

# **Prolin als osmotische Schutzsubstanz und Nahrungsquelle**

**Hydrolyse prolinhaltiger Peptide und evolutionäre Anpassung des  
Argininabbau-Weges für die anabole Prolinbiosynthese**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. Nat.)**

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Adrienne Zaprasis**

aus Chemnitz

Marburg/Lahn 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2010 bis Januar 2013 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität in Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

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

Gutachter dieser Arbeit waren:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2013

*Ein neuer Gedanke wird zuerst versacht,  
dann bekämpft, bis er nach längerer Zeit  
als selbstverständlich gilt.*

(Arthur Schopenhauer)

*Für meine Mutti*

In Zusammenarbeit mit der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht und Manuskripte vorbereitet:

Moses M., Sinner T., **Zaprasis A.**, Stöveken N., Hoffmann T., Belitsky BR., Sonenshein AL., and Bremer E. (2012). Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *Journal of Bacteriology*. 194, 745-758

**Zaprasis A.**, Brill J., Thüring M., Wünsche G., Heun M., Hoffmann T., and Bremer E. (2013) Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 576-587

**Zaprasis A.**, Hoffmann T., Wünsche G., Floréz LA., Stülke J., and Bremer E. Bypass of the ProA bottleneck in proline biosynthesis of *Bacillus subtilis*: mutational activation of the RocR regulator and of a cryptic *rocDEF* promoter. (*In Vorbereitung*)

Kohlstedt, M., Sappa, PK., Meyer, H., Maaß, S., **Zaprasis, A.**, Hoffmann, T., Becker, J., Mäder, Steil, L., U., Hecker, M., Stülke, J., Bremer, E., Lalk, M., Völker, U., Wittmann C. A multi-omics perspective of the adaptation of carbon core metabolism of *Bacillus subtilis* to carbon limitation and simultaneous osmotic challenge (*In Vorbereitung*)

