yceE</i>	resistance protein CdrC - <i>C. acetobutylicum</i> (E=1e-74)	2.7	6.2	8.3	12
<i>yceF</i>	toxic anion resistance protein YkoY - <i>B. subtilis</i> (E=4e-28)	2.1	5.2	4.0	7.3
<i>yceG</i>	tellurite resistance protein TelA - <i>R. sphaeroides</i> (E= 1e-125)	2.7	6.8	4.1	7.9
<i>yceH</i>	tellurite resistance protein TelA - <i>R. sphaeroides</i> (E= 1e-30)	1.7	4.9	3.6	9.6
<i>ybsS</i>	conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=3e-28)	2.1	6.7	2.8	5.3
<i>ydbT</i>	conserved protein BH1721 - <i>B. halodurans</i> (E=9e-68)	1.4	7.1	2.2	4.9
<i>ydjF</i>	phage shock protein A DR1473 - <i>D. radiodurans</i> (E=4e-20)	2.3	9.1	3.9	14
<i>ydjG</i>	unknown protein BH1806 - <i>B. halodurans</i> (E=6e-74)	1.2	5.5	2.4	9.6
<i>ydjH</i>	unknown protein BH1807 - <i>B. halodurans</i> (E=2e-11)	1.5	3.0	1.8	4.5
<i>ydjI</i>	unknown protein BH1805 - <i>B. halodurans</i> (E=4e-5)	0.9	4.1	1.7	7.8
<i>ydjO</i>	no similarity	1.0	4.2	1.0	5.3
<i>ydjP</i>	bromide peroxidase - <i>S. aureofaciens</i> (E=1e-18)	1.8	5.9	1.4	5.9
<i>yeaA</i>	no similarity	1.4	4.8	1.2	4.8
<i>yfhL</i>	hypothetical protein YvaZ - <i>B. subtilis</i> (E=5e-05)	5.3	3.9	1.6	2.0
<i>yfhM</i>	epoxide hydrolase-rel. protein - <i>D. radiodurans</i> (E=9e-61)	9.8	7.5	3.8	4.1
<i>yjOB</i>	HpFtsH - <i>H. pylori</i> (E=2e-20)	3.6	15	2.2	13
<i>yknW</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=4e-20)	1.0	7.5	2.4	11
<i>yknX⁶</i>	ABC-transporter-like protein TptB - <i>S. cristatus</i> (E=5e-23)	0.4	0.7	0.9	0.6
<i>yknY</i>	putative ABC transporter YvrO - <i>B. subtilis</i> (E=3e-75)	1.2	3.4	3.2	5.5
<i>yknZ</i>	ABC transp.-ATP-binding protein NMB0549 - <i>N. meningitidis</i> (E=6e-52)	1.2	2.8	2.3	3.8
<i>yndN</i>	glutathione transferase FosB (EC2.5.1.18) - <i>S. epidermidis</i> (E= 8e-48)	1.3	4.5	2.2	6.4
<i>yoaF</i>	no similarity	0.3	3.2	0.7	6.4
<i>yobJ</i>	no similarity	0.6	6.1	0.6	6.4
<i>yoZ</i>	hypothetical protein YjqA - <i>B. subtilis</i> (E=7e-10)	1.2	3.9	1.6	6.2
<i>yqfB</i>	no similarity	1.2	3.9	1.6	6.2
<i>yqfA</i>	ORF1 - <i>B. megaterium</i> (E=1e-151)	1.7	24	2.8	22
<i>yqeZ</i>	conserved protein BH1356 - <i>B. halodurans</i> (E=e-103)	1.3	17	1.8	17
<i>yfel</i>	proteinase IV - <i>A. aeolicus</i> (E=1e-37)	2.4	3.6	5.3	4.7

Gen ^a	Funktion/ ähnlichstes Protein (E-Wert) ^b	regulatorische Region / potentielle Promotorsequenzen ^c	Induktionswerte ^f			
			wt	<i>sigB</i>		
<i>ythQ</i>	ABC transporter (permease) EcsB - <i>B. halodurans</i> (E=6e-05)	<i>ythPQ</i> operon	1.5	3.4	2.3	4.7
<i>ythP</i>	ABC transp. -ATP-binding protein EcsA - <i>B. subtilis</i> (E=2e-45)	ttaa AGAAAAC tttttttttttctatttt CCGTA gtaa-N ₂₀ - TTG	1.3	2.5	1.3	2.6
<i>yuaI</i>	probable acetyltransferase - <i>D. radiodurans</i> (E=1e-15)	<i>yuaFGI</i> operon	2.5	34	7.0	62
<i>yuaG</i>	epidermal surface antigen - <i>B. halodurans</i> (E=4e-78)	<i>yuaFGI</i> operon	3.6	57	7.2	68
<i>yuaF</i>	no similarity	at TTGAAAAC ttttttcccgagggtgtct CGTA taaatgggt (A) a	1.7	14	2.7	20
<i>yvID</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=4e-23)	<i>yvIABCD</i> operon	1.5	6.0	2.7	9.3
<i>yvIC</i>	conserved protein BH3592 - <i>B. halodurans</i> (E=3e-11)	<i>yvIABCD</i> operon	0.9	2.3	1.2	2.9
<i>yvIB</i>	unknown conserved protein - <i>B. halodurans</i> (E=4e-63)	<i>yvIABCD</i> operon	2.7	7.2	3.4	11
<i>yvIA</i>	no similarity	aat TTGAAAAC cctgaagagagatttttaaa CGTA taaaataa (GT) a	2.0	6.1	3.1	9.2
<i>ywRE</i>	no similarity	ttta TGAAAAC gttttttcttttttt CGTA taaaaggtta (GA)	0.7	2.4	0.7	3.5

^aDie Gene sind nach ihrer Reihenfolge im Genom von *B. subtilis* geordnet. In fetten Buchstaben sind die Gene gekennzeichnet, die schon vor dieser DNA-Makroarrayanalyse aus der Literatur als SigW-abhängig bekannt waren.

^bDie Funktion der kodierten Proteine wurde angegeben, wenn sie durch genetische oder biochemische Daten gestützt ist. Ansonsten ist der nächste Homologe des kodierten Proteins genannt. In Klammern sind die E-Werte aufgeführt, die über eine BLAST2.0-Datenbanksuche mit einer BLOSSUM62 Matrix gegen eine nicht redundante SWALL Proteindatenbank erhalten wurden. Mit „No similarity“ sind E-Werte bezeichnet, die über e-03 lagen. ^cDie vermuteten -35 und -10 Regionen der potentiellen SigW-abhängigen Promotoren und das mögliche Startkodon sind fett hervorgehoben. Die experimentell bestimmten 5'Enden der mRNAs sind in Klammern fett angezeigt.

^fDie Spotintensitäten wurden kalkuliert, indem die normalisierten Hybridisierungssignale von individuellen Genen in den induzierten Proben des gestressten Wildtyps oder der *sigB*-Mutante durch die relativen Intensitäten der unbehandelten Kontrollen geteilt wurden. Sie sind Durchschnittswerte aus wenigstens zwei unabhängigen Hybridisierungen.

^gGene, die innerhalb eines Operons liegen, aber nicht die strengen Expressionskriterien erfüllen sind mit aufgelistet, wenn die flankierenden Gene ein SigW-abhängiges Expressionsmuster zeigen, oder die Struktur des Operons durch einen Northernblot bestätigt war.

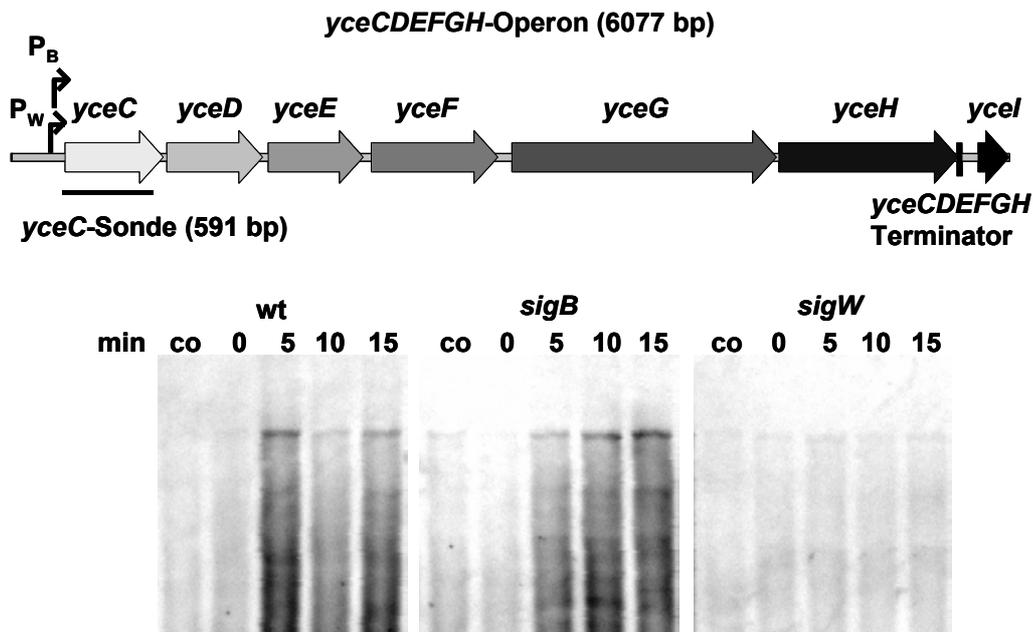


Abb. 6.10: Northernblotanalyse der Expression des *yceCDEFGH*-Operons. Die genomische Organisation des Operons zeigt die Lage der potentiellen Promotoren (\overleftarrow{P}) und Terminatoren ($\overleftarrow{|}$), sowie der verwendeten Antisense-RNA-Sonde ($\overleftarrow{-}$). Auf der DNA ($\overleftarrow{-}$) sind die codierenden Regionen als Pfeile dargestellt. Für die Expressionsanalyse wurden Zellen eines *B. subtilis* Wildtypstammes (BSA 46), einer *sigB*-Mutante (BSM272) und einer *sigW*-Mutante (BSM268) in Minimalmedium kultiviert und in der exp. Wachstumsphase mit 4% NaCl (w/v) behandelt. Vor und nach der Zugabe von NaCl wurden Proben zur RNA-Isolation entnommen. Zur Überprüfung des Expressionsmusters wurden 7,5 μ g RNA/Spur elektrophoretisch separiert, auf eine Nylonmembran geblottet und die *yceC*-mRNA mit einer Dig-markierten *yceC*-Antisense-RNA-Sonde nachgewiesen.

Eine unabhängige Bestätigung der salzinduzierten Expression des SigW-Regulons wurde durch die Northernblotanalysen für das *yceCDEFGH*- und das *yfhLM*-Operon erbracht. Beide Operons wurden in den Transkriptomexperimenten als SigB- und SigW-abhängig definiert. Das *yceCDEFGH*-Operon ist 6077 bp lang und kodiert 6 Proteine, die große Ähnlichkeit mit Resistenzproteinen aus *Clostridium acetobutylicum* und *Rhodobacter sphaeroides* haben (Abb. 6.10). Vor dem Operon wurden ein potentiell SigW-abhängiger Promotor und ein möglicher SigB-abhängiger Promotor gefunden, die einander überlappen. Die Northernblotanalyse des *yceCDEFGH*-Operons zeigt, dass im Wildtyp vor der Zugabe von NaCl nur ein schwaches Transkript detektiert werden konnte. Nach 5 min Salzstress ist eine klare Induktion des Operons zu sehen. Dieses Transkript konnte auch über den kompletten Zeitraum von 15 min beobachtet werden. Das gleiche Transkript wurde auch in der *sigB*-Mutante gefunden. In der *sigW*-Mutante konnte nur das Basallevel des Operons detektiert, jedoch keine Induktion nachgewiesen werden. Dieses Resultat dokumentiert, dass das *yceCDEFGH*-Operon nach Einwirkung von 4% NaCl-Stress SigW-abhängig induziert wird.

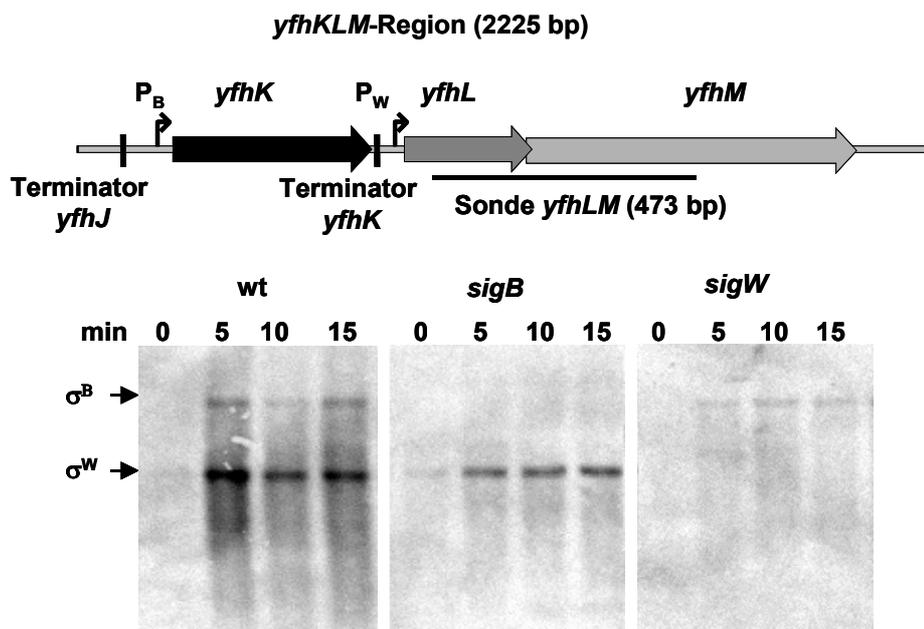


Abb. 6.11: Northernblotanalyse der Expression des *yfhLM*-Operons. Die genomische Organisation des *yfhLM*-Operons zeigt die Lage der potentiellen Promotoren (P), sowie der verwendeten Antisense-RNA-Sonde (→). Auf der DNA (→) sind die codierenden Region als Pfeile dargestellt. Für die Expressionsanalyse wurden die Zellen eines *B. subtilis* Wildtypstammes (BSA46), einer *sigB*-Mutante (BSM272) und einer *sigW*-Mutante (BSM268) in Minimalmedium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase mit 4% NaCl (w/v) behandelt. Vor und nach der Zugabe von NaCl wurden Proben zur RNA-Isolation entnommen. Zur Überprüfung des Expressionsmusters wurden 7,5 µg RNA/Spur elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und die *yfhLM*-mRNA mit einer Dig-markierten *yfhLM*-Antisense-RNA-Sonde nachgewiesen.

Eine zusätzliche Kontrolle des Operons durch andere Regulatoren nach Einwirkung anderer Stressoren kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass der potentielle SigB-Promotor bei der Expression eine Rolle spielt, weil in der *sigB*-Mutante und im Wildtyp nahezu die gleiche Induktion nachgewiesen werden konnte.

Die Gene *yfhL* und *yfhM* sind in einem 1205 bp großen Operon mit einem potentiellen SigW-abhängigen Promotor vor dem codierenden Bereich organisiert (Abb. 6.11). Das Genprodukt von *yfhL* ist ein Paralog des hypothetischen Proteins YvaZ aus *B. subtilis* und *yfhM* kodiert für ein Protein, welches Ähnlichkeit mit dem Epoxidhydrolase-verwandten Protein aus *Deinococcus radiodurans* hat. Vor dem Operon liegt das SigB-abhängige Gen *yfhK*, das ein paraloges Protein zu YwsB kodiert und vom *yfhLM*-Operon durch einen Terminator getrennt ist. Mit der *yfhLM*-Antisense-RNA-Sonde konnte im Wildtyp keine Transkription des Operons vor Einwirkung von NaCl nachgewiesen werden. Erst in der Probe 5 min nach Salzzugabe wurden zwei Transkripte detektiert. Das größere Transkript ist wesentlich schwächer exprimiert als das kleinere. Da es nur noch in der *sigW*-Mutante und nicht in der *sigB*-Mutante gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass der Terminator vor *yfhLM* teilweise

überlesen wird. Deshalb ist die SigB-abhängige Transkription hier mit einem Durchlesen von *yfhK* aus zu erklären. Die Expression des kleineren *yfhLM*-Transkriptes ist sehr deutlich nach 5 min NaCl-Stress induziert. Dieses Transkript ist etwas schwächer auch in der *sigB*-Mutante zu sehen und fehlt in der *sigW*-Mutante. Daher wird das *yfhLM*-Operon nach Salzstress zu einen größeren Anteil SigW-abhängig exprimiert.

6.1.10. Expression des SigW-Regulons ist osmoinduziert

Der Einfluss von Salzstress auf die Genexpression kann zwei Ursachen haben. Aufgrund einer vermehrten Aufnahme von Ionen können zelluläre Enzyme in ihrer Funktion behindert werden (ionischer Effekt). Da große Ionen wie Na^+ und Cl^- nicht frei durch die Membran diffundieren können, sondern aktiv aufgenommen werden müssen kommt es zusätzlich zu osmotisch bedingtem Ausströmen von Wasser aus der Zelle. Diese Plasmolyse der Zelle führt bei vielen Proteinen auch zum kompletten Funktionsverlust (osmotischer Effekt).

In Stressexperimenten mit NaCl, KCl, Saccharose und Glycerin sollte der Einfluss dieser beiden Effekte auf die Induktion des SigW-Regulons bestimmt werden (Abb.6.12). Neben NaCl wurde KCl verwendet, um einen Na^{2+} -spezifischen Einfluss auf die Expression auszuschließen. Der Zucker Saccharose ist nur osmotisch wirksam, weil er nicht in die Zelle gelangen kann. Glycerin kann durch erleichterte Diffusion in die Zelle gelangen und ist deshalb osmotisch unwirksam, kann aber über ionische Effekte Einfluss auf die Genexpression haben.

So wurde ein *B. subtilis* Wildtyp in Minimalmedium ohne Glutamat kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase mit 0,42 M Glycerin, 0,5 M Saccharose, 0,3 M NaCl oder 0,35 M KCl behandelt. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen alle einer ungefähren Osmolalität von 815 mmol/kg, was vorher mit einem Osmometer überprüft wurde. Vor und nach der Zugabe von NaCl, KCl, Saccharose oder Glycerin zum Medium wurden Proben zur RNA-Isolation entnommen. Von der isolierten RNA wurden 0,5 µg/Dot auf eine Nylonmembran geblottet und mit spezifischen Antisense-RNA-Sonden gegen *sigW*, das SigW-abhängige Gen *yuaG*, das osmoregulierte Gen *opuAA* und den Translationsfaktor *tufA* hybridisiert. Als Vertreter für das SigW-Regulon wurde auch für alle weiteren Experimente neben *sigW*, das für ein potentielles Oberflächenantigen codierende *yuaG* verwendet, weil es einzig von SigW reguliert ist (Huang *et al.*, 1999). In Abb. 6.12 sind repräsentative „dot blots“ dieser Stressexperimente gezeigt. Der „dot blot“ (Abb. 6.12 A) wurde mit einer Antisense-RNA-Sonde gegen *sigW* inkubiert. Die erste Reihe von „dots“ dokumentiert die Expression

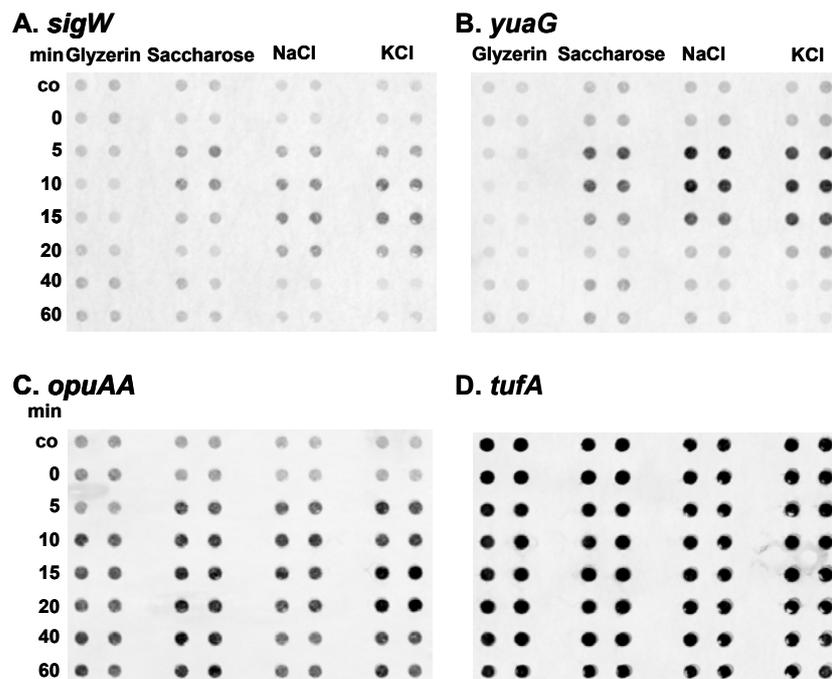


Abb. 6.12: Einfluss von Salz- und Osmostress auf die Expression ausgewählter Mitglieder des SigW-Regulons. Ein *B. subtilis* Wildtyp (168) wurde in Minimalmedium bis zu einer $OD_{540} = 0,3$ kultiviert und dann mit Glyzerin (0,42 M), Sukrose (0,5 M), NaCl (0,3 M) oder KCl (0,35 M) behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Stressbehandlung wurden Proben zur RNA-Isolation entnommen. Von diesen Proben wurden 0,5 μg RNA/Dot auf eine Nylonmembran geblottet. Die Membranen wurden mit spezifischen, Dig-markierten Antisense-RNA-Sonden für die Gene *sigW* (A), *yuaG* (B), *opuAA* (C), *tufA* (D) hybridisiert.

von *sigW* nach Einwirkung von Glyzerin. Hier ist zu sehen, dass es nicht zu einer Induktion der Expression von *sigW* kommt. Nach Zugabe von Saccharose in das Medium ist nach 5 min eine schwache, aber eindeutige Induktion der Expression von *sigW* zu erkennen. Allerdings fällt das Expressionsniveau innerhalb von 15 min wieder ab. Eine ebenfalls transiente Induktion von *sigW* ist auch nach Zugabe von NaCl zu sehen. Die Induktion ist hier stärker als nach Saccharoseeinwirkung und scheint erst nach 40 min das Basalniveau wieder zu erreichen. Das gleiche Bild ist bei KCl-Stress zu beobachten. Im zweiten „dot blot“ (Abb. 6.12 B) ist das Expressionsmuster von *yuaG* abgebildet. Genau wie für das *sigW*-Gen konnte nach Zugabe von Glyzerin keine Induktion von *yuaG* detektiert werden. Nach 10 min Glyzerinstress ist sogar eine schwache Repression zu sehen. Das Induktionsmuster für den Einfluss von Saccharose, NaCl und KCl entspricht dem von *sigW*. Auch *opuAA* zeigte eine Induktion der Expression nach Einwirkung des Zuckers und der beiden Salze. Eine schwache Induktion wurde nach Glyzerinzugabe detektiert. Schon die Betrachtung der „dot blots“ zeigt, dass die Induktion von SigW und seines ganzen Regulons nach Salzstress osmotisch bedingt ist. Die quantitative Auswertung der „dot blot“-Untersuchungen ist in Abb. 6.13 zusammengefasst. Die relativen Induktionswerte sind als \log_2 -Werte aufgetragen worden, um die Repression von Genen gleichwertig mit der Induktion

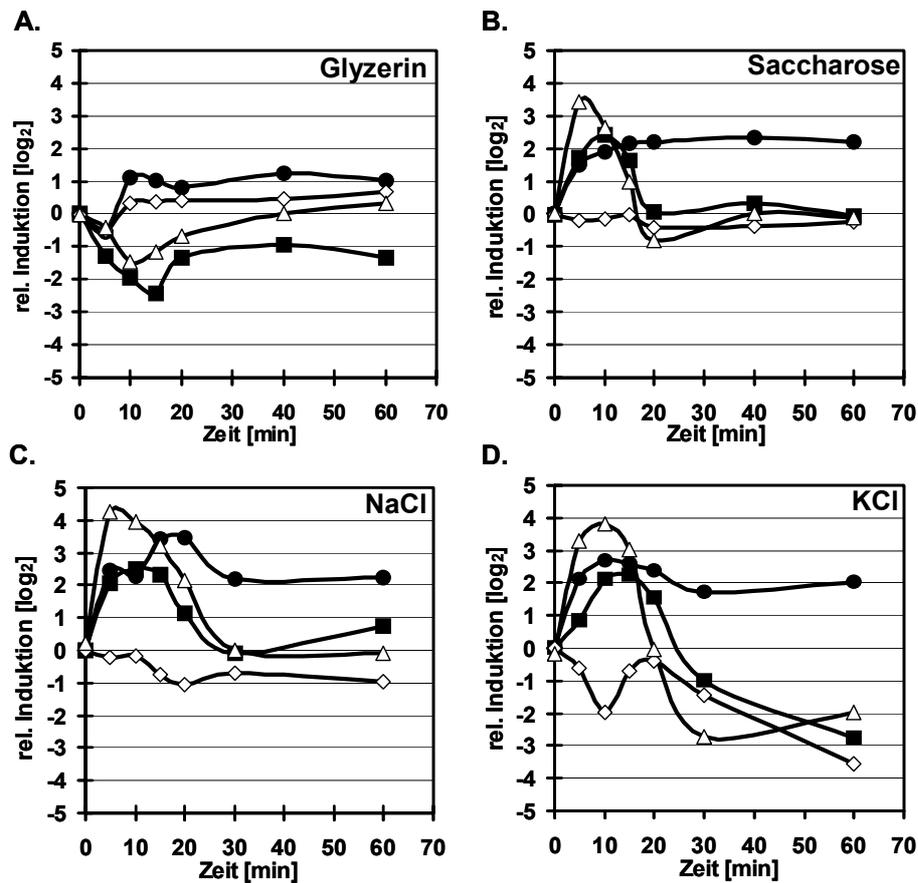


Abb. 6.13: Quantitative Auswertung der relativen Induktion des SigW-Regulons durch Veränderung des osmotischen Druckes. Nach Einwirkung von (A) 0,42 M Glyzerin, (B) 0,5 M Sukrose, (C) 0,3 M NaCl oder (D) 0,35M KCl wurde die relative Induktion der Gene \blacksquare *sigW*, \triangle *yuaG*, \bullet *opuAA* und \square *tufA* graphisch verglichen. Bestimmt wurde die rel. Induktion [log₂] der Expression in Bezug auf die Basalexpression der einzelnen Gene.

darzustellen. In Abb. 6.13 A ist die Expression nach Glyzerineinwirkung gezeigt. Dabei fällt auf, dass die Transkription von *yuaG* und *sigW* in Gegenwart von Glyzerin transient schwach reprimiert wurde. Die Expression der anderen zwei Gene wurde nicht entscheidend durch Glyzerin beeinflusst. Auch die für *opuAA* zu sehende Induktion war nicht signifikant.

