

Philipps



Universität  
Marburg

**Eine neue Facette im zellulären Anpassungsprozess von *Bacillus subtilis*  
an hohe Salinitäten:**

**Die Analyse des osmotisch induzierten *yqiHIK* Operons**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Kathleen Elisabeth Fischer**

aus Marburg

Marburg/Lahn, 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis Oktober 2012 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am: 09.11.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

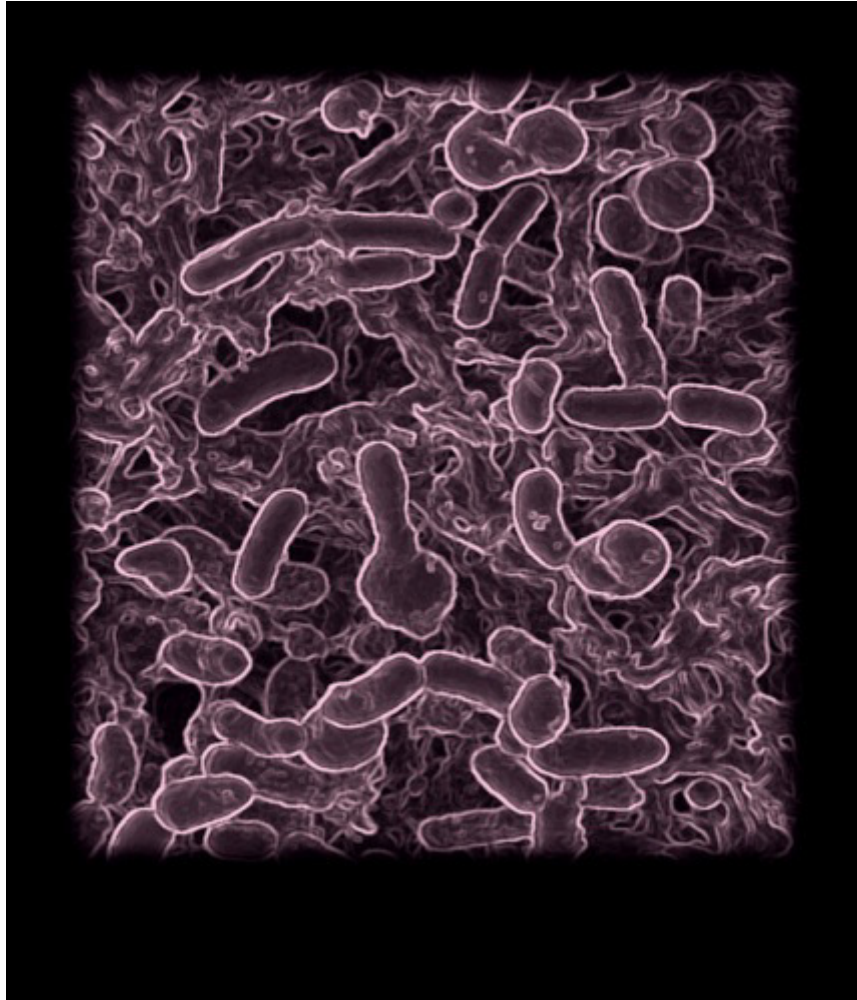
Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung am: 30.11.2012

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse wurden zum Teil in der folgenden Originalpublikation veröffentlicht:

**Fischer, K. E.** and Bremer, E. 2012. Activity of the osmotically regulated *yqiHIK* promoter from *Bacillus subtilis* is controlled at a distance. J. Bacteriol. **194**:5197-5280.

Im Rahmen dieser Veröffentlichung (Fischer und Bremer, 2012) wurde ein Cover-Bild eingereicht, das auch akzeptiert wurde:



---

**Cover Bild** (Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.):

Der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 wurde in Minimal-Medium (SMM) unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) inkubiert. Während des Anpassungsprozesses an hohe Osmolaritäten finden drastische morphologische Veränderungen im Phänotyp von *B. subtilis* Zellen statt, die sich durch ein hohes Maß an Heterogenität auszeichnen. Nachdem die Zellen sich an die osmotische Stresssituation angepasst haben, bilden sich die morphologischen Veränderungen schrittweise zur charakteristischen stäbchenförmigen Morphologie von *B. subtilis* zurück. Das hier dargestellte Bild zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (8.000-fache Vergrößerung) von *B. subtilis* Zellen während dieses Anpassungsprozesses. Die Konturen der Zellen wurden mit einem Bild-Tool für „künstlerische Effekte“ (Power Point) hervorgehoben. Die Farbe wurde anschließend mit dem Programm Photoshop verändert.

*Meinem Vater*

**INHALTSVERZEICHNIS**

	<u>Seite</u>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>I. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>III. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1. Differenzierungsprozesse in <i>B. subtilis</i> .....	3
1.1. Sporulation.....	5
1.2. Kannibalismus.....	7
1.3. Biofilm-Formation.....	8
2. Osmoregulation in <i>B. subtilis</i> .....	9
2.1. Wasser-Management unter osmotischen Stressbedingungen.....	9
2.2. Anpassung an hochosmolare Bedingungen: Die „Salt-out“ Strategie .....	10
3. Die bakterielle Zellwand.....	12
3.1. Die chemische Struktur und Architektur der bakteriellen Zellwand .....	13
3.2. Die Zellwand-Synthese, Peptidoglykan-Reifung und Turnover.....	14
4. Zellwand hydrolysierende Enzyme- die Autolysine .....	15
4.1. Klassifizierung der Autolysine.....	15
4.2. Charakteristika der Zellwandhydrolasen.....	16
4.3. Transkriptions- sowie posttranslationelle Regulation der Autolysine .....	16
5. Die Salzinduktion zahlreicher Gene und deren Beteiligung am Zellwandmetabolismus.....	17
6. Zielsetzung.....	21
<b>IV. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
1. Chemikalien und Materialien.....	22
2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	22
2.1. Bakterienstämme.....	22
2.2. Plasmide .....	25
2.3. Oligonukleotide .....	27
3. Medien und Zusätze.....	27
3.1. Medien .....	27
3.2. Medienzusätze und Antibiotika .....	29
4. Mikrobiologische Methoden .....	29
4.1. Sterilisation .....	29
4.2. Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Bakterien .....	29
4.3. Ermittlung der Zelldichte .....	30
4.4. Bestimmung des Sporentiters.....	30
4.5. Analyse des Schwärmeverhaltens von <i>B. subtilis</i> .....	30
4.6. Biofilm-Assay .....	31

5.	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	31
5.1.	Präparation von Nukleinsäuren .....	31
5.1.1.	Präparation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> .....	31
5.1.2.	Präparation von Plasmid-DNA .....	31
5.1.3.	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>B. subtilis</i> .....	31
5.2.	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	32
5.3.	Konstruktion einer Deletions-Insertions-Mutante über ein PCR-Konstrukt .....	32
5.4.	DNA-Restriktion .....	33
5.5.	Agarosegelelektrophorese.....	33
5.6.	Reinigung von DNA .....	33
5.7.	Ligation .....	33
5.8.	Transformation.....	34
5.8.1.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
5.8.2.	Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	34
5.9.	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	34
5.10.	DNA-Sequenzierung .....	34
5.11.	Promotor-Mapping via Primer-Extension-Analyse.....	35
5.12.	Zielgerichtete Mutagenese .....	35
6.	Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen .....	36
6.1.	Konstruktion von Plasmiden .....	36
6.1.1.	Der Shuttlevektor pRB373 .....	36
6.1.2.	Das Expressionsplasmid pASK-IBA5 plus.....	37
6.1.3.	Der Vektor pJMB1 dient der Konstruktion von N-terminalen <i>treA</i> - Reporterfusionen.....	37
6.1.4.	Das Plasmid pGP382.....	38
6.2.	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> Stämmen .....	39
6.2.1.	Konstruktion der verschiedenen Deletion-Insertion-Mutanten.....	39
6.2.2.	Konstruktion der <i>yqiH</i> -Reporter-gen-Fusionsstämme.....	39
7.	Biochemische Methoden.....	40
7.1.	Bestimmung der TreA-Aktivität .....	40
7.2.	Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen .....	40
7.2.1.	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i> .....	40
7.2.2.	Reinigung der Proteine Yqil und SinR via Strep-Tag Affinitätschromatographie .....	41
7.3.	SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen .....	42
7.4.	Zymogramme – Zur Analyse von Zellwandhydrolasen .....	42
7.4.1.	Präparation der Zellwand von <i>B. subtilis</i> .....	42
7.4.2.	SDS PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen .....	43
8.	Radioaktive Bestimmung der intrazellulären Glycin-Betain und L-Carnitin Pools .....	43
9.	Mikroskopie .....	43
9.1.	Phasenkontrastmikroskopie.....	44

9.2. Fluoreszenzmikroskopie .....	44
9.3. Rasterelektronenmikroskopie .....	44
<b>V. ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
1. Die funktionelle, physiologische sowie regulatorische Analyse des salzinduzierten <i>yqiHIK</i> Operons aus <i>B. subtilis</i> .....	45
1.1. Hochosmolare Bedingungen führen in <i>B. subtilis</i> zu Veränderungen der Morphologie .....	45
1.2. Das <i>yqiHIK</i> Gencluster aus <i>B. subtilis</i> .....	47
1.3. Bioinformatische Analyse der putativen Amidase Yqil aus <i>B. subtilis</i> .....	49
1.4. Funktionelle Charakterisierung der vermutlichen Zellwandhydrolase Yqil aus <i>B. subtilis</i> : Heterologe Expression, Reinigung und Zymographie .....	51
1.5. Die Deletion des <i>yqiHIK</i> Operons beeinträchtigt das Wachstumsverhalten von <i>B. subtilis</i> unter hochosmolaren Bedingungen .....	52
1.5.1. Physiologische Auswirkungen eines Up-Shock auf die Deletionsmutante KFB8 .....	56
1.5.2. Die Komplementation des <i>yqiHIK</i> Phänotyps .....	57
1.5.3. Die Motilität der <i>yqiHIK</i> Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt .....	58
1.6. Die osmotische Induktion des <i>yqiHIK</i> Operons aus <i>B. subtilis</i> .....	59
1.6.1. Primer-Extension-Analyse: Die Bestimmung des SigA-abhängigen Promotors des <i>yqiHIK</i> Operons .....	60
1.6.2. Zielgerichtete Mutagenese des salzabhängigen SigA-Promotors des <i>yqiHIK</i> Genclusters .....	61
1.6.3. Der Einfluss der stromaufwärts gelegenen AT-reichen Region auf die osmotische Induzierbarkeit des <i>yqiHIK</i> Operons .....	63
1.6.4. Der Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU auf die Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons unter hyperosmotischen Bedingungen .....	65
2. Die Repression des <i>yqiHIK</i> Genclusters durch diverse kompatible Solute .....	66
2.1. Analyse der osmoprotektiven Eigenschaften von Glycin-Betain und L-Carnitin .....	68
2.2. Die Bestimmung des intrazellulären Solut-Pools für Glycin-Betain und L-Carnitin .....	69
3. Biofilm-Formation vs. Sporulation: Der Beitrag des <i>yqiHIK</i> Genclusters zu diesen Differenzierungsprozessen .....	70
3.1. Der Einfluss des Repressor-Proteins SinR auf die Expression des <i>yqiHIK</i> Operons aus <i>B. subtilis</i> .....	71
3.1.1. Der Repressor AbrB besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Expression des <i>yqiHIK</i> Genclusters .....	73
3.1.2. Heterologe Produktion und Reinigung des SinR Proteins aus <i>B. subtilis</i> .....	74
3.1.3. Physiologische Untersuchung der Deletionsmutante KFB8 zum Biofilm-Verhalten in <i>B. subtilis</i> .....	75
3.2. Der Einfluss der Deletionsmutante KFB8 in den Sporulationsprozess: Die Bestimmung des Sporentiters .....	76



3.2.1.	Die Induktion der <i>yqiHIK</i> Expression nach Initiation der Sporulation .....	78
3.2.2.	Die Expression des <i>yqiHIK</i> Operons bei Initiation der Sporulation ist SinR/SinI-abhängig .....	79
3.2.3.	Der salzinduzierbare, SigA-abhängige Promotor ist nicht für die Expression des <i>yqiHIK</i> Genclusters unter Sporulations-Bedingungen verantwortlich .....	80
3.2.4.	Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des sporulationsspezifischen Promotors.....	81
4.	Die Expression des <i>yqiHIK</i> Operons in der „Todeszone“ .....	82
4.1.	Der salzinduzierbare, SigA-abhängige Promotor ist nicht für die Transkription des <i>yqiHIK</i> Genclusters in der Todeszone verantwortlich.....	84
4.2.	Verkürzungen der <i>yqiHIK</i> Promotorregion.....	85
4.3.	Analyse des Einflusses diverser Regulator-Mutanten auf die Induktion der Transkription in der „Todeszone“ .....	86
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>87</b>
1.	Salzstress induzierte Modifikationen der Zellwand in <i>B. subtilis</i> .....	88
1.1.	Die physiologische Rolle der YqiHIK Proteine unter hyperosmotischen Bedingungen.....	89
1.2.	Die Wahrnehmung eines osmotischen Signals in <i>B. subtilis</i> .....	92
1.2.1.	Das Regulon des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU sowie dessen Beteiligung an der Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons .....	95
1.2.2.	Das Modell zur osmotischen Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons aus <i>B. subtilis</i> .....	98
2.	Die Beteiligung des Repressors SinR an der Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons.....	100
2.1.	Die Induktion des Operons nach Initiation der Sporulation .....	101
2.2.	Das Modell zur SinR/SinI-abhängigen Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons .....	102
3.	Der Anstieg der <i>yqiHIK</i> Promotoraktivität in der „Todeszone“ .....	104
3.1.	Die funktionelle Bedeutung des Yqil Proteins in der „Todeszone“ .....	105
3.2.	Implikationen der facettenreichen Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons .....	108
4.	Ausblick .....	109
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>110</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>128</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>138</b>
<b>X.</b>	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>139</b>
<b>XI.</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>140</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<b>Abb. 1:</b> Zelluläre Differenzierungswege in <i>B. subtilis</i> .	4
<b>Abb. 2:</b> Der Ablauf des Sporulationsprozess in <i>B. subtilis</i> .	7
<b>Abb. 3:</b> Biofilm-Formation in <i>B. subtilis</i> .	9
<b>Abb. 4:</b> Anpassung von <i>B. subtilis</i> an hochosmolare Bedingungen.	12
<b>Abb. 5:</b> Zusammensetzung des Zellwand-Peptidoglykans in <i>B. subtilis</i> .	14
<b>Abb. 6:</b> Modell zur Architektur des Zellwand-Peptidoglykans in <i>B. subtilis</i> .	14
<b>Abb. 7:</b> PCR vermittelte Generation von Gendeletionen.	33
<b>Abb. 8:</b> Darstellung des Shuttlevektors pRB373.	36
<b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung des Expressionssystems pASK-IBA5 plus.	37
<b>Abb. 10:</b> Das <i>treA</i> -Reportergenplasmid pJMB1.	38
<b>Abb. 11:</b> Das Expressions-Plasmid pGP382.	39
<b>Abb. 12:</b> Phasenkontrastmikroskopie des <i>B. subtilis</i> Wildtyp-Stammes.	46
<b>Abb. 13:</b> Rasterelektronenmikroskopie (REM) des <i>B. subtilis</i> Wildtyp-Stammes.	47
<b>Abb. 14:</b> Struktur und genetische Organisation des <i>yqiHIK</i> Operon aus <i>B. subtilis</i> .	48
<b>Abb. 15:</b> <i>In silico</i> Analyse der putativen Amidase Yqil.	51
<b>Abb. 16:</b> Biochemische Analyse des Proteins Yqil.	52
<b>Abb. 17:</b> Wachstumsanalyse diverser Amidase-Mutanten.	53
<b>Abb. 18:</b> Wachstumsanalyse der Mutanten KFB8 und KFB37.	54
<b>Abb. 19:</b> Analyse der morphologischen Veränderungen von <i>B. subtilis</i> Zellen entlang der Wachstumskurve.	55
<b>Abb. 20:</b> "Live and Dead Staining" hyperosmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Zellen.	56
<b>Abb. 21:</b> Analyse des Wachstumsverhaltens des Stammes KFB8 nach der plötzlichen Erhöhung der externen Osmolarität.	57
<b>Abb. 22:</b> Komplementation des Phänotyps der Mutante KFB8 durch die Synthese von Yqil.	58
<b>Abb. 23:</b> Analyse des Schwärmeverhaltens von <i>B. subtilis</i> auf Softagarplatten.	59
<b>Abb. 24:</b> Die Expression des <i>yqiHIK</i> Genclusters in Abhängigkeit steigender NaCl-Konzentrationen.	60
<b>Abb. 25:</b> Die Identifizierung des <i>yqiHIK</i> Transkriptionsstartpunktes.	61
<b>Abb. 26:</b> Die Lage der AT-reichen Region in der <i>yqiHIK</i> Promotorregion.	64
<b>Abb. 27:</b> Der Ausschluss der Beteiligung des Rok Proteins auf die Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons.	65
<b>Abb. 28:</b> Die <i>yqiHIK</i> Promotoraktivität und deren Abhängigkeit von dem Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU.	66
<b>Abb. 29:</b> Die Repression des <i>yqiHIK</i> Genclusters durch diverse kompatible Solute.	68
<b>Abb. 30:</b> Wachstumsanalyse des Stammes KFB23.	69
<b>Abb. 31:</b> Die intrazelluläre Konzentration der kompatiblen Solute Glycin-Betain und L-Carnitin.	69
<b>Abb. 32:</b> Der Biofilm-Repressor SinR aus <i>B. subtilis</i> .	71
<b>Abb. 33:</b> Die Identifikation zweier möglicher SinR Bindestellen in der regulatorischen Region des <i>yqiHIK</i> Operons.	73
<b>Abb. 34:</b> Der Einfluss des Regulators AbrB auf die Expression des <i>yqiHIK</i> Genclusters.	74

**Abb. 35:** Heterologe Expression und Reinigung des SinR Proteins aus *B. subtilis*. ..... 75

**Abb. 36:** Die Analyse des Biofilm-Verhaltens der Deletionsmutante KFB8. .... 76

**Abb. 37:** Die Quantifizierung der Sporulationsfrequenz in DSM. .... 77

**Abb. 38:** Die Quantifizierung der Sporulationsfrequenz in SMM. .... 78

**Abb. 39:** Die Induktion der *yqiHIK* Expression nach Initiation der Sporulation..... 79

**Abb. 40:** Die Abhängigkeit der Initiation der *yqiHIK* Expression in DSM vom SinR Regulator. .... 79

**Abb. 41:** Der Einfluss des salzabhängigen SigA-Promotors auf die Induktion des *yqiHIK* Operons in DSM. .... 80

**Abb. 42:** Die Identifikation des *yqiHIK* Transkriptionsstartpunktes bei Eintritt in die Sporulation..... 81

**Abb. 43:** Zielgerichtete Mutagenese des putativen SigH-Promotors..... 82

**Abb. 44:** Wachstumsphasenabhängige Transkription des *yqiHIK* Operons unter isoosmotischen Bedingungen. .... 83

**Abb. 45:** Wachstumsphasenabhängige Transkription des *yqiHIK* Operons unter hyperosmotischen Bedingungen. .... 84

**Abb. 46:** Der Einfluss des salzabhängigen SigA-Promotors auf die Induktion des *yqiHIK* Operons in der Todeszone. .... 85

**Abb. 47:** Die Eingrenzung der Lokalisation des Todespromotors des *yqiHIK* Genclusters. .... 86

**Abb. 48:** Der Einfluss diverser Regulatoren aus *B. subtilis* auf die Aktivität der Expression des *yqiHIK* Operons in der „Todeszone“. .... 86

**Abb. 49:** Die komplexe Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*..... 88

**Abb. 50:** Domänenstruktur der Histidin-Kinase DegS aus *B. subtilis*. .... 93

**Abb. 51:** Das Modell zur osmotischen DegS/DegU-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Operons. .... 99

**Abb. 52:** Differenzierungsmöglichkeiten in *B. subtilis* und deren Abhängigkeit zur Spo0A Konzentration. .... 103

**Abb. 53:** Modell zur SinR/SinI-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Genclusters. .... 104

**Abb. 54:** Die Eingrenzung des putativen dritten Promotors des *yqiHIK* Genclusters..... 105

**Abb. 55:** Der putative Zellwand-Recycling-Pathway in *B. subtilis*. .... 107

**Abb. 56:** Versuchte Komplementation des Phänotyps der Mutante KFB8 durch die Synthese von Yqil. .... 135

**Abb. 57:** Analyse des Schwärmeverhaltens von Zellwandhydrolase-Mutanten auf Softagarplatten. 135

**Abb. 58:** Strukturen diverser kompatibler Solute aus *B. subtilis*..... 136

**Abb. 59:** Abhängigkeit der *yqiH*-Promotoraktivität von der externen Glycin-Betain Konzentration.... 136

**Abb. 60:** Sequenzierungs-Ergebnisse der identifizierten Biofilm-Markergene. .... 137

**TABELLENVERZEICHNIS**

	<u>Seite</u>
<b>Tabelle 1:</b> Durch Hochsalz induzierte Gene und deren Funktion im Zellwandmetabolismus .....	19
<b>Tabelle 2:</b> <i>E. coli</i> – Stämme .....	22
<b>Tabelle 3:</b> <i>B. subtilis</i> – Stämme .....	23
<b>Tabelle 4:</b> Plasmide .....	25
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung des Biofilm-Mediums MSgg .....	28
<b>Tabelle 6:</b> Antibiotika und Zusätze .....	29
<b>Tabelle 7:</b> Zielgerichtete Mutagenese des SigA-abhängigen <i>yqiHIK</i> Promotors .....	63
<b>Tabelle 8:</b> Amidasen aus <i>B. subtilis</i> im Überblick .....	91
<b>Tabelle 9:</b> Vergleich der Transkriptom-Studien: Salzinduktion-DegS/DegU-Regulon .....	96
<b>Tabelle 10:</b> Oligonukleotide .....	128
<b>Tabelle 11:</b> Die <i>B. subtilis</i> Stammkonstruktion im Überblick .....	133

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AB	Antibiotika
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
bp	Basenpaare
Cml <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	Carboxy-terminal
DMSP	Dimethylsulfoniopropionat
DSM	Difco's Sporulationsmedium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery <sup>R</sup>	Erythromycin-Resistenz
GB	Glycin-Betain
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
KBE	Koloniebildende-Einheit
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
MMA	Minimal-Medium A
N-terminal	Amino-terminal
NaCl	Natriumchlorid
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PBP	Penicillinbinde Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pNPG	para-Nitrophenyl- $\alpha$ -Glucopyranosid
RBS	Ribosomenbindestelle
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sig	Sigmafaktor
SMM	Spizizen's Minimal-Medium
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
x g	relative Zentrifugalkraft als vielfaches der Erdbeschleunigung
ZKS	Zwei-Komponenten-System

## I. ZUSAMMENFASSUNG

In seinem natürlichen Lebensraum ist der Mikroorganismus *Bacillus subtilis* zahlreichen Stressfaktoren ausgesetzt. Durch komplexe Regulations- sowie Differenzierungsprozesse (Biofilm-Formation, Sporulation) besitzt dieses Bakterium die Fähigkeit, sich an diverse Stresssituationen anzupassen. Die Verfügbarkeit von Wasser ist ein Beispiel für einen solchen Stressfaktor. Als eine zentrale Anpassungsstrategie an hyperosmotische Kulturbedingungen, konnte in *B. subtilis* die Akkumulation von kompatiblen Soluten durch Synthese und Aufnahme identifiziert werden. In Transkriptom-Analysen hyperosmotisch gestresster *B. subtilis* Kulturen wurden jedoch zahlreiche Gene identifiziert, die unter Hochsalz Bedingungen eine Induktion in der Genexpression zeigten (265).

Interessanterweise kristallisierte sich bei der Analyse dieser Transkriptom-Daten eine Gruppe von Genen heraus, denen eine Beteiligung am Zellwandmetabolismus zugesprochen werden konnte. Beispiele dafür sind die Gene *yqiH* sowie *yqil*. Das Gen *yqiH* kodiert vermutlich für ein Lipoprotein, wohingegen das Protein Yqil Sequenzähnlichkeiten zu der Enzymklasse der N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen aufweist. Diese Enzyme gehören zu der Gruppe der Zellwandhydrolasen (Autolysine), die in wichtige zelluläre Prozesse involviert sind. Mit Hilfe der Zymographie konnte im Verlauf dieser Arbeit die hydrolytische Fähigkeit für das Protein Yqil *in vitro* bestätigt werden.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Kultivierung von *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen zu einer drastischen Veränderung in der Zellmorphologie führte, die ausschließlich während der Anpassungsphase auftrat. Die Ergebnisse der Transkriptom-Analysen und auch die Beobachtung der morphologischen Veränderungen führten zu der Hypothese, dass die Restrukturierung der Zellhülle eine neue Facette in der Adaptation von *B. subtilis* an hochsaline Bedingungen darstellen könnte. Um eine mögliche Beteiligung der Proteine YqiH sowie Yqil zu untersuchen wurden, diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit einer biochemischen, physiologischen sowie regulatorischen Charakterisierung unterzogen.

Durch eine RT-PCR-basierende Methode konnte eine Co-Transkription der *yqiHI* Gene mit einem weiteren Gen *yqiK* erstmals gezeigt werden. Die Charakterisierung einer *yqiHIK* Deletionsmutante zeigte unter normalen physiologischen sowie hyperosmotischen Bedingungen eine Wachstumsverzögerung im Vergleich zum Wildtyp, was allein auf das Fehlen der Amidase Yqil zurückgeführt werden konnte. Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass die YqiHIK Proteine wesentlich an der Restrukturierung der Zellwand beteiligt sind. Durch Reporterstudien wurde die osmotische Induktion des *yqiHIK* Operons näher analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine Expression des *yqiHIK* Genclusters nur bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen erfolgte (> 0,7 M NaCl). Die Expression wird dabei über einen SigA-Promotor vermittelt, der mit Hilfe einer Primer-Extension-Analyse identifiziert werden konnte und ferner einer detaillierten Mutagenese-Studie unterzogen wurde. Verkürzungen in der *yqiHIK* Promotorregion führten zu der Identifikation einer AT-reichen Region, die kritisch für die Induktion des Operons unter hohen osmotischen Bedingungen war. Diese AT-reiche Region wurde als mögliche Binderegion für den Regulator DegU aus *B. subtilis* wiedererkannt. Die Beteiligung des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU an der Induktion der Expression des *yqiHIK* Operons unter salinen Bedingungen, stellte dabei ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit dar, wobei somit erstmalig ein Hinweis darauf gegeben wurde, wie die Zelle in der Lage ist, hohe NaCl-Konzentrationen wahrzunehmen und darauf zu reagieren.

Neben der Induktion des *yqiHIK* Operons unter hyperosmotischen Bedingungen wurden im Verlauf dieser Dissertation noch zwei weitere regulatorische Besonderheiten dieses Genclusters aufgedeckt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der Expression des *yqiHIK* Operons direkt nach Initiation der Sporulation erfolgte. Dabei wurde eine Beteiligung des SinR Regulators nachgewiesen, welcher auch die Expression dieses Operons unter normalen Wachstumsbedingungen verhindert. Darüber hinaus konnte eine Erhöhung der Transkription des *yqiHIK* Genclusters in der sogenannten „Todeszone“ beobachtet werden. Für beide dieser regulatorischen Aspekte wurde eine Beteiligung des zuvor identifizierten SigA-Promotors ausgeschlossen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden somit drei physiologische Prozesse aufgedeckt, an denen die Genprodukte des *yqiHIK* Operons beteiligt zu sein scheinen, wobei die Transkription des *yqiHIK* Genclusters über mindestens zwei unterschiedliche Promotoren erfolgt. Zusätzlich wurden zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Expression des *yqiHIK* Operons kontrollieren. Die Regulation des *yqiHIK* Operons ist ein gutes Beispiel dafür, wie facettenreich Bakterien ihre Umwelt wahrnehmen und genetisch darauf reagieren können.

## II. SUMMARY

The microorganism *Bacillus subtilis* lives in a challenging habitat, i.e. the upper layers of the soil. Due to its ability to differentiate between several developmental programs (e.g. Biofilm formation, sporulation) the organism is able to adapt to various environmental stress conditions as well as nutrient limitation. Water availability is a crucial factor for all microorganisms. A key feature during the acclimatization process of salt stresses *B. subtilis* cells is the accumulation of large amounts of compatible solutes. Based on a genome-wide profiling study of osmotically stressed cells (265) a plenty of salt induced genes could be identified. However, the majority of these gene products are uncharacterized so far.

Interestingly, among the osmotically induced genes there are several cell wall modifying proteins. Members of this group of osmotically induced genes are for example the genes *yqiH* and *yqil*. The *yqiH* gene codes for a putative lipoprotein of unknown function whereas the gene *yqil* is predicted to code for an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. These enzymes belong to the group of cell wall hydrolases (autolysins) which are involved in several important cellular processes. The hydrolytic activity of the Yqil protein was confirmed in this study by the *in vitro* zymogram technique.

Furthermore, drastic but transient, changes in the morphology of salt challenged *B. subtilis* cells could be observed during the acclimatization process. In sum, the transcription profiling study as well as the cross morphological deformations lets me hypothesize that modifications of the cell wall could be a new and so far unexplored facet in the osmo adaptation process in *B. subtilis*. To address a possible impact of the encoded YqiH and Yqil proteins on this process, a physiological characterization as well as a genetic analysis of the transcription of the *yqiHIK* operon was performed in this PhD thesis.

RT-PCR based analyses revealed a co-transcription of the *yqiHI* genes with a third gene, *yqiK*. The analysis of a *yqiHIK* deletion mutant showed a delayed growth phenotype under normal and hyper osmotic growth conditions. This growth defect was exclusively due to the lack of the amidase Yqil. In addition, I could show that the YqiHIK proteins were not critically involved in the reshaping of the cell wall under hyperosmotic conditions. Reporter gene studies revealed an expression of the *yqiHIK* gene cluster only when the *B. subtilis* cell was exposed to a significant level of osmotic stress (> 0.7 M NaCl). Primer extension analyses lead to the identification of a SigA-type promoter that is responsible for osmotic induced transcription of the *yqiHIK* gene cluster which was furthermore subject of a detailed mutagenesis study. A deletion analysis of the *yqiHIK* regulatory region was performed that showed an AT-rich DNA segment that is critical for activity and osmotic regulation of the *yqiHIK* operon. Additionally, the AT-rich region was identified as a target for the response regulator DegU from *B. subtilis*. As a key aspect of this thesis, it could be demonstrated that the two component system DegS/DegU is crucial for the regulation of the expression of the *yqiHIK* genes at high salinity growth conditions. This result pointed to, how the *B. subtilis* cell is able to recognize differences in the external NaCl concentration.

Beside the salt stress induction of the *yqiHIK* operon, two additional regulatory aspects of the *yqiHIK* gene cluster were discovered. On the one hand it was found that the expression of this transcriptional unit was initiated directly after the cells have entered the sporulation pathway. The SinR protein contributes to this regulatory facet and is also involved in preventing the *yqiHIK* expression under normal physiological growth conditions. On the other hand an increase of the *yqiHIK* transcription could be observed in the so called "death zone", after the cells have passed through the stationary growth phase. An involvement of the SigA promoter mediating osmotic control of the *yqiHIK* expression could be excluded with respect to both of the above described regulatory aspects.

In conclusion, the YqiHIK proteins seem to be involved in three different physiological processes: (1) Adaptation to hyperosmotic growth conditions, (2) sporulation and (3) peptidoglycan recycling. The expression of the *yqiHIK* operon is at least regulated by two differently controlled promoters. Furthermore, two transcriptional regulators could be discovered that manage the expression of the *yqiHIK* operon. The complex pattern of the transcription of the *yqiHIK* gene cluster is an informative example of how bacteria can recognize changes in their environment and adjust to these changes by selectively triggering gene expression.

### III. EINLEITUNG

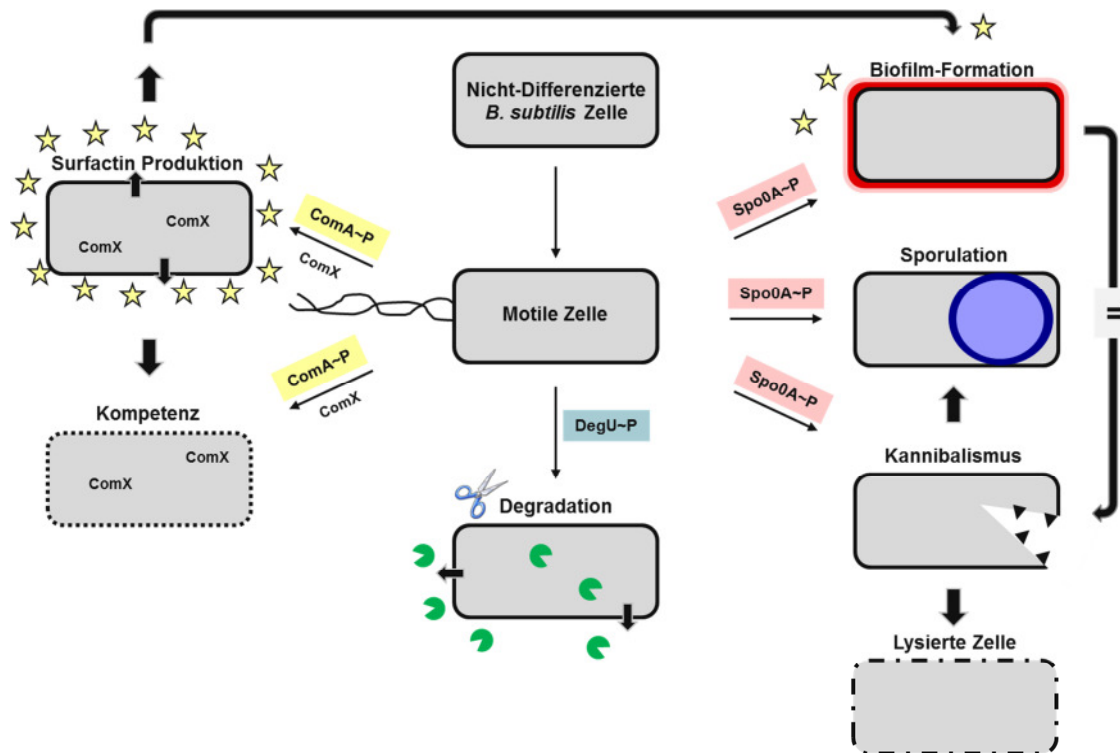
Bakterien sind in der Lage, praktisch jede ökologische Nische auf dieser Erde zu kolonisieren. Die Kolonisierung ist in den unterschiedlichen Lebensräumen jedoch davon abhängig, wie erfolgreich sich Mikroorganismen an sich verändernde Umweltbedingungen wie Schwankungen in der Temperatur, dem pH-Wert, der Osmolarität, der Strahlung sowie an Variabilitäten in der Verfügbarkeit von Nährstoffen anpassen können (3, 139, 228). Die Anpassung wird in Bakterien häufig über eine schnelle Änderung des Transkriptionsprofils gesteuert, in dem eine selektive Genexpression propagiert wird. Das Boden-Bakterium *Bacillus subtilis* gehört zu den am besten charakterisierten Gram-positiven Bakterien. Zelluläre Prozesse wie Motilität, Kannibalismus, Kompetenz, Biofilm-Formation sowie die Endosporenbildung gehören dabei zu den verschiedenen Entwicklungsmöglichkeiten in *B. subtilis* (5, 174, 255). Diese verschiedenen Abläufe unterliegen einer vielseitigen und sehr komplexen Regulation, an der wiederum zahlreiche proteinogene Faktoren beteiligt sind.

Die Entwicklungsprogramme (Sporulation, Kannibalismus sowie Biofilm-Formation) von *B. subtilis* werden im Folgenden vorgestellt. Im Anschluss daran wird die Anpassung des Organismus an hochosmolare Bedingungen dargestellt, da gerade Schwankungen in der externen Osmolarität eine in dessen Habitat, die oberen Bodenschichten, häufig vorkommende Stresssituation widerspiegelt. Des Weiteren werden die Funktion der Zellwand sowie die Architektur des Murein-Sacculus von *B. subtilis* dargelegt. Ein Schwerpunkt werden dabei die zellwandmodifizierenden Enzyme, die sogenannten Autolysine, sein.

#### 1. Differenzierungsprozesse in *B. subtilis*

Bakterien haben komplexe Signalwege entwickelt, um auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren. Nachdem diese Veränderungen von der Zelle wahrgenommen wurden, kann diese mit einer differenzierten Genexpression auf die jeweilige Stresssituation antworten. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass sich Mikroorganismen innerhalb einer Population in Subpopulationen differenzieren können, die sich einerseits zwar im Phänotyp unterscheiden, genetisch jedoch identisch sind (63, 174, 255). Dieses Phänomen wird als Bistabilität (63) oder auch Bimodalität (174) bezeichnet und ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Subpopulation andere Signalmoleküle produziert oder auch auf solche antworten kann, die innerhalb einer Gemeinschaft letztlich zu unterschiedlichen Fähigkeiten oder auch Zelltypen, eben dieser Subpopulation, führt. In *B. subtilis* konnte diese Art der Bistabilität sowohl bei den Differenzierungsprozessen Sporulation, Kannibalismus, Kompetenz, Motilität als auch bei der Produktion von extrazellulären Proteasen beobachtet werden (63, 174, 255). Die Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen tritt immer dann auf, sobald regulatorische Proteine nur ein bestimmtes Repertoire von Genen aktivieren. Dabei unterliegt dieser Regulator meist einem positiven Feedback Loop, was die unterschiedliche Genexpression zusätzlich propagiert. In *B. subtilis* agieren drei Master-Regulatoren, die für die Regulation der verschiedenen Entwicklungsprogramme verantwortlich sind (Spo0A, DegU sowie ComA) (174) (Abbildung 1).





**Abb. 1: Zelluläre Differenzierungswege in *B. subtilis*.**

Schematisch abgebildet werden die verschiedenen Zelltypen, die innerhalb einer *B. subtilis* Population existieren können. Die charakteristischen Eigenschaften, die mit gezeigten Differenzierungswegen einhergehen, wurden schematisch dargestellt. Die Sterne symbolisieren die Surfactin Produktion. Die Prozesse der Biofilm-Formation und des Kannibalismus laufen in einer identischen Subpopulation (=) (modifiziert nach López und Kolter (174)).

Eine Voraussetzung für die selektive Genexpression ist, dass die Master-Regulatoren in ihrer phosphorylierten und somit aktiven Form vorliegen. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Spo0A, DegU und ComA wird dabei durch die zugehörigen Histidin Kinasen gewährleistet. Im Falle des Regulators Spo0A handelt es sich um die Kinasen KinA, KinB, KinC, KinD und KinE (128, 129, 164, 165). Die Kinasen KinA und KinB sind an dieser Stelle für die Initiation der Sporulation notwendig, wohingegen die Kinasen KinC, KinD und KinE die Biofilm-Formation und Matrixbildung initiieren (82, 174). Die Aktivierung der Antwort-Regulatoren DegU sowie ComA erfolgt durch die Sensor-Kinasen DegS (55, 195) und ComP (286). Das Zwei-Komponenten-System (ZKS) DegS/DegU ist für die Regulation der extrazellulären Protease-Produktion (Subtilisin, Levansucrase und  $\alpha$ -Amylase) verantwortlich, wobei das ZKS ComP/ComA den Eintritt in die Kompetenz-Phase reguliert.

Die Differenzierung in die unterschiedlichen Zelltypen der diversen Entwicklungsprogramme kann in *B. subtilis* in drei verschiedenen Stufen eingeteilt werden (Abbildung 1) (174). Während des exponentiellen Wachstums befindet sich zunächst ein großer Teil einer *B. subtilis* Population in einem motilen Stadium (Ausbildung von Flagellen). Im weiteren Wachstumsverlauf treten die Zellen in die stationäre Wachstumsphase ein. Durch die Wahrnehmung eines spezifischen Signals (ComX) hat dies zur Folge, dass die *B. subtilis* Zelle in die Kompetenz-Phase eintritt, die diese zur Aufnahme nackter DNA aus der Umwelt befähigt, oder die Zelle dazu veranlasst, ebenfalls ein bestimmtes Signal-Molekül zu sekretieren (Surfactin). Wird wiederum Surfactin von der *B. subtilis* Zelle wahrgenommen, kann dies anschließend dazu führen, dass die Zellen sich in Matrix produzierende sowie kannibalistische Subpopulationen entwickeln. Die letzte Entwicklungsstufe wird schließlich

durch eine Nahrungslimitation induziert und führt dazu, dass ein Teil einer *B. subtilis* Population die Sporulation einleiten kann, wobei eine andere mit der Synthese von extrazellulären Proteasen beginnt.

### 1.1. Sporulation

Der Prozess der Sporulation wurde in der Vergangenheit intensiv in *B. subtilis* erforscht. Neben der Klasse der *Bacilli* sind ebenso alle Mitglieder der Gruppe *Clostrida* zur Ausbildung einer Spore fähig, wobei sich die Regulation dieses Entwicklungsprozesses in beiden Klassen sehr stark ähnelt (118, 142). Die Formation einer Spore wird in *B. subtilis* durch eine Nahrungslimitation eingeleitet. Diese kann durch Glucose-, Stickstoff oder auch Phosphatmangel während des vegetativen Wachstums induziert werden. Endosporen können sich in jeglichen ökologischen Nischen manifestieren, da diese hochresistent gegen Hitze, Strahlung, chemische Lösungsmittel sowie hydrolytische Enzyme sind (204). Darüber hinaus sind Sporen fähig, in diesem Ruhezustand sehr lange Zeitperioden zu überdauern (40, 285). Dabei konnten lebende Sporen aus Bernstein isoliert werden, die über 25-40 Millionen Jahre in einem fossilen Bienendarm verweilten (40). Sobald eine Verbesserung des Nahrungsangebotes im jeweiligen Habitat stattgefunden hat, sind Sporen in der Lage das vegetative Wachstum erneut aufzunehmen, was als Keimungsprozess bezeichnet wird (10). Als solche keimungsfördernde Signale konnten in *B. subtilis* Aminosäuren sowie Muropeptide identifiziert werden, bei denen es sich um lösliche Peptidoglykanfragmente handelt (254).

Nachdem die Sporulation initiiert wurde, bedarf die Formation einer Spore in *B. subtilis* sechs bis acht Stunden (37°C) (227). Dieser Entwicklungsprozess ist in sechs verschiedene Stufen eingeteilt (Abbildung 2), wobei jede dieser Stufen durch einen bestimmten Transkriptionsfaktor dominiert wird (69, 70, 116, 142, 227).

Die Initiation der Sporulation wird als **Stufe 0** definiert. Diese Entwicklungsphase wird durch den Master-Regulator Spo0A bestimmt, der als Transkriptionsfaktor agiert und somit über 100 Gene direkt in *B. subtilis* reguliert (72, 193). Die Aktivität des Spo0A Proteins ist abhängig von dessen Phosphorylierungsstatus, wobei hohe oder auch niedrige Konzentrationen von phosphoryliertem Spo0A (Spo0A~P) zur Expression unterschiedlicher Genklassen führen (81). Die Gene, die während der Sporulation exprimiert werden und unter der Kontrolle dieses Regulators sind, benötigen eine hohe Konzentration von Spo0A~P, da die Affinität zu der Binderegion, der sogenannten Spo0A-Box (296), niedriger ist (116). Die Phosphorylierung des Spo0A Proteins wird durch fünf Kinasen (KinA-KinE) gewährleistet (129), wobei hauptsächlich die Kinasen KinA und KinB zur Initiation der Sporulation beitragen (82). Dabei wird der Phosphatrest nicht direkt auf den Master-Regulator übertragen, sondern über zwei weitere Intermediate, die Phosphotransferase-Proteine Spo0F sowie Spo0B. Diese Reaktion wird als Phosphorelay bezeichnet (35). Die Signale, die von den Kinasen KinA sowie KinB wahrgenommen werden sind immer noch unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass beispielsweise die Kinase KinA direkt den intrazellulären ATP-Pool messen kann und somit die Signaltransduktion initiiert (266). Ein weiterer positiver Regulator der Sporulation ist der Sigmafaktor SigH, der für die Transkription von zahlreichen weiteren Genen verantwortlich ist, deren Genprodukte eine Rolle während der frühen Sporulation spielen (33). Die Aktivierung des *sigH* Gens liegt zum einen indirekt unter der Kontrolle des Master-Regulators Spo0A (47, 100). Zum anderen ist ein weiteres

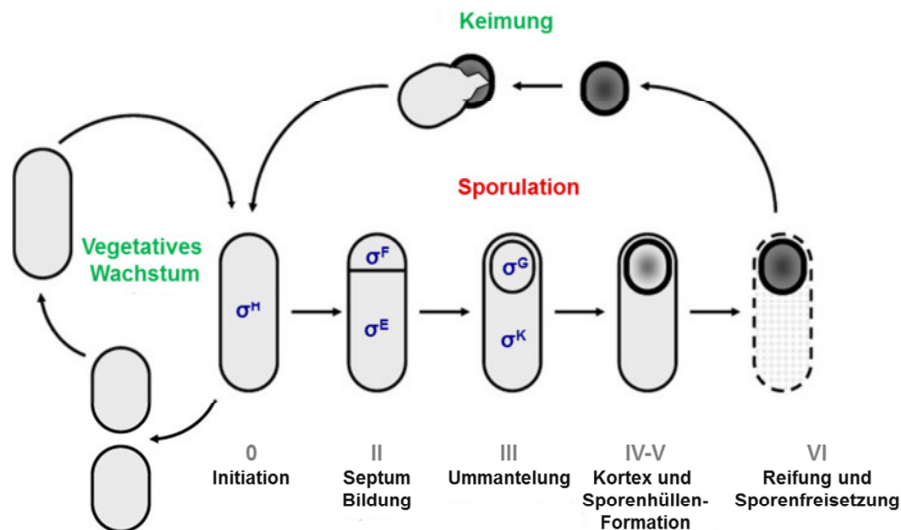
regulatorisches Protein an der Expression des *sigH* Gens beteiligt. In diesem Fall handelt es sich um den globalen Repressor AbrB der für eine direkte Repression des Gens verantwortlich ist (47). Die reprimierende Funktion des AbrB Proteins kann wiederum durch die phosphorylierte Form von Spo0A aufgehoben werden (47).

Nach Initiation der Sporulation findet nun in **Stufe II** der Sporulation die asymmetrische Zellteilung statt, bei der die stäbchenförmige *B. subtilis* Zelle in eine kleinere Vorspore sowie eine größere Mutterzelle unterteilt wird, welche durch ein Septum voneinander getrennt werden. Diese Art der Zellteilung zieht ebenfalls eine veränderte Chromosomen-Segregation mit sich.

In einem Phagozytose ähnlichen Prozess wird in **Stufe III** (Engulfment) die Vorspore vollständig mit einer zweiten Membran umzogen, wobei diese nun frei im Zytoplasma der Mutterzelle lokalisiert vorliegt. Während dieses Prozesses stellt der Abbau von Zellwandmaterial in der Mitte des Septums sowie am Zellpol der Vorspore einen essentiellen Schritt dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass drei Proteine SpoIID, SpoIIM sowie SpoIIP maßgeblich an dem Ummantelungsprozess beteiligt sind, wobei ausschließlich das Enzym SpoIID Zellwand hydrolytische Fähigkeiten besitzt (1).

Das Innere der Spore (Kern) erfährt während **Stufe IV-V** des Entwicklungsprozesses eine drastische Veränderung der chemischen Zusammensetzung. Zunächst findet zum Schutz der DNA die Synthese der SASP (small acid soluble spore protein) statt, die die DNA umgeben. Zusätzlich wird vermehrt Dipicolinsäure im Kern akkumuliert, eine charakteristische sporenspezifische Substanz, die zuvor in der Mutterzelle synthetisiert wurde. Die Aufnahme dieser Substanz geht mit der Anreicherung von zweiwertigen Kationen einher ( $\text{Ca}^{2+}$ ), was wiederum zur Dehydrierung und Mineralisierung der Spore führt. Zur gleichen Zeit findet die Synthese des sogenannten Sporen-Kortex statt, der aus einer modifizierten Form des Zellwand-Peptidoglykans besteht. Dieser befindet sich zwischen der äußeren und inneren Sporenmembran. Abschließend assembliert sich eine weitere äußere Proteinschicht, die als Sporenhülle bezeichnet wird und aus ca. 70 verschiedenen Proteinen besteht.

In **Stufe VI** wird schließlich die reife Spore durch die Lyse der Mutterzelle freigesetzt. Für diesen mehrstufigen Sporulationsprozess sind zahlreiche Sigmafaktoren verantwortlich, die zu unterschiedlichen Zeiten sowie in unterschiedlichen Kompartimenten aktiv sind und so eine gerichtete Expression der zahlreichen Zielgene in der Vorspore oder auch in der Mutterzelle ermöglichen (69, 70, 116, 227).



**Abb. 2: Der Ablauf des Sporulationsprozess in *B. subtilis*.**

Dargestellt ist ein schematischer Überblick des Sporulationszyklus in *B. subtilis*. Das vegetative Wachstum wird durch eine Zellteilung in zwei identische Tochterzellen bestimmt. Der Prozess der Sporulation wird durch eine Nahrungslimitation induziert. Die morphologischen Implikationen sowie die dominierenden Sigmafaktoren ( $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^K$ ) der einzelnen Stadien werden gezeigt. Durch die Keimung können die *B. subtilis* Zellen erneut das vegetative Wachstum aufnehmen (modifiziert nach J. Errington (69)).

## 1.2. Kannibalismus

Der Prozess des Kannibalismus wurde in *B. subtilis* erstmalig 2003 durch González-Pastor *et al.* (89) beschrieben. Dabei handelt es sich um eine Strategie, die Formation einer Endospore, die durch eine Nahrungslimitation induziert wird, vorerst nochmals hinauszuzögern, obwohl der Sporulationsprozess bereits eingeleitet worden ist. Dafür werden von einem Teil einer Population spezifische Toxine sekretiert, die zur Lyse der übrigen Subpopulation von *B. subtilis* Zellen führen. Durch die Aufnahme der durch die Zelllyse freigesetzten Nährstoffe, kann der Mikroorganismus letztlich die Sporulation nochmals verzögern. Ursache für die Verzögerung der Sporulation ist die hohe Komplexität des Sporulationsprozesses, der für *B. subtilis* einen immensen Energie- sowie Zeitaufwand bedeutet und der zudem nach zwei Stunden irreversibel ist (65, 221). Verbessert sich das Nahrungsangebot plötzlich im Habitat, ist der Organismus nach Überschreitung des sogenannten „Point of no return“, nicht mehr in der Lage die Formation einer Spore zu stoppen.

Grundlage für die Differenzierung in eine kannibalistische Zelle ist erneut das Phänomen der Bistabilität (63, 174). Nachdem eine Nährstofflimitation von der *B. subtilis* Zelle wahrgenommen wurde, findet ein Phosphorelay statt, der dazu führt, dass der Master-Regulator Spo0A phosphoryliert und somit aktiviert wird (Spo0A~P) (35, 129, 275). Dieser wird jedoch nur in einem Teil einer *B. subtilis* Population aktiviert, wodurch nur eine Subpopulation die Sporulation initiiert. Liegt das Spo0A Protein nun in seiner phosphorylierten Form vor, aktiviert dieser die Transkription von zwei für diesen Prozess spezifischen Genclustern (89). Zum einen wird die Expression des *skfA-H* Operons propagiert. Dieses Operon kodiert für das Toxin SkfA sowie für das zugehörige Exportsystem, welches dafür sorgt, dass das Toxin aus der Zelle transportiert wird und somit eine Immunität hervorruft (89). Zum anderen wird ein weiteres Toxin, SdpC, synthetisiert, welches auf dem zweiten Operon (*sdpABC*)

kodiert vorliegt und ebenfalls positiv durch Spo0A~P reguliert wird. Der Mechanismus, der zur Immunität gegenüber dem Toxin SdpC führt, konnte durch Ellermeier *et al.* aufgedeckt werden (68). In diesem Fall wird ein weiteres Operon (*sdpRI*) exprimiert, welches für einen löslichen Autorepressor (SdpR) sowie ein in der Zytoplasmamembran integriertes Immunitätsprotein (Sdpl) kodiert. Die Zelle wird vor dem Effekt des SdpC Toxins bewahrt, indem dieses an das Sdpl Protein in der Zytoplasmamembran bindet. Zusätzlich bindet an diesen Proteinkomplex der lösliche Autorepressor SdpR, wodurch letztlich die Immunität gewährleistet wird. In beiden Fällen exprimieren nur die *B. subtilis* Zellen die Immunitätsproteine, die auch die Toxine synthetisieren. Der andere Teil der *B. subtilis* Subpopulation, in der der Master-Regulator Spo0A nicht aktiviert wurde, synthetisiert weder das Toxin noch die Abwehrmechanismen. Diese Zellen werden somit lysiert und dienen als Nahrungsressource für den übrigen Teil der Population. Die Sporulation wird vorerst herausgezögert.

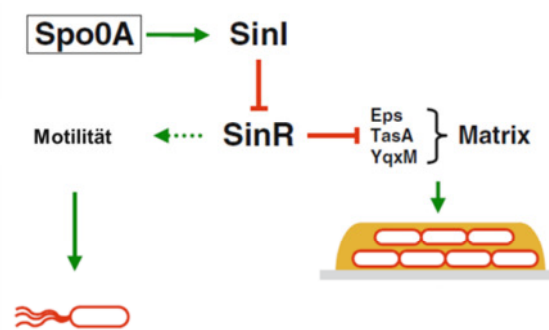
### 1.3. Biofilm-Formation

Bakterien sind in der Lage, sich an nahezu jede denkbare Oberfläche in ihrer Umgebung anzuheften (175). Dabei geht man davon aus, dass Mikroorganismen in den natürlichen Lebensräumen überwiegend in einem Biofilm vorliegen (51, 97). Bei einem Biofilm handelt es sich um eine komplexe Gemeinschaft aus Zellen, wobei diese Art der Differenzierung, trotz der erwähnten Bistabilität (63, 174) während dieses Prozesses, mit einem Vorteil für die ganze Population einhergeht.

Obwohl die Signalwege, die zur Biofilm-Formation der einzelnen Bakterienarten führen, sehr vielfältig sind, existieren dennoch einige Parameter, die alle gemein haben. Zum einen werden alle Zellen innerhalb eines Biofilms durch eine extrazelluläre Matrix zusammengehalten, wobei diese größtenteils aus Exopolysacchariden sowie Nukleinsäuren besteht (28, 290). Zum anderen wird die Biofilmformation durch extrazelluläre Signale (z. B. Surfactin) hervorgerufen, die entweder von der Zelle eigens synthetisiert werden oder aus der Umwelt aufgenommen werden können (148, 264). Weiterhin führt ein Biofilm zum Schutz einer ganzen Population, da diese beispielsweise von Antibiotika (178), Fress-Feinden (130) oder auch vor dem menschlichen Immunsystem geschützt wird (166). Es konnte beobachtet werden, dass viele der gängigen *B. subtilis* Laborstämme im Gegensatz zu ihren „wilden“ Vorfahren nicht mehr in der Lage, sind robuste Biofilme auszubilden. Dieses Phänomen wird auf eine Domestikation der Laborstämme zurückgeführt, bei der im Laufe der Zeit mehrere Mutationen stattgefunden haben, die für den Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms verantwortlich sind. Am Beispiel von *B. subtilis* konnte exakt diese Phänomen am Beispiel des domestizierten Labor- und Wildtypstammes 168 sowie dessen „wildem“ Vorläuferstamm (NCIB3610) beobachtet werden (27).

Eine Voraussetzung für die Biofilm-Formation in *B. subtilis* ist der Verlust der Motilität. Nachdem eine Subpopulation die Fähigkeit zur Fortbewegung verloren hat, fangen diese an, lange Zellketten zu bilden (27), dem eine charakteristische Matrix-Produktion folgt. Die extrazelluläre Matrix besteht aus dem Exopolysaccharid EPS sowie dem TasA Protein (26). Der zentrale Regulator während der Biofilm-Formation stellt das Repressor-Protein SinR dar (135). In motilen Zellen sorgt das SinR Protein dafür, dass die zwei essentiellen Gencluster, *epsA-O* sowie *yqxM-sipW-tasA*, die für die Matrix-Produktion in *B. subtilis* verantwortlich sind, reprimiert werden (46, 135). Dabei erkennt der Repressor eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion und verhindert dadurch deren

Transkription (50, 135). Die reprimierende Aktivität des SinR Proteins wird jedoch durch den Antagonisten SinI aufgehoben (167). Die zugrunde liegende Signaltransduktion findet wie folgt statt (Abbildung 3): In *B. subtilis* konnte die Produktion sowie Sekretion des „Quorum Sensing“-Moleküls Surfactin als wichtig für die Biofilm-Formation identifiziert werden, da dieses Signalmolekül einen Kaliumausstrom aus dem Zytoplasma der *B. subtilis* Zelle herbeiführt (173). Dieser Kaliumverlust wird von der Kinase KinC wahrgenommen und setzt wiederum den Phosphorelay in Gang, der schließlich zur Phosphorylierung des Master-Regulators Spo0A führt (173). Liegt das Spo0A Protein in seiner aktiven Form vor, hat dies die Synthese des Antagonisten SinI zur Folge. Dieser ist nun in der Lage an den Repressor SinR zu binden, wobei dieser wiederum von die Promotorregion der beiden Transkriptionseinheiten *epsA-O* sowie *yqxM-sipW-tasA* verlässt, wodurch die Matrix-Produktion und somit die Biofilm-Formation initiiert wird (167, 175).



**Abb. 3: Biofilm-Formation in *B. subtilis*.**

Dargestellt ist der vereinfachte Signalweg, der in *B. subtilis* zur Matrix-Produktion und somit zur Biofilm-Formation führt (modifiziert nach Lemon *et al.* (167)).

## 2. Osmoregulation in *B. subtilis*

### 2.1. Wasser-Management unter osmotischen Stressbedingungen

In seinem natürlichen Habitat kolonisiert der Mikroorganismus *B. subtilis* die oberen Bodenschichten (66). In dieser ökologischen Nische stellt vor allem die Verfügbarkeit von Wasser einen kritischen abiotischen Faktor dar, wobei diese durch Regenfälle oder auch Trockenperioden stark schwankt. Da die Osmolarität des Zytoplasmas größer ist, als die der Umgebung, kommt es zu einem Wassereinstrom in die Zelle entlang des osmotischen Gradienten. Dadurch entsteht der hydrostatische Druck, der Turgor. Ein positiver Turgor ist unerlässlich für die Zellelongation sowie die Zellteilung in Mikroorganismen (30, 228). Bei dem Turgor handelt es sich um den sogenannten Zellinnendruck, der die Zytoplasmamembran von innen gegen die Zellwand drückt und somit formgebend ist. Dabei ist der elastische Murein-Sacculus in der Lage Veränderungen des Turgors bis zu einem gewissen Grad zu dulden (281). Obwohl dieser Zellinnendruck experimentell schwierig zu bestimmen ist, konnte für den Gram-positiven Organismus *B. subtilis* ein Wert von 1,9 MPa (19,37 atm) determiniert werden (288). Dieser Wert übersteigt dabei den Innendruck eines Standard-Autoreifens um den Faktor 10. Während langer Trockenzeiten übersteigt die Konzentration von gelösten Ionen im extrazellulären Milieu die des Zytoplasmas. Unter diesen hochosmolaren Bedingungen ist ein sofortiger Wasserverlust der Zelle entlang des osmotischen Gradienten die Folge,

der schließlich mit dem Zusammenbruch des Turgors einhergeht (30, 228). Verringert sich hingegen die externe Osmolarität, beispielsweise durch Regenfälle, dringt Wasser in die Zelle ein, was zu einem drastischen Anstieg des Turgors führt, wodurch die Zelle schließlich platzen kann.

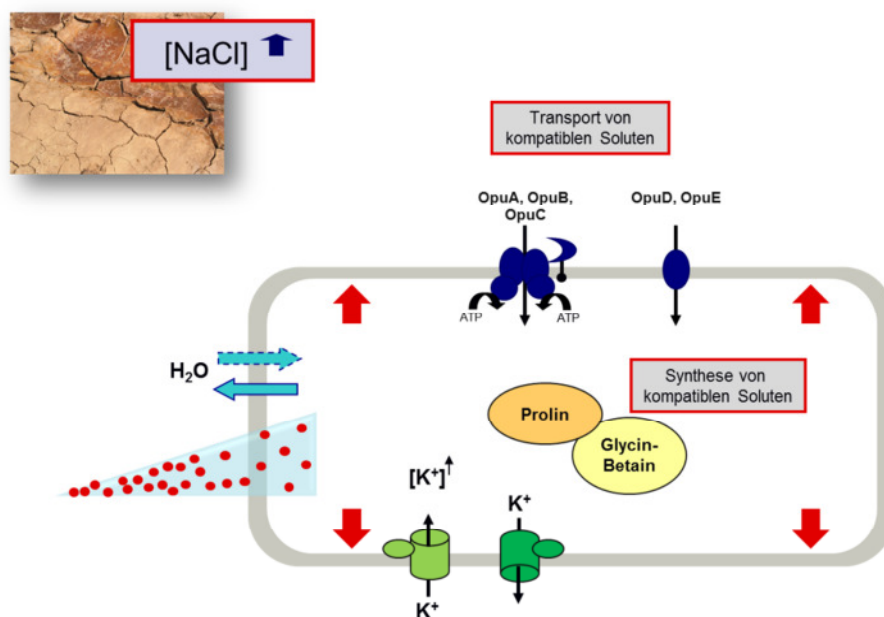
Eine effektive Anpassung an Veränderungen in der externen Osmolarität muss demnach mit einem aktiven Wasser-Management einhergehen, das wiederum dazu führt, dass der Turgor in einem tolerierbaren Bereich verbleibt. Eine Vielzahl von Mikroorganismen besitzt sogenannte Aquaporine (AqpZ), die selektiv einen Wassertransport über die Zytoplasmamembran gewährleisten (39). Diese konnten jedoch nicht in *B. subtilis* identifiziert werden und zudem deren physiologische Bedeutung für die Anpassung von Mikroorganismen völlig ungeklärt ist. Die Osmoregulation in *B. subtilis* wird vielmehr durch eine gezielte Veränderung des osmotischen Potentials direkt im Zytoplasma bestimmt, die schließlich einen Ein- oder Ausstrom von Wasser zur Folge hat (30).