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis.....   | IV        |
| Abbildungsverzeichnis .....  | V         |
| Tabellenverzeichnis .....  | VII       |
| <b>1 Zusammenfassung.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2 Summary .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>3 Einleitung .....</b>  | <b>3</b>  |
| 3.1 Der Modellorganismus <i>Bacillus subtilis</i> : Forschung und Industrie..... | 3         |
| 3.2 Osmoregulation in <i>Bacillus subtilis</i> .....                             | 4         |
| 3.2.1 Die Aufrechterhaltung des Turgors.....                                     | 4         |
| 3.2.2 Die „salt out“ Strategie .....   | 5         |
| 3.2.3 Kompatible Solute: Eigenschaften und Wirkungsweise .....                   | 6         |
| 3.2.4 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt .....                           | 7         |
| 3.3 Die Rolle der Aminosäure Prolin in <i>Bacillus subtilis</i> .....            | 8         |
| 3.3.1 Prolinbiosynthese in <i>Bacillus subtilis</i> .....                        | 8         |
| 3.3.2 Die Nutzung von Prolin als Nährstoffquelle.....                            | 11        |
| 3.4 Die Rolle der Peptide in <i>Bacillus subtilis</i> .....                      | 12        |
| 3.5 Zielsetzung.....   | 14        |
| <b>4 Material und Methoden .....</b>   | <b>16</b> |
| 4.1 Material.....  | 16        |
| 4.1.1 Chemikalien .....  | 16        |
| 4.1.2 Enzyme und Oligonukleotide.....  | 16        |
| 4.1.3 Medien .....   | 16        |
| 4.2 Mikrobiologische Methoden.....   | 18        |
| 4.2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....   | 18        |
| 4.2.2 Wachstum von Bakterien .....   | 19        |
| 4.2.3 Bestimmung der Zelldichte .....  | 19        |
| 4.2.4 Bestimmung von Mutationsraten .....  | 19        |
| 4.2.5 Wachstumshemmung durch toxische Prolinanaloga .....                        | 20        |
| 4.3 Molekularbiologische Methoden .....  | 20        |
| 4.3.1 Präparation und Nachweis von DNA .....                                     | 20        |
| 4.3.2 Transformation von Bakterien .....   | 24        |
| 4.3.3 Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen .....                      | 26        |
| 4.4 Biochemische Methoden.....   | 27        |
| 4.4.1 Quantifizierung von Prolin.....  | 27        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.4.2    | Bestimmung von Enzymaktivitäten .....  | 28        |
| <b>5</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>31</b> |
| 5.1      | Untersuchungen zur Umgehung der <i>proA</i> Deletion.....  | 31        |
| 5.1.1    | Isolierung von Pro <sup>+</sup> Suppressor-Mutanten .....  | 31        |
| 5.1.2    | Die Pro <sup>+</sup> Suppressor-Mutationen erlauben keine Osmoprotektion von <i>B. subtilis</i><br>bei Hyperosmolarität..... | 33        |
| 5.1.3    | Der Prolinkatabolismus ist nicht an der Umgehung der <i>proA</i> -Deletion beteiligt   | 36        |
| 5.1.4    | Der Argininkatabolismus ist an der Synthese von Prolin beteiligt .....   | 37        |
| 5.1.5    | Lokalisierung der Pro <sup>+</sup> Suppressor-Mutationen im Chromosomen von <i>B. subtilis</i><br>.....                      | 40        |
| 5.1.6    | Physiologische Charakterisierung der verschiedenen Klassen von Pro <sup>+</sup><br>Suppressor-Mutationen .....               | 42        |
| 5.1.7    | Klasse I: Punktmutationen im Aktivatorprotein RocR (RocR*).....  | 43        |
| 5.1.8    | Klasse II: Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors.....  | 46        |
| 5.1.9    | Mutationen ermöglichen neues Expressionsmuster des Argininabbau Clusters<br><i>rocDEF</i> .....                              | 50        |
| 5.2      | Untersuchungen der osmoprotektiven Wirkung prolinhaltiger Peptide in <i>B. subtilis</i> .....                                | 51        |
| 5.2.1    | Komplementation der Prolin-Auxotrophie durch die Spaltung prolinhaltiger<br>Peptide.....                                     | 51        |
| 5.2.2    | Prolinhaltige Peptide besitzen eine osmoprotektive Wirkung auf das Wachstum<br>der <i>B. subtilis proHJ</i> -Mutante.....    | 52        |
| 5.2.3    | Untersuchungen zur Verstoffwechslung prolinhaltiger Peptide.....   | 55        |
| 5.2.4    | Die Spaltung prolinhaltiger Peptide führt zur Akkumulation der osmotischen<br>Schutzsubstanz Prolin.....                     | 56        |
| 5.2.5    | <i>In silico</i> Identifizierung möglicher Prolin Iminopeptidasen in <i>B. subtilis</i> .....                                | 58        |
| 5.2.6    | YbaC und YclE sind nicht an der Spaltung prolinhaltiger Peptide beteiligt.....   | 59        |
| 5.2.7    | <i>In silico</i> Identifizierung möglicher Prolin Amino-Peptidasen in <i>B. subtilis</i> .....                               | 61        |
| 5.2.8    | Die Rolle der Prolin Amino-Peptidasen PapA und PapB im Schutz vor<br>Hyperosmolarität.....                                   | 64        |
| 5.2.9    | Der <i>B. subtilis</i> Wildtypstamm wird in Anwesenheit prolinhaltiger Peptide vor<br>hohen Osmolaritäten geschützt .....    | 66        |
| 5.2.10   | Der Abbau von externem Prolin ist bevorzugt unter hochosmolaren Bedingungen<br>.....   | 68        |
| 5.2.11   | Der Einfluss der prolinhaltigen Peptide auf die Transkription von <i>putBCP</i><br>.....                                     | 69        |