Die Expression von *sigW*, *yuaG*, *opuAA* und *tufA* durch Saccharose ist in Abb. 6.13 B dokumentiert. Nach Zugabe des Zuckers wurden *sigW*, *yuaG* und *opuAA* verstärkt transkribiert. Dabei stieg die Transkription von *sigW* nach 10 min osmotischem Stress um das fünffache an und fiel innerhalb der nächsten 10 min wieder auf das Basalniveau zurück. Das SigW-abhängige Gen *yuaG* war nach 5 min Osmostress zehnfach induziert und hatte genau wie *sigW* ein transientes Expressionsprofil, welches nach 20 min wieder den Basalwert erreicht hatte. Die Transkription von *opuAA* wurde durch Saccharose fünffach induziert und über den restlichen Beobachtungszeitraum auf diesem Niveau exprimiert. Unbeeinflusst durch den Zucker blieb die Expression von *tufA*.

Die beiden Salze NaCl und KCl stimulierten die Expression von *opuAA* und den beiden SigW-abhängigen Genen am stärksten. Bei NaCl-Stress war der gleiche transiente Expressionsverlauf für *sigW* und *yuaG* zu beobachten, wie nach Saccharoseeinwirkung. Die Transkription von *opuAA* wurde hier ebenfalls nach der Induktion nicht wieder auf das Basalniveau heruntergefahren.

Ein ähnlicher Expressionsverlauf war auch nach der Einwirkung von KCl für *opuAA* zu sehen. Die Transkription der Gene *sigW* und *yuaG* wurde hier nach einer fünffachen bzw. 14fachen Induktion nicht wieder auf das Basalniveau reduziert, sondern weiter reprimiert. Während die Expression der anderen drei Gene innerhalb der ersten 10 min nach Zugabe von KCl deutlich induziert wurde, wurde die von *tufA* signifikant reprimiert. Obwohl die Transkription von *tufA* bis 20 min nach Stressbeginn wieder leicht anstieg, folgte dann eine ähnlich starke Repression der Expression von *tufA* wie bei *sigW* und *yuaG*.

6.1.11. Rolle der Salzkonzentration bei der Expression des SigW-Regulons

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Salzkonzentration auf die Expression des SigW-Regulons. Ein Wildtypstamm wurde in Minimalmedium ohne Glutamat kultiviert und bei einer $OD_{540} = 0,3$ mit 0,2 M NaCl, 0,7 M NaCl oder 1,2 M NaCl behandelt. Ferner wurde die Genexpression nach einem hypoosmotischen Schock analysiert. Dazu wuchsen die Zellen in Minimalmedium ohne Glutamat mit 0,8 M NaCl bis zu einer $OD_{540} = 1,0$. Bei dieser optischen Dichte wurde die Bakteriensuspension mit vorgewärmtem Minimalmedium ohne Glutamat 1:10 verdünnt. Die Endkonzentration an NaCl im Medium betrug dann nur noch 0,08 M. Aus allen Experimenten wurden RNA-Proben, wie zuvor beschrieben, auf Nylonmembranen gespottet und hybridisiert.

In Abb. 6.14 sind ebenfalls die relativen Induktionswerte als \log_2 -Werte aufgetragen worden. Die Abb. 6.14 A fasst die Genexpression von *sigW* nach Einwirkung verschiedener Salzkonzentrationen zusammen. Bei 0,2 M NaCl und 0,7 M NaCl wurde die Expression von *sigW* klar induziert. Nach Zugabe von 0,2 M Salz gab es ein Maximum der Transkription bei 10 min, welches dem dreifachen der Basalexpression entsprach. Das Induktionsmaximum bei 0,7 M war mit 2,2 nach 15 min erreicht. Mit Überschreiten des Induktionsmaximums wurde die Expression von *sigW* reprimiert. Eine Salzkonzentration von 1,2 M NaCl führte nicht zu einer Induktion der Transkription des *sigW*-Gens. Der hypoosmotische Schock reprimierte die Expression von *sigW*. Die Transkription von *yuaG* wurde deutlich durch 0,2 M Salz im Medium

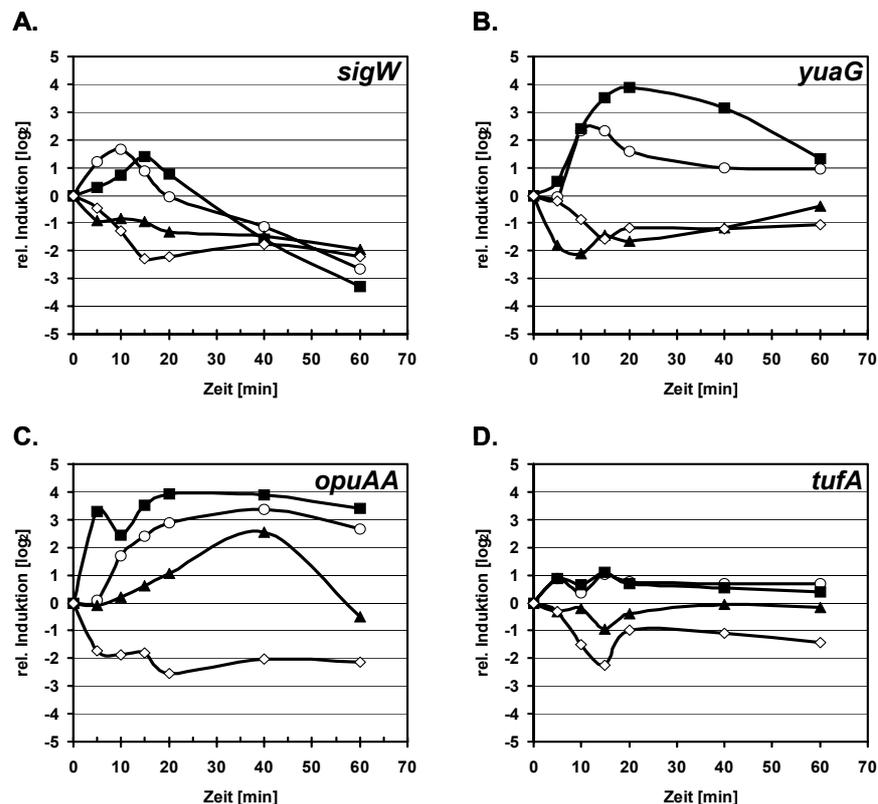


Abb. 6.14: Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die Expression ausgewählter Mitglieder des SigW-Regulons. Ein Wildtyp (168) wurde in Minimalmedium bis zu einer $OD_{540} = 0,3$ kultiviert und mit 0,2 M NaCl (○), 0,7 M NaCl (■) oder 1,2 M NaCl (▲) gestresst. Für ein hypoosmotisches Schockexperiment (◇) wuchsen die Zellen bei 0,8 M NaCl bis zu einer $OD_{540} = 1,0$ und wurden dann mit Minimalmedium 1:10 verdünnt. Von den entnommenen RNA-Proben wurden 0,5 µg/Dot auf eine Nylonmembran geblottet und mit spezifischen, Dig-markierten Antisense-RNA-Sonden für *sigW* (A), *yuaG* (B), *opuAA* (C) und *tufA* (D) hybridisiert. Bestimmt wurde die rel. Induktion [\log_2] der Expression in Bezug auf die Basalexpression der einzelnen Gene.

induziert (Abb.6.14 B). Noch stärker war die Expression mit 0,7 M NaCl. Reprimiert wurde *yuaG* bei einer Endkonzentration von 1,2 M Salz. Etwas schwächer war die Repression nach einem hypoosmotischen Schock.

Im Vergleich zu den SigW-abhängigen Genen wurde die Expression von *opuAA* durch 0,2 M, 0,7 M und 1,2 M Salz klar gesteigert (Abb.6.14 C). Am stärksten war die Induktion nach 0,7 M Salz. Ein Unterschied zwischen dem SigW-Regulon und *opuAA* war die Art des Expressionsprofils. Die Reaktion der Zelle auf Salzstress führte zu einer konstitutiven Expression von *opuAA*, aber einer transienten Induktion von *sigW* und *yuaG*. Allerdings war die Transkription von *opuAA* nach dem hypoosmotischen Schock genauso reprimiert, wie bei *sigW*.

Die Expression von *tufA* war nach 0,2 M, 0,7 M und 1,2 M Salz nicht wesentlich verändert. Der hypoosmotische Schock reprimierte auch die Transkription von *tufA*, was darauf hindeutet, dass auch der Transkriptions-/Translationsapparat der Zelle durch den hypoosmotischen Schock in seiner Funktion beeinträchtigt wurde.

6.1.12. Einfluss der osmoprotektiven Substanz Glyzinbetain auf die Expression des SigW-Regulons

Die Rolle von Glyzinbetain bei der Expression des SigW-Regulons nach 4% Salzstress wurde ebenfalls mit Hilfe der „dot blot“-Methode untersucht. Ein Wildtypstamm wurde für diese Experimente mit und ohne 1 mM Glyzinbetain im Minimalmedium ohne Glutamat bis zu einer $OD_{540} = 0,3$ kultiviert und dann mit 4% NaCl gestresst. Aus Proben, die vor und nach der Salzzugabe entnommen wurden, wurde die RNA isoliert und 0,5 $\mu\text{g}/\text{dot}$ auf Nylonfilter geblottet. Diese wurden dann mit Antisense-RNA-Sonden für *sigW*, *yuaG*, *opuAA* und *sigB* hybridisiert. Die relative Induktion der Expression eines Gens wurde kalkuliert, indem die höchste Spotintensität auf 100% gesetzt wurde (Abb. 6.15).

Mit 1 mM Glyzinbetain im Medium verändert sich die Induktionsintensität von *sigW* nach 4% Salzstress nicht (Abb. 6.15 A). Die Expression von *yuaG* nach Salzstress betrug in der Kultur mit Glyzinbetain ungefähr 80% im Vergleich zu der Kultur ohne das Osmoprotektivum (Abb. 6.15 B). Auch die Expression von *sigB* wurde

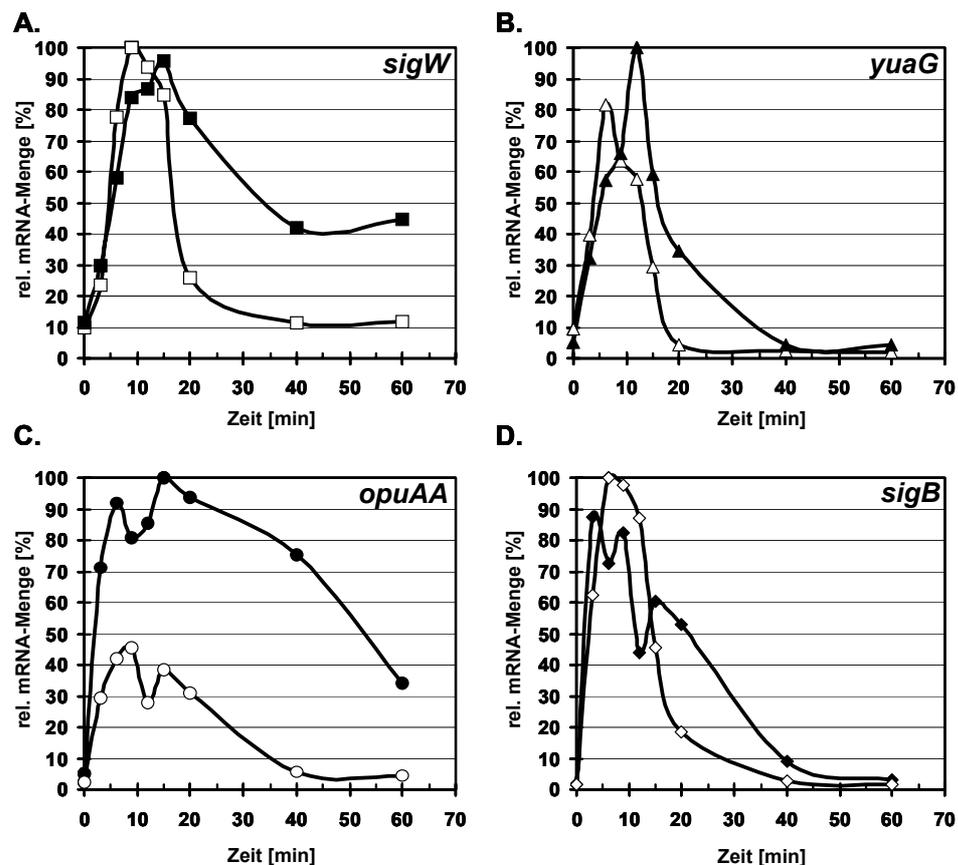


Abb. 6.15: Einfluss der osmoprotektiven Substanz Glyzinbetain auf die Induktion ausgewählter Mitglieder des SigW-Regulons durch 4% Salzstress. *B. subtilis* (168) wurde mit (offene Symbole) und ohne (geschlossene Symbole) 1 mM Glyzinbetain in Minimalmedium bis zu einer $OD_{540} = 0,3$ angezogen und mit 4% NaCl gestresst. Von den entnommenen Proben wurden 0,5 μg RNA/Dot auf eine Nylonmembran geblottet und mit spezifischen, Dig-markierten mRNA-Sonden für *sigW* (A), *yuaG* (B), *opuAA* (C) und *sigB* (D) beprobt. Bestimmt wurde die rel. mRNA-Menge der einzelnen Gene. Zur Kalkulation wurde die höchste Spotintensität gleich 100% gesetzt.

durch Glyzinbetain im Medium nicht verändert (Abb. 6.15 C). Im Gegensatz zur Transkription von *opuAA* ohne Glyzinbetain im Medium erreicht die Expression bei Anwesenheit von Glyzinbetain nach Salzstress nur 50% der Intensität.

Diese Versuche dokumentieren, dass mit der osmoprotektiven Substanz Glyzinbetain im Medium die Stärke der Induktion des SigW-Regulons nicht signifikant beeinflusst wird. Aber anscheinend erfolgt die Abschaltung der osmotisch bedingten Expression ohne Glyzinbetain im Medium etwas langsamer als mit Glyzinbetain.

6.1.13. Überlebensexperimente mit einer *sigW*-Mutante nach 10% Salzstress

Die Frage, ob SigW und die Mitglieder des Regulons entscheidend zu der Entwicklung der Resistenz und Adaptation gegen Salzstress beitragen, sollte in Überlebensexperimenten nach einem das Wachstum verhindernden NaCl-Stress von 10% untersucht werden.

Ein *B. subtilis* Wildtypstamm und eine *sigW*-Mutante wurden während des exponentiellen Wachstums mit 10% NaCl behandelt. Dieser extreme Salzstress führte zu einer deutlichen Verringerung der Wachstumsrate, ein Unterschied zwischen der *sigW*-Mutante und dem Wildtyp war nicht festzustellen. Auch die Bestimmung der Überlebensrate zeigte nur einen marginalen Unterschied zwischen der *sigW*-Mutante und dem Wildtyp (Abb. 6.16). Ähnliche Experimente wurden von Ina Bude in der Arbeitsgruppe von Prof. Bremer durchgeführt (Budde, 2002). Auch hier konnte kein signifikantes Defizit der *sigW*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden.

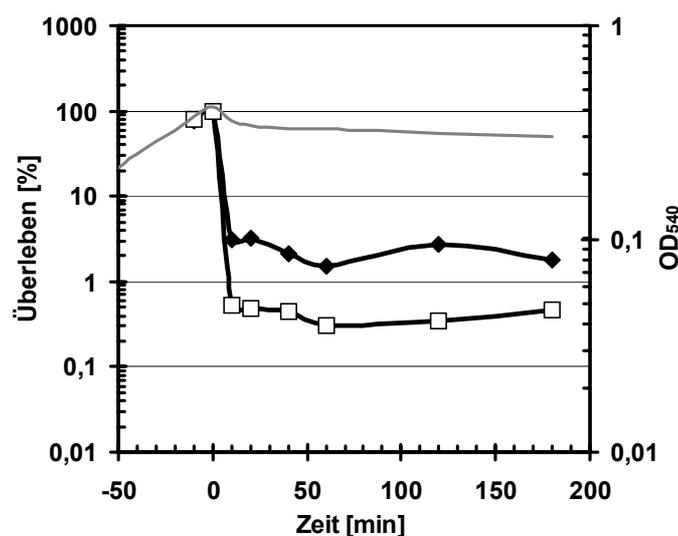


Abb. 6.16: Analyse der Salzstresssensitivität einer *sigW*-Mutante im Vergleich zu einem Wildtyp. Zellen eines Wildtyps (□; 168) und einer *sigW*-Mutante (○; BSM268) wurden in Minimalmedium kultiviert und bei einer OD₅₄₀ = 0,4 mit 10% NaCl gestresst. An verschiedenen Zeitpunkten wurden 1 ml Proben entnommen und in einer Verdünnungsreihe bis 10⁻⁷ verdünnt. Von jeder Probe wurden 200 µl auf LB-Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Kolonienzahl wurde bestimmt und das Überleben in Bezug auf die nicht mit Salz behandelten Zellen (0 min) kalkuliert.

6.2. Charakterisierung der Induktion der generellen Stressantwort von *Bacillus subtilis* während des Wachstums bei niedriger Temperatur

Bisher hat sich diese Arbeit hauptsächlich mit der Identifizierung neuer SigB-abhängiger Gene beschäftigt, um die Rolle der generellen Stressantwort im Resistenz- und Adaptationsnetzwerk von *B. subtilis* besser zu begreifen. Genauso wichtig für die Einordnung in die regulatorischen Netzwerke dieses Gram-positiven Bakteriums ist das Wissen über die induzierenden Umweltbedingungen und die Regulation der generellen Stressantwort.

In zahlreichen Versuchen konnten die Wissenschaftler um Bill Haldenwang und Chester W. Price die Wege der Aktivierung des alternativen Sigmafaktors SigB nach Umweltstress und metabolischen Stress beschreiben (Akbar *et al.*, 1997; Benson and Haldenwang, 1993b; Boylan *et al.*, 1992; Brody, 2001; Haldenwang and Losick, 1980; Vijay *et al.*, 2000; Völker *et al.*, 1995a; Völker *et al.*, 1997). Ein neues Phänomen war die Aktivierung der SigB-abhängigen generellen Stressantwort bei kontinuierlichem Wachstum in der Kälte. Entdeckt wurde die Beteiligung von SigB an der Kälteanpassung von *B. subtilis* in Proteomanalysen, die von Jutta Gade im Labor von Prof. E. Bremer in Zusammenarbeit mit Andrea Völker realisiert wurden. Tamara Hoffmann zeigte daraufhin, dass eine *sigB*-Mutante einen temperatursensitiven Phänotyp hat und im Gegensatz zu einem *B. subtilis* Wildtyp bei 15 °C nicht mehr wachsen kann. Als nächstes versuchte Andrea Krisp die Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur und dessen Regulation zu beschreiben. In ihrer Dissertation konnte Sie zeigen, dass die Aktivierung der generellen Stressantwort unabhängig von den bisher bekannten Signaltransduktionswegen der SigB-Aktivierung ist (Krisp, 2002). Auch diese Arbeit setzt sich im zweiten Teil mit der Charakterisierung der kältebedingten Induktion der generellen Stressantwort und ihrer Regulation auseinander, um ein noch detailliertes Bild der Funktion von SigB im Resistenz- und Adaptationsnetzwerk von *B. subtilis* zu bekommen.

6.2.1. Analyse der Regulation der SigB-Aktivierung in SM-Medium

Alle Experimente zur Expression und Regulation der generellen Stressantwort bei niedriger Temperatur wurden in dem definierten Minimalmedium nach Spizizen getätigt. Diese Nährlösung wurde zuvor nicht für die Analyse der SigB-Aktivität verwendet, weshalb mit einer SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Fusion einführend die Aktivierung von SigB nach 4% Ethanolstress und unter Glukosemangel untersucht wurde.

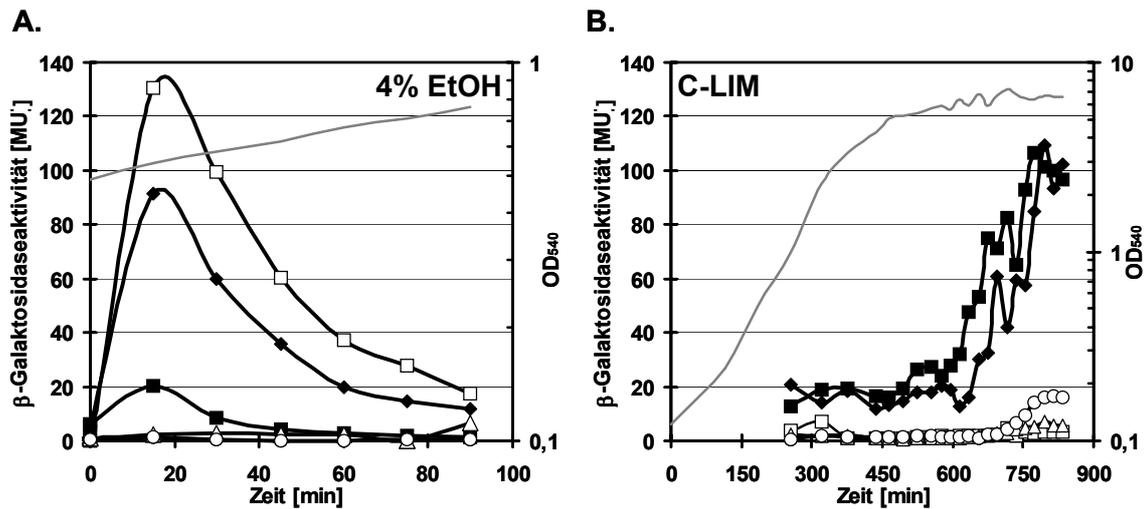


Abb. 6.17: Expression einer SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Fusion nach Umweltstress und metabolischem Stress in SM-Medium. Ein *B. subtilis* Wildtyp BSM151 (\square) und isogene Mutanten mit Nullmutationen in den Regulatoren der SigB-Aktivität (\square *rsbP* (BSM152), \blacksquare *rsbU* (BSM154), \triangle *rsbV* (BSM155), \circ *sigB* (BSM156)) wurden in SMM kultiviert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde während des exp. Wachstums (–) nach Einwirkung von 4% Ethanol (A) und beim Übergang des Wachstums (–) in die stationäre Phase durch Glukoselimitation (B) in Miller units [MU] gemessen.

Diese beiden Stressoren stimulieren die Aktivität dieses alternativen Sigmafaktors über die beiden in der Einleitung vorgestellten, voneinander unabhängigen Signaltransduktionswege der generellen Stressantwort (Abb. 3.2).

B. subtilis-Stämme mit Nullmutationen in den Regulatoren *rsbP*, *rsbU*, *rsbV*, eine *sigB*-Mutante und ein Wildtyp wurden in SM-Medium kultiviert und während des exponentiellen Wachstums mit 4% Ethanol gestresst. In einem zweiten Versuch wurden diese Stämme in SM-Medium mit einer wachstumslimitierenden Glukosekonzentration von 0,05% inkubiert. Aus beiden Experimenten wurden Proben für eine LacZ-Bestimmung entnommen. In Graph A der Abb. 6.17 ist die Expression der SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Fusion über einen Zeitraum von 90 min nach Einwirkung von Ethanol dokumentiert. Wie erwartet, zeigten der Wildtyp und die *rsbP*-Mutante eine deutliche, transiente Induktion der Expression der Reporterfusion mit einem Maximum nach 15 min Stress. Das Gen *rsbP* kodiert für die metabolischen Stress vermittelnde Phosphatase RsbP, die keinen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion nach Umweltstress hat. In der *rsbU*-Mutante, deren durch Umweltstress aktivierte Phosphatase RsbU defekt ist, wurde nur ein sehr schwacher Anstieg der LacZ-Aktivität gemessen. Dagegen konnte keine Induktion der *ctc::lacZ*-Fusion in der *rsbV*- und in der *sigB*-Mutante nachgewiesen werden.

Auch unter Glukosemangel wurde das erwartete Muster für die LacZ-Aktivität erhalten (Abb. 6.17 B). Nach Übergang in die stationäre Phase wurde die Expression der *ctc::lacZ*-Fusion im Wildtyp und in der *rsbU*-Mutante induziert. Es konnte keine

LacZ-Aktivität in einer *rsbP*-, *rsbV*- oder *sigB*-Mutante gemessen werden. Der Phänotyp einer *rsbV*-Mutante entspricht dem einer *sigB*-Mutante, weil RsbV als Anti-antisigmafaktor die Schnittstelle der beiden Signaltransduktionswege der generellen Stressantwort ist und direkt die Interaktion von SigB mit dem Antisigmafaktor RsbW beeinflusst.

Mit dieser LacZ-Studie konnte dokumentiert werden, dass die Regulation in SM-Medium der bekannten Signaltransduktion der generellen Stressantwort nach Umweltstress und metabolischem Stress folgt und keine medienspezifische Veränderung der SigB-Aktivierung vorliegt.