## 2.2. Anpassung an hochosmolare Bedingungen: Die „Salt-out“ Strategie

Um sich an hochosmolare Bedingungen anzupassen, die durch ein niedriges osmotisches Potenzial des Zytoplasmas definiert werden und folglich ein Ausstrom von Wasser aus der Zelle mit sich bringen, haben Mikroorganismen zwei verschiedene Mechanismen zur Adaptation an diese Stresssituationen entwickelt. Diese werden als „Salt-in“ sowie „Salt-out“ Strategie bezeichnet. Bei der „Salt-in“ Strategie werden mit dem Steigen der externen Salinität hohe Konzentrationen von  $K^+$  sowie  $Cl^-$  Ionen in das Zytoplasma gepumpt, wohingegen zytotoxische  $Na^+$  Ionen aus der Zelle transportiert werden (139, 228). Dieser Anpassungsmechanismus wird als energetisch vorteilhafter angesehen (215), bedeutet jedoch, dass Organismen, die dieser Strategie folgen ihre Physiologie sowie ihren Stoffwechsel an eine hohe Ionenkonzentration im Laufe der Evolution angepasst haben müssen und sind daher häufig obligat halophil. Obwohl bei der „Salt-out“ Strategie zunächst ebenfalls  $K^+$ -Ionen in der Zelle akkumuliert werden, basiert dieser Prozess jedoch im Kern auf der Aufnahme oder auch Synthese von organischen Osmolyten, den sogenannten kompatiblen Soluten (30, 139, 228, 291). Kompatible Solute können in sehr hohen Konzentrationen in der Zelle angereichert werden, ohne dass diese mit zellulären Prozessen interferieren (228). Diese Substanzen konnten bisher nicht nur in Bakterien identifiziert werden, sondern auch in pflanzlichen, tierischen sowie menschlichen Zellen (36, 139). Chemisch sind diese Solute in verschiedene Gruppen einzuteilen, wobei jeder Organismus in der Lage ist, ein bestimmtes Set an kompatiblen Soluten zu verwenden. In Bakterien werden häufig Zucker oder Polyole (Trehalose, Glycerin), Aminosäuren (Glutamat, Prolin), Trimethyl-Ammonium-Verbindung (Glycin-Betain, Carnitin) sowie Tetrahydropyrimidine (Ectoin/Hydroxy-Ectoin) verwendet (Abbildung 58 im Anhang) (30, 139, 297). Neben den osmoprotektiven Eigenschaften können diese organischen Solute ebenfalls als Thermo- sowie Kälteschutz fungieren (31, 117, 122). Eine weitere interessante Funktion dieser Substanzen beschreibt das Modell der „Präferentiellen Exklusion“, (267) welches besagt, dass kompatible Solute gegen Denaturierungseffekte in Proteinen wirken können und diese in ihrer natürlichen Konformation stabilisieren und somit wichtige Proteinfunktionen aufrechterhalten können. Daher werden diese Substanzen auch als „chemische Chaparone“ beschrieben (25, 76, 125).

*B. subtilis* ist kein halophiles Bakterium, kann jedoch eine moderate Salz-Konzentration im Medium tolerieren (halotolerant). Die maximale Konzentration, bei der gerade noch Wachstum stattfindet, konnte in definiertem Minimal-Medium auf etwa 1,2 M NaCl festgelegt werden (22). Trotz dieser häufig auftretenden Stresssituation in natürlichen Habitaten, die hohe Salinitäten mit sich ziehen, ist *B. subtilis* jedoch nicht in der Lage unter diesen physiologischen Bedingungen die Sporulation zu initiieren (239). *B. subtilis* ist ein Vertreter der „Salt-out“ Strategie. Intensive Studien zur Anpassung dieses Organismus an hochosmolare Bedingungen haben zur Identifikation der folgenden Osmostress-Antwort geführt (Abbildung 4):

Findet eine plötzliche Erhöhung in der externen Osmolarität statt, ist die initiale Antwort zur Stabilisierung des Turgors die Akkumulation von  $K^+$ -Ionen (288), die in *B. subtilis* über die Ktr-Systeme erfolgt (121). Begleitend zu der Aufnahme von  $K^+$ -Ionen findet als weitere direkte Antwort die Synthese des kompatiblen Soluts Prolin statt (287), wobei dies dann zu einer Reduktion des Kalium-Pools führt. Die Prolin-Synthesegene (*proHJ*) liegen in einem Operon kodiert vor, wobei eine Expression dieses Gencluster unmittelbar durch osmotischen Stress induziert wird (32). Weiterhin existieren in *B. subtilis* fünf Transportsysteme OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE (Opu: **Osmoprotectant uptake**), die eine Aufnahme diverser kompatibler Solute ermöglichen, sobald sich diese im extrazellulären Milieu befinden (29). Bei den Aufnahmesystemen OpuA, OpuB sowie OpuC handelt es sich um hochaffine ABC-Transporter, die ein sehr unterschiedliches Substratspektrum für kompatible Solute oder deren Vorläufer (z. B. Cholin) besitzen (29). Die Transporter OpuD und OpuE sind hingegen sekundäre Aufnahmesysteme, die aus nur einer einzelnen Membran-Komponente bestehen. Die Aufnahme des prominenten kompatiblen Soluts Glycin-Betain kann in *B. subtilis* beispielsweise über drei verschiedene Transporter (OpuA, OpuC sowie OpuD) erfolgen (132, 133, 138). Zudem ist eine Synthese des effizienten osmotischen Solut, über einen zweistufigen Oxidationsprozess über das Vorläufermolekül Cholin möglich (21, 133).





**Abb. 4: Anpassung von *B. subtilis* an hochosmolare Bedingungen.**

Abgebildet ist ein schematischer Überblick über die Stressantwort von *B. subtilis* bei hohen Salinitäten ( $\text{NaCl}$ ), die in dem natürlichen Habitat durch eine Austrocknung des Bodens erfolgen kann. Hochosmolare Bedingungen führen zu einer höheren Solut-Konzentration (●) des extrazellulären Milieus, was einen Ausstrom von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) aus der Zelle zur Folge hat. Der Adaptationsprozess basiert auf der Akkumulation von  $\text{K}^+$ -Ionen sowie der Synthese (Prolin und Glycin-Betain) und dem Transport (OpuA-OpuE) von kompatiblen. Die roten Pfeile symbolisieren den hydrostatischen Innendruck (Turgor). Modifiziert nach Pittelkow und Bremer (228).

Die Akkumulation von  $\text{K}^+$ -Ionen sowie die darauf folgende Anreicherung von kompatiblen Soluten verhindert in *B. subtilis* den Ausstrom von Wasser entlang des osmotischen Gradienten unter hyperosmotischen Stressbedingungen. Dadurch wird eine Stabilisierung des Turgors gewährleistet, wodurch die Zelle normale physiologische Prozesse, und damit das Wachstum, erneut aufnehmen kann.

Ferner konnte beobachtet werden, dass die Kultivierung von *B. subtilis* unter hyperosmotischen Stressbedingungen eine Veränderung/Restrukturierung der Zellwand mit sich zieht. Diese werden in Passage 5 der Einleitung detailliert vorgestellt. Vorerst wird jedoch im folgenden Abschnitt die Architektur sowie die Funktion der bakteriellen Zellwand beschrieben.

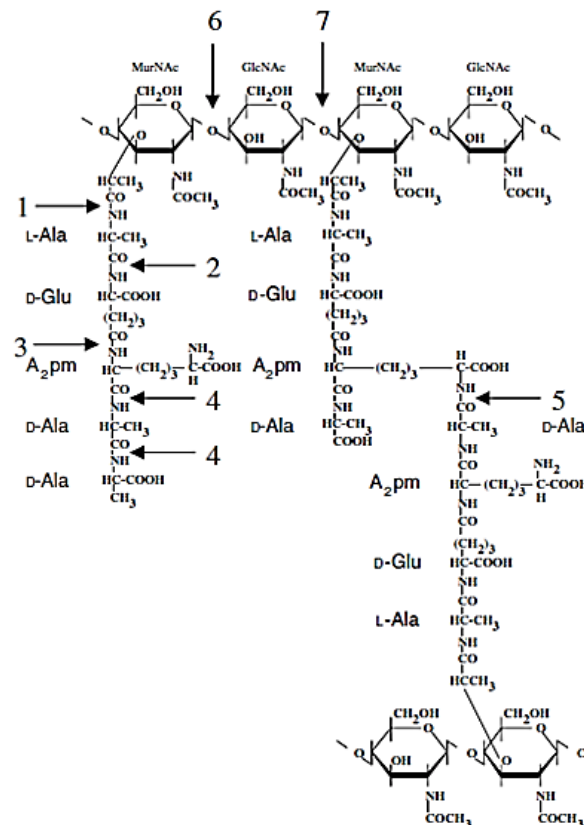
### 3. Die bakterielle Zellwand

Den größten Bestandteil der bakteriellen Zellwand stellt das Peptidoglykan (Murein) dar, welches sich außerhalb der Zytoplasmamembran befindet und nahezu in allen Bakterien vorhanden ist (105, 202, 279, 281). Als bisherige Ausnahme konnte die Abteilung der *Chlamydiae* identifiziert werden, die zwar die meisten Peptidoglykan-Synthesegene besitzt, jedoch interessanterweise keinen Murein-Sacculus aufweist (45). Die Hauptfunktion des Zellwand-Peptidoglykans besteht darin, dem enormen Zellinnendruck (Turgor) entgegenzuwirken und somit die Zellintegrität zu bewahren (osmotische Stabilität) (279, 281). Damit geht einher, dass der Murein-Sacculus für die Aufrechterhaltung bzw. Gestaltung der Zellmorphologie verantwortlich ist. Trotz dieser mechanischen Stabilität ist die Zellwand eine sehr dynamische Struktur, die zahlreichen Modifikationen sowie Umstrukturierung während des Zellzyklus unterliegt. Zusätzlich dient dieses Polymer der Verankerung von sekundären Zellwandpolymeren, wie Proteine, (61) Teichon-, Lipoteichon- sowie Teichuronsäuren (19, 41, 202, 203). Die Lipoteichonsäuren sind strukturell mit den Teichonsäuren verwandt, werden jedoch im Gegensatz dazu in der Zytoplasmamembran verankert und nicht kovalent an die Zellwand gebunden. Die zuletzt genannten Polysaccharide machen einen beträchtlichen Anteil (10-60 % des Trockengewichts) der bakteriellen Zellwand aus und sind überdies für die negative Ladung der Zellwand verantwortlich. Dies basiert auf den Phosphat- (Teichonsäuren) bzw. Carboxylgruppen (Teichuronsäuren) dieser sekundären Polymere. Mit Hilfe der Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Zellwand Gram-positiver Bakterien in zwei verschiedene Bereiche eingeteilt werden kann. Diese wurden als innerer Zellwandbereich (inner wall zone) sowie äußerer Zellwandbereich (outer wall zone) beschrieben, die sich durch eine niedrige bzw. hohe Elektronendichte auszeichnen (185, 186, 281). Der äußere Bereich umfasst dabei das Peptidoglykan sowie alle angelagerten sekundären Zellwandstrukturen, wohingegen der innere

Bereich konzeptionell mit dem Periplasma Gram-negativer Bakterien in Verbindung gebracht wird (185, 186).

### 3.1. Die chemische Struktur und Architektur der bakteriellen Zellwand

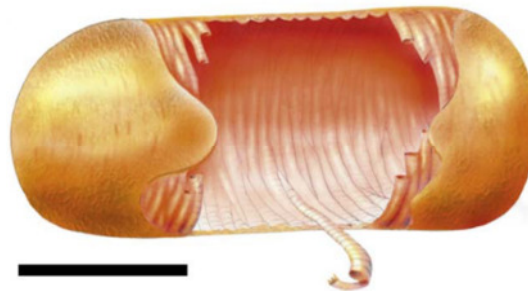
Der Murein-Sacculus ist in Gram-negativen Bakterien einschichtig, wohingegen er bei Gram-positiven aus mehreren Schichten besteht (Dicke: 30-40 nm) (120, 279). Die chemische Struktur des Peptidoglykans basiert grundsätzlich auf linearen Zuckersträngen, die durch kurze Peptide miteinander quervernetzt werden (120, 279) (Abbildung 5). Der Glykanstrang setzt sich wiederum aus alternierenden Einheiten der N-Acetyl-Muraminsäure sowie N-Acetyl-Glucosamin zusammen, die durch eine  $\beta$ -1,4 glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind (Transglykosylierung). Die Carboxylgruppen der D-Lactyl-Reste der N-Acetyl-Muraminsäuren werden wiederum mit Peptidketten verbunden. Die Komposition des Peptidanteils setzt sich in *B. subtilis* aus den Aminosäuren L-Alanin (L-Ala), D-Glutamat (D-Glu), Meso-Diaminopimelinsäure ( $A_2pm$ ), D-Alanin (D-Ala) sowie nochmals D-Alanin zusammen (Abbildung 5). Die Transpeptidierungsreaktion findet zwischen den Aminosäuren Meso-Diaminopimelinsäure (Position 3) sowie D-Alanin (Position 4) von benachbarten Glykansträngen statt, gewährleistet so deren Quervernetzung und führt letztlich zur dreidimensionalen Struktur des Murein-Sacculus. Die letzte Aminosäure (D-Alanin) des Peptidstranges wird während der Transpeptidierung abgespalten. Der Anteil der Quervernetzungen des reifen Peptidoglykans liegt bei ca. 30 % (9).



**Abb. 5: Zusammensetzung des Zellwand-Peptidoglykans in *B. subtilis*.**

Dargestellt ist die chemische Zusammensetzung des Zellwand-Peptidoglykans einer vegetativen *B. subtilis* Zelle. Die alternierenden Zuckerbausteine bestehen aus N-Acetyl-Muraminsäure (MurNAc) sowie N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc). Die Aminosäureabfolge der Peptidkette ist L-Alanin (L-Ala), D-Glutamat (D-Glu), Meso-Diaminopimelinsäure (A<sub>2</sub>pm), D-Alanin (D-Ala) und D-Alanin. Die Pfeile weisen auf die chemischen Bindungen hin, die durch die folgenden Gruppen der Autolysine gespalten werden: **1**, N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase; **2**, LD-Endopeptidase; **3**, DL-Endopeptidase; **4**, Carboxypeptidase; **5**, DD-Endopeptidase; **6**, Muraminidase und lytische Transglycosylase; **7**, Glukosaminidasen. Die Abbildung wurde der Publikation von Fukushima *et al.* (85) entnommen.

Die chemische Struktur der Zellwand erklärt zum einen die Widerstandsfähigkeit dieses Polymers (Glykanstränge) sowie zum anderen die Flexibilität (Peptidstränge), die notwendig sind um sich an die unterschiedlichsten Gegebenheiten anzupassen. Die exakte Bestimmung der Architektur, die mit der dreidimensionalen Struktur der Zellwand einhergeht, ist jedoch schwer zu fassen (105). Das derzeitige Modell besagt, dass die Glykanstränge natürlicherweise rechtsgewunden sind, was wiederum zu einer helikalen Anordnung des gesamten Zellwandmaterials führt (189). Der Zellwandzylinder spiralisiert sich somit zu einer kabelartigen Architektur, mit einer gewundenen Substruktur (Abbildung 6) (105).

**Abb. 6: Modell zur Architektur des Zellwand-Peptidoglykans in *B. subtilis*.**

Gezeigt wird die schematische Darstellung zur Architektur des Zellwandzylinders. Das Zellwandmaterial besitzt dabei eine kabelartige Orientierung mit einer gewundenen Substruktur. Der Größenstandard entspricht 1  $\mu\text{m}$  (105).

**3.2. Die Zellwand-Synthese, Peptidoglykan-Reifung und Turnover**

Die Synthese der Zellwand ist in drei verschiedene Stufen unterteilt, die wiederum in drei subzellulären Kompartimenten stattfinden (202). Zunächst werden alle Vorläufer-Komponenten der Zellwand (Peptidoglykan, sekundäre anionische Polymere) im Zytoplasma synthetisiert (14). Die anschließende Translokation über die Zytoplasmamembran der synthetisierten Vorläufermoleküle erfolgt über die Verknüpfung mit einem Lipid-Carrier (Undecaprenylphosphat) (24). Im dritten Schritt werden die einzelnen Zellwandkomponenten assembliert und in das bestehende Netzwerk eingebaut. Dieser Prozess wird als Peptidoglykan-Reifung bezeichnet (243). Die Zellwand-Neu-Synthese geht mit einem ständigen Abbau von altem Zellwandmaterial einher, was als Zellwand-Turnover bezeichnet wird (58). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um einen „Inside-to-Outside“-Mechanismus handelt, wobei eine neue, dehnbare Mureinschicht von unten an die Zellwand angelagert wird, die dem Innendruck der Zelle entgegenwirkt. Der Turgor der Zelle ist letztlich dafür verantwortlich, die neue Mureinschicht nach außen zu schieben. An dem Prozess der Neu-Synthese sowie Abbau der Zellwand sind zahlreiche Enzyme beteiligt, die einerseits das Peptidoglykan an einer spezifischen Stelle hydrolysieren (Autolysine), oder auch neue Verbindungen knüpfen können (Penicillinbinde-

Proteine) (243). Die Koordination des Zusammenspiels dieser Enzyme ist somit von enormer Bedeutung, um fortlaufend die Zellintegrität zu gewährleisten.

#### **4. Zellwand hydrolysierende Enzyme- die Autolysine**

Bei der Gruppe der Autolysine handelt es sich um bakteriolytische Enzyme, die das eigens synthetisierte Zellwandpeptidoglykan an spezifischen Stellen spalten können (74, 258, 280). Obwohl diese Enzymklasse durch ihre hydrolytische Fähigkeit potentiell letal ist, sind Autolysine oder auch Zellwandhydrolasen universell in allen Bakterien vorhanden, die eine Zellwand aus Peptidoglykan besitzen (258). Die bakterielle Zellwand verleiht einerseits der Zelle eine mechanische Stabilität, wobei es sich andererseits bei diesem Sacculus um eine sehr dynamische Struktur handelt, die sich an die Veränderungen des Turgors anpassen muss und zudem ständigen Modifikationen während des Zellzyklus unterliegt (279, 281). Daher sind Autolysine an jeglichen zellulären Prozessen beteiligt (Wachstum, Zellwand-Turnover, Peptidoglykan-Reifung, Zellteilung, Motilität, Chemotaxis, Kompetenz, Protein-Segregation, Pathogenität sowie Sporulation), die eine selektive sowie gerichtete Veränderung des Zellwand-Peptidoglykans voraussetzen (20, 80).

##### **4.1. Klassifizierung der Autolysine**

Der Aufbau des Zellwand-Peptidoglykans impliziert, dass vier verschiedene chemische Bindungsklassen innerhalb des Polymers gespalten werden müssen, um den Murein-Sacculus schließlich in seine Einzelbausteine zu zerlegen (280). Daher wird die Enzymklasse der Autolysine, bezogen auf die hydrolytische Bindungsspezifität, in vier verschiedene Gruppen unterteilt: (1) N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidasen (Amidase), (2) Endopeptidasen, (3) Glukosaminidasen sowie (4) Muraminidasen (85, 119, 258, 280) (Abbildung 5).

N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidasen, die sogenannten Amidasen, spalten dabei die Amidbindung zwischen der N-Acetyl-Muraminsäure sowie dem L-Alanin, der ersten Aminosäure des Peptidstranges, wodurch eine Trennung des Glykanstranges von dem Peptidanteil gewährleistet wird. Endopeptidasen oder auch Carboxypeptidasen spalten hingegen die diversen Amidbindungen zwischen den Aminosäuren des Peptidstranges im Murein-Sacculus oder auch in löslichen Peptidoglykanfragmenten. Dabei unterscheidet man DD-Peptidasen, die die Bindung zwischen D-Aminosäuren im Peptidstrang hydrolysieren, von LD- bzw. DL-Peptidasen, die für eine Spaltung der Amidbindung zwischen L- und D-Aminosäuren verantwortlich sind. Darüber hinaus sind drei Typen von Enzymklassen bekannt, die zu einer Trennung der Glykosidbindungen im Zuckerstrang führen. Dabei umfasst die Gruppe der Muraminidasen die Enzymklassen der Lysozyme sowie die der lytischen Transglykosylasen. Beide dieser Klassen spalten die  $\beta$ -1,4 glykosidische Bindung zwischen der N-Acetyl-Muraminsäure und dem N-Acetyl-Glucosamin, wobei die Spaltung über zwei verschiedene Wege erfolgt. Die dritte Klasse der Glykanstrang-spaltenden Enzyme gehört zu der Gruppe der Glukosaminidasen, die wiederum generell die Glykosidbindung zwischen der N-Acetyl-Muraminsäure sowie angrenzenden Monosacchariden spalten können.

#### 4.2. Charakteristika der Zellwandhydrolasen

Die Sequenzierung des *B. subtilis* Genoms (154) ermöglichte erstmalig eine Zusammenstellung aller potentiell vorkommenden Zellwandhydrolasen in diesem Organismus. Dabei konnten 35 putative Autolysine, basierend auf Sequenzsimilaritäten, identifiziert werden (258). Untersuchungen zeigten dabei, dass eine große Schwierigkeit darin bestand, die physiologische Funktion einer bestimmten Zellwandhydrolase zu bestimmen. Dieses Charakteristikum liegt in der sehr hohen Anzahl von Autolysinen innerhalb eines Organismus begründet, die zudem redundante Rollen einnehmen können. Darüber hinaus ist bekannt, dass Zellwandhydrolasen mehr als eine physiologische Rolle in einem Bakterium spielen können (74, 258, 280). In *E. coli* existieren beispielsweise fünf N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidasen, sechs lytische Transglykosylasen sowie drei Endopeptidasen, die vermutlich alle zur Septum-Trennung während der Zellteilung zweier Tochterzellen beitragen (107, 108). Ferner konnte bisher in keinem Bakterium ein Autolysin detektiert werden, das für die Zelle essentiell ist (258, 280).

Neben der funktionellen Redundanz der Autolysine, stellt der modulare Aufbau dieser Enzyme ein weiteres charakteristisches Merkmal dar (74). Dabei setzen sich die Module aus einer katalytischen- sowie einer nicht-katalytischen Domäne zusammen. Die katalytische Domäne ist für die hydrolytische Bindungsspezifität verantwortlich und dient der Einordnung der Autolysine in die bereits vorgestellten Gruppen (Abbildung 5). Bei den nicht-katalytischen Domänen handelt es sich hingegen um Zellwandbindedomänen, die einer Verankerung an die Zellwand und somit an deren hydrolytischen Wirkungsort dienen. Diese Bindung kann dabei direkt an das Peptidoglykan oder auch an sekundäre Zellwandpolymere (Lipoteichonsäuren) erfolgen. Ferner können diese für eine Erhöhung der hydrolytischen Aktivität verantwortlich sein (86). Bisher wurden sieben verschiedene Zellwandbindemodule in der Literatur beschrieben: (1) CHAP-Domäne (16), (2) GW-Domäne (247), (3) SH3-Domäne (289), (4) PlyPSA-Domäne (149), (5) FtsN-Domäne (295), (6) Cholin-Bindedomäne (73), (7) LysM-Domäne (15). Dabei stellt beispielsweise die LysM-Zellwandbindedomäne ein häufig vorkommendes Motiv dar, was bisher in über 1.500 Proteinen verschiedenster Bakterienspezies gefunden werden konnte (59). Zudem ist es möglich, dass Zellwandhydrolasen sogenannte direkte Sequenzwiederholungen („direct repeat“) aufweisen, die ebenfalls eine Bindung an die Zellwand vermitteln (11, 180). Darüber hinaus besitzt eine Vielzahl der Zellwand-assoziierten Proteine einen hohen pI-Wert, der die Affinität dieser Proteine zur negativ geladenen Zellwand ebenfalls erhöht (258).

#### 4.3. Transkriptions- sowie posttranslationelle Regulation der Autolysine

Aufgrund der potentiellen Letalität, der Autolysine müssen diese einer strikten Kontrolle unterliegen, um eine ungerichtete Zelllyse zu verhindern. Die Regulation dieser Enzymklasse findet dabei auf transkriptioneller- sowie posttranslationeller Ebene statt (258, 280). Die transkriptionelle Regulation der Autolysin-Gene erfolgt oftmals über spezifische Sigmafaktoren, die bestimmte zelluläre Prozesse innerhalb eines Organismus regulieren. Typischerweise werden Zellwandhydrolasen, die in *B. subtilis* in den Prozess der Sporulation involviert sind über sporulationsspezifische Sigmafaktoren reguliert (Abbildung 2) (280). Dies hat zur Folge, dass diese nur dort exprimiert werden, wo die Enzyme

letztlich auch benötigt werden. Zudem ist bekannt, dass in *B. subtilis* die höchste Autolysinaktivität bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase verzeichnet werden kann (78). Die Enzyme LytC (N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase) sowie LytD (Glukosaminidase) konnten in dieser Wachstumsphase als die Hauptautolysine identifiziert werden (180, 181). Die Gene *lytC* sowie *lytD* werden ferner über den Transkriptionsfaktor SigD co-reguliert, der in *B. subtilis* Prozesse wie Motilität sowie Chemotaxis bestimmt (251).

Auf posttranslationeller Ebene spielt die subzelluläre Lokalisation der Zellwandhydrolasen eine essentielle Rolle, da die Interaktion zwischen Autolysin und Zellwand-Peptidoglykan kritisch für deren Aktivität ist. Dabei erfolgt die Segregation der Autolysine überwiegend über den Sec-abhängigen Translokationsweg, wobei in einigen Fällen ebenso die TAT-Translokationsmaschinerie verwendet wird (18, 259). Eine Interaktion zwischen Zellwand und Autolysin wird über die genannten Zellwandbindemotive propagiert. Durch physikalische oder auch chemische Veränderungen der Zellwand können jedoch Konformationsänderungen induziert werden, die die Affinität zwischen Zellwandhydrolase und Murein-Sacculus verändern können (147). In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass das Vorhandensein oder auch das Fehlen von sekundären Zellwandpolymeren, wie Teichonsäuren, ebenfalls die Aktivität von Autolysinen beeinflusst (112, 113). Dabei sind Lipoteichonsäuren bekannt für ihre inhibitorische Wirkung auf Zellwandhydrolasen (280).

## 5. Die Salzinduktion zahlreicher Gene und deren Beteiligung am Zellwandmetabolismus

Die zentralen Anpassungsmechanismen von *B. subtilis* an hochosmolare Kulturbedingungen bezüglich des Wasser-Managements und der damit verbundenen Aufrechterhaltung des Turgors, konnten durch intensive Studien bereits gut charakterisiert werden (Abbildung 4) (139, 228). Diverse Analysen des Transkriptom- sowie Proteom-Profiles salzgestresster *B. subtilis* Zellen (96, 123, 265) deuteten jedoch darauf hin, dass es sich um einen komplexen Anpassungsprozess handeln muss. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass für eine Vielzahl der Gene, die an diesem Prozess beteiligt zu sein scheinen, eine physiologische Rolle bisher nicht ermittelt werden konnte. Dies führte schließlich zu der Annahme, dass noch weitere Facetten während der Anpassung an hohe Salinitäten existieren müssen. Eine genaue Untersuchung der über 100 salzinduzierten Gene, die in der DNA-Microarray-Analyse durch Steil *et al.* (265) identifiziert werden konnten, ergab, dass basierend auf Sequenzhomologien zu bereits charakterisierten Proteinen, vielen der abgeleiteten Proteine eine Rolle im Zellwandmetabolismus zugesprochen werden konnte (Tabelle 1). Zudem besitzt diese Gruppe von Genen teilweise sehr hohe Induktionsfaktoren (Tabelle 1), die eine zentrale Bedeutung der zugehörigen Proteine zusätzlich suggerieren.

Ein Beispiel dafür stellt das Gen *gpsB* (Induktionsfaktor 3,7 (265)) (Tabelle 1) dar, welches in *B. subtilis* für ein Zellteilungs-Protein (Divisom) kodiert (48). Die Funktion des GpsB Proteins liegt darin, zusammen mit einem weiteren Protein, EzrA (169), die subzelluläre Lokalisation des Penicillinbinde-Proteins PBP1 während des Elongations- und Zellteilungszyklus zu koordinieren (48). Das Penicillinbinde-Protein PBP1 besitzt eine Transglycosylase sowie Transpeptidase Funktion und ist an der Zellwandsynthese sowohl während der Elongation als auch während der Division beteiligt (48). Interessanterweise führte eine Deletion des *gpsB* Gens zu einem salzsensitiven Phänotyp,

sobald eine Salz-Konzentration von 0,6 M NaCl im Medium überschritten wurde. Eine mikroskopische Untersuchung dieser Kulturen zeigte zudem, enorme Veränderungen in der Morphologie der Deletionsmutante verglichen mit der des Wildtyps. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen zum einen weitaus länger waren und zudem viele lysierte Zellen vorlagen. Zum anderen besaßen einige Zellen Verdickungen an den Zellpolen. Diese morphologischen Aberrationen der *gpsB* Deletionsmutante konnte durch die Zugabe einer erhöhten Magnesiumkonzentration zur Wildtyp-Morphologie zurückgeführt werden (48).

Des Weiteren konnte in den Transkriptom-Analysen salzgestresster *B. subtilis* Zellen, das *yoch* Gen (Induktionsfaktor 12,3 (265)) identifiziert werden (Tabelle 1), das für eine Zellwandhydrolase kodiert. Eine Analyse der Proteinsequenz deutete zudem darauf hin, dass Yoch Ähnlichkeiten zu der lytischen Transglycosylase MltA aus *E. coli* besitzt (278). Die hydrolytische Fähigkeit des Yoch Autolysins konnte *in vitro* bestätigt werden (253). Für das *yoch* Gen konnte überdies gezeigt werden, dass die Expression des Gens der Kontrolle des essentiellen Zwei-Komponenten-Systems Walk/WalR (YycG/YycF) unterliegt (124, 293). Das Walk/WalR System ist für die Regulation zahlreicher Gene verantwortlich, die eine Rolle im Zellwandmetabolismus sowie bei der Synthese von Membranproteinen spielen (64). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression des *yoch* Gens durch sekretierte Muropeptide (lösliche Peptidoglykanfragmente) induziert wird (253). Diese Induktion ist abhängig von der membrangebunden Ser/Thr Kinase PrkC. Die Konstruktion und Analyse einer *yoch* Mutante zeigte bei der Kultivierung unter Hochsalz Bedingungen ebenfalls ein drastisches Wachstumsdefizit im Vergleich zu dem *B. subtilis* Wildtyp-Stamm. Weiterhin konnten morphologische Veränderungen dieser Deletionsmutante beobachtet werden, die durch die vermehrte Formation von leeren Zellhüllen dominiert wurde (248).

Als weiteres salzinduziertes Gen, konnte das *yabE* Gen (Salzinduktion: 5,4) identifiziert werden (Tabelle 1) (265). Das YabE Protein gehört in *B. subtilis* ebenfalls zu der Enzymklasse der Autolysine, wobei es sich um ein homologes Protein zu Yoch handelt, das ebenfalls Sequenzähnlichkeiten zu der lytischen Transglycosylase MltA aus *E. coli* besitzt (278). Darüber hinaus gehören die Proteine YabE sowie Yoch zu der Rpf/SpS [(resuscitation-promoting factors)/(stationary phase survival)] Proteinfamilie, die die Wiederaufnahme des Wachstums schlafender Zellen propagieren (49, 137, 232). Dieser Mechanismus wird durch eine Peptidoglykan-Hydrolyse induziert, die von Seiten der Proteine YabE und Yoch katalysiert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass das *yabE* Gen negativ durch eine Antisense RNA reguliert wird, welche wiederum unter der Kontrolle der extrazytoplasmatischen Sigmafaktoren SigX sowie SigM steht. Diese Sigmafaktoren regulieren zum Teil überlappende Regulons, die mit der Stressantwort zur Homöostase der Zellhülle in Verbindung gebracht werden (67). Interessanterweise konnten große Teile des SigX sowie SigM Regulons in einer weiteren Proteom- sowie Transkriptom-Studie wieder gefunden werden (96), in der Daten von *B. subtilis* Kulturen erhoben wurden, die einer plötzlichen Erhöhung der Salzkonzentration (1,2 M NaCl) ausgesetzt wurden.

Weiterhin gruppiert sich das Gen *yddJ* (Salzinduktion: 13,8) zu den salzinduzierten Genen (265). Die abgeleitete Proteinsequenz weist Sequenzähnlichkeiten zu der Gruppe der Lipoproteine auf (Tabelle 1). Dieses Gen liegt vermutlich in einem Operon (*yddEFGHIJ*) kodiert vor, wobei das Gen *yddH* (*cwlT*)

für ein bifunktionales Autolysin in *B. subtilis* kodiert. Das CwIT Protein besitzt einerseits eine Muraminidase Aktivität und kann andererseits als DL-Endopeptidase fungieren (84).

Ferner konnten die bisher noch uncharakterisierten Gene *yqiH* sowie *yqil* in der Transkriptom-Studie salzgestresster *B. subtilis* Zellen (265) identifiziert werden (Tabelle 1). Diese Gene weisen eine ca. 15 sowie 7 fache Induktion der Genexpression unter den getesteten Bedingungen auf. Das Gen *yqiH* kodiert dabei vermutlich ebenfalls für ein Lipoprotein, wohingegen das an *yqiH* angrenzende *yqil* Gen Sequenzähnlichkeiten zu der Gruppe der N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen besitzt. Diese beiden Gene bilden die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit.

Neben der Identifikation der Gene, deren Expression durch hochsaline Bedingungen induziert wurden, konnten auch zwei weitere Gene detektiert werden, die unter diesen Kulturbedingungen reprimiert wurden ((265) Tabelle 1) und ebenfalls dem Zellwandmetabolismus zugeordnet werden konnten. Dabei handelt es sich um die Gene *lytF* (Salzrepression: 11,3) sowie *wapA* (Salzrepression: 7,7). Das *lytF* Gen unterliegt der Kontrolle des Sigmafaktors SigD und kodiert für eine DL-Endopeptidase (182). Es konnte gezeigt werden, dass das Autolysin LytF eine wichtige Rolle während des vegetativen Wachstums in *B. subtilis* spielt und dabei in den Prozess der Zellteilung involviert ist (103, 214, 292). Bei dem Protein WapA handelt es sich hingegen um ein Zellwand assoziiertes Protein (250), wobei das *wapA* Gen unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU ist (177).

**Tabelle 1:** Durch Hochsalz induzierte Gene und deren Funktion im Zellwandmetabolismus

Gen	Funktion	Faktor Induktion/Repression
<i>yabE</i>	Unbekannt; ähnlich zu Zellwandbindeprotein (lytische Transglycosylase) <b>Regulation:</b> Antisense RNA; SigX, SigM (67)	5,4
<i>yddJ</i>	Unbekannt; ähnlich zu Lipoprotein <b>Regulation:</b> AbrB Regulon <b>Operon:</b> <i>yddEFGHIJ</i> [YddH → CwIT (Autolysin mit N-Acetylmuramidase und DL-Endopeptidase Aktivität (84)]	13,8
<i>yocH</i>	Zellwandhydrolase (lytische Transglycosylase) (253) <b>Regulation:</b> WalK/WalR, AbrB Regulon; Spo0A Regulon; Antisense RNA (205)	12,3
<i>gpsB (ypsB)</i>	Zellteilungs-Protein (Divisom) (48)	3,7
<i>yqiH</i>	Unbekannt; ähnlich zu Lipoprotein <b>Operon:</b> <i>yqiHIK</i>	14,9
<i>yqil</i>	Unbekannt; ähnlich zu N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase <b>Operon:</b> <i>yqiHIK</i>	6,8
<i>lytF*</i>	DL-Endopeptidase (Hauptautolysin) (214) <b>Regulation:</b> SigD; SlrR Regulon	11,3
<i>wapA*</i>	Zellwand assoziiertes Protein (Vorläufer) (250) <b>Regulation:</b> DegS/DegU <b>Operon:</b> <i>wapA-yxxG</i>	7,7

\* Gene, deren Expression durch Hochsalz Bedingungen reprimiert werden (265)



Die hier vorgestellten Daten (Tabelle 1) führen zu der Vermutung, dass eine Modifikation oder auch Restrukturierung der Zellwand in *B. subtilis* unter hyperosmotischen Stressbedingungen stattfindet, wobei es sich um eine weitere Facette der Osmoregulation in *B. subtilis* handeln könnte. Diese Hypothese konnte bereits durch vorangegangene Studien unterstützt werden. López *et al.* postulierten, dass eine Veränderung der Zellwandkomposition unter hyperosmotischen Bedingungen in *B. subtilis* stattfindet (171, 172). Dabei konnte beobachtet werden, dass eine veränderte bzw. geringere Sensitivität gegenüber spezifischen Phagen ( $\Phi 29$ ,  $\Phi 105$ ) sowie Antibiotika (Lysozym, Penicillin G), deren Wirkungsort die Zellwand ist, zu verzeichnen war. Daraus wurde geschlossen, dass die Zellwand an Dicke zugenommen haben muss und zudem nun weniger kompakt ist. Darüber hinaus konnten auch Modifikationen in der Zytoplasmamembran beobachtet werden, wobei gezeigt wurde, dass die Hydrophobizität der hyperosmotischen Kulturen zugenommen hatte und überdies die Lipidkomposition verändert worden war. Es wurde spekuliert, dass somit Lipoteichonsäuren eine wichtige Rolle während des Adaptationsprozesses spielen könnten. Des Weiteren konnte in einer weiteren Studie (217) eine Salzinduktion des *pbpE* Gens festgestellt werden. Das *pbpE* Gen kodiert in *B. subtilis* für ein Penicillinbinde-Protein PBP4\*, eine Zellwandhydrolase mit einer vermutlichen DD-Endopeptidase Aktivität (217). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *pbpE* Gens nicht nur zu einem salzsensitiven Phänotyp des Mutanten-Stammes führte, sondern auch eine höhere Sensitivität gegenüber an der Zellwand agierenden Antibiotika (Vancomycin, Penicillin und Bacitracin) aufweist. Eine Beteiligung des PBP4\* Enzyms an den durch Salzstress induzierten Modifikationen der Zellwand wurde diskutiert.

## 6. Zielsetzung

Durch langjährige Studien zur Osmoregulation in *B. subtilis* konnten bisher die zentralen Anpassungsprozesse im Hinblick auf das Wasser-Management sowie die Mechanismen, die zur Stabilisierung des Turgors notwendig sind, weitestgehend aufgeklärt werden (139, 228). Diese beruhen vor allem in der sofortigen Aufnahme von Kaliumionen sowie in der darauf folgenden Akkumulation von kompatiblen Soluten, die teilweise aus Vorläufermolekülen synthetisiert werden können oder direkt aus der Umwelt über spezifische Transportsysteme aufgenommen werden.

Diverse Analysen des Transkriptom-Profiles salzgestresster *B. subtilis* Zellen (96, 123, 265), deuteten jedoch auf komplexe Anpassungsprozesse an osmotische Stress-Bedingungen hin, da für eine Vielzahl der salzinduzierten Gene bisher keine Funktion bekannt ist. In der durch Steil *et al.* (265) durchgeführten Transkriptom-Studie konnten über 100 salzinduzierte Gene identifiziert werden. Basierend auf Sequenzhomologien wurden einige dieser Genprodukte funktionell in eine Gruppe eingeteilt, die eine Rolle im Zellwandmetabolismus spielen könnte. Dabei zeigte sich, dass für eine Vielzahl dieser Proteine eine zellwandhydrolytische Fähigkeit angenommen wird oder bereits gezeigt werden konnte. Salzstressinduzierte Veränderungen des Zellwand-Peptidoglykans wurden überdies in zahlreichen weiteren Studien postuliert (171, 172, 217). Die genauen Veränderungen bzw. die Funktion dieser Umstrukturierung konnten bisher jedoch nicht bestimmt werden. Sowohl die Identifikation der zahlreichen salzinduzierten Gene (Tabelle 1), deren Produkten eine Rolle im Zellwandmetabolismus zugesprochen werden konnte, als auch die angesprochenen Literaturdaten führten zu der These, dass diese Modifikationen der Zellwand eine neue Facette in der Adaptation von *B. subtilis* an hyperosmotische Kulturbedingungen darstellen könnten.

Die Gene *yqiH* (putatives Lipoprotein) sowie *yqiI* (putative N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase) traten ebenfalls erstmalig von der durch Steil *et al.* durchgeführten Transkriptom-Analyse (265) in den Fokus, da diese Gene eine sehr starke osmotische Induktion aufwiesen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte nun das als Operon identifizierte *yqiHIK* Gencluster (75) aus *B. subtilis* genauer charakterisiert werden. Zudem sollten die physiologischen Prozesse aufgedeckt werden, in die vor allem die Zellwandhydrolase YqiI involviert sein könnte.

Die hier vorgelegten Daten zeigten eine sehr komplexe Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*. Ferner wies diese facettenreiche Regulation auf unterschiedlichste Aufgaben der synthetisierten YqiHIK Proteine hin, die zudem suggerierten, dass diese Proteine in sehr unterschiedliche Differenzierungsprozesse in *B. subtilis* involviert zu sein scheinen. In diesem Zusammenhang wurde neben der Beteiligung an der Anpassung an osmotische Stress-Bedingungen, Prozesse wie Kannibalismus, Peptidoglykan-Recycling, Biofilm-Formation sowie Sporulation diskutiert.

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht explizit erwähnt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt, D), Roche Applied Science (Mannheim, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Merck (Darmstadt, D) und QIAGEN (Hilden, D) bezogen. Die Bestandteile der Vollmedien stammten von der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA).

### 2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Bei den angegebenen *Escherichia coli* Stämmen handelt es sich entweder um ein *E. coli* K-12 Derivat (DH5 $\alpha$ ) oder um *E. coli* B Derivate. Dahingegen handelt es sich, bei denen in Tabelle 3 aufgeführten *B. subtilis* Stämmen, weitestgehend um Derivate des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 (WT 168) (13). Die Bezeichnung der Gene folgt der von B. Bachmann vorgeschlagenen Nomenklatur (12). In Tabelle 4 werden alle verwendeten bzw. im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide dargestellt. Die Auflistung der Oligonukleotide ist in Tabelle 10 im Anhang zu finden.

#### 2.1. Bakterienstämme

**Tabelle 2:** *E. coli* – Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
Arctic Express (DE3) RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte [ <i>cpn10 cpn60</i> Gent <sup>r</sup> ] [ <i>argU ileY leuW</i> Str <sup>r</sup> ]	Agilent Technologies (La Jolla, USA)
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>E44</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>recA1 endA thi-1 relA1 gyrA96</i>	(101)
XL 10 - Gold	<i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 Tet <sup>r</sup> F <sup>'</sup> [ <i>proAB lacI</i> <sup>Δ</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Agilent Technologies (La Jolla, USA)

**Tabelle 3:** *B. subtilis* – Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
WT 168	<i>trpC2</i>	(13)
NCIB3610	Prototroph	BGSC (www.bgsc.org)
JGB34	$\Delta(\textit{treA}::\textit{ery})2$	J. Gade
TSTB3	$\Delta(\textit{treA}::\textit{neo})1$	(262)
<i>sinR</i>	$\Delta(\textit{sinR}::\textit{spc})$	O. Kuipers; Universität Groningen
<i>sinI</i>	$\Delta(\textit{sinI}::\textit{spc})$	O. Kuipers; Universität Groningen
OC003	$\Delta(\textit{abrB}::\textit{spc})$	(47)
<i>rok</i>	$\Delta(\textit{rok}::\textit{neo})$	(6)
MD282	$\Delta(\textit{degS degU}::\textit{neo})$	M. Dahl; Universität Konstanz
MD300	<i>degU32(Hy)aphA3</i> gekoppelt	(177)
KFB8	$\Delta(\textit{yqiHIK}::\textit{neo})1$	(75)
KFB8 (pKF51)	$(\textit{yqiHIK}::\textit{neo})1$ [pGP382-P <sub>degQ</sub> - <i>yqiI</i> ]	diese Arbeit
KFB9	$\Delta(\textit{lytC}::\textit{spc})1$	diese Arbeit
KFB10	$\Delta(\textit{yrvJ}::\textit{ery})1$	diese Arbeit
KFB14	$\Delta(\textit{yqiHIK}::\textit{neo})1 \Delta(\textit{lytC}::\textit{spc})1 \Delta(\textit{yrvJ}::\textit{ery})1$	diese Arbeit
KFB15	$\Delta(\textit{treA}::\textit{neo})1 \textit{amyE}::[\Phi(\textit{yqiH}_{300bp}'\text{-}\textit{treA}) \textit{caf}]$	diese Arbeit
KFB16	$\Delta(\textit{cwlC}::\textit{tet})1$	diese Arbeit
KFB17	$\Delta(\textit{cwlD}::\textit{zeo})1$	diese Arbeit
KFB23	$\Delta(\textit{treA}::\textit{neo})1 \textit{amyE}::[\Phi(\textit{yqiH}_{300bp}'\text{-}\textit{treA}) \textit{caf}] \Delta(\textit{opuA}::\textit{ery})1$ $\Delta(\textit{opuB}::\textit{Tn10}(\textit{spc}))1 \Delta(\textit{opuD}::\textit{tet})1$	diese Arbeit
KFB24	$\Delta(\textit{treA}::\textit{neo})1 \textit{amyE}::[\Phi(\textit{yqiH}_{300bp}'\text{-}\textit{treA}) \textit{caf}] \textit{mut1}$	diese Arbeit
KFB25	$\Delta(\textit{treA}::\textit{neo})1 \textit{amyE}::[\Phi(\textit{yqiH}_{300bp}'\text{-}\textit{treA}) \textit{caf}] \textit{mut2}$	diese Arbeit

## FORTZETZUNG TABELLE 3

KFB26	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut3$	diese Arbeit
KFB29	$\Delta(yqiHIK::neo)1 \Delta(lytC::spc)1 \Delta(yrvJ::ery)1 \Delta(cwlC::tet)1$	diese Arbeit
KFB31	$\Delta(yqiHIK::neo)1 \Delta(cwlC::tet)1 \Delta(cwlD::zeo)1$	diese Arbeit
KFB32	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut4$	diese Arbeit
KFB33	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut5$	diese Arbeit
KFB34	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut6$	diese Arbeit
KFB35	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut7$	diese Arbeit
KFB36	$\Delta(yqiHIK::neo)1 \Delta(yrvJ::ery)1 \Delta(cwlC::tet)1 \Delta(cwlD::zeo)1$	diese Arbeit
KFB37	$\Delta(yqiHIK::neo)1 \Delta(lytC::spc)1 \Delta(yrvJ::ery)1 \Delta(cwlC::tet)1 \Delta(cwlD::zeo)1$	diese Arbeit
KFB38	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{220bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB39	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{148bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB40	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{122bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB41	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB42	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] \Delta(sinR::spc)$	diese Arbeit
KFB43	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] \Delta(abrB::spc)$	diese Arbeit
KFB46	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] \Delta(sinI::spc)$	diese Arbeit
KFB47	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] \Delta(rok::neo)$	diese Arbeit
KFB51	$(yqiHIK::neo)1 [pDR110-P_{spanc}-yqiI]$	diese Arbeit
KFB55	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{279bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB56	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{270bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB57	$\Delta(treA::neo)1 amyE::[\Phi(yqiH_{250bp}'-treA) caf]$	diese Arbeit
KFB63	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut8$	diese Arbeit
KFB64	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut9$	diese Arbeit
KFB65	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) caf] mut10$	diese Arbeit

## FORTZETZUNG TABELLE 3

KFB66*	$\Delta(yqiHlK::neo)1$	diese Arbeit
KFB69	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) cat] mut11$	diese Arbeit
KFB70	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) cat] mut12$	diese Arbeit
KFB71	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) cat] mut13$	diese Arbeit
KFB72	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) cat] \Delta(degS degU::neo)$	diese Arbeit
KFB78	$\Delta(treA::ery)2 amyE::[\Phi(yqiH_{300bp}'-treA) cat] degU32$ (Hy) <i>aphA3</i> gekoppelt	diese Arbeit

\*Derivat des Wildtyp-Stammes NCIB3610 (BGSC)

## 2.2. Plasmide

Tabelle 4: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJMB1	Low Copy Vektor; trägt promotorloses <i>treA</i> Reportergen und homologe Bereiche des <i>amyE</i> Genlocus zur stabilen Genomintegration in <i>B. subtilis</i> ; Amp <sup>R</sup> , Cml <sup>R</sup>	M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlicht
pRB373	<i>E. coli</i> – <i>B. subtilis</i> Shuttlevektor; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(34)
pDG783	Derivat von pFSB118; trägt Kanamycin-Resistenzkassette	(94)
pDG1515	Derivat von BluescriptKS <sup>+</sup> ; trägt Tetracyclin-Resistenzkassette	(94)
pDG1726	Derivat von pSB119; trägt Spectinomycin-Resistenzkassette	(94)
p7Z6	Derivat von pMD18-T; trägt Zeocin-Resistenzkassette	(294)
pASK-IBA3 plus	<i>E. coli</i> Vektor zur zytoplasmatischen Expression ( <i>tet</i> -Promotor); Strep-Tag@II (C-terminal); Transkriptionsinduktion mit AHT; Amp <sup>R</sup>	IBA (Göttingen, D)
pASK-IBA5 plus	<i>E. coli</i> Vektor zur zytoplasmatischen Expression ( <i>tet</i> -Promotor); Strep-Tag@II (N-terminal); Transkriptionsinduktion mit AHT; Amp <sup>R</sup>	IBA (Göttingen, D)
pGP382	<i>E. coli</i> – <i>B. subtilis</i> Shuttlevektor zur konstitutiven zytoplasmatischen Expression ( <i>degQ</i> <sub>36</sub> Promotor); Strep-Tag (C-terminal); Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	(114)
pKF11	Derivat von pASK-IBA3 plus; trägt 555 bp Fragment des <i>yqiI</i> Leserahmens (ohne Signalsequenz)	(75)

## FORTZETZUNG TABELLE 4

pKF16	Derivat von pRB373; trägt 546 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion	diese Arbeit
pKF18*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -35 Promotorregion ( <i>mut1</i> )	diese Arbeit
pKF19*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -16 Promotorregion ( <i>mut2</i> )	diese Arbeit
pKF20*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -10 Promotorregion ( <i>mut3</i> )	diese Arbeit
pKF24*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -10 Promotorregion ( <i>mut4</i> )	diese Arbeit
pKF25*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -10 Promotorregion (invariantes T) ( <i>mut5</i> )	diese Arbeit
pKF26*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -35 und -10 Promotorregion ( <i>mut6</i> )	diese Arbeit
pKF27*	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -35, -16 und -10 Promotorregion ( <i>mut7</i> )	diese Arbeit
pKF28	Derivat von pJMB1; trägt 220 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen	diese Arbeit
pKF29	Derivat von pJMB1; trägt 148 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen	diese Arbeit
pKF30	Derivat von pJMB1; trägt 122 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen	diese Arbeit
pKF35	Derivat von pDR110; trägt 719 bp Fragment des <i>yqil</i> Leserahmens inklusive der RBS sowie des Stopp-Codons	diese Arbeit
pKF36	Derivat von pJMB1; trägt 279 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen	diese Arbeit
pKF37	Derivat von pJMB1; trägt 270 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen	Diese Arbeit
pKF44	Derivat von pASK-IBA5 plus; trägt 330 bp Fragment des <i>sinR</i> Leserahmens (ohne Stopp-Codon)	diese Arbeit
pKF45	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -10 Promotorregion ( <i>sigH</i> ) ( <i>mut8</i> )	diese Arbeit
pKF46	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der -35 Promotorregion ( <i>sigH</i> ) ( <i>mut9</i> )	diese Arbeit

FORTZETZUNG TABELLE 4

pKF47**	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der SinR Bindestelle (I) ( <i>mut10</i> )	diese Arbeit
pKF48**	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der SinR Bindestelle (I) ( <i>mut11</i> )	diese Arbeit
pKF49**	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der SinR Bindestelle (II) ( <i>mut12</i> )	diese Arbeit
pKF50**	Derivat von pJMB1; trägt 300 bp Fragment der <i>yqiHIK</i> Promotorregion fusioniert an <i>treA</i> Reportergergen; Mutagenese der SinR Bindestelle (II) ( <i>mut13</i> )	diese Arbeit
pKF51	Derivat von pGP382; trägt 719 bp Fragment des <i>yqil</i> Leserahmens inklusive der RBS sowie des Stopp-Codons	diese Arbeit

\*Die exakte Lage und Art der Basenaustausche, die während der Mutagenese der *yqiHIK* Promotorregion eingebracht wurden sind Tabelle 7 entnehmen.

\*\*Die exakte Lage und Art der Mutationen, die in den putativen SinR Bindestellen (I und II) vorgenommen wurden, sind in Passage 3.1 des Kapitels Ergebnisse dargestellt.

### 2.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, D) bezogen und sind in Tabelle 10 im Anhang zusammengefasst.

## 3. Medien und Zusätze

### 3.1. Medien

Zur Vermehrung und Stammhaltung der diversen *E. coli* und *B. subtilis* Stämme, wurde das Komplexmedium LB (Luria-Bertani) verwendet (190). Festmedien wurden darüber hinaus zusätzlich mit 15,0 g/l Agar versetzt. Die Produktion der extrazellulären  $\alpha$ -Amylase (AmyE) aus *B. subtilis* wurde auf LB-Stärkeplatten (1 % (w/v)) und der Überspülung der Kolonien mit einer Iod-Lösung überprüft (54).

Für die heterologe Produktion der Proteine Yqil und SinR aus *B. subtilis* in *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL wurde Minimal-Medium A verwendet (MMA) (241). Dieses enthielt zusätzlich mit 0,4 % (w/v) Casaminoäuren, 0,4 % (w/v) Glukose, 0,2 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  sowie 1 g/l Thiamin.

Die Kultivierung der verschiedenen *B. subtilis* Derivate (Tabelle 3) erfolgte in Spizizen's Minimalmedium (SMM) (263). Zur Vervollständigung des Mediums wurden 0,5 % (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle sowie eine Lösung von Spurenelementen (102) ergänzt. Die Zugabe von L-Tryptophan (20 mg/l) diente der Komplementierung der Tryptophan-Auxotrophie des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 und dessen Derivate. Für osmotische Stressexperimente wurde die Osmolarität des Mediums durch die Zugabe einer konzentrierten NaCl (5 M) Lösung erhöht.



Zur Bestimmung des Sporentiters von *B. subtilis* wurde Schaeffer's Sporulationsmedium, ebenfalls bekannt als Difco's Sporulationsmedium (DSM), verwendet (244). Durch dieses Medium wird bereits nach wenigen Stunden ein Nährstoffmangel induziert, der den Eintritt von *B. subtilis* in den Sporulationsprozess einleitet.

Um das Biofilm-Verhalten von *B. subtilis* zu dokumentieren, wurde MSgg (187) Medium verwendet. Dieses wurde als Flüssig- sowie Festmedium eingesetzt, um die Pellicle-Formation sowie die charakteristischen, strukturierten Kolonien zu analysieren, die kennzeichnend für das Biofilm-Verhalten von *B. subtilis* sind (27). Die Zusammensetzung des Mediums ist Tabelle 5 zu entnehmen. Die Bestandteile wurden einzeln sterilfiltriert und anschließend unter sterilen Bedingungen zusammengefügt. Das Festmedium wurde mit 1,5 % (w/v) Agar supplementiert. Als weitere Zusätze dienten Glycin-Betain und/oder NaCl, die ebenfalls dem Grundmedium beigelegt wurden.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des Biofilm-Mediums MSgg

Substanz (Stock)	Endkonzentration	Pro 500 ml
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (100 mM)	5 mM; pH 7	25 ml
MOPS (1 M)	100 mM; pH 7	50 ml
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	2 mM	10 ml
CaCl <sub>2</sub> (35 mM)	700 µM	10 ml
MnCl <sub>2</sub> (2,5 mM)	50 µM	10 ml
FeCl <sub>3</sub> (2,5 mM)	50 µM	10 ml
ZnCl <sub>2</sub> (100 µM)	1 µM	5 ml
Glycerin (80 % (w/v))	0,5 %	3,125 ml
Glutamat (25 % (w/v))	0,5 %	10 ml
Thiamin (1mM)	2 µM	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O		ad 500 ml
Tryptophan (4 mg/ml)	20 µg/ml	2,5 ml
Glycin-Betain (100mM)*	1 mM	5 ml
NaCl (5 M)*	0,5 M	50 ml

\*Zusätze, die nicht zum Grundmedium dazugehören

### 3.2. Medienzusätze und Antibiotika

Antibiotika und andere Medienzusätze wurden als konzentrierte Stammlösung in destilliertem Wasser oder Ethanol (Chloramphenicol, Tetracyclin) angesetzt und sterilfiltriert. Die Antibiotika wurden nach Bedarf den Medien nach dem Autoklavieren und dem anschließenden Abkühlen auf ca. 60 °C beigelegt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und deren Endkonzentrationen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Antibiotika und Zusätze

Substanz (Stock)	Endkonzentration ( <i>E. coli</i> )	Endkonzentration ( <i>B. subtilis</i> )
Ampicillin (100 mg/ml)	100 µg/ml	-
Chloramphenicol (30 mg/ml)	-	5 µg/ml
Spectinomycin (100 mg/ml)	-	100 µg/ml
Tetracyclin (5 mg/ml)	-	15 µg/ml
Kanamycin (50 mg/ml)	100 µg/ml	10 µg/ml
Zeocin (100 mg/ml)	-	35 µg/ml
Erythromycin	-	1 µg/ml
Anhydrotetracyclin (2 mg/ml)	0,2 µg/ml	-

## 4. Mikrobiologische Methoden

### 4.1. Sterilisation

Hitzeunempfindliche Lösungen und Medien wurden 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Carl Roth). Die Sterilisation von Glaswaren erfolgte über drei Stunden bei einer Temperatur von 180 °C.

### 4.2. Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C. Flüssigkulturen bis 10 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Roller inkubiert, wohingegen größere Volumina in Erlenmeyerkolben im Wasserbad oder auf Luftschüttlern bei 220 Umdrehungen pro Minute (rpm) schüttelnd inkubiert wurden.

Zur Vermehrung von *B. subtilis* unter iso- sowie hyperosmotischen Bedingungen wurden zunächst 5 ml LB in einem Reagenzglas mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Tag bei 37 °C inkubiert.

Mit dieser LB-Kultur wurde wiederum eine zweite Vorkultur, die diesmal aus SMM bestand (Volumen 20 ml), inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser SMM-Vorkultur wurde schließlich die SMM-Hauptkultur (Volumen 20 ml) beimpft. Sämtliche Kulturen wurden auf eine  $OD_{578}$  von 0,1 inokuliert. Zum Beimpfen wurden ausschließlich Vorkulturen verwendet, die eine  $OD_{578}$  von maximal 2 besaßen. Damit konnte gewährleistet werden, dass sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die NaCl-Konzentration der Hauptkultur wurde so eingestellt, dass nach der Inokulation mit der Vorkultur, die gewünschte Endosmolarität erreicht wurde. Festmedien wurden nach dem Erkalten mit einer sterilen Glaspipette beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank.

#### 4.3. Ermittlung der Zelldichte

Die Ermittlung der Zelldichte aller Bakterienkulturen erfolgte photometrisch (Ultrospec 2100 *pro*) bei einer Wellenlänge von 578 nm. Dabei wird angenommen, dass einer  $OD_{578}$  von 1 eine Zellzahl von etwa  $1 \cdot 10^9$  Zellen pro 1 ml entspricht (190). Zellsuspensionen ab einer  $OD_{578}$  von 0,5 wurden zur Messung mit dem verwendeten Medium verdünnt.

#### 4.4. Bestimmung des Sporentiters

Zur Bestimmung des Sporentiters wurden *B. subtilis* Zellen in DSM (244) kultiviert. Die Sporulation wurde nach dem Verbrauch der Nährstoff- und Energiequellen bei Eintritt in die stationäre Phase ( $T_0$ ) induziert.

*B. subtilis* Vorkulturen wurden in SMM bei 37°C (220 rpm) inkubiert. Der eigentliche Versuch wurde in DSM durchgeführt. Dafür wurde die Hauptkultur auf eine  $OD_{578}$  von 0,1 angeimpft und bei 37°C (220 rpm) im Wasserbad inkubiert. Um den Wachstumsverlauf und somit den Eintritt in die Sporulation verfolgen zu können, wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die  $OD_{578}$  verfolgt. Am folgenden Tag (ca. 24 Stunden nach Beginn der Sporulation) wurde 1 ml der Kultur entnommen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 0,5 ml der Probe adäquat verdünnt und anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Bestimmung des Sporentiters wurden die verbleibenden 0,5 ml zunächst 30 Minuten bei 80°C pasteurisiert und anschließend ebenfalls nach geeigneter Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert. Der Sporentiter wurde durch das Verhältnis der Koloniebildenden-Einheiten (KBE) der nicht-pasteurisierten Ansätze zu denen der pasteurisierten Ansätze berechnet.

#### 4.5. Analyse des Schwärmeverhaltens von *B. subtilis*

Um die Motilität diverser *B. subtilis* Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp 168 zu analysieren, wurden SMM-Softagarplatten mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0 M; 0,5 M; 0,7 M NaCl) hergestellt. Um das Schwimmverhalten von *B. subtilis* zu gewährleisten, betrug die Konzentration des Agars in diesen Platten nur 0,3 % (w/v). Für den Motilitätstest wurden die *B. subtilis* Stämme bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  0,5-1) in SMM inkubiert und anschließend in die Mitte einer Agarplatte gespottet (5 µl Kultur). Die Inkubation der Schwärmeplatten erfolgte bei 37°C.

Die Dauer der Inkubation richtete sich dabei nach der NaCl-Konzentration der Softagarplatten und dauerte bei der höchsten NaCl-Konzentration (0,7 M NaCl) drei Tage (265).

#### **4.6. Biofilm-Assay**

Um das Biofilm-Verhalten verschiedener *B. subtilis* Stämme zu untersuchen, wurde eine 5 ml LB-Kultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Volumen von 5-10 µl dieser Kulturen wurde auf eine MSgg-Agarplatten (187) getropft. Die Inkubation erfolgte über drei bis fünf Tage bei 30°C. Die Biofilm-Formation ist an den charakteristischen, strukturierten bzw. lammellenartigen Oberflächen der Kolonien zu erkennen (167). Neben der Analyse der Biofilm-Architektur auf Festmedium ist es ebenfalls möglich die Biofilm-Formation in Flüssigmedium zu beobachten. Dafür wurden 10 ml des MSgg-Flüssigmediums (187) in 6-well Kulturgefäße gefüllt und im Anschluss ebenfalls mit 10 µl einer LB-Übernachtskultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 30°C für mindestens drei Tage. Die sogenannten Pellicle bilden sich an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft (27, 167).

### **5. Molekularbiologische und genetische Methoden**

#### **5.1. Präparation von Nukleinsäuren**

##### **5.1.1. Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis***

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* erfolgte nach dem Protokoll von Marmur (184). Die chromosomale DNA wurde dafür aus 5 ml einer *B. subtilis* Kultur präpariert, die zuvor mit einer Einzelkolonie angeimpft wurde. Die Inkubation erfolgte über fünf Stunden bei 37°C. Die genomische DNA wurde in 0,1-0,5 ml dH<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

##### **5.1.2. Präparation von Plasmid-DNA**

Für eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde Plasmid-DNA mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot, D) präpariert. Für die Isolation von Plasmid-DNA in höheren Konzentrationen erfolgte die Präparation nach dem Herstellerprotokoll über die QIAGEN-Säulen (Tip 100) mit dem Plasmid Midi Kit von QIAGEN (Hilden, D).