| 5.3      | Untersuchungen zur Identifizierung des dritten Prolintransporters in <i>B. subtilis</i> .....                                | 70        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.3.1     | Bioinformatische Analyse möglicher Prolintransporter.....       | 71         |
| 5.3.2     | Untersuchungen zum Prolintransport in <i>B. subtilis</i> .....  | 73         |
| <b>6</b>  | <b>Diskussion.....</b>  | <b>77</b>  |
| 6.1       | Die physiologische Rolle von Prolin in <i>B. subtilis</i> ..... | 78         |
| 6.1.1     | Prolinbiosynthese .....   | 78         |
| 6.1.2     | Argininabbau.....   | 82         |
| 6.1.3     | Prolin Chemotaxis.....  | 82         |
| 6.1.4     | Prolinabbau .....   | 83         |
| 6.1.5     | Peptidnutzung .....   | 85         |
| 6.1.6     | Vernetzung des Argininabbaus mit der Prolinbiosynthese .....    | 88         |
| 6.1.7     | Prolin „recycle“ Kreislauf.....                                 | 92         |
| 6.1.8     | Prolintransport.....  | 93         |
| 6.2       | Ausblick.....   | 94         |
| <b>7</b>  | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                               | <b>97</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Anhang.....</b>  | <b>112</b> |
| 8.1       | Oligonukleotide .....   | 112        |
| 8.2       | Bakterienstämme .....   | 116        |
| 8.3       | Plasmide.....   | 120        |
| 8.4       | Bioinformatische Methoden.....                                  | 120        |
| 8.4.1     | Verwendete Computerprogramme .....                              | 120        |
| 8.4.2     | Verwendete Internetplattformen .....                            | 121        |
| 8.5       | Formelsammlung .....  | 121        |
| 8.5.1     | Fehlerrechnung .....  | 121        |
| 8.5.2     | Das Lambert-Beersche Gesetz.....                                | 122        |
| <b>9</b>  | <b>Danksagung.....</b>  | <b>123</b> |
| <b>10</b> | <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>124</b> |
| <b>11</b> | <b>Erklärung.....</b>   | <b>125</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| $\alpha$ -PNPG                     | p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucofuranosid                     |
| A <sub>230</sub>                   | Absorption bei 230 nm   |
| A <sub>260</sub>                   | Absorption bei 260 nm   |
| A <sub>280</sub>                   | Absorption bei 280 nm   |
| AC                                 | L-Azetidin-2-carbonsäure                                      |
| ATP                                | Adenosintriphosphat   |
| $\beta$ -ONPG                      | o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid                    |
| bp                                 | Basenpaare ( <i>base pairs</i> )                              |
| C                                  | Kohlenstoff ( <i>carbon</i> )                                 |
| Cm <sup>R</sup>                    | Chloramphenicol-Resistenz                                     |
| C-terminal                         | Carboxy-terminal  |
| dH <sub>2</sub> O                  | destilliertes Wasser  |
| DHP                                | 3,4-Dehydro-DL-Prolin   |
| DHP <sup>R</sup>                   | DHP-Resistenz   |
| DNA                                | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP                               | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                |
| EDTA                               | Ethylendiamintetraessigsäure                                  |
| Er <sup>R</sup>                    | Erythromycin-Resistenz  |
| <i>et al.</i>                      | und andere, <i>et alii</i> (lateinisch)                       |
| Km <sup>R</sup> ; neo <sup>R</sup> | Kanamycin-Resistenz   |
| LB                                 | Luria Bertani (Medium)  |
| LFH                                | <i>Long Flanking Homology</i>                                 |
| N                                  | Stickstoff ( <i>nitrogen</i> )                                |
| N-terminal                         | Amino-terminal  |
| OD <sub>578</sub>                  | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm              |
| PCR                                | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> ) |
| rpm                                | Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )      |
| RNA                                | Ribonukleinsäure  |
| SDS                                | Natriumdodecylsulfat  |
| Sig                                | Sigmafaktor   |
| SMM                                | Spizizen's Minimal Medium                                     |
| Sp <sup>R</sup>                    | Spectinomycin-Resistenz                                       |
| TAE                                | Tris-HCl/Acetat/EDTA  |
| U                                  | <i>units</i> (Einheiten)                                      |
| UV                                 | Ultraviolett  |
| v/v                                | Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )              |
| w/v                                | Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )              |
| Zeo <sup>R</sup>                   | Zeocin-Resistenz  |