6.2.2. Medienunabhängige Aktivierung des alternativen Sigmafaktors SigB

Um zu prüfen, ob die SigB-vermittelte Induktion der *ctc::lacZ*-Fusion bei niedriger Temperatur unabhängig vom Medium erfolgt, wurden ein Wildtyp und eine *sigB*-Mutante in SM-Medium, LB, DSM, SMM mit Glyzinbetain, aminosäurenlimitiertem Minimalmedium und glukoselimitiertem Minimalmedium angezogen und während des gesamten Wachstums die LacZ-Aktivität der Reporterfusion verfolgt (Abb. 6.18). Diese Experimente wurden alle bei 16 °C durchgeführt, da T. Hoffmann (2003) gezeigt hatte, dass eine *sigB*-Mutante bei 15 °C nicht mehr wachsen konnte.

In allen sechs Medien kam es nur im Wildtyp zu einer deutlich gesteigerten Transkription der *ctc::lacZ*-Fusion mit einem Induktionsmaximum während der exponentiellen Wachstumsphase. Dann fiel die Expression der Fusion bis zum Übergang in die stationäre Phase wieder ab, auf einen Wert der immer klar über dem Basallevel bei 37 °C vor dem Umsetzen in die Kälte lag. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen der *sigB*-Mutante und dem Wildtyp war bei 16 °C in keinem der Medien festzustellen. In SMM wuchsen die Zellen in der Kälte bis zu einer optischen Dichte von 9 (Abb. 6.18 A). Das Maximum der *ctc::lacZ*-Expression wurde bei einer ungefähren $OD_{540} = 0,6$ ca. 24-30 h nach dem Transfer auf 16 °C gemessen. Der Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase zur stationären Phase begann nach 100 h bei niedriger Temperatur. Die in LB und DSM kultivierten Zellen erreichten die stationäre Phase bei 16 °C nach 35-50 h. Das Induktionsmaximum im Wildtyp wurde in LB bei einer ungefähren $OD_{540} = 2$ nach ca. 30 h bestimmt und war von der Intensität mit der Induktion in SMM vergleichbar (Abb. 6.18 A und B). Die Transkription der Reporterfusion war in DSM wesentlich schwächer als in allen anderen Medien (Abb. 6.18 C). Ein Grund dafür könnte sein, dass die Aktivierung der generellen Stressantwort in diesem für Sporulationsexperimente optimierten Medium unterdrückt wird.

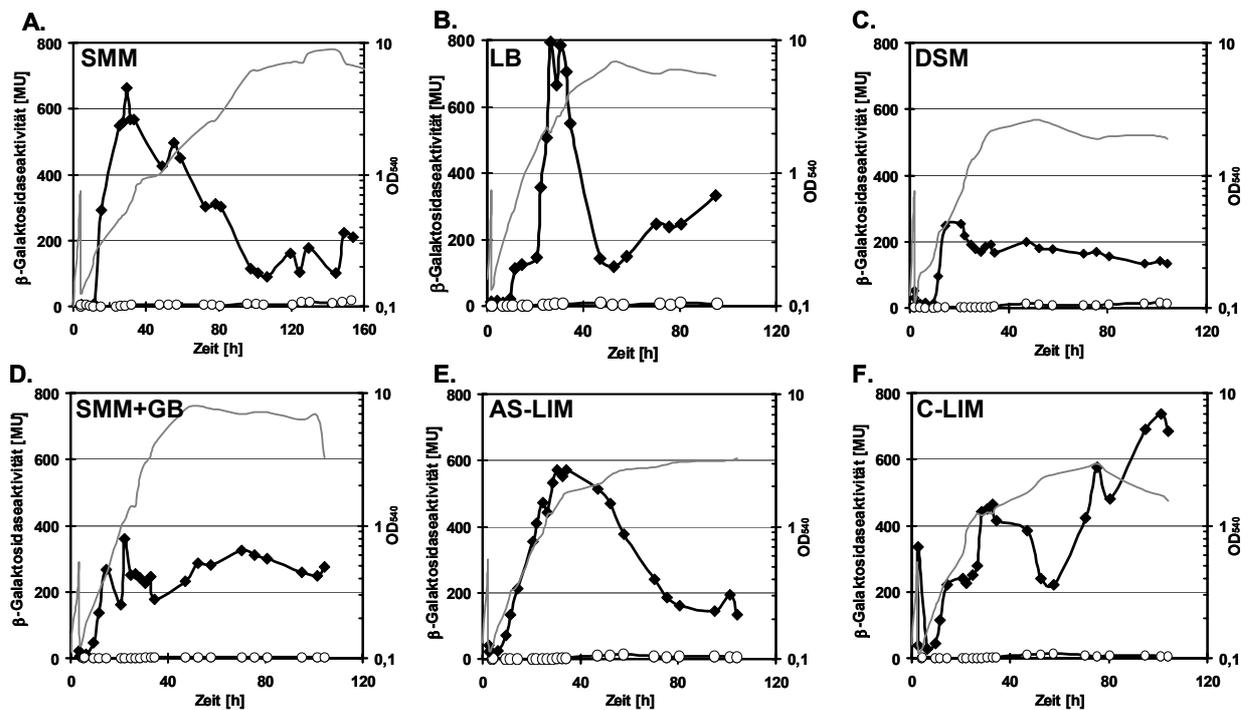


Abb. 6.18: Medienunabhängige Induktion einer *ctc::lacZ*-Fusion während des Wachstums bei niedriger Temperatur (16 °C). Ein Wildtyp (□;BSM151) und eine isogene *sigB*-Mutante (○;BSM156) wurden in (A) SMM, (B) LB, (C) DSM, (D) SMM + Glyzinbetain, sowie unter (E) Aminosäuremangel und (F) Glukoselimitation kultiviert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde während des gesamten Wachstums (–) verfolgt. Nachdem die Zellen zuvor bei 37 °C bis zu einer $OD_{540} = 0,5$ gewachsen waren, wurde die Kultur mit vorgewärmtem SMM auf eine $OD_{540} = 0,1$ verdünnt und auf 16 °C umgesetzt. Die Enzymaktivität ist in Miller units [MU] angegeben.

Auch die Zugabe der osmoprotektiven Substanz Glyzinbetain zum SM-Medium beschleunigte das Wachstum bei 16 °C um das Doppelte (vgl. Abb. 6.18 A und D). Ähnliche Experimente wurden von T. Hoffmann bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt (Hoffmann, 2003). Sie konnte zeigen, dass durch Zugabe von Glyzinbetain nicht nur das Wachstum von *B. subtilis* beschleunigt wird, sondern bei einer *sigB*-Mutante der Wachstumsdefekt in der Kälte (15 °C) wieder aufgehoben wird. Interessanterweise betrug die LacZ-Aktivität mit Glyzinbetain knapp 50% im Vergleich zur Induktion des Reporters in SMM ohne Glyzinbetain. Diese Befunde unterstützen die These, dass osmoprotektive Substanzen wie Glyzinbetain auch als Kryoprotektiva wirken können (Bayles, 2000; Ko, 1994). Zusätzlich zeigte es, dass die Induktion der generellen Stressantwort in der Kälte durch die Anwesenheit von Glyzinbetain beeinflussbar sein könnte, was für die Induktion nach Salzstress nicht der Fall ist. Allerdings kann die Zugabe von Glyzinbetain eine *sigB*-Mutante vor dem Tod durch einen harten Schock mit 10% NaCl schützen und den Verlust der generellen Stressantwort kompensieren (Völker *et al.*, 1999).

Normalerweise wird SigB unter Aminosäuremangel (Abb.6.18 E) nicht aktiviert. Die Induktion von *ctc::lacZ* in diesem Medium ist eindeutig auf die niedrige Temperatur

zu beziehen und auf die exponentielle Wachstumsphase beschränkt. Auch hier wurde das Induktionsmaximum nach ca. 30 h erreicht.

Unter Glukoselimitationsbedingungen (Abb. 6.18 F) sind zwei Induktionsmaxima für die Transkription von *ctc::lacZ* zu sehen. Neben der kältebedingten Expression während des exponentiellen Wachstums, kam es noch zu einer zweiten Steigerung der LacZ-Aktivität durch den Glukosemangel. Die Kälteinduktion fiel hier etwas schwächer aus als in SMM.

Diese Versuche demonstrieren, dass die Induktion der SigB-abhängigen Stressantwort in der Kälte weitgehend medienunabhängig erfolgt.

6.2.3. Nutzung einer *gsiB::gfp*-Reporterfusion zur Studie der generellen Stressantwort

Während ihrer Dissertation konstruierte Grit Kuhnke SigB-abhängige GFP-Reporterfusionen, in dem Sie die Promotorregion des alleinig SigB-abhängigen Gens *gsiB* vor die codierende Sequenz für GFP klonierte. Diese Transkriptionsfusionen können in *amyE*, das Gen für eine α -Amylase, integriert werden, ohne die Untersuchung der generellen Stressantwort in *B. subtilis* zu beeinflussen.

Um einen Eindruck vom Expressionsverhalten einer *gsiB::gfp*-Reporterfusion zu bekommen, wurde ein Wildtypstamm mit dieser Fusion in SMM kultiviert und während des exponentiellen Wachstums verschiedenen Ethanolkonzentrationen ausgesetzt. Die Proteinbiosynthese der Zellen wurde nach 1 h Stress durch Zugabe von Erythromycin gestoppt. Vor der mikroskopischen Betrachtung wurden die Bakterien auf 1%iger Agarose immobilisiert. In Abb. 6.19 ist zu sehen, dass die Intensität der GFP-Fluoreszenz mit steigender Ethanolkonzentration zunahm, und am stärksten nach Einwirkung von 4% Ethanol war. Eine Ethanolkonzentration von 8% beeinträchtigte nicht die nur GFP-Fluoreszenz, sondern war teilweise tödlich für die Zellen, wie an den Zelltrümmern im Phasenkontrastbild zu sehen ist. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von GFP als zellulären Reporter ist die Tatsache, dass die Expression für die Population, aber auch für die einzelne Zelle beobachtet werden kann. So wurde in dem Versuch auch deutlich, dass einige Zellen innerhalb der Population die Fusion stärker exprimierten als andere. Allerdings leuchteten mit steigender Ethanolkonzentration immer mehr Zellen der Population.

Dieser Versuch zeigt, dass die *gsiB::gfp*-Fusion sehr gut für die mikroskopische Beobachtung der Aktivierung der generellen Stressantwort geeignet ist.

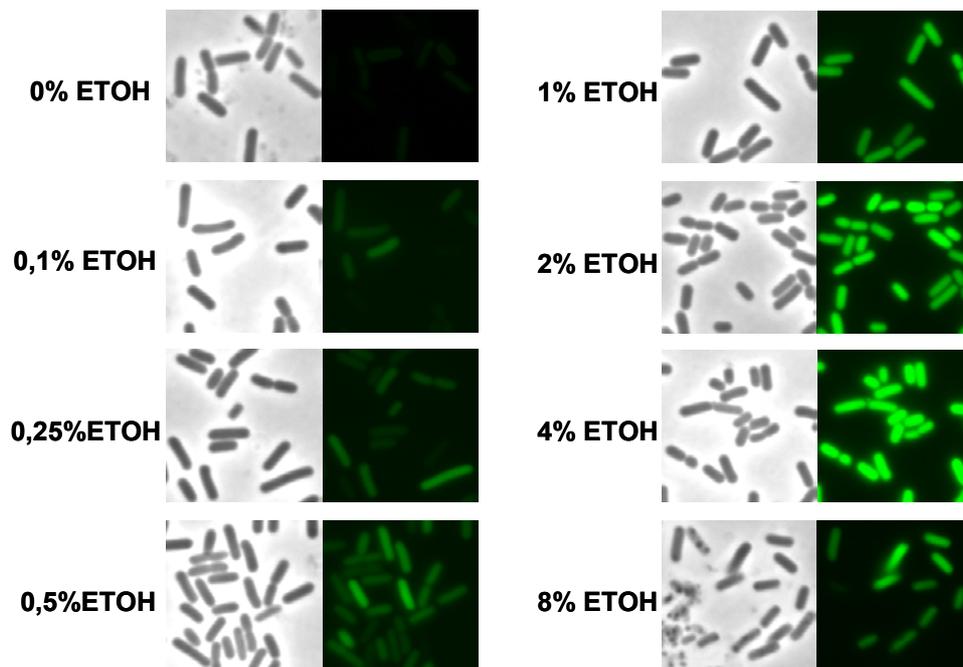


Abb. 6.19: Monitoring der Aktivität des generellen Stresssigmafaktors SigB mit Hilfe einer transkriptionellen *gsiB::gfp*-Fusion. Die Zellen von *B. subtilis* (BSM269) wurden in Minimalmedium kultiviert und bei einer $OD_{540} = 0,3$ mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ethanol behandelt. Nach 1 h Stress wurde die Proteinbiosynthese durch die Zugabe von Erythromycin (200 mg/ml) gestoppt. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf einem Objektträger mit 1%iger Agarose immobilisiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiolabmikroskopsystem und dem Programm Axiovision 4.0 visualisiert. Alle Aufnahmen sind bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen worden. Die Fluoreszenz wurde mit einem 450-490/FT510/LP520 Filterset beobachtet und die Ringblende für das Objektiv war Ph3. Die Belichtungszeit für die Phasenkontrastbilder betrug 1 s und für die Fluoreszenzbilder 5 s.

6.2.4. RsbV-unabhängige Expression der *gsiB-gfp*-Fusion bei verschiedenen Temperaturen

Die Signaltransduktionswege zur Aktivierung von SigB nach Umweltstress und metabolischem Stress teilen sich das Hauptregulatorprotein RsbV. In ihrer Doktorarbeit konnte A. Krisp anhand von Westernblotanalysen und LacZ-Messungen zeigen, dass bei 16 °C die Induktion der generellen Stressantwort von *B. subtilis* ohne RsbV möglich ist. Die Mikroaufnahmen eines Wildtyps, einer *rsbV*-Mutante und einer *sigB*-Mutante, die bei niedrigen Temperaturen angezogen wurden, bestätigen dieses Ergebnis (Abb. 6.20). Als Kontrolle wurden die Stämme mit 4% Ethanol behandelt. Die Fluoreszenzbilder dokumentieren, dass die SigB-abhängige *gsiB::gfp*-Fusion nach 4% Ethanolstress nur im Wildtyp leuchtet und nicht in der *rsbV*-Mutante oder der *sigB*-Mutante. Bei der optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C kam es nicht zu einer detektierbaren Expression der Reporterfusion. Eine deutliche Fluoreszenz war allerdings im Wildtyp und in der *rsbV*-Mutante nachzuweisen, wenn die Zellen bei 16 °C kultiviert wurden. Die SigB-Abhängigkeit der Expression von *gsiB::gfp* war in der bei 16 °C noch kultivierbaren *sigB*-Mutante sichtbar, die keine Fluoreszenz zeigte.

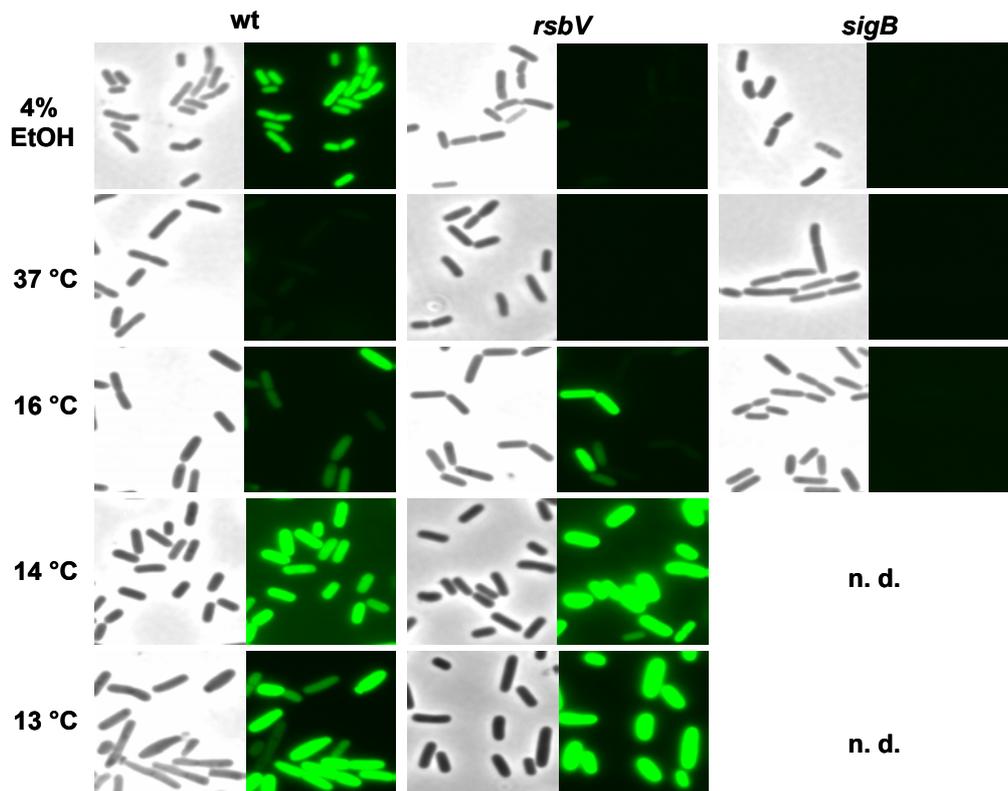


Abb. 6.20: RsbV-unabhängige Aktivierung von SigB durch Wachstum bei niedriger Temperatur. *B. subtilis* (BSM269), eine isogene *rsbV*-Mutante (BSM275) und eine isogene *sigB*-Mutante (BSM276) wurden in Minimalmedium bei 37 °C, 16 °C, 14 °C und 13 °C bis zu einer $OD_{540} = 1$ kultiviert. Zusätzlich wurden alle Stämme bei 37 °C und einer $OD_{540} = 0,5$ für 1 h mit 4% Ethanol gestresst. Die Proteinbiosynthese wurde unmittelbar nach der Probenentnahme durch Zugabe von Erythromycin (200 mg/ml) gestoppt. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf einem Objektträger mit 1%iger Agarose immobilisiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiolabmikroskopsystem und dem Programm Axiovision 4.0 visualisiert. Alle Aufnahmen sind bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen worden. Die Fluoreszenz wurde mit einem 450-490/FT510/LP520 Filterset beobachtet und die Ringblende für das Objektiv war Ph3. Die Belichtungszeit für die Phasenkontrastbilder betrug 1 s und für die Fluoreszenzbilder 5 s. n. d. = nicht detektiert.

Die weitere Abnahme der Temperatur auf 14 °C demonstriert, dass mit der Verschärfung der Stresssituation die Anschaltung der generellen Stressantwort forciert wurde. Mit einer weiteren Verringerung der Temperatur auf 13 °C konnte aber keine stärkere Induktion der Reporterfusion erreicht werden, was damit zusammenhängen kann, dass diese Temperatur zu viel Stress für die Zellen bedeutet.

6.2.5. Medienunabhängige Induktion der *ctc::lacZ*-Fusion in einer *rsbV*-Mutante bei 16 °C

Um sicher zu gehen, dass auch diesmal kein medienbedingter Effekt die RsbV-unabhängige Aktivierung von SigB auslöst, wurde eine *rsbV*-Mutante bei 16 °C in LB, DSM, unter Aminosäuremangel und Glukosehunger kultiviert und die LacZ-Aktivität durch Transkription von *ctc::lacZ* bestimmt (Abb 6.21).

Die Expressionsmuster der Fusion in der *rsbV*-Mutante unterschieden sich kaum von denen des Wildtyps in Abb. 6.19. Das beweist, dass auch die Induktion der

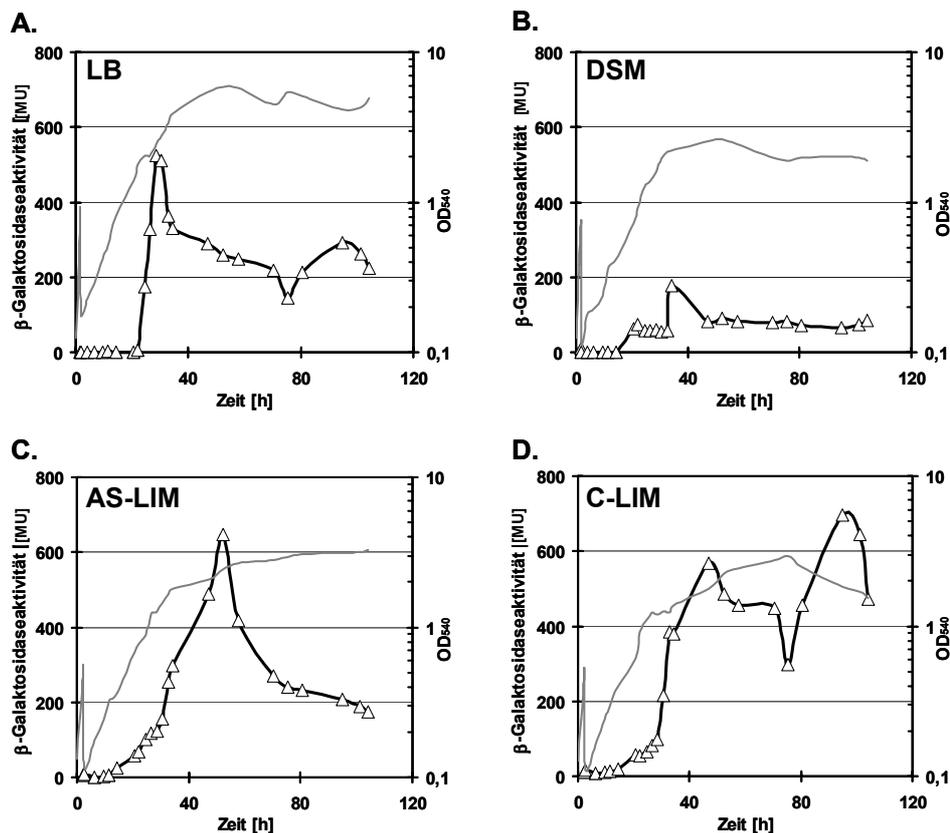


Abb. 6.21: RsbV- und medienunabhängige Induktion einer *ctc::lacZ*-Fusion während des Wachstums bei niedriger Temperatur. Eine isogene Δ *rsbV*-Mutante (BSM155) wurde in (A) LB, (B) DSM, sowie unter (C) Aminosäuremangel und (D) Glukoselimitation kultiviert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde während des gesamten Wachstums (–) verfolgt. Nachdem die Zellen zuvor bei 37 °C bis zu einer $OD_{540} = 0,5$ gewachsen waren, wurde die Kultur mit vorgewärmtem SMM auf eine $OD_{540} = 0,1$ verdünnt und auf 16 °C umgesetzt. Die Enzymaktivität ist in Miller units [MU] angegeben.

generellen Stressantwort in einer *rsbV*-Mutante medienunabhängig war. Dieses Ergebnis und die GFP-Bilder unterstreichen, dass die Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur ohne RsbV möglich ist.

6.2.6. IPTG-induzierte Expression von SigB bei niedriger Temperatur

Eine Möglichkeit SigB ohne die Beteiligung von RsbV aus dem Komplex mit RsbW zu befreien, wäre eine höhere Affinität des Sigmafaktors zur RNA-Polymerase als zum Antisigmafaktor bei niedriger Temperatur. Wäre dies der Fall, würde die Expression eines *ctc::lacZ*-Reporters bei 16 °C wesentlich schneller und stärker ansteigen als bei 37 °C.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine *rsbW*-Mutante bei 16 °C und 37 °C in SMM angezogen, die einen IPTG-induzierbaren Promotor anstelle des natürlichen SigB-abhängigen Promotors vor *rsbV* hat. Dadurch ist eine SigB-Aktivität nur durch Zugabe von IPTG zu verzeichnen. Während des exponentiellen Wachstums wurde die Expression von SigB durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und Proben zur LacZ-

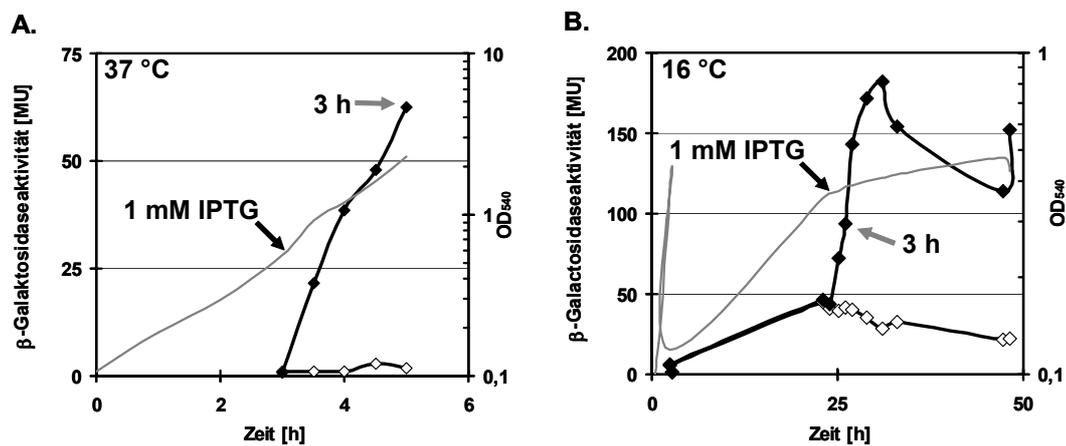


Abb. 6.22: IPTG-induzierte SigB-Synthese bewirkt Induktion der Expression einer SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Fusion bei 16 °C. Eine *rsbW*-Mutante (BSA115) mit einem IPTG induzierbaren Promotor vor dem SigB-Operon wurde in SMM kultiviert. Nachdem die Zellen zuvor bei 37 °C bis zu einer OD₅₄₀= 0,5 gewachsen waren, wurde die Kultur mit vorgewärmtem SMM auf eine OD₅₄₀= 0,1 verdünnt und auf 16 °C umgesetzt. Während des Wachstums (–) bei 16 °C wurde die β -Galaktosidaseaktivität in Miller units [MU] gemessen. Nach 25 h wurde einer Kultur (□) 1 mM IPTG zugegeben während die andere Kultur ohne IPTG (◇) blieb.