##### **5.1.3. Präparation von Gesamt-RNA aus *B. subtilis***

*B. subtilis* Kulturen wurden in SMM bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,8 bis 1 inkubiert. Im Anschluss daran wurden 20 ml dieser Kulturen mit 20 ml und 4°C kaltem „Killingpuffer“ (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM NaN<sub>3</sub>; mit DEPC-Wasser (1 %) auf 1l aufgefüllt) versetzt und zur Ernte bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert (104). Das dadurch entstandene Zellpellet wurde bei -20°C aufbewahrt. Die Präparation der Gesamt-RNA aus *B. subtilis* wurde nach Herstellerangaben, mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten RNA (Eluat 30 µl) erfolgte photometrisch (A<sub>260</sub>). Die Qualität der gereinigten RNA wurde

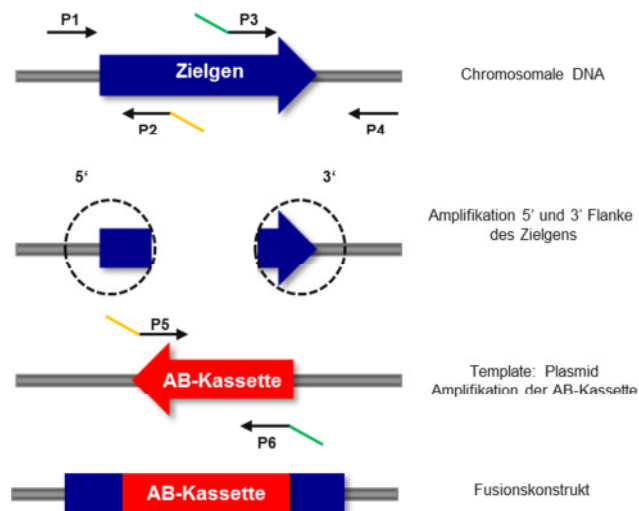
anschließend überprüft (Agarosegelelektrophorese) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 5.2. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die PCR (Polymerase Chain Reaction)-Technik nach Standardprotokollen in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) durchgeführt. Als Polymerasen dienten die Enzyme Phusion (Finnzyme, Espoo, FIN) und Velocity (Bioline, Luckenwalde, D). Die Reaktionsansätze (Gesamtvolumen: 50 µl) sowie die entsprechenden Thermoprofile wurden den Herstellervorgaben angepasst. Chromosomale DNA wurde in einer Konzentration von 100 ng als Template eingesetzt. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 im Anhang aufgeführt.

## 5.3. Konstruktion einer Deletions-Insertions-Mutante über ein PCR-Konstrukt

Die PCR vermittelte Generation von Gendelektionen erfolgte nach der Methode von Kuwayama *et al.* (158). Dafür wurden zunächst drei unabhängige Amplifikationsreaktionen durchgeführt. Zum einen die Amplifikation der 5'- (P1 und P2) bzw. 3'-Region (P3 und P4) des zu deletierenden Zielgens sowie zum anderen die Vervielfältigung einer Antibiotika-Resistenzkassette (P5 und P6) (Abbildung 7). Im Anschluss daran fand eine weitere PCR statt, in der die einzelnen Fragmente miteinander fusioniert wurden (P1 und P4). Die Fusion der 5' Flanke des Zielgens, der Antibiotika-Resistenzkassette sowie der 3' Flanke des Zielgens basierte auf den komplementären und überlappenden Enden der verwendeten Oligonukleotide (Abbildung 7; Tabelle 10). Anschließend wurde *B. subtilis* mit dem Fusionskonstrukt transformiert. Der stabile Einbau des Konstrukts ins Chromosom wird durch homologe Rekombination, durch die komplementären Bereiche der 5' und 3' Flanke des Zielgens hervorgerufen. Die Deletion des Zielgens geht somit mit der Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette einher. Die Transformanten wurden auf Agarplatten, bezogen auf die spezifischen Antibiotikaresistenzen, selektiert. Zur Überprüfung der exakten Integration der Antibiotika-Resistenzkassetten ins Genom von *B. subtilis* wurde zunächst die chromosomale DNA der Stämme isoliert. Im Anschluss daran wurden die entsprechenden DNA-Bereiche von chromosomaler Wildtyp-DNA sowie der DNA der isolierenden Mutanten via PCR (P1 und P4) amplifiziert und miteinander verglichen.



**Abb. 7: PCR vermittelte Generation von Gendeletionen.**

Schematische Darstellung zur Konstruktion einer Gendeletion in *B. subtilis*. Die Lage der verschiedenen Primer (P1-P6), die zur Amplifikation der 5' Flanke, 3' Flanke sowie der Antibiotika-Kassette (AB-Kassette) benötigt werden sind gekennzeichnet (158).

#### 5.4. DNA-Restriktion

Zum Verdau von Plasmid-DNA sowie von PCR-Amplifikaten, wurden Ansätze von einem Gesamtvolumen von 20-50  $\mu\text{l}$  mit 0,1-1  $\mu\text{g}$  DNA verwendet. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Fermentas (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, D) bezogen. Die eingesetzten Enzymmengen sowie die dazugehörigen Puffer und Inkubationszeiten entsprachen dabei den Angaben des Herstellers. Die Kontrolle der DNA-Restriktion erfolgte anschließend über Agarosegelelektrophorese.

#### 5.5. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über ein 1 %iges Agarosegel in TAE-Laufpuffer (241). Große Gele (14 cm) liefen bei 120 V für etwa eine Stunde, kleine Gele (7 cm) hingegen bei 90 V und ebenfalls einer Stunde. Als Größenstandard diente der MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, D). Nach der Auftrennung wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für ca. 15 Minuten gefärbt und unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm mit einer Video-Dokumentationsanlage (INTAS, Göttingen, D) fotografiert.

#### 5.6. Reinigung von DNA

Die Reinigung bzw. Konzentration von DNA erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (241) zur DNA-Fällung. Die DNA wurde dabei durch die Zugabe von Ethanol und Natriumacetat präzipitiert.

#### 5.7. Ligation

Zur Konstruktion diverser Vektoren (Tabelle 4) wurde folgendes Protokoll zur Ligation von homologen Restriktionsenden angewandt: Ligationen erfolgten mit etwa 20-40 ng Vektor-DNA und einem drei- bis

fünffachen molaren Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments, wobei Vektor- und Insert-DNA zuvor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend gereinigt worden waren. Die Ligationen verliefen in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 50 µl nach Vorschrift der Firma USB Corporation (Cleveland, USA). Die Inkubation erfolgte über 16 Stunden bei 16°C im Wasserbad.

## **5.8. Transformation**

### **5.8.1. Transformation von *E. coli***

Zur Transformation von Plasmid-DNA (0,1-1 µg) in kompetente *E. coli* Stämme wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen wurde Plasmid-DNA mittels Elektroporation (GenePulser™, Bio Rad) gemäß Herstellerangaben („Bacterial electrotransformation and pulse controler instruction manual, Version 1.0“) in elektrokompente *E. coli* Stämme (DH5α und Arctic Express (DE3) RIL) transformiert. Die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente XL 10 – Gold Zellen, welche im Zusammenhang mit der zielgerichteten Mutagenese (QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit) verwendet wurden, wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Agilent Technologies, La Jolla, USA).

### **5.8.2. Transformation von *B. subtilis***

Die Transformation von *B. subtilis* erfolgte nach der „Zwei-Schritt-Methode“ (143). Dabei wird die natürliche Kompetenz von *B. subtilis* ausgenutzt, die bei Eintritt in die stationäre Phase (62) auftritt. Die Konzentration der für die Transformation eingesetzten DNA betrug 0,1-10 µg. Dabei zeigte sich, dass die Transformationseffizienz anstieg, je höher die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad der Nucleinsäure waren. Transformanten wurden auf LB-Agarplatten, die mit den entsprechenden Antibiotika versetzt waren, selektiert.

## **5.9. Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA als auch von RNA erfolgte photometrisch mit Hilfe eines UV/VIS-Spektralphotometers (NanoDrop® ND-10.000, PeqLab, Erlangen, D) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wird angenommen, dass eine OD 1 bei 260 nm ( $E_{260}$ ) ca. 50 µg/ml an doppelsträngiger-DNA, 37 µg/ml an einzelsträngiger-DNA oder ca. 40 µg/ml an RNA entspricht (241).

## **5.10. DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzanalysen wurden bei Eurofins MWG Operon (DNA Sequencing Service, Ebersberg, D) durchgeführt. Eine Analyse der erhaltenen DNA-Sequenz erfolgte anschließend mit Hilfe des Programms Vector NTI (Advance 10, Invitrogen Karlsruhe, D). Im Falle der Primer-Extension-Analyse wurde die Sequenzierung nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (242) mit Hilfe des Plasmids pKF16 vorgenommen. Dafür wurde das CycleReader Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet und mit einem Li-Cor DNA Sequencer (Modell 4.000; Eurofins MWG,

Ebersberg, D) analysiert. Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 10) wurden am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DY-781) markiert (Biomers, Ulm, D).

### 5.11. Promotor-Mapping via Primer-Extension-Analyse

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde die Primer-Extension-Analyse angewandt. Dafür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus *B. subtilis* präpariert und diese anschließend mittels Reverser Transkription durch die Anlagerung eines *yqiH* spezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid (DY-781) (Tabelle 10) in cDNA umgeschrieben. Das Primer-Extension Produkt spiegelt dabei die Länge (bp) des markierten Oligonukleotid und dem 5' Ende der spezifischen mRNA wider. Folglich wurde das Plasmid pKF16 sequenziert, wobei durch den Vergleich der cDNA mit der Sequenzreaktion das 5'-Ende der *yqiHIK* spezifischen mRNA bestimmt werden konnte. In die Primer-Extension Reaktion wurden 10 µg gereinigte Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurde zuvor entweder aus *B. subtilis* Kulturen isoliert, die ohne die Zugabe von NaCl gewachsen waren (SMM; DSM) oder Kulturen, deren Osmolarität erhöht worden war (SMM-1,2 M NaCl). Die eigentliche Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des Primer Extension System-AMV Reverse Transcriptase Kits (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Die Primer-Konzentration, die in den Assay eingesetzt wurde, betrug 10 pmol.

### 5.12. Zielgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von diversen Punktmutationen in der *yqiHIK* Promotorregion von *B. subtilis* wurde das QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurden dafür spezifische Oligonukleotide generiert, die die gewünschten Punktmutationen beinhalteten. Durch die Anlagerung dieser Oligonukleotide an doppelsträngige Plasmid-DNA wird die Einbringung der Zielmutation *in vitro* gewährleistet. Als Template wurden die Plasmide pKF13 sowie pKF18 (Tabelle 4, 7) eingesetzt, die ein 300 bp langes DNA-Fragment der *yqiHIK* Promotorregion an ein *treA*-Reportergen fusioniert tragen. Das Plasmid pKF13 beinhaltete dabei die ursprüngliche *yqiHIK* Promotorsequenz, wohingegen im Falle des Plasmides pKF18 bereits eine Mutation in der -35 Region des *yqiHIK* Promotors vorhanden war (Tabelle 7). Die Konzentration der Plasmid-DNA betrug in beiden Fällen 20 ng. Die zur Einbringung der diversen Punktmutationen notwendigen Oligonukleotide sind Tabelle 10 zu entnehmen. Nach erfolgreicher Transformation der mutagenisierten Plasmid-DNA in chemisch kompetente XL 10 – Gold Zellen wurde erneut Plasmid-DNA von positiv selektionierten Transformanten isoliert und die Anwesenheit der gewünschten Mutation durch eine DNA-Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde *B. subtilis* mit den daraus entstandenen Plasmiden (Tabelle 4, 7) transformiert, wodurch sich diese über die homologen Bereiche des *amyE* Genlokus stabil ins Genom integrieren konnten. Die daraus resultierenden Stämme sind Tabelle 3 zu entnehmen.



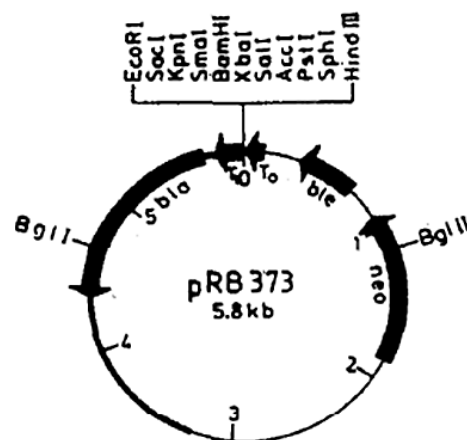
## 6. Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen

In Tabelle 4 im Kapitel Material und Methoden sind die Plasmide aufgelistet, die im Verlauf dieser Arbeit konstruiert wurden. Diesen Plasmiden liegen vier verschiedene Ausgangsvektoren zugrunde. Diese werden im Folgenden beschrieben sowie schematisch dargestellt. Mit Hilfe dieser Plasmide wurden wiederum zahlreiche *B. subtilis* Stämme (Tabelle 3) konstruiert. Zur besseren Veranschaulichung befindet sich im Anhang eine Zusammenfassung (Tabelle 11) der Plasmide zusammen mit den korrespondierenden Stämmen. Diese Übersicht zeigt weiterhin, welche Oligonukleotide verwendet wurden, um das dazugehörige Plasmid zu konstruieren, sowie alle Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, die den synthetisierten Oligonukleotiden angefügt worden waren. Durch Sequenzierungsreaktionen wurden alle konstruierten Plasmide überprüft.

### 6.1. Konstruktion von Plasmiden

#### 6.1.1. Der Shuttlevektor pRB373

Bei dem *E. coli* – *B. subtilis* Shuttlevektor pRB373 handelt es sich um ein Derivat des Vektors pRB273 (34) (Abbildung 8). Mit Hilfe der Primer PpRB373\_yqiH\_for und PpRB373\_yqiH\_rev wurde ein 546 bp langes DNA-Fragment der *yqiHIK* Promotorregion von chromosomaler DNA des *B. subtilis* 168 Wildtyp-Stammes amplifiziert. Dieses Amplifikat wurde nach der PCR mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und im Anschluss daran über die *EcoRI* Schnittstelle in die „Multiple Cloning Site“ des Vektors pRB373 ligiert. Im weiteren Verlauf wurde der *B. subtilis* 168 Wildtyp-Stamm mit dem daraus resultierenden Vektor mit dem Namen pKF16 (Tabelle 4) transformiert. Positive Transformanten wurden auf LB-Kanamycin-Platten selektioniert. Dieser Stamm wurde verwendet um Gesamt-RNA aus *B. subtilis* zu isolieren, die wiederum für die Primer-Extension-Reaktion eingesetzt werden sollte. Durch das Vorhandensein des Plasmids wird die Konzentration der spezifischen *yqiH*-mRNA in der Zelle erhöht.

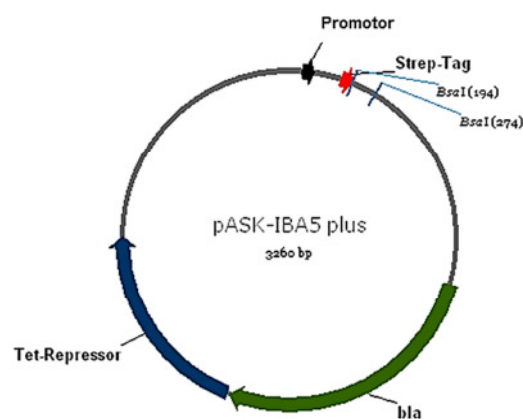


**Abb. 8: Darstellung des Shuttlevektors pRB373.**

Schematisch dargestellt ist der Vektor pRB373 (34). Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (*bla*) als Selektionsmarker in *E. coli* sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette (*neo*) für die Selektion in *B. subtilis*. Das Antibiotikum Bleomycin (*ble*) kann hingegen in beiden Organismen als Selektionsmarker verwendet werden.

### 6.1.2. Das Expressionsplasmid pASK-IBA5 plus

Zur Konstruktion des Vektors pKF44 (Tabelle 3), unter Verwendung der Primer *sinR\_N\_strep\_for* sowie *sinR\_N\_strep\_rev*, wurde der vollständige Leserahmen des *sinR* Gens mittels PCR, von chromosomaler DNA des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 amplifiziert. Das daraus resultierende 330 bp lange DNA-Fragment wurde durch die Restriktionsendonuklease *BsaI* geschnitten und wiederum in die *BsaI*-Schnittstelle des Expressionsplasmides pASK-IBA5 plus (Abbildung 9) ligiert. Dieses Plasmid wurde zuvor durch die gleiche Endonuklease linearisiert. In pKF44 unterliegt das *sinR* Gen der Kontrolle eines durch Anhydrotetracyclin induzierbaren Tetracyclin Promotors/Operators. Des Weiteren besitzt das rekombinante SinR Protein nach der Synthese einen N-terminalen Strep-TagII® und kann somit mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden.

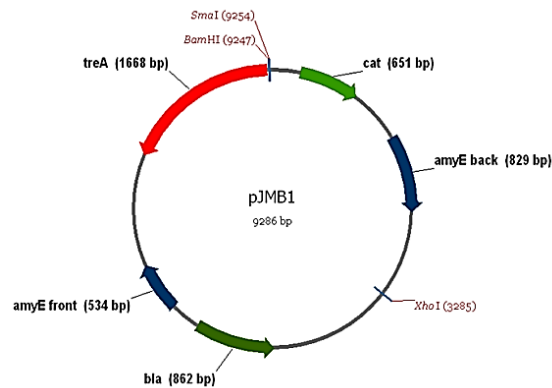


**Abb. 9: Schematische Darstellung des Expressionssystems pASK-IBA5 plus.**

Gezeigt ist der Vektor pASK-IBA5 plus. Das *bla* Gen, das für eine Ampicillin-Resistenz kodiert (Selektionsmarker in *E. coli*) ist grün markiert. Bei dem Promotor handelt es sich um einen *tet*-Promotor, dessen Induktion durch den Tet-Repressor gesteuert wird (blau). Zusätzlich gekennzeichnet ist der Strep-Tag II®, welcher N-terminal an das Zielgen angefügt wird.

### 6.1.3. Der Vektor pJMB1 dient der Konstruktion von N-terminalen *treA*-Reporterfusionen

Der Vektor pJMB1 (M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlichte Daten) ist ein Derivat des Vektors pMD476 (246) und ermöglicht die Herstellung einer *treA*-Reporterfusion in *B. subtilis* (Abbildung 10). Das *treA* Gen kodiert in *B. subtilis* für eine salztolerante Phospho- $\alpha$ -(1,1)-Glukosidase (TreA) (91, 109) und wird aufgrund dieser Eigenschaft bevorzugt in *B. subtilis* zu Reportergenstudien von osmotisch induzierbaren Genen eingesetzt. Diverse Fragmente unterschiedlicher Länge (Tabelle 3), die die *yqiHIK* Promotorregion beinhalteten, wurden von chromosomaler DNA des *B. subtilis* 168 Wildtyp-Stammes mittels PCR amplifiziert. Sowohl die PCR-Amplifikate, als auch der Vektor pJMB1, wurden mit den Restriktionsendonukleasen *SmaI* und *BamHI* verdaut und anschließend miteinander ligiert. Der Vektor pJMB1 besitzt als zusätzliche Besonderheit zwei Sequenzbereiche, die homolog zu dem *amyE* Genlokus aus *B. subtilis* sind. Das *amyE* Gen kodiert in *B. subtilis* für die  $\alpha$ -Amylase (270) und ist nicht essentiell.

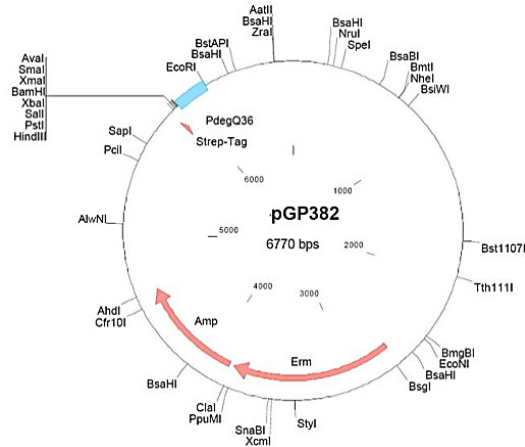


**Abb. 10: Das *treA*-Reportergenplasmid pJMB1.**

Schematisch dargestellt ist der Vektor pJMB1 (M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlichte Daten). In grün markiert sind die beiden Gene *bla* und *cat*, die für eine Ampicillin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzkassette kodieren. Diese dienen der Selektion in *E. coli* bzw. *B. subtilis*. In blau gekennzeichnet sind die homologen Sequenzbereiche des *amyE* Gens (*amyE* front/back). Zusätzlich ist die Lage der relevanten Restriktionsschnittstellen (*Sma*I, *Bam*HI sowie *Xho*I) gezeigt.

#### 6.1.4. Das Plasmid pGP382

Der Vektor pGP382 ist ein Expressionsplasmid (Abbildung 11), welches die Synthese von rekombinanten Proteinen ermöglicht, die eine C-terminale Strep-Tag Fusion besitzen (114). Das Gen von Interesse ist in diesem Fall unter der Kontrolle des konstitutiven *degQ*<sub>36</sub> Promotors aus *B. subtilis*. Aufgrund dieser transkriptionellen Regulation und der Stärke des *degQ*<sub>36</sub> Promotors, wurde dieser Vektor zur Komplementation der *yqiH*K Deletionsmutante KFB8 eingesetzt. Dafür wurde unter Verwendung der Primer Pkomp\_pGP382\_yqil\_for sowie Pkomp\_pGP382\_yqil\_rev (Tabelle 10), ein 719 bp großes Fragment von chromosomaler DNA des *B. subtilis* 168 Wildtyp-Stammes amplifiziert. Dieses Fragment beinhaltet den gesamten Leserahmen des *yqil* Gens aus *B. subtilis* sowie die dazugehörige Ribosomenbindestelle. Durch das Vorhandensein des *yqil* eigenen Stopp-Codons wird eine C-terminale Strep-Tag Fusion verhindert. Das Amplifikat sowie der Vektor pGP382 wurden mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Bam*HI geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Das daraus entstandene Plasmid wurde pKF51 und der korrespondierende Stamm KFB8 (pKF51) benannt. Dieses Plasmid ist nicht in der Lage, sich ins Genom von *B. subtilis* zu integrieren. Daher wurde durch die Zugabe von Erythromycin ein permanenter Selektionsdruck auf die Anwesenheit von pKF51 in den entsprechenden *B. subtilis* Stämmen aufrechterhalten.



**Abb. 11: Das Expressions-Plasmid pGP382.**

Schematisch abgebildet ist der Vektor pGP382 (114). In rot markiert sind die beiden Gene *bla* und *ery*, die für eine Ampicillin- und Erythromycin-Resistenzkassette kodieren. Diese dienen der Selektion in *E. coli* bzw. *B. subtilis*. Zusätzlich gekennzeichnet ist die „Multiple-Cloning-Site“.

## 6.2. Konstruktion von *B. subtilis* Stämmen

### 6.2.1. Konstruktion der verschiedenen Deletion-Insertion-Mutanten

Zur Untersuchung der physiologischen Rolle des salzinduzierten Operons *yqiHIK* aus *B. subtilis*, wurde bereits im Rahmen meiner Masterarbeit eine *yqiHIK* Deletionsmutante konstruiert (75). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier weitere Deletionen von Genen vorgenommen, die für homologe Zellwandhydrolasen kodieren (*lytC*, *yrvJ*, *cwIC* und *cwID*). Darüber hinaus wurden diverse Doppel-, Tripel-, Quadrupel- sowie eine Quintupel-Mutante konstruiert (Tabelle 3). Die Deletion der Gene erfolgte über die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette nach der Methode von Kuwayama *et al.* (158). Die mittels PCR amplifizierte Konstrukte (Abbildung 7) wurden durch doppelt homologe Rekombination in das Chromosom des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 am ursprünglichen Genort inseriert. Die Rekombinanten wurden über spezifische Antibiotika-Agarplatten (siehe Resistenzen) selektioniert. Die Kombination der einzelnen Gendeletionen erfolgte über die Transformation von Einzel-Mutanten mit chromosomaler DNA einer anderen *B. subtilis* Einzel-Mutante (siehe Abschnitt 5.8.2 Transformation von *B. subtilis*). Die daraus resultierende Doppel-Mutante wurde ebenfalls mit chromosomaler DNA einer weiteren Einzel-Mutante transformiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde schließlich die Quintupel-Mutante erzeugt. Sämtliche daraus entstanden *B. subtilis* Deletionsmutanten wurden durch eine PCR-Reaktion auf die korrekte Lokalisation der Antibiotika-Resistenzkassetten im *B. subtilis* Genom hin überprüft und sind in Tabelle 3 beschrieben.

### 6.2.2. Konstruktion der *yqiH*-Reporter-gen-Fusionsstämme

Die Konstruktion der diversen *treA*-Reporter-genstämme (Tabelle 3) basiert auf der Integration des Plasmides pJMB1 (M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlichte Daten) ins Genom von *B. subtilis* über den *amyE* Genloкус. Dafür wurden zunächst alle konstruierten pJMB1 Derivate (Tabelle 4) mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *XhoI* (Abbildung 10) linearisiert und im Anschluss daran benutzt um *B. subtilis* zu transformieren. Der Empfängerstamm besaß eine chromosomale *treA* Gendeletion,

damit die gemessene TreA-Aktivität allein der Promotoraktivität des Fusionskonstruktes zugeordnet werden konnte. Dafür wurden zwei verschiedene *B. subtilis*  $\Delta treA$  Stämme verwendet (TSTB3 sowie JGB34) (Tabelle 3), die sich nur durch ihren Antibiotika-Selektionsmarker unterschieden. Durch homologe Sequenzbereiche zum *amyE* Lokus aus *B. subtilis*, konnte das linearisierte Plasmid über doppelt homologe Rekombination ins Genom des Akzeptorstammes inseriert werden. Die korrekte Insertion wurde schließlich über den AmyE Phänotyp auf Stärkeplatten mittels eines Iod-Testes bestimmt (54). Um den Einfluss diverser Regulatoren aus *B. subtilis* auf die *yqiHIK* Promotoraktivität zu testen, wurden die korrespondierenden Wildtyp-Fusionsstämme KFB15 bzw. KFB41 (Tabelle 3) mit chromosomaler DNA der jeweiligen Regulatormutanten (Tabelle 3) transformiert. Anschließend erfolgte die Selektion auf spezifische Antibiotika. Die daraus entstandenen Stämme sowie die korrespondierenden Plasmide sind den Tabellen 3, 4 und 11 zu entnehmen.

## 7. Biochemische Methoden

### 7.1. Bestimmung der TreA-Aktivität

Die Expressionslevel der verschiedenen *yqiH-treA* Fusionen wurden durch die Messung der TreA- (Phospho- $\alpha$ -(1,1)-Glukosidase) Aktivität bestimmt (91). Dafür wurde das chromogene Substrat pNPG (para-Nitrophenyl- $\alpha$ -Glucopyranosid) verwendet. Dieses Substrat kann mit Hilfe des TreA-Enzyms umgesetzt werden, wobei ein Reaktionsprodukt eine gelbe Färbung besitzt. Diese Färbung ist photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifizierbar und ein Maß für den Expressionslevel des jeweiligen *yqiH*-Fusionskonstruktes.

Zur Bestimmung der TreA-Aktivität der verschiedenen Reporterstämme (Tabelle 3) wurden diese entweder in DSM, SMM oder SMM mit diversen NaCl-Konzentrationen bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  1-1,5) kultiviert und im Anschluss daran aliquotiert (1,8 ml). Die Proben wurden daraufhin pelletiert sowie in 0,5 ml Z-Puffer resuspendiert (190). Zur Hydrolyse der Zellwand wurde Lysozym verwendet (1 mg/ml). Nach 10-minütiger Inkubation (37°C) wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Ein Volumen von 0,4 ml des Überstandes wurde anschließend für den eigentlichen TreA-Enzymtest verwendet (109). Jeder in dieser Arbeit gezeigten TreA-Assays wurde mit zwei technischen sowie zwei biologischen Parallelen durchgeführt. Dieser Versuchsansatz wurde darüber hinaus zweimalig wiederholt. Die hier dargestellten Daten zeigen exemplarisch einem Versuchsansatz, wobei somit die Standardabweichung aus vier Werten (zwei technischen sowie zwei biologischen Parallelen) ermittelt wurde. Die TreA-Aktivität wurde in [Units (mg Protein)<sup>-1</sup>] angegeben und ist somit äquivalent zum  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymassay (190).

### 7.2. Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

#### 7.2.1. Heterologe Überexpression in *E. coli*

Die heterologe Produktion der Proteine Yqil sowie SinR aus *B. subtilis* erfolgte in *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL Zellen. Der *yqil* Leserahmen liegt auf dem Vektor pKF11 (75), einem pASK-IBA3 plus (IBA, Göttingen, D) Derivat, vor. Bei dem Vektor pKF44 handelt es sich hingegen um ein pASK-IBA5 plus

(IBA, Göttingen, D) Derivat, welches das *sinR* Gen trägt. Die Gene unterliegen der Kontrolle eines Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotors. Darüber hinaus ermöglichen die Vektoren durch die Fusion eines Strep-Tags (284) an die synthetisierten Proteine, eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie, basierend auf der Bindung der Fusionsproteine an ein spezifisches Säulenmaterial.

Für die heterologe Produktion der Proteine Yqil und SinR wurde der Arctic Express (DE3) RIL Stamm mit den Vektoren pKF11 und pKF44 transformiert und über Nacht auf LB-Ampicillin Agarplatten selektioniert. Mit Hilfe dieser Transformanten wurde eine Vorkultur beimpft. Für die Expression wurde das Medium MMA mit Ampicillin verwendet. Das Volumen der Vorkultur betrug 250 ml, die Inkubation erfolgte bei 220 rpm und einer Temperatur von 37°C über Nacht. Das Beimpfen der Hauptkultur (Volumen 1l) auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 erfolgte mit Hilfe der Vorkultur. Nach dem Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5-0,7 wurde die Kultur auf 18°C abgekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde die heterologe Expression von *yqil* sowie *sinR* durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration: 0,2 µg/ml) ins Medium induziert. Die weitere Inkubation der Kultur erfolgte bei 18°C und 220 rpm für weitere 12 Stunden. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 5.000 rpm) geerntet und das dadurch gewonnene Zellpellet konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Zur Überprüfung, ob die Induktion und somit die Produktion der rekombinanten Proteine erfolgreich war, wurden vor Induktion sowie direkt vor der Ernte, Proben entnommen. Die Analyse der Aliquots erfolgte unter Berücksichtigung der OD<sub>578</sub> über eine SDS-PAGE.

### 7.2.2. Reinigung der Proteine Yqil und SinR via Strep-Tag Affinitätschromatographie

Nach der heterologen Produktion der Proteine Yqil und SinR wurden die gefrorenen Zellpellets zunächst in einem 1M Tris-HCl Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Das Yqil Protein verblieb aufgrund der fehlenden Signalsequenz im Zytoplasma. Der zytoplasmatische Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe der French Press (French® Pressure Cell Press; American Instrument Company, Silver Spring, USA). Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde der Prozess viermalig durchgeführt. Das Zelllysate wurde im Anschluss daran mittels einer Ultrazentrifugation (60 min; 30.000 rpm; 4°C) von Zelltrümmern und Membrankomponenten getrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde durch einen Loop auf eine Strep-Tactin-Sepharose Säule (IBA, Göttingen, D) aufgetragen. Die Reinigung erfolgte nach der Arbeitsanleitung „Strep-TagII®-System“ (IBA, Göttingen, D) und ist durch Pittelkow *et al.* (229) detailliert beschrieben worden. Der pH-Wert des Elutionspuffers betrug 7,5. Bei der für die Proteinreinigung verwendeten Anlage handelt es sich um eine ÄKTAbasic der Firma GE Healthcare Europe (München, D). Die Steuerung der Anlage erfolgte über die dazugehörige Unicorn-Software. Nach der Analyse der einzelnen Fraktionen wurden diejenigen, mit der höchsten Proteinkonzentration durch Zentrifugation über eine Membran mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentriers (Vivaspin 6; Volumen 6 ml; Sartorius AG, Göttingen, D) ankonzentriert. Die Ausschussgröße der Membran lag bei 10 kDa. Die Analyse des Proteingehalts sowie des Reinheitsgrades der einzelnen Proteinfractionen erfolgte photometrisch mit dem UV/VIS-Spektralphotometer (NanoDrop® ND-10.000, PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D) sowie durch eine SDS-PAGE. Die gereinigten Proteine wurden bei 4°C gelagert.

### 7.3. SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS-Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid) wurde zur Überprüfung der Produktion sowie zur Kontrolle der Reinigung der rekombinanten Proteine verwendet. Die SDS-PAGE wurde nach Standardprotokollen (159) ausgeführt, wobei die Gel-Läufe in Elektrophorese-Kammern von Bio-Rad durchgeführt worden sind. Als Standard, zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine, wurde der Page Ruler Prestained Protein Marker (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, D) verwendet (14-70 kDa). Die SDS-PAGE (15 %ige Mini-Gele) wurden anschließend in einer aus 0,25 % (w/v) Coomassie<sup>TM</sup> Brilliant Blue G250 (Merck, Darmstadt, D), 50 % (v/v) Isopropanol und 5 % (v/v) Essigsäure bestehenden Lösung gefärbt. Der Entfärber setzte sich aus 70 % (w/v) Isopropanol, 5 % Eisessig und 45 % destilliertem Wasser zusammen und die Entfärbung erfolgte über Nacht auf dem Schüttler.

### 7.4. Zymogramme – Zur Analyse von Zellwandhydrolasen

Bei der Zymographie handelt es sich um ein Verfahren zur Analyse der proteolytischen Aktivität von Proteasen mittels einer SDS-PAGE (79, 144). Dabei wird abhängig vom Typ der Protease ein spezifisches Substrat bei der Herstellung des Gels zugefügt, was der Protease schließlich als *in situ* Substrat zur Verfügung steht. Im Falle von Zellwandhydrolasen wird das Polyacrylamidgel mit gereinigter Zellwand supplementiert. Zunächst werden die Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt, was zur Folge hat, dass die Denaturierung ausschließlich durch SDS erfolgt somit ohne die Zugabe von Reduktionsmitteln im Probenpuffer (DTT; Mercaptoethanol). Im nächsten Schritt wird das SDS mit dem Detergenz Triton X-100 aus dem Gel gewaschen, was der Renaturierung der Enzyme dient. Aktive Enzyme spalten das zuvor eingebettete Substrat an der Stelle des Gels, an dem sie sich nach der Auftrennung, bezogen auf das Molekulargewicht des Proteins, befinden. Das Polyacrylamidgel wird in einem letzten Schritt mit Metylen-Blau gefärbt und mit Hilfe von Wasser entfärbt. Die Zonen der Lyse entfärben sich deutlich schneller und sind als weiße Banden zu identifizieren.

#### 7.4.1. Präparation der Zellwand von *B. subtilis*

Zur Präparation der Zellwand aus *B. subtilis* wurde einem Protokoll von Kawai *et al.* (134) gefolgt. Dafür wurde zunächst 1 Liter einer *B. subtilis* Kultur in SMM angezogen und bei einer OD<sub>578</sub> von 0,8-1,0 pelletiert (4°C, 5.000 rpm). Das Zellpellet wurde anschließend in ca. 1 ml „Killing Puffer“ (siehe 5.1.3.) resuspendiert. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte im Anschluss mittels einer Kugelmühle (2 Minuten, 2.600 rpm; B. Braun Biotech International, Melsungen, D). Das daraus resultierende Zellpulver wurde zunächst in ca. 4 ml auf 60°C vorgewärmten, 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,0) resuspendiert und anschließend in 40 ml des genannten Puffers (4°C) überführt.

Die eigentliche Präparation der Zellwand erfolgte, indem die Zellsuspension tropfenweise in 120 ml kochendes SDS (5 %) überführt wurde. Dabei wurde die SDS-Lösung mittels eines Magnetrührers ständig gerührt. Das tropfenweise Hinzufügen der Suspension ist notwendig, um endogene Autolysine möglichst schnell zu inaktivieren. Nach der Zugabe der Suspension wurde die Lösung für weitere

15 Minuten unter ständigem Rühren gekocht. Im Anschluss daran wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Sedimentation der Zellwände erfolgte durch eine Zentrifugation bei 48.000 x g für 20 Minuten. Zum Entfernen des SDS wurde das Pellet mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die so präparierte Zellwand wurde in ca. 100 µl destilliertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 7.4.2. SDS PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen

Um eine mögliche hydrolytische Aktivität der putativen Amidase Yqil nachweisen zu können, wurde zunächst ein 15 %iges Polyacrylamidgel angefertigt, dem in einer Endkonzentration von 0,2 % präparierte *B. subtilis* Zellwand zugefügt wurde (163). Mit einer Konzentration von 8 µg wurde gereinigtes Protein mit 2x SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % (w/v) SDS; 17,4 % (w/v) Glycerin und 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) versehen und für 2 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 10 mA für ca. 3 Stunden. Zur Renaturierung wurde das Gel für 16 Stunden bei 37°C in 500 ml Renaturierungspuffer (25 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 % Triton X-100 (v/v)) (85, 163) schwenkend inkubiert. Die Färbung des Gels erfolgte mit 0,1 % (w/v) Methylen Blau in 0,01 % (w/v) KOH (127).

### 8. Radioaktive Bestimmung der intrazellulären Glycin-Betain und L-Carnitin Pools

Zur Bestimmung der intrazellulären Glycin-Betain- sowie L-Carnitin-Pools wurde der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 in SMM mit 1,2 M NaCl sowie mit Glycin-Betain bzw. L-Carnitin bis zu einer  $OD_{578}$  von 1,0-1,5 kultiviert. Die Endkonzentration der kompatiblen Solute im Wachstumsmedium betrug 1mM und beinhaltete radioaktiv markierte Solute in den folgenden Konzentrationen: 0,64 µM [ $1-^{14}C$ ] Glycin-Betain bzw. 0,31 µM [ $1-^{14}C$ ] L-Carnitin. Die Bestimmung der intrazellulären Solut Konzentration erfolgte über die Quantifizierung der Szintillation wie durch Holtmann und Bremer (122) detailliert beschrieben wurde. Dabei gilt, dass eine  $OD_{578}$  von 1, einem gesamt Zellvolumen von 0,65 µl der *B. subtilis* Zellen in 1ml der Kultur entspricht (S. Moses, E. P. Bakker und E. Bremer, unveröffentlichte Daten).

### 9. Mikroskopie

Für die Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie wurden die *B. subtilis* Zellen aus Flüssigkulturen auf sogenannten Agarpads immobilisiert. Dafür wurde der Objektträger mit einer 1 %igen Agaroseschicht benetzt. Bei dem verwendeten Mikroskop handelte es sich um Eclipse 50i (Nikon, Düsseldorf, D). Die Dokumentation erfolgte mit der am Mikroskop installierten Digitalkamera DS-5Mc (Nikon, Düsseldorf, D) bzw. der dazugehörigen Software NIS-Elements F 2,30. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden zu Präsentations- sowie Publikations-Zwecken in Adobe Photoshop (Version 10) bearbeitet.



### 9.1. Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrast Aufnahmen wurden bei einer 1.000-fachen Vergrößerung (Okular 10x; Objektiv Plan Apo 100x/1,40 Oil Ph3 DM  $\infty$ /0,17 WD 0,13) vorgenommen.

### 9.2. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit verschiedener *B. subtilis* Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm 168 wurde das Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit, nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses System basiert auf einem zweifarbigen Fluoreszenz-Assay, der Zellen bezogen auf ihre Lebensfähigkeit anfärbt. Bei den beiden Fluoreszenzfarbstoffen handelt es sich zum einen um SYTO 9, ein grün-fluoreszierender Farbstoff, sowie zum anderen um Propidiumiodid, der die Zellen rot-fluoreszierend erscheinen lässt. Diese Farbstoffe färben gleichermaßen die Nukleinsäuren an und werden in einem Gemisch verwendet. SYTO 9 ist in der Lage alle Zellen anzufärben, wohingegen Propidiumiodid nur Zellen penetrieren kann, die eine defekte Zellmembran aufweisen. Dadurch ist der rot-fluoreszierende Farbstoff in der Lage SYTO 9 zu verdrängen. Lebende Zellen, die eine intakte Zellmembran besitzen erscheinen somit grün, wohingegen absterbende Zellen, definiert durch eine beschädigte Zellmembran rot gefärbt sind. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden unter Ausschluss des normalen Durchlichtes sowie durch den Gebrauch des entsprechendem Filterset (CF-L Epi-Fl Filter Block GFP-L; Ex 460-500/DM505/BA510) ermöglicht. Das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum der Farbstoffe lag bei 480/500 nm (SYTO 9) und 490/635 nm (Propidiumiodid).

### 9.3. Rasterelektronenmikroskopie

Die detaillierte Untersuchung der Zellmorphologie salzgestresster *B. subtilis* Zellen wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie vorgenommen. Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit Laura Czech (Bachelorstudentin; AG Bremer) und Dr. Karl-Heinz Rexer (Mykologie; AG von Herrn Prof. Kost; Philipps Universität Marburg) durchgeführt.

*B. subtilis* Kulturen wurden dafür in SMM mit sowie ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  0,4-0,7) kultiviert. Die Zellen wurden im Anschluss daran auf einer Nylon Membran (Pall BioSupport, East Hills, USA) immobilisiert und sofort mit 1 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Immobilisierte Zellen wurden anschließend mit Sörensen Puffer (100 ml  $KH_2PO_4$  (0,1 M); 900 ml  $NaHPO_4$  (0,1 M); (pH 7,8)) gewaschen und für zwei Stunden mit einer 1 %igen Osmiumtetroxid Lösung nach fixiert. Nachdem die Zellen nochmals, dreimal mit Sörensen Puffer sowie destilliertem Wasser gewaschen worden waren, wurden diese durch die Verwendung von Ethylenglycolmonoethylether über Nacht dehydriert und in 100 % Aceton (v/v) überführt. Darauf folgte die Trocknung mit Hilfe der „Kritischen-Punkt-Methode“ unter einer  $CO_2$  Atmosphäre sowie die sofortige Beschichtung mit 150-250 Å Gold. Die *B. subtilis* Zellen wurden durch den Gebrauch eines Rasterelektronenmikroskops S-530 der Firma Hitachi visualisiert. Das Mikroskop wurde dafür mit 25 kV betrieben.

## V. ERGEBNISSE

### 1. Die funktionelle, physiologische sowie regulatorische Analyse des salinduzierten *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*

Der Mikroorganismus *B. subtilis* kolonisiert in seinem natürlichen Habitat die oberen Bodenschichten (66). In dieser ökologischen Nische stellt die Verfügbarkeit von Wasser einen kritischen abiotischen Faktor dar. Die Kultivierung von *B. subtilis* unter hochosmolaren Stressbedingungen wird *in vitro* durch die Zugabe von NaCl in das Medium herbeigeführt. Dabei können die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup> Ionen die Zytoplasmamembran nicht in großen Mengen passieren.

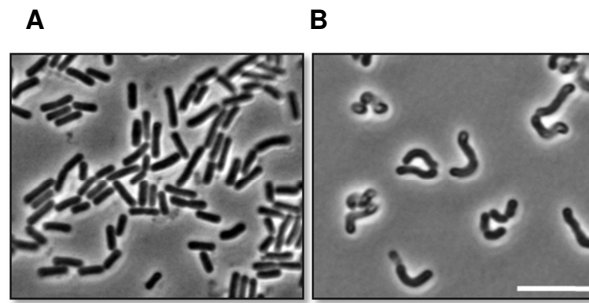
Genom- sowie Proteom-Analysen des Transkriptionsprofils von *B. subtilis* Kulturen, die einer erhöhten Salinität ausgesetzt worden waren, offenbarten jedoch eine komplexe und mannigfaltige zelluläre Antwort auf diese Stresssituation (96, 123, 265). Die Identifikation von zahlreichen Genen bzw. Genprodukten, deren Funktion bis dato unbekannt ist, führt zu der Annahme, dass es neben der bereits bekannten Antwort auf hohe Salinitäten, noch weitere Facetten der Osmoregulation in *B. subtilis* gibt.

#### 1.1. Hochosmolare Bedingungen führen in *B. subtilis* zu Veränderungen der Morphologie

Bei *B. subtilis* handelt es sich um ein halotolerantes Bakterium, das eine Erhöhung der externen Osmolarität bis zu einem bestimmten Grad dulden kann, sie aber nicht zum Wachsen benötigt. Dabei stellt die Zugabe von 1,2 M NaCl in das Kulturmedium eine starke Stresssituation für *B. subtilis* dar. Die Erhöhung der Osmolarität von moderat (340 mosmol kg Wasser<sup>-1</sup>) auf hoch (2.700 mosmol kg Wasser<sup>-1</sup>) spiegelt sich vor allem im Wachstumsverhalten von *B. subtilis* wider, was mit einer Verlängerung der lag-Phase in Antwort auf steigende Salinität einhergeht (21).

Um mögliche Auswirkungen auf die Morphologie salzgestresster *B. subtilis* Wildtyp-Kulturen zu analysieren, wurden diese zunächst in SMM ohne die Zugabe von NaCl kultiviert. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurde schließlich die Hauptkultur inokuliert. Dafür wurde SMM mit oder ohne der Zugabe von 1,2 M NaCl verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub> 1) kultiviert. Anschließend wurden Proben (5 µl) von der SMM-0 M NaCl als auch SMM-1,2 M NaCl *B. subtilis* Kultur entnommen und mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie analysiert (Abbildung 12). Die Zellen wurden dafür zur Immobilisierung auf Agarpads (1 % (w/v)) aufgebracht.

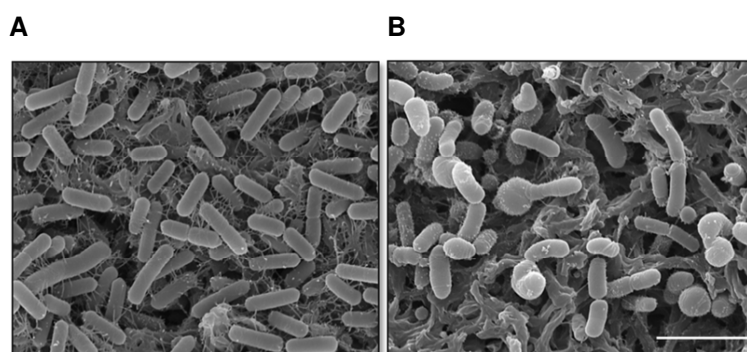
Die Wildtyp-Kulturen, die unter normalen physiologischen Bedingungen kultiviert worden waren, zeigten den charakteristischen stäbchenförmigen Phänotyp von *B. subtilis* (Abbildung 12 A). Überraschenderweise konnten jedoch starke morphologische Veränderungen von *B. subtilis* Zellen beobachtet werden, die unter hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) kultiviert worden waren (Abbildung 12 B). Diese Zellen wirkten stark gekrümmt und wiesen zudem Verdickungen an den Zellpolen auf (Abbildung 12 B).

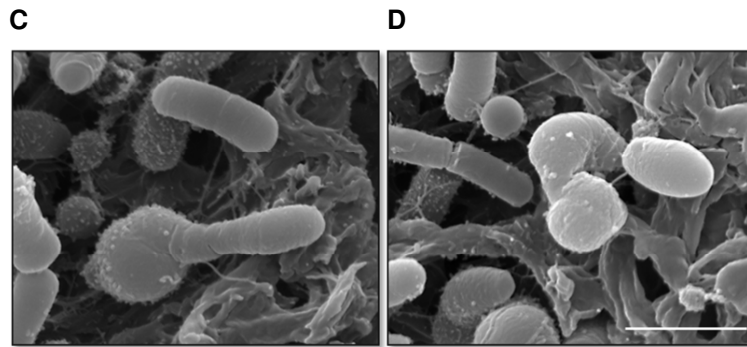


**Abb. 12: Phasenkontrastmikroskopie des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes.**

Gezeigt sind Phasenkontrast-Aufnahmen (1.000-fache Vergrößerung) des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 in SMM ohne die Zugabe von NaCl (**A**) sowie mit 1,2 M NaCl (**B**). Die  $OD_{578}$  der Kulturen betrug jeweils 1. Der Größenstandard entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Um diese morphologischen Veränderungen salzgestresster *B. subtilis* Wildtyp-Zellen genauer zu untersuchen, wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Die Kultivierung des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes erfolgte dabei analog zu der zuvor beschriebenen Vorgehensweise. Die Zellen wurden nach Erreichen der Ziel-OD ( $OD_{578}$  0,4-0,7) auf einer Nylon-Membran immobilisiert, durch Glutaraldehyd fixiert und mit Hilfe von Ethylenglycolmonoethylether dehydriert, sowie anschließend durch die „Kritische-Punkt-Methode“ getrocknet. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder sind in Abbildung 13 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Aufnahmen der Zellen, die ohne Salzstress (0 M NaCl) kultiviert worden waren (Abbildung 13 A), war vor allem die Homogenität dieser Zellen auffällig, denn die Größe und Form dieser Zellen waren nahezu identisch. Im Gegensatz dazu steht die Morphologie der Zellen, die bei 1,2 M NaCl kultiviert worden waren. Wie zuvor auch schon bei den Phasenkontrastaufnahmen beobachtet werden konnte, waren Verdickungen an den Zellpolen vorzufinden (Abbildung 13 B, C). Darüber hinaus waren viele Zellen stark gewunden (Abbildung 13 B, D). Größe und Dicke dieser Zellen variierte ebenfalls im Vergleich zu den Zellen, die unter normalen physiologischen Bedingungen kultiviert worden waren.





**Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopie (REM) des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes.**

Gezeigt sind REM-Aufnahmen des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 ( $OD_{578}$  0,4-0,7) in SMM ohne die Zugabe von NaCl (**A**) sowie mit 1,2 M NaCl (**B, C, D**). Die Bilder A und B wurden mit einer 8.000-fachen Vergrößerung aufgenommen; der Größenstandard entspricht 4  $\mu$ m. Die Bilder C und D wurden hingegen mit einer 20.000-fachen Vergrößerung aufgenommen; der Größenstandard entspricht 2  $\mu$ m.

Durch die mikroskopischen Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen starke Veränderungen an der Zellhülle vornimmt. Die Morphologie der Zellen zeichnet sich durch ein großes Maß an Heterogenität aus. Es bleibt zunächst die Frage offen, ob es sich dabei um einen aktiven oder vielmehr passiven Prozess handelt, der unwillkürlich nach Exposition von *B. subtilis* Zellen mit hohen NaCl-Konzentrationen auftritt. Diese morphologischen Umgestaltungen setzen jedoch eine Restrukturierung der Zellwand voraus. An diesem Prozess müssten wiederum zellwandmodifizierende Enzyme beteiligt sein. Dieses Phänomen deutet auf eine neue Facette der Adaptation von *B. subtilis* an hohe Salinitäten hin. Interessanterweise konnten in den zuvor erwähnten Transkriptom-Analysen salzinduzierte Gene identifiziert werden, deren Produkte dem Zellwandmetabolismus zugeordnet wurden (265). Ein Beispiel dafür sind die Gene *yqiH* sowie *yqiI* aus *B. subtilis*.

## 1.2. Das *yqiHIK* Gencluster aus *B. subtilis*

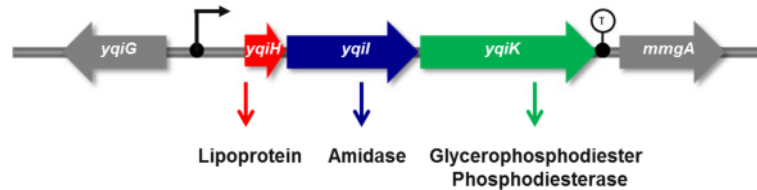
Eine Analyse des Transkriptionsprofils von *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen führte unter anderem zu der Identifikation der Gene *yqiH* sowie *yqiI*. Diese Gene zeigten in dem zugrunde liegenden DNA-Microarray, unter den getesteten Bedingungen (1,2 M NaCl), ein hohes Induktionsniveau (15- bzw. 7-fach) im Vergleich zu ungestressten Bedingungen (265). Eine Untersuchung der Gennachbarschaft (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList>) zeigte, dass die Gene *yqiH* und *yqiI* zusammen mit einem weiteren Gen *yqiK* in direkter Nachbarschaft auf dem *B. subtilis* Chromosom kodiert vorliegen (Abbildung 14 A). Die Expression des *yqiK* Transkriptes war bei 1,2 M NaCl ebenfalls leicht erhöht, wobei die osmotische Induktion nicht den Schwellenwert von drei erreichte, der für die Transkriptom-Analyse (265) festgelegt worden war.

Datenbankanalysen zeigten, dass das Gen *yqiH* vermutlich für ein extrazelluläres Lipoprotein kodiert, welches mittels einer Lipidmodifikation in der Zytoplasmamembran verankert werden kann. Das Protein YqiI besitzt Sequenzähnlichkeit zu einer N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase, einem sekretorischen Enzym, was der Gruppe der Autolysine zugeordnet wird (258, 280). Diese Zellwandhydrolasen spalten die Amidbindung zwischen dem L-Alanin sowie der N-Acetylmuraminsäure des Zuckerstranges (Abbildung 5). Das Protein YqiK besitzt wiederum

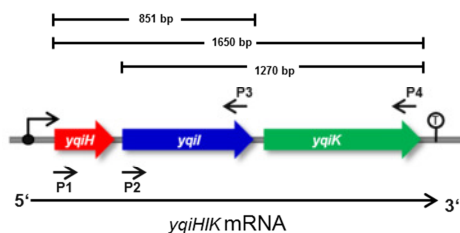
Homologien zu der Enzymklasse der Glycerophosphodiester Phosphodiesterasen. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus (160).

Die Lage sowie die Orientierung des *yqiHIK* Genclusters suggeriert, dass es sich dabei um eine Transkriptionseinheit in *B. subtilis* handelt, die durch hohe Salinitäten induziert werden kann. Mit Hilfe der Methode des sogenannten „Operon-Mappings“ konnte das *yqiHIK* Gencluster als eine Expressionseinheit in *B. subtilis* identifiziert werden (Abbildung 14 B, C) (75). Die Methode beruht auf einer Reversen Transkriptionsreaktion, die mit Gesamt-RNA als Template durchgeführt wurde. Daraus ging die cDNA hervor, die als Template für die eigentliche Amplifizierungsreaktion verwendet wurde, wobei die gewählten Primer die intergenen Regionen der Ziel-Gene umspannten. Die genaue Lage der Primer, die für diesen Versuch verwendet wurden, sind der Abbildung 14 B zu entnehmen. Die *yqiHIK* polycistronische mRNA endet an einem Terminator, der in der 137 bp intergenen Region zwischen dem Gen *yqiK* sowie *mmgA* liegen muss. Das *mmgA* Gen liegt stromabwärts in der gleichen Orientierung zu dem *yqiHIK* Operon und kodiert für eine Acetyl-CoA Thiolase (233). In den kürzlich veröffentlichten „Tiling-Array“-Analysen des gesamten Transkriptoms von *B. subtilis*, von Nicolas *et al.* (205) konnte ein weiteres kürzeres Transkript identifiziert werden, das stromaufwärts des Gens *yqiK* beginnt. Die Expression des Gens *yqiK* kann somit unter bestimmten physiologischen Bedingungen ebenfalls separat erfolgen.

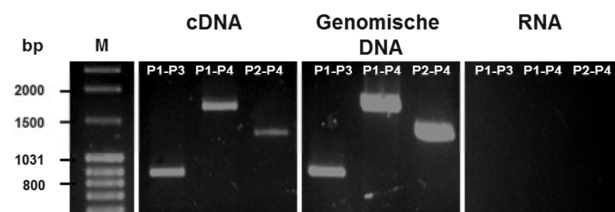
**A**



**B**



**C**



**Abb. 14: Struktur und genetische Organisation des *yqiHIK* Operon aus *B. subtilis*.**

(A) Schematische Darstellung des *yqiHIK* Genclusters. In direkter Nachbarschaft befinden sich die Gene *yqiG* (stromaufwärts) sowie *mmgA* (stromabwärts). Die Lage des Promotors sowie die des Terminators sind gekennzeichnet. (B) Lage und Orientierung der Primer P1-P4. (C) RT-PCR basierende Methode zur Bestimmung der Transkriptionseinheit *yqiHIK*. Die PCR-Amplifizierungsreaktion wurde auf verschiedenen Templates [cDNA, genomische DNA (Positiv-Kontrolle), RNA (Negativ-Kontrolle)] durchgeführt.

Eine Gennachbarschaftsanalyse, die mit Hilfe des Webserver des Doe Joint Genomic Institute (<http://img.jgi.doe.gov>) durchgeführt wurde, zeigte, dass das *yqiHIK* Gencluster nur in drei weiteren nahe verwandten Organismen von *B. subtilis* vorkommt, nämlich *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atropheus* sowie *Bacillus licheniformis*.

### 1.3. Bioinformatische Analyse der putativen Amidase Yqil aus *B. subtilis*

Das Gen *yqil*, welches aus 618 bp besteht, kodiert in *B. subtilis* für eine putative N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase. Das Prä-Protein setzt sich aus 206 Aminosäuren zusammen, die eine vorhergesagte molekulare Masse von ca. 22 kDa besitzen. Eine Analyse der Aminosäuresequenz mittels des SMART Webtools (168) zeigte, dass die Aminosäuren 1-23 für ein N-terminales Signalpeptid kodieren (Abbildung 15 A), was die Sekretion des Proteins über die Zytoplasmamembran ermöglicht. Die Translokation über die Membran basiert auf einem Sec-abhängigen Transport (273). Am C-Terminus des reifen Proteins befindet sich ein weiteres Sequenzmotiv, welches als die katalytische Amidase\_3 Domäne (Aminosäuren 67-178) identifiziert werden konnte (Abbildung 15 A). Diese Domäne ist charakteristisch für N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen und wurde nach der PFAM-Nomenklatur für Proteine benannt (PF015020) (230).

Darüber hinaus existieren noch vier weitere homologe Proteine zu Yqil in *B. subtilis*. Bei diesen Proteinen handelt es sich zum einen um die Amidase LytC, die zusammen mit dem Protein LytD 95 % der autolytischen Aktivität während des vegetativen Wachstums ausmacht (157, 161, 292). Zum anderen handelt es sich um die Amidasen CwC sowie CwD, die eine wichtige Rolle während des Sporulations- bzw. Keimungsprozesses in *B. subtilis* spielen (191, 249). Des Weiteren stellt das Protein YrvJ ein zusätzliches Homolog zu Yqil dar, dessen Funktion bisher experimentell nicht bestimmt wurde. Die Sequenzidentitäten zu Yqil variieren dabei zwischen 12 % (YrvJ) und 32 % (CwD). Allen Proteinen gemein ist das Vorhandensein der katalytisch wichtigen Amidase\_3 Domäne (Abbildung 15 B). Vergleicht man die Sequenzidentitäten dieser Domäne, bezogen auf Yqil miteinander, variieren diese zwischen 33 % (CwD) und 55 % (LytC). Ein Alignment dieser katalytischen Domäne ist in Abbildung 15 A dargestellt. Zusätzlich zu den fünf zueinander homologen Proteinen aus *B. subtilis*, wurde in dieses Alignment noch eine weitere Amidase aufgenommen. Bei diesem Enzym handelt es sich um die Zellwandhydrolase CwIV aus *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus*. Diese Amidase besitzt ebenfalls eine Amidase\_3 Domäne (Abbildung 15 B) und darüber hinaus konnte die Funktionalität des Enzyms (256) bestätigt und die Kristallstruktur des CwIV1 Proteins (PDB: 1JWQ) gelöst werden. In vorangegangenen Studien wurden die folgenden Aminosäuren H-15, E-29, H-82 sowie E-148 als katalytisch essentiell identifiziert (74, 256). Diese wichtigen Reste sind in allen homologen Proteinen vorhanden (Abbildung 15 A).

Mit Hilfe des kristallographischen Datensets (PDB: 1JWQ) konnte ein *in silico* Modell von Yqil erstellt werden, das auf der katalytischen Domäne des Templates CwIV1 beruht (Abbildung 15 C). Die Identifikation von CwIV1 als mögliches Template erfolgte mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers (8), wobei die Aufbereitung der Bilder mit dem Programm PyMol (<http://www.pymol.org/>) vorgenommen wurde. Die vorhergesagte dreidimensionale Struktur von Yqil besteht aus fünf  $\beta$ -Faltblättern sowie aus fünf  $\alpha$ -Helices. In diesem *in silico* Modell sind ebenfalls die katalytisch wichtigen Aminosäuren (H-15, E-29, H-82 sowie E-148) hervorgehoben. Die Aminosäuren H-15, E-29 sowie H-82 sind funktionell von großer Bedeutung, da sie in die Koordination eines einzelnen Zinkatoms, im aktiven Zentrum des Enzyms involviert sind (74, 256). Die Aminosäure E-148 ist nicht direkt an der Zinkbindung beteiligt, sondern übt vielmehr einen stabilisierenden Effekt auf diese Koordination des Ions aus.

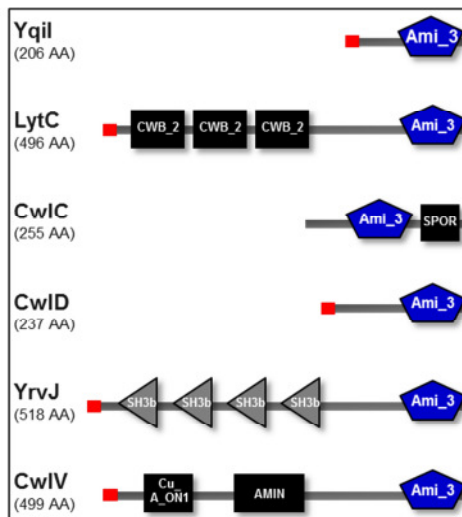
Der Aufbau von Zellwandhydrolasen besteht typischerweise aus zwei Domänen (74, 258, 280). Einerseits besitzen sie eine hydrolytisch aktive Domäne, die für die Spaltung der Zellwand an einer

charakteristischen Stelle des Peptidoglykans verantwortlich ist. Andererseits benötigen Zellwandhydrolasen eine Domäne, die der Verankerung an die Zellwand dient, um ihre hydrolytische Aktivität an ihrem Wirkungsort zu entfalten. Für diese Bindedomäne konnten zahlreiche Sequenzmotive identifiziert werden. Analysiert man den schematischen Aufbau der zu Yqil homologen Proteine, wie er in Abbildung 15 B dargestellt ist, ist zu erkennen, dass alle Enzyme mit Ausnahme des Yqil Proteins eine solche Zellwandbindedomäne besitzen. CwID besitzt ebenfalls kein spezielles Sequenzmotiv, welches für die Bindung verantwortlich ist, sondern vielmehr hydrophobe Regionen am N-Terminus, die eine Wechselwirkung mit der Sporenmembran eingehen und somit der Verankerung an diese dienen. Vergleichbare hydrophobe Aminosäuren sind ebenfalls nicht in der Sequenz von Yqil vorzufinden.