### Aminosäure-Nomenklatur IUPAC-IUB, (6)

|   |           |   |           |   |              |   |            |
|---|-----------|---|-----------|---|--------------|---|------------|
| A | Alanin    | Q | Glutamin  | L | Leucin       | S | Serin      |
| R | Arginin   | E | Glutamat  | K | Lysin        | T | Threonin   |
| N | Asparagin | G | Glycin    | M | Methionin    | W | Tryptophan |
| D | Aspartat  | H | Histidin  | F | Phenylalanin | Y | Tyrosin    |
| C | Cystein   | I | Isoleucin | P | Prolin       | V | Valin      |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 1:</b> Die „Salt out“ Strategie: Anpassung von <i>B. subtilis</i> an Hyperosmolarität.....  | 6  |
| <b>Abb. 2:</b> Die verschiedenen Wege der Prolinbiosynthese und deren Regulation in <i>B. subtilis</i> . ....   | 10 |
| <b>Abb. 3:</b> Prolinabbau in <i>B. subtilis</i> .....  | 12 |
| <b>Abb. 4:</b> Peptidaufnahmesysteme in <i>B. subtilis</i> . ....   | 14 |
| <b>Abb. 5:</b> Einfluss der Suppressor-Mutationen auf das Wachstum von <i>B. subtilis proBA</i> -<br>Deletionsstämmen unter isoosmolaren Bedingungen..... | 32 |
| <b>Abb. 6:</b> Wachstum verschiedener <i>B. subtilis</i> Deletionsstämme auf Minimal-Agarplatten. ....  | 33 |
| <b>Abb. 7:</b> Einfluss der Suppressor-Mutationen auf das Wachstum von <i>B. subtilis proA</i> -<br>Deletionsstämmen unter hochosmolaren Bedingungen..... | 34 |
| <b>Abb. 8:</b> Einfluss der externen Salzkonzentration auf die Höhe des intrazellulären Prolin-pools des<br><i>B. subtilis</i> Wildtypstammes JH642.....  | 34 |
| <b>Abb. 9:</b> Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Zellen und der Menge<br>an intrazellulär akkumuliertem Prolin. .... | 35 |
| <b>Abb. 10:</b> Einfluss der <i>putC</i> -Deletion auf das Wachstum verschiedener <i>B. subtilis</i> Pro <sup>+</sup> Suppressor-<br>Stämme. ....         | 37 |
| <b>Abb. 11:</b> Einfluss von Arginin auf das Wachstum verschiedener <i>B. subtilis</i> Deletions-Stämme auf<br>Minimal-Agarplatten. ....                  | 38 |
| <b>Abb. 12:</b> Prolinbiosynthese ausgehend von Glutamat und ausgehend von Arginin.....   | 39 |
| <b>Abb. 13:</b> Einfluss der <i>rocD</i> -Deletion auf das Wachstum verschiedener <i>B. subtilis</i> Pro <sup>+</sup><br>Suppressor-Stämme. ....          | 40 |
| <b>Abb. 14:</b> Einfluss der <i>sigL</i> -Deletion auf das Wachstum verschiedener <i>B. subtilis</i> Pro <sup>+</sup> Suppressor-<br>Stämme. ....         | 43 |
| <b>Abb. 15:</b> Regulation der <i>rocDEF</i> Transkription in <i>B. subtilis</i> und Lokalisierung der<br>Punktmutationen in RocR.....                    | 44 |
| <b>Abb. 16:</b> Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors innerhalb der <i>rocDEF</i><br>Promotorregion. ....                               | 47 |
| <b>Abb. 17:</b> Prolinhaltige Peptide ermöglichen Wachstum eines Prolin auxotrophen <i>B. subtilis</i><br>Stammes.....                                    | 52 |
| <b>Abb. 18:</b> Die osmoprotektive Wirkung verschiedener prolinhaltiger Peptide auf das Wachstum<br>von <i>B. subtilis</i> . ....                         | 53 |
| <b>Abb. 19:</b> Einfluss prolinhaltiger Peptide auf das Wachstum der <i>proHJ</i> -Mutante GWB100 unter<br>hochosmolaren Bedingungen. ....                | 54 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 20:</b> Einfluss der <i>putBCP</i> Deletion auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> in der Anwesenheit prolinhaltiger Peptide. ....   | 56 |
| <b>Abb. 21:</b> Das Wachstum und der intrazelluläre Prolinpool osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Zellen in der Anwesenheit prolinhaltiger Peptide. ....                          | 58 |
| <b>Abb. 22:</b> Sequenzalignment der möglichen Peptidasen YclE und YbaC aus <i>B. subtilis</i> mit der Iminopeptidase XPIP aus <i>X. campestris</i> . ....                              | 59 |
| <b>Abb. 23:</b> Der Einfluss der Deletion von <i>yclE</i> und <i>ybaC</i> auf das Wachstum osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Zellen in Anwesenheit osmoprotektiver Peptide. .... | 60 |
| <b>Abb. 24:</b> <i>In silico</i> Modell der Peptidasen YqhT und YkvY aus <i>B. subtilis</i> . ....  | 61 |
| <b>Abb. 25:</b> Sequenzalignment der Peptidasen PapA (YqhT) und PapB (YkvY) aus <i>B. subtilis</i> mit der Peptidase PepQ aus <i>P. furiosus</i> . ....                                 | 62 |
| <b>Abb. 26:</b> Die Peptidasen PapA und PapB sind an der Spaltung von Xaa-Pro und Xaa-Pro-Xaa Peptiden beteiligt. ....  | 63 |
| <b>Abb. 27:</b> Einfluss der Deletion von <i>papA</i> und <i>papB</i> auf das Wachstum osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Zellen in Anwesenheit osmoprotektiver Peptide. ....     | 65 |
| <b>Abb. 28:</b> Einfluss der Peptidasen PapA und PapB auf den intrazellulären Prolinpool osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Zellen. ....  | 66 |
| <b>Abb. 29:</b> Wachstum und intrazellulärer Prolingehalt des <i>B. subtilis</i> Wildtypstammes JH14115..   | 67 |
| <b>Abb. 30:</b> Einfluss des PutBCP Systems auf den intrazellulären Prolinpool verschiedener <i>B. subtilis</i> Deletionsstämme. ....   | 69 |
| <b>Abb. 31:</b> Einfluss prolinhaltiger Peptide auf die Induktion der <i>putBCP</i> -Transkription. ....  | 70 |
| <b>Abb. 32:</b> Sequenzalignment der bekannten (PutP, OpuE) und der möglichen (YwcA, YodF) Prolintransporter aus <i>B. subtilis</i> . ....  | 72 |
| <b>Abb. 33</b> Sensitivität verschiedener <i>B. subtilis</i> Prolintransportermutanten gegen toxische Prolinanaloga bei verschiedenen Salzkonzentrationen. ....                         | 74 |
| <b>Abb. 34:</b> Verlust der Sensitivität DHP-resistenter <i>B. subtilis</i> Prolintransportermutanten gegenüber den toxischen Prolinanaloga DHP und AC. ....                            | 75 |
| <b>Abb. 35:</b> Wachstum DHP-resistenter <i>B. subtilis</i> Prolintransportermutanten bei verschiedenen Stickstoff-Quellen. ....  | 75 |
| <b>Abb. 36:</b> Einfluss der DHP-Resistenz auf die Induktion der <i>putBCP</i> -Transkription ....  | 76 |
| <b>Abb. 37:</b> Prolin in <i>B. subtilis</i> : Eine schematische Darstellung. ....  | 78 |
| <b>Abb. 38:</b> Modell für die Induktion der Transkription des <i>rocDEF</i> -Operons durch externes Prolin. ....   | 90 |

## Tabellenverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabelle 1:</b> Verwendete Grundmedien.....  | 17  |
| <b>Tabelle 2:</b> PCR-Temperaturprogramm.....  | 22  |
| <b>Tabelle 3:</b> Temperaturprogramm einer Fusions-PCR .....   | 23  |
| <b>Tabelle 4:</b> Die drei Klassen von Pro <sup>+</sup> Suppressor-Mutationen <sup>1</sup> .....   | 42  |
| <b>Tabelle 5:</b> Einfluss der Punktmutationen im positiven Regulator RocR auf die Transkription des <i>rocDEF</i> -Operons. ....                    | 46  |
| <b>Tabelle 6:</b> Rolle des aktivierten SigA-abhängigen Promotors und der Einfluss von Prolin auf die Transkription des <i>rocDEF</i> -Operons. .... | 49  |
| <b>Tabelle 7:</b> Verwendete Oligonukleotide.....  | 112 |
| <b>Tabelle 8:</b> Verwendete und konstruierte Bakterienstämme.....   | 116 |
| <b>Tabelle 9:</b> Verwendete und konstruierte Plasmide .....   | 120 |
| <b>Tabelle 10:</b> Genutzte Computerprogramme .....  | 120 |
| <b>Tabelle 11:</b> Genutzte Internetangebote.....  | 121 |

## 1 Zusammenfassung

In dem Gram<sup>+</sup> Bakterium *Bacillus subtilis* spielt Prolin eine wichtige Rolle. Als proteinogene Aminosäure ist es essentiell für die Biosynthese von Proteinen, es findet als Kohlen- oder Stickstoffquelle Verwendung und es fungiert außerdem als osmotische Schutzsubstanz.

*B. subtilis* besitzt zwei Wege um Prolin *de novo* zu synthetisieren: die anabole und die osmoadaptive Prolinbiosynthese. Beide Wege sind über das gemeinsam genutzte Enzym ProA miteinander verknüpft. Die Deletion von *proA* führt zu einer Störung in der Prolinbiosynthese. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Suppressor-Mutationen innerhalb der *rocR-rocDEF*-Region diese Störung durch die Rekrutierung des Argininabbau-Weges für die Prolin Neusynthese ausgleichen können. Zwei Klassen von Mutationen konnten identifiziert werden: (i) einzelner Aminosäureaustausch im Aktivatorprotein RocR führt zu teilweise Induktor unabhängigen RocR\*-Proteinen; (ii) Mutationen in der Promotorregion von *rocDEF* führen zur Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors. In beiden Fällen kam es zu einer erhöhten Transkription des *rocDEF*-Operons, was die Erhöhung der Menge an RocD in der Zelle zur Folge hatte. RocD als Teil des Argininabbau-Weges produziert dabei dasselbe Produkt wie ProA und kann somit dessen Fehlen ersetzen. Außerdem entwickelte sich dabei ein völlig neuer regulatorischer Mechanismus für die Expression des *rocDEF*-Operons, da dessen Expression nun auch in Anwesenheit von Ammonium durch Prolin induziert werden konnte. Dies demonstriert wie effektiv sich Bakterien an Einschränkungen innerhalb essentieller Stoffwechselwege anpassen können.