Bestimmung entnommen. In Abb. 6.22 ist zu sehen, dass die LacZ-Aktivität bei 37 °C innerhalb von 3 h nach IPTG-Zugabe von 1 MU auf 60 MU stieg. Bei der 16 °C-Kultur stieg die LacZ-Aktivität innerhalb der gleichen Zeit von 45 MU auf 95 MU. Dieses Experiment zeigt, dass die Expression des *ctc::lacZ* Reporters bei 16 °C langsamer induziert wurde als bei 37 °C. Also scheint SigB in der Kälte im Vergleich zu 37 °C nicht besser an die RNA-Polymerase zu binden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf einen bisher unbekanntem Signaltransduktionsweg für die Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur.

6.2.7. Kälteinduktion des SigB-Regulons in Regulatormutanten der SigB-Aktivität

Ohne RsbV können andere bekannte Regulatorproteine keine Rolle für die Induktion in der Kälte spielen. Um dies aber durch experimentelle Befunde zu untermauern, wurden Westernblotanalysen mit Antikörpern gegen SigB, RsbV, RsbW und RsbX durchgeführt. Alle vier Proteine werden zusammen in einem Operon kodiert, das von einem SigB-abhängigen Promotor aus transkribiert wird. Zusätzlich wurde die Synthese von Ctc, als bewährtem Reporter der SigB-Aktivität analysiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde die Menge an RsbS überwacht, einem weiteren Regulator von SigB, der nicht stresskontrolliert exprimiert wird. Für alle SigB-abhängigen Proteine konnte im Wildtyp nach 1 h Ethanolstress und nach Wachstum bei 16 °C eine starke Zunahme in der Proteinmenge nachgewiesen werden (Abb. 6.23).

Der Ausfall der metabolischen Stressphosphatase RsbP durch Insertion einer Nullmutation in *rsbP* hatte keinen Einfluss auf die Induktion nach Ethanolstress,

reduzierte aber die Expression nach Kältestress. Die Inaktivierung von RsbU, der Phosphatase, die entscheidend für die Wahrnehmung von Umweltstress ist, blockierte die Induktion nach Ethanolstress, nicht aber die Induktion bei niedriger Temperatur. In einer *rsbUP*-Doppelmutante war die Kälteinduktion so stark wie bei der *rsbP*-Mutante. Nach Ethanolstress konnte in der *rsbUP*-Doppelmutante keine Induktion der generellen Stressproteine SigB, RsbW, RsbV und RsbX nachgewiesen werden.

Wie in den zuvor gezeigten Experimenten, demonstrierte die *rsbV*-Mutante eine sehr starke Induktion während des Wachstums in der Kälte (siehe Abb. 6.20 und 6.21). Überraschenderweise wies eine Mutante mit Nullmutationen in *rsbP*, *rsbU* und *rsbV* bei niedriger Temperatur eine vergleichbare Kälteinduktion wie eine *rsbV*-Mutante auf, obwohl die Induktion bei niedriger Temperatur in einer *rsbUP*-Mutante deutlich verringert war. In der *sigB*-Mutante konnte für Ctc keine Veränderung nach Ethanolstress oder Kältestress detektiert werden. Die Anhäufung von RsbV und RsbW in der Kälte ist daher ein Artefakt.

Einen Eindruck über den zeitlichen Ablauf der Induktion der generellen Stressantwort in den einzelnen Regulatormutanten gab das Monitoring des *ctc::lacZ* Reporters während des Wachstums bei 16 °C (Abb. 6. 24).

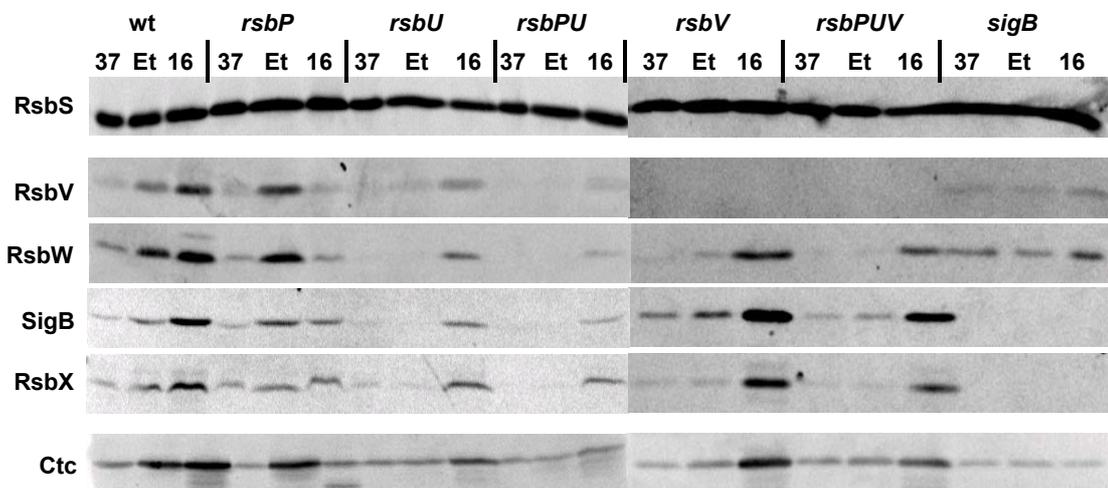


Abb. 6.23: Westernblotanalyse der Menge der stressinduzierten Regulatoren für die SigB-Aktivität und des generellen Stressproteins Ctc. *B. subtilis* (BSM151) und isogene Mutanten in den Genen *rsbU* (BSM154), *rsbP* (BSM152), *rsbUP* (BSM153), *rsbV* (BSM155), *rsbUPV* (BSM267) und *sigB* (BSM156) wurden in SMM kultiviert. Die bei 37 °C sowie die bei 16 °C inkubierten Kulturen wurden bei einer $OD_{540} = 1$ geerntet. Der Ethanolstress (4% v/v) wurde bei einer $OD_{540} = 0,8$ gesetzt und die Zellen 1 h später geerntet. Von den Proteinrohextrakten wurden 30 µg/Spur aufgetrennt und dann auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die Membranen wurden mit monoklonalen Antikörpern für die Proteine RsbS, RsbV, RsbW, SigB, RsbX und einem polyklonalen für Ctc hybridisiert. Der sekundäre Antikörper war an eine alkalische Phosphatase gekoppelt, so dass die immobilisierten Proteine auf der Membran über die Chemifluoreszenzeigenschaften des Phosphatasesubstrates detektiert werden konnten.

Auch hier ist zu sehen, dass es in allen Regulatormutanten, mit Ausnahme der *sigB*-Mutante, zu einer Kälteinduktion von *ctc* kam. Der zeitliche Ablauf und das Wachstum unterschieden sich nicht sonderlich zwischen den Mutanten.

Der Verlust der Umweltstressphosphatase RsbU hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion der Reporterfusion bei niedriger Temperatur. Genau wie in dem Westernblot war die Induktion in der Mutante mit der *rsbP*-Nullmutation allein und in Kombination mit *rsbU* deutlich reduziert, aber nicht blockiert. Die Zerstörung des *rsbV*-Gens resultierte in einer Kälteinduktion, die sogar stärker als im Wildtyp war. Auch das *ctc::lacZ*-Experiment belegt, dass in einer *rsbUPV*-Tripelmutante das Induktionsmuster bei niedriger Temperatur, dem einer *rsbV*-Mutante entsprach. Für die Signaltransduktion der kältevermittelten Induktion der generellen Stressantwort lässt sich aus diesem Experiment ableiten, dass die Induktion unabhängig von den beiden bisher bekannten Regulationswegen nach Umweltstress und metabolischen Stress abläuft. Die verringerte Intensität der β -Galaktosidaseaktivität in der *rsbP*-Mutante lässt aber vermuten, dass die RsbP-Phosphatase in Gegenwart von RsbV einen positiven Einfluss auf die Stärke der generellen Stressantwort bei Kältestress hat und so positiv modulierend in die Aktivierung von SigB in der Kälte eingreift.

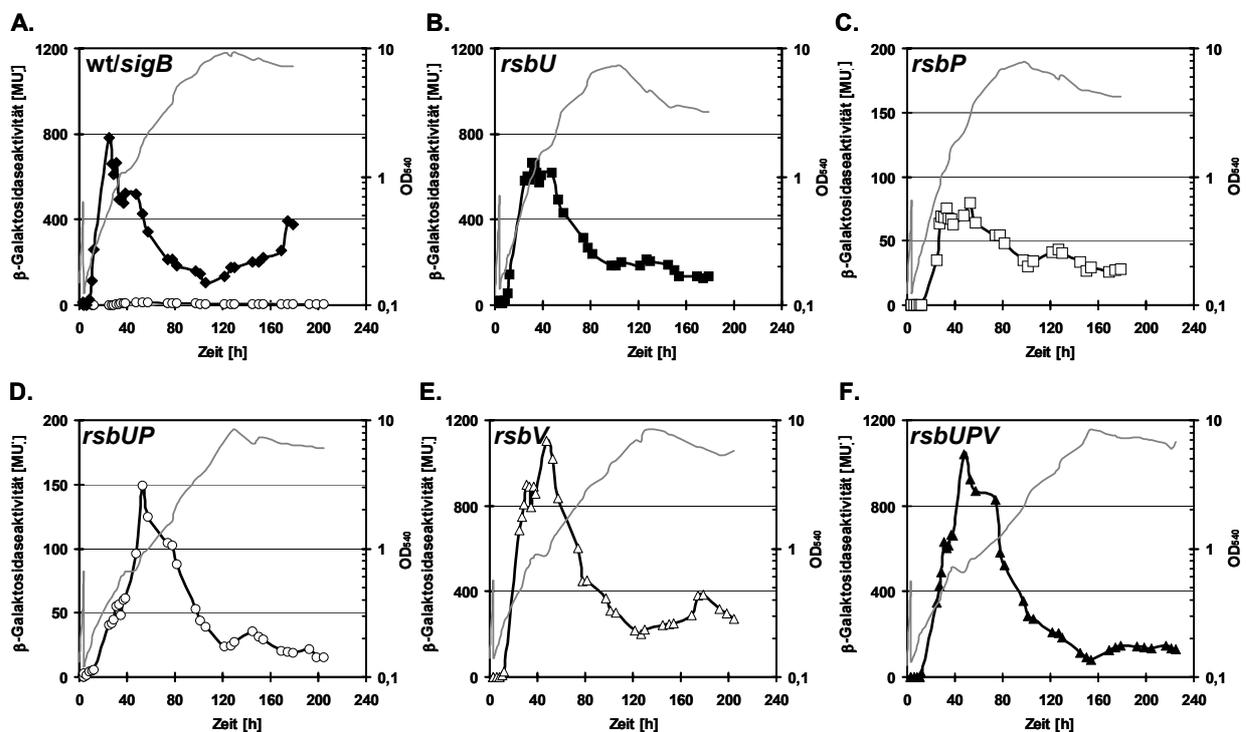


Abb. 6.24: Expression einer SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Fusion in verschiedenen Regulatormutanten bei 16 °C. Ein *B. subtilis* Wildtyp (BSM151) (\square) und isogene Stämme mit Nullmutationen in den Regulatoren der SigB-Aktivität (\blacksquare *rsbU*, \square *rsbP*, \bullet *rsbUP*, Δ *rsbV*, \blacktriangle *rsbUPV*, \circ *sigB*) wurden in SMM kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität während des gesamten Wachstums (–) verfolgt. Nachdem die Zellen zuvor bei 37 °C bis zu einer $OD_{540} = 0,5$ gewachsen waren, wurde die Kultur mit vorgewärmtem SMM auf eine $OD_{540} = 0,1$ verdünnt und auf 16 °C umgesetzt. Die Enzymaktivität ist in Miller units [MU] angegeben.

Der Anti-Antisigmafaktor RsbV war bisher ein positiver Regulator der SigB-Aktivität, weil er durch Komplexbildung mit RsbW die Entlassung von SigB ermöglichte. Ein Vergleich der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten in einer *rsbUP*-Mutante (Abb. 6.24 D) mit der *rsbUPV*-Tripelmutante zeigen, dass bei intaktem RsbV die Kälteinduktion wesentlich schwächer ausfällt als in der Tripelmutante (Abb. 6.24 F). Daraus ist abzuleiten, dass RsbV in der Kälte kein positiver Faktor bei der Aktivierung von SigB ist, sondern einen negativen Einfluss auf die Entlassung von SigB aus dem inhibierenden Komplex mit RsbW hat. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, weil es einen neuen Aspekt zur Rolle von RsbV in der Regulationskaskade der generellen Stressantwort definiert.

6.2.8. Wachstumsexperimente bei 15 °C und 13 °C

Die Bedeutung der generellen Stressproteine für die Adaptation an niedrige Temperaturen wird auch durch die mit den Regulatormutanten durchgeführten Wachstumsexperimente unterstützt.

In der Abb. 6.25 A ist zu sehen, dass die *rsbU*- und die *rsbV*-Mutante bei 15 °C wie der Wildtyp wachsen. Eine Reduktion des Wachstums ist bei der *rsbP*- und der *rsbUP*-Mutante zu erkennen, die von einer verminderten Induktion des Regulons begleitet wird (Abb. 6.24 C und D). Die *rsbUPV*-Tripelmutante zeigt nicht nur eine volle Induktion des SigB-Regulons (Abb. 6.24 F), sondern auch ein wiederhergestelltes Wachstum bei niedriger Temperatur (15 °C).

Bei 13 °C wuchsen alle Stämme innerhalb von 300 h höchstens auf eine $OD_{540} = 1$. Das bedeutet, dass bei 13 °C das untere Temperaturlimit für *B. subtilis* (168) unter diesen Wachstumsbedingungen anzusiedeln ist. Allerdings war auch hier zu sehen, dass die *rsbUP*-Mutante, genau wie die *sigB*-Mutante deutlich schlechter wuchs als der Rest.

Der zeitliche Ablauf der Induktion der *gsiB::gfp*-Fusion bei 13 °C ist in Abb. 6.26 dargestellt. Die Bilder dokumentieren die Induktion während der ersten 120 h nach dem Umsetzen auf 13 °C aus der Abb. 6.25 B. Direkt nach dem Umsetzen gab es keine Induktion der GFP-Fusion. Erst nach 22 h war ein schwaches, nach 48 h ein besseres und nach 72 h ein deutliches GFP-Signal als Zeichen der Induktion der generellen Stressantwort zu sehen. Die Intensität der Fluoreszenz nahm auch noch nach 100 und 120 h zu.

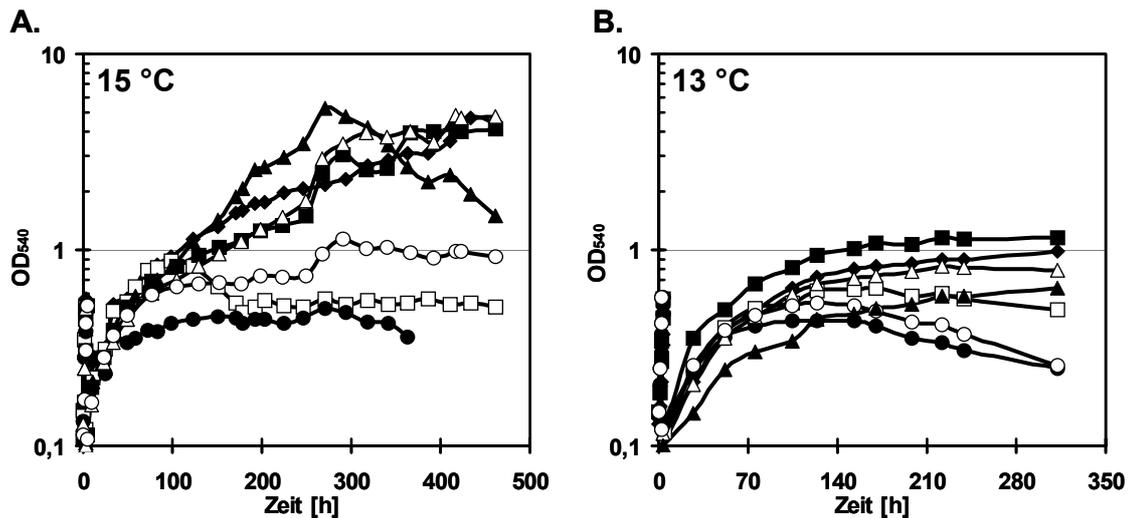


Abb. 6.25: Wachstum der verschiedenen Regulatormutanten bei 15 °C und 13 °C. Nachdem ein \square *B. subtilis* Wildtyp und die isogenen Mutanten in den Genen \blacksquare *rsbU*, \square *rsbP*, \bullet *rsbUP*, \triangle *rsbV*, \blacktriangle *rsbUPV* und \circ *sigB* zuvor bei 37 °C bis zu einer $OD_{540} = 0,5$ gewachsen waren, wurden die Kulturen mit vorgewärmtem SMM auf eine $OD_{540} = 0,1$ verdünnt und auf (A) 15 °C bzw. (B) 13 °C umgesetzt.

Eine erste Induktion war in der *rsbP*-Mutante nach 48 h zu detektieren. Aber hier wurde die Fluoreszenz über die Zeit nicht deutlich stärker. Insgesamt war die Induktion der Reporterfusion in dieser Mutante am schwächsten, was mit den Ergebnissen der *ctc::lacZ*-Messungen bei 16 °C übereinstimmt. Genau wie im Wildtyp war in der *rsbU*-Mutante nach 22 h eine schwache Induktion von *gsiB::gfp* zu sehen. Diese nahm während des weiteren Wachstums stetig zu, erreichte aber nie die Intensität des Wildtyps. In der *rsbV*-Mutante und der *rsbUPV*-Tripelmutante war eine erste Induktion der GFP-Fusion nach 48 h festzustellen. Auch hier stieg die Expression während des Wachstums immer weiter an und war mindestens genauso stark wie im Wildtyp. Die *sigB*-Mutante transkribierte die *gsiB::gfp*-Fusion bei 13 °C zu keinem Zeitpunkt. Alle Stämme zeigen ein vergleichbares Induktionsmuster während des Wachstums bei 13 °C und 16 °C, allerdings mit einer leichten zeitlichen Verzögerung bei 13 °C.

Als Kontrolle wurde die Anschaltung nach Ethanolstress mit abgebildet. Wie erwartet, wurde nach Einwirkung von Ethanol eine Fluoreszenz nur im Wildtyp und in der *rsbP*-Mutante detektiert.

Auch das Wachstumsexperiment bei 13 °C zeigt die Bedeutung der generellen Stressantwort für *B. subtilis* in der Kälte. Die *rsbP*-, *rsbUP*- und *sigB*-Mutante, die die schwächste Induktion des SigB-Regulons aufweisen, wachsen hier am schlechtesten. Zudem lysieren *rsbUP*-Mutante und die *sigB*-Mutante nach dem Übergang in die stationäre Phase schneller, als alle anderen beobachteten Stämme.

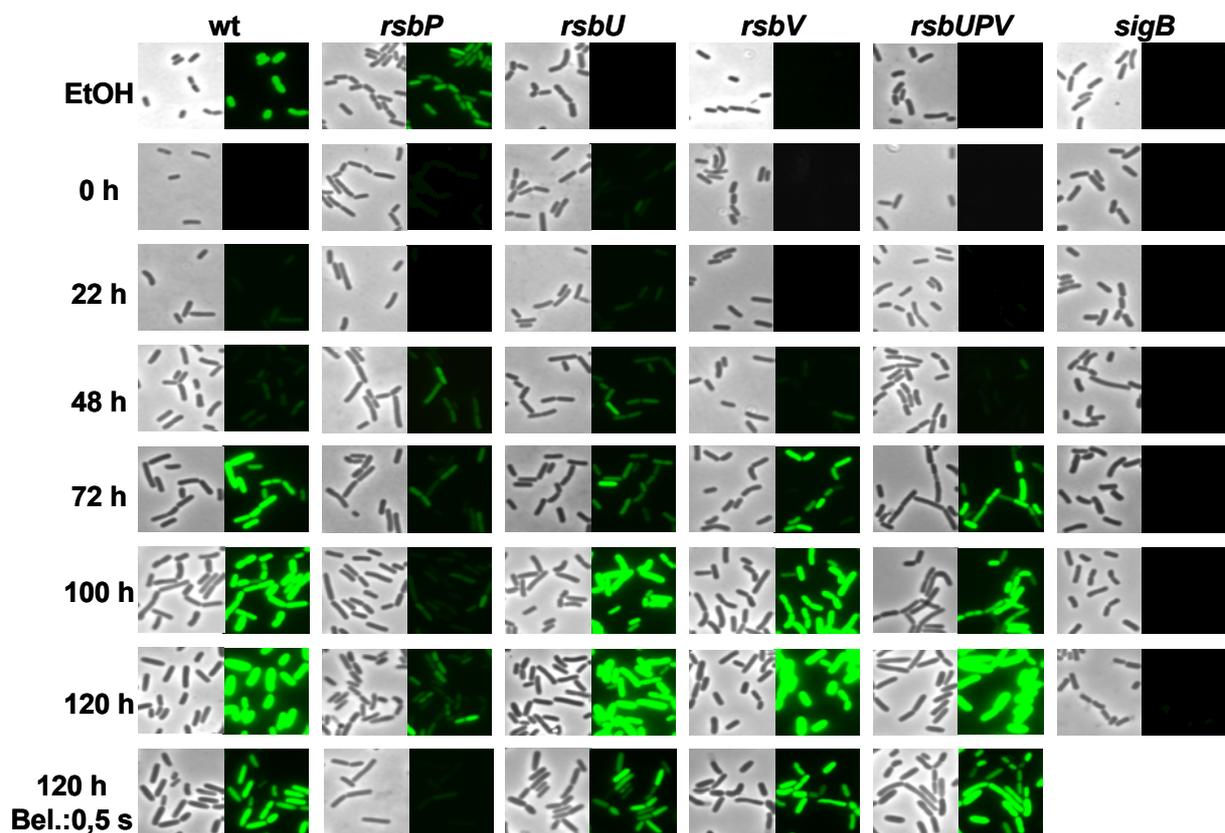


Abb. 6.26: Zeitlich aufgelöste Induktion der Expression einer SigB-abhängigen *gsiB::gfp*-Fusion in verschiedenen Regulatormutanten bei 13 °C. *B. subtilis* (BSM269) und isogene Mutanten in den Genen *rsbU* (BSM277), *rsbP* (BSM278), *rsbV* (BSM275), *rsbUPV* (BSM280) und *sigB* (BSM276) wurden in SMM bei 13 °C kultiviert. Über einen Zeitraum von 100 h wurden 1 ml Proben entnommen. Zusätzlich wurden alle Stämme $OD_{540} = 0,5$ 1 h mit 4% Ethanol gestresst. Die Proteinbiosynthese wurde durch die Zugabe von Erythromycin (200 mg / ml) gestoppt. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf einem Objektträger mit 1%iger Agarose immobilisiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiolabmikroskopsystem und dem Programm Axiovision 4.0 visualisiert. Alle Aufnahmen sind bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen worden. Die Fluoreszenz wurde mit einem 450-490/FT510/LP520 Filterset beobachtet und die Ringblende für das Objektiv war Ph3. Die Belichtungszeit betrug 2 s für alle Fluoreszenzbilder und 1s für die Phasenkontrastbilder. In der letzten Reihe ist die Belichtungszeit für die überbelichteten Fluoreszenzbilder auf 0,5 s reduziert.

6.2.9. Phosphorylierungsstatus von RsbV bei niedriger Temperatur

Die Schlüsselreaktion bei der Aktivierung von SigB nach Einwirkung von metabolischem Stress oder Umweltstress ist die Dephosphorylierung von RsbV. Diese Dephosphorylierung wird durch die beiden Stressphosphatasen RsbU und RsbP nach der Einwirkung eines Stressors katalysiert. Die RsbU-Phosphatase muss nach Umweltstress erst durch das Protein RsbT aktiviert werden (Yang *et al.*, 1996). Die RsbP-Phosphatase ist schon vor der Einwirkung von metabolischem Stress aktiv, durch den Stimulus wird die Aktivität allerdings noch gesteigert. Somit ist RsbP für das schwache Basalniveau von SigB verantwortlich, dass für die schnelle Induktion der generellen Stressantwort wichtig ist (Vijay *et al.*, 2000). Eine Erklärung für die negativ

modulierende Rolle von RsbV in der Kälte könnte die Änderung des Phosphorylierungsstatus von RsbV in der RsbP-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sein.

Diese Möglichkeit wurde geprüft, indem Gesamtproteinextrakte eines Wildtyps, einer *rsbP*-Mutante und einer *sigB*-Mutante auf Mini-2D-Gelen aufgetrennt wurden. Proteine je einer 37 °C-, 16 °C- und ethanolgestressten Kultur der drei Stämme wurden nach Auftrennung mit der 2D-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit Antikörpern gegen RsbV und RsbW inkubiert.