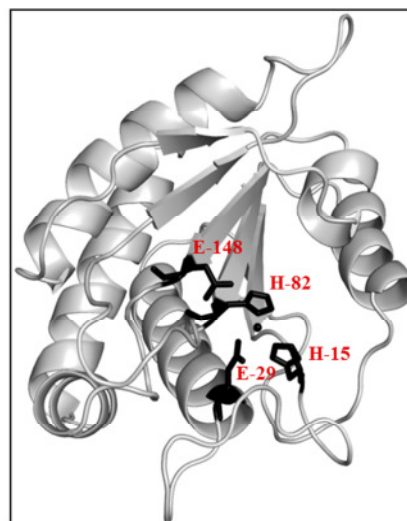
**A**

Yqil	6	GKT VY I DA G H G G E D S G A V G . . . N G L F E K D I N L A V S E H V T D K L K E . . E G A N P . V A S R S D D H F L T .
LytC	295	G E T I F I D P G H G D D S G A I G . . N G L L E K E V N L D I A K R V N T K L N A . . S G A L P . V L S R S N D T E Y S .
CwIC	1	M V K I F I D P G H G G S D P G A T G . . N G L Q E K T L T L Q I A L A L R T I L T N E Y E G V S L . L L S R T S D Q Y V S .
CwID	14	G K I I Y L D P G H G G P D G G A V G . . G K L L E K D V T L E V A F R M R D Y L Q E . . Q G A L V . I M T R E S D T D L A P .
YrvJ	426	N K T I I V D P G H G G K D S G T I G Y . S G K F E K N L T I K T A K L L A S K L R S . . A G A D V . Y V T R Q D D T F V S .
CwIV1	297	K K V V V I D A G H G A K D S G A V G I S R K N Y E K T F N L A M A L K V E S I L K Q . . N P K L E V L T R S D D T F L E .
Yqil	63	. . . . . L E E R V A K A S A N Q A D L F V S I H V N S G V A S A S . G T E T Y F Q S D Y E G E N S R R L A S
LytC	352	. . . . . L Q E R V N K A A S A Q A D L F L S I H A N A N D S S S P N G S E T Y Y D T T Y Q A A N S K R L A E
CwIC	60	. . . . . L N D R T N A A N N W G A D F F L S I H V N S G G G T . . . G F E S Y I Y P D V . G A P T T T Y Q S
CwID	72	E G T K G Y S R R K A E D L R Q R V K L I N H S E A E L Y I S I H L N A I P S Q K W S G A O S F Y Y G K Y . . A E N E K V A K
YrvJ	484	. . . . . L Q S R V S T S H Y R N A D A F I S I H Y D S Y A D T S T R G S T A Y Y . . . Y S P A K D Q E L A S
CwIV1	357	. . . . . L K Q R V K V A E N L K A N V E F V S I H A N S S G S S A S N G T E T Y . . . . . Y Q R S A S K A F A N
Yqil	113	D I Q S Q L V S S L Q T R D R . G V K E S D F Y V I T Y S Q M P S V L A E L G F I T N S S D A D K L G S E E Y Q Q K A A D A I
LytC	402	Q I Q P K L A A N L G T R D R . G V K T A A F Y V I K Y S K M P S V L V E T A F I T N A S D A S K L K Q A V Y K D K A A Q A I
CwIC	106	T I H S E V I Q A V D F A D R . G K K T A N F H V L R E S A M P A L L T E N G F I D T V S D A N K L K T S S F I Q S L A R G H
CwID	133	Y I Q D E L R R N L E N T T R K A K R I H G I Y L M Q N V T K P G A L I E V G F L S N P S E A T L L G K P K Y Q D K V A S S I
YrvJ	531	D V H S E V V K R S S I P D R . G V L F G D Y Y V L R E N R Q P A M L Y E L G Y V S H P Q E E A I V H S N S Y G E K V T D G I
CwIV1	403	V M H K Y F A P A T G L T D R . G I R Y G N F H V I R E T T M P A V L L E V G Y L S N A K E E A T L F D E D F Q N R V A Q G I
Yqil	175	V N G I D S Y Y D Q . . . . .
LytC	464	H D G T V S Y Y R . . . . .
CwIC	168	A N G L E . . . . .
CwID	196	Y K G I L R Y F T E K G D P P E
YrvJ	593	E S G L E K Y F Q . . . . .
CwIV1	465	A D G I T E Y L D V K . . . . .

**B**



**C**



**Abb. 15: In silico Analyse der putativen Amidase Yqil.**

(A) Aminosäuresequenz-Alignment der Proteine Yqil, LytC, CwIC und CwID aus *B. subtilis* sowie CwIV1 aus *P. polymyxa* var. *colistinus*. Schwarze Boxen heben katalytisch essentielle Aminosäuren (H-15, E-29, H-82, E-148) hervor (74, 256). (B) Schematische Darstellung der Domain-Organisation folgender Proteine: Yqil, LytC, CwIC, CwID CwIV. Rote Boxen repräsentieren das Vorhandensein einer Signal-Sequenz (Sec-Typ). Die katalytische Amidase 3 Domäne (Ami\_3) ist in blau dargestellt (PF015020). Diverse Zellwandbindedomänen wurden mit schwarzen bzw. grauen Boxen gekennzeichnet: CWB\_2 (PF04122), SPOR (PF05036), SH3b (SM00287), AMIN (PF11741). (C) In silico Modell der Yqil Struktur basierend auf dem Template CwIV1 von *P. polymyxa* var. *colistinus* (PDB: 1JWQ). Die Aminosäuren H-15, E-29, H-82 sowie E-148 sind dabei wahrscheinlich an der Koordination eines Zinkions im aktiven Zentrum des Proteins beteiligt (74, 256).

Die bioinformatische Analyse legt dar, dass es sich bei Yqil um ein sekretorisches Protein handelt, was der Gruppe der N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen zugeordnet werden kann, von denen es in *B. subtilis* vier weitere Homologe gibt. Das Fehlen der charakteristischen Zellwandbindedomäne lässt die exakte zelluläre Lokalisation von Yqil vorerst offen. Das Vorhandensein einer Signalsequenz impliziert zunächst, dass das Protein vollständig sekretiert wird, wobei Proteom-Analysen des Secretoms von *B. subtilis* nicht zur Identifikation des Yqil Proteins geführt haben (272). Eine Verankerung mit der Zellwand könnte mit einer bisher unbekanntem Wechselwirkung einhergehen. Des Weiteren wäre eine Verankerung an das Zellwand-Peptidoglykan über eine Protein-Protein Interaktion denkbar. Ein möglicher Interaktionspartner könnte das Lipoprotein YqiH darstellen, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist.

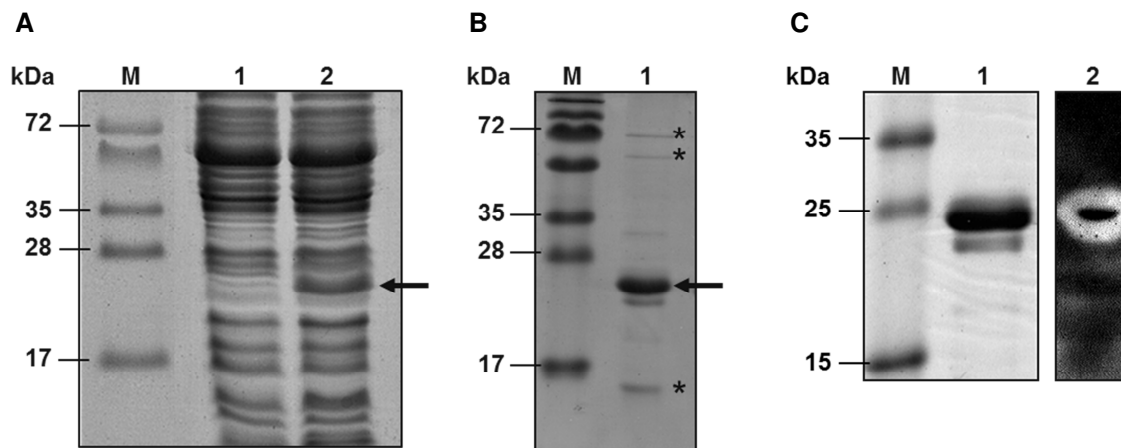
**1.4. Funktionelle Charakterisierung der vermutlichen Zellwandhydrolase Yqil aus *B. subtilis*: Heterologe Expression, Reinigung und Zymographie**

Zur funktionellen Analyse der vermutlichen Zellwandhydrolase Yqil wurde der Leserahmen des *yqil* Gens (ohne Signal-Sequenz) in den Vektor pASK-IBA3 plus kloniert (75). Der daraus resultierende Vektor pKF11 wurde in den *E. coli* Stamm Arctic Express (DE3) RIL transformiert. Die heterologe Expression des Gens erfolgte nach der Induktion durch AHT. Vor der Induktion sowie kurz vor der Ernte der Kulturen wurden Proben entnommen, die weiterhin auf einer SDS-PAGE analysiert wurden. Die erfolgreiche Produktion des heterologen Proteins Yqil ist in Abbildung 16 A zu erkennen. Das rekombinante Yqil Protein trägt am C-Terminus ein Strep-TagII Peptid, das über einen kurzen Linker an das Protein fusioniert ist. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe der Strep-TagII Affinitätschromatographie, die auf der Affinität des Strep-TagII Peptids zur Strep-Tactin Säulenmatrix beruht. Der Reinheitsgrad des gereinigten Yqil Proteins wurde ebenfalls auf einer SDS-PAGE genauer untersucht (Abbildung 16 B). Neben der Proteinbande die sich auf Höhe der Zielgröße befindet (ca. 22 kDa) sind noch weitere Protein-Banden erkennbar (Abbildung 16 B). Diese Banden wurden in Zusammenarbeit mit der Proteinanalyse-Abteilung der Universität Marburg (Dr. Stefan Baumeister) massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Banden, die oberhalb der Zielbande verlaufen, *E. coli* Hitzeschockproteinen (DnaK) zugeordnet werden konnten. Bei der Protein-Bande die unterhalb der Yqil-Bande verläuft, handelt es sich jedoch um ein Abbauprodukt des Yqil Proteins.

Um nun, basierend auf Sequenzhomologien, die vorhergesagte hydrolytische Aktivität von Yqil experimentell zu bestätigen, wurde ein Zymogramm erstellt (79, 144). Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren, um Hydrolasen auf ihre Funktionalität hin zu überprüfen, indem das Substrat des Enzyms in einem SDS-Gel co-polymerisiert wird. Im Fall von Yqil wurde gereinigtes



Zellwandmaterial (0,2 %) von *B. subtilis* in ein 15 %iges SDS-Gel eingebettet. Anschließend wurden 8 µg des gereinigten Proteins geladen und elektrophoretisch für drei Stunden bei 10 mA aufgetrennt. Nach einer Renaturierungsphase wurde die SDS-PAGE mit Methyleneblau gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt (Abbildung 16 C). Das gereinigte Yqil Protein wurde nach der Größe aufgetrennt und verbleibt somit an nur einer Stelle der SDS-PAGE. Nach der Renaturierung des Yqil Proteins konnte dieses das Zellwandmaterial an der gegebenen Stelle verdauen. Diese Zonen der Lyse sind durch die weißen Banden erkennbar, die durch ein schnelleres Auswaschen des Farbstoffs an dieser Stelle entstehen.



**Abb. 16: Biochemische Analyse des Proteins Yqil.**

**(A)** Überproduktion von Yqil. Coomassie gefärbtes SDS-Gel vor (Spur 1) und nach der Induktion (Spur 2) der Expression des *yqil* Gens mittels AHT. Der Pfeil kennzeichnet die Lage des Yqil Proteins (22 kDa) **(B)** SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) nach der Reinigung des rekombinanten Yqil Proteins (4 µg). Der Pfeil kennzeichnet die Lage von Yqil wohingegen Sterne die Banden markieren, welche massenspektrometrisch analysiert wurden. Obere Banden: *E. coli* Hitzeschockproteine (DnaK); Untere Bande: Abbauprodukt des Yqil Proteins. **(C)** Zymogramm des Proteins Yqil (8 µg). SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung (Spur 1) sowie nach der Färbung mit Methylene-Blau (Spur 2). Für die Zymographie (Spur 2) wurde gereinigtes Zellwandmaterial von *B. subtilis* verwendet (79, 144).

Mit Hilfe dieses Versuchs konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Enzym Yqil aus *B. subtilis* in der Lage ist, gereinigtes Zellwand-Peptidoglykan *in vitro* zu spalten und kann somit der Gruppe der Zellwandhydrolasen zugeordnet werden.

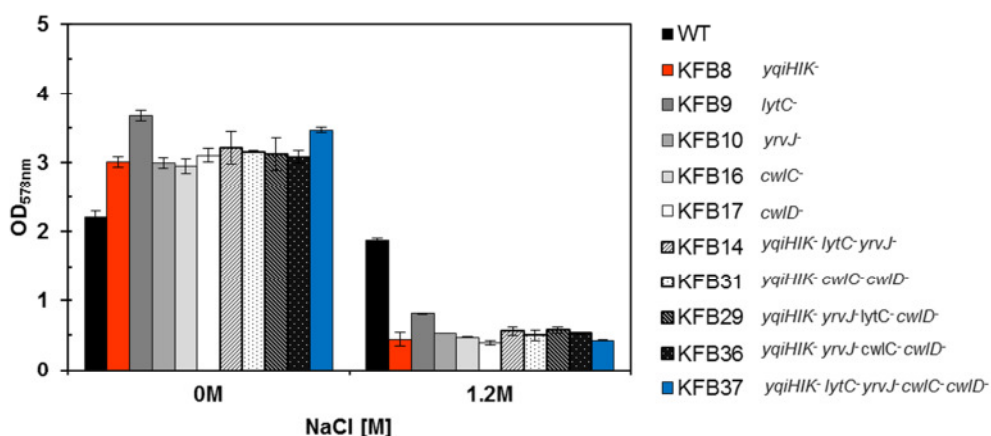
### 1.5. Die Deletion des *yqiHIK* Operons beeinträchtigt das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen

Um die physiologische Rolle der YqiHIK Proteine zu analysieren, wurde eine *yqiHIK* Deletionsmutante durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette konstruiert und der daraus resultierende Stamm KFB8 genannt (75). Ein besonderes Augenmerk lag auf der Charakterisierung der physiologischen Rolle des Proteins Yqil. Wie in der Literatur bereits beschrieben wurde, ist die Analyse der physiologischen Rolle eines bestimmten Autolysins schwierig, da homologe Proteine die zelluläre Funktion eines anderen Proteins oft problemlos übernehmen können (74, 258, 280). Aufgrund dieser Redundanz wurden neben der *yqiHIK* Deletionsmutante, Einzel-Mutanten der homologen Amidasen LytC, CwlC, CwlD sowie YrvJ konstruiert. Darüber hinaus wurden aufbauend

auf den Einzel-Mutanten (KFB8-KFB10; KFB16-KFB17), jeweils zwei Tripel (KFB14, KFB31)- und Quadrupel (KFB29, KFB36) - sowie eine Quintupel-Mutante (KFB37) hergestellt (Tabelle 3; Abbildung 17).

Die diversen Deletionsmutanten wurden in einem vorläufigen Wachstumsexperiment unter zwei unterschiedlichen physiologischen Bedingungen kultiviert. Dafür wurden zunächst Vorkulturen in SMM mit einer LB-Kultur angeimpft, welche dann über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Mit Hilfe dieser Vorkulturen wurden wiederum die Hauptkulturen angeimpft ( $OD_{578}$  0,1). Die Hauptkulturen bestanden aus SMM ohne die Zugabe von NaCl sowie aus SMM mit 1,2 M NaCl. Diese Kulturen wurden bei 37°C für 20 Stunden im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Wachstumsertrag in Form der  $OD_{578}$  photometrisch bestimmt. Das Ergebnis dieses Wachstumsexperiments ist in Abbildung 17 dargestellt. Unter normalen physiologischen Bedingungen (0 M NaCl) wuchs der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm nach 20-stündiger Inkubation bis zu einer  $OD_{578}$  von 2. Der Wachstumsertrag der diversen Mutanten variierte von  $OD_{578}$  von 3 bis 3,5 und lag im Vergleich zum Wildtyp somit deutlich höher, da der Wildtyp-Stamm sich zu diesem Zeitpunkt bereits in der Absterbephase befand. Unter hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) erreichte der Wildtyp-Stamm hingegen eine  $OD_{578}$  von 1,5 und befand sich zur dieser Zeit erst in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase, was durch das deutlich langsamere Wachstum von *B. subtilis* unter diesen Stressbedingungen erklärt werden kann. Die diversen Mutanten mit Defekten in den Zellwandhydrolasen, erreichten bis zu diesem Zeitpunkt nur eine  $OD_{578}$  von ca. 0,5 und befanden sich somit erst am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase.

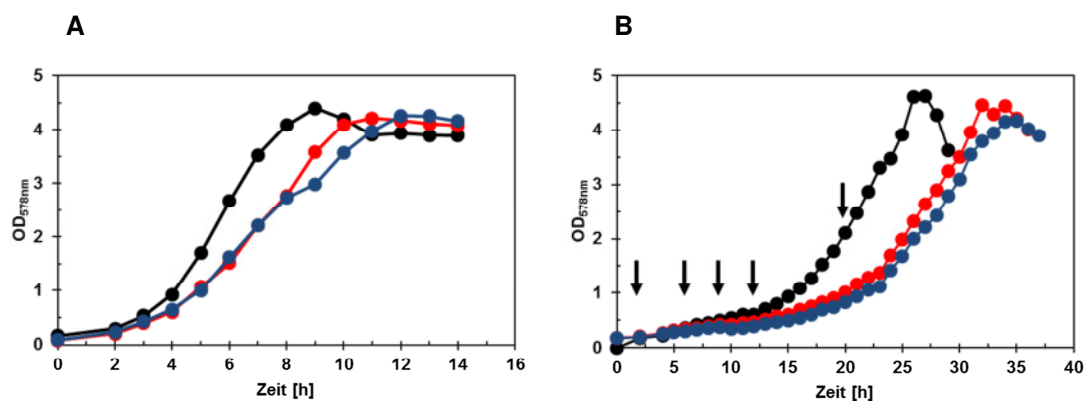
Unter beiden getesteten Kulturbedingungen konnte eine Verzögerung des Wachstums der diversen Zellwandhydrolase-Mutanten festgestellt werden. Das Wachstumsdefizit zeigte sich bei hohen Salinitäten deutlicher als unter normalen physiologischen Bedingungen. Der Phänotyp der unterschiedlichen Mutanten war nahezu identisch, unabhängig davon, ob es sich um eine Einzel-Tripel- Quadrupel- oder um die Quintupel-Mutante handelte.



**Abb. 17: Wachstumsanalyse diverser Amidase-Mutanten.**

Der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 sowie diverse Amidase-Mutanten wurden in SMM sowie SMM-1,2 M NaCl kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 20 Stunden der Inkubation in Form der  $OD_{578}$  aufgenommen. Die Genotypen der diversen Mutanten sind der Abbildungslegende zu entnehmen.

Um im Anschluss daran die Frage zu beantworten, zu welchem Zeitpunkt die Wachstumsverzögerung der Deletionsmutanten stattfindet, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Dafür wurde der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm, die Einzel-Mutante KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) sowie exemplarisch die Fünffach-Mutante KFB37 ( $\Delta yqiHIK, \Delta lytC, \Delta cwIC, \Delta cwID, \Delta yrvJ$ ) unter den zuvor beschriebenen Parametern in SMM ohne die Zugabe von NaCl sowie in SMM mit 1,2 M NaCl bei 37°C inkubiert. Der Wachstumsverlauf wurde stündlich durch das Messen der  $OD_{578}$  bestimmt (Abbildung 18). Ohne die Zugabe von NaCl zeigte sich der Wachstumsvorteil des Wildtyps darin, dass er im Vergleich zu den Mutanten-Stämmen KFB8 und KFB37 früher in die stationäre Phase eintrat. Nichtsdestotrotz konnten die Stämme einen identischen Wachstumsertrag erzielen (Abbildung 18 A). Die Kultivierung der Deletionsmutanten KFB8 sowie KFB37 zeigte unter hyperosmotischen Bedingungen, dass deren Wachstumsnachteil in einer deutlich längeren Adaptationsphase begründet liegt. Der *B. subtilis* Wildtyp erreichte bereits nach 15 Stunden eine  $OD_{578}$  von 1, wohingegen die Mutanten diesen Wachstumsertrag erst nach ca. 22 Stunden der Inkubation erreichten (Abbildung 18 B). Auch bei hohen Salinitäten können die Mutanten den gleichen Wachstumsertrag erreichen, wie es für den Wildtyp-Stamm gezeigt wurde. Die Deletionsmutanten besaßen auch in diesem Experiment ein deckungsgleiches Wachstumsverhalten. Es konnten keine Unterschiede zwischen der *yqiHIK* Mutante sowie der Quintupel-Mutante festgestellt werden.

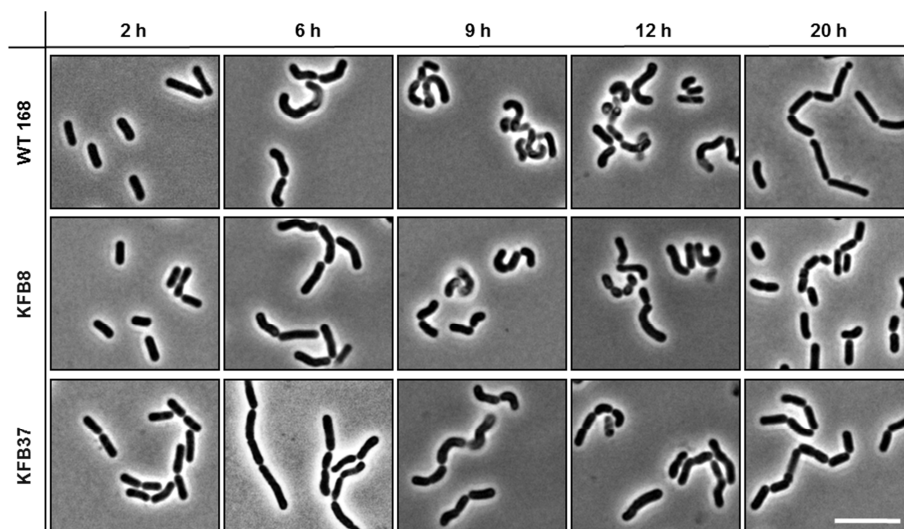


**Abb. 18: Wachstumsanalyse der Mutanten KFB8 und KFB37.**

Der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 (●), die *yqiHIK* Deletionsmutante KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) (●) sowie die Quintupel-Mutante KFB37 ( $\Delta yqiHIK, \Delta lytC, \Delta cwIC, \Delta cwID, \Delta yrvJ$ ) (●) wurden in SMM ohne die Zugabe von NaCl (A) sowie mit 1,2 M NaCl (B) kultiviert. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen Proben zur mikroskopischen Analyse entnommen wurden (Abbildung 19).

Zu Beginn dieses Kapitels wurde das Phänomen vorgestellt, dass der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm morphologische Veränderungen der Zellhülle vornimmt, sobald dieser unter hochosmolaren Bedingungen kultiviert wird. Diese Veränderungen der Morphologie sollten nun in Abhängigkeit der Wachstumsphase analysiert werden. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob es Unterschiede in der Morphologie des Wildtyp-Stammes im Vergleich zu den Zellwandhydrolase-Mutanten KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) und KFB37 ( $\Delta yqiHIK, \Delta lytC, \Delta cwIC, \Delta cwID, \Delta yrvJ$ ) gibt. Dafür wurden zu gegebenen Zeitpunkten entlang der Wachstumskurve Proben entnommen, die mittels Phasenkontrastmikroskopie genauer analysiert wurden (Abbildung 19). Die verschiedenen Zeitpunkte sind durch Pfeile in Abbildung 18 B gekennzeichnet. Die erste Probe der *B. subtilis* Wildtyp-Kultur wurde nach zweistündiger Inkubation

entnommen. Die Morphologie entsprach zu diesem Zeitpunkt dem erwartenden stäbchenförmigen Phänotyp. Eine weitere Probenentnahme erfolgte nach sechs Stunden. Zu diesem Zeitpunkt begannen die *B. subtilis* Wildtyp-Zellen bereits Veränderungen in der Morphologie vorzunehmen. Die maximale Variation zeigte sich nach 9 bzw. 12 Stunden der Inkubation in SMM mit 1,2 M NaCl. Die Zellen erschienen sehr deformiert und gewunden, wie es zuvor bereits beschrieben wurde (Abbildung 12 und 13). Interessanterweise kehrte nach 20-stündiger Inkubation der charakteristische, stäbchenförmige Phänotyp von *B. subtilis*, der zu Beginn ebenfalls beobachtet werden konnte, zurück. Sowohl die *yqiHIK* Einzelmutante KFB8 als auch die Quintupel-Mutante KFB37 zeigten ein identisches Verhalten, wie es bereits für den Wildtyp beschrieben wurde (Abbildung 19).



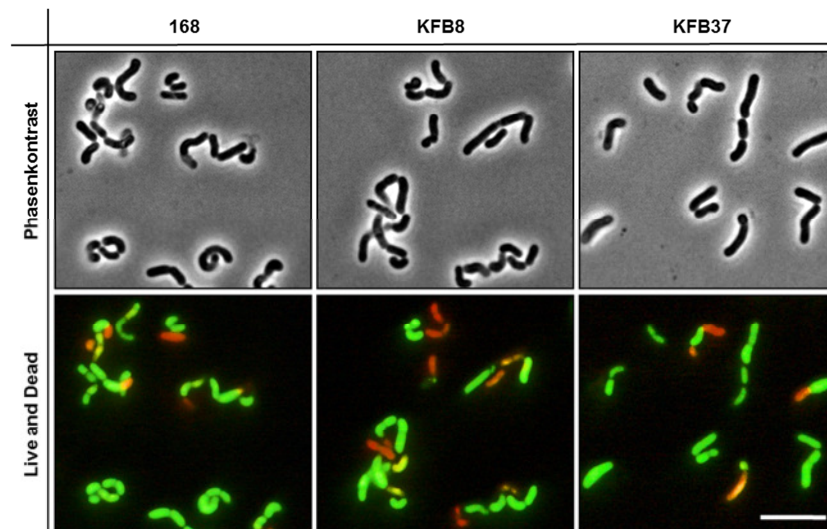
**Abb. 19: Analyse der morphologischen Veränderungen von *B. subtilis* Zellen entlang der Wachstumskurve.**

Der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 (WT 168), der Stamm KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) sowie der Stamm KFB37 ( $\Delta yqiHIK$ ,  $\Delta lytC$ ,  $\Delta cwIC$ ,  $\Delta cwID$ ,  $\Delta yrvJ$ ) wurden zu diversen Zeitpunkten mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert (1.000-fache Vergrößerung). Die Stämme wurden in SMM-1,2 M NaCl kultiviert. Die Probenentnahme erfolgte entlang der Wachstumskurve (Abbildung 18 B). Der Größenstandard entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Dieses Experiment zeigt, dass die durch hohe Salinitäten induzierten morphologischen Veränderungen eine Wachstumsphasen-Abhängigkeit besitzen. Während der Adaptationsphase beginnen die Zellen sich zu deformieren, was ein Maximum erreicht, bevor die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase eintreten. Wachsen die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt exponentiell, bildet sich der Phänotyp schrittweise zurück zu dem stäbchenförmigen Phänotyp den *B. subtilis* unter normalen physiologischen Bedingungen besitzt.

Um zu überprüfen, ob die gewundenen und deformierten *B. subtilis* Zellen noch leben oder bereits abgestorben sind, wurde eine „Live and Dead Staining“ Prozedur angewandt. Dafür wurden die Proben, die nach 12 Stunden der Inkubation den hyperosmotischen Kulturen entnommen worden waren (Abbildung 18 B und Abbildung 19) mit einem Gemisch aus zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, SYTO 9 und Propidiumiodid, gefärbt. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass SYTO 9 die Nukleinsäuren aller Zellen anfärben kann, wohingegen Propidiumiodid nur Nukleinsäuren von Zellen markiert, die eine zerstörte Zellmembran aufweisen. Eine defekte bzw. intakte Zellmembran gilt dabei als ein Indiz für die Lebensfähigkeit einer Zelle. Zellen, die eine intakte

Zytoplasmamembran besitzen, fluoreszieren grün. Zellen mit defekter Membran werden von Propidiumiodid penetriert und rot gefärbt. Das Ergebnis des „Live and Dead Staining“ ist in Abbildung 20 dargestellt. Interessanterweise erscheinen die Mehrzahl der morphologisch veränderten Zellen des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes, der *yqiHIK* Mutante KFB8 sowie der Fünffach-Mutante KFB37, grünfluoreszierend. Das wiederum bedeutet, dass trotz der drastischen Deformation der Zellhülle, die Zytoplasmamembran immer noch intakt ist und die Zellen somit als lebend eingestuft werden können.



**Abb. 20: „Live and Dead Staining“ hyperosmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen.**

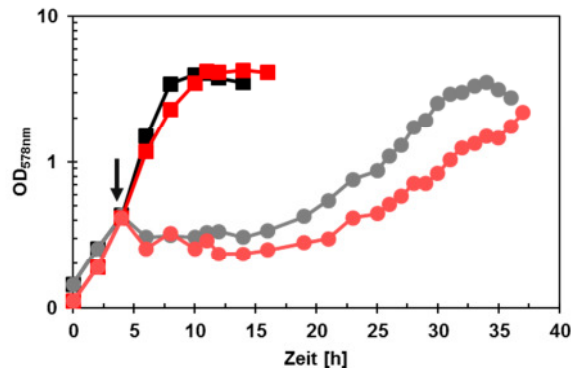
Dargestellt sind Phasenkontrast- sowie Fluoreszenz-Aufnahmen der Stämme 168, KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) sowie KFB37 ( $\Delta yqiHIK$ ,  $\Delta lytC$ ,  $\Delta cwIC$ ,  $\Delta cwID$ ,  $\Delta yrvJ$ ). Die verschiedenen Stämme wurden nach 12-stündiger Inkubation in SMM-1,2 M NaCl mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 9 sowie Propidiumiodid gefärbt und mikroskopisch analysiert. Der Größenstandard entspricht 5  $\mu\text{m}$ . Die Mikroskopie-Bilder wurden bei einer 1.000-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Durch die Beobachtung, dass die deformierten Zellen immer noch lebensfähig sind, wird die These unterstützt, dass es sich hierbei um eine weitere Facette der Adaptation von *B. subtilis* an hyperosmotische Bedingungen handeln könnte. Die Zellwandhydrolasen Yqil, LytC, CwIC, CwID sowie YrvJ sind jedoch nicht maßgeblich an der Restrukturierung der Zellwand beteiligt.

### 1.5.1. Physiologische Auswirkungen eines Up-Shock auf die Deletionsmutante KFB8

Neben dem kontinuierlichen Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen ist es ebenfalls möglich, das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* nach einer plötzlichen Erhöhung der externen Osmolarität zu analysieren. Diese Situation wird als „Up-Shock“ bezeichnet. Um das Wachstumsverhalten der *yqiHIK* Mutante KFB8 im Vergleich zum Wildtyp nach einem Up-Shock zu untersuchen, wurden zunächst Vorkulturen in SMM kultiviert. Wie bereits zuvor beschrieben, wurden die SMM-Hauptkulturen mit diesen Vorkulturen angeimpft ( $\text{OD}_{578}$  0,1). Die Kulturen des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes sowie die des Stammes KFB8 wurden in SMM bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,5 bei 37°C kultiviert. Nach dem Erreichen der Ziel-OD wurde die Osmolarität der Kulturen auf 1,2 M NaCl erhöht. Der Wachstumsertrag wurde daraufhin stündlich gemessen. Als Kontrollen dienten Kulturen deren Osmolarität nicht erhöht wurde, sondern die unter normalen physiologischen Bedingungen weiter wuchsen (Abbildung 21). Auch die plötzliche Erhöhung der externen Osmolarität auf 1,2 M NaCl führte zu einem Wachstumsdefizit der

*yqiHIK* Mutante KFB8. Der Wachstumsertrag näherte sich letztlich dem des *B. subtilis* Wildtyps an. Das Wachstum schien jedoch durch eine längere Zeitspanne während der Adaptation erneut verzögert.



**Abb. 21: Analyse des Wachstumsverhaltens des Stammes KFB8 nach der plötzlichen Erhöhung der externen Osmolarität.**

Der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 (●) sowie die *yqiHIK* Deletionsmutante KFB8 (●) wurden in SMM kultiviert. Nach Erreichen der Ziel-OD ( $OD_{578}$  0,5) wurde die Osmolarität plötzlich erhöht (1,2 M NaCl). Der Up-Schock ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zur Kontrolle wurde das Wachstum der Stämme 168 (■) und KFB8 (■) in SMM auch ohne die Zugabe von NaCl verfolgt.

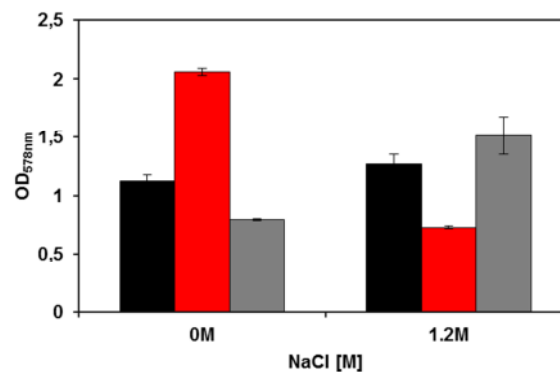
### 1.5.2. Die Komplementation des *yqiHIK* Phänotyps

In den bisher vorgestellten Wachstumsexperimenten konnte sowohl unter normalen physiologischen als auch unter hyperosmotischen Bedingungen ein Wachstumsdefizit der *yqiHIK* Deletionsmutante im Vergleich zum *B. subtilis* Wildtyp-Stamm aufgezeigt werden (Abbildung 18). Dieses Wachstumsverhalten zeigte sich ebenfalls in den anderen Zellwandhydrolase-Mutanten (Abbildung 17).

Um nun zu beweisen, dass der Phänotyp der *yqiHIK* Mutante durch die Expression des Gens *yqil* allein komplementiert werden kann und somit der Wachstumsphänotyp der *yqiHIK* Mutante nicht durch die beiden anderen Gene der Transkriptionseinheit hervorgerufen wird, wurde der vollständige Leserahmen des *yqil* Gens in den Vektor pGP382 kloniert. In diesem System wird die Expression des *yqil* Gens durch den konstitutiven *degQ<sub>36</sub>* Promotor gewährleistet (114). Dieses Plasmid wurde im Anschluss in die Deletionsmutante KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) transformiert. Der daraus resultierende Stamm trägt die Bezeichnung KFB8 (pKF51).

In einem weiteren Experiment wurden sowohl der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm sowie die Deletionsmutante KFB8 als auch der Komplementations-Stamm entsprechend der oben beschriebenen Prozedur in SMM sowie in SMM-1,2 M NaCl kultiviert. Die optische Dichte der Kulturen wurde nach 20-stündiger Inkubation bei 37°C photometrisch ( $OD_{578}$ ) bestimmt (Abbildung 22). Die Wachstumserträge des *B. subtilis* Wildtyps sowie die des Komplementations-Stammes waren nahezu identisch. In SMM ohne Zugabe von NaCl befanden sich die Stämme bereits in der Absterbephase und hatten eine  $OD_{578}$  von ca. 1. Die Mutante KFB8 hingegen wies noch eine  $OD_{578}$  von ca. 2 auf, was erneut die Verzögerung im Wachstum widerspiegelt. Unter hohen salinen Bedingungen besaß sowohl der Wildtyp als auch der Komplementations-Stamm einen deutlichen Wachstumsvorsprung im

Vergleich zur Deletionsmutante KFB8. Dieses Experiment wies daraufhin, dass durch die Expression des *yqil* Gens allein der Phänotyp der *yqiHIK* Mutante komplementiert werden kann. Das Fehlen der Zellwandhydrolase Yqil ist daher ausschließlich für das Wachstumsdefizit unter den gewählten Bedingungen verantwortlich.



**Abb. 22: Komplementation des Phänotyps der Mutante KFB8 durch die Synthese von Yqil.**

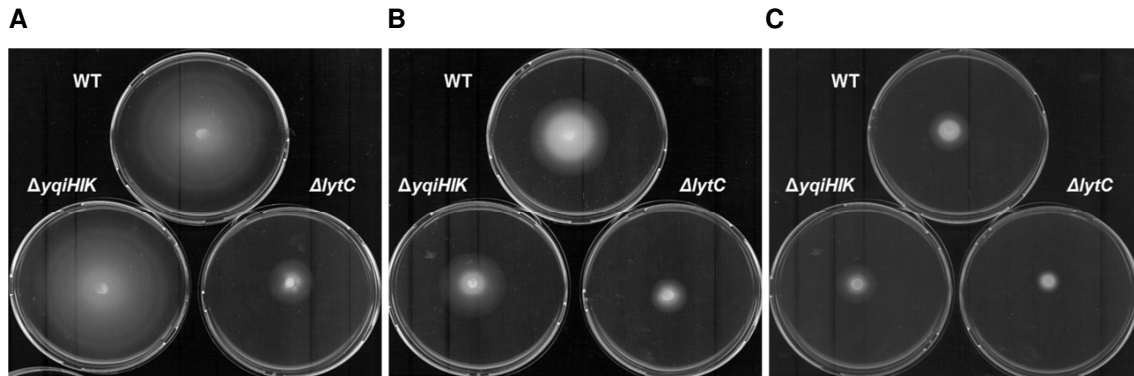
Die *B. subtilis* Stämme 168 (■), KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) (■) sowie der Komplementations-Stamm KFB8 (pKF51) (■) wurden in SMM mit sowie ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl für 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 578 nm bestimmt. Die Expression des Gens *yqil* unterliegt der Kontrolle des konstitutiven Promotors  $degQ_{36}$  (114).

In vorherigen Versuchen wurde bereits mit anderen Systemen versucht die *yqiHIK* Mutante zu komplementieren. Dabei wurde die Expression des *yqil* Gens durch einen IPTG induzierbaren ( $P_{spank}$ ) Promotor gesteuert. Diese Versuche blieben jedoch erfolglos, da die Transkriptmenge nicht ausreichend war, um eine entsprechende Konzentration des Zielproteins zu synthetisieren, die für eine Komplementation nötig gewesen wären (Abbildung 56 im Anhang). Der konstitutive  $degQ_{36}$  Promotor ist jedoch in der Lage die Expression des *yqil* Gens auf ein Niveau zu heben, wie es in der Wildtyp-Zelle der Fall zu sein scheint.

### 1.5.3. Die Motilität der *yqiHIK* Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt

Zellwandhydrolasen, die sogenannten Autolysine, sind an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt (258, 280). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass beispielsweise das Autolysin LytC eine wichtige Rolle bei der Motilität in *B. subtilis* spielt (161). Um nun einen möglichen Einfluss der *yqiHIK* Deletion auf das Schwimmverhalten von *B. subtilis* zu untersuchen, wurde ein Motilitätstest auf Schwärmeplatten durchgeführt. Für diesen Assay wurde der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm, die Deletionsmutante *yqiHIK* (KFB8) sowie die Mutante KFB9 ( $\Delta lytC$ ) in SMM bis zur exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  0,5-1) inkubiert. Mit Hilfe dieser Kulturen wurden SMM-Softagarplatten inokuliert, indem 5  $\mu$ l der Proben auf die Mitte einer Platte aufgebracht wurden, wobei die verwendeten SMM-Softagarplatten in ihrer NaCl-Konzentration (0 M NaCl, 0,5 M NaCl, 0,7 M NaCl) variierten. Die Platten wurden anschließend für 24 bis 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Länge der Inkubationszeit richtete sich nach Höhe der verwendeten NaCl-Konzentration, da das Wachstum der Zellen unterschiedlich stark durch die verschiedenen NaCl-Konzentrationen beeinflusst wurde (265). Nach der Inkubation wurde der Durchmesser der Ausbreitungszone bestimmt. Das Ergebnis des

Motilitätstests ist Abbildung 23 zu entnehmen. Das Schwärmeverhalten des Stammes KFB8 war identisch mit dem des *B. subtilis* Wildtyps. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass steigende NaCl-Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Motilität von *B. subtilis* haben. Als Kontrolle diente der Stamm KFB9 ( $\Delta lytC$ ), der ein deutliches Defizit im Schwimmverhalten aufzeigte, wie es zuvor bereits unter normalen physiologischen Bedingungen beschrieben wurde (161).



**Abb. 23: Analyse des Schwärmeverhaltens von *B. subtilis* auf Softagarplatten.**

Dargestellt ist das Schwärmeverhalten des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes sowie der Stämme KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) und KFB9 ( $\Delta lytC$ ) auf SMM-Softagarplatten (0,3 % Agar (w/v)) mit diversen NaCl-Konzentrationen. (A) 0 M NaCl. (B) 0,5 M NaCl. (C) 0,7 M NaCl. Die Inkubation der Platten erfolgte für 1-2 Tage bei 37 °C.

Durch die Redundanz der Autolysine wurden ebenfalls die konstruierten Einzel-, Tripel-, Quadrupel- sowie die Quintupel- Mutanten (Tabelle 3) auf ihr Schwärmeverhalten hin überprüft. Dabei zeigte sich, dass einerseits die Deletion des *yqiHIK* Operons in keinem Fall zu einer Einschränkung der Motilität führt. Andererseits konnten keine additiven Effekte, bezogen auf das Schwimmverhalten der *lytC* Mutante, die mit weiteren Deletionen gekoppelt wurde, festgestellt werden. Dieser Versuch demonstrierte, dass die Beeinträchtigung im Schwimmverhalten der hier getesteten Stämme allein durch das Vorhandensein der *LytC* Amidase aus *B. subtilis* bestimmt wird (Abbildung 57 im Anhang). Die Einschränkung der Motilität unter hyperosmotischen Bedingungen wurde bereits durch Steil *et al.* beschrieben (265). Interessanterweise zeigte sich in den Transkriptom-Analysen salzgestresster Zellen, dass eine Repression von Genen stattfindet, die eine Rolle bei der Motilität in *B. subtilis* spielen. Ein wichtiges Beispiel stellt hierbei die Repression des Flagellen-Gens *hag* dar. Die Expression des *hag* Gens unterliegt dabei dem alternativen Sigmafaktor  $\sigma^D$ , wie es auch für die Amidase *LytC* beschrieben wurde (44).

### 1.6. Die osmotische Induktion des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*

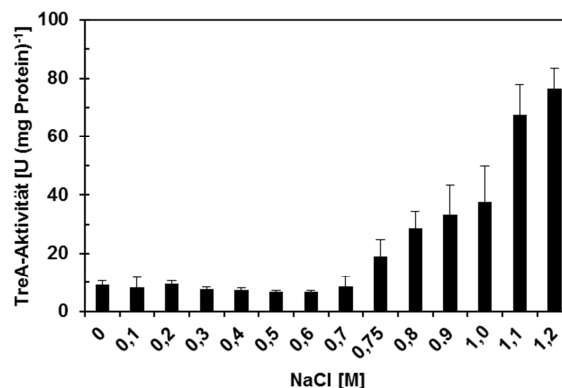
Durch die Transkriptom-Analyse salzgestresster *B. subtilis* Zellen (265) konnten die Gene *yqiH* sowie *yqiI*, als Gene identifiziert werden, deren Expression durch eine hohe NaCl-Konzentration (1,2 M NaCl) im Medium induziert werden konnte. Im Folgenden sollte die osmotische Regulation genauer studiert werden. Hierzu wurde eine *yqiH-treA* Reporterfusion konstruiert. Zu diesem Zweck wurde ein 300 bp langes DNA-Fragment (Abbildung 26 A) der *yqiHIK* Promotorregion an ein promotorloses *treA* Gen fusioniert. Das 300 bp lange DNA-Fragment definiert sich durch eine 257 bp Region, die stromaufwärts des Translationsstartes des *yqiH* Gens liegt sowie durch 43 bp der *yqiH* kodierenden



Region. Dieses Fusionskonstrukt wurde über homologe Rekombination in den *amyE* Lokus von *B. subtilis* inseriert und liegt somit stabil kodiert auf dem Chromosom in Einzelkopie vor. Der daraus entstandene Stamm wurde KFB15 genannt.

Um die Expression des *yqiHIK* Genclusters in Abhängigkeit steigender NaCl-Konzentrationen zu bestimmen, wurde der Stamm KFB15 in SMM mit verschiedenen Salinitäten (0 M NaCl-1,2 M NaCl) kultiviert. Die Kulturen wurden bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  1-1,5) inkubiert. Im Anschluss daran wurden Aliquots dieser Kulturen entnommen und zur Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt. Die Aktivität der salztoleranten Phospho- $\alpha$ -(1,1)-Glukosidase (TreA) (91, 109) dient dabei als Maß für die *yqiHIK* Promotoraktivität.

Wie Abbildung 24 entnommen werden kann, liegt bis zur NaCl-Konzentration von 0,7 M ein Basalniveau der *yqiH-treA*-Fusion vor (ca. 10 Units). Erst wenn diese NaCl-Konzentration überschritten wurde, stieg die TreA-Aktivität an. Dabei stellte sich ein Höchstmaß der gemessenen TreA-Aktivität (ca. 70 Units) bei einer Salz-Konzentration von 1,2 M NaCl ein. Somit findet eine ca. siebenfache Induktion des *yqiHIK* Operons unter hochosmolaren Bedingungen statt. Die Tatsache, dass die Expression des Genclusters nur bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen induziert wird, stellt ein völlig neues Expressionsmuster sowie eine Besonderheit unter allen bisher charakterisierten salzinduzierten Genen von *B. subtilis* dar (32, 262). Basierend auf diesem Ergebnis wurden nun alle weiteren Reporterstudien bei einer NaCl-Konzentration von 1,2 M durchgeführt.



**Abb. 24: Die Expression des *yqiHIK* Genclusters in Abhängigkeit steigender NaCl-Konzentrationen.**

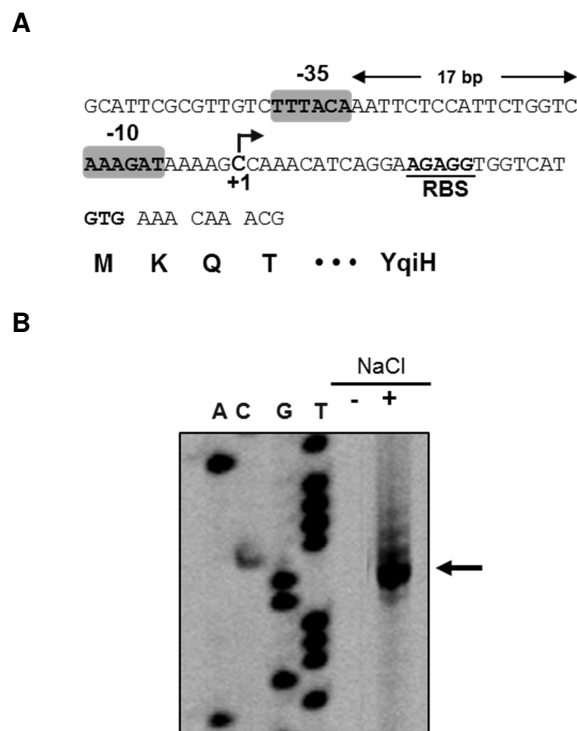
Gezeigt ist die Bestimmung der TreA-Aktivität des Stammes KFB15 (*yqiH-treA*) in SMM-Kulturen mit diversen NaCl-Konzentrationen (0 M NaCl-1,2 M NaCl).

### 1.6.1. Primer-Extension-Analyse: Die Bestimmung des SigA-abhängigen Promotors des *yqiHIK* Operons

Zur Bestimmung des Promotors des *yqiHIK* Genclusters aus *B. subtilis*, der für die Salzinduktion des Operons verantwortlich ist, wurde eine Primer-Extension-Analyse durchgeführt. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus iso- sowie hyperosmotischen Kulturen präpariert, die bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  1) inkubiert worden waren. In diesen Stämmen wurde die Transkriptmenge zusätzlich dadurch erhöht, dass die Promotorregion auf einem Plasmid kodiert vorlag (pKF16). Nach der Reversen Transkription der Gesamt-RNA, die durch die Anlagerung eines

fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids (DY-781) in cDNA umgeschrieben werden konnte, wurde das Primer-Extension Produkt elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Primer-Extension-Reaktion identifizierte eine *yqiH*K spezifische mRNA, die darüber hinaus osmotisch induziert wurde (Abbildung 25 B). Unter normalen physiologischen Bedingungen konnte kein Transkript determiniert werden. Das 5' Ende der spezifischen mRNA befindet sich 25 bp vor dem GTG, dem vorhergesagten Translationsstart des *yqiH* Gens, und beginnt mit einem C (+1) (Abbildung 25 A). Die Inspektion der DNA-Sequenz offenbarte eine -35 sowie -10 Region, die der Gruppe der SigA-abhängigen Promotoren aus *B. subtilis* zugeordnet werden kann. Die konservierten Regionen sind durch einen 17 bp Spacer voneinander getrennt (Abbildung 25 A), der bevorzugt bei SigA Promotoren vorzufinden ist. SigA ist der „Housekeeping“ Sigmafaktor in *B. subtilis* (110).



**Abb. 25: Die Identifizierung des *yqiH*K Transkriptionsstartpunktes.**

(A) Abgebildet ist die Nukleotidsequenz der *yqiH*K Promotorregion. Die -35 und -10 Region werden durch 17 Basenpaare voneinander getrennt und sind grau unterlegt. Die Ribosomenbindestelle (RBS) sowie der Translationsstart des *yqiH* Gens sind gekennzeichnet. Der Transkriptionsstart (+1) ist mit einem Pfeil markiert. (B) Primer-Extension-Analyse des *yqiH*K Transkriptes. Dafür wurde Gesamt-RNA aus dem *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 (pKF16) präpariert, der zuvor unter iso- sowie hyperosmotischen Bedingungen kultiviert worden war.

### 1.6.2. Zielgerichtete Mutagenese des salzabhängigen SigA-Promotors des *yqiH*K Genclusters

Der Vergleich des osmotisch induzierten *yqiH*K Promotors mit der Konsensus-Sequenz von SigA-abhängigen Promotoren (110) zeigte einige Sequenzabweichungen (Tabelle 6). Daher wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, in der schrittweise die abweichenden Basenpaare des *yqiH*K Promotors durch solche ersetzt wurden, die der SigA-Konsensus-Sequenz entsprachen. Die Mutationen wurden in die Plasmide pKF13 bzw. pKF18 eingebracht. Diese wurden im Anschluss in den *amyE* Locus auf dem *B. subtilis* Chromosom inseriert. Die daraus resultierenden Stämme sind in Tabelle 7 aufgelistet. Der *yqiH-treA* Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 wurde zusammen mit den anderen

Fusionsstämmen, die Veränderungen in der *yqiHIK* Promotorregion beinhalteten, in SMM mit sowie ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert. Aliquots dieser Kulturen ( $OD_{578}$  1-1,5) wurden für die Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt (Tabelle 7).

Ein charakteristisches und funktionell wichtiges Motiv in der -10 Region von SigA-Promotoren stellt das hochkonservierte „invariante T“ dar (110). Dies konnte in dieser Mutagenesestudie bestätigt werden, denn ein Basenpaaraustausch von T/A zu G/C (KFB33) führte zum vollständigen Verlust der Promotoraktivität. In einem weiteren Schritt wurde eine Mutation in die -35 Region eingebracht. Der daraus resultierende Stamm (KFB24) beinhaltete nun eine perfekte -35 Region. Die Bestimmung der TreA-Aktivität zeigte, dass das Expressionsniveau dadurch leicht anstieg. Die -10 Region variierte an drei Positionen im Vergleich zu der Konsensus-Sequenz. Die Einbringung einer Punktmutation in die -10 Region (KFB20) erhöhte die Induktion unter hochosmolaren Bedingungen von Faktor 10 (KFB15) auf Faktor 18. Die Veränderung der -10 Region in allen drei abweichenden Positionen (KFB32) hatte eine drastische Auswirkung auf die absolute TreA-Aktivität unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Transkription stieg von ca. 50 Units (KFB15) auf ungefähr 400 Units an. Diese Verbesserung in der -10 Region führte jedoch ebenfalls dazu, dass das Basalniveau der *yqiHIK* Transkription unter normalen physiologischen Bedingungen enorm anstieg. Die osmotische Induktion sank somit von Faktor 10 (KFB15) auf Faktor 2 (KFB32) ab. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte bei der Zusammenführung einer perfekten -35 und -10 Region beobachtet werden (KFB34). Auch hierbei wurde der Promotor konstitutiv und verlief auf einem sehr hohen Expressionsniveau im Vergleich zur Wildtyp-Fusion.

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die viele SigA-Promotoren beinhalten, ist das sogenannte TG-Motiv an der Position -16 (110, 283), welches eine wichtige Rolle bei der Funktion als auch bei der Stärke des Promotors spielt. Der *yqiHIK* Promotor besitzt an der Position -16 eine GT-Basenabfolge, an Stelle des bekannten TG-Motivs. Somit wurde in einer weiteren Mutagenese dieses charakteristische Sequenzmotiv eingeführt (KFB25). Das Expressionsmuster dieser Promotorvariante war ähnlich zu dem der Wildtyp-Fusion (KFB15). Die osmotische Induktion konnte von Faktor 10 auf 14 verbessert werden. Die Expression unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) versechsfachte sich, wohingegen ein moderater Anstieg im Basalniveau (0 M NaCl) des Promotors (Faktor 4) zu verzeichnen war. Wie vermutet, führte die Kombination der Mutationen in der -35, -16 sowie -10 Region dazu, dass der nun perfekte SigA-Promotor osmotisch nicht mehr länger induziert werden konnte. Die TreA-Aktivität erreichte vergleichbare Werte, wie es zuvor in den Stämmen KFB32 und KFB34 beobachtet werden konnte. Die Einbringung des TG-Motivs konnte somit die absolute Expressionsstärke nicht noch weiter verbessern.

Diese Mutagenesestudie hat gezeigt, dass Verbesserungen in der Promotorsequenz hin zum SigA-Konsensus das Expressionsniveau des *yqiHIK* Operons deutlich verstärkt. Wird die Promotorregion jedoch dahingehend verändert, dass diese nun vollständig mit der SigA-Konsensus-Sequenz übereinstimmt, ist die Expression des Genclusters nicht länger osmotisch induzierbar. Die Abweichungen in der *yqiHIK* Promotorsequenz dienen folglich dazu, die Expression des Operons unter normalen physiologischen Bedingungen niedrig zu halten. Ein weiteres Indiz dafür, dass den synthetisierten Proteinen vor allem unter hochosmolaren Bedingungen eine wichtige Rolle zukommt.

**Tabelle 7:** Zielgerichtete Mutagenese des SigA-abhängigen *yqiHIK* Promotors

Stamm	Plasmid	<i>yqiHIK</i> Promotor-Sequenz			TreA-Aktivität [U (mg Protein) <sup>-1</sup> ]		Induktions- Faktor**
		-35	-16	-10	0 M NaCl	1,2 M NaCl	
		<b>TTGACA</b>	<b>TG</b>	<b>TATAAT</b> *			
KFB15	pKF13	TTTACA	GT	AAAGAT	5 ± 1	49 ± 7	9,8
KFB33	pKF25	TT <u>G</u> ACA	GT	AAAGAG <u>G</u>	3 ± 1	3 ± 1	1,0
KFB24	pKF18	TTTACA	GT	AAAGAT	7 ± 1	81 ± 11	11,6
KFB26	pKF20	TTTACA	GT	AAA <u>A</u> AT	5 ± 1	91 ± 3	18,2
KFB32	pKF24	TTTACA	GT	<u>TATA</u> AT	230 ± 11	399 ± 21	1,7
KFB34	pKF26	TT <u>G</u> ACA	GT	<u>TATA</u> AT	304 ± 3	429 ± 27	1,4
KFB25	pKF19	TTTACA	<u>TG</u>	AAAGAT	20 ± 8	286 ± 8	14,3
KFB35	pKF27	TT <u>G</u> ACA	<u>TG</u>	<u>TATA</u> AT	264 ± 20	314 ± 2	1,2

\*Konsensus-Sequenz SigA-Promotoren (110)

\*\*Induktionsfaktor (0 M NaCl → 1,2 M NaCl)

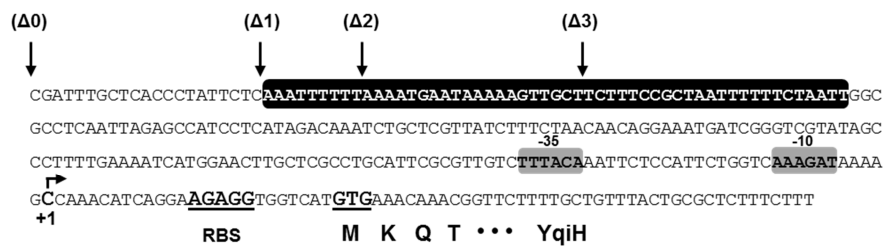
### 1.6.3. Der Einfluss der stromaufwärts gelegenen AT-reichen Region auf die osmotische Induzierbarkeit des *yqiHIK* Operons

Ein 300 bp langes DNA-Fragment der *yqiHIK* Promotorregion wurde für die TreA-Reportergenstudien eingesetzt (Abbildung 26 A). Bei der Inspektion dieses DNA-Fragmentes fiel eine 53 bp lange AT-reiche Region auf, die ca. 180 bp stromaufwärts der -35 Region lokalisiert ist. Es stellte sich nun die Frage, ob diese AT-reiche Region wichtig für die Regulation des *yqiHIK* Operons ist. Eine solche Region könnte eine Bindestelle für ein mögliches Regulator-Protein sein, oder auch einen topologischen Effekt auf den Promotor und somit auf dessen Aktivität haben. Um diese Frage zu beantworten, wurden Verkürzungen des 300 bp langen DNA-Fragmentes vorgenommen, die zum einen direkt zu Beginn der AT-reichen Region ( $\Delta 1$ ) und zum anderen innerhalb der AT-reichen Region ( $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$ ) lagen (Abbildung 26 A).

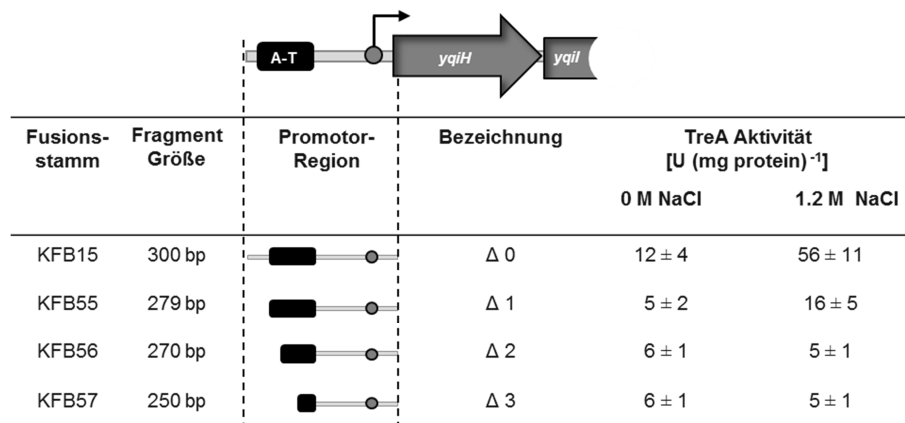
Der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 ( $\Delta 0$ ) sowie die Stämme KFB55 ( $\Delta 1$ ), KFB56 ( $\Delta 2$ ) sowie KFB57 ( $\Delta 3$ ) wurden in SMM sowie in SMM mit 1,2 M NaCl bis zum Eintritt in die mittlere exponentielle Wachstumsphase ( $OD_{578}$  1-1,5) kultiviert. Daraufhin wurden Aliquots entnommen und in den TreA-Enzymtest eingesetzt (Abbildung 26 B). Bereits in der ersten Verkürzung ( $\Delta 1$ ) konnte ein Abfall der *yqiHIK* Promotoraktivität unter hyperosmotischen Bedingungen um den Faktor 3,5 beobachtet werden. Nichtsdestotrotz konnte die Expression des Operons weiterhin osmotisch induziert werden. Die Analyse der zweiten und dritten Verkürzung ( $\Delta 2$ ;  $\Delta 03$ ) ergab, dass der *yqiHIK* Promotor nicht länger

durch die Erhöhung der Osmolarität (1,2 M NaCl) induziert werden konnte. Das Expressionsniveau sank auf ein Basalniveau (0 M NaCl), welches unter dem des Wildtyp-Promotors lag ( $\Delta 0$ ).

**A**



**B**



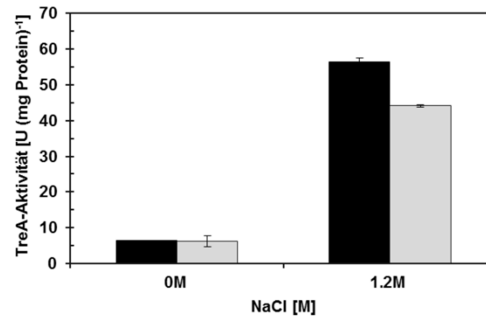
**Abb. 26: Die Lage der AT-reichen Region in der *yqiH* Promotorregion.**

(A) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Fragmentes der *yqiH-treA* Fusion ( $\Delta 0$ ). Die Lage der Verkürzungen  $\Delta 1-3$  sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die AT-reiche Region wird durch eine schwarze Box markiert. Darüber hinaus sind sowohl Transkriptions- sowie Translationsstart, die -35 sowie -10 Region, als auch die Ribosomenbindestelle (RBS) hervorgehoben. (B) Tabellarische Darstellung der *yqiH* Promotoraktivität der Stämme KFB15 sowie KFB55-KFB57 unter iso- als auch hyperosmotischen Bedingungen.

Die Verkürzungen in der *yqiH* Promotorregion zeigten, dass eine AT-reiche Region, die ca. 180 bp stromaufwärts der -35 Region des Operons lokalisiert ist, erforderlich für die Aktivität und osmotische Induktion des *yqiH* Genclusters in *B. subtilis* ist.

Ein mögliches regulatorisches Protein, welches in der Lage ist, AT-reiche Regionen zu binden, stellte das Rok Protein aus *B. subtilis* dar. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Smits und Grossman (260) erwähnt die funktionelle Ähnlichkeit des Rok Proteins zu dem H-NS Protein aus *E. coli*. Bei dem H-NS Protein handelt es sich um ein an Nukleinsäuren assoziiertes Protein, was in *E. coli* an der Regulation von osmotisch induzierbaren Genen beteiligt ist (60). Das H-NS Protein ist dabei an einer Repression der Gene unter normalen physiologischen Bedingungen beteiligt (199). Ein Beispiel dafür ist das *proU* Operon aus *E. coli* (176). Um einen möglichen Einfluss des Rok Proteins auf die Expression des *yqiH* Operons zu testen, wurde ein Stamm konstruiert (KFB47), in dem die *yqiH-treA* Fusion in einen  $\Delta rok$  Hintergrund eingebracht wurde. Die korrespondierende *yqiH-treA* Wildtyp-Fusion wurde aufgrund von überlappenden Antibiotikaresistenzen in einen anderen Stamm-Hintergrund eingebracht (Tabelle 3). Der daraus resultierende Stamm wurde KFB41 genannt. Analog zu den vorherigen TreA-Enzym-Assays wurden auch in diesem Fall die Stämme KFB41 sowie KFB47 in SMM sowie SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert, anschließend aliquotiert und in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt. Das

Expressionsmuster beider Stämme war unter iso- als auch hyperosmotischen Bedingungen nahezu identisch (Abbildung 27). Eine Beteiligung des Rok Proteins an der Regulation des *yqiHIK* Operons kann somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 27: Der Ausschluss der Beteiligung des Rok Proteins auf die Regulation des *yqiHIK* Operons.**

Gezeigt ist die TreA-Aktivität der Stämme KFB41 (■) sowie KFB47 ( $\Delta rok$ ; ▒), die zuvor in SMM mit sowie ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert worden war.