In seinem natürlichen Habitat ist *B. subtilis* ständig wechselnden Umweltbedingungen, wie die Osmolarität, ausgesetzt. Die Anpassung an hochosmolare Bedingungen erfolgt dabei durch die osmotisch kontrollierte *de novo* Synthese von Prolin, oder durch dessen Aufnahme aus der Umgebung. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass prolinhaltige Peptide ebenfalls eine osmoprotektive Wirkung besitzen. Nach dem Import der Peptide durch spezielle Peptidtransporter (App, Dpp, Opp, DtpT) kommt es intrazellulär zu deren Spaltung, was zu einer Freisetzung des Prolins führt. Durch die Akkumulation dieses Prolins kommt es zu einem Schutz der osmotisch gestressten Zelle. Die an der Spaltung der Xaa-Pro bzw. Xaa-Pro-Xaa Peptide beteiligten Peptidasen konnten identifiziert werden: PapA (YqhT) und PapB (YkvY). Dies fügt einen neuen Aspekt in der Nutzung von Prolin als osmotische Schutzsubstanz durch *B. subtilis* hinzu und demonstriert wie gewinnbringend die im Habitat verfügbaren Ressourcen zum Schutz vor osmotischem Stress genutzt werden können.

*B. subtilis* besitzt neben den beiden bekannten Prolintransportern (PutP, OpuE) noch ein weiteres, bisher unbekanntes Prolinaufnahmesystem. In dieser Arbeit wurde für dessen Identifizierung ein genetisches Screening-Verfahren entwickelt. In einem Stamm der Prolin nicht mehr aktiv in die Zelle aufnehmen kann, wurden trotz externer Zugabe von Prolin die Gene des Prolinabbau-Weges (*putBCP*) nicht mehr exprimiert. Dies demonstriert, dass der Import des externen Prolins in die Zelle, die Voraussetzung für die Induktion der Transkription von *putBCP* ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse enthüllen weitere Facetten der physiologischen Rolle von Prolin in *B. subtilis* und zeigen außerdem sehr eindrucksvoll, wie effektiv sich Bakterien an die unterschiedlichsten Veränderungen anpassen können.

## 2 Summary

Proline is a very important compound and serves several functions for the gram<sup>+</sup> bacterium *Bacillus subtilis*. Proline is an amino acid and therefore essential for protein synthesis, it can be used by *B. subtilis* as a single source of carbon and nitrogen and furthermore proline acts as an osmotic stress protectant.

*B. subtilis* possess two different ways for the *de novo* synthesis of proline: the anabolic and the osmoadaptive pathway. Both pathways are connected via the shared ProA protein. The deletion of the *proA* gene leads to a perturbation in both the anabolic and osmoadaptive proline biosynthesis. Suppressor mutations within the *rocR-rocDEF* region recruit the arginine degradation pathway for the synthesis of proline. The suppressor mutations were of two types: (i) single amino acid substitutions in the activator protein RocR resulting in partial inducer-independent RocR\* variants; (ii) mutants in the promoter region of *rocDEF* activates a cryptic SigA-type promoter. Both types of mutants enhance the transcription of *rocDEF* leading to increased amounts of RocD. RocD as part of the arginine degradation pathway synthesizes the same reaction product as the ProA enzyme and thereby bypassing the ProA mediated enzyme reaction. Furthermore, the suppressor mutants also developed a new regulatory mechanism that allows the enhanced *rocDEF* transcription in response to proline in the presence of ammonium. This demonstrates how effective bacteria can adapt to limitations on their essential biosynthetic pathways.

In his natural habitat *B. subtilis* is frequently exposed to osmotic fluctuations. *B. subtilis* can adapt to high osmolarity growth conditions through the osmotically induced *de novo* synthesis or the uptake of proline. But *B. subtilis* can also use proline containing peptides as osmotic stress protectants. Osmoprotection by peptides depends on their import via peptide uptake systems (App, Dpp, Opp, DtpT) and the subsequent hydrolysis to release proline. The liberated proline is then accumulated to protect the cell against the disadvantageous effects of high osmolarity. The peptidases responsible for the hydrolysis of various types of Xaa-Pro and Xaa-Pro-Xaa peptides could be identified: PapA (YqhT) and PapB (YkvY). This adds a new aspect to the use of proline as an osmotic stress protectant by *B. subtilis* and demonstrates how gainful available resources can be used by bacteria to adapt to changes in environmental conditions.