In der Abb. 6.27 ist zu sehen, dass in ungestressten Zellen bei 37 °C mehr inaktives RsbV~P zu sehen ist als RsbV. Erst durch die Einwirkung von 4% Ethanol sollte innerhalb von 10 min nach der Zugabe des Stimulus eine Verlagerung von RsbV~P zu aktivem RsbV stattfinden (Völker *et al.*, 1995a). Dieser Wechsel von RsbV~P zu RsbV konnte für alle drei untersuchten Stämme nach 10 min Ethanolstress nachgewiesen werden. Zusätzlich war durch die stressinduzierte Expression des *sigB*-Operons eine Zunahme an RsbV und RsbW im Wildtyp und der *rsbP*-Mutante zu sehen. Bei 16 °C ist im Wildtyp im Vergleich zur 37 °C-Kultur eine Zunahme an RsbV im Verhältnis zu RsbV~P zu sehen. Diese Verlagerung von mehr RsbV~P bei 37 °C zu mehr RsbV bei 16 °C ist in der *rsbP*-Mutante deutlich stärker ausgeprägt. Dieses Ergebnis impliziert,

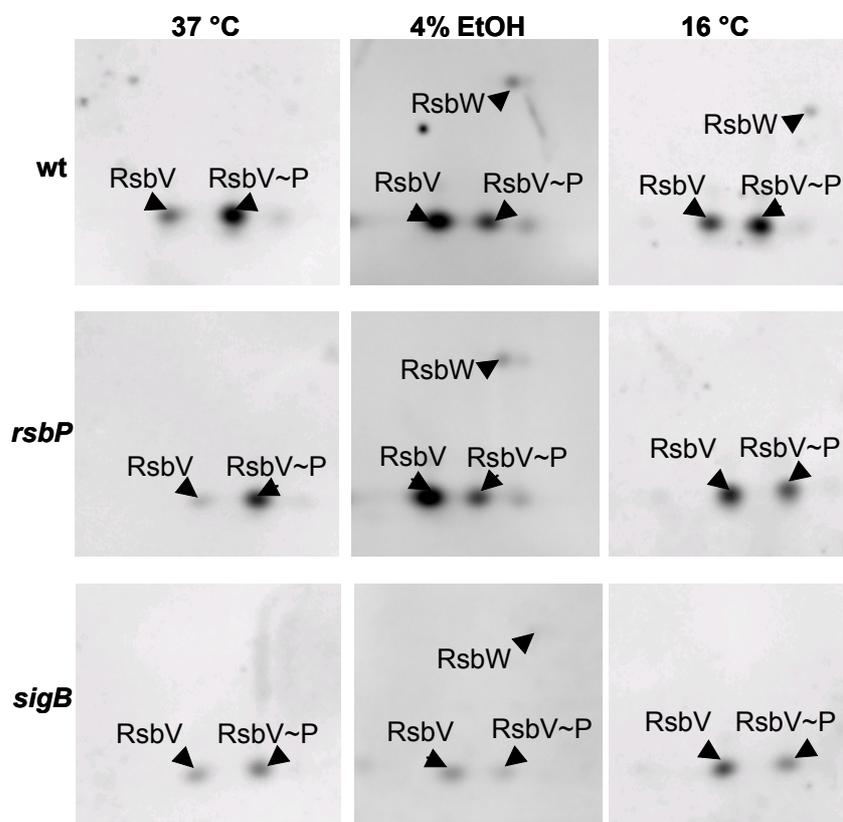


Abb. 6.27: Analyse des Phosphorylierungsstatus von RsbV bei 16 °C. Gesamtproteinextrakte eines Wildtyps (BSM151), einer isogenen *rsbV*-Mutante (BSM155) und einer isogenen *sigB*-Mutante (BSM156) wurden mit Hilfe von Mini-2D-Gelen aufgetrennt und dann auf eine Nylonmembran transferiert. Die Proteine RsbW und RsbV wurden mit monoklonalen Antikörpern detektiert. Alle Stämme wurden in SMM kultiviert und bei einer $OD_{540} = 1$ bzw. 10 min nach 4% Ethanolstress geerntet.

dass die Zunahme an dephosphoryliertem RsbV in der *rsbP*-Mutante für den negativ modulierenden Effekt des Anti-Antisigmafaktors in der Kälte verantwortlich sein könnte. Zudem bedeutet es, dass RsbV in der RsbP-Phosphatasemutante bei 16 °C besser dephosphoryliert wird als im Wildtyp. Dies widerspricht der bisherigen Signaltransduktion, in der der Verlust von RsbP zu einer Zunahme an RsbV~P führt. Eigentlich waren wir in unseren Überlegungen davon ausgegangen, dass es in der *rsbP*-Mutante zu einer Akkumulation von RsbV~P kommen würde.

In der *sigB*-Mutante war die detektierte Proteinmenge immer am kleinsten, weil hier keine stressbedingte Induktion stattfinden konnte.

6.2.10. Analyse der Komplexbildung bei 16 °C mittels Gelfiltration

Die bisherigen Untersuchungen belegen, dass die Kälteaktivierung von SigB ohne Mitwirkung von RsbV möglich ist. Die Aktivierung von SigB beruht aber auf einem „partner-switch“-Mechanismus, bei dem RsbW aufgrund der Dephosphorylierung von RsbV~P von SigB zu RsbV wechselt (Alper *et al.*, 1994; Völker *et al.*, 1996).

Eine Analyse der Komplexbildung zwischen RsbV, RsbW und SigB mittels Gelfiltration sollte zeigen, ob eine Komplexbildung zwischen RsbV und RsbW „in vivo“ bei 16 °C stattfindet, oder es zu neuen Komplexbildungen kommt. Diese könnten einen Hinweis auf den Signaltransduktionsmechanismus bei niedriger Temperatur geben.

Über eine präparative Superdex 200 Gelfiltrationssäule wurden die Proteinrohextrakte eines Wildtyps, einer *rsbV*-Mutante und einer *sigB*-Mutante aufgetrennt. Analysiert wurden Proteinrohextrakte von Kulturen, die bei 37 °C oder 16 °C gewachsen waren bzw. für 10 min mit 4% Ethanol gestresst wurden. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden nach Auftrennung durch eine „SDS-PAGE“ auf Nylonmembranen transferiert, die mit Antikörpern gegen RsbV, RsbW und SigB hybridisiert wurden.

Um einen Überblick über die Verteilung der einzelnen Komplexe und Proteine zu bekommen, wurden die Gele der Reihenfolge nach beladen, beginnend mit den hochmolekularen Fraktionen (Abb. 6.28). Analysiert wurde der Molekülmassenbereich von 600-12 kDa, da die zu detektierenden Proteine in diesen Bereich eluieren.

Auf den Membranen sind die Komplexe aus den einzelnen Fraktionen als einzelne Proteine sichtbar, weil die Proteinkomplexe in SDS-Gelen denaturieren. Als Negativkontrolle ist die Komplexverteilung im Wildtyp bei 37 °C abgebildet, da sie die Komplexbildung und -verteilung der Proteine vor Stress zeigt. Hier ist gut zu sehen, dass SigB hauptsächlich in einem Komplex mit RsbW vorliegt. Der wesentliche Teil des SigB/RsbW-Komplexes wurde bei ca. 66 kDa gefunden. Dies lässt auf eine

Komplezzusammensetzung von SigB₁/RsbW₂ schliessen, weil das Molekulargewicht von SigB ca. 30 kDa und dass von RsbW 18 kDa beträgt. Auch ein Teil von RsbV konnte in diesen Fraktionen nachgewiesen werden, weil nicht das gesamte RsbV phosphoryliert ist und dieser Teil mit RsbW interagiert. Dieser vergleichsweise geringe Anteil an RsbV ist vermutlich mitverantwortlich für das Basalniveau an SigB bei 37 °C. Der Hauptteil an RsbV wurde, wie erwartet, alleine in den Fraktionen 95-99 detektiert, die einem ungefähren Molekulargewicht von 13-20 kDa entsprechen. Das Molekulargewicht von RsbV beträgt 13 kDa. Somit liegt dieses Protein bei 37 °C unkomplexiert vor.

Die Komplexbildung nach Stress ist in der Gelfiltrationsanalyse der mit Ethanol behandelten Wildtypprobe dokumentiert. Im hochmolekularen Bereich von 660 kDa konnte SigB-Protein nachgewiesen werden. Dieses ist hier wahrscheinlich mit der RNA-Polymerase assoziiert. Auch der SigB/RsbW-Komplex wurde hier bei 66 kDa detektiert, aber es konnte auch eine verstärkte Bildung eines RsbW/RsbV-Komplexes um die Fraktion 81 detektiert werden, mit einer ungefähren molekularen Masse von ca. 60 kDa, was für eine RsbW₂/RsbV₂-Zusammensetzung spricht. Auch in dieser Probe wurde unkomplexiertes RsbV gefunden (Dufour and Haldenwang, 1994).

In der Wildtypprobe die bei 16 °C gewachsen war, wurde das gleiche Elutionsbild nachgewiesen, wie in der ethanolgestressten Probe. Der Sigmafaktor wurde im hochmolekularen Bereich detektiert, was auf die Assoziation mit der RNA-Polymerase hinweist. Auch bei 16 °C kam es zu einer Komplexbildung zwischen RsbW und RsbV. Wobei hier weniger RsbV im Komplex mit RsbW vorlag und mehr unkomplexiertes RsbV detektiert wurde als nach Ethanolstress. Um zu prüfen, ob die bekannten Komplexbildungen zwischen SigB/RsbW und RsbW/RsbV andere Komplexe überlagern, wurden auch Gesamtproteinextrakte einer *rsbV*-Mutante und einer *sigB*-Mutante nach dem Wachstum bei niedriger Temperatur über die Gelfiltration analysiert. Neben dem SigB/RNA-Polymerasekomplex und dem SigB/RsbW-Komplex wurde in der *rsbV*-Mutante eine schwache RsbW-Akkumulation um die Fraktionen 86-87 bei einem ungefähren Molekulargewicht von 35 kDa festgestellt. Dies entspricht dem RsbW₂-Homodimer, wie es in der Literatur beschrieben ist (Dufour and Haldenwang, 1994; Dufour *et al.*, 1996; Völker *et al.*, 1995b). Es könnte sich aber auch um einen anderen alternativen Komplex mit einem unbekanntem kleinen Protein handeln. Auch in der *sigB*-Mutante konnten neben dem RsbW/RsbV-Komplex und dem unkomplexierten RsbV in der Kälte keine eindeutig neuen Komplexe der drei Regulatoren der generellen Stressantwort entdeckt werden.

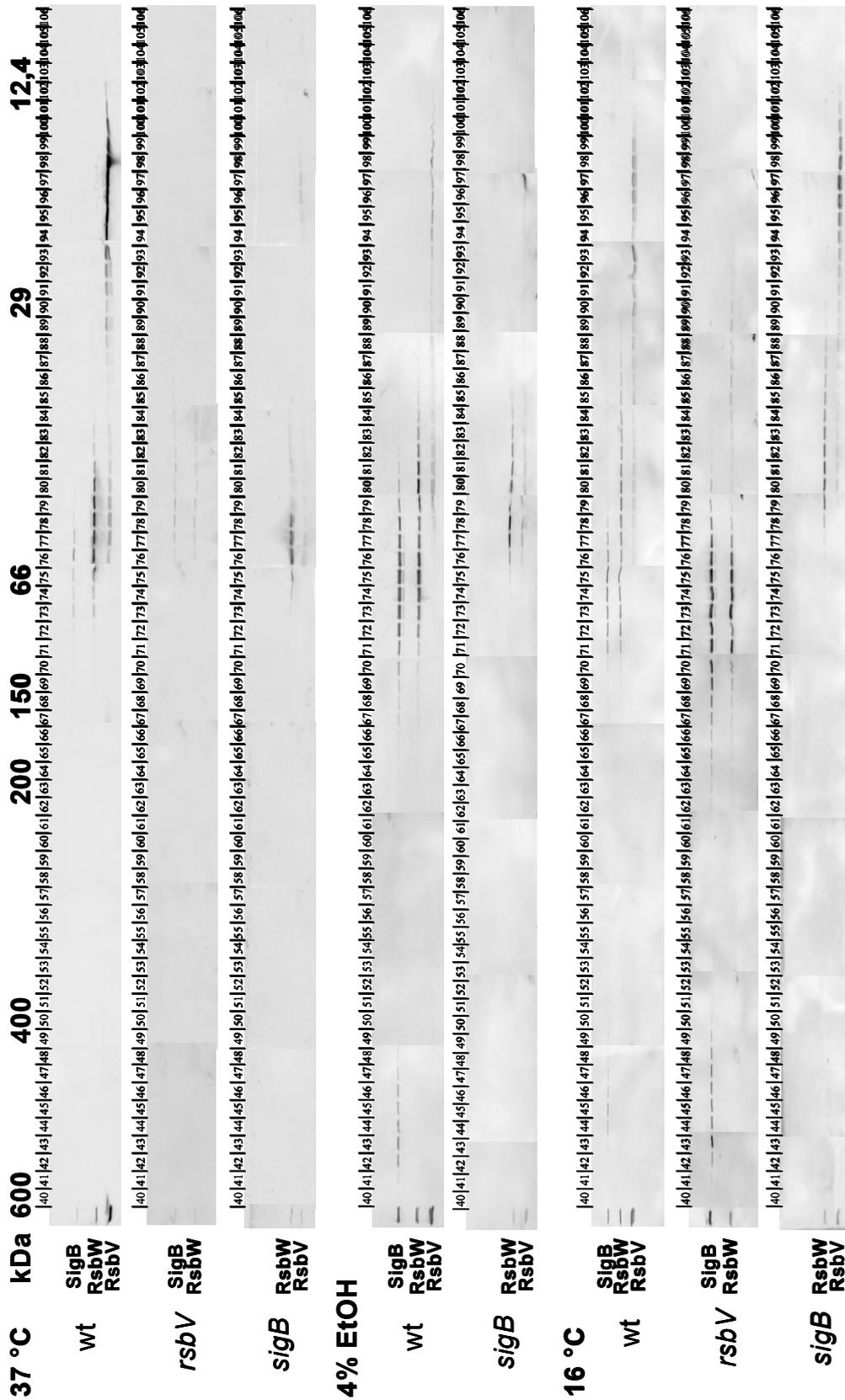


Abb. 6.28: Analyse der Komplexbildung von RsbV, RsbW und SigB mittels Gelfiltration. Gesamtproteinextrakte eines Wildtyp (BSM151), einer isogenen rsbV-Mutante (BSM155) und einer isogenen sigB-Mutante (BSM156) wurden über eine HiLoad 16 / 60 200 pregrade Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die Komplexbildung zwischen RsbV, RsbW und SigB bei 37°C, 16°C und 4% Ethanolstress wurde über einer Westernblotanalyse mit monoklonalen Antikörpern für die genannten Proteine untersucht. Die Zellen wurden alle in SMM kultiviert und bei einer OD₅₄₀= 1 bzw. 10 min nach 4% Ethanolstress geerntet. Für jeden Westernblot sind die aufgetragenen Fraktionen mit der entsprechenden Nummer angegeben. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Links vor den Proteinfaktionen sind 30 µg Protein aus dem entsprechenden Gesamtproteinextrakt aufgetragen.

6.2.11. Prüfung einer Beteiligung von RelA an der Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur

Die RelA-vermittelte „stringent response“ spielt bei der Signaltransduktion nach metabolischem Stress oder Umweltstress zur Aktivierung von SigB in *B. subtilis* keine bekannte Rolle. Allerdings konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass das Alarmon ppGpp eine entscheidende Funktion bei der Interaktion von alternativen Sigmafaktoren mit der RNA-Polymerase hat. In *E. coli* ist die Induktion der Regulons des generellen Stresssigmafaktors RpoS und des Hitzeschocksigmafaktors Sig32 in *relA*-Mutanten deutlich schwächer als im Wildtyp, obwohl ppGpp für die Aktivität der beiden Sigmafaktoren nicht absolut benötigt wird. Mit Mutanten in *rpoD*, dem Gen des „Housekeeping“-Sigmafaktors in *E. coli*, die eine geringere Affinität zur RNA-Polymerase haben oder der Überproduktion von Rsd, dem Antisigmafaktor von SigD, konnte die volle Induktion des SigS-Regulons und des Sig32-Regulons in *relA*-Mutanten wiederhergestellt werden (Jishage, 2002). Zusätzlich dokumentierten die Autoren mit „in vitro“-Transkriptionsassays, dass die Zunahme der Konzentration an ppGpp die Fähigkeit von Sig70 einschränkt mit Sig32 um die Bindung an das Coreenzym der RNA-Polymerase zu konkurrieren. Somit entscheidet die RelA-vermittelte „stringent response“ mit über die Konkurrenzfähigkeit alternativer Sigmafaktoren bei der Bindung an das Coreenzym der RNA-Polymerase in Abstimmung mit den zellulären Forderungen bei physiologischem Stress.

In *B. subtilis* wurde in *spo0H*- und *spo0A*-Mutanten eine ungewöhnliche Induktion der stärksten SigB-abhängigen Gene *gsiB* und *gspA* nach Aminosäurelimitation gefunden. Diese verstärkte Expression war SigB-vermittelt, obwohl Aminosäuremangel kein Induktor der generellen Stressantwort in *B. subtilis* ist. Die Untersuchung des Induktionsmechanismus belegte, dass die ungewöhnliche Expression nur der stärksten Mitglieder des SigB-Regulons abhängig von RelA war (Eymann, 2001). In diesem Fall veränderte der Wegfall des alternativen Sigmafaktors SigH die Konkurrenzbedingungen um freie Coreenzyme der RNA-Polymerase zu Gunsten von SigB.

Der Einfluss von RelA auf die Induktion der generellen Stressantwort in der Kälte sollte mit Hilfe der SigB-abhängigen *gsiB::gfp*-Fusion analysiert werden. Dazu wurde eine Nullmutation von *relA* in einen Wildtyp, eine *rsbP*- und eine *rsbV*-Mutante inseriert. Zum Vergleich der Induktionsmuster wurden ein Wildtyp, eine *rsbP*-Mutante, eine *rsbV*-Mutante und die entsprechenden *relA*-Mutanten bei 16 °C inkubiert und die GFP-Fluoreszenz mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen.

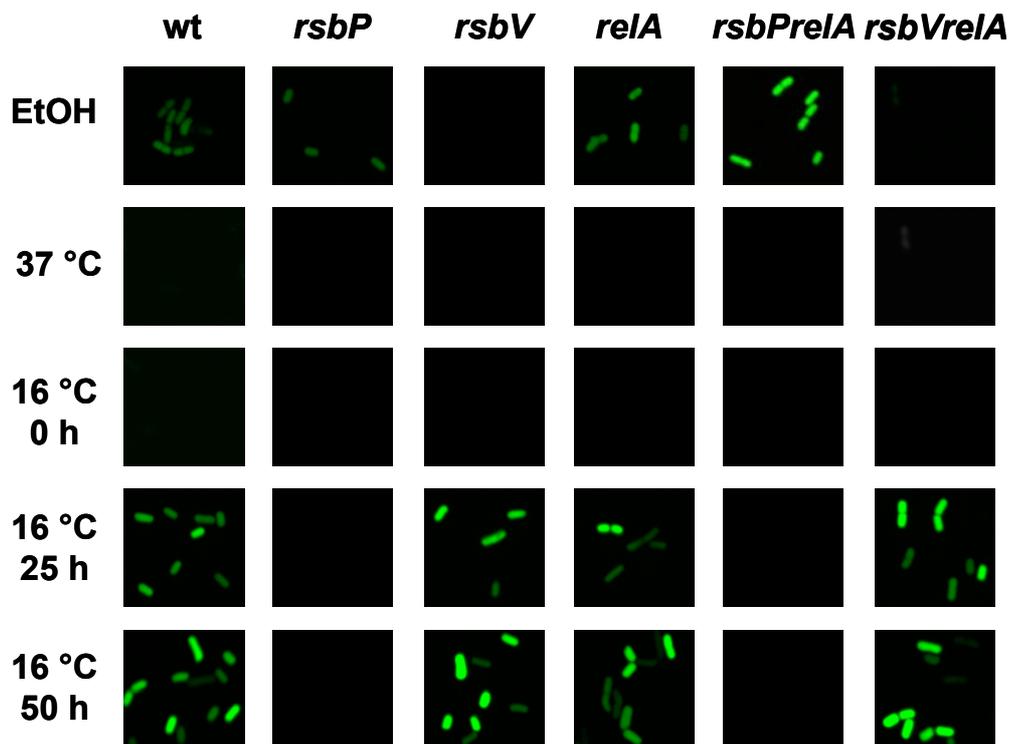


Abb. 6.289: Analyse des Einflusses der „strigent response“ auf die Expression einer SigB-abhängigen *gsiB::gfp*-Fusion in isogenen *relA*-Mutanten bei 16 °C. *B. subtilis* (BSM269) und die isogenen Mutanten BSM278 (*rsbP*), BSM275 (*rsbV*), BSM282 (*relA*), BSM283 (*relArsbP*) und BSM284 (*relArsbV*) wurden in SMM bei 16 °C kultiviert. Über einen Zeitraum von 50 h wurden je 1 ml Proben entnommen. Zusätzlich wurden alle Stämme $OD_{540} = 0,5$ 1 h mit 4% Ethanol gestresst. Die Proteinbiosynthese wurde durch die Zugabe von Kanamycin (60 mg / ml) gestoppt. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf einem Objektträger mit 1%iger Agarose immobilisiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop von Nikon visualisiert. Alle Aufnahmen sind bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen worden. Die Belichtungszeit betrug 5s.

Als Kontrolle wurde die Expression von *gsiB::gfp* nach Ethanolstress aufgenommen. Die Bilder zeigen, dass das Einbringen einer *relA*-Deletion das Induktionsmuster eines Wildtyps, einer *rsbP*- oder *rsbV*-Mutante in Reaktion auf niedrige Temperatur nicht erkennbar beeinflusst. Dieser Versuch demonstriert, dass RelA vermutlich keine Rolle bei der Regulation der generellen Stressantwort in der Kälte spielt.

6.2.12. Niedrige Sporulationsfrequenz in der Kälte

Die besondere physiologische Signifikanz der kältebedingten Induktion der generellen Stressantwort wurde durch Experimente von Abdallah Bashir deutlich (Bashir, 2001). Er konnte zeigen, dass bei niedriger Temperatur die Ausbildung von Endosporen in *B. subtilis* deutlich reduziert ist.

In Tab. 6.10 wurde die Sporulationsfrequenz in einer *rsbV*- und einer *sigB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Untersucht wurde die Anzahl der hitzeresistenten Sporen nach 130 h bei 16 °C in den drei Stämmen. Auch hier ist zu

sehen, dass nur zwischen 1-5% der Zellen in der Kälte sporulieren, im Vergleich zu einer Sporulationsfrequenz von 70-80% bei 37 °C. Allerdings hat eine Mutation in *rsbV* oder *sigB* keinen Einfluss auf die niedrige Bildung von Endosporen in der Kälte und unterstreicht so die Bedeutung der generellen Stressantwort bei niedriger Temperatur als eine alternative Überlebensstrategie.

Tab. 6.10: Sporulationsfrequenz bei niedriger Temperatur (16 °C).

	GZZ	Sporen	Sporulation [%]
wt	4,28*10 ⁷	5,03*10 ⁵	1,17
<i>rsbV</i> -Mutante	3,56*10 ⁶	2,03*10 ⁵	5,75
<i>sigB</i> -Mutante	2,58*10 ⁶	1,44*10 ⁵	5,58

B. subtilis-Wildtyp (BSM151) und die isogenen Mutanten BSM155 (*rsbV*-Mutante) und BSM156 (*sigB*-Mutante) wurden bei 37 °C bis zu einer OD₅₄₀= 0,5 inkubiert. Diese Kulturen wurden mit vorgewärmtem SMM auf eine OD₅₄₀= 0,1 verdünnt und weiter bei 16 °C kultiviert. In der stationären Phase (130 h) wurden je 1 ml Proben von allen Stämmen entnommen und in einer Verdünnungsreihe bis 10⁻⁷ verdünnt. Von jeder Probe wurden 200 µl auf LB-Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine weitere Probe von jedem Stamm wurde für 30 min mit 80 °C hitzebehandelt. Auch diese Proben wurden wieder bis 10⁻⁷ verdünnt und auf LB-Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden gezählt. Die Sporulationsfrequenz [%] ergibt sich aus dem Verhältnis von hitzestabilen Sporen zur Gesamtzellzahl (GZZ).

7. Diskussion

7.1. Aufbau der Transkriptomstudie zur Induktion der generellen Stressantwort

Erst die abgeschlossene Sequenzierung des Genoms von *B. subtilis* ermöglichte eine genomweite Studie der generellen Stressantwort (Kunst *et al.*, 1997). Schon vorher waren einige Mitglieder des SigB-Regulons identifiziert worden. Dabei zeichnete sich ab, dass der alternative Sigmafaktor SigB mit über 100 Genen eines der größten Regulons in diesem Gram-positiven Modellorganismus kontrolliert. Die meisten dieser generellen Stressproteine konnten durch Proteomstudien der generellen Stressantwort zugeordnet werden (Antelmann *et al.*, 1995; Antelmann *et al.*, 1997a; Antelmann *et al.*, 1997c; Bernhardt *et al.*, 1997; Petersohn *et al.*, 1999a; Völker *et al.*, 1994). Allerdings erlaubten Proteomanalysen mit 2D-Gelen nur einen begrenzten Blick auf die Zusammensetzung des Regulons, da mit dieser Technik Membranproteine, sehr kleine Proteine und Proteine, die lediglich in geringen Mengen in der Zelle vorkommen, nur schwer zugänglich sind. Zudem können mit den aktuellen Trennmethode nur ca. 1500 Proteine auf einem 2D-Gel differenziert werden, also ungefähr $\frac{1}{3}$ aller möglichen Genprodukte von *B. subtilis*. Doch in anderen genetischen und sequenzbasierenden Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass auch Membranproteine zu den GSP gehören, die eine Funktion bei der Adaptation der Zelle an Stress haben (Boylan *et al.*, 1991; Boylan *et al.*, 1993b; Petersohn *et al.*, 1999b). Zum Verständnis der physiologischen Funktion der generellen Stressantwort in der Auseinandersetzung von *B. subtilis* mit schnell wechselnden Umweltbedingungen war eine umfassende Beschreibung des Regulons notwendig. Mit Hilfe der Arraytechnologie konnten die Limitationen der 2D-Analyse umgangen werden und erstmals eine weitgehend komplette Studie über die veränderte Genexpression nach Einwirkung von Umweltstress umgesetzt werden. Fokussiert wurde die Studie auf die Expression des generellen Stressregulons nach Einwirkung von Ethanol, Hitze und Salz, weil diese drei Stressarten sehr gute Aktivatoren von SigB sind und sich diese Stressexperimente gut umsetzen ließen. Es war wichtig, verschiedene Stressarten in die Versuche einzubeziehen, um die generelle Stressantwort besser von den spezifischen Stressreaktionen trennen zu können. So wurde allerdings gleichzeitig eine Analyse der

faktorspezifischen Stressantworten nach Salz, Hitze und Ethanol möglich, was die Vernetzung der einzelnen Adaptationsantworten verdeutlicht. Mit dem Einsatz der *rsbX*-Suppressormutante sollten die SigB-abhängig exprimierten Gene gut definierbar werden, da in dieser Regulatormutante durch Entkopplung der RsbX-abhängigen „Feedback“-Regulation der generellen Stressantwort eine erhöhte Expression der GSP vorliegt. Die Northernblotanalyse und die Arraystudie für *gsiB* bestätigen diese Theorie. Die Scatterplots in Abb. 6.4 belegen, dass SigB-induzierte Gene in der *rsbX*-Suppressormutante stark transkribiert wurden. Die Induktionsverhältnisse aus dem Vergleich mit einer *sigB*-Mutante dokumentieren, dass Gene mit einem SigB-bestimmten Expressionsmuster hier genauso gut zu identifizieren waren, wie in den anderen Gegenüberstellungen.