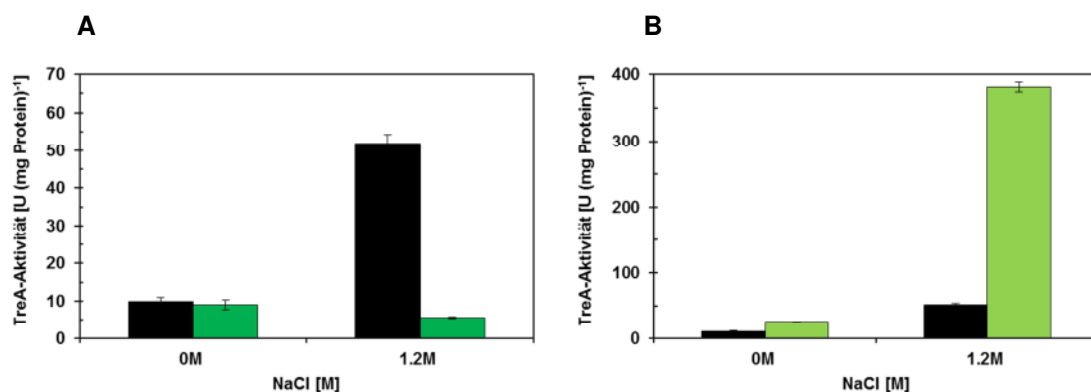
#### 1.6.4. Der Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU auf die Regulation des *yqiHIK* Operons unter hyperosmotischen Bedingungen

Durch die gezielte Regulation der zahlreichen salzinduzierten Gene in *B. subtilis* stellte sich die Frage, ob ein osmotisches Signal existent ist, das die *B. subtilis* Zelle dazu veranlasst unter hyperosmotischen Bedingungen eine selektive Genexpression vorzunehmen. In diesem Zusammenhang werden oftmals Zwei-Komponenten-Systeme (ZKS) diskutiert, die für die Erkennung eines spezifischen Umweltreizes sowie der Übersetzung und Weiterleitung eines solchen Signals verantwortlich sind (71, 145, 210). Interessanterweise konnte in den Transkriptom-Analysen salzgestresster *B. subtilis* Zellen das ZKS DegS/DegU als salzinduziert identifiziert werden (155, 265). Dieses ZKS spielt eine wichtige Rolle sowohl bei dem Prozess der Kompetenz als auch bei der Sekretion von extrazellulären Proteasen in *B. subtilis* (56, 71, 153, 198). Bei diesem Signaltransduktions-System stellt das DegU Protein den Antwort-Regulator dar, der mit der im Zytoplasma lokalisierten Histidin-Kinase DegS korrespondiert (56, 71, 198). Das DegU Protein kann dabei, unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus, sowohl als Repressor als auch als Aktivator fungieren, indem dieser Transkriptionsfaktor eine AT-reiche Sequenzabfolge auf der DNA erkennt (52, 57, 98, 196, 198, 212).

Die Analyse der Verkürzungen in der AT-reichen Region stromaufwärts zu *yqiHIK* suggerierte, dass direkt zu Beginn der AT-reichen Region ein kritischer Sequenzbereich liegen muss, da bereits die erste Verkürzung Einfluss auf das Expressionsniveau des Operons nahm (Abbildung 26). Eine genaue Inspektion der AT-reichen Region offenbarte eine gegenläufige Sequenzwiederholung „inverted repeat“ (ATTTT-N<sub>1</sub>-TAAAA) als auch eine direkte Sequenzwiederholung „direct repeat“ (TAAAA-N<sub>4</sub>-TAAAA). Diese Art der Bindemotive können von dem Response-Regulators DegU aus *B. subtilis* erkannt und gebunden werden (140, 219, 257).

Um nun zu testen, ob das DegS/DegU ZKS einen Einfluss auf das Expressionsmuster des *yqiHIK* Operons hat, wurde die *yqiH-treA* Reportergenfusion in einen  $\Delta degSU$  Hintergrund eingebracht. Sowohl der korrespondierende Stamm KFB72 als auch der Stamm KFB41 wurden in SMM sowie in

SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Die Messung der TreA-Aktivität zeigte, dass das *yqiHIK* Gencluster nicht mehr osmotisch induziert werden konnte (Abbildung 28 A). Die Transkriptmenge bewegte sich dabei nur noch auf einem Basalniveau. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass das DegS/DegU ZKS maßgeblich an der osmotisch induzierten Expression des *yqiHIK* Genclusters beteiligt ist. Darüber hinaus scheint der Antwort-Regulator DegU als Aktivator zu fungieren, sobald dieser in seiner phosphorylierten Form vorliegt. Diese Vermutung konnte durch die Analyse einer DegU-Hypermutable untermauert werden (Abbildung 28 B). In dieser Mutante ist die Phosphorylierung des Regulators weitaus stabiler, da DegS diesen nicht mehr dephosphorylieren kann (111, 153, 177). Die osmotische Induktion (1,2 M NaCl) stieg in dieser Mutante um den Faktor 7 an, wohingegen unter normalen physiologischen Bedingungen nur ein geringer Anstieg der Expression um den Faktor 2,5 zu verzeichnen war.



**Abb. 28: Die *yqiHIK* Promotoraktivität und deren Abhängigkeit von dem Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU.**

Gezeigt ist die TreA-Aktivität der *yqiH-treA* Wildtyp-Fusion (KFB41; ■) sowie der Fusionsstämme (A) KFB72 ( $\Delta degSU$ ; ■) und (B) KFB78 (*degU32* (Hy); ■). Die Bestimmung der TreA-Aktivität erfolgte in SMM sowie in SMM-1,2 M NaCl.

## 2. Die Repression des *yqiHIK* Genclusters durch diverse kompatible Solute

Um unter hyperosmotischen Bedingungen den Ausstrom von Wasser aus der Zelle zu verhindern, stellt die Akkumulation von kompatiblen Soluten eine zentrale Anpassungsstrategie zur Osmoprotektion in *B. subtilis* dar (30, 139, 228). Aus energetischen Gründen wird dabei die Aufnahme dieser Osmoprotektiva, sofern diese extrazellulär vorhanden sind, der *de novo* Synthese vorgezogen. In *B. subtilis* konnten zahlreiche Solute als osmotisch protektiv charakterisiert werden (21, 32, 37, 131, 139, 152, 201). In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass beispielsweise das prominente kompatible Solut Glycin-Betain eine Repression auf die Transkription zahlreicher salzinduzierter Gene ausübt (E. Bremer, persönliche Mitteilung).

Um nun einen möglichen Einfluss gängiger Osmoprotektiva auf die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons zu untersuchen, wurde der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 unter normalen physiologischen sowie hyperosmotischen Bedingungen in SMM kultiviert. Zusätzlich wurden zu den SMM-1,2 M NaCl Kulturen jeweils diverse kompatible Solute (Abbildung 29) mit einer Endkonzentration von 1 mM dazu gegeben. Nach Erreichen der mittleren-exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  1-1,5), wurden Proben dieser Kulturen entnommen und anschließend in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt. Das

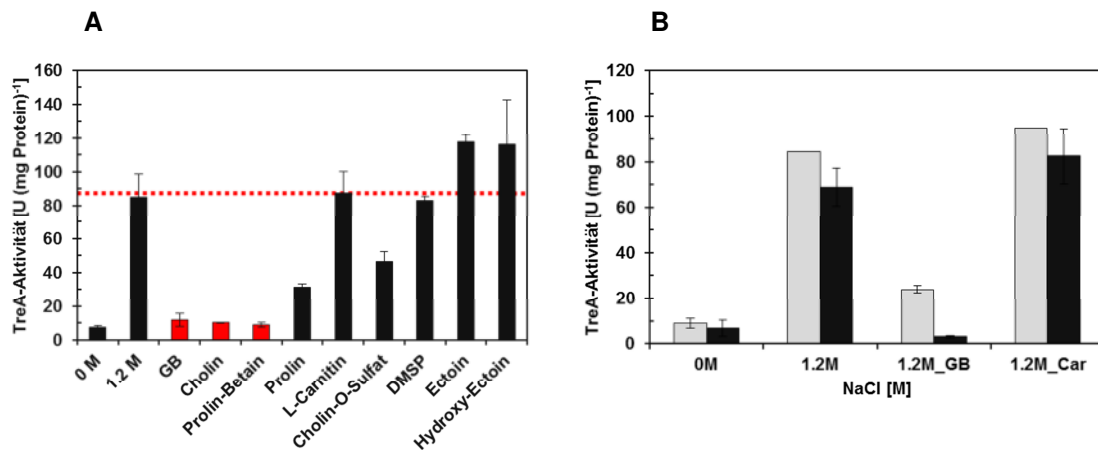
Ergebnis ist in Abbildung 29 A dargestellt. Als Kontrollen dienten in diesem Versuch die Transkriptionslevel des nicht-induzierten (0 M SMM) sowie des induzierten (1,2 M NaCl) *yqiHIK* Promotors. Interessanterweise zeigte sich, dass die Zugabe von Glycin-Betain, Cholin und Prolin-Betain dazu führt, dass die Expression des Operons auf einem Basalniveau verbleibt, wie es unter normalen physiologischen Bedingungen (0 M NaCl) beobachtet werden kann. Die Zugabe der kompatiblen Solute Prolin sowie Cholin-O-Sulfat führten ebenfalls zu einer Repression der Promotoraktivität, wobei immer noch eine osmotische Induktion des *yqiHIK* Genclusters zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu standen die Osmoprotektiva L-Carnitin, DMSP, Ectoin sowie Hydroxy-Ectoin, die keinen Einfluss auf die Transkription des Operons hatten.

Dieses Expressionsmuster kann nicht durch die strukturellen Unterschiede sowie die Gruppierung der Osmolyte in unterschiedliche chemische Klassen erklärt werden (Abbildung 58 im Anhang).

Es stellte sich nun die Frage, ob dieses Phänomen darin begründet liegt, dass die verwendeten Solute unterschiedliche osmoprotektive Eigenschaften besitzen. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Schwerpunkt auf zwei der kompatiblen Solute gelegt. Einerseits wurde Glycin-Betain verwendet, welches zur Repression des *yqiHIK* Operons führt und andererseits wurde L-Carnitin ausgewählt, dass wiederum keinen Einfluss auf die Expression des Operon hat. In *B. subtilis* kann Glycin-Betain über drei verschiedene Aufnahmesysteme in die Zelle gelangen. Zum einen über die ABC-Transporter OpuA und OpuC sowie zum anderen über den sekundären Transporter OpuD (132, 138). L-Carnitin hingegen kann nur über den ABC-Transporter OpuC in die Zelle transportiert werden (131). Daher wurde ein Stamm konstruiert (KFB23), in dem alle Aufnahmesysteme ( $\Delta opuA$ ,  $\Delta opuD$ ) mit Ausnahme des OpuC Transporters ( $opuC^+$ ), deletiert wurden. Zusätzlich trägt dieser Stamm die *yqiH-treA* Fusion. Die kinetischen Parameter für die Aufnahme über das OpuC-Transportsystem sind für die Solute Glycin-Betain ( $K_M$  6  $\mu\text{M}$ ;  $V_{\max}$  65  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  Protein) und L-Carnitin ( $K_M$  6  $\mu\text{M}$ ;  $V_{\max}$  71,5  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  Protein) nahezu identisch (131, 132).

Zum Vergleich der Transkriptionslevel wurde der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 sowie der Stamm KFB23 in SMM, SMM-1,2 M NaCl oder SMM-1,2 M NaCl-Glycin-Betain/L-Carnitin kultiviert, um Aliquots dieser Kulturen in den TreA-Aktivitätstest einzusetzen. Die Expressionsniveaus waren unter allen getesteten physiologischen Bedingungen vergleichbar (Abbildung 29 B). Der größte Unterschied der Transkriptionslevel konnte jedoch bei der Zugabe von Glycin-Betain observiert werden. Die Repression der Expression war in der Wildtyp-Fusion KFB15, der Stamm in dem alle Glycin-Betain Transporter intakt sind, stärker, verglichen mit der des  $opuC^+$  Stammes KFB23 mit eingeschränkter Glycin-Betain Aufnahmekapazität.





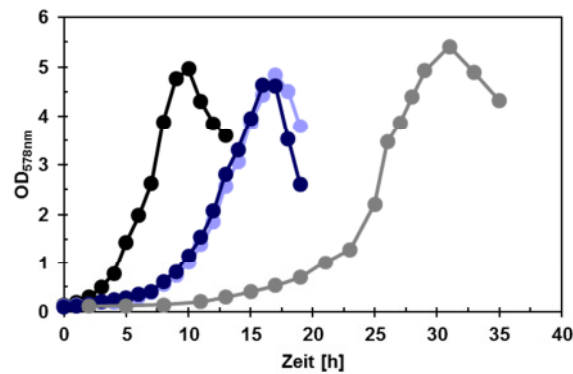
**Abb. 29: Die Repression des *yqiHIK* Genclusters durch diverse compatible Solute.**

(A) Darstellung der *yqiHIK* Promotoraktivität (KFB15) in SMM (0 M NaCl), SMM-1,2 M NaCl und in SMM-1,2 M NaCl sowie der Zugabe von diversen kompatiblen Soluten (1 mM): Glycin-Betain (GB), Cholin, Prolin-Betain, L-Carnitin, Cholin-O-Sulfat, DMSP, Ectoin und Hydroxy-Ectoin. Die rote Linie markiert die Induktion der Expression des Operons unter hyperosmotischen Bedingungen. (B) Vergleich der TreA-Aktivität der Fusionsstämme KFB15 (■) sowie KFB23 (*opuC*<sup>+</sup>) (◐) in SMM (0 M NaCl), SMM-1,2 M NaCl, SMM-1,2 M NaCl (+ Glycin-Betain (GB)) und SMM-1,2 M NaCl (+ L-Carnitin (Car)).

Für die Wildtyp-Fusion *yqiH-treA* konnte gezeigt werden, dass bereits eine Glycin-Betain Konzentration von 250  $\mu$ M ausreichend ist, um die *yqiHIK* Promotoraktivität deutlich zu reduzieren (Abbildung 59 im Anhang).

## 2.1. Analyse der osmoprotektiven Eigenschaften von Glycin-Betain und L-Carnitin

Mit Hilfe des Stammes KFB23 (*OpuA*<sup>-</sup>, *OpuC*<sup>+</sup>, *OpuD*<sup>-</sup>) sollten die osmoprotektiven Eigenschaften der ausgewählten Solute untersucht werden. Dafür wurde das Wachstum von KFB23 unter verschiedenen physiologischen Bedingungen (SMM, SMM-1,2 M NaCl oder SMM-1,2 M NaCl-Glycin-Betain/L-Carnitin) analysiert, indem der Wachstumsertrag in Form der OD<sub>578</sub> stündlich verfolgt wurde (Abbildung 30). Unter isoosmotischen Bedingungen (0 M NaCl) trat der Stamm KFB23 nach achtstündiger Inkubation in die stationäre Phase ein. Die stationäre Phase wurde in SMM-1,2 M NaCl jedoch erst nach ca. 30 Stunden der Inkubation erreicht. Die Zugabe von Glycin-Betain als auch L-Carnitin führte gleichermaßen zu einer Wachstumsverbesserung des Stammes KFB23 bei hohen Salinitäten. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die kompatiblen Solute Glycin-Betain als auch L-Carnitin gleichwertig als osmotische Schutzsubstanzen fungieren. Dies kann somit nicht die Ursache für den unterschiedlichen Einfluss auf die Promotoraktivität des Operons *yqiHIK* sein.

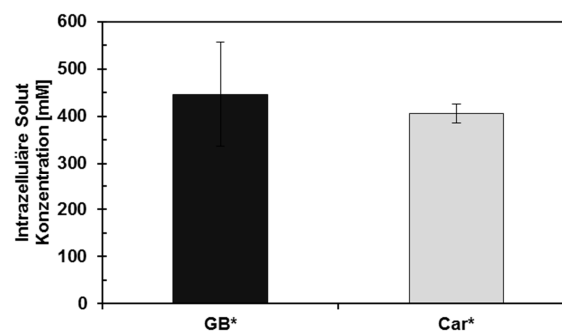


**Abb. 30: Wachstumsanalyse des Stammes KFB23.**

Der Fusionsstamm KFB23 wurde in SMM (●), SMM-1,2 M NaCl (●) sowie in SMM-1,2 M NaCl und der Zugabe von Glycin-Betain (●) oder L-Carnitin (●) kultiviert. Die Ermittlung der optischen Dichte ( $OD_{578}$ ) erfolgte stündlich.

## 2.2. Die Bestimmung des intrazellulären Solut-Pools für Glycin-Betain und L-Carnitin

Da bisher ausgeschlossen werden konnte, dass unterschiedliche osmoprotektive Eigenschaften der Solute eine Auswirkung auf das Transkriptionsverhalten des *yqiHIK* Operons haben, sollte nun überprüft werden, ob ein Unterschied in der intrazellulären Solut-Konzentration eine Ursache für dieses Phänomen darstellen könnte. Dafür wurde der Wildtyp-Stamm 168 in SMM unter hyperosmotischen (1,2 M NaCl) bis zu einer  $OD_{578}$  von 1-1,5 kultiviert. Zusätzlich wurden diese Kulturen, mit einem Gemisch aus nicht radioaktiv markiertem sowie [ $1-^{14}C$ ]-markiertem Glycin-Betain und [ $1-^{14}C$ ]-markiertem L-Carnitin supplementiert. Die intrazelluläre Bestimmung der Solut Konzentrationen erfolgte durch die Quantifizierung der Szintillation (122). Für die kompatiblen Solute Glycin-Betain und L-Carnitin konnte ein nahezu identischer intrazellulärer Pool ermittelt werden (Abbildung 31). Die Konzentration variierte von ca. 400-450 mM.



**Abb. 31: Die intrazelluläre Konzentration der kompatiblen Solute Glycin-Betain und L-Carnitin.**

Dargestellt ist die Bestimmung des intrazellulären Solut-Pools der radioaktiv markierten Osmolyte [ $1-^{14}C$ ] Glycin-Betain (GB\*) und [ $1-^{14}C$ ] L-Carnitin (Car\*) durch die Quantifizierung der Szintillation (122) in dem *B. subtilis* Wildtyp-Stamm, der in SMM mit 1,2 M NaCl in Anwesenheit von Glycin-Betain oder L-Carnitin kultiviert worden war.

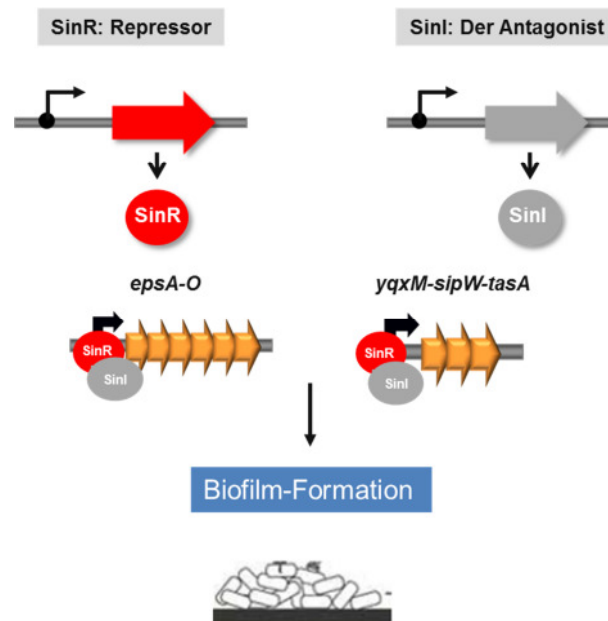
Ein Unterschied in der zytoplasmatischen Konzentration der kompatiblen Solute konnte somit ebenfalls als mögliche Ursache ausgeschlossen werden. Aufgrund dessen ist bisher unklar, welcher zelluläre Mechanismus hinter dem unterschiedlichen Einfluss der Osmoprotektiva auf die Expression des *yqiHIK* Operons steckt. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss des DNA-Supercoilings als

generellen Transkriptionsfaktor diskutiert (276). Es ist bekannt, dass eine erhöhte Salinität einen Einfluss auf das Supercoiling-Verhalten von DNA hat, denn unter diesen Bedingungen liegt die DNA negativ-spiralisiert vor (7, 115, 150). Demnach ist denkbar, dass die kompatiblen Solute direkt die Transkription beeinflussen, in dem sie das Supercoiling-Verhalten modifizieren. Kompatible Solute sind in der Lage Makromoleküle in ihrer natürlichen Konformation zu stabilisieren (30, 139, 228). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Solute unterschiedliche Fähigkeiten haben, als Schutzsubstanzen zu fungieren. Ein gutes Osmoprotektivum kann gleichzeitig eine schlechte Hitze- oder auch Kälte-Protektion hervorrufen (31, 117, 122). Diese differenzierten Eigenschaften könnten demnach die Unterschiede auf das Transkriptionsverhalten von osmotisch induzierten Genen erklären. Somit bleibt die Frage offen, ob eine generelle Struktureigenschaft existiert, die in der Promotorregion salzinduzierter Gene vorhanden ist, und welche auf die Anwesenheit von kompatiblen Soluten antwortet.

### **3. Biofilm-Formation vs. Sporulation: Der Beitrag des *yqiHIK* Genclusters zu diesen Differenzierungsprozessen**

Die erste Passage des Kapitels Ergebnisse, behandelte die funktionelle und physiologische Charakterisierung der N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase Yqil aus *B. subtilis*. Ein Schwerpunkt dieser Passage umfasste dabei die salzinduzierte Expression des *yqiHIK* Operons, wobei ein Einfluss des Zwei-Komponenten Systems DegS/DegU (71, 198) postuliert wurde (Abbildung 28).

In den kürzlich veröffentlichten Tiling-Array-Daten (205) wurde neben der Salzinduktion, auch eine Repression des *yqiHIK* Operons unter biofilminduzierenden Bedingungen festgestellt. Im weiteren Verlauf wird nun ein möglicher Einfluss des Repressor-Proteins SinR auf die Regulation des Genclusters vorgestellt (Abbildung 32). Das *sinR* Gen kodiert für einen Master-Regulator, der in *B. subtilis* für die Biofilm-Formation verantwortlich ist (42, 135, 167). Das SinR Protein reprimiert dabei zwei Gencluster, die für die extrazelluläre Matrix-Formation notwendig sind, und deren Expression somit eine Voraussetzung für die Biofilm-Formation in *B. subtilis* darstellt (46, 135). Der Antagonist des SinR Proteins ist das SinI Protein (135), welches in der Lage ist, an SinR zu binden und dadurch das Biofilm-Verhalten zu fördern (Abbildung 32).



**Abb. 32: Der Biofilm-Repressor SinR aus *B. subtilis*.**

Dargestellt ist die Regulation des Repressor-Proteins SinR. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an die Promotoren der beiden Transkriptionseinheiten *epsA-O* sowie *yqxM-sipW-tasA*, wobei deren Expression dadurch gehindert wird. Nach der Synthese des Antagonisten SinI bindet dieser an SinR, was wiederum mit einer Konformationsänderung von Seiten des Repressors SinR einhergeht. Es folgt die Expression der Gencluster *epsA-O* sowie *yqxM-sipW-tasA*, die für die Matrix-bildenden Proteine kodieren. Dies stellt eine Voraussetzung für die Biofilm-Formation in *B. subtilis* dar.

Die Gene *sinR* sowie *sinI* gehören darüber hinaus zum Spo0A- als auch AbrB-Regulon (47, 193). Der Regulator Spo0A stellt dabei den Master-Regulator der Sporulation in *B. subtilis* dar (116, 193, 227). Diese beiden Differenzierungs-Prozesse, die Biofilm-Formation zum einen als auch der Eintritt in die Sporulation zum anderen, sind in *B. subtilis* regulatorisch eng miteinander vernetzt (4, 81, 99). Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit ebenfalls ein möglicher Einfluss der YqiHIK Proteine auf den Sporulationsprozess vorgestellt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Zellwandhydrolasen eine wichtige Funktion bei der Sporulation als auch Keimung spielen. Diese Enzyme sind für eine Umstrukturierung der Zellwand bzw. des Sporen-Peptidoglykans verantwortlich (194, 258, 280).

### 3.1. Der Einfluss des Repressor-Proteins SinR auf die Expression des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*

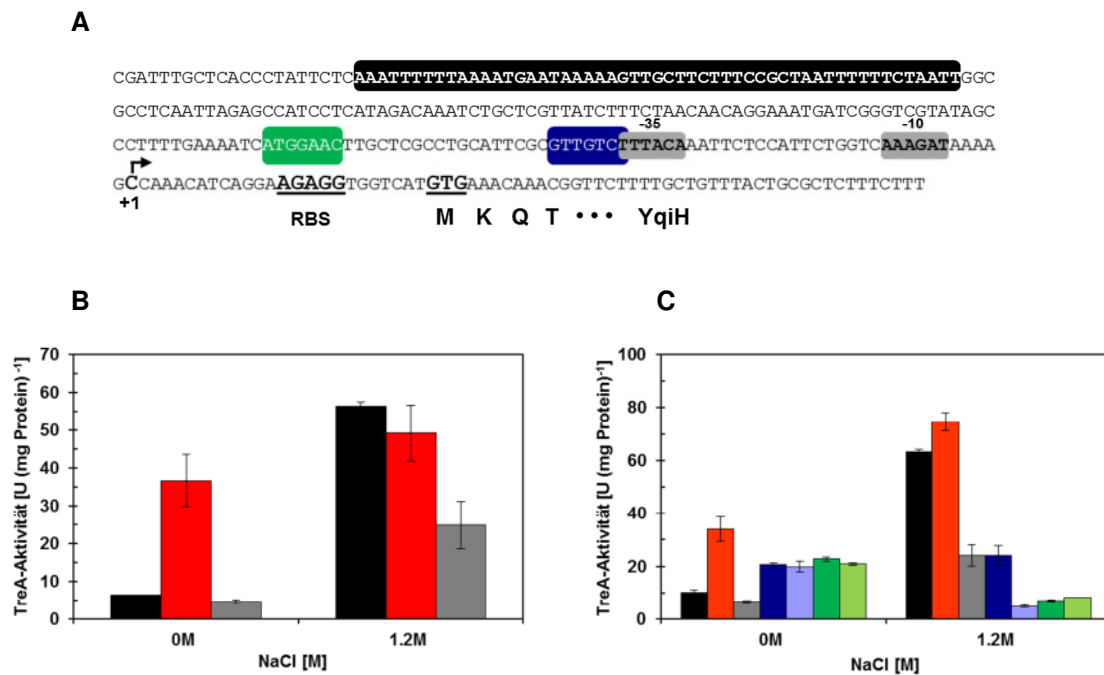
Um einen möglichen Einfluss des SinR Proteins auf die Regulation des *yqiHIK* Operons zu untersuchen, wurde das *yqiH-treA* Reporter-genkonstrukt in verschiedene *B. subtilis* Stammhintergründe ( $\Delta sinR$ ;  $\Delta sinI$ ) eingebracht. Der Wildtyp-Fusionsstamm KFB41 sowie die Stämme KFB42 ( $\Delta sinR$ ) und KFB46 ( $\Delta sinI$ ) wurden in SMM sowie SMM-1,2 M NaCl kultiviert und bei Eintritt in die mittlere exponentielle Phase ( $OD_{578}$  1-1,5) geerntet und in den TreA-Enzym-Assay eingesetzt. Das daraus bestimmte Expressionslevel (ca. 50 bis 60 Units) der Stämme KFB41 und KFB42 war unter hyperosmotischen Bedingungen, nahezu identisch (Abbildung 33 B). Der Stamm KFB46 zeigte jedoch unter diesen Bedingungen ein Expressionsniveau, was nur bei ca. 25 Units lag und somit genau die Hälfte von dem darstellte, was bei den anderen Stämmen beobachtet werden konnte.

Überraschenderweise konnte unter isoosmotischen Bedingungen (0 M NaCl) ein enormer Anstieg der Expression des *yqiHIK* Operons, in dem SinR Deletionsstamm KFB42 festgestellt werden (Abbildung 33 B). Dieses Expressionsmuster suggeriert, dass das SinR Protein an die Promotorregion des *yqiHIK* Genclusters binden könnte und somit eine Expression unter normalen physiologischen Bedingungen verhindert. Die Expression kann jedoch unter hyperosmotischen Bedingungen induziert werden. Die SinR-abhängige Expression unterliegt dabei ebenfalls der Kontrolle des Antagonisten SinI. Fehlt dieses Protein kann weder unter iso- als auch unter hyperosmotischen Bedingungen das Wildtyp-Expressionsniveau erreicht werden.

Das Repressor-Protein SinR ist ein DNA-Bindeprotein, welches eine spezifische Sequenzabfolge (**GTTCTCT**) auf der DNA erkennt (46, 50, 135). Dabei konnten verschiedene Bindemuster typisiert werden. Zum einen kann der SinR Transkriptionsfaktor ein Einzelmotiv oder in einer gegenläufigen Weise angeordnetes Motiv erkennen. Des Weiteren kann eine Tandem-Sequenz erkannt und gebunden werden (50). Die Inspektion der *yqiHIK* Promotorregion (Abbildung 33 A) ergab, dass in der Tat zwei mögliche SinR Bindestellen existieren. Eine davon überlappt direkt mit der -35 Region des SigA-abhängigen *yqiHIK* Promotors während die andere 18 bp stromaufwärts zu dieser überlappenden Binderegion liegt.

Zur Untersuchung der möglichen SinR Binderegionen wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, die eine SinR Bindung an die DNA verhindern sollte. Dabei wurden jeweils zwei verschiedene Mutagenese-Ansätze verfolgt. Als Bindestelle I wurde die mit der -35 Region überlappende Binderegion definiert. In dieser wurde in einem ersten Schritt das Konsensus-Motiv (**GTTGTCT** → **CCCGTCT**) modifiziert und der daraus resultierende Stamm KFB65 genannt. In einer zweiten Mutagenese wurde nahezu das gesamte Motiv (**GTTGTCT** → **AAAAAAT**) (KFB69) mit Ausnahme von dem Basenpaar (T/A), das zur -35 Region gehört, verändert. Die stromaufwärts gelegene Region wurde als Bindestelle II definiert. Dabei wurde das Motiv zum einen in eine AT-reiche Region umgewandelt (**ATGGAAC** → **AAAAAAA**) und zum anderen zu einem GC-reichen Abschnitt (**ATGGAAC** → **CCCCCCC**) mutagenisiert. Die daraus entstandenen Stämme wurden KFB70 sowie KFB71 genannt.

In einem daran anschließenden Versuch wurden die TreA-Fusionsstämme KFB41, KFB42 ( $\Delta sinR$ ), KFB46 ( $\Delta sinI$ ), KFB65 und KFB69 (Mutagenese der Bindestelle I) sowie KFB70 und KFB71 (Mutagenese der Bindestelle II) in SMM und SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Nach einer analogen Vorgehensweise wurden Aliquots zur Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 C dargestellt. Die Stämme KFB41, KFB42 ( $\Delta sinR$ ) sowie KFB46 ( $\Delta sinI$ ) zeigten ein Expressionsmuster, wie es bereits zuvor (Abbildung 33 B) beschrieben wurde. Interessanterweise konnte eine Induktion der Expression des *yqiHIK* Operons unter normalen physiologischen Bedingungen in allen Stämmen festgestellt werden, in denen die putativen SinR Bindemotive (I und II) mutagenisiert worden waren. Das Expressionsniveau lag dabei jedoch unter dem, in einer SinR Deletionsmutante (KFB42) ermittelten Niveaus (Abbildung 33 C).



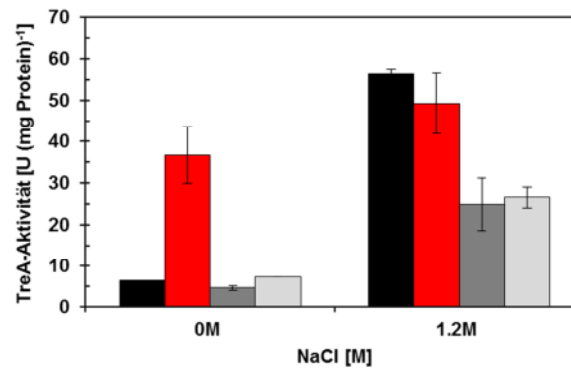
**Abb. 33: Die Identifikation zweier möglicher SinR Bindestellen in der regulatorischen Region des *yqiHIK* Operons.**

(A) Darstellung der DNA-Sequenz des 300 bp langen Fragments der *yqiH-treA* Wildtyp-Fusion (KFB41). Eine putative SinR Bindestelle (Bindestelle I) überlappt mit der -35 Region des SigA-Promotors und ist mit einer blauen Box gekennzeichnet. Eine weitere putative SinR Erkennungssequenz (Bindestelle II) ist durch eine grüne Box hervorgehoben. (B) und (C) Abgebildet ist die TreA-Aktivität von *B. subtilis* Kulturen, die zuvor in SMM-0 M NaCl sowie in SMM-1,2 M NaCl kultiviert worden waren. Folgende Fusionsstämme wurden verwendet: KFB41 (■), KFB42 ( $\Delta sinR$ ) (■), KFB46 ( $\Delta sinI$ ) (■), KFB65 (■) und KFB69 (■) (Mutagenese des Bindemotivs I) sowie KFB70 (■) und KFB71 (■) (Mutagenese des Bindemotivs II).

Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die zwei identifizierten DNA-Regionen, SinR-Bindestellen sein könnten. Die Tatsache, dass unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) eine Repression der *yqiHIK* Expression in den Stämmen KFB69-KFB71 (Mutagenese der Bindemotive I und II) stattgefunden hat, könnte wiederum an der räumlichen Nähe der SinR-Binderegionen zur -35 Region des salzinduzierten SigA-abhängigen Promotors liegen.

### 3.1.1. Der Repressor AbrB besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Expression des *yqiHIK* Genclusters

Wie bereits erwähnt wurde, ist das *sinI* Gen Bestandteil des AbrB-Regulons (47). Die Expression dieses Gens wird dabei zunächst durch den Repressor AbrB verhindert. Aufgrund dessen sollte ein möglicher Effekt des AbrB-Proteins auf die Aktivität des *yqiHIK* Genclusters untersucht werden. Dafür wurde erneut das *yqiH-treA*-Fusionskonstrukt in einen AbrB Deletionsstamm eingebracht (KFB43) und die TreA-Aktivität unter den herkömmlichen physiologischen Bedingungen (0 M sowie 1,2 M NaCl) untersucht. Als Kontrollen dienten dabei der Wildtyp-Fusionsstamm KFB41 sowie die Stämme KFB42 ( $\Delta sinR$ ) und KFB46 ( $\Delta sinI$ ). In einer AbrB Deletionsmutante konnte das *yqiHIK* Gencluster in SMM mit 1,2 M NaCl nicht mehr voll induziert werden (Abbildung 34).



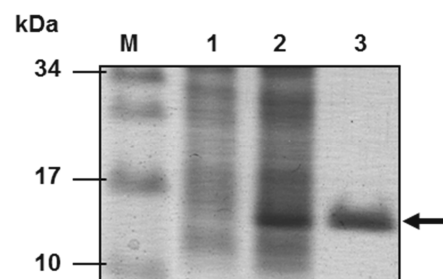
**Abb. 34: Der Einfluss des Regulators AbrB auf die Expression des *yqiHIK* Genclusters.**

Gezeigt ist die Determination der TreA-Aktivität der Stämme KFB41 (Wildtyp-Fusion; ■), KFB42 ( $\Delta sinR$ ; ■), KFB43 ( $\Delta abrB$ ; ■) und KFB46 ( $\Delta sinI$ ; ■). Die Expression der *yqiH-treA* Fusion wurde von Zellen bestimmt, die in SMM ohne die Zugabe von NaCl sowie in SMM mit 1,2 M NaCl gewachsen worden waren.

Analog zu SinR erkennt der Transkriptionsfaktor AbrB ebenfalls ein spezifisches Bindemotiv auf der DNA (47). Da eine solche AbrB Binderegion nicht in *yqiHIK* Promotornähe nach Inspektion der DNA identifiziert werden konnte, scheint der Effekt des AbrB Proteins auf die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons, indirekt zu sein.

### 3.1.2. Heterologe Produktion und Reinigung des SinR Proteins aus *B. subtilis*

In den TreA-Enzym-Assays konnte eindeutig eine Beteiligung des SinR Proteins an der Aktivität des *yqiHIK* Promotors aufgezeigt werden. Durch die Mutagenese-Studien konnten zwei putative Bindestellen des SinR Proteins identifiziert werden. Um nun diese DNA-Regionen zweifelsfrei als SinR-Bindestellen zu definieren, müsste eine DNA-Bandshift-Analyse durchgeführt werden. Eine solche Analyse konnte im Zusammenhang mit meiner Dissertation aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden. Eine Voraussetzung stellt jedoch die Reinigung des SinR Proteins dar. Dafür wurde der Leserahmen des *sinR* Gens in einen Vektor kloniert, der eine N-terminale Strep-TagII Fusion ermöglicht. Das daraus entstandene Plasmid pKF44 wurde daraufhin in *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL transformiert. Die heterologe Expression des *sinR* Gens erfolgte nach Induktion durch AHT. Anschließend wurde das synthetisierte Protein mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie gereinigt. Die erfolgreiche Produktion sowie der Reinheitsgrad des SinR Proteins sind Abbildung 35 zu entnehmen.



**Abb. 35: Heterologe Expression und Reinigung des SinR Proteins aus *B. subtilis*.**

Abgebildet ist die SDS-PAGE nach der Coomassie-Färbung. Der *E. coli* Zellextrakt wurde vor (Spur 1) sowie nach der Induktion (Spur 2) der SinR-Expression mittels AHT aufgetragen. Die Reinigung des SinR Proteins (6 µg) erfolgte mit Hilfe der Strep-Tag Affinitätschromatographie (Spur 3).

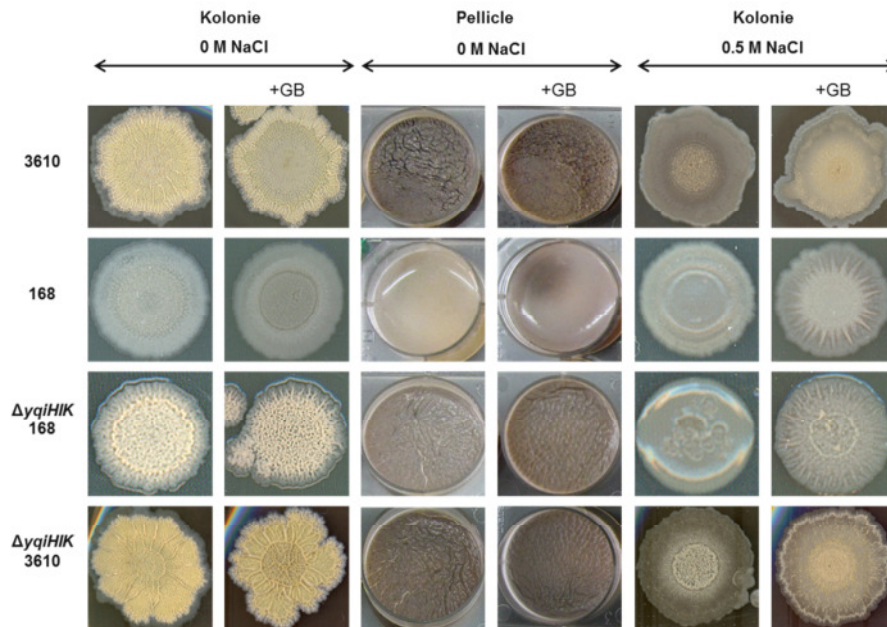
**3.1.3. Physiologische Untersuchung der Deletionsmutante KFB8 zum Biofilm-Verhalten in *B. subtilis***

Das SinR Protein ist ein Master-Regulator für die Biofilm-Formation in *B. subtilis* (42, 135, 167). Nachdem ein Einfluss dieses Proteins auf die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons bestimmt werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob die Deletionsmutante KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) einen Phänotyp unter biofilminduzierenden Bedingungen besitzt. Dabei ist anzumerken, dass der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168, in dessen Hintergrund die Gendeletion eingebracht wurde, nicht in der Lage ist, einen robusten Biofilm auszubilden (187). Bei diesem Wildtyp-Stamm handelt es sich um eine domestizierte Wildtyp-Linie, die über Jahrzehnte hinweg als Laborstamm verwendet wurde und dadurch die Fähigkeit verloren hat, einen Biofilm auszubilden. Dafür konnten kürzlich durch McLoon *et al.* (187) die genauen Mutationen aufgedeckt werden, die für dieses Verhalten verantwortlich sind. Um das Biofilm-Verhalten in *B. subtilis* zu studieren, wurde der Stamm NCIB3610 (3610) verwendet, bei dem es sich um einen „wilden“ Vorläufer zu dem Stamm 168 handelt (27, 136).

Experimentell kann die Biofilm-Formation sowohl auf Kolonie-Ebene analysiert werden, als auch durch die Ausbildung eines Pellicles in einer Flüssigkultur (27). Um das Biofilm-Verhalten der Deletionsmutante zu studieren, wurde die *yqiHIK* Deletion zusätzlich in den Wildtyp-Hintergrund des Stammes 3610 eingebracht (KFB66). Die beiden Wildtyp-Stämme 168 und 3610 sowie die Deletionsmutanten KFB8 und KFB66, wurden in einer LB-Kultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit diesen Kulturen zum einen MSgg-Agarplatten sowie andererseits MSgg-Flüssigkulturen inokuliert. Diese wurden daraufhin für mindestens drei Tage bei 30°C inkubiert. Das Biofilm-Verhalten wurde zusätzlich noch in Abhängigkeit steigender NaCl-Konzentrationen (0 M NaCl → 0,5 M NaCl) sowie auf den Einfluss des Osmoprotektivum Glycin-Betain (GB) hin untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt. Der Stamm 3610 zeigte auf MSgg-Agarplatten (0 M NaCl) die typischen lammellenartigen Oberflächenstrukturen, die charakteristisch für die Biofilm-Formation in *B. subtilis* sind. Darüber hinaus konnten auch in MSgg-Flüssigkulturen die Ausbildung von Pellicles beobachtet werden. Diese dünne, membranartige Schicht bildet sich direkt an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft aus (27, 167). Überraschenderweise blieb die Ausbildung eines Biofilm auf MSgg-Agarplatten, denen 0,5 M NaCl zugesetzt wurde, aus. Unter allen getesteten Bedingungen zeigte jedoch das kompatible Solut Glycin-Betain einen positiven bzw. stabilisierenden Effekt auf die Biofilm-Formation in *B. subtilis*. Besonders deutlich konnte dies auf den NaCl-Platten beobachtet werden. Der Stamm 3610 konnte nach Zugabe von Glycin-Betain die Ausbildung des Biofilms verbessern, obwohl die Robustheit des Biofilms, den unter isoosmotischen Bedingungen nicht gleich kommt. Der Wildtyp-Stamm 168 war wie erwartet nicht in der Lage, einen Biofilm unter den hier getesteten Bedingungen auszubilden. Auch die Zugabe von Glycin-Betain hatte keinen Einfluss darauf. In dem Deletionsstamm KFB66 konnte ein identisches Biofilm-Verhalten beobachtet werden, wie es bereits für den Wildtyp-Stamm 3610 beschrieben wurde. Die Deletion des *yqiHIK* Operons zeigte in diesem Stamm-Hintergrund keinen Einfluss auf das Biofilm-Verhalten.



Interessanterweise war die *yqiHIK* Deletionsmutante in der Lage sowohl auf Fest- sowie Flüssigmedium einen Biofilm auszubilden, obwohl diese Deletion in den 168 Stamm-Hintergrund eingebracht worden war. Das Biofilm-Verhalten war analog zu dem der Stämme 3610 sowie KFB66, wobei die Robustheit des Biofilms dem des Stammes 3610 nicht gleich kommt.



**Abb. 36: Die Analyse des Biofilm-Verhaltens der Deletionsmutante KFB8.**

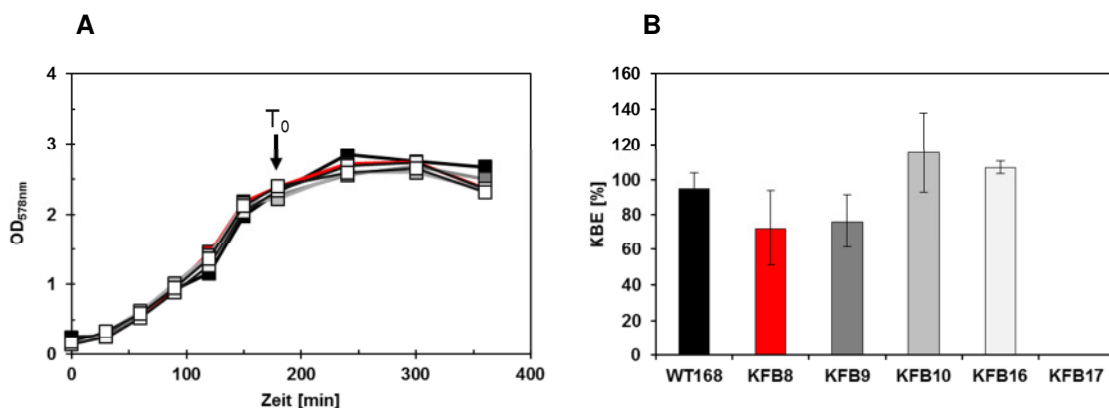
Dargestellt ist das Biofilm-Verhalten der *B. subtilis* Stämme 3610, 168, KFB8 (168  $\Delta yqiHIK$ ) und KFB66 (3610  $\Delta yqiHIK$ ) in MSgg-Flüssig (Pellicle) - sowie Festmedium (Kolonie). Die Biofilm-Formation wurde zusätzlich auf MSgg-Festmedium mit der Addition von 0,5 M NaCl sowie der Zugabe von Glycin-Betain (GB) analysiert.

Wie bereits erwähnt wurde, konnten in insgesamt vier Genen (*sfp*, *epsC*, *swrA*, und *degQ*) Mutationen identifiziert werden, die dazu führen, dass der Wildtyp 168 nicht mehr in der Lage ist, einen Biofilm auszubilden (187). Das Sfp Protein ist dabei an der Surfactin Produktion in *B. subtilis* beteiligt (173), wohingegen die Gene *epsC*, *swrA* sowie *degQ* für ein Matrix-produzierendes Protein (27, 167), ein in die Motilität involviertes Protein (136) sowie für ein regulatorisches Enzym kodieren (146). Revertiert man alle diese Mutationen, kann die Ausbildung eines Biofilm wieder hergestellt werden (187). Um nun die Frage zu klären, ob in dem Stamm KFB8 eine oder mehrere dieser Mutationen revertiert waren, wurden die besagten Genregionen sequenziert. Als Kontrollen dienten dabei die beiden Wildtyp-Stämme 168 sowie 3610. Das Ergebnis dieser Sequenzierung ist in Abbildung 60 im Anhang dargestellt. Der Genotyp des Stammes KFB8 unterschied sich in keinem der getesteten Markergene von dem des Wildtyp-Stammes 168. Die Rückführung der Mutationen der Biofilm-Markergene ist somit nicht die Ursache für den Phänotyp des Stammes KFB8 unter biofilminduzierenden Bedingungen.

### 3.2. Der Einfluss der Deletionsmutante KFB8 in den Sporulationsprozess: Die Bestimmung des Sporentiters

Nachdem der Einfluss des *yqiHIK* Operons auf das Biofilm-Verhalten in *B. subtilis* untersucht wurde, sollte nun im weiteren Verlauf ein mögliches Einwirken der YqiHIK Proteine auf den Sporulationsprozess analysiert werden.

Dafür wurde zunächst der Sporentiter in einem spezifischen Sporulationsmedium (DSM) bestimmt. Der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 sowie die Zellwandhydrolase-Mutanten KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ), KFB9 ( $\Delta lytC$ ), KFB10 ( $\Delta yrvJ$ ), KFB16 ( $\Delta cwIC$ ) und KFB17 ( $\Delta cwID$ ) wurden in SMM-Vorkulturen über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe dieser Vorkulturen wurden am nächsten Tag die Hauptkulturen in DSM angeimpft ( $OD_{578}$  0,1). Der Wachstumsertrag wurde in regelmäßigen Abständen durch das Messen der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt (Abbildung 37 A). Der Eintritt in die stationäre Phase wird als Initiation der Sporulation definiert und mit  $T_0$  bezeichnet. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Sporentiter der einzelnen Stämme bestimmt. Dargestellt wurden die Koloniebildenden-Einheiten (KBE in %) (Abbildung 37 B). Der Sporentiter des Wildtyp-Stammes lag bei  $8.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ . Das Wachstumsverhalten der diversen Einzelmutanten in DSM verlief, verglichen zum Wildtyp 168 nahezu deckungsgleich. Alle Kulturen traten nach 180 Minuten in die stationäre Phase ein (Abbildung 37 A), weshalb dieser Zeitpunkt als  $T_0$  definiert wurde. Die KBE der einzelnen Zellwandhydrolase-Mutanten waren identisch zu denen des Wildtyps. Diese variierten von 75 bis 110 %. Für den Stamm KFB17 ( $\Delta cwID$ ) konnte durch diese Methode keine Sporulationsfrequenz bestimmt werden, da die *cwID*-Gendelektion zu einem Germinations-Phänotyp führt. Diese Mutante ist in der Lage hitzeresistente Sporen zu bilden, wobei diese nicht mehr auskeimen können (249).

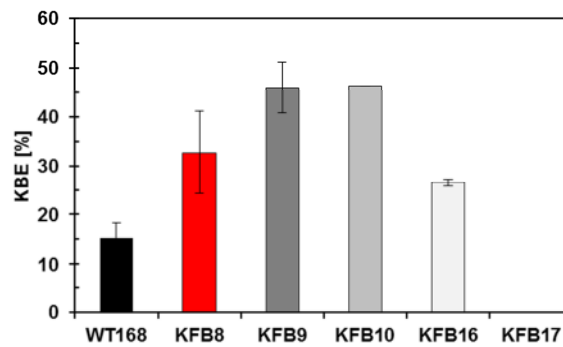


**Abb. 37: Die Quantifizierung der Sporulationsfrequenz in DSM.**

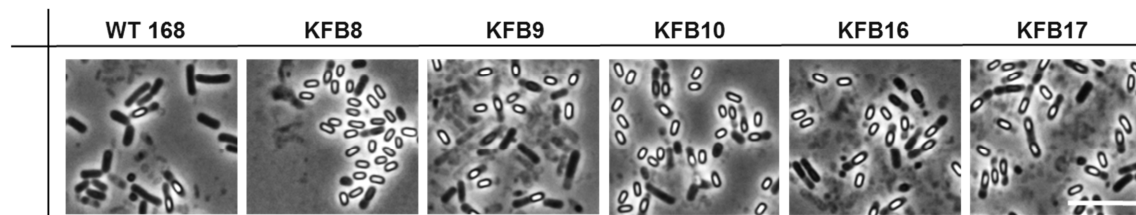
(A) Gezeigt ist das Wachstumsverhalten ( $OD_{578}$ ) der *B. subtilis* Stämme 168 (■), KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) (■), KFB9 ( $\Delta lytC$ ) (■), KFB10 ( $\Delta yrvJ$ ) (■), KFB16 ( $\Delta cwIC$ ) (■) sowie KFB17 ( $\Delta cwID$ ) (□). Der Eintritt in die stationäre Phase ist mit einem Pfeil markiert und wird als  $T_0$  definiert. Die Sporulation wurde somit nach 180 Minuten initiiert. (B) Darstellung der Koloniebildenden-Einheiten (KBE [%]) der diversen Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Bestimmung des Sporentiters in DSM offenbarte keinen Unterschied zwischen den diversen Stämmen. Im Anschluss daran wurde der Sporentiter nun in dem Minimal-Medium SMM analysiert. Dafür wurden die Hauptkulturen in SMM für 26 Stunden bei 37°C inkubiert, um im Anschluss daran die KBE zu bestimmen. Im Vergleich zu der Sporulationsfrequenz, die in DSM bestimmt werden konnte, variierten die KBE in SMM von 15 bis 45 % (Abbildung 38 A). Überraschenderweise wiesen alle Zellwandhydrolase-Mutanten, verglichen mit dem Wildtyp-Stamm 168, zu diesem Zeitpunkt eine Hyper-Sporulation auf. Dieser Phänotyp konnte mikroskopisch eindeutig bestätigt werden (Abbildung 38 B). Auch in diesem Experiment konnte keine KBE für die Deletionsmutante KFB17 ( $\Delta cwID$ ) determiniert werden. Die Hyper-Sporulation konnte mikroskopisch jedoch auch für diese Mutante beobachtet werden.

A



B



### Abb. 38: Die Quantifizierung der Sporulationsfrequenz in SMM.

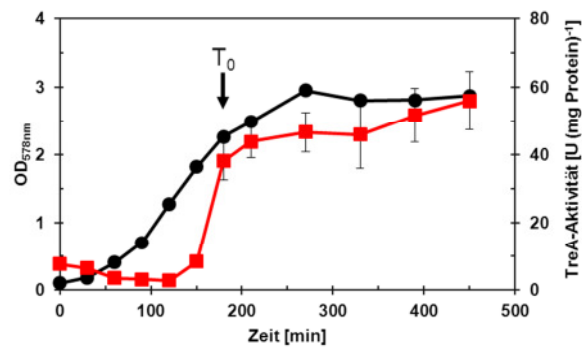
(A) Darstellung der koloniebildenden Einheiten (KBE [%]) der diversen Einzel-Mutanten KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) (■), KFB9 ( $\Delta lytC$ ) (▣), KFB10 ( $\Delta yrvJ$ ) (▢), KFB16 ( $\Delta cwIC$ ) (◊) sowie KFB17 ( $\Delta cwID$ ) (□) im Vergleich zum Wildtyp 168 (■). (B) Phasenkontrastmikroskopie der diversen *B. subtilis* Stämme nach 26-stündiger Inkubation in SMM. Der Größenstandard entspricht 5  $\mu\text{m}$ . Die Mikroskopie-Bilder wurden mit einer 1.000-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die Ursache für die erhöhte Sporulationsfrequenz der Zellwandhydrolase-Mutanten ist bisher unklar. Es ist jedoch bekannt, dass solche Stämme eine frühzeitige Sporulation aufweisen, die ein Wachstumsdefizit besitzen und aufgrund dessen einen Vorteil haben, die Initiation der Sporulation zu beschleunigen (223).

#### 3.2.1. Die Induktion der *yqiHIK* Expression nach Initiation der Sporulation

Nach der physiologischen Charakterisierung der Deletionsmutante KFB8 unter Sporulations-Bedingungen, sollte im Folgenden die Analyse der Expression des *yqiHIK* Operons unter analogen Voraussetzungen erfolgen. Dafür wurde der TreA-Fusionsstamm KFB15 in DSM kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen, die sowohl zur Bestimmung des Wachstumsertrags verwendet wurden, als auch zur Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt wurden. Der Eintritt in die stationäre Phase und somit die Initiation der Sporulation erfolgte nach 180 Minuten ( $T_0$ ) (Abbildung 39). Die Promotoraktivität des *yqiHIK* Genclusters stieg direkt nach Eintritt in die Sporulation ( $T_0$ ) von einem Basalniveau (5-10 Units) auf ca. 40 Units an. Dieses Expressionsniveau steigerte sich im weiteren Verlauf auf ca. 70 Units. Diese Promotoraktivität unter Sporulations-Bedingungen entspricht somit der nach der Salzinduktion (Abbildung 24). Die Induktion der *yqiHIK* Transkription direkt nach Initiation der Sporulation suggeriert, dass die YqiHIK Proteine eine Rolle während der frühen Sporulation zu spielen scheinen. Im Falle von Zellwandhydrolasen ist bekannt,

dass diese an der Restrukturierung der Zellwand sowie bei der Bildung des Sporen-Peptidoglykans beteiligt sind (194, 258, 280).

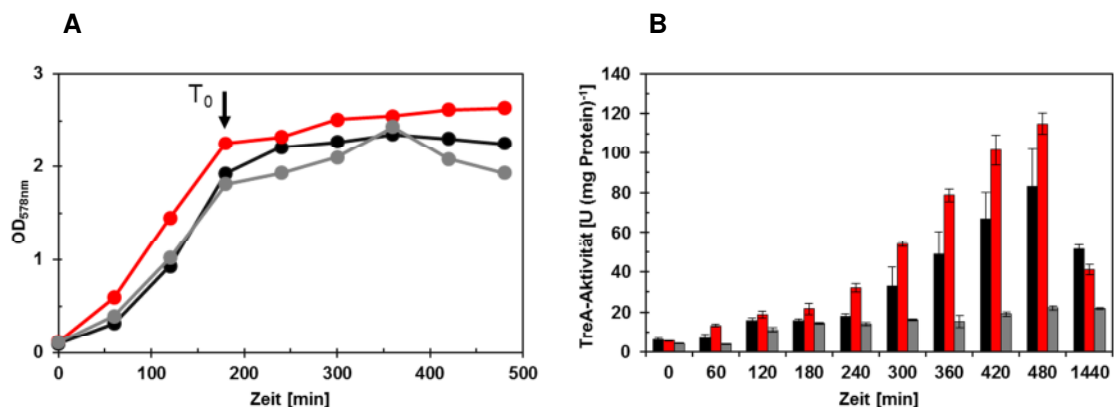


**Abb. 39: Die Induktion der *yqiHIK* Expression nach Initiation der Sporulation.**

Dargestellt ist das Wachstumsverhalten des *yqiH-treA* Fusion-Stammes KFB15 in DSM (●). Der Eintritt in die stationäre Phase wird mit einem Pfeil markiert und mit  $T_0$  definiert. Die Sporulation wurde somit nach 180 Minuten initiiert. Die Ermittlung des Wachstumsertrages erfolgte durch die Messung der  $OD_{578}$  in regelmäßigen Zeitperioden. Zusätzlich wurde zu diesen Zeitpunkten die TreA-Aktivität (■) bestimmt.

### 3.2.2. Die Expression des *yqiHIK* Operons bei Initiation der Sporulation ist SinR/SinI-abhängig

Um eine mögliche SinR/SinI-Abhängigkeit unter Sporulations-Bedingungen zu untersuchen, wurde der Wildtyp-Fusionsstamm KFB41 als auch die Fusionsstämme KFB42 ( $\Delta sinR$ ) KFB46 ( $\Delta sinI$ ) in DSM kultiviert. Der Wachstumsverlauf und die TreA-Aktivität wurden nach regelmäßigen Zeitintervallen bestimmt (Abbildung 40). Der Eintritt in die stationäre Phase erfolgte ebenfalls nach 180 Minuten ( $T_0$ ) (Abbildung 40 A). Es konnte erneut beobachtet werden, dass die Promotoraktivität nach Initiation der Sporulation in dem Stamm KFB41 kontinuierlich anstieg. Das Expressionsniveau der SinR Deletionsmutante überragte dabei zu jedem Zeitpunkt das der Wildtyp-Fusion. Fehlt jedoch der Antagonist SinI, verblieb die Expression auf einem Basalniveau. Der *yqiHIK* Promotor konnte in dem Stamm KFB46 ( $\Delta sinI$ ) nicht mehr induziert werden (Abbildung 40 B).



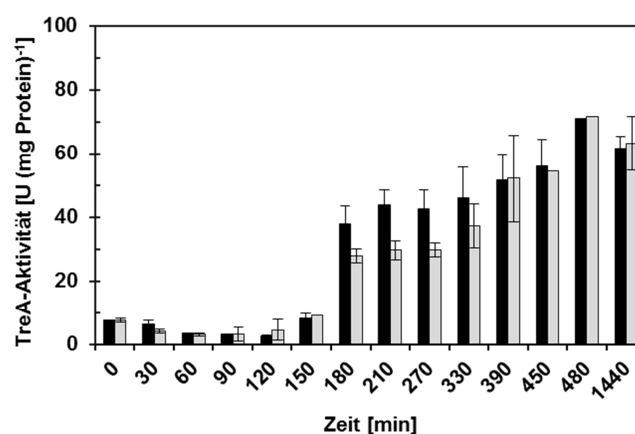
**Abb. 40: Die Abhängigkeit der Initiation der *yqiHIK* Expression in DSM vom SinR Regulator.**

(A) Gezeigt ist das Wachstumsverhalten ( $OD_{578}$ ) der *B. subtilis* Stämme KFB41 (Wildtyp-Fusion; ●), KFB42 ( $\Delta sinR$ ; ■) und KFB46 ( $\Delta sinI$ ; ■) in DSM. Der Eintritt in die stationäre Phase ist mit einem Pfeil markiert und wird als  $T_0$  definiert. Die Initiation der Sporulation erfolgt nach 180 Minuten. (B) Darstellung der TreA-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation in DSM.

Dieses Expressionsmuster legt die Vermutung nahe, dass die Transkription des *yqiHIK* Operons unter Sporulations-Bedingungen einer SinR/SinI-Abhängigkeit unterliegt. Die Deletion des SinR Repressors führt dabei zu einer Erhöhung der Expressionsrate, wohingegen das Fehlen des SinI Proteins zur Repression des Operons führt. Das SinI Protein ist somit nicht mehr in der Lage an den Antagonisten SinR zu binden. Dieser verweilt dann als Repressor in Promotornähe auf der DNA und verhindert dadurch die Transkription des *yqiHIK* Genclusters.

### 3.2.3. Der salzinduzierbare, SigA-abhängige Promotor ist nicht für die Expression des *yqiHIK* Genclusters unter Sporulations-Bedingungen verantwortlich

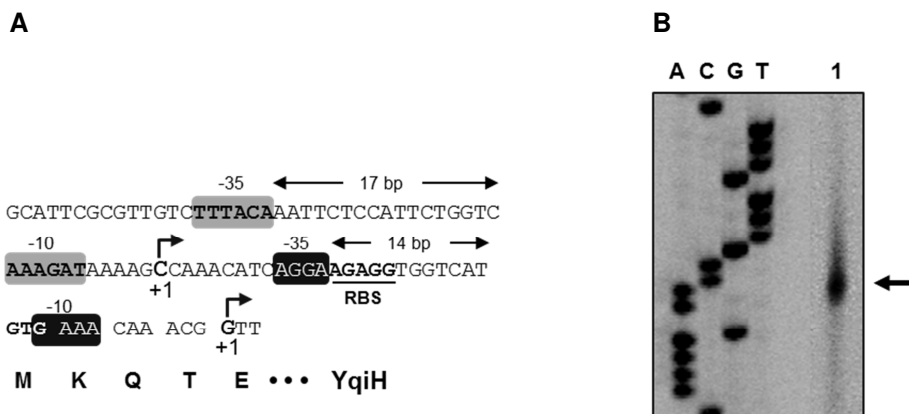
Nachdem eine Erhöhung der Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons unter Sporulations-Bedingungen ermittelt wurde, stellte sich nun die Frage, ob die Erhöhung der Transkription ebenfalls von dem SigA-Promotor abhängig ist, der zuvor unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) identifiziert werden konnte (Abbildung 25). Um diese Frage zu beantworten, wurde sowohl der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 als auch der Stamm KFB33, in dem das hochkonservierte invariante T der -10 Region des SigA-Promotors mutagenisiert wurde (Tabelle 7), in DSM kultiviert. Diese Mutation zerstört die osmotisch regulierte Promotoraktivität des SigA-abhängigen Promotors (Tabelle 7). In regelmäßigen Zeitintervallen wurden Proben dieser Kulturen entnommen und in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 vorzufinden. Die Initiation der Sporulation erfolgte nach 180 Minuten der Inkubation, was erneut mit einer starken Erhöhung der Promotoraktivität einherging. Die TreA-Aktivität der beiden Stämme ist zu jedem gemessenen Zeitpunkt nahezu identisch. Wenn die Expression unter Sporulations-Bedingungen von dem zuvor bestimmten SigA-abhängigen Promotor gesteuert werden würde, hätte in der invarianten T Mutante (KFB33) keine Expression des *yqiHIK* Operons stattfinden dürfen. Die Transkription des *yqiHIK* Genclusters muss somit von einem sporulationspezifischen Promotor gesteuert werden.