In addition to PutP and OpuE, *B. subtilis* possess a so far uncharacterized proline transport system. To identify the unknown proline transporter a genetic screening approach was developed. In a *B. subtilis* mutant strain unable to transport proline, the transcription of the proline utilization genes (*putBCP*) did no longer occur in the presence of proline. This demonstrates the necessity of the proline import to induce *putBCP* expression.

In conclusion, the knowledge acquired in this dissertation revealed novel facets of the physiological role of proline in *B. subtilis* and furthermore it illustrates impressively how effective bacteria can adapt on a variety of changing.

## 3 Einleitung

Bakterien gehören zu den verbreitetsten Organismen auf der Erde (52, 207). Im Laufe der Evolution hat sich eine Vielzahl von Bakterien entwickelt, die die unterschiedlichsten Lebensräume besiedeln konnten, da sie mit den dort vorherrschenden Bedingungen gut zurechtkamen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei natürlich die Nährstoffverfügbarkeit, aber auch die Temperatur, der pH-Wert, die Sauerstoffverfügbarkeit, sowie die Osmolarität sind wichtige Faktoren (193). Je nach Art des Habitats kommt es zu mehr oder weniger großen Schwankungen der einzelnen Umweltbedingungen. Die Besiedlung dieser Habitats und die Stresssituationen, denen die Bakterien ausgesetzt sind, hatte die Entwicklung einer großen Diversität an Anpassungsstrategien zur Folge (61, 75).

### 3.1 Der Modellorganismus *Bacillus subtilis*: Forschung und Industrie

Als Modellorganismus für Gram<sup>+</sup> Bakterien steht *Bacillus subtilis* im Mittelpunkt des allgemeinen Forschungsinteresses im Fachgebiet der Mikrobiologie. *B. subtilis* ist ein stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Bakterium, was überwiegend in den oberen Bodenschichten aber auch in aquatischen Habitats zu finden ist (56). Das Bakterium besitzt eine chemoorgano-heterotrophe Lebensweise, es wächst vorwiegend aerob, kann aber auch bei Sauerstoffmangel anaerob wachsen (83). Neben der Fähigkeit sehr schnell auf physiologischen Stress zu reagieren (25, 86, 154), ist *B. subtilis* in der Lage hitzeresistente Endosporen im Falle von Nahrungslimitierung zu bilden (187). In diesem Zustand können lange Zeitperioden überdauert werden und es kommt erst dann zur Auskeimung sollte sich das Nahrungsangebot verbessert haben (41, 167, 201). *B. subtilis* ist aufgrund seiner natürlichen Kompetenz genetisch einfach zu manipulieren und dies wurde durch die Sequenzierung des kompletten Genoms weiter erleichtert (10, 115, 177). Im Gegensatz zu anderen *Bacillus*-Arten (*B. anthracis*, *B. cereus*) ist *B. subtilis* apathogen und seine Erforschung kann deshalb zum Verständnis der Lebensweise seiner pathogenen Verwandten beitragen.

*B. subtilis* ist aber nicht nur ein interessantes Untersuchungsobjekt in der Forschung. Das Bakterium wird ebenso in der Industrie zur Gewinnung von Antibiotika wie Bacitracin, von Exoenzymen, wie Amylasen und Lipasen, sowie zur Herstellung der Endoprotease Subtilisin eingesetzt (8, 50, 150). Diese Enzyme werden als Waschmittelzusätze verwendet. Ebenso wird *B. subtilis* in der Synthese von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>), der Vorstufe der Flavocoenzyme FAD und FMN eingesetzt (9, 11). Riboflavin wird vielen Lebensmitteln

zugesetzt, da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist es selbst zu synthetisieren. Das sehr kostenintensive chemisch-technische Verfahren zur Riboflavin-Herstellung wurde nahezu vollständig durch die biotechnologische Riboflavin-Gewinnung mit Hilfe von *B. subtilis* ersetzt (9). *B. subtilis* ist also unverzichtbar in der industriellen Produktion kommerziell verwertbarer Substanzen.

### **3.2 Osmoregulation in *Bacillus subtilis***

Mikroorganismen sind stets einer großen Anzahl von Veränderungen ausgesetzt. Unabhängig des besiedelten Habitats ist nach wie vor die Verfügbarkeit von Wasser das entscheidende Merkmal für das Überleben eines Mikroorganismuses. Es stellt dabei eine große Herausforderung für ihn dar, seinen Wasserhaushalt den gerade herrschenden Umweltbedingungen anzupassen.