Eine autonome Beurteilung der SigB-Abhängigkeit eines Gens wurde durch die Promotoranalyse erreicht.

7.1.1. Auswertung der Identifizierungsstrategien für die verschiedenen Stressantworten

Durch die Kombination von Arrayhybridisierung und Promotorsuche konnte mit Hilfe schon bekannter SigB-abhängiger Gene eine Suchschablone zur Identifizierung neuer Mitglieder des SigB-Regulons erstellt werden.

- I. Induktion im Wildtyp bei zwei von drei Stressarten (Hitze, Salz, Ethanol) und eine verlängerte Induktion in der *rsbX*-Suppressormutante
- II. Ausbleiben der Induktion in der *sigB*-Mutante
- III. Ein potentieller SigB-abhängiger Promotor vor dem Gen.

Von 64 bekannten SigB-abhängigen Genen konnten 50 mit diesen Bedingungen bestätigt werden. Außerdem wurden so 50 weitere Gene als mögliche neue Mitglieder des SigB-Regulons beschrieben.

Bei dieser Auswertung der Arraydaten wurde die Gruppe der doppelkontrollierten Gene vernachlässigt. Schon in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, dass eine Reihe von SigB-abhängigen Genen noch durch einen weiteren Regulator kontrolliert werden. Viele dieser Gene, wie *clpP* und *yvyD* zeigen deshalb auch in der *sigB*-Mutante eine Stressinduktion. Um diese Klasse von Genen ebenfalls zu charakterisieren, mussten neue Suchkriterien bestimmt werden. Entscheidend für die Wahl waren auch hier die Induktionsmuster der bereits in der Literatur beschriebenen SigB-regulierten Gene mit einer zusätzlichen Kontrolle:

- I. Induktion in Wildtyp und *sigB*-Mutante bei zwei von drei Stressarten (Hitze, Salz, Ethanol)
- II. Existenz eines potentiellen SigB-abhängigen Promotors vor der Transkriptionseinheit

Eine besondere Bedeutung kam bei dieser Gruppe dem Promotor zu, weil die doppelkontrollierten Gene des SigB-Regulons nur so von anderen Stressgenen zu unterscheiden waren, die SigB-unabhängig durch mehr als einen Stress induziert wurden.

So konnten neben 13 schon bekannten SigB-abhängigen Genen mit einer zusätzlichen Kontrolle, 11 weitere doppelkontrollierte Gene gefunden werden, die möglicherweise für generelle Stressproteine kodieren.

Insgesamt konnten in dieser Transkriptomstudie 124 Gene identifiziert werden, die wahrscheinlich durch den alternativen Stresssigmafaktor SigB reguliert werden. Eine unabhängige Bestätigung der SigB-Abhängigkeit konnte in Northernblotanalysen für die Gene *ycnH*, *yjgD* und *yqgZ* schon erbracht werden. Dies ist auch für die anderen neuen Mitglieder des Regulons notwendig, um mögliche Falschpositive zu eliminieren.

In dieser Studie wurden 13 zuvor als SigB-abhängig beschriebene Gene nicht bestätigt. Dabei ist nicht auszuschließen, dass es sich bei einigen um Falschpositive aus früheren Studien handelt. Aber für manche dieser nicht bestätigten GSP ist die SigB-Abhängigkeit experimentell eindeutig bewiesen, wie bei *opuE* und *csbA*. Die fehlende Identifizierung als Mitglied des SigB-Regulons ist in diesen Fällen mit Artefakten bei den Arrayhybridisierungen zu erklären. Diese können durch Mängel bei der Herstellung der PCR-Produkte oder der Qualität der Primer für die cDNA-Synthese entstanden sein. Dies gilt auch für die fehlende oder schwache Induktion von Genen, die eindeutig SigB-reguliert sind, weil sie gemeinsam mit anderen klar identifizierten generellen Stressproteinen in einem Operon transkribiert werden (siehe *bmrR*). Da bei diesen Genen die Zugehörigkeit zum SigB-Regulon durch die Operonstruktur bewiesen ist, wurden solche Gene trotz der nicht eindeutigen Stressinduktion in die Liste der SigB-kontrollierten Gene aufgenommen.

Ein Schwachpunkt der Arrayhybridisierungen ist somit die optimale Wahl der Primer für die cDNA-Synthese und aller PCR-Produkte auf der Nylonmembran. Die Primer und PCR-Produkte müssen eine größtmögliche Spezifität für das jeweilige Gen aufweisen und gleichzeitig ähnliche Hybridisierungseigenschaften haben, um bei einer Temperatur das spezifische cDNA-Produkt gleichgut zu binden. Weil dies bei 4107 Genen nur bedingt möglich ist, können die Induktionswerte der Gene nur als

semiquantitativ angesehen werden. So erfüllen 38 Gene die Kriterien für ein SigB-abhängiges Gen nur knapp nicht, weil die Induktion knapp unter dem Faktor 2 lag oder kein bzw. nur ein schwacher SigB-abhängiger Promotor vor dem Leserahmen lokalisiert war.

Eine andere Erklärung für die fehlende Induktion könnte eine komplexe Kontrolle der Gene sein, durch die die SigB-Abhängigkeit überdeckt wird, wie beispielsweise ein schwach ausgeprägter Promotor. Das Fehlen eines SigB-Promotors trotz einer klaren SigB-abhängigen Induktion könnte auf eine indirekte Kontrolle der Gene hinweisen.

7.1.2. Beurteilung der Funktionen neuer SigB-abhängiger Gene

Die umfassende Einteilung eines Genoms in verschiedene Stimulons und Regulons mit Hilfe der Arraytechnologie dient in erster Linie der Kategorisierung der Gene. Ihre potentielle Aufgabe kann so physiologisch relevanten Faktoren zugeordnet werden. Eine biochemische Beschreibung der Funktion, der hier gefundenen SigB-abhängigen Gene muss folgen, um die physiologische Rolle der generellen Stressantwort zu verstehen.

Die durchgeführten Datenbankanalysen zeigen, dass hier noch viel Potential für weitere Forschungen liegt, weil die meisten der hier identifizierten SigB-abhängigen Gene für Proteine mit einer unbekanntem Funktion kodieren.

Anhand der hier durchgeführten algorithmenbasierenden Lokalisationsanalysen (Nielsen *et al.*, 1997; Sonnhammer *et al.*, 1998) konnte allerdings gezeigt werden, dass viele spezifische und generelle Stressproteine mindestens eine Transmembrandomäne besitzen. Bezogen auf die generelle Stressantwort scheinen sogar $\frac{1}{5}$ aller in dieser Studie beschriebenen *sigB*-abhängigen Gene für ein Protein mit Transmembranhelix zu kodieren. Zu diesen Proteinen gehört YtaB, eine UDP-Glukose-1-phosphat-uridylyltransferase, die an der Anpassung der Zellwandbiosynthese unter Stress beteiligt sein könnte. Aber auch einige Transporter, die den Abtransport von toxischen Substanzen aus der Zelle organisieren oder an der Bereitstellung alternativer Nahrungsquellen unter Stress mitwirken können. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass die generelle Stressantwort auch an der Aufrechterhaltung der Hüllenintegrität und Transportkapazität teilnimmt.

Ein weiteres Indiz, dass einige generelle Stressproteine an der Eliminierung von toxischen Substanzen mitwirken (Petersohn *et al.*, 1999b), liefern die Gene für *yqgZ* und *yknA*, die für eine Arsenreduktase bzw. eine Deoxycytidyldeaminase kodieren. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Superoxiddismutase SodA partiell SigB-reguliert ist.

Des Weiteren scheint sich die These (Hecker and Völker, 1998), dass die generelle Stressantwort für eine ausgeglichene Redoxbilanz wichtig ist, durch die potentiellen Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen, wie YvaA und YxnA, ebenfalls zu erhärten.

YfhF, ein potentieller Zellteilungsinhibitor, könnte die Zellteilung verzögern, um der Zelle mehr Zeit zur Reparatur der Stressschäden zu geben.

Aber auch einige potentielle ribosomale Proteine konnten dem SigB-Regulon zugeordnet werden, was auf eine Anpassung der Translation an Stress hinweisen könnte. So hat das erste bekannte SigB-abhängige Gen *ctc* große Ähnlichkeit zum ribosomalen Protein L25 aus *E. coli*. Außerdem bindet Ctc an die 5S Untereinheit des Ribosoms (Schmalisch, 2002). Auch die Sequenz des generellen Stressproteins YtiA zeigt gute Übereinstimmungen mit dem ribosomalen Protein L31 aus *Bacillus halodurans*.

Allerdings konnte bisher nur für wenige generelle Stressproteine eine Rolle in der Resistenzentwicklung der Zelle experimentell nachgewiesen werden. Das DNA-bindende Dps ist eines der wenigen, weil es eine essentielle Funktion bei der Ausbildung der oxidativen Stressresistenz hat (Antelmann *et al.*, 1997b). Eine detaillierte Analyse der Funktionen der einzelnen Stressgene wird entscheidend sein, um die Anforderungen, die die Umwelt an ein Bodenbakterium wie *B. subtilis* stellt, zu verstehen.

Die Bedeutung der Charakterisierung des SigB-Regulons zum besseren Verständnis seiner physiologischen Funktion und die Zweckmäßigkeit von DNA-Arrays für diese Aufgabe belegt die Tatsache, dass zur gleichen Zeit zwei andere Arbeitsgruppen ähnliche Versuche durchführten.

Zur Beschreibung der generellen Stressantwort nutzte C. Price einen von der Firma Millennium Pharmaceuticals hergestellten DNA-Makroarray mit ca. 3900 Leserahmen des *B. subtilis* Genoms. Für die Hybridisierungen wurde die cDNA radioaktiv markiert (Price, 2001).

Sie analysierten die Veränderungen im Transkriptom nach Einwirkung von 4% Ethanol zwischen einem *B. subtilis* Wildtyp und einer isogenen *sigB*-Mutante. Zusätzlich verwendeten sie eine *rsbW*-Mutante, bei der der interne SigB-Promotor durch den P_{spac}-Promotor ersetzt war. So konnten diese Autoren mit IPTG als Induktor die Transkription des kompletten SigB-Regulons stressunabhängig initiieren.

Durch ihre Arrayanalysen konnten sie 127 Gene mit einem SigB-abhängigen Induktionsmuster beschreiben. Parallel starteten die Autoren eine genomweite

Promotorsuche, nach der 123 Gene einen potentiellen SigB-Promotor hatten. Mit beiden Analysen konnten sie 193 mögliche Mitglieder des SigB-Regulons beschreiben. Allerdings hatten nur 57 dieser Gene einen SigB-Promotor und ein SigB-reguliertes Induktionsmuster.

In der anderen genomweiten Transkriptomanalyse untersuchte das Labor um J. Helmann die Hitzeschockantwort von *B. subtilis* mit Hilfe von selbsthergestellten DNA-Mikroarrays (Helmann, 2001). Sie spotteten die PCR-Produkte von 3700 Genen auf Glasslides und hybridisierten diese mit Cy5- und Cy3-markierten cDNA-Proben. Analysiert wurden die Veränderungen in der Genexpression von Zellen die bei 37 °C gewachsen waren und Zellen, die einem Hitzeschock von 48 °C über einen Zeitraum von 20 min ausgesetzt waren. Der Fokus lag dabei auf der Identifizierung neuer SigB-abhängiger Gene. Insgesamt waren auf diesem Mikroarray 123 Gene mit einem SigB-abhängigem Transkriptionsmuster zu lokalisieren. Darunter waren 56 neue Mitglieder des Regulons. Bei allen konnte ein SigB-Promotor dem Gen zugeordnet werden. Ein Nachteil der Arbeit war, dass die Autoren keine *sigB*-Mutante in ihre Analyse miteinbezogen hatten.

Ein Vergleich aller drei Transkriptomanalysen zum SigB-Regulon führt leider zu einem ernüchternden Ergebnis. Nur 61 Gene sind in allen drei Studien als SigB-abhängig zu definieren. Insgesamt sollen 260 Gene durch den alternativen Sigmafaktor SigB kontrolliert werden, was ungefähr 5% aller Gene von *B. subtilis* ausmacht.

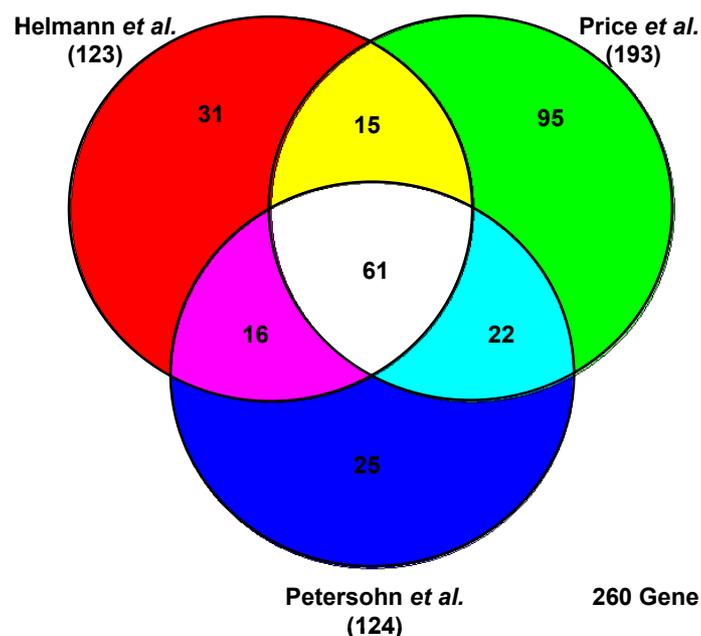


Abb. 7.1: Verteilung aller potentiellen SigB-abhängigen Gene aus drei verschiedenen Transkriptomstudien zur generellen Stressantwort. In der Arbeit von Price et al wurden 193 mögliche Mitglieder des SigB-Regulons beschrieben. In der Arbeit von Helmann et al. 123 Gene und bei Petersohn et al. 124 Gene.

Im abgebildeten Venndiagramm (Abb. 7.1) wird deutlich, dass keine der drei Studien von den anderen besonders abweicht. In allen drei Arbeiten wurden immer über 70% der bekannten SigB-abhängigen Gene gefunden.

Die großen Unterschiede zwischen den drei Analysen sind mit den unterschiedlichen Arrays, Hybridisierungsbedingungen und den verschiedenen Datenanalysemethoden, die zur Evaluation der Daten verwendet wurden, zu erklären. Aber auch die unterschiedlichen Stressbedingungen könnten die Ursache für die starke Varianz in den Studien sein. Aufgrund einer möglichen komplexeren Kontrolle vieler Gene, kann die Wahl der Stressbedingungen einen Einfluss auf das Set von SigB-abhängigen Genen haben, das überhaupt mit diesem Stimuli gefunden werden kann. Bei der Betrachtung nur einer Stressbedingung ist es zudem schwierig, ohne ein weiteres Selektionskriterium die generellen Stressproteine von den spezifischen Stressproteinen zu trennen. Andererseits werden bei der Analyse mehrerer Stimuli hauptsächlich die strikt SigB-abhängigen Gene gefunden. Daher ist es dringend notwendig mit Hilfe aller in diesen drei Studien beschriebenen potentiellen SigB-abhängigen Gene weitere Transkriptionsanalysen durchzuführen, um die methodenbedingten Unterschiede zu reduzieren und weitere mögliche Besonderheiten der generellen Stressantwort zu analysieren. Nur so können die Falschpositiven der drei Studien isoliert und alle Mitglieder des generellen Stressregulons identifiziert werden. Diese Versuche werden momentan von Falk Hertwig und Leif Steil mit DNA-Mikroarrays durchgeführt, die spezifische Oligonukleotidsonden gegen die potentiellen SigB-abhängigen Gene der drei erwähnten Analysen tragen.

7.1.3. Analyse der salzspezifischen Induktion des ECF-Sigmafaktors SigW

Ein Vorteil der Arraytechnologie besteht darin, dass sie bei komplett sequenzierten Genomen einen Überblick der Veränderungen bei der Expression aller Gene eines Organismus gibt. So konnten neben der generellen Stressantwort auch die spezifischen Stressantworten nach Hitze-, Salz- und Ethanolstress analysiert werden. Dabei fällt auf, dass eine kleine Gruppe von sieben Genen unabhängig von SigB durch alle drei Stressarten induziert wurde. Die Aufgabe dieser Gene in der Stressadaptation ist nicht auffällig. Weiterhin bleibt zu klären, ob sie durch einen gemeinsamen Mechanismus reguliert werden.

Wie erwartet wurden nach Ethanol- und Hitzestress die HrcA-kontrollierten Chaperone GroESL und das DnaK-System gefunden, deren Expression durch denaturierte Proteine induziert wird. Allerdings wurden 12 weitere Gene gefunden, deren Regulation und Funktion noch unbekannt ist. Das Gleiche gilt für die 16

ethanolspezifisch induzierten Gene und für die sechs Gene, die nach Hitzestress stärker transkribiert wurden. Letztere gehören daher zur Klasse IV der Hitzeschockgene (Hecker and Völker, 2001).

Das interessanteste Phänomen unter den spezifischen Stressantworten wurde unter den 64 salzinduzierten Genen entdeckt. Außer den osmokontrollierten Opu-Transportern und den Prolinbiosynthesegenen wurde auch das komplette SigW-Regulon durch Salzstress induziert. Durch eine genauere Studie dieses unerwarteten Befundes konnten in Kombination mit einer Promotoranalyse 44 SigW-abhängige Gene identifiziert werden. Darunter waren 24 schon bekannte Mitglieder der Reglons und 20 neue. Zu den identifizierten Regulonmitgliedern gehören auch die Gene für den ECF-Sigmafaktor SigW und seinen Antisigmafaktor RsiW.

In früheren Studien wurden mit Hilfe einer auf Konsensussequenzen basierenden Promotorsuche gekoppelt mit Transkriptionsassays und Reporterstudien die ersten 32 SigW-abhängigen Gene beschrieben (Huang *et al.*, 1999). Alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Mitglieder des SigW-Regulons konnten in einer Transkriptomstudie zur Stressadaptation von *B. subtilis* an Alkalistress bestätigt werden (Wiegert, 2001). Zusätzlich gelang es Wiegert *et al.* weitere 29 Gene neu dem SigW-Regulon zuzuordnen, von denen 19 auch nach Salzstress gefunden wurden. Die SigW-Abhängigkeit des Gens *yoaF* wurde von Cao *et al.* (2001b) unabhängig bestätigt.

Während des *B. subtilis* Genomprojektes wurden sieben ECF-Sigmafaktoren in diesem Bakterium gefunden (Kunst *et al.*, 1997). Diese Gruppe von alternativen Sigmafaktoren reagiert auf extrazytoplasmatische Signale und unterstützt die Zelle bei der Aufrechterhaltung der Hüllenfunktionen. Die Regulation der ECF-Sigmafaktoren erfolgt über einen konservierten Signaltransduktionsweg mit einem membran-gebundenen Antisigmafaktor (Raivio, 2001). Im Fall von SigW sind der Sigmafaktor und sein Antagonist in einem Operon organisiert, das von einem SigW-abhängigen Promotor transkribiert wird (positive Autoregulation) (Huang *et al.*, 1998). Die Charakterisierung von SigW-abhängigen Genen führte zu der Hypothese, dass SigW ein „Antibiosis“-Regulon kontrolliert, welches an der Detoxifizierung der Zelle und an der Produktion von Antibiotika beteiligt ist (Cao, 2001b; Turner and Helmann, 2000).

So kodieren auch die in dieser Arbeit gefundenen SigW-abhängigen Gene hauptsächlich Resistenzgene und ABC-Transporter. Zudem besitzen 18 der beschriebenen SigW-regulierten Gene mindestens eine Transmembrandomäne.

Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Salz und Alkalistress das SigW-Regulon induzieren, sondern auch Vancomycin und andere Antibiotika. Dies untermauert die

These des „Antibiosis“-Regulons weiter. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine *sigW*-Mutante gegenüber dem Zellwandinhibitor Fosfomycin zehnmal sensitiver ist als ein Wildtyp (Cao, 2001a). Auch dies ist ein wichtiger Anhaltspunkt für die Funktion des SigW-Regulons, weil eine *sigW*-Mutante auf die beiden anderen Stimuli Alkali und Salz nicht sensitiver reagiert als der Wildtyp.

Die Induktion des ECF-Sigmafaktors nach Salzstress war überraschend, weil schon andere Gruppen nach möglichen Induktoren des SigW-Regulons gesucht hatten. Dabei hatten Huang *et al.* (1999) und Wiegert *et al.* (2001) auch die Aktivierung von SigW nach Salzstress berücksichtigt. Allerdings führten sie Stressversuche mit 1,2 M NaCl durch. Die „dot blot“-Experimente in dieser Arbeit zeigen aber, dass das SigW-Regulon bei Salzkonzentrationen von 0,2 M und 0,7 M deutlich transient induziert wird. Eine Endkonzentration von 1,2 M NaCl im Medium reprimierte dagegen das SigW-Regulon schwach. Damit scheint die Aufgabe dieses Regulons nicht bei harschem Salzstress, sondern für die Anpassung der Hüllenfunktionen an milden Salzstress wichtig zu sein. Dies erklärt auch, weshalb der Verlust des ECF-Sigmafaktors SigW keine Auswirkung auf das Überleben von *B. subtilis* nach Zugabe 10% NaCl zum Medium hat.

In den Northernblotanalysen für die Operons *yceCDEFGH* und *yfhLM* wurde die salzabhängige Induktion des SigW-Regulons noch einmal bestätigt. Außerdem konnte der „Northern blot“ für *yceCDEFGH* klären, dass dieses Operon nicht, wie in der Arrayanalyse angenommen, auch SigB-abhängig exprimiert wird. Damit ist der prognostizierte SigB-Promotor für die Transkription des Operons nach Salzstress nicht notwendig. Eine Regulation dieses Operons über einen weiteren Regulator ist eher unwahrscheinlich, da die Induktion nach Ethanol auch von SigW kontrolliert sein kann und kein eindeutiger Anstieg der Expression nach Hitzeschock zu sehen war.

Die Transkriptionsanalyse des *yfhLM*-Operons bestätigt, dass beide Gene zusammen mit *yfhK* von SigB transkribiert werden. Der „Northern blot“ zeigt ein Transkript, welches im Wildtyp und in der *sigW*-Mutante vorhanden ist, aber in der *sigB*-Mutante fehlt. Der nicht sehr stark ausgeprägte Terminator zwischen *yfhK* und *yfhL* wird dabei überlesen. Zusätzlich werden *yfhL* und *yfhM* noch von einem SigW-abhängigen Promotor aus reguliert, von dem aus das Operon bei Salzstress ebenfalls transkribiert wird. Die SigW-abhängige Expression der beiden Gene ist dominanter als die SigB-kontrollierte, weil das kleinere und stärkere Transkript nicht in der *sigW*-Mutante detektiert wurde. Für das *yfhLM*-Operon konnte die in den Arrayanalysen vermutete Regulation der Transkription bestätigt werden.

Außerdem zeigt diese Northerblotanalyse, dass der alternative Sigmafaktor SigB und der ECF-Sigmafaktor SigW durch die gemeinsam kontrollierten Gene miteinander verknüpft sind. Diese mögliche Vernetzung der beiden Stressantworten wurde schon vorher von Petersohn *et al.* (1999b) vermutet, nachdem sie zeigen konnten, dass das SigW-abhängige Gen *yjbC* auch von SigB kontrolliert wird.

Dass der ECF-Sigmafaktor SigW und sein Regulon osmotisch induziert wurden, war ein unerwartetes Ergebnis. Eigentlich wurde davon ausgegangen, dass der salzspezifische Anstieg der Expression des SigW-Regulons auf einem ionischen Effekt beruht, weil keines der bekannten osmotisch regulierten Gene einen SigW-Promotor hat. Die „dot-blot“-Analysen mit spezifischen Antisense-RNA-Sonden für *sigW* und *yuaG* beweisen aber, dass das SigW-Regulon osmoreguliert ist. Im Vergleich zu dem ebenfalls osmokontrollierten *opuAA*-Gen ist die Induktion von *sigW* und *yuaG* bei Salzstress transient und nicht anhaltend. Das Gen *opuAA* kodiert einen Teil des ABC-Transporters OpuA, der für die Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen, wie Glyzinbetain, Prolin oder Cholin als Antwort auf osmotischen Stress in die Zelle verantwortlich ist (Bremer and Krämer, 2000). Die Expression des *opuA*-Operons ist osmotisch reguliert (Kempf, 1995). Genauso die anderer ABC-Transporter für kompatible Solute, wie OpuB und OpuC. Mit Glyzinbetain im Medium ist die Induktion dieser Gene bei Salzstress nicht so stark wie ohne das Osmoprotektivum. Die „dot blot“-Experimente in Abb. 6.15 zeigen, dass Glyzinbetain kaum einen Einfluss auf die Expression von *sigW* und *yuaG* hat. Somit scheint die Aufgabe des SigW-Regulons bei der Anpassung an Salzstress unabhängig von dem Schutzmechanismus der osmoprotektiven Substanzen zu sein.