**Abb. 41: Der Einfluss des salzabhängigen SigA-Promotors auf die Induktion des *yqiHIK* Operons in DSM.** Der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 (■) sowie der Stamm KFB33 (□) in dem das invariante T mutagenisiert (-10 Region) wurde, wurden in DSM kultiviert. Die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Sporulation wurde nach 180 Minuten initiiert ( $T_0$ ).

### 3.2.4. Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des sporulationsspezifischen Promotors

Durch den zuletzt vorgestellten Versuch (Abbildung 41) kristallisierte sich heraus, dass die Transkription des *yqiHIK* Operons durch einen weiteren Promotor reguliert wird. Da dieser Promotor unter Sporulations-Bedingungen aktiv ist, wurde erneut eine Primer-Extension-Analyse durchgeführt. Diesmal wurde der Wildtyp-Stamm 168 (pKF16) in DSM kultiviert und nach fünfstündiger Inkubation (nach Inokulation) geerntet. Zu diesem Zeitpunkt konnte davon ausgegangen werden, dass die sporulationsabhängige Induktion der Transkription des *yqiHIK* Operons stattgefunden hat. Aus diesen Kulturen wurde schließlich die Gesamt-RNA isoliert und für eine Primer-Extension-Reaktion eingesetzt. Es konnte eine *yqiHIK* spezifische mRNA detektiert werden (Abbildung 42 B). Der dadurch bestimmte Transkriptionsstart (+1) lag in dieser Reaktion in der kodierenden Region des Gens *yqiH* (Abbildung 42 A). Eine Inspektion dieser Region zeigte eine -35 sowie -10 Region, die Sequenzähnlichkeiten zu der Konsensus-Sequenz von SigH-abhängigen Promotoren aufweist. Trotz einer hohen Variabilität konnten die charakteristischen Muster der Konsensus-Sequenz (**R-AGGAwWW-11-14 bp-R-GAATww**) wieder gefunden werden. Die -35 und -10 Region werden in dem Fall durch einen 14 bp langen Spacer voneinander getrennt. Die -10 Region überlappt mit dem Translationsstart des YqiH Proteins (Abbildung 42 A). Der Sigmafaktor SigH ist für die Regulation von Genen verantwortlich, die für die frühe Sporulation notwendig sind (33, 93). Eine SigH-abhängige Transkription des *yqiHIK* Operons würde demnach im Einklang zu den Reporter-gen-Studien (Abbildung 41) stehen, da gezeigt wurde, dass die Expression direkt zur Initiation der Sporulation induziert wird. Dies deutet darauf hin, dass die Genprodukte funktionell eine Rolle während der frühen Sporulation spielen.

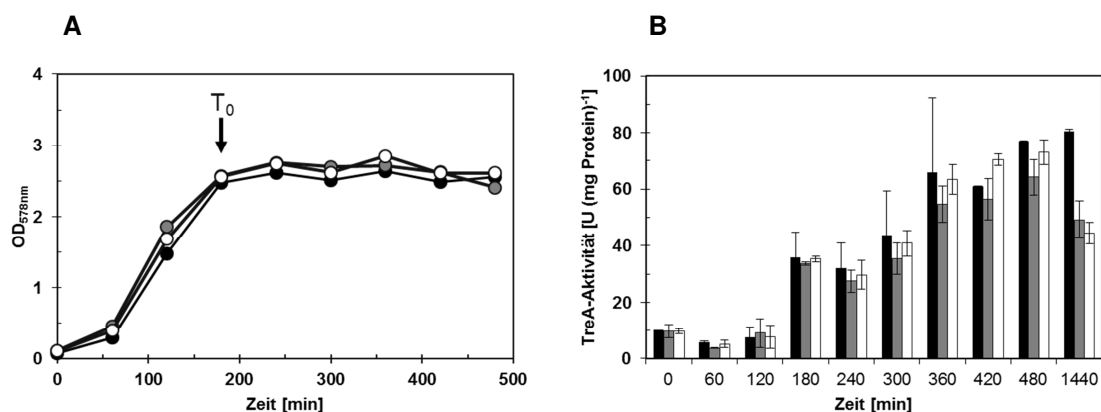


**Abb. 42: Die Identifikation des *yqiHIK* Transkriptionsstartpunktes bei Eintritt in die Sporulation.**

(A) Abgebildet ist die Nukleotidsequenz der *yqiHIK* Promotorregion. Die -35 und -10 Region des salzinduzierten SigA Promotors sind grau unterlegt. Die putative -35 sowie -10 Region des SigH-abhängigen Promotors sind mit schwarzen Boxen gekennzeichnet. Die Regionen werden durch 14 Basenpaare voneinander getrennt. Die Ribosomenbindestelle (RBS) sowie der Translationsstart des *yqiH* Gens sind gekennzeichnet. Der SigH-abhängige Transkriptionsstart (+1) ist mit einem Pfeil markiert und liegt in der kodierenden Region des YqiH Proteins. (B) Primer-Extension-Analyse des *yqiHIK* Transkriptes (Spur 1). Dafür wurde Gesamt-RNA aus dem *B. subtilis* Wildtyp-Stamm 168 (pKF16) präpariert, der zuvor in DSM ( $T_{480}$ ) kultiviert worden war.

Um den, durch die Primer-Extension-Reaktion ermittelten SigH-Promotor zu verifizieren, wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. In dieser wurde zum einen die Konsensus-Sequenz der -35 Region verändert (**AGGA**→**TCCT**), der daraus resultierende Fusions-Stamm wurde KFB64 genannt.

Zum anderen wurde das Sequenzmotiv in der -10 Region verändert (**AAA**→**CCC**), wodurch der Stamm KFB63 entstand. Die Stämme KFB41, KFB63 sowie KFB64 wurden anschließend in DSM kultiviert, um den Wachstumsverlauf verfolgen zu können und um letztlich die TreA-Aktivität zu bestimmen. Die Probenentnahme erfolgte in regelmäßigen Abständen. Analog zu den vorherigen Versuchen traten die Kulturen nach 180 Minuten in die stationäre Phase ein ( $T_0$ ) (Abbildung 43 A). Das ermittelte Expressionsmuster der SigH-Promotor-Mutanten war identisch zu dem der Wildtyp *yqiH-treA* Fusion (Abbildung 43 B). Durch diese Expressionsanalyse steht nun fest, dass der durch die Primer-Extension-Analyse identifizierte „SigH-Promotor“ (Abbildung 42) demnach nicht bestätigt werden konnte.

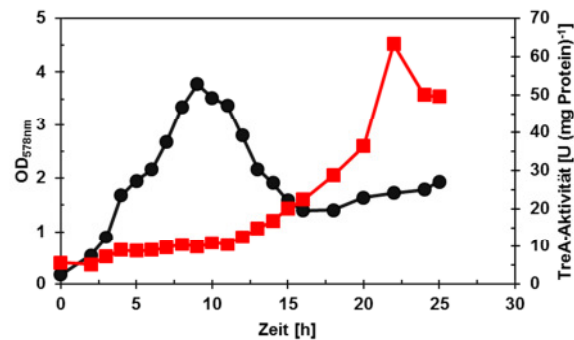


**Abb. 43: Zielgerichtete Mutagenese des putativen SigH-Promotors.**

(A) Dargestellt ist das Wachstumsverhalten der Stämme KFB41 (■), KFB63 (Mutation in der -35 Region) (■) sowie KFB64 (Mutation in der -10 Region) (□). Die Initiation der Sporulation erfolgte nach 180 Minuten der Inkubation in DSM ( $T_0$ ). (B) Bestimmung der TreA-Aktivität der genannten *B. subtilis* Fusionsstäme zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung in DSM.

#### 4. Die Expression des *yqiHIK* Operons in der „Todeszone“

Bisher wurden zwei zentrale transkriptionelle Aspekte vorgestellt, die der Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis* dienen. Einerseits konnte eine Induktion des Operons unter hochosmolaren Bedingungen identifiziert werden, die darüber hinaus der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU unterliegt. Andererseits wurde eine Induktion der Transkription des *yqiHIK* Genclusters unter Sporulations-Bedingungen aufgedeckt. In diesem Zusammenhang konnte eine direkte Beteiligung des Regulators SinR genetisch etabliert werden. Im folgenden Abschnitt liegt nun der Schwerpunkt auf einer weiteren regulatorischen Facette, nämlich der Induktion der Expression des *yqiHIK* Operons in der „Todeszone“. Die „Todeszone“ wird hierbei als die Wachstumsphase definiert, die unmittelbar auf die Absterbephase folgt. In dieser Phase verweilt der Wachstumsertrag ( $OD_{578}$ ) auf einem niedrigen dennoch konstanten Niveau (Abbildung 44).



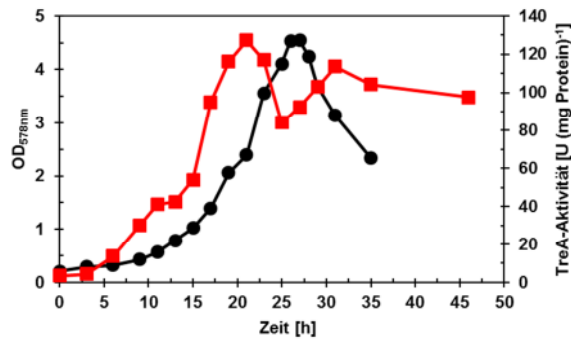
**Abb. 44: Wachstumsphasenabhängige Transkription des *yqiHIK* Operons unter isoosmotischen Bedingungen.**

Gezeigt ist die Bestimmung der TreA-Aktivität des Stammes KFB15 entlang der Wachstumskurve (■). Dafür wurde der Stamm KFB15 in SMM für 30 Stunden inkubiert. Die Bestimmung des Wachstumsertrages erfolgte durch das Messen der OD<sub>578</sub> (●) in regelmäßigen Zeitabständen.

In den vorangegangenen Versuchen konnte keine Induktion des *yqiHIK* Genclusters unter isoosmotischen Bedingungen in SMM aufgezeigt werden. Da die für die TreA-Reporterstudien verwendeten Proben fortlaufend während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden, sollte nun in einem weiteren Experiment die *yqiHIK* Promotoraktivität entlang der Wachstumskurve determiniert werden. Dafür wurde der Stamm KFB15 in SMM unter normalen physiologischen Bedingungen (0 M NaCl) bei 37°C für 25 Stunden inkubiert. Die Probenentnahme zur Bestimmung des Wachstumsertrages (OD<sub>578</sub>) sowie für die Determination der TreA-Aktivität erfolgte in regelmäßigen Perioden. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt. Der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 trat nach ca. acht Stunden in die stationäre Wachstumsphase ein, dicht gefolgt von dem Eintritt in die Absterbephase. Der Wachstumsertrag pendelte sich nach ca. 15 Stunden der Inkubation bei einer OD<sub>578</sub> von 1,5 ein und verweilte für weitere zehn Stunden auf diesem Niveau („Todeszone“). Das Erreichen des Wachstumsniveaus in der Absterbephase (15 Stunden) stellte einen Wendepunkt in der Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons dar. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nur ein Basal-Expressionsniveau (10 Units) verzeichnet werden. Die Transkription stieg ab diesem Zeitpunkt jedoch kontinuierlich an, bis nach ca. 22 Stunden ein Maximum der Expression (ca. 65 Units) erreicht werden konnte. Die Promotoraktivität war zu diesem Zeitpunkt vergleichbar mit der, die durch Salz- sowie Sporulationsinduktion erreicht werden konnte.

Analog zu dem vorherigen Experiment sollte nun untersucht werden, ob ein Anstieg der *yqiHIK* Promotoraktivität in der „Todeszone“ auch unter hyperosmotischen Bedingungen beobachtet werden kann. Hierzu wurde der Stamm KFB15 in SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Die Kulturen wurden auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37°C inkubiert, wobei die Probenentnahme stündlich erfolgte. Mit Hilfe dieser Aliquots wurde der Wachstumsertrag (OD<sub>578</sub>) sowie die TreA-Aktivität zu dem gegebenen Zeitpunkt bestimmt (Abbildung 45). Dabei war zu erkennen, dass sich die TreA-Aktivität simultan zur Wachstumskurve entwickelte. Mit Eintritt in die stationäre Phase erreichte die TreA-Produktion ebenfalls ein Maximum und fiel in der darauf folgenden Phase von ca. 120 Units auf 80 Units ab. In der Tat konnte erneut ein Anstieg der TreA-Aktivität, diesmal bereits in der Absterbephase beobachtet werden, dieses Expressionsniveau verweilte ab diesem Zeitpunkt auf einem weiteren Plateau.





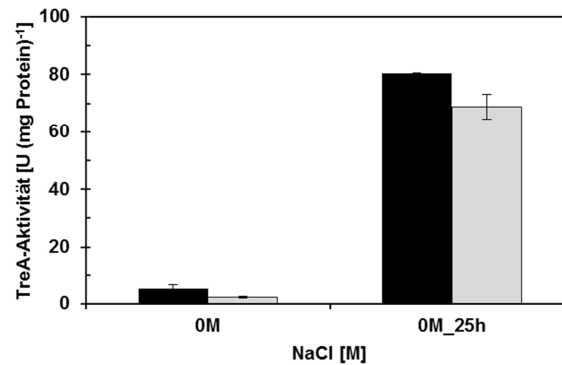
**Abb. 45: Wachstumsphasenabhängige Transkription des *yqiHIK* Operons unter hyperosmotischen Bedingungen.**

Gezeigt ist die Bestimmung der TreA-Aktivität des Stammes KFB15 entlang der Wachstumskurve (■). Dafür wurde der Stamm KFB15 in SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Die Bestimmung des Wachstumsertrages erfolgte durch das Messen der OD<sub>578</sub> (●) in regelmäßigen Zeitabständen.

Die Transkriptionsdaten offenbarten, dass eine Induktion des *yqiHIK* Operons unter normalen physiologischen Bedingungen erst dann stattfindet, wenn sich die Zellen bereits in der Todeszone befinden. Zu diesem Zeitpunkt findet kein Wachstum mehr statt und die Zellen liegen zum Teil bereits sporuliert bzw. lysiert vor. Dieser transkriptionelle Anstieg der Promotoraktivität in SMM-0 M NaCl sowie SMM-1,2 M NaCl suggeriert zudem eine weitere physiologische Funktion der YqiHIK Proteine in *B. subtilis*. Dieses Phänomen könnte in *B. subtilis* mit den Prozessen Kannibalismus sowie Zellwand-Recycling in Verbindung gebracht werden.

#### 4.1. Der salzinduzierbare, SigA-abhängige Promotor ist nicht für die Transkription des *yqiHIK* Genclusters in der Todeszone verantwortlich

Nach der Identifikation dieses neuen Expressionsmusters unter normalen physiologischen Bedingungen sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Erhöhung der Transkription in der Todeszone der Kontrolle des zuvor identifizierten SigA-Promotors (Abbildung 25) unterliegt. Dafür wurden der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 sowie der Stamm KFB33 (Mutagenese des invarianten T) (Tabelle 7) in SMM einerseits bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub> 1-1,5) und andererseits für 25 Stunden inkubiert und anschließend geerntet. Die Bestimmung der Promotoraktivität der *yqiHIK* Expressionseinheit zeigte ein vergleichbares Transkriptionsprofil zu beiden Zeitpunkten (Abbildung 46). Da eine Erhöhung der Transkription beider Stämme nach 25-stündiger Inkubation zu verzeichnen war, kann nun postuliert werden, dass die Induktion in der Todeszone nicht über den SigA-Promotor reguliert wird.



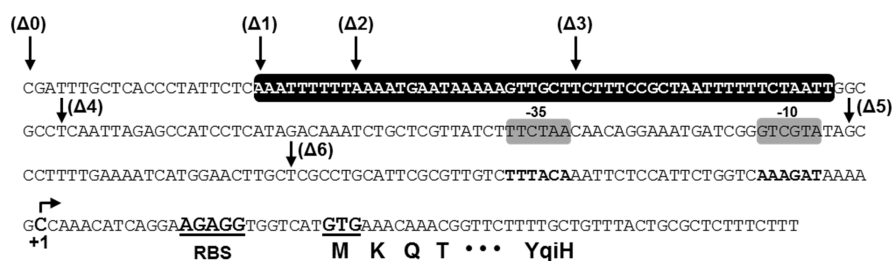
**Abb. 46: Der Einfluss des salzabhängigen SigA-Promotors auf die Induktion des *yqiHIK* Operons in der Todeszone.**

Der Wildtyp-Fusionsstamm KFB15 (■) sowie der Stamm KFB33 (▒) in dem das invariante T (-10 Region) mutagenisiert wurde, wurden in SMM bis zum Eintritt in die exponentielle Phase ( $OD_{578}$  1-1,5) sowie für 25 Stunden kultiviert. Die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons wurde zu diesen Zeitpunkten bestimmt.

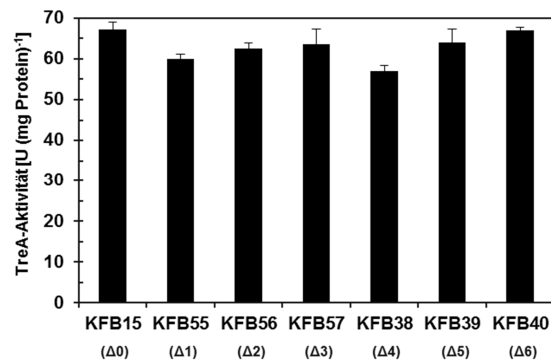
#### 4.2. Verkürzungen der *yqiHIK* Promotorregion

Nachdem eine Beteiligung des zuvor identifizierten SigA-Promotors ausgeschlossen werden konnte, sollte in einem weiteren Ansatz die Lage des Promotors, der für die Expression in der Todeszone verantwortlich ist, eingegrenzt werden. Dafür wurden Verkürzungen in der Promotorregion vorgenommen, wie sie bereits für die AT-reiche Region beschrieben wurden (Abbildung 26). Neben den zuvor analysierten Verkürzungen ( $\Delta 1$ - $\Delta 3$ ), wurden drei weitere Restriktionen der Promotorregion durchgeführt ( $\Delta 4$ - $\Delta 6$ ) (Abbildung 47 A). Die daraus resultierenden Stämme (Abbildung 47 B) wurden zusammen mit der *yqiH-treA* Wildtyp-Fusion KFB15 in SMM für 25 Stunden inkubiert. Aliquots dieser Proben wurden anschließend für die Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt. Eine nahezu identische Promotoraktivität konnte für alle Verkürzungen, die im regulatorischen Bereich des *yqiHIK* Operons vorgenommen wurden, verglichen zur Wildtyp-Fusion, verzeichnet werden (Abbildung 47 B). Ebenfalls in der Verkürzung  $\Delta 6$  (KFB40) konnte eine Induktion der Expression in der Todeszone determiniert werden. Durch den Startpunkt der Verkürzung  $\Delta 6$  kann die Lage des Todespromotors auf ein DNA-Fragment eingegrenzt werden, welches aus 79 bp besteht (Abbildung 47 A).

**A**



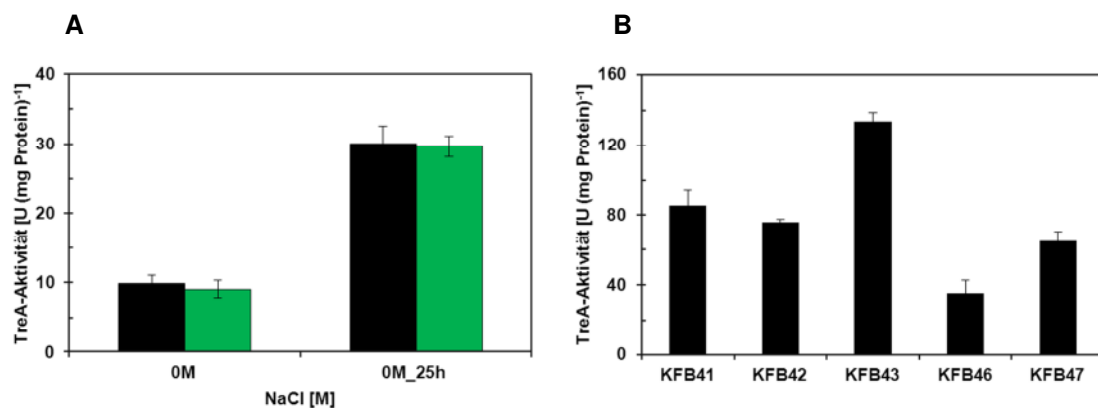
## B

**Abb. 47: Die Eingrenzung der Lokalisation des Todespromotors des *yqiHIK* Genclusters.**

(A) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Fragments der *yqiH-treA* Fusion ( $\Delta 0$ ). Die Lage der Verkürzungen  $\Delta 1-6$  sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die AT-reiche Region wird durch eine schwarze Box markiert. Darüber hinaus sind sowohl Transkriptions- sowie Translationsstart, die -35 sowie -10 Region, als auch die Ribosomenbindestelle (RBS) hervorgehoben. (B) Determination der *yqiHIK* Promotoraktivität der Stämme KFB15 und KFB55-KFB57 sowie KFB38-KFB40 nach einer 25-stündigen Inkubation in SMM.

### 4.3. Analyse des Einflusses diverser Regulator-Mutanten auf die Induktion der Transkription in der „Todeszone“

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluss zahlreicher wichtiger Regulatoren aus *B. subtilis* auf die Transkription des *yqiHIK* Operons unter verschiedenen physiologischen Bedingungen untersucht. Um eine mögliche Beteiligung dieser Regulatoren an der Expression des Operons in der „Todeszone“ zu untersuchen, wurden die diversen TreA-Fusionsstämme KFB72 ( $\Delta degSU$ ), KFB42 ( $\Delta sinR$ ), KFB46 ( $\Delta sinI$ ), KFB43 ( $\Delta abrB$ ) und KFB47 ( $\Delta rok$ ) zusammen mit dem Wildtyp-Fusionsstamm KFB41 in SMM für 25 Stunden inkubiert. Aliquots dieser Stämme wurden im Anschluss daran verwendet, um die TreA-Aktivität in der „Todeszone“ zu bestimmen (Abbildung 48). Keiner der hier untersuchten Regulatoren zeigte einen Einfluss auf die Induktion der Expression des *yqiHIK* Operons in der Todeszone. Ein Einfluss der diversen Transkriptionsfaktoren kann somit unter diesen physiologischen Bedingungen ausgeschlossen werden.

**Abb. 48: Der Einfluss diverser Regulatoren aus *B. subtilis* auf die Aktivität der Expression des *yqiHIK* Operons in der „Todeszone“.**

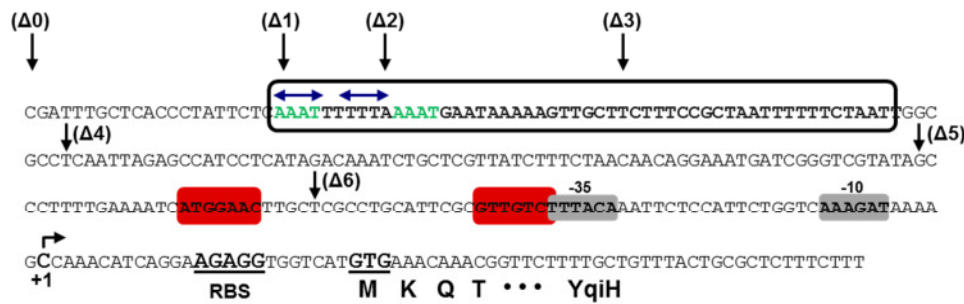
(A) Die Stämme KFB41 (■) und KFB72 ( $\Delta degSU$ ; ■) wurden in SMM bis zum Eintritt in die exponentielle Phase ( $OD_{578}$  1-1,5) sowie für 25 Stunden kultiviert. Die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons wurde zu diesen Zeitpunkten bestimmt. (B) Bestimmung der TreA-Aktivität der Stämme KFB41, KFB42 ( $\Delta sinR$ ), KFB43 ( $\Delta abrB$ ), KFB46 ( $\Delta sinI$ ), KFB47 ( $\Delta rok$ ) nach 25-stündiger Inkubation in SMM.

## VI. DISKUSSION

Im Verlauf dieser Dissertation konnte eine sehr komplexe Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis* aufgeklärt werden. Das *yqiHIK* Gencluster kodiert dabei für ein extrazelluläres Lipoprotein (YqiH), eine sekretierte N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase (YqiI) sowie eine zytoplasmatische Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (YqiK). Die facettenreiche Regulation der *yqiHIK* Transkriptionseinheit beruht dabei im Wesentlichen auf drei unterschiedlichen Aspekten:

1. Die Beteiligung des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU an der salzinduzierten Regulation des *yqiHIK* Operons
2. Der Einfluss des Biofilm-Regulators SinR auf die Expression des *yqiHIK* Genclusters
3. Die Expression der *yqiHIK* Transkriptionseinheit in der „Todeszone“

Die zentralen regulatorischen DNA-Sequenzen sind in Abbildung 49 zusammengefasst. Zum einen konnte eine Beteiligung des Zwei-Komponenten-Systems (ZKS) DegS/DegU bei hohen Salinitäten festgestellt werden. Dabei scheint die zytoplasmatisch vorliegende Sensor-Kinase DegS ein osmotisches Signal zu erkennen, und dieses Signal auf den Antwort-Regulator DegU zu übertragen. Dieser erkennt voraussichtlich eine AT-reiche Region in der Promotorregion des *yqiHIK* Operons, die in beträchtlicher Entfernung zur der -35 Region des SigA-abhängigen Promotors lokalisiert vorliegt. Eine Bindung des Antwort-Regulators DegU führt schließlich zu einer Aktivierung des Genclusters unter hyperosmotischen Bedingungen. Darüber hinaus konnte ein Einfluss des Repressors SinR auf die Expression des *yqiHIK* Operons aufgedeckt werden. Dieser erkennt ebenfalls ein spezifisches Bindemotiv auf der DNA in der Promotorregion der Transkriptionseinheit. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei mögliche Bindemotive identifiziert werden, wobei eines mit der -35 Region des SigA-Promotors überlappt. Dieser Umstand wird dafür verantwortlich gemacht, dass keine Transkription des *yqiHIK* Genclusters unter normalen osmotischen Wachstumsbedingungen (SMM-0 M NaCl) erfolgt. Darüber hinaus konnte eine Expression des Operons in der sogenannten „Todeszone“ beobachtet werden. Die „Todeszone“ wurde als die Wachstumsphase definiert, die unmittelbar auf die Absterbephase folgt. In diesem Zusammenhang wird eine Beteiligung der Zellwandhydrolase YqiI an den Prozessen des Kannibalismus sowie des Peptidoglykan-Recyclings erwogen. Ferner konnte ausgeschlossen werden, dass dieses regulatorische Ereignis unter der Kontrolle des zuvor identifizierten SigA-Promotors liegt. Vielmehr konnte die Lokalisation des Promotors auf ein 79 bp langes DNA-Fragment eingegrenzt werden. Diese identifizierten Transkriptionsmuster implizieren, dass die YqiHIK Proteine in verschiedene physiologische Prozesse involviert sind. Die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen werden im folgenden Verlauf vorgestellt und diskutiert.



**Abb. 49: Die komplexe Regulation des *yqiH* Operons aus *B. subtilis*.**

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Fragmentes der *yqiH-treA*-Fusion ( $\Delta 0$ ). Die Lage der Verkürzungen in der Promotorregion ( $\Delta 1-6$ ) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die AT-reiche Region wird durch einen schwarzen Kasten dargestellt, wobei mögliche DegU Bindemotive durch blaue Pfeile (gegenläufige Sequenzwiederholung) sowie durch eine grüne Schrift (direkte Sequenzwiederholung) hervorgehoben sind. Rote Boxen markieren die zwei putativen Binderegionen des SinR Proteins. Sowohl die -35 sowie -10 Region als auch Transkriptions- sowie Translationsstart und die Ribosomenbindestelle (RBS) sind gekennzeichnet.

### 1. Salzstress induzierte Modifikationen der Zellwand in *B. subtilis*

*B. subtilis* ist in seinem natürlichen Lebensraum, den oberen Bodenschichten, zahlreichen abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt (66). Dabei wird angenommen, dass dieser Mikroorganismus in seinem Habitat einer ständigen Nahrungslimitation unterliegt, die letztlich zur Bildung einer Endospore führt, die es *B. subtilis* erlaubt, unter ungünstigen Wachstumsbedingungen zu persistieren. Erst bei einer Verbesserung des Nährstoffangebotes können die Sporen auskeimen, und das Bakterium lebt in seiner vegetativen Form weiter (70, 116, 227). Die Initiation der Sporulation wird jedoch aufgrund des hohen Energieaufwands und der Unumkehrbarkeit nach Initiation dieses Prozesses als letzter Ausweg von der *B. subtilis* Zelle angesehen. Neben der akuten Nahrungslimitation stellt die Verfügbarkeit von Wasser für das bodenbewohnende Bakterium *B. subtilis* ebenfalls einen kritischen Faktor dar. Während Trockenperioden übersteigt die Konzentration von gelösten Ionen im extrazellulären Milieu die des Zytoplasmas. Die Folge ist ein Wasserverlust der Zelle, der mit dem Zusammenbruch des Turgors (Plasmolyse) sowie mit einem Wachstumsstillstand einhergeht (139, 228). Trotz dieser häufig auftretenden Komplikationen, die mit hohen Salinitäten verbunden sind, ist der Organismus nicht in der Lage, unter diesen physiologischen Bedingungen die Sporulation zu initiieren (239). Vielmehr stellt die Akkumulation von Kaliumionen sowie die spätere Synthese oder auch Aufnahme der sogenannten kompatiblen Solute eine zentrale Anpassungsstrategie in *B. subtilis* an diese Umweltbedingungen dar (139, 228). Obwohl die zentralen Mechanismen der Osmoregulation bezogen auf das Wasser- sowie Turgor-Management gut untersucht sind, zeigte die Analyse des Transkriptom-Profiles salzgestresster *B. subtilis* Zellen (96, 123, 265), dass eine Vielzahl an Genen an diesem Prozess beteiligt zu sein scheinen, deren Funktion bisher nicht bekannt ist. Dies unterstützt die These, dass noch weitere Facetten während der Anpassung an hohe Salinitäten existieren, die bisher noch unentdeckt sind.

Eine genaue Untersuchung der über 100 salzinduzierten Gene, die in der DNA-Microarray-Analyse (265) identifiziert werden konnten, ergab, dass eine Reihe der kodierten Proteine eine Rolle im Zellwandmetabolismus zu spielen scheinen. In vorangegangenen Studien durch López *et al.* (171, 172) sowie durch Palomino *et al.* (217), wurde bereits postuliert, dass die Kultivierung von *B. subtilis* in hypertone Medium eine Veränderung der Zellhülle nach sich zieht. Dabei deuteten die Daten darauf hin, dass die Zellwand an Dicke zunimmt sowie der Grad der Quervernetzungen des Peptidoglykans

ansteigt. Die Transkriptom-Daten (265) sowie vorangegangene Studien salzgestresster *B. subtilis* Zellen (171, 172, 217) veranlassten mich zur Formulierung der These, dass Modifikationen der Zellwand in *B. subtilis* eine neue Facette der Osmoregulation darstellen könnten. Um diese Frage zu adressieren, war das zentrale Ziel dieser Dissertation, die physiologische sowie regulatorische Charakterisierung des Yqil Proteins bzw. die des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*.

### 1.1. Die physiologische Rolle der YqiHIK Proteine unter hyperosmotischen Bedingungen

Die Kultivierung von *B. subtilis* Zellen in hypertonem Medium (SMM-1,2 M NaCl) führt zu einer enormen Veränderung in dessen Zellmorphologie. Mit Hilfe von Phasenkontrast- sowie rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass diese morphologischen Aberrationen durch deformierte und stark gewundene Zellen bestimmt werden, die überdies oft Verdickungen an den Zellpolen aufwiesen (Abbildung 12, 13). Eine detaillierte Analyse zeigte, dass diese Deformationen abhängig von der Wachstumsphase sind (Abbildung 19), denn diese traten nur in der ausgedehnten lag-Phase auf, die kennzeichnend für das Wachstum unter Salzstress in *B. subtilis* ist (21). Darüber hinaus finden gerade in dieser Wachstumsphase die zentralen Anpassungsprozesse in *B. subtilis* statt, wozu beispielsweise die Synthese des kompatiblen Solutes Prolin gehört (32, 139). Nachdem die Zellen sich an den Osmostress angepasst haben, verändert sich der Phänotyp im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase schrittweise zurück zur typischen stäbchenförmigen Morphologie von *B. subtilis*. Ob *B. subtilis* diese morphologischen Veränderungen aktiv vornimmt, um sich an hohe Salinitäten anzupassen, oder ob diese Deformationen als unmittelbare Antwort nach Inokulierung von *B. subtilis* Zellen in Hochsalz Medium auftreten, bleibt ungeklärt. Die Tatsache, dass die Zellen jedoch erst nach sechsständiger Inkubation in hypertonem Medium mit den Änderungen beginnen, setzt voraus, dass es sich nicht um eine unwillkürliche Reaktion handelt, die beispielsweise durch den Wasserverlust des Zytoplasmas (30) induziert werden könnte. Durch die Beobachtung, dass die meisten der deformierten Zellen immer noch lebensfähig sind, wird die These unterstützt, dass es sich hierbei um eine weitere Facette der Adaptation von *B. subtilis* an hyperosmotische Bedingungen handeln könnte. Man könnte spekulieren, dass die Veränderung der Oberfläche einen Vorteil bei hohen Salinitäten für die Bakterienzelle darstellt, oder auch zwangsläufig durch die Veränderung des Zellurgors geschieht. Zusätzlich ist der Turgor für die Zellelongation sowie Zellteilung verantwortlich, wobei genau diese Prozesse während der Anpassungsphase stark verlangsamt sind. Diese morphologischen Veränderungen setzen jedoch eine Restrukturierung des Zellwand-Peptidoglykans voraus, da dieser Sacculus maßgeblich für die Bestimmung der Zellform ist. Daraufhin stellte sich die Frage, welche zellwandmodifizierenden Enzyme an diesem Prozess beteiligt sein könnten.

Die Transkriptom-Analyse durch Steil *et al.* (265) rückte erstmalig die Gene *yqiH* sowie *yqil* in den Fokus, da diese Gene starke Induktionsfaktoren (15 bzw. 7-fach) in Antwort auf Hochsalz Bedingungen im Vergleich zu den anderen salzinduzierten Genen aufwiesen (Tabelle 1). Die kürzlich veröffentlichten Tiling-Array Daten (205), bei denen das Transkriptom von *B. subtilis* unter zahlreichen physiologischen Bedingungen untersucht wurde, untermauert dies. Das Gen *yqil* kodiert in *B. subtilis* vermutlich für eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase, deren hydrolytische Fähigkeit, gereinigtes Zellwandmaterial zu verdauen (*in vitro*), im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden konnte

(Abbildung 16). Eine Beteiligung des Yqil Enzyms an diesem Prozess schien somit möglich. Die Untersuchung der Zellmorphologie einer *yqiHIK* Mutante zeigte jedoch (Abbildung 19), dass die Zellwandhydrolase Yqil nicht kritisch an der Restrukturierung der Zellwand unter hyperosmotischen Bedingungen in *B. subtilis* beteiligt ist.

Die funktionelle Analyse von Autolysinen ist schwierig, da diese Enzymklasse eine hohe Redundanz aufweist (74, 258, 280). Es existieren oft mehrere homologe Proteine zu einem bestimmten Autolysin, die darüber hinaus noch gleichzeitig an diversen weiteren zellulären Prozessen beteiligt sind. Autolysine sind durch ihre Zellwand-hydrolytische Fähigkeit potentiell letal und unterliegen daher einem hohen Grad der Regulation (74, 258, 280). Weiterhin sind diese Enzyme kritisch für zahlreiche physiologische Funktionen, wobei bisher noch kein Autolysin entdeckt werden konnte, was essentiell zu sein scheint. Diese Tatsache deutet ebenso auf die hohe Redundanz dieser Enzyme hin. Datenbankanalysen zeigten (258), dass es in *B. subtilis* wahrscheinlich insgesamt 35 Autolysine gibt, welche sich vor allem in ihrer hydrolytischen Aktivität unterscheiden. Dabei existieren fünf homologe Amidasen zu dem Protein Yqil, die sich alle durch das Vorhandensein der katalytisch wichtigen Amidase\_3 Domäne auszeichnen, die typisch für N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen ist (Abbildung 15). Diese Amidasen sind für die Spaltung der Amidbindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und dem L-Alanin, der ersten Aminosäure des Peptidanteils im Peptidoglykan, verantwortlich. Die Konstruktion von simultanen Deletionsmutanten bis hin zur Konstruktion einer Quintupel-Mutante bestätigte, dass die homologen Amidasen LytC, CwIC, CwID sowie YrvJ ebenfalls nicht maßgeblich an der Umstrukturierung der Zellwand bei hohen Salinitäten beteiligt sind.

Die erstmalige Konstruktion und Analyse einer Quintupel-Mutante ( $\Delta yqiHIK$ ,  $\Delta lytC$ ,  $\Delta cwIC$ ,  $\Delta cwID$  und  $\Delta yrvJ$ ) demonstrierte jedoch, dass dieser Stamm immer noch lebensfähig war, obwohl eine Verzögerung im Wachstum unter normalen physiologischen als auch unter hyperosmotischen Bedingungen im Vergleich zum *B. subtilis* Wildtyp beobachtet werden konnte (Abbildung 18). Dieser Befund suggeriert, dass noch weitere Proteine in *B. subtilis* vorhanden sein müssen, die in der Lage sind, die oben genannte Amidbindung zu spalten. In der Tat konnten durch Datenbankanalysen (258), weitere Amidasen (XlyA, XlyB, BlyA, CwIA und CwIH) identifiziert werden, deren Gene auf Prophagen bzw. auf Prophagen verwandten DNA-Elementen kodiert vorliegen (151, 156, 206, 235, 271). Der Unterschied dieser Amidasen zu den Proteinen Yqil, LytC, CwIC, CwID sowie YrvJ ist, dass diese eine Amidase\_2 Domäne als katalytische Einheit besitzen, die ebenfalls häufig in N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen vorzufinden sind (74) (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Amidasen aus *B. subtilis* im Überblick

Protein	Funktion
LytC	Hauptautolysin während des vegetativen Wachstums (Zellteilung, Zellwand-Turnover, Zelllyse, Lyse der Mutterzelle, Motilität) (Amidase_3 Domäne) <b>Regulation:</b> SigA, SigD
CwIC	Sporulation (Lyse der Mutterzelle) (Amidase_3 Domäne) <b>Regulation:</b> SigK, SigG
CwID	Sporenkeimung (Amidase_3 Domäne) <b>Regulation:</b> SigE, SigG
YqiI	Vermutlich: Adaptation an hochosmolare Bedingungen, frühe Sporulation (Amidase_3 Domäne) <b>Regulation:</b> SigA
YrvJ	Unbekannt (Amidase_3 Domäne); Tiling-Array (205): Expressionsmuster analog zur Amidase LytC
BlyA	Kodiert von Prophage SP $\beta$ ; involviert in SP $\beta$ -vermittelte Zelllyse (Amidase_2 Domäne) <b>Regulation:</b> Induktion des Prophagen SP $\beta$
CwlA	Skin vermittelte Lyse (Skin: SigK intervening element; kryptischer Rest von Prophage) (Amidase_2 Domäne) <b>Regulation:</b> SigA (scheinbar nicht aktiv)
CwlH	Sporulation (Lyse der Mutterzelle; zusammen mit CwIC) (Amidase_2 Domäne) <b>Regulation:</b> SigK
XlyA	PBSX Prophagen assoziiertes Endolysin; involviert in PBSX-vermittelte Zelllyse (ähnlich zu CwlA) (Amidase_2 Domäne) <b>Regulation:</b> Induktion des Prophagen PBSX
XlyB	PBSX Prophagen assoziiertes Endolysin; involviert in PBSX-vermittelte Zelllyse (komplementiert $\Delta xlyA$ Phänotyp) (Amidase_2 Domäne) <b>Regulation:</b> Induktion des Prophagen PBSX

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass die Vermutung, Amidasen könnten alleinig an der Restrukturierung der Zellwand beteiligt sein, nicht zutreffend war. Die Tatsache, dass jedoch eine Mutation in einer der Amidasen YqiI, LytC, CwIC, CwID oder YrvJ ein Wachstumsdefizit hervorrufen kann, impliziert dennoch, wie wichtig die Integrität der Zellwand gerade unter hochosmolaren Bedingungen zu sein scheint. Vor allem die starke Salzinduktion des *yqiHIK* Operons spricht weiterhin für eine Beteiligung der YqiHIK Proteine an dem Prozess der Anpassung an hochosmolare Bedingungen in *B. subtilis*. Für eine detaillierte Analyse des Phänomens der wachstumsphasenabhängigen Umstrukturierung der bakteriellen Zellwand in hypertone Medium, müssten folglich diverse weitere simultane Genunterbrechungsmutanten generiert werden. Wie bereits angesprochen wurde, existieren weitere salzinduzierte Gene, die vermutlich für Proteine kodieren, die eine Rolle im Zellwandmetabolismus spielen (Tabelle 1). Die Konstruktion diverser Mutanten in denen verschiedene Sets dieser Gene deletiert wären, könnte möglicherweise Aufschluss darüber geben, ob in diesen Mutanten Veränderungen im Restrukturierungsprozess der Zellwand zu verzeichnen wären.



Wie bereits erwähnt wurde, scheint der Grad der Quervernetzung des Peptidoglykans zuzunehmen (171, 172), wofür letztlich Endopeptidasen verantwortlich sind. In der erwähnten Transkriptom-Studie von Steil *et al.* (265) konnte das Gen *yddJ* identifiziert werden, welches vermutlich für ein Lipoprotein kodiert. Interessanterweise liegt dieses Gen ebenfalls in einem Operon (*yddEFGHIJ*) vor, wobei das Gen *yddH* (*cwlT*) für ein Autolysin kodiert, welches sowohl eine N-Acetylmuramidase- als auch eine DL-Endopeptidase-Aktivität besitzt (84). Die Tatsache, dass der Sacculus in hypertonen Kulturen voraussichtlich dicker wird (171, 172, 217), würde ein Zusammenspiel diverser Zellwandhydrolasen voraussetzen und könnte ohnehin nicht alleinig durch Amidasen bewerkstelligt werden.

## 1.2. Die Wahrnehmung eines osmotischen Signals in *B. subtilis*

Eine Analyse der Expression des *yqiHIK* Operons bei steigenden NaCl-Konzentrationen zeigte eine Transkription des Genclusters erst, nachdem ein Schwellenwert von 0,7 M NaCl überschritten wurde. Die Expression fand ein Maximum bei einer NaCl-Konzentration von 1,2 M NaCl (Abbildung 24), wobei diese Salzkonzentration die obere Wachstumsgrenze in *B. subtilis* darstellt, wenn keine Osmoprotektiva ins Medium supplementiert werden (22). Interessanterweise konnte diese Art des Transkriptionsmusters bisher noch für kein anderes der salzinduzierten Gene von *B. subtilis* beobachtet werden (32, 262). In *B. subtilis* kodieren die *proHJ* Gene für die Proteine, die für die Synthese des kompatiblen Solutes Prolin verantwortlich sind (32), wohingegen das *opuE* Gen für ein osmotisch induziertes Prolin-Aufnahmesystem (OpuE) kodiert (282). Eine intensive Studie der osmotischen Induktion dieser Gene demonstrierte, dass deren Transkription sich proportional zu steigenden NaCl-Konzentrationen entwickelte. Dieses Transkriptionsmuster konnte ebenfalls für das Autolysin-Gen *yoch* gezeigt werden (248). Trotz der unterschiedlichen Expressionsprofile weisen diese Daten darauf hin, dass die Zelle in der Lage ist, kleinste Unterschiede in der externen Osmolarität wahrzunehmen und dies auf Transkriptionsebene umzusetzen. Diese Beobachtung weist auf die zentrale Frage hin: Wie wird das osmotische Signal von der *B. subtilis* Zelle wahrgenommen und weitergeleitet?

Für das *yqiHIK* Operon konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass dessen Transkription von dem ZKS DegS/DegU abhängig ist (Abbildung 28). In dieser regulatorischen Einheit kodiert das *degS* Gen für die Histidin-Kinase und das *degU* Gen wiederum für den zugehörigen Antwort-Regulator (55, 56, 71). Das DegU Protein fungiert bei der Regulation des *yqiHIK* Genclusters als Aktivator, da in einer *degSU* Deletionsmutante keine salzinduzierte Expression des Operons verzeichnet werden konnte. Unterstützend dazu zeigte eine Analyse des Transkriptionsniveaus des *yqiHIK* Genclusters in einer DegU-Hypermutable (*degU32(Hy)*), eine Erhöhung des Transkriptionslevels um den Faktor 7. In dieser Mutante ist der Phosphorylierungsstatus des DegU Proteins stabiler, da die Dephosphorylierungsreaktion der Sensor-Kinase DegS schwächer ist (111, 153, 177). Dies wiederum impliziert, dass der DegU Regulator nicht nur einen positiven Einfluss auf die Regulation des *yqiHIK* Operons hat, sondern vielmehr das DegU Protein in seiner phosphorylierten Form vorliegen muss.

Die Wahrnehmung eines spezifischen Stresssignals sowie die anschließende Weiterleitung dieses Reizes werden oftmals durch ZKS gewährleistet (71, 145, 210). Dabei ist eine Sensor-Kinase für die Wahrnehmung eines spezifischen Umweltreizes verantwortlich, sie wandelt dies in ein chemisches

Signal um, was wiederum einen zugehörigen Antwort-Regulator befähigt, eine selektive Genexpression zu fördern (71, 145, 210). Die Sequenzierung des *B. subtilis* Genoms zeigte, dass in diesem Organismus 37 Histidin-Kinasen und 34 Antwort-Regulatoren existieren (154). Davon bilden insgesamt 30 regulatorische Einheiten, in denen die Gene für Sensor-Kinasen und den Antwort-Regulatoren zusammen gefasst sind (71). In *B. subtilis* konnte bisher nur das Walk/WalR als essentiell identifiziert werden (269). Die meisten Sensor-Kinasen sind in der Zytoplasmamembran lokalisiert, von wo aus sie ein extrazelluläres Stresssignal wahrnehmen können. Interessanterweise stellt die Histidin-Kinase DegS eine Besonderheit dar, da dieses Enzym im Zytoplasma lokalisiert vorliegt (Abbildung 50).



**Abb. 50: Domänenstruktur der Histidin-Kinase DegS aus *B. subtilis*.**

Abgebildet ist der strukturelle Aufbau der Histidin-Kinase DegS. Diese besteht aus den folgenden drei Domänen: DegS (PF05384; Kinase-Aktivität), HisKA\_3 (PF07730; Sensor-Aktivität) sowie HATPase\_c (SM00387; ATP-Bindung).

In *B. subtilis* sind nur wenige Sensor-Kinasen im Zytoplasma lokalisiert, zentrale Beispiele dafür stellen die Kinasen KinA sowie KinC dar, die eine wichtige Rolle im Phosphorelay zur Phosphorylierung des Master-Regulators Spo0A einnehmen (129, 165). Die zytoplasmatische Lokalisation des DegS Proteins impliziert, dass die Aktivierung des ZKS DegS/DegU bei hoher Salinität durch ein intrazelluläres Signal erfolgen muss. Die Frage, ob ein osmotisches Signal existiert, was einheitlich für die Regulation zahlreicher Gene in *B. subtilis* verantwortlich ist (265), konnte bisher nicht geklärt werden. Zudem ist nicht klar, ob die *B. subtilis* Zelle osmotischen Stress als ein extrazelluläres Ereignis wahrnimmt, oder ob durch Veränderungen in der externen Osmolarität/Salinität Veränderungen in der Zusammensetzung des Zytoplasmas ausgelöst werden, die die Zelle dann als abgeleitetes Signal messen kann. Darüber hinaus konnte auch kein DNA-Motiv identifiziert werden, was typischerweise in der Promotorregion osmotisch induzierter Gene vorliegt und somit eine gerichtete Induktion oder auch Repression bestimmter Zielgene erlauben würde. Der Zusammenhang zwischen der DegS/DegU-abhängigen osmotischen Induktion des *yqiHIK* Operons sowie die zytoplasmatische Lokalisation der DegS Kinase deutet somit eindeutig auf ein zytoplasmatisches Signal in der Osmostress-Antwort in *B. subtilis* hin.

Bisher wurden vier unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert, wo die Signalwahrnehmung eines osmotischen Reizes stattfinden könnte, um schließlich Rückschlüsse auf die Art des Signals ziehen zu können. Hohe Salinitäten könnten demnach Veränderungen (1) im extrazellulären Milieu, (2) in der Zytoplasmamembran, (3) im Turgor oder (4) im Zytoplasma nach sich ziehen (30, 291).

Die hier vorgelegten Daten weisen auf ein intrazelluläres Signal hin, was eine Veränderung der intrazellulären Ionen und/oder Solut Konzentration impliziert. Man könnte annehmen, dass bei der Kultivierung von *B. subtilis* bei hohen NaCl-Konzentrationen, vermehrt Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle gelangen, die dort als osmotischer Reiz fungieren. Diese werden jedoch durch ihre Zytotoxizität (228) direkt wieder exportiert, wodurch eine hohe Na<sup>+</sup>-Ionenkonzentration als ein persistierendes

intrazelluläres Signal ausscheidet. Der Anspruch an ein osmotisches Signal würde jedoch vor allem darin begründet liegen, dass es zeitnah nach der Inokulierung von *B. subtilis* in hypertonem Medium vorhanden und zusätzlich auch spezifisch für diese Stresssituation ist. Unter hyperosmotischen Bedingungen stellt die sofortige intrazelluläre Akkumulation von Kaliumionen eine der initialen Stressantworten dar (139, 228). Im Hinblick darauf werden Kaliumionen als ein wahrscheinliches osmotisches Signal angesehen. Es konnte für *B. subtilis* gezeigt werden, dass nach einem osmotischen Up-Schock die  $K^+$ -Konzentration von 350 mM auf 650 mM innerhalb einer Stunde ansteigt (287, 288). Die Aufnahme dieser Ionen erfolgt dabei über die Ktr-Systeme (121). Ferner könnte man davon ausgehen, dass die drastische Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration beispielsweise die Bindung eines Transkriptionsfaktors an die DNA beeinflusst.

Durch die DegS/DegU abhängige Regulation des *yqiHIK* Operons existiert nun ein experimentell zugängliches System, um gezielt die Frage nach der Signalwahrnehmung sowie dessen Weiterleitung in *B. subtilis* unter osmotischen Stressbedingungen zu studieren. Dabei wäre es zunächst denkbar, eine Mutagenese des DegS/DegU Zwei-Komponenten-Systems durchzuführen und im Anschluss daran die Auswirkung auf die Transkription des *yqiHIK* Genclusters mittels der *yqiH-treA* Reporter-genfusion zu untersuchen. Ferner kann durch die zytoplasmatische Lokalisation des ZKS DegS/DegU ein *in vitro* Phosphorylierungs-Assay durchgeführt werden, der den Phosphorylierungsstatus beider Proteine durch radioaktiv-markiertes ATP nachvollziehen lässt. Mit Hilfe dieses Assays wäre es denkbar, die Auswirkungen der verschiedenen Stimuli auf die Autophosphorylierung der DegS Kinase zu untersuchen sowie den damit verbundenen Phosphotransfer auf den Antwort-Regulator DegU. Mit Hilfe dieses Systems könnte ebenfalls eine Art „Phospho-Mimicking“ durchgeführt werden, um die Frage zu adressieren, ob die Histidin-Kinase DegS tatsächlich für die Wahrnehmung des Osmo-Signals verantwortlich ist. Dabei müsste zunächst eine nicht-polare Deletion des *degS* Gens erfolgen. Anschließend könnte man den Antwort-Regulator durch andere Kinasen phosphorylieren und dessen Aktivität anhand der Induktion des *yqiHIK* Operons verfolgen. Ein geeigneter Kandidat wäre die Kinase ProB (207). Das *proB* Gen kodiert in *B. subtilis* für eine  $\gamma$ -Glutamat-Kinase, wobei dieses Enzym zusammen mit zwei weiteren Proteinen für die Synthese von Prolin ausgehend von dem Vorläufer-Molekül Glutamat verantwortlich ist (17). Das *proB* Gen bzw. die synthetisierte  $\gamma$ -Glutamat-Kinase geraten dadurch in den Fokus, da das *proB* Gen nicht salzinduziert ist (17). Folglich wäre interessant, ob eine *in vitro* Phosphorylierung des Antwort-Regulators DegS von Seiten der ProB Kinase erfolgen kann und ob DegU-P ebenfalls die Expression des *yqiHIK* Operons stimulieren könnte bzw. ob ferner die Induktion des *yqiHIK* Genclusters immer noch osmotisch induziert wäre. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Kopienzahl des *proB* Gens in der Zelle zu einer vermehrten Protease-Produktion führte (207). Ein weiterer interessanter Versuch könnte mit Hilfe einer KinC-DegS Hybrid-Kinase erfolgen, wie sie bereits durch López *et al.* beschrieben wurde (173). Dabei wurde die DegS-Domäne (Kinase-Funktion) der Histidin-Kinase DegS (Abbildung 50) durch die Transmembranen-Domänen sowie durch die PAS/PAC-Domäne der Kinase KinC ersetzt, wobei dieses Chimäre-Enzym nun membrangebunden vorliegt. Mit Hilfe dieses Systems könnte nun genauer untersucht werden, ob das *yqiHIK* Gencluster immer noch salzinduziert wäre, obwohl die Hybrid-Kinase nun in der Zytoplasmamembran vorliegen würde und KinC normalerweise kein osmotisches Signal wahrnimmt.

Für die Existenz eines intrazellulären osmotischen Signals konnten bisher noch weitere Beispiele in Mikroorganismen identifiziert werden. Ein zentrales Beispiel stellt dabei die Salzinduktion des SigB-Regulons in *B. subtilis* dar. Dieses wird als generelle Stressantwort nach einem Hitzeschock, Salzstress oder Ethanolstress induziert (106), wobei kürzlich osmotischer Stress als einer der stärksten Induktoren des SigB-Regulons bestimmt werden konnte (200). Das SigB-Regulon umfasst ca. 200 Gene und somit 5 % des gesamten Genoms von *B. subtilis* (106, 183). Deletiert man das *sigB* Gen, zeigt die Zelle jedoch keinen signifikanten salzsensitiven Phänotyp (106). Die SigB-abhängige Kaskade wird in *B. subtilis* unmittelbar nach einem hyperosmotischen Up-Schock induziert, was dann aber lediglich eine transiente Genexpression der Zielgene mit sich zieht. Die Induktions-Kaskade ist hochkomplex und setzt eine Beteiligung von zahlreichen Regulatoren voraus. Ein besonderer Aspekt stellt dabei das sogenannte „Stressosom“ dar (183). Dabei handelt es sich um eine Art Signal-Zentrum, das aus einem komplexen Zusammenschluss der Proteine RsbR, RsbS und RsbT besteht. In diesem Signal-Zentrum werden diverse Signale aus der Umwelt als Stressfaktoren erkannt und schließlich als ein Einzelsignal ausgeschleust (183, 218, 234). Die Lage des „Stressosoms“ ist ebenfalls zytoplasmatisch und stellt ein besonderes Beispiel dafür dar, wie Bakterien ihre Umwelt wahrnehmen und darauf reagieren können. Ein weiteres System, das eine Veränderung in der Osmolarität wahrnimmt, ist das ZKS EnvZ/OmpR aus *E. coli* (38, 77, 237). EnvZ ist eine Histidin-Kinase, die in der inneren Membran lokalisiert vorliegt, wohingegen OmpR den zugehörigen Antwort-Regulator darstellt. Obwohl die Sensor-Kinase EnvZ in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist und man zunächst davon ausgegangen ist, ein periplasmatisches Signal würde die Signalweiterleitung auslösen, konnte dennoch gezeigt werden, dass die Signalperzeption im Zytoplasma abläuft (77, 237). Des Weiteren konnte für das ZKS MtrB/MtrA von *Corynebacterium glutamicum* ebenfalls gezeigt werden, dass dieses System in die Osmostress-Antwort sowie in den Zellwandmetabolismus involviert ist (192). Dabei wurde analog zu dem ZKS EnvZ/OmpR aus *E. coli* postuliert, dass die MtrB Histidin-Kinase ein zytoplasmatisches Signal wahrnehmen muss, was unabhängig von der im Periplasma lokalisierten Domäne geschieht (192). Ferner konnte der Glycin-Betain Transporter BetP ebenfalls aus *C. glutamicum* erstmalig eindeutig als Kaliumsensor identifiziert werden (245). Dabei ist eine C-terminale zytoplasmatische Domäne für die Wahrnehmung der  $K^+$ -Konzentration verantwortlich. In vorangegangenen Studien wurden bereits die Aufnahmesysteme OpuA aus *Lactobacillus lactis* sowie ProP aus *E. coli* als Osmosensoren diskutiert, die ebenso eine intrazelluläre Veränderung der Ionen/Osmolyt Konzentration wahrnehmen können (53, 231, 238, 277).

### **1.2.1. Das Regulon des Zwei-Komponenten-Systems DegS/DegU sowie dessen Beteiligung an der Regulation des *yqiHIK* Operons**

Das ZKS DegS/DegU aus *B. subtilis* war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Dabei haben Studien gezeigt, dass dieses Signaltransduktions-System vor allem Prozesse reguliert, die während dem Übergang der exponentiellen Wachstumsphase zur stationären Phase stattfinden (56, 71, 198). Dazu gehören die Induktion und Synthese von sekretierten degradierenden Enzymen (Subtilisin und Levansucrase), die Regulation von Genen, die während der späten Kompetenzphase notwendig sind, sowie die Repression der Gene, die dem SigD-Regulon zugehörig sind. Interessanterweise konnten die kodierenden Gene (*degS* und *degU*) des ZKS in der Transkriptom-

Studie salzgestresster *B. subtilis* Zellen entdeckt werden, wo diese eine 4-fache Induktion aufwiesen (265).

Zudem wurde bereits durch unterschiedliche Ansätze versucht ein DegS/DegU Regulon zu definieren. Dabei beruhte ein Ansatz darauf, das Expressions-Profil in einem *B. subtilis* Stamm zu analysieren, in dem das *degS* Gen deletiert vorlag, wohingegen die Transkription des *degU* Gens mittels eines IPTG induzierbaren Promotors gesteuert wurde (213). In einem anderen Ansatz fand eine Transkriptions-Analyse in einer *B. subtilis degU32(Hy)* Mutante statt, die die phosphorylierte Form des Antwort-Regulators stabilisiert (177). Ein Vergleich der Transkriptom-Studien, die zur Identifikation salzinduzierter Gene führte (265) mit dem postulierten DegS/DegU Regulon (177, 213), zeigten eine Überlappung von 15 Genen (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Vergleich der Transkriptom-Studien: Salzinduktion-DegS/DegU-Regulon

Gen	Funktion
<i>yddT</i>	Putatives Phagen Protein; Signalsequenz vorhanden (168)
<i>yfjA<sup>a</sup></i>	Unbekannt; WXG100-Domäne vorhanden (PF06013): Neues Sekretionssystem in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; verleiht Immunität (216)
<i>yfjB<sup>a</sup></i>	Unbekannt
<i>yfjC<sup>a</sup></i>	Unbekannt
<i>yitM</i>	Unbekannt; Signalsequenz sowie transmembrane Domäne vorhanden (168)
<i>yjhA</i>	Putatives Lipoprotein; TRF-2 Domäne vorhanden (PF11611) (261)
<i>exlX (yoaJ)</i>	Extrazelluläre Endoglucanase (Vorläufer) (Expansin) (141)
<i>yomL</i>	Putatives Phagen Protein (SPβ); Signalsequenz vorhanden (168)
<i>yqxI<sup>p</sup></i>	Unbekannt; Skin Element; Signalsequenz vorhanden (168)
<i>yqxJ<sup>p</sup></i>	Unbekannt; Skin Element; „Coiled Coil“ Region vorhanden (168)
<i>yukC<sup>c</sup></i>	Putatives membrane-assoziiertes Enzym; involviert in Bacteriocin Produktion ( <a href="http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList">http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList</a> )
<i>yukD<sup>c</sup></i>	Putatives Bacteriocin ( <a href="http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList">http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList</a> )
<i>ywqH<sup>d</sup></i>	Unbekannt; „Coiled Coil“ Region vorhanden (168)
<i>ywqI<sup>d</sup></i>	Unbekannt; „Coiled Coil“ Region vorhanden (168)
<i>ywqJ<sup>d</sup></i>	Putative Transposase oder Phagen Integrase ( <a href="http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList">http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList</a> )

<sup>abcd</sup>Transkriptionseinheit in *B. subtilis*

Eine Analyse der überlappenden Gene zeigte jedoch, dass keines der resultierenden Genprodukte nach bisherigem Kenntnisstand funktionell mit der Osmoregulation in *B. subtilis* in Verbindung gebracht werden konnte. Für einige dieser Gene konnte im Rahmen einer weiteren Dissertation (95) die Salzinduktion bestätigt werden. Überraschenderweise konnte das *yqiHIK* Operon bisher nicht als Mitglied des DegS/DegU Regulon identifiziert werden (177, 213).

Der DegU Regulator kann unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren (52, 196, 198, 212). In *B. subtilis* werden beispielsweise die Gene *aprE* (Alkanische Protease; Subtilisin) und *sacB* (Levansucrase) durch die phosphorylierte Form von DegU reguliert, wohingegen das *comK* Gen (Master-Regulator für Kompetenz) wiederum durch die nicht-phosphorylierte Form des Regulators stimuliert wird (197, 209, 211, 274). Für diese Gene konnte eine AT-reiche Bindestelle identifiziert werden, die entweder aus einer direkten (*aprE*, *sacB*) oder gegenläufigen Sequenzwiederholung besteht (*comK*). Dabei konnte kürzlich gezeigt werden, dass für beide Bindemotive eine Präferenz besteht, je nachdem ob der Regulator DegU in seiner phosphorylierten oder nicht-phosphorylierten Form vorliegt (212). Beide Arten der Bindemotive konnten in der AT-reichen Region des *yqiHIK* Promotorbereichs identifiziert werden, die ca. 180 bp vor der -35 Region des salzinduzierbaren SigA-Promotors lokalisiert vorliegen (Abbildung 49). Diese neuen Erkenntnisse (212) sowie die Art der Regulation des *yqiHIK* Operons durch die phosphorylierte Form des DegU Regulators lassen die Erkennung und Bindung durch eine direkte Sequenzwiederholung (*aprE*, *sacB*) als wahrscheinlicher gelten. Ob diese Vermutung für das *yqiHIK* Operon jedoch tatsächlich zutreffend ist, müsste durch DNA-Bandshift- sowie DNA-Footprinting-Analysen bestätigt werden.

Obwohl die Gene *aprE*, *sacB* sowie *wapA* (Zellwand-assoziiertes Protein) durch die phosphorylierte Form des Antwort-Regulators DegU reguliert werden und zudem das *degSU* Operon ebenfalls osmotisch induziert wird, konnte jedoch nur für das *sacB* Gen eine Salzinduktion festgestellt werden, wohingegen die anderen beiden Gene reprimiert werden (Tabelle 1) (57, 155, 240). Das *sacB* Gen konnte wiederum nicht in den Transkriptom-Daten salzgestresster *B. subtilis* Kulturen identifiziert werden (265) und wird aufgrund dessen nicht in Tabelle 9 genannt. Somit stellt die Identifikation des *yqiHIK* Operons das erste Target des ZKS DegS/DegU dar, für das ein Einfluss während der Osmoadaptation in *B. subtilis* postuliert wird, sowie für das eine intensive Studie über die osmotische Induktion sattgefunden hat.