Mit dem SigW-Regulon ist ein neuer Teil des Salzstressstimulons beschrieben, dass insbesondere eine Funktion bei mildem Salzstress zu haben scheint.

7.2. Generelle Stressantwort und niedrige Temperatur

Schwankungen in der Umgebungstemperatur gehören zu den natürlichen Umweltfaktoren, denen Bodenbakterien besonders ausgesetzt sind. Zu erheblichen Temperaturveränderungen kommt es durch die jahreszeitlich bedingten Wetterumschwünge, aber auch der Wechsel zwischen Tag und Nacht oder Regen führen zu Temperaturabkühlungen, die einen Einfluss auf das Leben in den ersten 10-20 cm im Boden haben. Diese Temperaturschwankungen beeinträchtigen alle zellulären Prozesse. Sie verändern die Membranfluidität, die Geschwindigkeit der

Replikation und Transkription, die Ribosomenaktivität, die Proteinfaltung und die Enzymaktivitäten (Graumann and Marahiel, 1999).

Eine der ersten spezifischen Antworten in *B. subtilis* auf niedrige Temperaturen ist die Kälteschockantwort (Graumann and Marahiel, 1996), deren physiologische Bedeutung zur Anpassung des Organismus an die Kälte in der Einleitung vorgestellt wurden.

Wichtig für die Akklimatisierung von *B. subtilis* an niedrige Temperaturen sind die Adaptation der Membranfluidität und die Induktion der CIPs und CAPs. Die Aufrechterhaltung der Membranfluidität erfolgt durch die isoleucinabhängige „de novo“-Synthese von anteiso-verzweigten Fettsäuren und die Oxidation von gesättigten Fettsäuren durch die Desaturase Des zu ungesättigten Fettsäuren (Aguilar, 1998; Klein *et al.*, 1999). Die Einführung von negativen Supercoils in die DNA durch die Gyrase erhöht die Enthalpie und so die Zugänglichkeit der Nukleinsäure für die Replikations- und Transkriptionsmaschinerie (Grau, 1994).

Die Kälteschockproteine binden an die mRNA und verhindern so die Ausbildung von Sekundärstrukturen. Da sie eine geringere Affinität zur mRNA haben als das Ribosom, werden die CAPs durch das Ribosom leicht von der abzulesenden mRNA-Kette verdrängt (Graumann and Marahiel, 1999).

All diese Prozesse passieren innerhalb der ersten 4 h nach dem Auftreten eines Temperaturabfalls von 37 °C auf unter 20 °C (Graumann and Marahiel, 1999).

In *E. coli* wird die RpoS-abhängige generelle Stressantwort auch durch Kälte induziert (Loewen and Hengge-Aronis, 1994). Da eine drastische Temperaturerhöhung, neben vielen anderen Faktoren, wie Ethanol, Salz, Glukosemangel oder Säure zu Induktoren des SigB-Regulons gehört, war es sinnvoll zu untersuchen, ob die SigB-abhängige generelle Stressantwort in *B. subtilis* ebenfalls bei niedriger Temperatur induziert wird. Deshalb untersuchte A. Völker in ihrer Dissertation eine mögliche Induktion des SigB-Regulons bei niedriger Temperatur. Sie konzentrierte sich dabei auf die ersten 3 h nach dem Umsetzen in die Kälte. In dieser Zeitspanne konnte sie im Wildtyp und in einer *rsbU*-Mutante nur eine marginale Erhöhung der Expression von *sigB* und *gsiB* feststellen (Völker, 1999a).

Erst in den Langzeitadaptationsversuchen von J. Gade gelang es mit Hilfe von 2D-Gelen die Induktion des kompletten generellen Stressregulons nachzuweisen. Physiologisch besonders interessant ist die Induktion des SigB-Regulons in der Kälte, weil A. Bashir im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigen konnte, dass die Sporulation bei niedriger Temperatur signifikant reduziert ist (Bashir, 2001). Somit bietet die generelle

Stressantwort eine alternative Überlebensstrategie bei niedriger Temperatur, deren physiologische Funktion für die Zelle essentiell für das Leben bei niedrigen Temperaturen zu sein scheint, da eine *sigB*-Mutante bei 15 °C einen klaren Wachstumsnachteil gegenüber dem *B. subtilis*-Wildtyp hat.

7.2.1. Einordnung der kältespezifischen Anschaltung der generellen Stressantwort

Aufbauend auf diese Vorarbeiten beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit einer detaillierten Beschreibung der kältespezifischen Induktion der generellen Stressantwort.

Zuerst wurde das verwendete Minimalmedium SMM auf mögliche medienbedingte Abweichungen in der bekannten Signaltransduktion der generellen Stressantwort nach Ethanol und Glukoselimitation untersucht. Nachdem in den kultivierten Regulatormutanten das erwartete Induktionsprofil für die Reporterfusion nach Einwirkung von metabolischem Stress und Umweltstress gemessen worden war, wurde überprüft, ob die kältespezifische Induktion der generellen Stressantwort unabhängig vom verwendeten Medium bei 16 °C erfolgt. Die Bestimmungen der LacZ-Aktivitäten während des kontinuierlichen Wachstums in der Kälte zeigen, dass die Induktion der generellen Stressantwort bei niedriger Temperatur nicht vom Medium abhängt (Abb. 6.18). Trotzdem hat die Wahl des Mediums einen Einfluss auf das Wachstum und die Intensität der SigB-Antwort in der Kälte. In dem für die meisten Kälteversuche verwendeten SM-Medium dauert die exponentielle Wachstumsphase bei 16 °C ca. 100 h. Doppelt so schnell wachsen die Zellen in LB-Medium. Die Zugabe von Glyzinbetain in SMM beschleunigt ebenfalls das Wachstum in der Kälte. Die osmoprotektive Substanz Glyzinbetain hat bei niedriger Temperatur auch einen Einfluss auf die Intensität der SigB-Antwort. Mit Glyzinbetain im Medium fällt die Induktion der *ctc::lacZ*-Reporterfusion ungefähr 50% schwächer aus als ohne. Dieser deutliche Einfluss von Glyzinbetain auf die Expression des SigB-Regulons wurde von T. Hoffmann auch bei verschiedenen niedrigen Temperaturen beobachtet. Dieser Effekt von Glyzinbetain auf die Expression des SigB-Regulons war bisher unbekannt, weil das Osmoprotektivum nach Salzstress in *B. subtilis* keine Wirkung auf die Intensität der generellen Stressantwort hat, obwohl es den salzsensitiven Phänotyp nach Einwirkung von 10% NaCl unterdrückt (Abb. 6.15, Völker, 1999b). Die gleiche protektive Wirkung hat Glyzinbetain in der Kälte, wo es den temperaturbedingten Wachstumsdefekt einer *sigB*-Mutante bei 15 °C aufhebt (Hoffmann, 2003). Somit ergänzen sich die generelle Stressantwort und Glyzinbetain beim Schutz der Zelle vor niedrigen Temperaturen. Zudem unterstreichen diese Untersuchungen die Funktion von Glyzinbetain als

Kryoprotektivum. Auch in dem pathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* wirken die osmoprotektiven Substanzen Betain und Carnitin als Kryoprotektiva (Angelidis, 2002; Mendum, 2002). Ihre Akkumulation in der Zelle bei niedrigen Temperaturen (um 8 °C) ist zu einem großen Teil vom orthologen Protein des alternativen Sigmafaktors SigB in *L. monocytogenes* abhängig. Das SigB in *L. monocytogenes* hat 78% Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu dem SigB aus *B. subtilis* und wird in einem Operon mit Genen der Orthologen von RsbV, RsbW und RsbX kodiert. Vor diesem Operon konnte ein RsbU-Ortholog und ein SigB-abhängiger Promotor identifiziert werden (Becker *et al.*, 1998).

Die Induktion von SigB in *L. monocytogenes* erfolgt zwischen 4-6 h nach dem Umsetzen in die Kälte. In diesen ersten Stunden bei niedriger Temperatur ist eine ausgeprägte „lag“-Phase zu beobachten, in der die Zellen nicht wachsen und die wahrscheinlich der Akklimatisierung an die Kälte dient.

Im Vergleich zu *B. subtilis* zeigte eine *sigB*-Mutante in *L. monocytogenes* nach dem Umsetzen von exponentiell wachsenden Zellen in die Kälte (8 °C) keinen kältesensitiven Phänotyp. Allerdings wuchs die *sigB*-Mutante signifikant schlechter als der Wildtyp, sobald nicht wachsende Zellen in frischem Medium bei niedriger Temperatur inkubiert wurden (Becker *et al.*, 2000). Somit ist SigB in *L. monocytogenes* nicht essentiell für das Überleben in der Kälte, wie es für *B. subtilis* der Fall ist.

Das Expressionsmuster der generellen Stressantwort von *B. subtilis* in der Kälte unterscheidet sich von der bisher bekannten Expression nach Umweltstress und metabolischem Stress. Bei 37 °C folgt auf die Einwirkung von Stress eine sofortige, aber transiente Induktion des SigB-Regulons, die nach 60 min wieder das Vor-Stress-Niveau erreicht. Bei niedriger Temperatur ist eine langanhaltende Induktion der Expression der *ctc::lacZ*-Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase zu sehen. Durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität ist auch zu beobachten, dass die Induktion des SigB-abhängigen *ctc::lacZ*-Reporters erst ungefähr 8 h nach dem Umsetzen auf die niedrige Temperatur erfolgt. Nach einem Maximum fällt die Induktion bis zum Übergang in die stationäre Phase nur langsam ab, um dann auf einem deutlich erhöhten Niveau zu stagnieren. Der in dieser Arbeit beobachtete Induktionsverlauf der generellen Stressantwort bei niedriger Temperatur konnte allerdings nicht nur in SMM, sondern auch in LB und anderen Medien nachgewiesen werden. Dieser Induktionsverlauf weicht von dem, den A. Krisp in ihrer Dissertation für die Expression der SigB-Antwort in der Kälte beschrieben hat, ab (Krisp, 2002). Anhand ihrer LacZ-Daten war von einer kontinuierlichen Expression der *ctc*-Fusion mit periodischen Schwankungen durch die

An- und Abschaltung von SigB während des Wachstums bei niedriger Temperatur in SMM auszugehen.

In der Kälte scheint die generelle Stressantwort allerdings wichtig, damit die Zellen überhaupt wachsen können, insbesondere bei Annäherung an die für *B. subtilis* minimale Wachstumstemperatur. Die langanhaltende Induktion während der exponentiellen Wachstumsphase spricht dafür, dass das SigB-Regulon aktuelle Adaptationsprozesse unterstützt und nicht nur eine Resistenz gegen zukünftigen Stress aufbaut. Bisher wurde hauptsächlich die spezifische Stressantwort für die akute Behebung der Schäden verantwortlich gemacht (Hitzeschock: Chaperone und Proteasen) und die generelle Stressantwort sollte in der Zelle eine Resistenz gegen zukünftigen Stress aufbauen, der in nicht wachsenden Zellen auftreten könnte (Hecker and Völker, 2001).

7.2.2. RsbV-unabhängige Induktion der generellen Stressantwort

Um die Regulation der SigB-Aktivität in der Kälte näher zu untersuchen, wurden vergleichende Westernblots und LacZ-Reporterassays mit Mutanten in den Regulatoren RsbP, RsbU und RsbV der SigB-Aktivität durchgeführt.

Im Unterschied zu den Daten von A. Krisp fiel auf, dass die Induktion der generellen Stressantwort in einer *rsbP*- und einer *rsbUP*-Doppelmutante signifikant schwächer ausfällt als im Wildtyp. Die Fluoreszenzbilder der *gsiB::gfp*-Fusion bei 13 °C bestätigen diese Unterschiede in der Induktion, gleiche Ergebnisse wurden bei 16 °C erhalten (nicht gezeigt). Es bleibt aber festzuhalten, dass auch in der *rsbP*- und in der *rsbUP*-Mutante immer eine kältebedingte Induktion der SigB-Antwort gemessen wurde.

Für die Bedeutung des positiv modulierenden Effekts der RsbP-Phosphatase auf die Intensität der Induktion der generellen Stressantwort in der Kälte, spricht das Wachstumsexperiment bei 15 °C. Hier haben die *rsbUP*-Mutante und die *rsbP*-Mutante, analog zur *sigB*-Mutante einen deutlichen Wachstumsnachteil im Vergleich zu den anderen Stämmen, der wahrscheinlich durch die unzureichende Induktion genereller Stressproteine bedingt ist. Obwohl bei 13 °C das Temperaturminimum für den *B. subtilis* 168 unter den getesteten Bedingungen im Labor erreicht war, wuchsen die *rsbUP*- und die *sigB*-Mutante bei dieser Temperatur ebenfalls schlechter als die restlichen Mutanten.

Da die RsbP-Phosphatase eine PAS-Domäne besitzt, mit der sie theoretisch in der Lage ist den Energiezustand der Zelle zu prüfen, ist es vorstellbar, dass RsbP an der Signalwahrnehmung von Kältestress beteiligt ist. Die Art des Signals ist unbekannt,

aber als Flavoprotein könnte diese Phosphatase Veränderungen im Protonengradienten der Zelle wahrnehmen (Vijay *et al.*, 2000).

Die schwache Induktion des SigB-Regulons in einer *rsbP*-Mutante kann sicherlich auch nur mit dem niedrigeren Basallevel an SigB zusammenhängen. Aus Analysen zur Aufgabe von RsbP in der Aktivierung von SigB ist bekannt, dass diese Phosphatase für die Basalaktivität von SigB während des exponentiellen Wachstums verantwortlich ist (Vijay *et al.*, 2000). Dieser RsbP-abhängige Basallevel an freiem SigB kann zu einer erhöhten Induktion von SigB-abhängigen Genen führen. Eymann und Hecker konnten eine ungewöhnliche Induktion von SigB-abhängigen Genen in einer *spo0H*-Mutante nach Aminosäurelimitation nachweisen. Die Untersuchung des Induktionsmechanismus belegte, dass die ungewöhnliche Expression nur der stärksten Mitglieder des SigB-Regulons abhängig von RelA war (Eymann, 2001). In diesem Fall veränderte der Wegfall des alternativen Sigmafaktors SigH die Konkurrenzbedingungen um freie Coreenzyme der RNA-Polymerase zu Gunsten von SigB. Um zu prüfen, ob der RelA-kontrollierte Wettstreit der Sigmafaktoren einen Einfluss auf die Aktivierung von SigB in der Kälte hat, wurde die Induktion einer *gsiB::gfp* Fusion nach Wachstum bei 16 °C untersucht. Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder beweisen eindeutig, dass die RelA-vermittelte „stringent response“ keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung in der Kälte hat.

Eines der interessantesten Ergebnisse der Dissertation von A. Krisp war die RsbV-unabhängige Aktivierung von SigB bei niedriger Temperatur (Krisp, 2002). Für Hitzeschock konnte schon in früheren Untersuchungen eine Anschaltung von SigB in einer *rsbV*-Mutante beobachtet werden (Benson and Haldenwang, 1993; Boylan *et al.*, 1993a). Allerdings wurde in weiteren Analysen gezeigt, dass die Hitzeinduktion der *sigB*-mRNA in *rsbU*- und *rsbV*-Mutanten ungefähr fünffach schwächer ausfiel als im Wildtyp (Völker *et al.*, 1995b). Für die Expression von *gsiB* war der Unterschied 100fach. Anhand dieser Ergebnisse wurde bewiesen, dass die Induktion der generellen Stressantwort nach Hitzeschock genau wie nach Ethanol- oder Salzstress hauptsächlich RsbU- und RsbV-abhängig war. Allerdings bezogen sich diese Versuche auf die Aktivierung der generellen Stressantwort innerhalb der ersten Stunde nach Hitzeschock bei einem milden Hitzeschock von 48 °C.

In der bisher bekannten Signaltransduktion zur Aktivierung von SigB hat RsbV die Schlüsselrolle bei der Entlassung von SigB aus dem inhibierenden Komplex mit RsbW. RsbV ist der Anti-Antisigmafaktor der RsbW bindet. Zusätzlich treffen sich die Signalwege für Umweltstress und metabolischen Stress am Anti-Antisigmafaktor in

Form der Dephosphorylierungsreaktion zur Aktivierung von RsbV durch die Phosphatasen RsbU und RsbP (Kang *et al.*, 1996; Vijay *et al.*, 2000; Völker *et al.*, 1995a; Völker *et al.*, 1995b; Yang *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe einer *gsiB::gfp*-Fusion die RsbV-unabhängige Aktivierung des SigB-Regulons beim Wachstum in der Kälte weiter untermauert werden. Bei weiter abfallender Temperatur nahm die Intensität der Antwort sogar noch weiter zu (Abb.6.20).

Die Untersuchung der Expression einer *rsbUPV*-Mutante zeigte aber, dass der Verlust von RsbV den Ausfall der beiden Phosphatasen RsbU und RsbP kompensiert, weil in der Tripelmutante die gleiche Induktionsstärke gemessen wurde wie in der *rsbV*-Mutante. Dieser Befund wurde im Westernblot bestätigt. Der Verlust beider Phosphatasen und des Anti-Antisigmafaktors hat einen positiven Einfluss auf das Wachstum bei 15 °C, was untermauert, dass die Synthese der generellen Stressproteine eine untere Schwelle überschreiten muss, um *B. subtilis* das Wachstum bei 15 °C zu ermöglichen. Somit ist davon auszugehen, dass RsbV in einer *rsbP*-Mutante einen negativ modulierenden Einfluss auf die Aktivierung von SigB hat. Eine *rsbPV*- oder *rsbUV*-Mutante wurde bisher nicht in die Versuche miteinbezogen, weil aufgrund der bisherigen Experimente davon auszugehen ist, dass sie ein ähnliches Induktionsmuster zeigen, wie die *rsbV*-Mutante.

Eine Ursache für die negativ modulierende Rolle von RsbV könnte die Änderung des Phosphorylierungsstatus von RsbV in der *rsbP*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sein. Diese These wurde überprüft, indem die phosphorylierte und dephosphorylierte Form von RsbV mit Hilfe von 2D-Gelen voneinander getrennt und mit monoklonalen Antikörpern im Westernblot sichtbar gemacht wurden. Das erhaltene Ergebnis schließt die Möglichkeit nicht aus, dass die Zunahme an unphosphoryliertem RsbV in der *rsbP*-Mutante für den negativ modulierenden Effekt des Anti-Antisigmafaktors in der Kälte verantwortlich sein könnte.

Somit scheint aktives RsbV in der Kälte bei der Aufhebung des Komplexes zwischen RsbW und SigB zu interferieren. Dies steht im Gegensatz zu der bisher bekannten Funktion von RsbV in der Regulation der Aktivität von SigB (Dufour and Haldenwang, 1994).

Ein Grund für den negativen Effekt des Anti-Antisigmafaktors RsbV könnte die verminderte Aktivität eines noch zu identifizierenden Proteins in der *rsbP*-Mutante sein, dass an Stelle von RsbV mit RsbW interagiert. Der Verlust der Phosphatase hat

vielleicht Einfluss auf eine aktivierende Modifikation des unbekanntes Regulators, da auch RsbV~P erst dephosphoryliert werden muss, bevor es aktiv ist.

Andererseits könnte RsbV in einer *rsbP*-Mutante auch verstärkt an den potentiellen neuen Antagonisten binden und so die Aufhebung des RsbW/SigB-Komplexes blockieren. Beide Vermutungen könnten die verminderte Intensität der Induktion des SigB-Regulons in einer *rsbP*-Mutante erklären.

Ein potentieller Kandidat für die Interaktion mit RsbW ist SpoIIAA, der Anti-Antisigmafaktor von SigF. SpoIIAA hat 32% Identität in der Aminosäuresequenz zu RsbV und der Antisigmafaktor des SigF-Systems SpoIIAB 27% zu RsbW (Kalman *et al.*, 1990). Genau wie bei RsbV und RsbW interagieren zwei Moleküle SpoIIAA mit dem SpoIIAB₂-SigF-Komplex (Delumeau, 2002; Helmann, 1999). Allerdings spielen die Nukleotide ATP und ADP eine entscheidende Rolle bei der Bindung von SpoIIAA an den Antisigmafaktor SpoIIAB. Im Komplex mit SigF ist ATP an SpoIIAB gebunden, erst durch die Phosphorylierung von zwei SpoIIAA-Molekülen liegt ein SpoIIAB/ADP/SigF-Komplex vor, an den zwei weitere SpoIIAA-Moleküle binden, um SigF aus dem Komplex mit SpoIIAB zu befreien (Alper *et al.*, 1994; Duncan *et al.*, 1996). Ein ähnliches Reaktionsmuster könnte für die Kälteaktivierung von SigB durch eine Bindung von SpoIIAA an RsbW vorliegen. Allerdings zeigten Alper *et al.* (1996) in „*in vitro*“-Kompetitionsassays, dass SpoIIAA nicht mit RsbW interagiert. Aber diese Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt.

Ein weiteres Protein, welches in der Kälte mit RsbW wechselwirken könnte, ist das essentielle GTP-bindende Protein Obg, für das mit dem „Hefe-TwoHybrid-System“ eine Interaktion mit RsbW nachgewiesen wurde (Scott, 1999). Für dieses Protein konnte nachgewiesen werden, dass es an das ribosomale Protein L13 bindet (Scott, 2000), womit es ein potentieller Signalübermittler zwischen dem Ribosom und SigB ist. Das Ribosom könnte ebenfalls in die Kältereulation der SigB-Aktivität involviert sein. Schon 1990 konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass das Ribosom als Sensor für extreme Temperaturen fungiert (VanBogelen, 1990). Zudem war die Beteiligung des Ribosoms an der Aktivierung von SigB nach Ethanolstress nachweisbar. Allerdings ist dieser Prozess RsbV abhängig (Zhang *et al.*, 2001).

Einen möglichen Hinweis auf Proteine, die RsbV bei der Interaktion mit RsbW zur Aktivierung von SigB ersetzen könnten, sollte eine Komplexanalyse mit Hilfe einer Gelfiltration bei 16 °C geben. Diese Methode wurde schon erfolgreich für Komplexuntersuchungen mit den Proteinen RsbV, RsbW und SigB eingesetzt (Benson and Haldenwang, 1993; Dufour and Haldenwang, 1994; Dufour *et al.*, 1996; Völker *et*

al., 1995b). In den Kontrollexperimenten wurden die aus der Literatur bekannten Komplexe zwischen den drei Proteinen detektiert. So wurde der RsbW/SigB-Komplex bei ungefähr 66 kDa nachgewiesen. Im ungestressten Zustand lag RsbV unkomplexiert vor und eluierte im Bereich von ca. 13-16 kDa. Geringe Mengen konnten aufgrund der Phosphorylierungsreaktion mit dem RsbW/SigB-Komplex assoziiert nachgewiesen werden.

Nach 10 min Ethanolstress ist eine Auflösung des RsbW/SigB-Komplexes zu Gunsten des neugebildeten RsbV/RsbW-Komplexes bei ca 60 kDa zu erkennen. Zudem konnte SigB im hochmolekularen Bereich um 600 kDa detektiert werden, welches wahrscheinlich mit der RNA-Polymerase assoziiert ist.

Die Komplexverteilung bei 16 °C entsprach der nach 10 min Ethanolstress. Um eine mögliche Überlagerung bisher unbekannter Komplexe zu verhindern, wurden ebenfalls Gelfiltrationen mit den Proteinextrakten einer bei 16 °C kultivierten *rsbV*- und einer *sigB*-Mutante durchgeführt. Dabei konnten keine neuen Komplexe für RsbW oder RsbV nachgewiesen werden. Dies deutet an, dass kein weiterer Regulator an der Aktivierung von SigB durch eine Interaktion mit RsbW oder RsbV beteiligt ist. Dieser Befund deckt sich mit den Gelfiltrationsanalysen von A. Krisp.

Eine andere Theorie zur Aktivierung von SigB in der Kälte ist, dass SigB bei niedriger Temperatur eine deutlich höhere Affinität zur RNA-Polymerase haben könnte als zu RsbW. Diese Möglichkeit wurde in einem Experiment geprüft, in dem die LacZ-Aktivität nach Induktion der SigB-Expression durch IPTG gemessen wurde. Der Versuch ergab, dass der Anstieg der β -Galaktosidaseaktivität bei 37 °C stärker ist als bei 16 °C. Deshalb scheint SigB die Bindung an die RNA-Polymerase bei niedriger Temperatur der Bindung an RsbW nicht zwingend vorzuziehen.

7.3. Ausblick

Das Ziel weiterer Arbeiten zur Kältereulation der generellen Stressantwort in *B. subtilis* wird in erster Linie das Verständnis der RsbV-unabhängigen Aktivierung von SigB sein. Einen möglichen Ersatz für RsbV bei niedriger Temperatur könnte der Anti-Antisigmafaktor SpoIIAA bieten. Sein Einfluss auf die Regulation in der Kälte wäre in einer *rsbVspoIIAA*-Doppelmutante mit Hilfe einer *ctc::lacZ* Fusion relativ schnell zu prüfen. Aber auch ein Screening einer Transposonbibliothek durch Transformation in eine *rsbV*-Mutante mit *ctc::lacZ* als Reporterfusion, könnte helfen mögliche neue Interaktionspartner für RsbW zu finden, sowie weitere Regulatoren der kältebedingten Aktivierung von SigB.

Eine weitere sehr interessante Frage ist die Beteiligung des Ribosoms an der Signaltransduktion zur Aktivierung der generellen Stressantwort in der Kälte. Über die Zugabe von Hitzeschock-simulierenden Antibiotika, wie Kanamycin, zu in der Kälte wachsenden Zellen könnte getestet werden, ob die Aktivierung von SigB beeinflusst werden kann.