Die Tatsache, dass der Regulator DegU sowohl als Repressor als auch Aktivator fungieren kann und zusätzlich das Protein in seiner phosphorylierten sowie nicht-phosphorylierten Form die Expression verschiedener Gene stimulieren kann, macht die Identifikation eines vollständigen DegS/DegU Regulon schwierig. Nichtsdestotrotz könnte eine neue Transkriptom-Studie durchgeführt werden, die darauf abzielen würde, vor allem die Gene zu identifizieren, die einerseits abhängig von der Regulation des ZKS DegS/DegU sind und andererseits noch osmotisch induziert sind. Dies könnte vielleicht ermöglichen, putativ vorhandene Unterschiede in den regulatorischen Bereichen dieser Gene aufzudecken, um ferner zu verstehen, wie diese zu einer unterschiedlichen Art der Regulation von Seiten des Antwort-Regulators DegU führen.

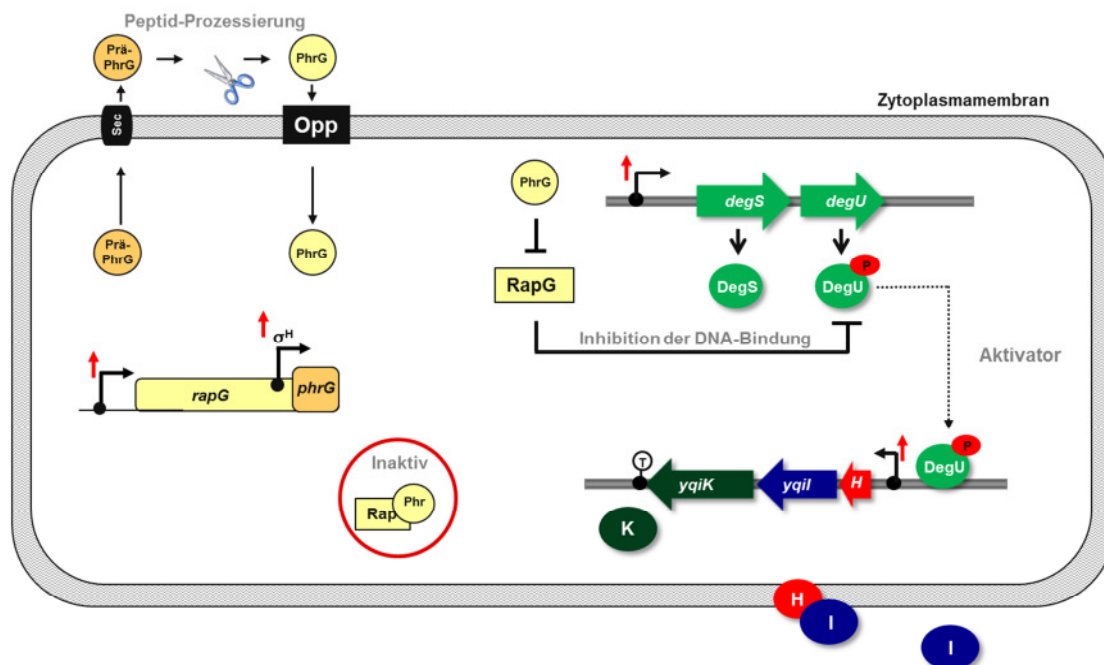
### 1.2.2. Das Modell zur osmotischen Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*

Die Aktivität des DNA-Bindeproteins DegU hängt in *B. subtilis* von verschiedenen Faktoren ab. Ein Beispiel für einen solchen Faktor stellt das RapG Protein (Regulator aspartyl-phosphate) dar (223), welches wiederum zu dem Rap-Phr System in *B. subtilis* gehört (223). Es konnten elf *rap* Gene (*rapA-rapK*) auf dem Chromosom von *B. subtilis* identifiziert werden die jeweils für Phosphatasen kodieren (154, 162). Bei diesen Phosphatasen handelt es sich um wichtige Komponenten der Phosphorelay-Signaltransduktion, die zentral an der Einleitung/Regulation des Sporulationsprozesses in *B. subtilis* beteiligt sind. Die Proteine RapA und RapB sind beispielsweise für die Dephosphorylierung des Spo0F Proteins verantwortlich und stellen somit einen negativen Regulator für die Sporulation in *B. subtilis* dar (223, 224). Weitere sechs dieser *rap* Gene werden auf dem Genom von *B. subtilis* von einem Leserahmen gefolgt, der für ein kleines extrazelluläres Vorläufer-Peptid kodiert (*phr*), dessen Transkription von einem eigenen SigH-abhängigen Promotor erfolgt (188). Das reife Phr Peptid ist in der Lage, die zugehörige Rap Phosphatase in ihrer Funktion zu inhibieren (222, 223). Dabei werden zunächst die Prä-Pentapeptide (Prä-Phr) als kleine Proteine mit einer Signalsequenz synthetisiert. Anschließend erfolgt eine Sec-abhängige Exkretion der Prä-Phr Peptide über die Zytoplasmamembran, die von einer Prozessierung des Proteins gefolgt wird (226). Das reife Phr Peptid wird im Anschluss daran erneut in das Zytoplasma zurück transportiert. Der Import erfolgt dabei über das ABC-Transportsystem Opp (223, 225, 226).

Das zugehörige Pentapeptid zu der Phosphatase RapG ist PhrG (208, 223). Das RapG Protein reguliert negativ den Transkriptionsfaktor DegU, indem dessen DNA-Bindeaktivität inhibiert wird (208). Diese Inhibition geht jedoch nicht mit einer Dephosphorylierungsreaktion von Seiten des RapG Proteins einher, wie es zudem für viele der anderen Rap Phosphatasen beschrieben wurde. Der negative Einfluss von Seiten des RapG Proteins wird wiederum durch das PhrG Pentapeptid aufgehoben, sobald dieses nach der extrazellulären Prozession erneut ins Zytoplasma transportiert wurde und an das RapG Protein binden konnte. Interessanterweise wurden die Gene *rapG* sowie *phrG* ebenfalls in der Transkriptom-Studie salzgestresster *B. subtilis* Zellen identifiziert, wo sie eine 3 bzw. 11-fache Induktion aufwiesen (265). Das daraus resultierende Modell zur Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen wird im Folgenden vorgestellt und ist in Abbildung 51 dargestellt.

Eine Induktion der Transkription des *yqiHIK* Operons findet unter hochosmolaren Bedingungen statt, sobald eine NaCl-Konzentration von 0,7 M NaCl des Kulturmediums überschritten wird. Das Expressionsniveau des Genclusters entwickelt sich dabei simultan zur Wachstumskurve und erreicht ein Maximum bei dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase. Diese Salzinduktion der Transkription ist wiederum von dem DegU Regulator abhängig. Die Gene, die für das DegS/DegU ZKS kodieren, werden ebenfalls durch hochosmolare Bedingungen induziert (265). Die Sensor-Kinase DegS nimmt ein zytoplasmatisches Signal wahr, was schließlich zur Autophosphorylierung des Enzyms führt. Im Anschluss daran phosphoryliert die DegS Histidin-Kinase den zugehörigen Response-Regulator DegU. Dieser Transkriptionsfaktor ist jedoch zunächst nicht in der Lage, an die DNA zu binden, da dieser durch die Phosphatase RapG daran gehindert wird. Die Expression des *rapG* sowie *phrG* Gens wird ebenfalls in hypertonen Kulturen induziert (265). Nach der Synthese des

PhrG Prä-Peptides wird dieses mit Hilfe einer Sec-abhängigen Translokationsmaschinerie ins extrazelluläre Milieu transportiert (223). Dort findet im Anschluss eine Prozessierung des Prä-Peptides statt, wobei das reife Pentapeptid anschließend über den Oligopeptid-Transporter Opp zurück ins Zytoplasma gelangt (225). Dort ist das PhrG Peptid in der Lage an die korrespondierende Phosphatase RapG zu binden. Durch die Formation dieses Komplexes kann das RapG Protein die DegU Bindeaktivität nicht mehr länger inhibieren (222). In Folge dessen ist der phosphorylierte Transkriptionsfaktor DegU in der Lage an die Promotorregion des *yqiHIK* Proteins zu binden. Dort erkennt dieser ein AT-reiches Bindemotiv auf der DNA, was in erheblicher Entfernung zur -35 Region des SigA-Promotors vorliegt (Abbildung 49). Durch die Bindung des DegU Proteins an die *yqiHIK* Promotorregion wird die Transkription des Genclusters über einen SigA-abhängigen Promotor induziert (Abbildung 25), wobei denkbar ist, dass die stromaufwärtsgelegene DegU Binderegion in räumliche Nähe zu dem Promotorbereich gebracht wird, wodurch schließlich die Interaktion der RNA-Polymerase stabilisiert bzw. ermöglicht wird (87, 268).



**Abb. 51: Das Modell zur osmotischen DegS/DegU-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Operons.**

Gezeigt ist das postulierte Modell zur osmotischen Induktion des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis*. Dabei wird die Beteiligung des DegS/DegU Zwei-Komponenten-Systems gezeigt, die wiederum durch das RapG/PhrG System reguliert wird. Die roten Pfeile symbolisieren die Salzinduktion der zugehörigen Gene.

Bei der hier postulierten Beteiligung des RapG-PhrG Systems an der DegS/DegU-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Operons handelt es sich um eine experimentell gut testbare Voraussage. Mit Hilfe einer Deletion der Gene *phrG* sowie *opp* (ABC-Transporter) könnte diese Hypothese final bestätigt werden. In beiden Fällen würde das reife Peptid PhrG nicht mehr im Zytoplasma lokalisiert vorliegen und könnte somit keine Wechselwirkung mit dem DegU-Inhibitor RapG einnehmen. Folglich würde die Transkription des *yqiHIK* Operons bei hohen Salinitäten ausbleiben. Des Weiteren wäre eine Analyse einer *rapG* Deletionsmutante im Hinblick auf die Expression des *yqiHIK* Operons bei



steigenden NaCl-Konzentrationen interessant. Die Deletion des *rapG* Gens würde einerseits dazu führen, dass das DNA-Bindeprotein DegU ungehindert an die Promotorregion der *yqiHIK* Transkriptionseinheit binden kann, andererseits könnte dies jedoch dazu führen, dass das Operon nun bereits durch moderate NaCl-Konzentrationen induzierbar sein könnte, wie es für die Gene *proHJ* (32), *opuE* (262) sowie *yocH* (248) beschrieben werden konnte, wobei diese osmotisch induzierbaren Gene nicht durch das DegS/DegU System gesteuert werden.

Darüber hinaus stellt sich auch die Frage, ob das RapG/PhrG System generell eine Rolle bei der osmotischen Regulation der DegS/DegU abhängigen Regulation der zuvor identifizierten Gene (Tabelle 9) spielt. Es könnte sich demnach herausstellen, dass das hier vorgestellte Modell (Abbildung 51) nicht nur auf das *yqiHIK* Operon zutreffend ist, sondern eher als generell anwendbares Modell angesehen werden kann.

Das ZKS DegS/DegU könnte demnach für eine bestimmte Anzahl osmotisch induzierbarer Gene als generelles Signaltransduktions-System für die Osmoregulation in *B. subtilis* in Frage kommen. Da das *yqiHIK* Operon nicht in den Transkriptom-Analysen (DegU Regulon) identifiziert werden konnte (177, 213), könnten ebenso noch weitere Zielgene existieren, die bisher nicht in Betracht gezogen wurden. Für zahlreiche salzinduzierte Gene, deren Genprodukte vor allem für das Wassermanagement sowie die Turgorstabilisierung unter hyperosmotischen Stressbedingungen verantwortlich sind, kann eine Beteiligung des DegS/DegU Systems ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz könnte ferner die Art der Signalwahrnehmung und Weiterleitung eines osmotischen Reizes durch dieses Signaltransduktions-System einen prinzipiellen Einblick ermöglichen, welche Parameter notwendig für die osmotische Induktion eines Gens in *B. subtilis* sind. Im Falle des *proHJ* Genclusters ist beispielsweise schon bekannt, dass ein 126 bp langes DNA-Fragment, welches die Promotorregion umfasst, ausreichend ist, um in *cis* eine Salzinduktion des *proHJ* Operons zu gewährleisten (32).

## 2. Die Beteiligung des Repressors SinR an der Regulation des *yqiHIK* Operons

Grundlage für die Untersuchung einer möglichen Beteiligung des SinR Proteins an der Regulation des *yqiHIK* Operons stellte das Ergebnis der kürzlich veröffentlichten Tiling-Array Analysen dar (205). Dort konnte eine Repression der *yqiHIK* Transkriptionseinheit festgestellt werden, sobald *B. subtilis* Kulturen unter biofilminduzierenden Bedingungen kultiviert wurden. Das SinR Protein ist ein globaler Regulator für die Biofilm-Formation in *B. subtilis* (135). Dabei fungiert das SinR Protein als direkter Repressor für ein 15 Gene umfassendes Operon (*epsA-O*), welches für Proteine kodiert, die an der Matrix-Produktion beteiligt sind (27). Zusätzlich konnte ein weiteres Ziel-Operon identifiziert werden, dessen Expression von SinR inhibiert wird. Dabei handelt es sich um das *yqxM-sipW-tasA* Operon (46), wobei die Genprodukte zusammen mit den Matrix-bildenden Proteinen eine Voraussetzung für die Ausbildung eines Biofilms in *B. subtilis* sind. Angrenzend zu dem *sinR* Leserahmen befindet sich stromaufwärts gelegen ein weiterer Leserahmen, nämlich der des *sinI* Gens (167). Das SinI Protein konnte als ein Antagonist zu dem SinR Protein identifiziert werden, wobei die Ausbildung eines SinR-SinI Komplexes die inhibierende Funktion des SinR Proteins aufhebt (135, 167, 175). Das *sinR* Gen wird konstitutiv von einem SigA-abhängigen Promotor exprimiert, wohingegen die Synthese des SinI Proteins abhängig von der Konzentration des phosphorylierten Spo0A Proteins in *B. subtilis* ist (252).

Bei dem SinR Repressor handelt es sich um ein DNA-Bindeprotein, welches eine spezifische Sequenz auf der DNA erkennt (46, 135) und diese als Tetramer bindet (50). Diese DNA-Erkennungssequenz besteht aus 7 bp und kann in mehrfacher Ausführung sowie gegenläufiger Orientierung auf dem Chromosom vorkommen. Eine Inspektion der *yqiHIK* Promotorregion deutete tatsächlich auf zwei mögliche SinR Bindemotive hin. Der als Bindemotiv I definierte DNA-Bereich überlappte dabei mit der -35 Region des salzabhängigen SigA-Promotors, wobei das Bindemotiv II 18 bp stromaufwärts zu dem Bindemotiv I lokalisiert vorliegt (Abbildung 49).

Die Analyse einer *sinR* sowie *sinI* Deletionsmutante auf die Transkription des *yqiHIK* Operons deutete in der Tat auf eine Beteiligung der SinR und SinI Proteine an der Regulation der *yqiHIK* Transkriptionseinheit hin (Abbildung 33). Zusätzlich führte eine zielgerichtete Mutagenese der beiden putativen Bindemotive zu der Annahme, dass beide Konsensus-Bereiche von dem SinR Protein erkannt und gebunden werden (Abbildung 33). Zur abschließenden Bestätigung dieser These müsste jedoch eine DNA-Bandshift- sowie DNA-Footprinting-Analyse durchgeführt werden. In den *treA*-Reporterstudien konnte in einer *sinR* Deletionsmutante ein Anstieg der Transkription des Genclusters unter normalen physiologischen Bedingungen (SMM-0 M NaCl) beobachtet werden. Dies führte zu der Hypothese, dass der SinR Repressor durch die Interaktion mit der -35 Region des SigA-Promotors dafür verantwortlich sein könnte, die Transkription des Operons unter normalen physiologischen Bedingungen niedrig zu halten. Untermuert wurde dies durch die Beobachtung, dass sobald der Antagonist SinI fehlte und somit SinR an die DNA gebunden bleibt, ein Anstieg der Expression in SMM-0 M NaCl ausblieb. Ein ähnliches Expressionsverhalten konnte unter hyperosmotischen Bedingungen beobachtet werden. In einer *sinR* Deletionsmutante konnte ein Transkriptionsniveau festgestellt werden, dass dem der Wildtyp *treA*-Reporterfusion entsprach. Lag jedoch das *sinI* Gen deletiert vor, fiel unter hyperosmotischen Bedingungen die Promotoraktivität auf ein Basalniveau zurück (Abbildung 33). Es stellte sich nun die Frage warum die Überlappung des SinR Repressors mit der -35 Region des SigA-Promotors nicht dazu führt, dass bei hohen Salinitäten die Expression des *yqiHIK* Operons ebenfalls reprimiert wird, wie es unter normalen physiologischen Bedingungen beobachtet werden konnte. Dafür sind zwei mögliche Ursachen denkbar. Erstens könnte unter salinen Bedingungen die stromaufwärtsgelegene Binderegion (Bindemotiv II) bevorzugt gebunden werden. Zweitens könnte man annehmen, dass die Affinität der DNA-Polymerase zu der Promotorregion unter osmotischen Kulturbedingungen stärker ist, wie die des SinR Repressors und diesen somit verdrängt. Zudem könnte eine Veränderung des DNA-Supercoilings eine Bindung der DNA-Polymerase zur Promotorregion fördern. Die Veränderung des DNA-Supercoilings als globales Regulationssystem wurde mehrfach diskutiert (276), dabei konnte gezeigt werden, dass in der Tat veränderte Umweltbedingungen, wie der Erhöhung der Osmolarität, zu einer Veränderung der DNA-Topologie führen (7, 92, 115, 150).

### 2.1. Die Induktion des Operons nach Initiation der Sporulation

Nachdem ein möglicher Einfluss des SinR Proteins an der Regulation des *yqiHIK* Operons bestätigt werden konnte, stellte sich anschließend die Frage, welche physiologischen Implikationen dies im Hinblick auf die YqiHIK Proteine hat. In dieser Arbeit wurden alle physiologischen Experimente mit der domestizierten *B. subtilis* Wildtyplinie 168 durchgeführt. Dieser Stamm ist nicht in der Lage einen

robusten Biofilm auszubilden, wofür kürzlich die exakten Mutationen, die diesem Defekt zu Grunde liegen, aufgeklärt werden konnten (187). Ich konnte eine SinR/SinI-Abhängigkeit für die Regulation des *yqiHIK* Genclusters unter sporulationsspezifischen Bedingungen feststellen. Dabei zeigte sich, dass in einer *sinR* Deletionsmutante die Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons, die der Wildtyp *treA*-Fusion überragte, wohingegen das Transkriptionslevel in einer *sinI* Deletionsmutante weit unter dem des Wildtyp-Niveaus lag (Abbildung 33). Diese Beobachtung wird durch frühere Studien unterstützt, in denen das SinR Protein als Inhibitor für die Sporulation sowie die extrazelluläre Protease Produktion definiert wurde (**Sporulation inhibition**) (179).

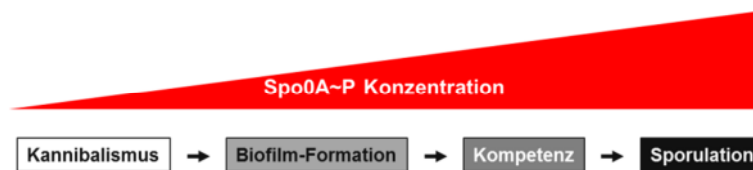
Die Sporulation ist ein hochkomplexer Differenzierungsprozess in *B. subtilis*, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind (70, 116, 227). Die Sporulation wird dabei in verschiedene Stufen eingeteilt (Abbildung 2), wobei die jeweiligen Phasen der Sporulation durch verschiedene Sigmafaktoren dominiert werden, die letztlich eine gerichtete Genexpression der Zielgene ermöglichen. Die Tatsache, dass die Transkription des *yqiHIK* Genclusters direkt nach dem Eintritt in die Sporulation erfolgt, impliziert, dass die Genprodukte eine Rolle während der frühen Sporulation zu spielen scheinen. Dabei ist bekannt, dass zahlreiche Zellwandhydrolasen in den Sporulations-Prozess involviert sind. Diese können sowohl an der Hydrolyse des Peptidoglykans der Mutterzelle sowie der Bildung des Sporen-Peptidoglykans beteiligt sein, als auch in die Sporenkeimung eingreifen (43, 249, 258, 280). Eine ähnliche Funktion könnte auch für die Zellwandhydrolase Yqil angenommen werden. Zudem zeigte die Bestimmung der Sporulationsfrequenz der *yqiHIK* Mutante zwar keine Auswirkung in dem sporulationsspezifischen Medium DSM (Abbildung 37), jedoch konnte eine Hyper-Sporulation der Deletionsmutante in dem definierten Minimalmedium SMM beobachtet werden (Abbildung 38).

Der Sigmafaktor, der für die Regulation früher sporulationsspezifischer Gene verantwortlich ist, ist SigH (33, 93). Eine Primer-Extension-Reaktion, die zur Identifizierung des *yqiHIK* Sporulations-Promotors durchgeführt wurde (Abbildung 42), deutete auf einen SigH-abhängigen Promotor hin. Dieser konnte jedoch in weiteren Studien nicht bestätigt werden. Eine Inspektion der *yqiHIK* Promotorregion deutete zudem auf keine SigH-Konsensus Region hin. Diese ist überdies schwierig zu identifizieren, da nicht viele hochkonservierte Bereiche in dieser Sequenz vorliegen (33). Die SinR/SinI-abhängige Regulation des *yqiHIK* Operons wurde in den Sporulations-Pathway integriert und wird im Folgenden Abschnitt vorgestellt (Abbildung 53).

## 2.2. Das Modell zur SinR/SinI-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Operons

In *B. subtilis* agieren fünf Kinasen (KinA-KinE) gleichzeitig, um den Master-Regulator Spo0A zu phosphorylieren (129). Der Phosphorylierungs-Reaktion liegt zugrunde, dass die Konzentration von phosphoryliertem Spo0A (Spo0A~P) ausschlaggebend für die Art der Differenzierung in *B. subtilis* ist (81, 174). Niedrige Level von Spo0A~P führen zu der Aktivierung von Genen, deren Produkte beispielsweise eine Rolle während des Kannibalismus spielen (81). Im Gegensatz dazu ist eine hohe Konzentration von Spo0A~P notwendig, um die Sporulation zu initiieren (81, 82). Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, dass die zahlreichen Zielgene eine unterschiedliche Affinität zu dem DNA-Bindeprotein Spo0A aufweisen (193). Die Abfolge der zellulären Differenzierungsprozesse in Abhängigkeit steigender Spo0A~P Konzentration lautet: Kannibalismus, Biofilm-Formation,

Kompetenz und schließlich Sporulation (Abbildung 52). Hierbei ist zu erwähnen, dass die diversen zellulären Prozesse immer nur in einer Subpopulation, innerhalb einer genetisch identischen Population vollzogen werden. Dieses Phänomen wird als Bistabilität beschrieben (63, 174).



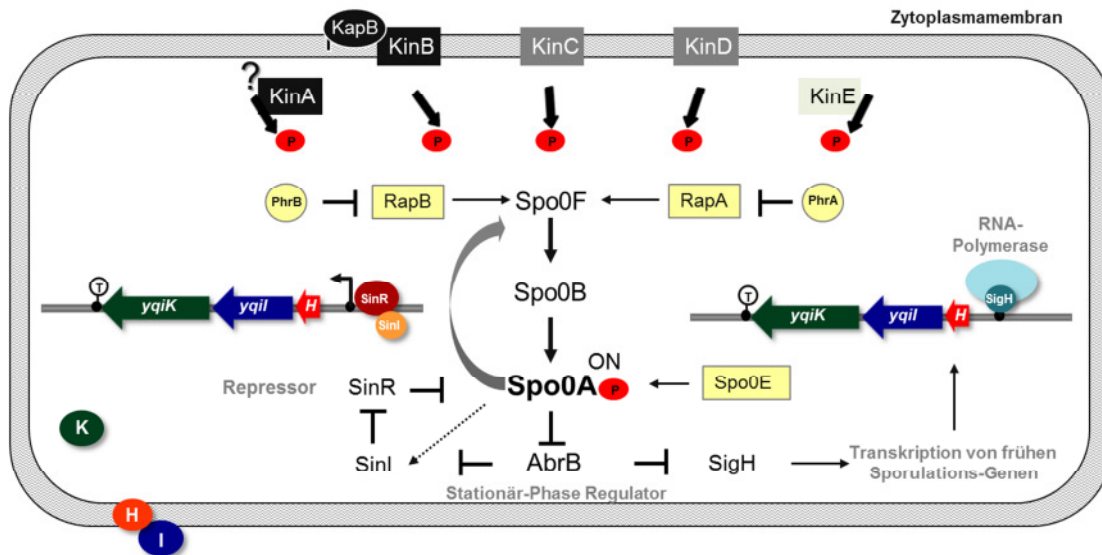
**Abb. 52: Differenzierungsmöglichkeiten in *B. subtilis* und deren Abhängigkeit zur Spo0A Konzentration.**

Aufgelistet sind verschiedene Differenzierungsmöglichkeiten (Kannibalismus, Biofilm-Formation, Kompetenz und Sporulation) in *B. subtilis*. Die Abfolge dieser zellulären Prozesse ist abhängig von der Konzentration des phosphorylierten Master-Regulators Spo0A (Spo0A~P).

Die Kinasen KinA sowie KinB sind maßgeblich in den Prozess der Sporulation involviert, wohingegen die Kinasen KinC und KinD bei der Biofilm-Formation eine wichtige Rolle einnehmen (129, 164, 165). Nach der Autophosphorylierung der Kinasen wird zunächst das Phosphotransferase-Protein Spo0F phosphoryliert. Im Anschluss daran findet ein Phosphorelay über die Phosphotransferase Spo0B hin zum Master-Regulator Spo0A statt (35, 116, 227). Befindet sich der Regulator Spo0A in seiner phosphorylierten und somit aktiven Form (Spo0A~P → ON), kann nun abhängig des Spo0A~P Levels eine gerichtete Transkription diverser Zielgene erfolgen. Der Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors Spo0A wird zusätzlich über diverse Phosphatasen reguliert, die an verschiedenen Stellen des Phosphorelays eingreifen können (223). Beispiele dafür stellen die Phosphatasen RapA und RapB dar, die das Spo0F Protein dephosphorylieren können und wiederum durch die zugehörigen regulatorischen Peptide PhrA bzw. PhrB in ihrer Phosphatase-Aktivität gehindert werden (223, 226). Eine weitere Phosphatase-Aktivität besitzt das Spo0E Protein, welches direkt in der Lage ist, den Master-Regulator Spo0A zu dephosphorylieren (223). Ein weiterer zentraler Regulator in dieser Signalkaskade stellt das AbrB Protein dar (47). Dabei handelt es sich um einen globalen Repressor, der für die Repression zahlreicher Gene verantwortlich ist (47). Das AbrB Protein reprimiert beispielsweise die Expression der Gene *sinI* sowie *sigH*. Steigt jedoch die Konzentration des aktiven Spo0A Regulators (Spo0A~P) führt dies wiederum zur Repression des *abrB* Gens, was schließlich einen positiven Effekt auf die Transkription der zuvor genannten Gene hat. Der Regulator SinR ist ebenfalls für die Repression zahlreicher Gene verantwortlich (46, 135, 167). Diese Repression kann durch die Spo0A~P abhängige Synthese des Antagonisten SinI aufgehoben werden. Das SinI Protein bindet dabei an SinR, was eine Konformationsänderung nach sich zieht, die dazu führt, dass der Repressor seine DNA-Bindeaktivität verliert (46, 135, 167).

Im Hinblick auf die Regulation des *yqiHIK* Operons postuliere ich nun das folgende Modell. Zunächst erkennt der Repressor SinR ein spezifisches Bindemotiv in der Promotorregion des *yqiHIK* Operons. Dies führt dazu, dass eine Transkription des Genclusters zunächst ausbleibt. Wird durch die Kinasen KinA sowie KinB ein spezifischer Reiz erkannt, der auf eine Nahrungslimitation zurückgeführt werden kann, wird die Signaltransduktions-Maschinerie in Gang gesetzt. Liegt der Master-Regulator Spo0A in seiner phosphorylierten und somit aktiven Form vor, führt dies wiederum zur Repression des *abrB* Gens. Sinkt die Konzentration des AbrB-Repressors, ist dieser nicht mehr in der Lage das *sinI* Gen zu

reprimieren. Folglich steigt die Synthese des SinI Proteins was letztlich dazu führt, dass durch eine SinI vermittelte Bindung der SinR Repressor von der Promotorregion des *yqiHIK* Operons ablöst und die Transkription somit initiiert. Analog zu der Regulation des *sinI* Gens kann bei steigenden Spo0A~P Konzentrationen der AbrB Regulator ebenfalls nicht mehr das Gen kodierend für den Sigmafaktor SigH reprimieren. Geht man davon aus, dass das SigH Protein ebenfalls die Transkription des *yqiHIK* Genclusters initiiert, würde dies nun im Einklang mit der postulierten physiologischen Rolle des Yqil Enzyms stehen, an frühen Stadien im Sporulationsprozess beteiligt zu sein.

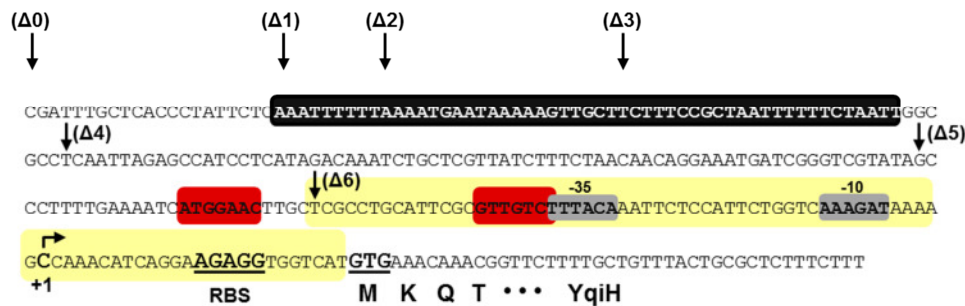


**Abb. 53: Modell zur SinR/SinI-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Genclusters.**

Abgebildet ist das postulierte Modell zur SinR/SinI-abhängigen Regulation des *yqiHIK* Genclusters unter sporulationspezifischen Bedingungen.

### 3. Der Anstieg der *yqiHIK* Promotoraktivität in der „Todeszone“

Die Messung der Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons entlang der Wachstumskurve unter normalen physiologischen Bedingungen (SMM-0 M NaCl) zeigte eine sehr deutliche Zunahme der Expression in der „Todeszone“ (Abbildung 44). Diese Zone wurde als die Wachstumsphase definiert, die unmittelbar auf die der Absterbephase folgt. In der Absterbephase sank der Wachstumsertrag von OD<sub>578</sub> 4 auf 1,5 ab, wohingegen die Zelldichte in der sogenannten „Todeszone“ konstant blieb (OD<sub>578</sub> 1,5) (Abbildung 44). Interessanterweise konnte bei der Bestimmung der Promotoraktivität des Genclusters unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) ein vergleichbares Transkriptionsmuster erkannt werden (Abbildung 45). Hierbei stieg die Transkription des *yqiHIK* Operons bereits in der Absterbephase an. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser Anstieg des Transkriptlevels in der Todeszone nicht über den salzinduzierbaren SigA-abhängigen Promotor reguliert wird (Abbildung 46). Durch zielgerichtete Verkürzungen in der stromaufwärtsgelegenen Promotorregion konnte der Promotor, der für die Expression des *yqiHIK* Genclusters in der Todeszone verantwortlich ist, auf ein 79 bp langes DNA-Fragment eingegrenzt werden (Abbildung 54).



**Abb. 54: Die Eingrenzung des putativen dritten Promotors des *yqiHIK* Genclusters.**

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Fragments der *yqiH-treA*-Fusion ( $\Delta 0$ ). Die Lage der Verkürzungen in der Promotorregion ( $\Delta 1$ - $\Delta 6$ ) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die AT-reiche Region wird durch eine schwarze Box dargestellt. Rote Boxen markieren die zwei putativen Binderegionen des SinR Proteins. Die -35 und -10 Region, der Transkriptions- sowie Translationsstart und die Ribosomenbindestelle (RBS) sind gekennzeichnet. In Gelb ist die eingegrenzte Lokalisation (79 bp) des Promotors hervorgehoben, der für die Expression des *yqiHIK* Operons in der Todeszone verantwortlich ist.

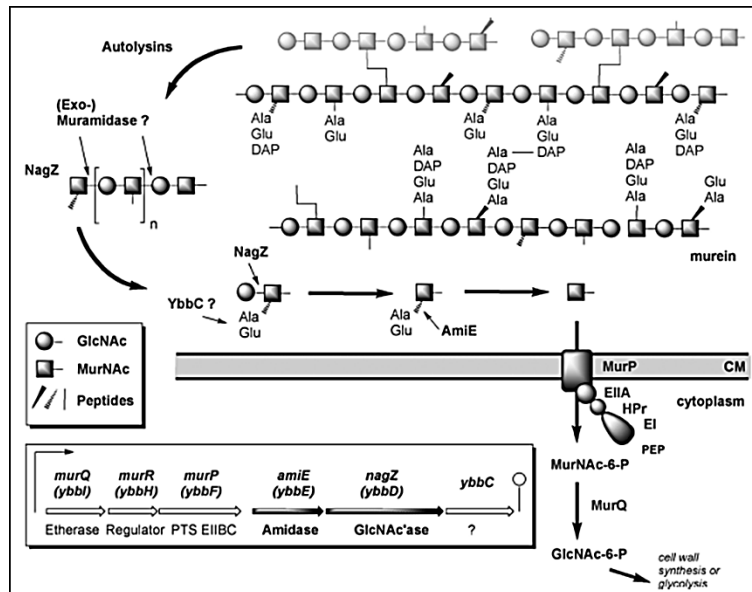
### 3.1. Die funktionelle Bedeutung des Yqil Proteins in der „Todeszone“

Es stellte sich nun die Frage, welche physiologischen Prozesse in der sogenannten „Todeszone“ ablaufen, die eine Expression des *yqiHIK* Operons zu dieser Zeit erklären könnten. In dieser Phase der Wachstumskurve liegen eine Vielzahl der *B. subtilis* Zellen sporuliert vor, wobei andere wiederum bereits lysiert sind. Ob einige Zellen überdies noch in der Lage sind sich zu teilen ist unklar, da kein Anstieg im Wachstumsertrag ( $OD_{578}$ ) zu verzeichnen war (Abbildung 44). Andererseits blieb dieser Ertrag aber auch über einen längeren Zeitraum konstant, was eine Art Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Zellyse und Sporulation voraussetzt. Eine Zellteilung würde letztlich implizieren, dass genügend Nährstoffe vorhanden sein müssten, wobei Kohlenstoff- sowie Stickstoffressourcen, die mit Hilfe des Medium bereitgestellt wurden, bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase aufgebraucht sein sollten. Eine weitere Nährstoffquelle könnte jedoch durch die bereits lysierten Zellen zur Verfügung gestellt werden.

*B. subtilis* ist für sein kannibalistisches Verhalten vor Initiation der Sporulation bekannt (89). Dabei ist dieses Bakterium in der Lage Toxine auszuscheiden, die zu der Zellyse einer Subpopulation sowie zur damit verbundenen Ausscheidung von Nährstoffen führen (89). Der molekulare Mechanismus beruht dabei auf der Bistabilität von *B. subtilis* Zellen innerhalb einer Population (63, 174). Dabei ist nur eine Subpopulation dazu fähig, ein sogenanntes Immunitäts-Protein zu synthetisieren, welches das sekretierte Toxin neutralisieren kann (68). Dieser Prozess des Kannibalismus gehört zu einem sozialen Verhalten in *B. subtilis* und dient letztlich der Herauszögerung der Sporulation (88, 89). Ursache dafür ist die Tatsache, dass die Sporulation einen hochenergieaufwendigen Prozess darstellt, der nach einem bestimmten Zeitpunkt („Point of no return“) nicht mehr rückgängig gemacht werden kann, selbst wenn plötzlich ausreichend Nährstoffe im Habitat vorhanden wären (88, 89). Bezogen auf den Anstieg der Promotoraktivität des *yqiHIK* Operons in der „Todeszone“ wäre es denkbar, dass gerade die Zellwandhydrolase Yqil als eine Art „Killerhydrolase“ fungiert, deren Aufgabe in der Bereitstellung von Nährstoffen sowie der damit verbundenen Zellyse liegt. Die sogenannten Muropeptide, lösliche Peptidoglykanfragmente, die nach der Hydrolyse des Zellwand-Peptidoglykans entstehen, könnten ferner als Signalmoleküle fungieren, die die Aktivität des *yqiHIK* Operons

zusätzlich erhöhen bzw. ermöglichen könnten. Dabei ist bekannt, dass Muropeptide als Signalmoleküle agieren können, um beispielsweise auf das Vorhandensein von Antibiotika hinzudeuten, die Sporenkeimung einzuleiten oder auch im Falle von Eukaryoten, eine bakterielle Infektion anzudeuten (23). Die Aktivierung eines Autolysins durch Muropeptide konnte am Beispiel der lytischen Transglycosylase YocH gezeigt werden (253). Die Induktion der *yocH* Expression ist in diesem Fall abhängig von PrkC, einer membrangebundenen Ser/Thr Kinase, die für die Erkennung und Bindung dieser Peptidoglykan-Fragmente verantwortlich ist. YocH ist in der Lage seine eigene Expression zu stimulieren und ist vermutlich für eine Hydrolyse der Muropeptide verantwortlich, die als Turnover-Produkte von lebenden Zellen freigesetzt werden. Demnach wäre eine Beteiligung der Kinase PrkC an der Regulation des *yqiHIK* Operons in der sogenannten „Todeszone“ zu prüfen.

Darüber hinaus könnte auch spekuliert werden, dass die Zellwandhydrolase Yqil an einem Zellwand-Recycling beteiligt ist. Das Zellwand-Peptidoglykan stellt durch seine Zusammensetzung eine enorme Ressource an Nährstoffen dar (220, 236). Der Prozess des Zellwand-Recyclings ist in dem Gram-negativen Organismus *E. coli* weitestgehend aufgeklärt. Dem zugrunde liegt die Fähigkeit von Bakterien einen sogenannten Zellwand-Turnover vorzunehmen, an dem zahlreiche Autolysine beteiligt sind (170, 220, 236). Dabei wird in *E. coli* 45 % und im Falle von *B. subtilis* sogar über 50 % des Peptidoglykans in einer Generation freigesetzt (220, 236). In *E. coli* werden davon nur ca. 6-8 % des Murein-Sacculus ins Medium sekretiert, wohingegen der größte Teil des Zellwand-Peptidoglykans recycelt wird (90). An diesem Prozess sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, wie beispielsweise Zellwandhydrolasen, Peptidasen sowie spezifische Transportsysteme, die einen Re-Transport der Nährstoffe ins Zytoplasma gewährleisten. Obwohl der Gram-positive Organismus *B. subtilis* eine höhere Zellwand-Turnover-Rate besitzt, konnte man lange Zeit kein Zellwand-Recycling nachweisen. Durch das vielschichtige Peptidoglykan hätte dies jedoch eine enorme Ressourcenverschwendung dargestellt. Im Jahre 2010 konnte durch Litzinger *et al.* (170) erstmalig ein Zellwand-Recycling-Pathway in *B. subtilis* identifiziert werden (Abbildung 55). Die Schlüsselenzyme stellen in diesem Prozess die Proteine NagZ (YbbD) sowie AmiE (YbbE) dar. Interessanterweise konnte für NagZ, eine N-Acetylglucosaminidase, eine Sekretion ins Medium beobachtet werden. Dabei findet eine nicht-kovalente Bindung des NagZ Proteins an die freigesetzten Peptidoglykanketten statt. Nach einer Prozessierung von Seiten dieses Proteins findet anschließend eine weitere Hydrolyse durch die Amidase AmiE statt.



**Abb. 55: Der putative Zellwand-Recycling-Pfadweg in *B. subtilis*.**

Dargestellt ist der durch Litzinger *et al.* (170) postulierte Signalweg des Zellwand-Recycling in *B. subtilis*. Die Lage und Orientierung der beteiligten Gencluster wird ebenfalls gezeigt. Die Abbildung wurde aus der oben genannten Veröffentlichung entnommen.

Ein jedoch wirklich zentraler Befund meiner Untersuchungen, im Hinblick auf den Anstieg der Promotoraktivität des *yqiH/K* Operons in der Todeszone (ca. 25 Stunden der Inkubation in SMM), zeigte sich bei der kritischen Analyse der *nagZ* Promotoraktivität mittels einer *lacZ*-Reporterfusion, die von Litzinger *et al.* (170) berichtet wurde. Dabei konnte ein sehr starker Anstieg in der Aktivität des NagZ Proteins nach einer 25-stündigen Inkubation in LB-Medium beobachtet werden. Dieser Zeitpunkt wurde als späte stationäre Phase bzw. Absterbephase definiert. Dieses Expressionsmuster konnte darüber hinaus ebenso für das Gen *pbpE* identifiziert werden (217). Dieses Gen kodiert in *B. subtilis* für ein weiteres Autolysin, für das zusätzlich eine Salzinduktion beobachtet werden konnte (217).

Um eine Beteiligung der Zellwandhydrolase Yqil an dem Prozess des Zellwand-Recyclings letztlich zu bestätigen, müsste eine Analyse der Zellwand-Turnover-Produkte in einer *yqil* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt werden. In Anbetracht der Redundanz der Autolysine wäre die Analyse einer  $\Delta yqil$ ,  $\Delta nagZ$  Doppelmutante ebenfalls interessant.

Ein kritischer Punkt in diesem Zusammenhang stellt weiterhin die Lokalisation der Zellwandhydrolase Yqil dar, die bisher nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Das Vorhandensein eines Signalpeptides deutet darauf hin, dass das Yqil Protein ins äußere Milieu sekretiert wird. Die Aminosäuresequenz des reifen Yqil Proteins weißt jedoch keine Zellwandbindedomäne auf (Abbildung 15), die charakteristisch für Autolysine jeglicher Art ist (74, 258, 280). Dennoch konnte das Yqil Protein nicht im Sekretom von *B. subtilis* identifiziert werden (272). Mein derzeitige Modell zieht in Betracht, dass eine Verankerung des Yqil Enzyms an die Zellwand stattfindet, die durch das Lipoprotein YqiH vermittelte werden könnte, was mittels eines „Bakterien-Zwei-Hybrid-Systems“ aufgeklärt werden könnte. Bei dem Protein YqiH handelt es sich vermutlich um ein in der Zytoplasmamembran verankertes Lipoprotein. Eine Co-Expression von einem Lipoprotein und einer Amidase konnte häufiger beobachtet werden (126), wobei die genaue Funktion des Lipoproteins nicht



bekannt ist. Spekuliert wurde in diesem Zusammenhang, ob das Lipoprotein vielleicht als eine Art Chaperon fungieren könnte, was bereits für das LppX Protein aus *Paenibacillus* sp. W-61 gezeigt werden konnte (83).

In Zukunft könnte die exakte Lokalisation der Zellwandhydrolase Yqil mit Hilfe einer spezifischen Markierung des Proteins (Strep-Tag, Flag-Tag oder Fluoreszenz-Tag) sowie sich einer daran anschließenden Antikörper-vermittelten Detektion (Western Blot) erfolgen. Überdies wäre es interessant zu untersuchen, ob die Lokalisation des Yqil Proteins von der jeweiligen Stresssituation oder auch Wachstumsphase abhängig ist.

### 3.2. Implikationen der facettenreichen Regulation des *yqiHIK* Operons

Wie bereits in Abschnitt 2 diskutiert wurde, wird die Induktion der Transkription des *yqiHIK* Operons bei Eintritt in die Sporulation nicht über den zuvor identifizierten SigA-abhängigen Promotor reguliert. Demnach stellt sich die Frage, ob die komplexe Regulation der Transkription des *yqiHIK* Operons über zwei oder sogar drei verschiedene Promotoren verläuft, oder anders formuliert, können beide Phänomene (Induktion Sporulation/Todeszone) durch nur einen Promotor reguliert werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand gehe ich davon aus, dass drei distinkte Promotoren existieren müssen, um eine gezielte Regulation des Genclusters unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Das Hauptargument was zu dieser Schlussfolgerung führte, liegt darin begründet, dass der Anstieg der *yqiHIK* Promotoraktivität in der „Todeszone“ zeitlich nicht mit der Initiation der Sporulation in Verbindung gebracht werden kann, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen alle bereits sporuliert bzw. lysiert vorliegen. Unterstützt wird dieses Argument dadurch, dass ein Anstieg des Transkriptionsniveaus des Genclusters in der „Todeszone“ auch in hypertonem Medium (1,2 M NaCl) beobachtet werden konnte. Dies wiederum kann unmöglich auf den Prozess der Sporulation zurückgeführt werden, da unter Hochsalz Bedingungen die *B. subtilis* Zelle nicht in der Lage ist zu sporulieren (239). Diese Fakten sprechen für ein anderes physiologisches Ereignis, was nicht mit dem Prozess der Sporulation in Verbindung gebracht werden kann und demnach nicht über einen sporulationsspezifischen Promotor reguliert würde. In *B. subtilis* sind verschiedene Sigmafaktoren bekannt, die eine gezielte Genexpression in den verschiedenen Stadien der Sporulation ermöglichen (70, 116, 227). Daher gehe ich davon aus, dass die Regulation des *yqiHIK* Operons durch drei unterschiedliche und unabhängig voneinander regulierte Promotoren erfolgen muss: (1) der bereits identifizierte SigA-abhängige Promotor, der für die Salzinduktion des *yqiHIK* Operons verantwortlich ist; (2) ein sporulationsspezifischer Promotor, der an der Induktion der Transkriptionseinheit zur Beginn der Sporulation beteiligt ist und (3) ein Promotor, der die Transkription des Gencluster in der „Todeszone“ induziert. Um dies letztlich zu bestätigen, müssten diese Promotoren mittels einer Primer-Extension-Analyse identifiziert werden. Eine zielgerichtete Mutagenese dieser Promotoren, analog zu der von mir durchgeführten Analyse des SigA-Promotors, könnte die Existenz von drei oder auch zwei Promotoren untermauern.

#### 4. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen eine komplexe und viele Facetten umfassende Regulation des *yqiHIK* Operons. Interessanterweise konnte eine ähnliche facettenreiche Regulation ebenfalls für das *aprE* Gen aus *B. subtilis* identifiziert werden. Das *aprE* Gen kodiert für die extrazelluläre alkalische Protease (Subtilisin), die am Ende der exponentiellen Wachstumsphase synthetisiert wird (2). Dabei regulieren vier DNA-Bindeproteine ScoC, SinR, AbrB sowie DegU die Expression dieses Gens, wobei nur im Falle von DegU ein positiver Effekt auf die Transkription des *aprE* Gens ausgeübt wird (2, 208).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig die morphologischen Veränderungen der Zellwand unter hyperosmotischen Bedingungen beobachtet und mit dem Anpassungsprozess von *B. subtilis* an hochosmolare Bedingungen in Verbindung gebracht. Durch die Aufklärung des Einflusses des ZKS DegS/DegU an der Regulation des *yqiHIK* Operons, sowie die zytoplasmatische Lokalisation der Sensor-Kinase DegS existiert nun ein experimentell gut zugängliches Modellsystem, anhand dessen die osmotische Regulation einer ganzen Gruppe salzinduzierter Gene in *B. subtilis* studiert werden kann. Die in dieser Dissertation vorgelegten Daten haben daher die Tür für vertiefte genetische Untersuchungen, im Hinblick auf die Wahrnehmung des „Salzstress-Signals“ durch die *B. subtilis* Zelle, geöffnet.

Die komplexe Regulation des *yqiHIK* Operons aus *B. subtilis* weist darauf hin, dass die kodierten Genprodukte wichtige Aufgaben unter sehr unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und in verschiedenen zellulären Differenzierungsprozessen spielen. In diesem Zusammenhang wurden Prozesse wie Kannibalismus/Peptidoglykan-Recycling, Biofilm-Formation sowie Sporulation diskutiert. Besonders interessante neue Einblicke in physiologische und genetische Prozesse sind daher in zukünftigen Studien zu erwarten, die *B. subtilis* beim Eintritt in die „Todeszone“ erfährt.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abanes-De Mello, A., Y. L. Sun, S. Aung, and K. Pogliano.** 2002. A cytoskeleton-like role for the bacterial cell wall during engulfment of the *Bacillus subtilis* forespore. *Genes Dev.* **16**:3253-3264.
2. **Abe, S., A. Yasumura, and T. Tanaka.** 2009. Regulation of *Bacillus subtilis* *aprE* expression by *glnA* through inhibition of *scoC* and sigma(D)-dependent *degR* expression. *J. Bacteriol.* **191**:3050-3058.
3. **Aertsen, A., and C. W. Michiels.** 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**:263-273.
4. **Aguilar, C., H. Vlamakis, A. Guzman, R. Losick, and R. Kolter.** 2010. KinD is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms. *MBio* **1**:e00035-10.
5. **Aguilar, C., H. Vlamakis, R. Losick, and R. Kolter.** 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:638-643.
6. **Albano, M., W. K. Smits, L. T. Ho, B. Kraigher, I. Mandic-Mulec, O. P. Kuipers, and D. Dubnau.** 2005. The Rok protein of *Bacillus subtilis* represses genes for cell surface and extracellular functions. *J. Bacteriol.* **187**:2010-2919.
7. **Alice, A. F., and C. Sanchez-Rivas.** 1997. DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Curr. Microbiol.* **35**:309-315.
8. **Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede.** 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**:195-201.
9. **Atrih, A., G. Bacher, G. Allmaier, M. P. Williamson, and S. J. Foster.** 1999. Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation. *J. Bacteriol.* **181**:3956-3966.
10. **Atrih, A., and S. J. Foster.** 1999. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **75**:299-307.
11. **Baba, T., and O. Schneewind.** 1998. Targeting of muralytic enzymes to the cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *Embo J.* **17**:4639-4646.
12. **Bachmann, B. J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
13. **Barbe, V., S. Cruveiller, F. Kunst, P. Lenoble, G. Meurice, A. Sekowska, D. Vallenet, T. Wang, I. Moszer, C. Medigue, and A. Danchin.** 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology.* **155**:1758-1775.
14. **Barreteau, H., A. Kovac, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, and D. Blanot.** 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:168-207.
15. **Bateman, A., and M. Bycroft.** 2000. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* **299**:1113-1119.
16. **Bateman, A., and N. D. Rawlings.** 2003. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**:234-237.

17. **Belitsky, B. R., J. Brill, E. Bremer, and A. L. Sonenshein.** 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:4389-4392.
18. **Bernhardt, T. G., and P. A. de Boer.** 2004. Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. *Mol. Microbiol.* **52**:1255-1269.
19. **Bhavsar, A. P., and E. D. Brown.** 2006. Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Mol. Microbiol.* **60**:1077-1090.
20. **Blackman, S. A., T. J. Smith, and S. J. Foster.** 1998. The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology.* **144**:73-82.
21. **Boch, J., B. Kempf, and E. Bremer.** 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.* **176**:5364-5371.
22. **Boch, J., G. Nau-Wagner, S. Kneip, and E. Bremer.** 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* **168**:282-489.
23. **Boudreau, M. A., J. F. Fisher, and S. Mobashery.** 2012. Messenger functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. *Biochemistry.* **51**:2974-2990.
24. **Bouhss, A., A. E. Trunkfield, T. D. Bugg, and D. Mengin-Lecreulx.** 2008. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:208-233.
25. **Bourot, S., O. Sire, A. Trautwetter, T. Touze, L. F. Wu, C. Blanco, and T. Bernard.** 2000. Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:1050-1056.
26. **Branda, S. S., F. Chu, D. B. Kearns, R. Losick, and R. Kolter.** 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* **59**:1229-1238.
27. **Branda, S. S., J. E. González-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, and R. Kolter.** 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:11621-11626.
28. **Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman, and R. Kolter.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**:20-26.
29. **Bremer, E.** 2002. Adaptation to changing osmolarity, p. 385-391. *In* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives. ASM Press, Washington, D.C.
30. **Bremer, E., and R. Krämer.** 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes, p. 79-97. *In* G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C.
31. **Brigulla, M., T. Hoffmann, A. Krisp, A. Völker, E. Bremer, and U. Völker.** 2003. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.* **185**:4305-4514.
32. **Brill, J., T. Hoffmann, M. Bleisteiner, and E. Bremer.** 2011. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J. Bacteriol.* **193**:5335-5346.
33. **Britton, R. A., P. Eichenberger, J. E. González-Pastor, P. Fawcett, R. Monson, R. Losick, and A. D. Grossman.** 2002. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**:4881-4890.
34. **Brückner, R.** 1992. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene.* **122**:187-192.

35. **Burbulys, D., K. A. Trach, and J. A. Hoch.** 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*. **64**:545-552.
36. **Burg, M. B., and J. D. Ferraris.** 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J. Biol. Chem.* **283**:7309-7313.
37. **Bursy, J., A. J. Pierik, N. Pica, and E. Bremer.** 2007. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **282**:31147-31155.
38. **Cai, S. J., and M. Inouye.** 2002. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**:24155-24161.
39. **Calamita, G., W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino, and P. Agre.** 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:29063-29066.
40. **Cano, R. J., and M. K. Borucki.** 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*. **268**:1060-1064.
41. **Carballido-López, R., and A. Formstone.** 2007. Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:611-616.
42. **Chai, Y., R. Kolter, and R. Losick.** 2009. Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **74**:876-887.
43. **Chastanet, A., and R. Losick.** 2007. Engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins. *Mol. Microbiol.* **64**:139-152.
44. **Chen, R., S. B. Guttenplan, K. M. Blair, and D. B. Kearns.** 2009. Role of the sigmaD-dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J. Bacteriol.* **191**:5775-5784.
45. **Chopra, I., C. Storey, T. J. Falla, and J. H. Pearce.** 1998. Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited. *Microbiology*. **144**:2673-2678.
46. **Chu, F., D. B. Kearns, S. S. Branda, R. Kolter, and R. Losick.** 2006. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **59**:1216-1228.
47. **Chumsakul, O., H. Takahashi, T. Oshima, T. Hishimoto, S. Kanaya, N. Ogasawara, and S. Ishikawa.** 2011. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* **39**:414-428.
48. **Claessen, D., R. Emmins, L. W. Hamoen, R. A. Daniel, J. Errington, and D. H. Edwards.** 2008. Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**:1029-1046.
49. **Cohen-Gonsaud, M., P. Barthe, C. Bagneris, B. Henderson, J. Ward, C. Roumestand, and N. H. Keep.** 2005. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:270-273.
50. **Colledge, V. L., M. J. Fogg, V. M. Levnikov, A. Leech, E. J. Dodson, and A. J. Wilkinson.** 2011. Structure and organisation of SinR, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **411**:597-613.
51. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**:1318-1322.

52. **Crutz, A. M., and M. Steinmetz.** 1992. Transcription of the *Bacillus subtilis* *sacX* and *sacY* genes, encoding regulators of sucrose metabolism, is both inducible by sucrose and controlled by the DegS-DegU signalling system. *J. Bacteriol.* **174**:6087-6095.
53. **Culham, D. E., M. Meinecke, and J. M. Wood.** 2012. Impacts of the Osmolality and the Lumenal Ionic Strength on Osmosensory Transporter ProP in Proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **287**:27813-27822.
54. **Cutting, S. M., and P. B. Vander Horn.** 1990. Genetic analysis, p. 27-74. *In* C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
55. **Dahl, M. K., T. Msadek, F. Kunst, and G. Rapoport.** 1991. Mutational analysis of the *Bacillus subtilis* DegU regulator and its phosphorylation by the DegS protein kinase. *J. Bacteriol.* **173**:2539-2547.
56. **Dahl, M. K., T. Msadek, F. Kunst, and G. Rapoport.** 1992. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **267**:14509-14514.
57. **Dartois, V., M. Debarbouille, F. Kunst, and G. Rapoport.** 1998. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:1855-1861.
58. **de Boer, W. R., P. D. Meyer, C. G. Jordens, F. J. Kruyssen, and J. T. Wouters.** 1982. Cell wall turnover in growing and nongrowing cultures of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **149**:977-984.
59. **Desvaux, M., E. Dumas, I. Chafsey, and M. Hebraud.** 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**:1-15.
60. **Dorman, C. J.** 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**:47-64.
61. **Dramsi, S., S. Magnet, S. Davison, and M. Arthur.** 2008. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:307-320.
62. **Dubnau, D.** 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev.* **55**:395-424.
63. **Dubnau, D., and R. Losick.** 2006. Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.* **61**:564-572.
64. **Dubrac, S., P. Bisicchia, K. M. Devine, and T. Msadek.** 2008. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* **70**:1307-1322.
65. **Dworkin, J., and R. Losick.** 2005. Developmental commitment in a bacterium. *Cell.* **121**:401-409.
66. **Earl, A. M., R. Losick, and R. Kolter.** 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* **16**:269-275.
67. **Eiamphungporn, W., and J. D. Helmann.** 2009. Extracytoplasmic function sigma factors regulate expression of the *Bacillus subtilis* *yabE* gene via a *cis*-acting antisense RNA. *J. Bacteriol.* **191**:1101-1105.
68. **Ellermeier, C. D., E. C. Hobbs, J. E. González-Pastor, and R. Losick.** 2006. A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell.* **124**:549-559.
69. **Errington, J.** 2010. From spores to antibiotics via the cell cycle. *Microbiology.* **156**:1-13.

70. **Errington, J.** 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**:117-126.
71. **Fabret, C., V. A. Feher, and J. A. Hoch.** 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**:1975-1983.
72. **Fawcett, P., P. Eichenberger, R. Losick, and P. Youngman.** 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:8063-8068.
73. **Fernández-Tornero, C., E. Garcia, R. López, G. Giménez-Gallego, and A. Romero.** 2002. Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* **321**:163-173.
74. **Firczuk, M., and M. Bochtler.** 2007. Folds and activities of peptidoglycan amidases. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:676-691.
75. **Fischer, K.** 2009. Analyse zur Auswirkung der vermutlichen Amidase Yqil aus *Bacillus subtilis* auf den Zellwandmetabolismus von *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen. Masterarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
76. **Fisher, M. T.** 2006. Proline to the rescue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13265-13266.
77. **Forst, S. A., and D. L. Roberts.** 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res. Microbiol.* **145**:363-373.
78. **Foster, S. J.** 1992. Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **174**:464-470.
79. **Foster, S. J.** 1991. Cloning, expression, sequence analysis and biochemical characterization of an autolytic amidase of *Bacillus subtilis* 168 *trpC2*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1987-1998.
80. **Foster, S. J.** 1994. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **23**:25-39.
81. **Fujita, M., J. E. González-Pastor, and R. Losick.** 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**:1357-1368.
82. **Fujita, M., and R. Losick.** 2005. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev.* **19**:2236-2244.
83. **Fukuda, M., S. Watanabe, J. Kaneko, Y. Itoh, and Y. Kamio.** 2009. The membrane lipoprotein LppX of *Paenibacillus* sp. strain W-61 serves as a molecular chaperone for xylanase of glycoside hydrolase family 11 during secretion across the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **191**:1641-1649.
84. **Fukushima, T., T. Kitajima, H. Yamaguchi, Q. Ouyang, K. Furuhashi, H. Yamamoto, T. Shida, and J. Sekiguchi.** 2008. Identification and characterization of novel cell wall hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting N-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *J. Biol. Chem.* **283**:11117-11125.
85. **Fukushima, T., Y. Yao, T. Kitajima, H. Yamamoto, and J. Sekiguchi.** 2007. Characterization of new L,D-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. *Mol. Genet. Genomics.* **278**:371-383.
86. **Gilbert, H. J.** 2007. Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. *Mol. Microbiol.* **63**:1568-1576.

87. **Glinkowska, M., J. Majka, W. Messer, and G. Wegrzyn.** 2003. The mechanism of regulation of bacteriophage lambda pR promoter activity by *Escherichia coli* DnaA protein. *J. Biol. Chem.* **278**:22250-22256.
88. **González-Pastor, J. E.** 2011. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**:415-424.
89. **González-Pastor, J. E., E. C. Hobbs, and R. Losick.** 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science.* **301**:510-513.
90. **Goodell, E. W., and U. Schwarz.** 1985. Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**:391-397.
91. **Gotsche, S., and M. K. Dahl.** 1995. Purification and characterization of the phospho-alpha-(1,1)-glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **177**:2721-2726.
92. **Graeme-Cook, K. A., G. May, E. Bremer, and C. F. Higgins.** 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **3**:1287-1294.
93. **Grossman, A. D.** 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **29**:477-508.
94. **Guérout-Fleury, A. M., K. Shazand, N. Frandsen, and P. Stragier.** 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene.* **167**:335-336.
95. **Hadzhieva, T.** 2007. Transcriptional activation and sensing properties of DegS-DegU: a two-component system involved in the osmotic regulation of *Bacillus subtilis*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
96. **Hahne, H., U. Mäder, A. Otto, F. Bonn, L. Steil, E. Bremer, M. Hecker, and D. Becher.** 2010. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *J. Bacteriol.* **192**:870-882.
97. **Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:95-108.
98. **Hamoen, L. W., A. F. Van Werkhoven, G. Venema, and D. Dubnau.** 2000. The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:9246-9251.
99. **Hamon, M. A., and B. A. Lazazzera.** 2001. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **42**:1199-1209.
100. **Hamon, M. A., N. R. Stanley, R. A. Britton, A. D. Grossman, and B. A. Lazazzera.** 2004. Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **52**:847-860.
101. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
102. **Harwood, C. R., and A. R. Archibald.** 1990. Growth, maintenance and general techniques, p. 1-26. *In* C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester.
103. **Hashimoto, M., S. Ooiwa, and J. Sekiguchi.** 2012. Synthetic lethality of the *lytE cwIO* genotype in *Bacillus subtilis* is caused by lack of D,L-endopeptidase activity at the lateral cell wall. *J. Bacteriol.* **194**:796-803.
104. **Hauser, N. C., M. Vingron, M. Scheideler, B. Krems, K. Hellmuth, K. D. Entian, and J. D. Hoheisel.** 1998. Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **14**:1209-1221.



105. **Hayhurst, E. J., L. Kailas, J. K. Hobbs, and S. J. Foster.** 2008. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**:14603-14608.
106. **Hecker, M., J. Pane-Farre, and U. Völker.** 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **61**:215-236.
107. **Heidrich, C., M. F. Templin, A. Ursinus, M. Merdanovic, J. Berger, H. Schwarz, M. A. de Pedro, and J. V. Höltje.** 2001. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **41**:167-178.
108. **Heidrich, C., A. Ursinus, J. Berger, H. Schwarz, and J. V. Höltje.** 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **184**:6093-6099.
109. **Helfert, C., S. Gotsche, and M. K. Dahl.** 1995. Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho-alpha-(1-1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. Mol. Microbiol. **16**:111-120.
110. **Helmann, J. D.** 1995. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. Nucleic Acids Res. **23**:2351-2360.
111. **Henner, D. J., E. Ferrari, M. Perego, and J. A. Hoch.** 1988. Location of the targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)*, and *sacQ36(Hy)* mutations in upstream regions of the subtilisin promoter. J. Bacteriol. **170**:296-300.
112. **Herbold, D. R., and L. Glaser.** 1975. *Bacillus subtilis* N-acetylmuramic acid L-alanine amidase. J. Biol. Chem. **250**:1676-1682.
113. **Herbold, D. R., and L. Glaser.** 1975. Interaction of N-acetylmuramic acid L-alanine amidase with cell wall polymers. J. Biol. Chem. **250**:7231-7238.
114. **Herzberg, C., L. A. Weidinger, B. Dorrbecker, S. Hubner, J. Stülke, and F. M. Commichau.** 2007. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. Proteomics. **7**:4032-4035.
115. **Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. Cell. **52**:569-584.
116. **Higgins, D., and J. Dworkin.** 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol. Rev. **36**:131-148.
117. **Hoffmann, T., and E. Bremer.** 2011. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. J. Bacteriol. **193**:1552-1562.
118. **Holt, S. C., and E. R. Leadbetter.** 1969. Comparative ultrastructure of selected aerobic spore-forming bacteria: a freeze-etching study. Bacteriol. Rev. **33**:346-378.
119. **Höltje, J. V.** 1995. From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. Arch. Microbiol. **164**:243-254.
120. **Höltje, J. V.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:181-203.
121. **Holtmann, G., E. P. Bakker, N. Uozumi, and E. Bremer.** 2003. KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. J. Bacteriol. **185**:1289-1298.
122. **Holtmann, G., and E. Bremer.** 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. J. Bacteriol. **186**:1683-1693.

123. **Höper, D., J. Bernhardt, and M. Hecker.** 2006. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics*. **6**:1550-1562.
124. **Howell, A., S. Dubrac, K. K. Andersen, D. Noone, J. Fert, T. Msadek, and K. Devine.** 2003. Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol. Microbiol.* **49**:1639-1655.
125. **Ignatova, Z., and L. M. Gierasch.** 2006. Inhibition of protein aggregation *in vitro* and *in vivo* by a natural osmoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13357-13361.
126. **Ishikawa, S., S. Kawahara, and J. Sekiguchi.** 1999. Cloning and expression of two autolysin genes, *cwlU* and *cwlV*, which are tandemly arranged on the chromosome of *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. *Mol. Gen. Genet.* **262**:738-748.
127. **Jayaswal, R. K., Y. I. Lee, and B. J. Wilkinson.** 1990. Cloning and expression of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. *J. Bacteriol.* **172**:5783-5788.
128. **Jiang, M., R. Grau, and M. Perego.** 2000. Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**:303-310.
129. **Jiang, M., W. Shao, M. Perego, and J. A. Hoch.** 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **38**:535-542.
130. **Kadouri, D., N. C. Venzon, and G. A. O'Toole.** 2007. Vulnerability of pathogenic biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:605-614.
131. **Kappes, R. M., and E. Bremer.** 1998. Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology.* **144**:83-90.
132. **Kappes, R. M., B. Kempf, and E. Bremer.** 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**:5071-5079.
133. **Kappes, R. M., B. Kempf, S. Kneip, J. Boch, J. Gade, J. Meier-Wagner, and E. Bremer.** 1999. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**:203-216.
134. **Kawai, Y., J. Marles-Wright, R. M. Cleverley, R. Emmins, S. Ishikawa, M. Kuwano, N. Heinz, N. K. Bui, C. N. Hoyland, N. Ogasawara, R. J. Lewis, W. Vollmer, R. A. Daniel, and J. Errington.** 2011. A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *Embo J.* **30**:4931-4941.
135. **Kearns, D. B., F. Chu, S. S. Branda, R. Kolter, and R. Losick.** 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **55**:739-749.
136. **Kearns, D. B., and R. Losick.** 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**:581-590.
137. **Keep, N. H., J. M. Ward, M. Cohen-Gonsaud, and B. Henderson.** 2006. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends Microbiol.* **14**:271-276.
138. **Kempf, B., and E. Bremer.** 1995. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**:16701-16713.
139. **Kempf, B., and E. Bremer.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**:319-330.

140. **Kenney, L. J.** 2002. Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:135-141.
141. **Kerff, F., A. Amoroso, R. Herman, E. Sauvage, S. Petrella, P. Filee, P. Charlier, B. Joris, A. Tabuchi, N. Nikolaidis, and D. J. Cosgrove.** 2008. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:16876-16881.
142. **Kim, J., and W. Schumann.** 2009. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cell Mol. Life Sci.* **66**:3127-3136.
143. **Klein, C., C. Kaletta, N. Schnell, and K. D. Entian.** 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:132-142.
144. **Kleiner, D. E., and W. G. Stetler-Stevenson.** 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* **218**:325-329.
145. **Klier, A., T. Msadek, and G. Rapoport.** 1992. Positive regulation in the gram-positive bacterium: *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:429-459.
146. **Kobayashi, K.** 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **66**:395-409.
147. **Koch, A. L., G. Kirchner, R. J. Doyle, and I. D. Burdett.** 1985. How does a *Bacillus* split its septum right down the middle? *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **136**:91-98.
148. **Kolter, R., and E. P. Greenberg.** 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature.* **441**:300-302.
149. **Korndorfer, I. P., J. Danzer, M. Schmelcher, M. Zimmer, A. Skerra, and M. J. Loessner.** 2006. The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *J. Mol. Biol.* **364**:678-689.
150. **Krispin, O., and R. Allmansberger.** 1995. Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**:129-135.
151. **Krogh, S., S. T. Jorgensen, and K. M. Devine.** 1998. Lysis genes of the *Bacillus subtilis* defective prophage PBSX. *J. Bacteriol.* **180**:2110-2117.
152. **Kuhlmann, A. U., and E. Bremer.** 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:772-783.
153. **Kunst, F., T. Msadek, and G. Rapoport.** 1994. Signal transduction network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*, p. 1-20. *In* Piggot P. J., Moran C. P. Jr, Youngman P. (ed), Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
154. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, and et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**:249-256.
155. **Kunst, F., and G. Rapoport.** 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:2403-2407.
156. **Kuroda, A., and J. Sekiguchi.** 1990. Cloning, sequencing and genetic mapping of a *Bacillus subtilis* cell wall hydrolase gene. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2209-2216.

157. **Kuroda, A., and J. Sekiguchi.** 1991. Molecular cloning and sequencing of a major *Bacillus subtilis* autolysin gene. *J. Bacteriol.* **173**:7304-7312.
158. **Kuwayama, H., S. Obara, T. Morio, M. Katoh, H. Urushihara, and Y. Tanaka.** 2002. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res.* **30**:E2. doi:10.1093/nar/30.2.e2.
159. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
160. **Larson, T. J., M. Ehrmann, and W. Boos.** 1983. Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the *glp* regulon. *J. Biol. Chem.* **258**:5428-5432.
161. **Lazarevic, V., P. Margot, B. Soldo, and D. Karamata.** 1992. Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* *lytRABC* divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1949-1961.
162. **Lazazzera, B. A., T. Palmer, J. Quisel, and A. D. Grossman.** 1999. Cell density control of gene expression and development in *Bacillus subtilis*, p. 27-42. *In* G. M. D. a. S. C. Winans (ed.), *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
163. **Leclerc, D., and A. Asselin.** 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* **35**:749-753.
164. **LeDeaux, J. R., and A. D. Grossman.** 1995. Isolation and characterization of *kinC*, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:166-175.
165. **LeDeaux, J. R., N. Yu, and A. D. Grossman.** 1995. Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:861-863.
166. **Leid, J. G., C. J. Willson, M. E. Shirliff, D. J. Hassett, M. R. Parsek, and A. K. Jeffers.** 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J. Immunol.* **175**:7512-7518.
167. **Lemon, K. P., A. M. Earl, H. C. Vlamakis, C. Aguilar, and R. Kolter.** 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**:1-16.
168. **Letunic, I., T. Doerks, and P. Bork.** 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **40**:302-305.
169. **Levin, P. A., I. G. Kurtser, and A. D. Grossman.** 1999. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:9642-9647.
170. **Litzinger, S., A. Duckworth, K. Nitzsche, C. Risinger, V. Wittmann, and C. Mayer.** 2010. Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* **192**:3132-3143.
171. **López, C. S., H. Heras, H. Garda, S. Ruzal, C. Sanchez-Rivas, and E. Rivas.** 2000. Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Int. J. Food Microbiol.* **55**:137-142.
172. **López, C. S., H. Heras, S. M. Ruzal, C. Sanchez-Rivas, and E. A. Rivas.** 1998. Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Curr. Microbiol.* **36**:55-61.
173. **López, D., M. A. Fischbach, F. Chu, R. Losick, and R. Kolter.** 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:280-285.

174. **López, D., and R. Kolter.** 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:134-149.
175. **López, D., H. Vlamakis, and R. Kolter.** 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:a000398.
176. **Lucht, J. M., P. Dersch, B. Kempf, and E. Bremer.** 1994. Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:6578-6578.
177. **Mäder, U., H. Antelmann, T. Buder, M. K. Dahl, M. Hecker, and G. Homuth.** 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol. Genet. Genomics.* **268**:455-467.
178. **Mah, T. F., and G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**:34-39.
179. **Mandic-Mulec, I., L. Doukhan, and I. Smith.** 1995. The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. *J. Bacteriol.* **177**:4619-4627.
180. **Margot, P., and D. Karamata.** 1992. Identification of the structural genes for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier in *Bacillus subtilis* 168: inactivation of these genes by insertional mutagenesis has no effect on growth or cell separation. *Mol. Gen. Genet.* **232**:359-366.
181. **Margot, P., C. Mauel, and D. Karamata.** 1994. The gene of the N-acetylglucosaminidase, a *Bacillus subtilis* 168 cell wall hydrolase not involved in vegetative cell autolysis. *Mol. Microbiol.* **12**:535-545.
182. **Margot, P., M. Pagni, and D. Karamata.** 1999. *Bacillus subtilis* 168 gene *lytF* encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate murepeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, sigmaD. *Microbiology.* **145** 57-65.
183. **Marles-Wright, J., and R. J. Lewis.** 2007. Stress responses of bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**:755-760.
184. **Marmur, J., and P. Doty.** 1961. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J. Mol. Biol.* **3**:585-594.
185. **Matias, V. R., and T. J. Beveridge.** 2005. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol. Microbiol.* **56**:240-251.
186. **Matias, V. R., and T. J. Beveridge.** 2006. Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**:1011-1021.
187. **McLoon, A. L., S. B. Guttenplan, D. B. Kearns, R. Kolter, and R. Losick.** 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J. Bacteriol.* **193**:2027-2034.
188. **McQuade, R. S., N. Comella, and A. D. Grossman.** 2001. Control of a family of phosphatase regulatory genes (*phr*) by the alternate sigma factor sigma-H of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:4905-4909.
189. **Meroueh, S. O., K. Z. Bencze, D. Heseck, M. Lee, J. F. Fisher, T. L. Stemmler, and S. Mobashery.** 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:4404-4409.
190. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

191. **Mishima, M., T. Shida, K. Yabuki, K. Kato, J. Sekiguchi, and C. Kojima.** 2005. Solution structure of the peptidoglycan binding domain of *Bacillus subtilis* cell wall lytic enzyme CwIC: characterization of the sporulation-related repeats by NMR. *Biochemistry*. **44**:10153-10163.
192. **Möker, N., P. Reihlen, R. Krämer, and S. Morbach.** 2007. Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **282**:27666-27677.
193. **Molle, V., M. Fujita, S. T. Jensen, P. Eichenberger, J. E. González-Pastor, J. S. Liu, and R. Losick.** 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **50**:1683-1701.
194. **Morlot, C., T. Uehara, K. A. Marquis, T. G. Bernhardt, and D. Z. Rudner.** 2010. A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **24**:411-422.
195. **Msadek, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport, and R. Dedonder.** 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* **172**:824-834.
196. **Msadek, T., F. Kunst, A. Klier, and G. Rapoport.** 1991. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *J. Bacteriol.* **173**:2366-2377.
197. **Msadek, T., Kunst, F. and Rapoport, G. .** 1995. A signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay, p. 447-471. *In* J. A. a. S. Hoch, T. J. (ed.), Two-Component Signal Transduction. American Society for Microbiology, Washington, DC.
198. **Msadek, T., Kunst, F., and Rapperport, G.** 1993. Two-component regulatory systems in *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, p. 724-745. *In* A. L. Sonenshein, Hoch, J.A., and Losick, R., (ed.), Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. ASM Press, Washington, DC.
199. **Nagarajavel, V., S. Madhusudan, S. Dole, A. R. Rahmouni, and K. Schnetz.** 2007. Repression by binding of H-NS within the transcription unit. *J. Biol. Chem.* **282**:23622-23630.
200. **Nannapaneni, P., F. Hertwig, M. Depke, M. Hecker, U. Mäder, U. Völker, L. Steil, and S. A. van Hijum.** 2012. Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology.* **158**:696-707.
201. **Nau-Wagner, G., J. Boch, J. A. Le Good, and E. Bremer.** 1999. High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:560-568.
202. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:174-229.
203. **Neuhaus, F. C., and J. Baddiley.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:686-723.
204. **Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow.** 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:548-572.

205. **Nicolas, P., U. Mäder, E. Dervyn, T. Rochat, A. Leduc, N. Pigeonneau, E. Bidnenko, E. Marchadier, M. Hoebeke, S. Aymerich, D. Becher, P. Bisicchia, E. Botella, O. Delumeau, G. Doherty, E. L. Denham, M. J. Fogg, V. Fromion, A. Goelzer, A. Hansen, E. Hartig, C. R. Harwood, G. Homuth, H. Jarmer, M. Jules, E. Klipp, L. Le Chat, F. Lecointe, P. Lewis, W. Liebermeister, A. March, R. A. Mars, P. Nannapaneni, D. Noone, S. Pohl, B. Rinn, F. Rugheimer, P. K. Sappa, F. Samson, M. Schaffer, B. Schwikowski, L. Steil, J. Stülke, T. Wiegert, K. M. Devine, A. J. Wilkinson, J. M. van Dijl, M. Hecker, U. Völker, P. Bessieres, and P. Noirot.** 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*. **335**:1103-1106.
206. **Nugroho, F. A., H. Yamamoto, Y. Kobayashi, and J. Sekiguchi.** 1999. Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. *J. Bacteriol.* **181**:6230-6237.
207. **Ogura, M., M. Kawata-Mukai, M. Itaya, K. Takio, and T. Tanaka.** 1994. Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**:5673-5680.
208. **Ogura, M., K. Shimane, K. Asai, N. Ogasawara, and T. Tanaka.** 2003. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**:1685-1697.
209. **Ogura, M., and T. Tanaka.** 1996. *Bacillus subtilis* DegU acts as a positive regulator for *comK* expression. *FEBS Lett.* **397**:173-176.
210. **Ogura, M., and T. Tanaka.** 2002. Recent progress in *Bacillus subtilis* two-component regulation. *Front Biosci.* **7**:1815-1824.
211. **Ogura, M., and T. Tanaka.** 1996. Transcription of *Bacillus subtilis degR* is sigma D dependent and suppressed by multicopy *proB* through sigma D. *J. Bacteriol.* **178**:216-222.
212. **Ogura, M., and K. Tsukahara.** 2010. Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. *Mol. Microbiol.* **75**:1244-1259.
213. **Ogura, M., H. Yamaguchi, K. Yoshida, Y. Fujita, and T. Tanaka.** 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* **29**:3804-3813.
214. **Ohnishi, R., S. Ishikawa, and J. Sekiguchi.** 1999. Peptidoglycan hydrolase LytF plays a role in cell separation with CwIF during vegetative growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:3178-3184.
215. **Oren, A.** 2011. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ. Microbiol.* **13**:1908-19023.
216. **Pallen, M. J.** 2002. The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol.* **10**:209-212.
217. **Palomino, M. M., C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal.** 2009. High salt stress in *Bacillus subtilis*: involvement of PBP4\* as a peptidoglycan hydrolase. *Res. Microbiol.* **160**:117-124.
218. **Pane-Farre, J., R. J. Lewis, and J. Stülke.** 2005. The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**:65-76.
219. **Pao, G. M., R. Tam, L. S. Lipschitz, and M. H. Saier, Jr.** 1994. Response regulators: structure, function and evolution. *Res. Microbiol.* **145**:356-362.
220. **Park, J. T., and T. Uehara.** 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:211-227.

221. **Parker, G. F., R. A. Daniel, and J. Errington.** 1996. Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. **142**:3445-3452.
222. **Perego, M.** 1997. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:8612-8617.
223. **Perego, M.** 1999. Self-signaling by Phr peptides modulates *Bacillus subtilis* development, p. 243-258. *In* G. M. Dunny *et al.* (ed.), *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington DC.
224. **Perego, M., C. Hanstein, K. M. Welsh, T. Djavakhishvili, P. Glaser, and J. A. Hoch.** 1994. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell*. **79**:1047-1055.
225. **Perego, M., C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher, and J. A. Hoch.** 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**:173-185.
226. **Perego, M., and J. A. Hoch.** 1996. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:1549-1553.
227. **Piggot, P. J., and D. W. Hilbert.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:579-586.
228. **Pittelkow, M., and E. Bremer.** 2011. Cellular adjustment of *Bacillus subtilis* and other *Bacilli* to fluctuating salinities, p. 275-302. *In* A. Ventosa, A. Oren, and Y. Ma (ed.), *Halophiles and hypersaline environments. - Current research and future trends*. Springer, Heidelberg.
229. **Pittelkow, M., B. Tschapek, S. H. Smits, L. Schmitt, and E. Bremer.** 2011. The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *J. Mol. Biol.* **411**:53-67.
230. **Punta, M., P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman, and R. D. Finn.** 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **40**:290-301.
231. **Racher, K. I., R. T. Voegelé, E. V. Marshall, D. E. Culham, J. M. Wood, H. Jung, M. Bacon, M. T. Cairns, S. M. Ferguson, W. J. Liang, P. J. Henderson, G. White, and F. R. Hallett.** 1999. Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry*. **38**:1676-1684.
232. **Ravagnani, A., C. L. Finan, and M. Young.** 2005. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. *BMC Genomics*. **6**:39.
233. **Reddick, J. J., and J. K. Williams.** 2008. The *mngA* gene from *Bacillus subtilis* encodes a degradative acetoacetyl-CoA thiolase. *Biotechnol. Lett.* **30**:1045-1050.
234. **Reeves, A., and W. G. Haldenwang.** 2007. Isolation and characterization of dominant mutations in the *Bacillus subtilis* stressosome components RsbR and RsbS. *J. Bacteriol.* **189**:1531-1541.
235. **Regamey, A., and D. Karamata.** 1998. The N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase encoded by the *Bacillus subtilis* 168 prophage SP *beta*. *Microbiology*. **144**:885-893.
236. **Reith, J., and C. Mayer.** 2011. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**:1-11.



237. **Roberts, D. L., D. W. Bennett, and S. A. Forst.** 1994. Identification of the site of phosphorylation on the osmosensor, EnvZ, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:8728-8733.
238. **Rübenhagen, R., H. Rönsch, H. Jung, R. Krämer, and S. Morbach.** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**:735-741.
239. **Ruzal, S. M., C. López, E. Rivas, and C. Sanchez-Rivas.** 1998. Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* **36**:75-79.
240. **Ruzal, S. M., and C. Sanchez-Rivas.** 1998. In *Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. *Curr. Microbiol.* **37**:368-372.
241. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. E. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
242. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:5463-5467.
243. **Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, and P. Charlier.** 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:234-258.
244. **Schaeffer, P., J. Millet, and J. P. Aubert.** 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**:704-711.
245. **Schiller, D., R. Rubenhagen, R. Krämer, and S. Morbach.** 2004. The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in sensing K<sup>+</sup> as an osmotic stimulus. *Biochemistry.* **43**:5583-5591.
246. **Schöck, F., S. Gotsche, and M. K. Dahl.** 1996. Vectors using the phospho-alpha-(1,1)-glucosidase-encoding gene *treA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene.* **170**:77-80.
247. **Scott, J. R., and T. C. Barnett.** 2006. Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:397-423.
248. **Seibert, T. M.** 2008. Die Zellwand-Hydrolase YocH aus *Bacillus subtilis*: Genetische Kontrolle durch das essentielle Zwei-Komponenten System YycFG, hohe Osmolarität und Kältestress. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
249. **Sekiguchi, J., K. Akeo, H. Yamamoto, F. K. Khasanov, J. C. Alonso, and A. Kuroda.** 1995. Nucleotide sequence and regulation of a new putative cell wall hydrolase gene, *cwdD*, which affects germination in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:5582-5589.
250. **Serizawa, M., and J. Sekiguchi.** 2005. The *Bacillus subtilis* YdfHI two-component system regulates the transcription of *ydfJ*, a member of the RND superfamily. *Microbiology.* **151**:1769-1778.
251. **Serizawa, M., H. Yamamoto, H. Yamaguchi, Y. Fujita, K. Kobayashi, N. Ogasawara, and J. Sekiguchi.** 2004. Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene.* **329**:125-136.
252. **Shafikhani, S. H., I. Mandic-Mulec, M. A. Strauch, I. Smith, and T. Leighton.** 2002. Postexponential regulation of *sin* operon expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**:564-571.
253. **Shah, I. M., and J. Dworkin.** 2010. Induction and regulation of a secreted peptidoglycan hydrolase by a membrane Ser/Thr kinase that detects muropeptides. *Mol. Microbiol.* **75**:1232-1243.

254. **Shah, I. M., M. H. Laaberki, D. L. Popham, and J. Dworkin.** 2008. A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**:486-496.
255. **Shank, E. A., and R. Kolter.** 2011. Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**:741-747.
256. **Shida, T., H. Hattori, F. Ise, and J. Sekiguchi.** 2001. Mutational analysis of catalytic sites of the cell wall lytic N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases CwIC and CwIV. *J. Biol. Chem.* **276**:28140-28146.
257. **Shimane, K., and M. Ogura.** 2004. Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. *J. Biochem.* **136**:387-397.
258. **Smith, T. J., S. A. Blackman, and S. J. Foster.** 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology.* **146** 249-262.
259. **Smith, T. J., and S. J. Foster.** 1995. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **177**:3855-3862.
260. **Smits, W. K., and A. D. Grossman.** 2010. The transcriptional regulator Rok binds A+T-rich DNA and is involved in repression of a mobile genetic element in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* **6**:e1001207.doi:10.1371/journal.pgen.1001207.
261. **Smogorzewska, A., and T. de Lange.** 2004. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:177-208.
262. **Spiegelhalter, F., and E. Bremer.** 1998. Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol. Microbiol.* **29**:285-296.
263. **Spizizen, J.** 1958. Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**:1072-1078.
264. **Spoering, A. L., and M. S. Gilmore.** 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:133-137.
265. **Steil, L., T. Hoffmann, I. Budde, U. Völker, and E. Bremer.** 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.* **185**:6358-6370.
266. **Stephenson, K., and J. A. Hoch.** 2001. PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:15251-15256.
267. **Street, T. O., D. W. Bolen, and G. D. Rose.** 2006. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13997-14002.
268. **Szalewska-Palasz, A., A. Wegrzyn, A. Blaszczyk, K. Taylor, and G. Wegrzyn.** 1998. DnaA-stimulated transcriptional activation of orilambda: *Escherichia coli* RNA polymerase beta subunit as a transcriptional activator contact site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:4241-4246.
269. **Szurmant, H., T. Fukushima, and J. A. Hoch.** 2007. The essential YycFG two-component system of *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **422**:396-417.
270. **Tachibana, K., K. Yoda, S. Watanabe, H. Kadokura, Y. Katayama, K. Yamane, M. Yamasaki, and G. Tamura.** 1987. Secretion of *Bacillus subtilis* alpha-amylase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1775-1782.

271. **Takemaru, K., M. Mizuno, T. Sato, M. Takeuchi, and Y. Kobayashi.** 1995. Complete nucleotide sequence of a skin element excised by DNA rearrangement during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. **141**:323-327.
272. **Tjalsma, H., H. Antelmann, J. D. Jongbloed, P. G. Braun, E. Darmon, R. Dorenbos, J. Y. Dubois, H. Westers, G. Zanen, W. J. Quax, O. P. Kuipers, S. Bron, M. Hecker, and J. M. van Dijl.** 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:207-233.
273. **Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron, and J. M. van Dijl.** 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:515-547.
274. **Tokunaga, T., M. H. Rashid, A. Kuroda, and J. Sekiguchi.** 1994. Effect of *degS-degU* mutations on the expression of *sigD*, encoding an alternative sigma factor, and autolysin operon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**:5177-5180.
275. **Trach, K., D. Burbulys, M. Strauch, J. J. Wu, N. Dhillon, R. Jonas, C. Hanstein, P. Kallio, M. Perego, T. Bird, and et al.** 1991. Control of the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* by a phosphorelay. *Res. Microbiol.* **142**:815-823.
276. **Travers, A., and G. Muskhelishvili.** 2005. DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:157-169.
277. **van der Heide, T., and B. Poolman.** 2000. Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:7102-7106.
278. **van Straaten, K. E., T. R. Barends, B. W. Dijkstra, and A. M. Thunnissen.** 2007. Structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase MltA with bound chitohexaose: implications for peptidoglycan binding and cleavage. *J. Biol. Chem.* **282**:21197-21205.
279. **Vollmer, W., D. Blanot, and M. A. de Pedro.** 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:149-167.
280. **Vollmer, W., B. Joris, P. Charlier, and S. Foster.** 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:259-286.
281. **Vollmer, W., and S. J. Seligman.** 2010. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* **18**:59-66.
282. **von Blohn, C., B. Kempf, R. M. Kappes, and E. Bremer.** 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.* **25**:175-187.
283. **Voskuil, M. I., and G. H. Chambliss.** 1998. The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. *Nucleic Acids Res.* **26**:3584-3590.
284. **Voss, S., and A. Skerra.** 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**:975-982.
285. **Vreeland, R. H., W. D. Rosenzweig, and D. W. Powers.** 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature.* **407**:897-900.
286. **Weinrauch, Y., R. Penchev, E. Dubnau, I. Smith, and D. Dubnau.** 1990. A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev.* **4**:860-872.
287. **Whatmore, A. M., J. A. Chudek, and R. H. Reed.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2527-2535.

288. **Whatmore, A. M., and R. H. Reed.** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2521-2526.
289. **Whisstock, J. C., and A. M. Lesk.** 1999. SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **24**:132-133.
290. **Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* **295**:1487.
291. **Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Krämer, B. Poolman, T. van der Heide, and L. T. Smith.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **130**:437-460.
292. **Yamamoto, H., S. Kurosawa, and J. Sekiguchi.** 2003. Localization of the vegetative cell wall hydrolases LytC, LytE, and LytF on the *Bacillus subtilis* cell surface and stability of these enzymes to cell wall-bound or extracellular proteases. *J. Bacteriol.* **185**:6666-6677.
293. **Yamamoto, K., T. Kitayama, S. Minagawa, T. Watanabe, S. Sawada, T. Okamoto, and R. Utsumi.** 2001. Antibacterial agents that inhibit histidine protein kinase YycG of *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:2306-2310.
294. **Yan, X., H. J. Yu, Q. Hong, and S. P. Li.** 2008. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5556-5562.
295. **Yang, J. C., F. Van Den Ent, D. Neuhaus, J. Brevier, and J. Lowe.** 2004. Solution structure and domain architecture of the divisome protein FtsN. *Mol. Microbiol.* **52**:651-660.
296. **Zhao, H., T. Msadek, J. Zapf, Madhusudan, J. A. Hoch, and K. I. Varughese.** 2002. DNA complexed structure of the key transcription factor initiating development in sporulating bacteria. *Structure.* **10**:1041-1050.
297. **Ziegler, C., E. Bremer, and R. Krämer.** 2010. The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol. Microbiol.* **78**:13-34.

## VIII. ANHANG

## Anhang 1

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden, falls vorhanden, unterstrichen und benannt. In Tabelle 11 sind die Plasmide (Tabelle 4) sowie die aus dieser Konstruktion entstandenen *B. subtilis* Stämme (Tabelle 3) zusammengefasst. Überdies werden die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 10), die wiederum zur Konstruktion der Plasmide notwendig waren, genannt.

Tabelle 10: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
sinR_N_strep_for	ATGGTAGG <u>TCTCAGCGCC</u> ATTGGCCAGCGTATTA AACAATACC	<i>Bsal</i> - Erkennungssequenz
sinR_N_strep_rev	ATGGTAGG <u>TCTCATATCACT</u> CCTCTTTTTGGGATT TTCTCCA	<i>Bsal</i> - Erkennungssequenz
<b>pJMB1/Verkürzungen</b>		
PtreAH_for:	<u>GCCCCGGG</u> CGATTTGCTCACCCCTATTCTC	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
Pcys_rev:	CGGGATCCAAAGAAAGAGCGCAGTAAACAGC	<i>BamHI</i> - Erkennungssequenz
PtreAH_for_trunc_1	<u>GCCCCGGG</u> TCAATTAGAGCCATCCTCATAG	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
PtreAH_for_trunc_2	<u>GCCCCGGG</u> GCCCTTTTGAAAATCATGGAAC	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
PtreAH_for_trunc_2b	<u>GCCCCGGG</u> TCGCCTGCATTTCGCGTTGTC	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
AT_Trunc_1_for	<u>GCCCCGGG</u> AAATTTTTTAAAATGAATAAAAAGTTG	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
AT_Trunc_2_for	<u>GCCCCGGG</u> AAAATGAATAAAAAGTTGCTTCTTTC	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
AT_Trunc_3_for	<u>GCCCCGGG</u> TCTTTCCGCTAATTTTTTCTAATTG	<i>SmaI</i> - Erkennungssequenz
<b>Primer Extension</b>		
PpRB373_yqiH_for	AAAGAATT <u>C</u> CGATTTGCTCACCCCTATTCTC	<i>EcoRI</i> - Erkennungssequenz
PpRB373_yqiH_rev	AAAGAATT <u>C</u> AGGTCTTTTCGCAGCTGAATATC	<i>EcoRI</i> - Erkennungssequenz
PEyqiH_2	ACGTTTATCCTTCGGA <u>ACTTG</u>	Floureszenzlabel (5') DY_781
<b>Komplementation</b>		

## FORTZETZUNG TABELLE 10

Pkomp_pGP382_yqil_for	AAAGGATCCTACAGCTGGAAGATATTCAGC	<i>Bam</i> HI- Erkennungssequenz
Pkomp_pGP382_yqil_rev	CCCCAAGCTTTATACTTATTTTGTCTGGCTCC	<i>Hind</i> III- Erkennungssequenz
PKomp_yqil_for	AAA <u>AAGCTTT</u> ACAGCTGGAAGATATTCAGC	<i>Hind</i> III- Erkennungssequenz
PKomp_yqil_rev	AAAAGCTAGCTATACTTATTTTGTCTGGCTCC	<i>Nhe</i> I- Erkennungssequenz

**Promotor-Mutagenese SigA-Promotor\***

Pprom_Mut -35_T→G_for	CGCCTGCATTGCGTGTCTT <b>G</b> ACAAATTCTCCAT TC	-35 Region
Pprom_Mut -35_T→G_rev	GAATGGAGAATTTGT <b>CA</b> AGACAACGCGAATGCAG GCG	-35 Region
Pprom_Mut GT→TG_for	TTGTCTTTACAAATTCTCCATTCTGT <b>G</b> CAAAGATAA AAGCCAAACATCAGGA	-16 Region
Pprom_Mut GT→TG_rev	TCCTGATGTTTGGCTTTTATCTTT <b>G</b> CACAGAATGG AGAATTTGTAAAGACAA	-16 Region
Pprom_Mut -10_G→A_for	CAAATTCTCCATTCTGGTCAAAA <b>A</b> TAAAAGCCAAA CATCAGGAAG	-10 Region
Pprom_Mut -10_G_A_rev	CTTCCTGATGTTTGGCTTTTATTTT <b>G</b> ACCAGAAT GGAGAATTTG	-10 Region
Pprom_Mut_int_T_for	TTCTCCATTCTGGTCAAAGAGAAAAGCCAAACATC AGGAAG	Invariantes T
Pprom_Mut_int_T_rev	CTTCCTGATGTTTGGCTTTT <b>C</b> TCTTTGACCAGAAT GGAGAA	Invariantes T
Pprom_Mut perf_10_for	GTCTTTACAAATTCTCCATTCTGGTCT <b>TATA</b> TAAAA GCCAAACATCAGGAAGAGGT	-10 Region
Pprom_Mut perf_10_rev	ACCTCTTCCTGATGTTTGGCTTTT <b>ATTATAG</b> ACCA GAATGGAGAATTTGTAAAGAC	-10 Region
Pprom_Mut perf_sigA_for	GCGTTGTCTT <b>G</b> ACAAATTCTCCATTCTGT <b>G</b> CTATA ATAAAAGCCAAACATCAGGAAGAGGTGG	Perfekter SigA Konsensus
Pprom_Mut perf_sigA_rev	CCACCTCTTCCTGATGTTTGGCTTTT <b>ATTATAG</b> CA CAGAATGGAGAATTTGT <b>CA</b> AGACAACGC	Perfekter SigA Konsensus
Pprom_Mut perf_35_10_for	GCGTTGTCTT <b>G</b> ACAAATTCTCCATTCTGGTCT <b>TATA</b> ATAAAAGCCAAACATCAGGAAGAGGTGG	-35 Region/-10 Region
Pprom_Mut perf_35_10_rev	CCACCTCTTCCTGATGTTTGGCTTTT <b>ATTATAG</b> AC CAGAATGGAGAATTTGT <b>CA</b> AGACAACGC	-35 Region/-10 Region

**Mutagenese der putativen SinR Bindestellen\***

Bind_mut_sinR_for	AACTTGCTCGCCTGCATTG <b>CCCC</b> GTCTTTACAAA TTCTCCATTCT	Bindestelle I
-------------------	--	---------------

## Fortsetzung Tabelle 10

Bind_mut_sinR_rev	AGAATGGAGAATTTGTAAAGACG <b>GGG</b> CGAATGCA GGCGAGCAAGTT	Bindestelle I
Bind_mut_sinR_A_for	TGAAAATCATGGAACCTTGCTCGCCTGCATT <b>CGCA</b> <b>AAAA</b> TTTACAAATTCTCCATTCTGGTCAAAGATA AAA	Bindestelle I (AT-reich)
Bind_mut_sinR_A_rev	TTTTATCTTTGACCAGAATGGAGAATTTGTAAATTT <b>TTT</b> GCGAATGCAGGCGAGCAAGTTCCATGATTTT CA	Bindestelle I (AT-reich)
Bind_mutII_sinR_C_for	ATGATCGGGTTCGTATAGCCCTTTT <b>GAAAATCCCC</b> <b>CCC</b> CTTGCTCGCCTGCATT <b>CGC</b>	Bindestelle II (GC-reich)
Bind_mutII_sinR_C_rev	GCGAATGCAGGCGAGCAAG <b>GGGGGG</b> GATTTTCA AAAGGGCTATACGACCCGATCAT	Bindestelle II (GC-reich)
Bind_mutII_sinR_A_for	TCGGGTCGTATAGCCCTTTT <b>GAAAATCAAAAAAT</b> TGCTCGCCTGCATT <b>CGC</b>	Bindestelle II (AT-reich)
Bind_mutII_sinR_A_rev	GCGAATGCAGGCGAGCAATTT <b>TTTT</b> GATTTTCAA AGGGCTATACGACCCGA	Bindestelle II (AT-reich)

**Promotor-Mutagenese des putativen SigH Promotors\***

Prom_mut_sigH10_for	CATCAGGAAGAGGTGGTCATGTG <b>CCCC</b> AAACGGT TCTTTTGCTGTTTAC	-10 Region
Prom_mut_sigH10_rev	GTAACAGCAAAGAACCGTTT <b>GGG</b> CACATGAC CACCTCTTCTGATG	-10 Region
Prom_mut_sigH35_for	GGTCAAAGATAAAAGCCAAACAT <b>CTCCT</b> AGAGGT GGTCATGTGAAACAAACG	-35 Region
Prom_mut_sigH35_rev	CGTTTGTTTCACATGACCACCTCT <b>AGG</b> AGATGTTT GGCTTTTATCTTTGACC	-35 Region

**Insertion/Deletions Mutanten\*\***

P1H	GTTTTCGGAGAATAAACTGCTGAATTAAG	5' Flanke <i>yqiH</i>
P2H	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATTAAC AGCAAAGAACCGTTTGTTCACAT	5' Flanke <i>yqiH</i>
P3K	TTATCGAATTC <b>ACTGG</b> CGTCGTTTTACA <b>ACTG</b> AAGAAAATGAGGAACGGTTTGATTA	3' Flanke <i>yqiK</i>
P4K	TTTCACATGTCAAACA <b>ACTGA</b> AGCAAAG	3' Flanke <i>yqiK</i>
P2D	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATTAAC AGCAAAGAACCGTTTGTTCACAT	Kanamycin- Resistenzkassette
P6D	ATGTGAAACAACCGTTCTTTT <b>GCTG</b> TTTAATAAC AATTT <b>CACACAG</b> GAACAGCTATGA	Kanamycin- Resistenzkassette
P1lytC	<i>TCTCTATTGAGTCTACTAAATATATCCGAC</i>	5' Flanke <i>lytC</i>
P2lytC	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT <b>TACATT</b> <i>TGCTTTGATATTTGTACAGCAGTG</i>	5' Flanke <i>lytC</i>

FORTZETZUNG TABELLE 10

P3lytC	TTATAACATGTATTCACGAACGAAAATCGCTTCTA AAATGCCGAGTGTTTTAGTTGAAAC	3' Flanke <i>lytC</i>
P4lytC	TTTGCACCGCTCATGATTTGTTTTGTAATA	3' Flanke <i>lytC</i>
P5spec	CACTGCTGTACAAATATCAAAGCAAATGTAATAAC AATTTCACACAGGAAACAGCTATGA	Spectinomycin- Resistenzkassette
P6spec	GTTTCAACTAAAACACTCGGCATTTTAGAAGCGAT TTTCGTTTCGTGAATACATGTTATAA	Spectinomycin- Resistenzkassette
P1yrvJ	CAATCGCTTCAATTCCAAACTGATAAAACT	5' Flanke <i>yrvJ</i>
P2yrvJ	TTGATATTTAAATTTATTAGGATCCCCGGGAATAG CGCTGAGGTGAAAATAATACATACA	5' Flanke <i>yrvJ</i>
P3yrvJ	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCATT GTACATAGCAATTCATACCAAGAAA	3' Flanke <i>yrvJ</i>
P4yrvJ	TAATTTCTCAAATGAAGAGGATATGTACGC	3' Flanke <i>yrvJ</i>
P5ery	TGTATGTATTATTTTCACCTCAGCGCTATTCCCGG GGATCCTAATAAATTTAAATATCAA	Erythromycin- Resistenzkassette
P6ery	TTTCTTGGTATGAATTGCTATGTACAATGGATAAC AATTTCACACAGGAAACAGCTATGA	Erythromycin- Resistenzkassette
P1cwIC	GACTTTTTGATTAAATCTCTCGTCTTTTGG	5' Flanke <i>cwIC</i>
P2cwIC	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATATTAGT TAATATCGTACGTAAGGCTAAAGC	5' Flanke <i>cwIC</i>
P3cwIC	TTTAATCTTTTTACGTACACTATCTGCAGCCAAAG GTTTTGACTCGATTGTCTTTTAAA	3' Flanke <i>cwIC</i>
P4cwIC	CTCCTTGCTCAGGAAATTTATAATAAACAG	3' Flanke <i>cwIC</i>
P5cwIC_tet	TTTAAAAGGACAATCGAGTCAAAACCTTTGGCTGC AGATAGTGTACGTAAAAAGATTTAAA	Tetracyclin- Resistenzkassette
P6cwIC_tet	GCTTTAGCCTTACGTACGATATTAECTAATATAAC AATTTCACACAGGAAACAGCTATGA	Tetracyclin- Resistenzkassette
P1cwID	ATTGTACATCCTGTTGCCAATGTTTTTGT	5' Flanke <i>cwID</i>
P2cwID	GGACTGAATAAATTTCGTATAGCATACATTAAGTAA TATGATGAAGCCTAGCAAAAACTG	5' Flanke <i>cwID</i>
P3cwID	CCATATCAAGATAACTTCGTATAATGTATGCTTATA GAAGTCGGATTTTTATCCAATCCA	3' Flanke <i>cwID</i>
P4cwID	TCTTTGCACTTTCATAATAAGCCATGTTCT	3' Flanke <i>cwID</i>
P5cwID_zeo	TGGATTGGATAAAAATCCGACTTCTATAAGCATAC ATTATACGAAGTTATCTTGATATGG	Zeocin- Resistenzkassette



## FORTZETZUNG TABELLE 10

P6cwID_zeo	<i>CAGTTTTTTGCTAGGCTTCATCATATTACTTAATGT ATGCTATACGAAGTTATTCAGTCC</i>	Zeocin- Resistenzkassette
<b>Sequenzierungs-Oligonukleotide</b>		
pASK-IBA-forward	GTGAAATGAATAGTTCGAC	pASK-IBA3 plus pASK-IBA5 plus
pASK-IBA-reverse	CGGCAAATGGCGATCGC	pASK-IBA3 plus pASK-IBA5 plus
PpJMB1-pFSB1_for	ATAAGGGTAACTATTGCCG	pJMB1
PpFSB1-gfp_rev	CCCATTAACATCACCATC	pJMB1
pRB373_for	CGCCCCGCCCTG	pRB373
pRB373_rev	G TTCAGAACGCTCGG	pRB373
PpDR110_pDR111_seq_ for	AAGTTGTTGACTTTATCTAC	pDR110
PpDR110_pDR111_seq_ rev	TGTAAGATTTAAATGCAACC	pDR110
M13_puc_for:	GTAAAACGACGGCCAGTG	pGP382
M13_puc_rev	GGAAACAGCTATGACCATG	pGP382
degQ_for	CAGGAAACGCCAAGAATCGCATAT	Biofilm
degQ_rev	GACTTGTTTCCAAGTCTTTTTTCACG	Biofilm
swrA_for	AGAGATTATGGATCATAAGTCAC	Biofilm
swrA_rev	TATTAATGGCTTGGATATCCTC	Biofilm
epsC_for	GCTGTGTATCACACGATGTTCTTC	Biofilm
epsC_rev	CCTCTTCTGGATTGTGTTCCAT	Biofilm
sfp_for	TTTTGCAGACGGAGGATCTAG	Biofilm
sfp_rev	TGTCAAGCTGTTGATGAGCCA	Biofilm

\*Mutagenisierte Basen wurden hervorgehoben

\*\*Sequenzbereiche, welche homolog zu den jeweiligen Zielgenen sind, sind kursiv dargestellt

**Tabelle 11:** Die *B. subtilis* Stammkonstruktion im Überblick

Stamm	Plasmid	Oligonukleotid
KFB8	-	P1H, P2H, P3K, P4K, P2D, P6D
KFB9	-	P1lytC, P2lytC, P3lytC, P4lytC, P5spc, P6spc
KFB10	-	P1yrvJ, P2yrvJ, P3yrvJ, P4yrvJ, P5ery, P6ery
KFB14	-	Siehe Einzelmutanten
KFB15	pKF13	PtreAH_for; Pcys_rev
KFB16	-	P1cwIC, P2cwIC, P3cwIC, P4cwIC, P5cwIC_tet, P6cwIC_tet
KFB17	-	P1cwID, P2cwID, P3cwID, P4cwID, P5cwID_zeo, P6cwID_zeo
KFB23	pKF13	Siehe oben
KFB24	pKF18	Pprom_Mut_-35_T→G_for; Pprom_Mut_-35_T→G_rev
KFB25	pKF19	Pprom_Mut_GT→TG_for; Pprom_Mut_GT→TG_rev
KFB26	pKF20	Pprom_Mut_-10_G→A_for; Pprom_Mut_-10_G→A_rev
KFB29	-	Siehe Einzelmutanten
KFB31	-	Siehe Einzelmutanten
KFB32	pKF24	Pprom_Mut_int_T_for; Pprom_Mut_int_T_rev
KFB33	pKF25	Pprom_Mut_perf_10_for; Pprom_Mut_perf_10_rev
KFB34	pKF26	Pprom_Mut_perf_sigA_for; Pprom_Mut_perf_sigA_rev
KFB35	pKF27	Pprom_Mut_perf_35_10_for; Pprom_Mut_perf_35_10_rev
KFB36	-	Siehe Einzelmutanten
KFB37	-	Siehe Einzelmutanten
KFB38	pKF28	PtreAH_for_trunc_1; Pcys_rev
KFB39	pKF29	PtreAH_for_trunc_2; Pcys_rev
KFB40	pKF30	PtreAH_for_trunc_2b; Pcys_rev
KFB41	pKF13	Siehe oben

---

**FORTZETZUNG TABELLE 11**

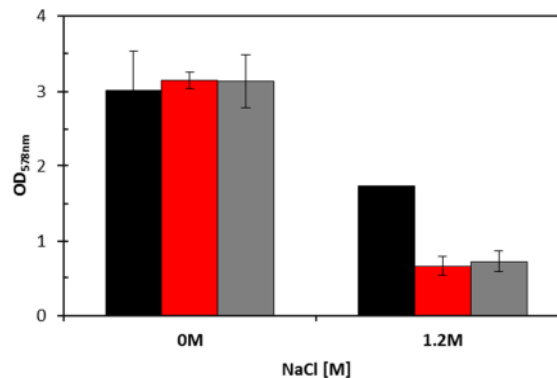
KFB42	pKF13	Siehe oben
KFB43	pKF13	Siehe oben
KFB44	pKF13	Siehe oben
KFB45	pKF13	Siehe oben
KFB46	pKF13	Siehe oben
KFB47	pKF13	Siehe oben
KFB51	pKF34	PKomp_yqil_for; PKomp_yqil_rev
KFB55	pKF36	AT_Trunc_1_for; Pcys_rev
KFB56	pKF37	AT_Trunc_2_for; Pcys_rev
KFB57	pKF38	AT_Trunc_3_for; Pcys_rev
KFB63	pKF45	Prom_mut_sigH10_for; Prom_mut_sigH10_rev
KFB64	pKF46	Prom_mut_sigH35_for; Prom_mut_sigH35_rev
KFB65	pKF47	Bind_mut_sinR_for; Bind_mut_sinR_rev
KFB69	pKF48	Bind_mut_sinR_A_for; Bind_mut_sinR_A_rev
KFB70	pKF49	Bind_mutII_sinR_C_for; Bind_mutII_sinR_C_rev
KFB71	pKF50	Bind_mutII_sinR_A_for; Bind_mutII_sinR_A_rev
KFB72	pKF13	Siehe oben
KFB78	pKF13	Siehe oben

---

**Anhang 2**

In einem vorangegangenen Komplementations-Experiment wurde die Expression des *yqil* Gens durch einen IPTG induzierbaren ( $P_{\text{spank}}$ ) Promotor gesteuert. Dafür wurde sowohl der *B. subtilis* Wildtyp-Stamm, die Deletionsmutante KFB8 als auch der Komplementations-Stamm in SMM sowie in SMM-1,2 M NaCl kultiviert. Die optische Dichte der Kulturen wurde nach 22-stündiger Inkubation bei 37°C photometrisch ( $OD_{578}$ ) bestimmt (Abbildung 56). Die Wachstumserträge der Deletionsmutante KFB8 sowie die des Komplementations-Stammes KFB51 waren unter den getesteten physiologischen

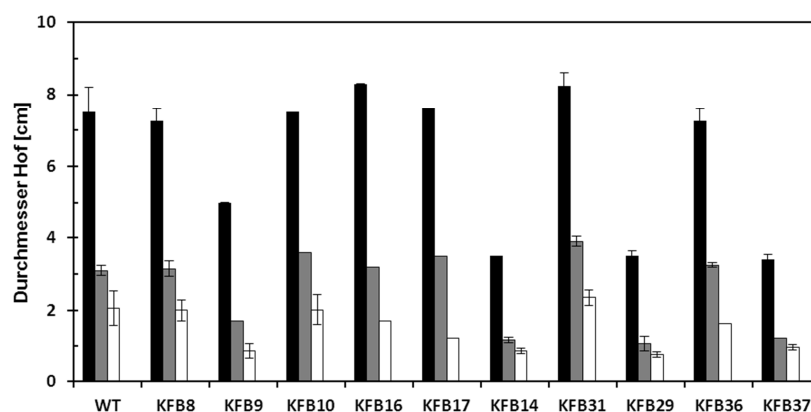
Bedingungen nahezu deckungsgleich (Abbildung 56). Eine Komplementation des Phänotyps der *yqiHIK* Deletionsmutante blieb somit erfolglos.



**Abb. 56: Versuchte Komplementation des Phänotyps der Mutante KFB8 durch die Synthese von Yqil.** Die *B. subtilis* Stämme 168 (■), KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ) (■) sowie der Komplementations-Stamm KFB51 (■) wurden in SMM mit sowie ohne der Zugabe von 1,2 M NaCl für 22 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 578 nm bestimmt. Die Expression des Gens *yqil* unterliegt der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren  $P_{\text{spark}}$  Promotors.

### Anhang 3

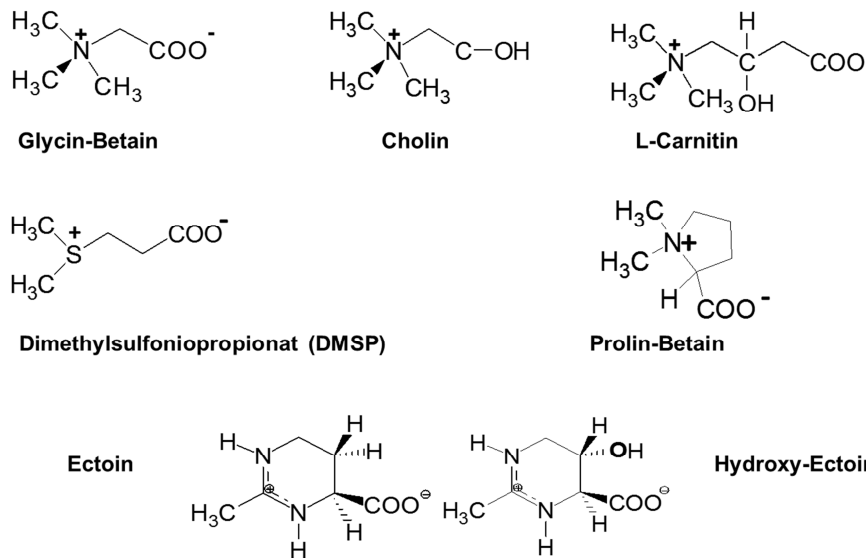
Für die Analyse des Schwärmeverhaltens des *B. subtilis* Wildtypstammes sowie das der Zellwandhydrolase-Mutanten KFB8, KFB9, KFB16, KFB17, KFB14, KFB31, KFB29, KFB36 und KFB37 (Tabelle 3), wurden diese Stämme in SMM bis zur exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  0,5-1) inkubiert. Mit Hilfe dieser Kulturen wurden SMM-Softagarplatten inokuliert, indem 5  $\mu$ l der Proben auf die Mitte einer Platte aufgebracht wurden. Die verwendeten SMM-Softagarplatten unterschieden sich in ihrer NaCl-Konzentration (0 M NaCl, 0,5 M NaCl, 0,7 M NaCl). Die Platten wurden anschließend für 24 bis 48 Stunden, abhängig von ihrer NaCl-Konzentration, bei 37°C inkubiert. Der Durchmesser der Ausbreitungszone wurde nach der Inkubation bestimmt (Abbildung 57).



**Abb. 57: Analyse des Schwärmeverhaltens von Zellwandhydrolase-Mutanten auf Softagarplatten.**

Dargestellt ist das Schwärmeverhalten des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 (WT) sowie das der Deletionsmutanten KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ), KFB9 ( $\Delta lytC$ ), KFB16 ( $\Delta cwlC$ ), KFB17 ( $\Delta cwlD$ ), KFB14 ( $\Delta yqiHIK \Delta lytC \Delta yrvJ$ ), KFB31 ( $\Delta yqiHIK \Delta cwlC \Delta cwlD$ ), KFB29 ( $\Delta yqiHIK \Delta lytC \Delta yrvJ \Delta cwlD$ ), KFB36 ( $\Delta yqiHIK \Delta yrvJ \Delta cwlC \Delta cwlD$ ) und KFB37 ( $\Delta yqiHIK \Delta lytC \Delta yrvJ \Delta cwlC \Delta cwlD$ ). Die verwendeten SMM-Softagarplatten variierten dabei in ihrer NaCl-Konzentration: 0 M NaCl (■), 0,5 M NaCl (■); 0,7 M NaCl (□).

## Anhang 4

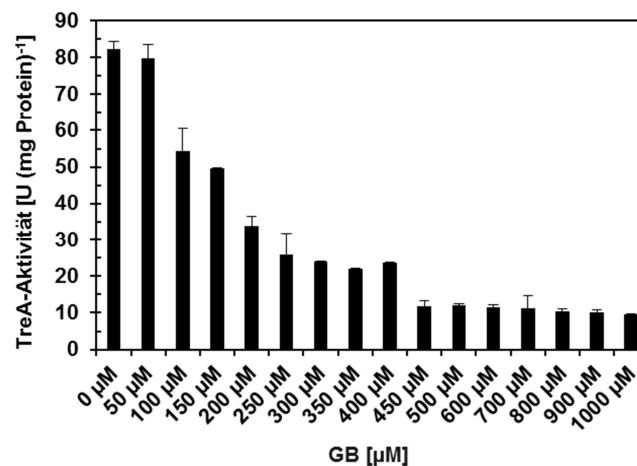


**Abb. 58: Strukturen diverser kompatibler Solute aus *B. subtilis*.**

Gezeigt sind die Strukturformeln der kompatiblen Solute Glycin-Betain, Cholin, L-Carnitin, DMSP, Prolin-Betain, Ectoin sowie Hydroxy-Ectoin.

## Anhang 5

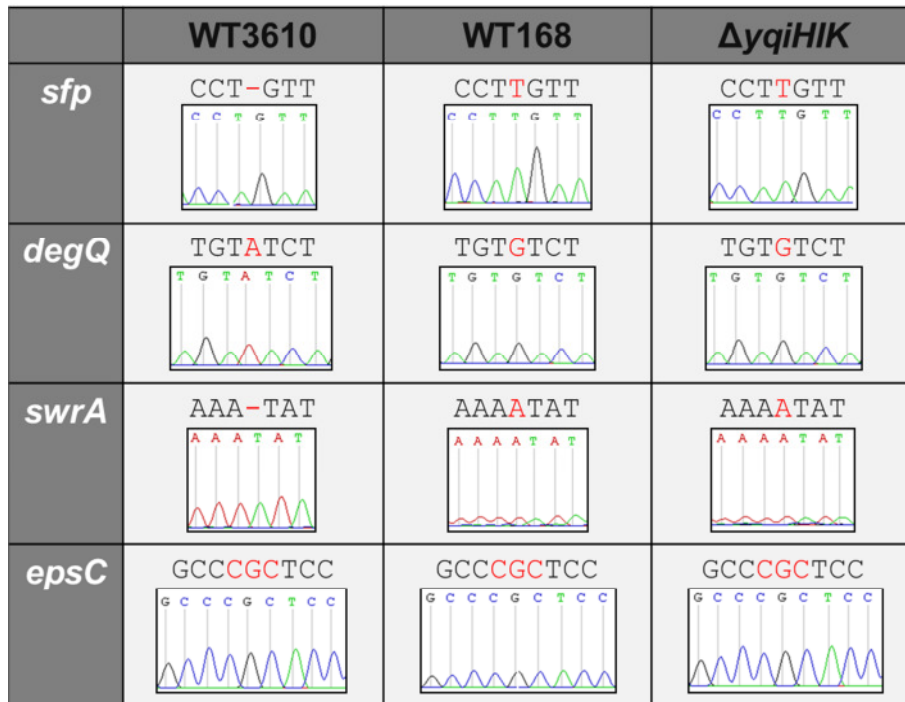
Zur Untersuchung der minimalen Glycin-Betain Konzentration, die ausreichend ist, um die Promotoraktivität des *yqiH* Operons vollständig zu reprimieren, wurde der Stamm KFB15 unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) in SMM kultiviert. Zusätzlich wurden zu den SMM-1,2 M NaCl Kulturen jeweils aufsteigende Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  1.000  $\mu\text{M}$ ) des kompatiblen Solut Glycin-Betain zugefügt. Nach Erreichen der mittleren-exponentiellen Wachstumsphase ( $\text{OD}_{578}$  1-1,5), wurden Proben dieser Kulturen entnommen und anschließend in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt (Abbildung 59). Bereits bei 250  $\mu\text{M}$  konnte eine deutliche Reduktion der *yqiH* Transkriptmenge beobachtet werden, wohingegen bei 450  $\mu\text{M}$  eine vollständige Repression der *yqiH* Expression zu verzeichnen war.



**Abb. 59: Abhängigkeit der *yqiH*-Promotoraktivität von der externen Glycin-Betain Konzentration.**

Gezeigt wird die Bestimmung der TreA-Aktivität des Stammes KFB15 in SMM-1,2 M NaCl, welches mit verschiedenen Glycin-Betain (GB) Konzentrationen supplementiert worden war.

## Anhang 6



**Abb. 60: Sequenzierungs-Ergebnisse der identifizierten Biofilm-Markergene.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Sequenzierungsreaktion der Biofilm-Markergene *sfp*, *degQ*, *swrA* und *epsC* (187) aus den *B. subtilis* Stämmen Wildtyp 3610, Wildtyp 168 sowie KFB8 ( $\Delta yqiHIK$ ).

## IX. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bremer für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken. Weiterhin möchte ich Danke sagen für die vielen fruchtbaren Diskussionen über wissenschaftliche sowie alltagsbezogenen Aspekte, für die intensive Betreuung, Förderung und die netten Worte während meiner ganzen Zeit in der AG Bremer.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thanbichler für die Bereitschaft als zweiter Gutachter zu fungieren sowie für die dreijährige Begleitung meiner Arbeit im Rahmen meines Thesis-Komitees der IMPRS bedanken.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank ebenfalls den weiteren Mitgliedern des Komitees, Prof. Dr. Lingelbach und Prof. Dr. Mösch. An dieser Stelle sei auch der IMPRS für die dreijährige Förderung und Finanzierung gedankt.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Tamara Hoffman für ihre unglaubliche Geduld, ihre stetigen Hilfestellungen, ihre Tipps beim Lösen von wissenschaftlichen als auch technischen Problemen sowie vor allem für ihre Ehrlichkeit, konstruktive Kritik und ihre Korrekturvorschläge beim Verfassen meiner Bachelor-, Master- und Doktorarbeit. Darüber hinaus möchte ich Tamara sowie Jutta Gade für den tollen Laboralltag, die zahlreichen Kaffeepausen, die schönen Stunden und die aufmunternden Worte danken, die meine Promotion zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben. Jutta, vielen Dank auch für die Spurenelemente.

Großer Dank gilt auch dem „Arbeitskreis KF“. Zunächst möchte ich mich dabei herzlich bei Jochen Sohn für die große Hilfe bei allen (computer-) technischen und praktischen Problemen sowie für die geleistete Unterstützung in den letzten zwei Jahren bedanken. Darüber hinaus möchte ich auch meinen Masterstudenten Christian Arnold, Patrick Köhler und Nils Widderich sowie meinen Bachelorstudenten Laura Czech und Jan Vogel für die tolle Erfahrung bei deren Betreuung bedanken und natürlich für die witzigen Stunden, die wie zusammen im Labor sowie in der Kaffee-Küche miteinander verbracht haben.

Natürlich möchte ich mich auch bei der gesamten Mikrobiologie (AG Bremer, AG Heider und AG Buckel) für die familiäre und harmonische Atmosphäre während der ganzen Zeit bedanken sowie für die netten „Grill-Nachmittage“, die in dieser Zeit stattgefunden haben.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und vieles überhaupt erst ermöglicht haben. Ganz besonders möchte ich jedoch meinem Freund Manuel danken, der mich über die ganze Zeit hinweg immer wieder motiviert hat, sich mit meiner Arbeit interessiert auseinandergesetzt hat und mir bei allem immer zur Seite stand.

*Vielen Dank!*

## X. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Eine neue Facette im zellulären Anpassungsprozess von *Bacillus subtilis* an hohe Salinitäten: Die Analyse des osmotisch induzierten *yqiHIK* Operons“**

selbständig verfasst und keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Textstellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, sind mit einer Quellenangabe kenntlich gemacht.

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

---

Kathleen E. Fischer

---

Ort, Datum



## XI. LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

---

**Name:** Kathleen Elisabeth Fischer  
**Geburtsdatum:** 05.05.1985  
**Geburtsort:** Marburg  
**Nationalität:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

### Universitätsausbildung

---

#### Philipps-Universität Marburg

seit 10/2009

#### Promotion am Fachbereich Biologie/Mikrobiologie

(Inhaberin eines Promotionsstipendiums der Max-Planck-Gesellschaft/International Max Planck Research School for Environmental and Cellular Microbiology [IMPRS])

**Thema der Dissertation:** Eine neue Facette im zellulären Anpassungsprozess von *Bacillus subtilis* an hohe Salinitäten: Die Analyse des osmotisch induzierten *yqiHIK* Operons

10/2007 – 07/2009

#### Master-Studiengang Molecular and Cellular Biology

**Abschluss:** Master of Science

**Thema der Masterarbeit:** Analyse zur Auswirkung der vermutlichen Amidase Yqil aus *Bacillus subtilis* auf den Zellwandmetabolismus von *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen

#### Fachmodule:

Molekulare Mikrobiologie; Mikrobielle Ökologie; Molekulare und zelluläre Infektionsbiologie

10/2004 – 06/2007

#### Bachelor-Studiengang Biology

**Abschluss:** Bachelor of Science

**Thema der Bachelorarbeit:** Optimierung der *Bacillus subtilis* Expressionssysteme pHT09 und pHT43 zur Produktion des Cholin-Bindeproteins OpuBC aus *Bacillus subtilis*

#### Vertiefungsmodul:

Mikrobiologie II

#### Fachmodule:

Biologie der Zelle; Mikrobiologie I; Genetik I; Mykologie

---

**Schul Ausbildung**

---

08/1995 – 06/2004

**Gymnasium Lahntalschule Biedenkopf****Abschluss:** Abitur**Leistungskurse:**

Biologie; Deutsch

---

**Praktische Erfahrung**

---

10/2009 – 10/2012

Anfertigung der Dissertation im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Erhard Bremer) an der Philipps-Universität Marburg

10/2007 – 09/2009

Anfertigung der Masterarbeit im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Erhard Bremer) an der Philipps-Universität Marburg

09/2007 – 10/2007

Praktikum am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

03/2007 – 06/2007

Anfertigung der Bachelorarbeit im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Erhard Bremer) an der Philipps-Universität Marburg

01/2007 – 03/2007

Praktikum im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Erhard Bremer) an der Philipps-Universität Marburg

---

**Besondere Kenntnisse & Fähigkeiten**

---

**Fremdsprachen**

Englisch: fließend in Wort und Schrift

Französisch: Grundkenntnisse

**EDV-Kenntnisse**

Fundierte Kenntnisse in MS-Office (Word, Excel, PowerPoint)

**SciMento**

10/2010 – 10/2012

Mitglied des SciMento Mentoring Programms für Frauen in den Natur- und Ingenieurwissenschaften

**Workshops**

Erfolgreich Führen und Leiten

Scientific Writing and Presentation skills

---

Kathleen E. Fischer

---

Ort, Datum