8. Literatur

- Aguilar, P., S., Cronan JR., E., J., and de Mendoza, D. (1998) A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *Journal of Bacteriology* **180**: 2194-2200.
- Aguilar, P.S., Lopez, P., and De Mendoza, D. (1999) Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the D5 desaturase of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **181**: 7028-7033.
- Akbar, S., and Price, C.W. (1996) Isolation and characterization of *csbB*, a gene controlled by *Bacillus subtilis* general stress transcription factor σ^B . *Gene* **177**: 123-128.
- Akbar, S., Kang, C.M., Gaidenko, T.A., and Price, C.W. (1997) Modulator protein RsbR regulates environmental signaling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **24**: 567-578.
- Akbar, S., Lee, S.Y., Boylan, S.A., and Price, C.W. (1999) Two genes from *Bacillus subtilis* under the sole control of the general stress transcription factor σ^B . *Microbiology* **145**: 1069-1078.
- 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*. *Journal of Bacteriology* **183**: 1329-1338.
- 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.
- 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*. *Journal of Molecular Biology* **260**: 165-177.
- Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **81**: 741-746.
- Angelidis, A.S., Smith, L. T., Hoffmann, L. M., and Smith, G.M. (2002) Identification of *opuC* as a chill-activated and osmotically-activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2644-2650.
- Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., and Hecker, M. (1995) A gene at 333° on the *Bacillus subtilis* chromosome encodes the newly identified σ^B -dependent general stress protein GspA. *Journal of Bacteriology* **177**: 3540-3545.
- Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., and Hecker, M. (1996) General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis* - cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *Journal of Bacteriology* **178**: 6571-6578.
- Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Mach, H., Völker, U., and Hecker, M. (1997a) First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **18**: 1451-1463.
- Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., Lapidus, A., and Hecker, M. (1997b) Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB* homologous gene is controlled by the alternative sigma factor σ^B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **179**: 7251-7256.
- Antelmann, H., Schmid, R., and Hecker, M. (1997c) The NAD synthetase NadE (OutB) of *Bacillus subtilis* is a σ^B -dependent general stress protein. *FEMS Microbiology Letters* **153**: 405-409.
- 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.

- Bashir, A. (2001) Charakterisierung neuer Sporulationsgene und Analyse der Rolle von Sporulation und genereller Stressantwort für das Überleben prototropher *Bacillus subtilis* Stämme in Bodenmikrokosmen. In *Laboratorium für Mikrobiologie, FB Biologie Marburg*: Philipps-Universität.
- Bayles, D.O., and B. J. Wilkinson (2000) Osmoprotectants and cyroprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Letters of Applied Microbiology* **30**: 23-27.
- Becker, G., Klauck, E., and Hengge-Aronis, R. (2000) The response regulator RssB, a recognition factor for σ^S proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti- σ^S factor. *Molecular Microbiology* **35**: 657-666.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., and Benson, A.K. (1998) Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ^B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *Journal of Bacteriology* **180**: 4547-4554.
- Belitsky, B.R.S., R.S. (1980) Amount of Guanosine polyphosphate and the level of stable RNA synthesis in *B. subtilis* upon inhibition of protein synthesis. *Molecular Biologija* **14**: 1343 - 1353.
- Benson, A.K., and Haldenwang, W.G. (1992) Characterization of a regulatory network that controls σ^B expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **174**: 749-757.
- Benson, A.K., and Haldenwang, W.G. (1993a) The σ^B dependent promoter of the *Bacillus subtilis* *sigB* operon is induced by heat shock. *Journal of Bacteriology* **175**: 1929-1935.
- Benson, A.K., and Haldenwang, W.G. (1993b) *Bacillus subtilis* σ^B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2330-2334.
- Benson, A.K., and Haldenwang, W.G. (1993c) Regulation of σ^B levels and activity in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **175**: 2347-2356.
- Bernhardt, J., Völker, U., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H., and Hecker, M. (1997) Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* - a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**: 999-1017.
- Bethesda Research Laboratories, USA
- Binnie, C., Lampe, M., and Losick, R. (1986) Gene encoding the σ^{37} species of RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 5943-5947.
- Birboim (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuclear Acids Res* **7**: 1513 - 1523.
- Blattner, F., R., Plunkett 3rd, G., Bloch, C., A., Perna, N., T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J., D., Rode, C., K., Mayhew, G., F., Gregor, J., Davis, N., W., Kirkpatrick, H., A., Goeden, M., A., Rose, D., J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., and Bremer, E. (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *Journal of Bacteriology* **178**: 5121-5129.
- Boylan, S.A., Thomas, M.D., and Price, C.W. (1991) Genetic method to identify regulons controlled by nonessential elements: isolation of a gene dependent on alternate transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **173**: 7856-7866.
- Boylan, S.A., Rutherford, A., Thomas, S.M., and Price, C.W. (1992) Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B by a regulatory pathway responsive to stationary phase signals. *Journal of Bacteriology* **174**: 3695-3706.
- Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., and Price, C.W. (1993a) Stress-induced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **175**: 7931-7937.

- Boylan, S.A., Redfield, A.R., and Price, C.W. (1993b) Transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary phase regulon. *Journal of Bacteriology* **175**: 3957-3963.
- Bray, E.A. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **103**: 1035-1040.
- Bremer, E., and Krämer, R. (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, D.C.: ASM, pp. 79-97.
- Brigulla, M. (1999) Identifizierung weiterer Regulatoren der Aktivität des generellen Stresssigmafaktor σ^B von *Bacillus subtilis*. In *Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie* Marburg: Philipps-Universität, pp. 1-61.
- Brody, M.S., Vijay, K., and Price C. W. (2001) Catalytic function of an α/β hydrolase is required for energy stress activation of the σ^B transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183**: 6422-6428.
- Budde, I. *personal communication* (2002).
- Cao, M., Bernat, B. A., Wang, Z., Armstrong, R. N., and Helmann, J. D. (2001a) FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma (W), an extracytoplasmatic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*.
- Cao, M., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Wu, M. F. W., Paddon, C., and Helmann, J. D. (2001b) Defining the *Bacillus subtilis* σ^W regulon: A comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA); and transcriptional profiling approaches. *Journal of Molecular Microbiology* **316**: 443-457.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., and Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds). Washington DC: ASM, pp. 1458-1496.
- Chen, C.C., Delumeau, O., Harris, R., Lewis, R., and Yudkin, M. D. (2003) A novel complex regulates the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *Functional genomics of Gram-positive microorganisms, 12th international conference on bacilli*: 75 P83.
- consortium, T.i.h.g. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *nature* **15**.
- Crick, F., H., C., (1962) The genetic code. *Science american* **204**: 66-74.
- Cronan, J.E., and Rock, C. O., (1996) Biosynthesis of membrane lipids. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingram, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H., E. (ed). Washington D.C.: ASM Press, pp. 612-636.
- Delumeau, O., Lewis, R.,J., and Yudkin, M. D. (2002) Protein-protein interactions that regulate the energy stress activation of σ^B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **184**: 5583-5589.
- Derre, I., and Msadek, T. (1997) CtsR is a DNA-binding protein controlling class III heat shock gene expression in *Bacillus subtilis*. In *9th International Conference on Bacilli* Lausanne, Switzerland, pp. 23.
- Derre, I., Rapoport, G., and Msadek, T. (2000) The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Molecular Microbiology* **38**: 335-347.
- Drzewiecki, K., Eymann, C., Mittenhuber, G., and Hecker, M. (1998) The *yvyD* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of σ^B and σ^H . *Journal of Bacteriology* **180**: 6674-6680.
- Dubnau, D., and Turgay, K. (2000) Regulation of competence in *Bacillus subtilis* and its relation to stress. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, D.C.: ASM, pp. 249-260.

- Dufour, A., and Haldenwang, W.G. (1994) Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *Journal of Bacteriology* **176**: 1813-1820.
- 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. *Journal of Molecular Biology* **260**: 147-164.
- Duncan, M.L., Kalman, S.S., Thomas, S.M., and Price, C.W. (1987) Gene encoding the 37,000-Dalton minor sigma factor of *Bacillus subtilis* RNA polymerase: isolation, nucleotide sequence, chromosomal locus, and cryptic function. *Journal of Bacteriology* **169**: 771-778.
- Engelmann, S., and Hecker, M. (1996) Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* sigB mutants and the role of katA and katE. *FEMS Microbiology Letters* **145**: 63-69.
- Errington, J. (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews* **57**: 1-33.
- Eymann, C., and Hecker, M. (2001a) Induction of the σ^B -dependent general stress genes by amino acid starvation in a spo0H mutant of *B. subtilis*. *FEMS Microbiology letters* **199**: 221-227.
- Eymann, C.M., G., and Hecker, M. (2001b) The stringent response, σ^H gene expression and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **264**: 913-923.
- Gaidenko, T., Yang, X., Lee, Y., and Price, C.W. (1999) Threonine phosphorylation of modulator protein RsbR governs its ability to regulate a serine kinase in the environmental stress signal pathway of *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **288**: 29-39.
- 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. *Journal of Bacteriology* **180**: 3730-3733.
- Garsin, D., Duncan, L., Paskowitz, D., and Losick, R. (1998) The kinase activity of the antisigma factor SpoIIAB is required for activation as well as inhibition of transcription factor σ^F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **284**: 569-578.
- Gerth, U., Krüger, E., Derre, I., Msadek, T., and Hecker, M. (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Molecular Microbiology* **28**: 787-802.
- Glaser, P., Kunst, F., Arnaud, M., Coudart, M.P., Gonzales, W., Hullo, M.F., Ionescu, M., Lubochinsky, B., Marcelino, L., Moszer, I., and et al. (1993) *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325°-333°. *Molecular Microbiology* **10**: 371-384.
- Goeffeau et al. (1997) The yeast genome. *nature* **387**.
- Göthel, S.F., Scholz, C., Schmid, F. X., and Marahiel, M. A. (1998) Cyclophilin and trigger factor from *Bacillus subtilis* catalyze in vitro protein folding and are necessary for viability under starvation conditions. *Biochemistry* **37**: 13392-13399.
- Grau, R.G., D., Glikin, G. C., and de Mendoza, D. (1994) DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **11**: 933-941.
- Graumann, P., and Marahiel, M.A. (1996) Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Archives of Microbiology* **166**: 293-300.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R., and Marahiel, M.A. (1996) Identification of cold shock stress induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **178**: 4611-4619.
- Graumann, P.L., and Marahiel, M.A. (1999) Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**: 203-209.
- Haldenwang, W.G., and Losick, R. (1979) A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature* **282**: 256-260.

- Haldenwang, W.G., and Losick, R. (1980) Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 7000-7004.
- Hecker, M., Heim, C., Völker, U., and Wöfler, L. (1988) Induction of stress proteins by sodium chloride treatment in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology* **150**: 564-566.
- Hecker, M., and Völker, U. (1990) General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology* **74**: 197-213.
- Hecker, M., Schumann, W., and Völker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **19**: 417-428.
- Hecker, M., and Völker, U. (1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon. *Molecular Microbiology* **29**: 1129-1136.
- Hecker, M., and Völker, U. (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **44**: 35-91.
- Helmann, J. D. (1999) Anti-sigma factors. *current opinion in microbiology* **2**: 135 - 141.
- Helmann, J.D., Winston, M. F., Kobel, P. A., Gamo, F-J., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M., and Paddon, C. (2001) Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *Journal of Bacteriology* **183**: 7318-7328.
- Hengge-Aronis, R. (2000) The general stress response in *Escherichia coli*. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, D.C.: ASM, pp. 161-178.
- Hoffmann, T. *personal communication* (2003).
- [Http://www.sanger.uk](http://www.sanger.uk) (2003).
- Huang, X., Fredrick, K.L., and Helmann, J.D. (1998) Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. *Journal of Bacteriology* **180**: 3765-3770.
- Huang, X.J., Gaballa, A., Cao, M., and Helmann, J.D. (1999) Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, σ^W . *Molecular Microbiology* **31**: 361-371.
- Inouye, M.N. (1999) Cold-shock response and adaptation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **1**: 191.
- Invitrogen, USA
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., and Nyström, T. (2002) Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes & Development* **16**: 1260-1270.
- Jones, P., G., and Inouye, M. (1994) The cold shock response-a hot topic. *Molecular Microbiology* **11**: 811-818.
- Kalman, S., Duncan, M.L., Thomas, S.M., and Price, C.W. (1990) Similar organization of the *sigB* and *spolIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Journal of Bacteriology* **172**: 5575-5585.
- Kang, C.M., Brody, M.S., Akbar, S., Yang, X.F., and Price, C.W. (1996) Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B in response to environmental stress. *Journal of Bacteriology* **178**: 3846-3853.
- 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. *Molecular Microbiology* **30**: 189-196.

- Kempf, B., and Bremer, E. (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 16701-16713.
- Kenney, T.J., Moran, C.P. (1987) Organization and regulation of an Operon that encodes a sporulation-essential sigma factor in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **169**: 3329-3339.
- Khorana, H., G., (1977) Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code. *Nobel Lectures in Molecular Biology, 1933-1975*: 303-331.
- Klein, W., Weber, M.H.W., and Marahiel, M.A. (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *Journal of Bacteriology* **181**: 5341-5349.
- Ko, R., Smith L. T., and Smith, G.M. (1994) Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cyrotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* **176**: 426-431.
- Kok, J., Trach, K. A., Hoch, J. A. (1994) Effects on *Bacillus subtilis* of a conditional lethal mutation in the essential GTP-binding protein Opg. *Journal of Bacteriology* **176**: 7155 - 7160.
- Krisp, A. (2002) Analyse der Induktion der generellen Stressantwort von *Bacillus subtilis* während des Wachstums bei niedriger Temperatur. In *Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie Marburg: Philipps-Universität*, pp. 124.
- Krüger, E., Msadek, T., and Hecker, M. (1996) Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Molecular Microbiology* **20**: 713-723.
- Krüger, E., Msadek, T., Ohlmeier, S., and Hecker, M. (1997) The *Bacillus subtilis* *clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology* **143**: 1309-1316.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H., and Hecker, M. (2001) Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO Journal* **20**: 852-863.
- Kuhnke, G. (2000) Untersuchungen zur Bedeutung der generellen Stressantwort für das Überleben von *Bacillus subtilis* im Boden. In *Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie Marburg: Philipps-Universität*, pp. 143.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., and Danchin, A. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Loewen, P.C., and Hengge-Aronis, R. (1994) The role of the sigma factor σ^S (KatF) in bacterial global regulation. *Annual Review of Microbiology* **48**: 53-80.
- 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*. *Molecular & General Genetics* **248**: 114-120.
- Mendum, M.L., and Smith, L. T. (2002) Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 813-819.
- 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.
- Moran, C.P., Jr., Lang, N., and Losick, R. (1981) Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* promoter recognized by *Bacillus subtilis* RNA polymerase containing σ^{37} . *Nucleic Acids Research* **9**: 5979-5990.
- Msadek, T., Kunst, F., and Rapoport, G. (1994) MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high

- temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5788-5792.
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M.L., Denizot, F., and Rapoport, G. (1998) ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Molecular Microbiology* **27**: 899-914.
- Mueller, J.P., Bukusoglu, G., and Sonenshein, A.L. (1992) Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes: control of *gsiA* by the ComP-ComA signal transduction system. *Journal of Bacteriology* **174**: 4361-4373.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Nirenberg, M. (1977) The genetic code. *Nobel Lectures in Molecular Biology 1933-1975*: 335-360.
- Petersohn, A., Antelmann, H., Gerth, U., and Hecker, M. (1999a) Identification and transcriptional analysis of new members of the σ^B regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145**: 869-880.
- Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Höper, D., Koburger, T., Völker, U., and Hecker, M. (1999b) Identification of σ^B -dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *Journal of Bacteriology* **181**: 5718-5724.
- Petersohn, A., Engelmann, S., Setlow, P., and Hecker, M. (1999c) The *katX* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of σ^B and σ^F . *Molecular & General Genetics* **262**: 173-179.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., and Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183**: 5617-5631.
- Pogliano, K., Hofmeister, A.E.M., and Losick, R. (1997) Disappearance of the σ^E transcription factor from the forespore and the SpoII_E phosphatase from the mother cell contributes to establishment of cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **179**: 3331-3341.
- Price, C.W. (2000) Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, D.C.: ASM, pp. 179-197.
- Price, C.W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C. K., and Youngman, P. (2001) Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **41**: 757-774.
- Raivio, T., L., and Silhavy, T. J. (2001) Periplasma stress and ECF sigma factors. *Annual Reviews*: 591-623.
- Richter, A., and Hecker, M. (1986) Heat-shock proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study. *FEMS Microbiology Letters* **36**: 69-71.
- Sambrook, J., Fritsch, J., and Maniatis, T. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory.
- Schmalisch, M., Langbein, I., and Stülke, J. (2002) The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4**: 495-501.
- Schmid, R., Bernhardt, J., Antelmann, H., Völker, A., Mach, H., Völker, U., and Hecker, M. (1997) Identification of vegetative proteins for a two-dimensional protein index of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 991-998.
- Schumann, W. (2000) Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism. *Advanced Biochemical Engineering and Biotechnology* **67**: 1-33.
- Schweder, T., Krüger, E., Xu, B., Jurgen, B., Blomsten, G., Enfors, S.O., and Hecker, M. (1999) Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnology & Bioengineering* **65**: 151-159.

- Scott, J., M., Haldenwang, W. G. (1999) Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor σ^B . *Journal of Bacteriology* **181**: 4653 - 4660.
- Scott, J.M., and Haldenwang, W.G. (1999) Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor σ^B . *Journal of Bacteriology* **181**: 4653-4660.
- Scott, J.M., Ju, J., Mitchell, T., Haldenwang, W.G. (2000) The *Bacillus subtilis* GTP binding protein Obg and regulators of the σ^B stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *Journal of Bacteriology* **182**: 2771 - 2777.
- Smirnova, N., Scott, J., Völker, U., and Haldenwang, W.G. (1998) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis sigB* operon mutations that suppress the loss of the negative regulator RsbX. *Journal of Bacteriology* **180**: 3671-3680.
- Smirnova, N., Scott, J., Voelker, U., Haldenwang, W.G. (1998) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis sigB* operon mutations that suppress the loss of negative regulator RsbX. *Journal of Bacteriology* **180**: 3671- 3680.
- Sonnhammer, E.L.L., vonHeijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In *Proc. of Sixth Int. Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D. and Sensen, C. (eds). Menlo Park, CA: AAAI Press, pp. 175-182.
- 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. *Molecular Microbiology* **29**: 285-296.
- Stock, J. (1999) Sensitivity, cooperativity and gain in chemotaxis signal transduction. *Trends in Microbiology* **7**: 1-4.
- Stülke, J., Hanschke, R., and Hecker, M. (1993) Temporal activation of beta-glucanase synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool. *Journal of General Microbiology* **139**: 2041-2045.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* **63**: 479-506.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., and van Dijk, J.M. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* **64**: 515-547.
- Turner, M.S., and Helmann, J.D. (2000) Mutations in multidrug efflux homologs, sugar isomerases, and antimicrobial biosynthesis genes differentially elevate activity of the σ^X and σ^W factors in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **182**: 5202-5210.
- VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **87**: 5589-5593.
- Varon, D., Boylan, S.A., Okamoto, K., and Price, C.W. (1993) *Bacillus subtilis gtaB* encodes UDP-glucose pyrophosphorylase and is controlled by stationary-phase transcription factor σ^B . *Journal of Bacteriology* **175**: 3964-3971.
- Varon, D., Brody, M.S., and Price, C.W. (1996) *Bacillus subtilis* operon under the dual control of the general stress transcription factor σ^B and the sporulation transcription factor σ^H . *Molecular Microbiology* **20**: 339-350.
- Venter, J., C., Adams, M., D., Myers, E., W., Li, P., W., Mural, R., J., Sutton, G., G., Smith, H., O., Yandell, M., Evans, C., A., Holt, R., A., Gocayne, J., D., Amanatides, P., Ballew, R., M., Huson, D., H., Wortman, J., R., Zhang, Q., Kodira, C., D., Zheng, X., H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P., D., Zhang, J., Miklos G., L., G., Nelson, C., Broder, S., Clark, A., G., Nadeau, J. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Vidwans, S., I., Ireton, K., and Grossman, A., D. (1995) Possible role for the essential GTP-binding Protein Obg in regulating the initiation of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **177**: 3308-3311.

- 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*. *Molecular Microbiology* **35**: 180-188.
- Völker, A. (1999a) Regulation der Aktivität des generellen Stresssigmafaktors σ^B in *Bacillus subtilis* und Charakterisierung genereller Stressproteine. In *Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät* Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität, pp. 1-142.
- Völker, A. (2000) In *Laboratorium für Mikrobiologie, FB Biologie* Marburg: Philipps-Universität.
- Völker, U., Mach, H., Schmid, R., and Hecker, H. (1992) Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* **138**: 2125-2135.
- Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H., and Hecker, M. (1994) Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140**: 741-752.
- Völker, U., Dufour, A., and Haldenwang, W.G. (1995a) The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of σ^B . *Journal of Bacteriology* **177**: 114-122.
- Völker, U., Völker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., and Haldenwang, W.G. (1995b) Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *Journal of Bacteriology* **177**: 3771-3780.
- Völker, U., Völker, A., and Haldenwang, W.G. (1996) Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti- σ^B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *Journal of Bacteriology* **178**: 5456-5463.
- Völker, U., Luo, T.Q., Smirnova, N., and Haldenwang, W.G. (1997) Stress activation of *Bacillus subtilis* σ^B can occur in the absence of the σ^B negative regulator RsbX. *Journal of Bacteriology* **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*. *Journal of Bacteriology* **181**: 3942-3948.
- Völker, U., Maul, B., and Hecker, M. (1999b) Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **181**: 3942-3948.
- 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. *Molecular Microbiology* **25**: 175-187.
- Watson, J., D., and Crick, F., H., C. (1953) A structure of desoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**: 737-738.
- Wendrich, T.M., and Marahiel, M.A. (1997) Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **26**: 65-79.
- Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., Schumann, W. (2001) Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon. *Molecular Microbiology preprint*: 1-14.
- 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. *Journal of Bacteriology* **177**: 123-133.
- White, B., A. (1993) PCR protocols. *Humana Press*.
- 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 & Development* **10**: 2265-2275.
- Yasbin, R.E., Willson, G. A., Young, T. E. (1973) Transformation and Transfection of lysogenic strains of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology* **113**: 540-548.

- Yuan, G., and Wong, S.L. (1995) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *Journal of Bacteriology* **177**: 6462-6468.
- Yura, T., Kanemori, M., and Morita, M.T. (2000) The heat shock response: regulation and function. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, D.C.: ASM, pp. 3-18.
- 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 . *Journal of Bacteriology* **183**: 2316-2321.
- Zuber, U., and Schumann, W. (1994) CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of the heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **176**: 1359-1363.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Völker für die interessante Themenstellung, die stetige Diskussionsbereitschaft und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer danke ich für die Bereitschaft das Erstgutachten anzufertigen. Bei Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Rolf 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. Mein Dank gilt auch Frau Isabel Manns und Herrn Dr. Gero Steinberg für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie. Herrn Mathias Gratz und Frau Henriette Meyer zu Schwabedissen danke ich für die Anleitung bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie. Bei Herrn Dr. Michael Niederweiß danke ich für die Überlassung des GFP+. Frau Dr. Grit Kuhnke danke ich für die Überlassung von Plasmiden und Stämmen.

Frau Anja Petersohn und Herrn Prof. Dr. Michael Hecker danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Charakterisierung des SigB-Regulons mit Hilfe von DNA-Makroarrays.

Frau Dr. Tamara Hoffmann, Frau Dr. Andrea Krisp, Frau Dr. Andrea Völker und Frau Jutta Gade danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit in der Beschreibung der Kälteinduktion von SigB.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken. Vor allem bei Herrn Leif Steil, Frau Alexandra Schütz, Frau Annette Dreisbach und Herrn Falk Hertwig für ihre konstruktiven Kritiken und Diskussionsbereitschaft.

Den Arbeitsgruppen Bremer und Buckel danke ich für die Hilfe bei der Bewältigung der zahlreichen Probleme des Laboralltags. Bei der Arbeitsgruppe Hecker bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei der Eingewöhnung in Greifswald.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Anna und Richard Brigulla, meiner Schwester Alexandra und meiner Freundin Anja Vaasen, die mein Studium und das Entstehen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Untersuchungen zur generellen Stressantwort in *Bacillus subtilis* nach Einwirkung von Umweltstress und bei niedriger Temperatur“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, dem

(Matthias Brigulla)

Lebenslauf

Persönliche Angaben: *Name:* Matthias Brigulla

Geburtstag: 08.08.1973

Geburtsort: Marburg / Lahn

Ausbildung

1993 Abitur am Ganztagsgymnasium Barsinghausen

seit Oktober 1994 – Juli 2002 Philipps-Universität Marburg / Hessen

1996 Vordiplom

1998 mündliche Diplomprüfungen in Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie

Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung weiterer Regulatoren der Aktivität des generellen Stresssigmafaktors σ^B in *Bacillus subtilis*“

seit Oktober 1999 Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs "Proteinfunktionen auf atomarer Ebene" der Philipps-Universität Marburg

seit August 2002 in der Arbeitsgruppe „Funktionelle Genomforschung“ von Prof. Dr. Uwe Völker an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Publikationen

Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J., Völker, U., and M. Hecker 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*; **183**:5617-5631

Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, 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. *Journal of Bacteriology*; **185**:4305-4313

Zivildienst

Aug. '93 – Okt. '94 Anaesthesie, OP-Block I – II, Med. Hochschule Hannover

Tätigkeit neben dem Studium

Semesterferien '94 - '96 Springer im OP für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Medizinische Hochschule Hannover

Praktika

1990 Zwei Wochen Schulpraktikum in der Ökostation Goltern; Thema: Chemische und biologische Trinkwasseranalyse der Deisterflüsse und ihrer Quellen

1990 Drei Wochen im Ausbildungslabor der Behringwerke Marburg zum Kennenlernen des Berufsbildes eines Biologielaboranten während der Sommerferien

1998 Sechs Wochen Cornell University, New York, USA Studienaufenthalt im Labor von Dr. Zinder; Thema: Anaerobes Wachstum von Stamm 195