#### **3.2.1 Die Aufrechterhaltung des Turgors**

Eine Bakterienzelle ist zum Schutz von einer Zytoplasmamembran umgeben. Sie ist durchlässig für Wasser, nicht aber für geladene Substanzen oder Makromoleküle. Das Zytoplasma ist eine wässrige Lösung, welche stets eine höhere Konzentration an gelösten Teilchen im Vergleich zu dem ihr umgebenden Medium besitzt (27). Dies hat den Einstrom von Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle zur Folge. Dadurch wird ein Druck im Inneren der Zelle aufgebaut, der die Zytoplasmamembran gegen die Zellwand drückt, der Turgor. Der Turgor ist essentiell für die Erhaltung des Zellvolumen, für das Wachstum, sowie für die Zellteilung und hat bei *B. subtilis* einen Wert von 1,9 MPa (95, 110, 205).

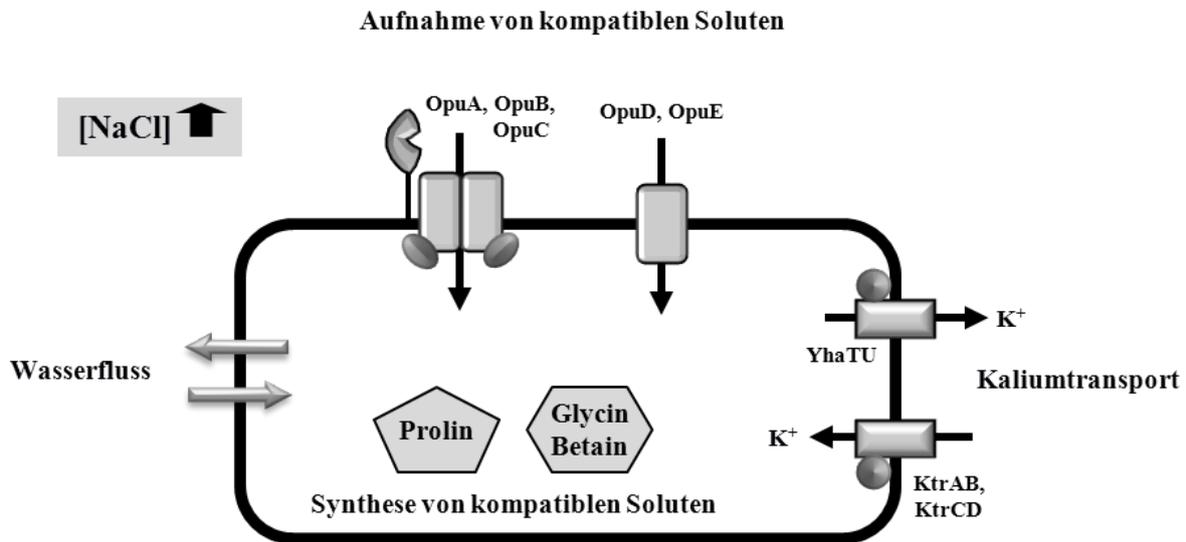
In den oberen Bodenschichten, dem natürlichen Habitat von *B. subtilis*, kommt es bedingt durch Regenfall oder Trockenheit zu extremen Schwankungen des osmotischen Potentials des Bodens (26, 56, 151). Diese Schwankungen haben dabei eine unmittelbare Wirkung auf den Wasserfluss über die Zytoplasmamembran. Anhaltender Regen ist mit einem Einstrom von Wasser in die Zelle gekoppelt, der Turgor erhöht sich zunehmend, was die Gefahr des Platzens der Zelle mit sich führt. Lange Trockenperioden hingegen führen zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle, was zu einer Verringerung des Turgors bis zu dessen völligen Zusammenbruchs führt. Zur Aufrechterhaltung des Turgors muss die Zelle demzufolge mit einer direkten Regulierung der Wasserströme reagieren. Es ist aber kein Mikroorganismus in der Lage, Wasser aktiv über die Zellmembran zu transportieren. Eine Möglichkeit Wasser

sowohl in die Zelle hinein als auch aus der Zelle heraus zu befördern, stellen die sogenannten Aquaporine dar (37). Aquaporine sind membrandurchspannende Wasserkanäle, welche die Wasserpermeabilität von Membranen erhöhen und kommen in einer Vielzahl von Mikroorganismen, nicht aber in *B. subtilis* vor (190). Die physiologische Rolle der Aquaporine im Allgemeinen und deren Beteiligung an der Anpassung an Hyperosmolarität im Besonderen wurde zwar diskutiert, konnte bisher aber nicht eindeutig geklärt werden (38, 175, 190). Es ist vielmehr so, dass *B. subtilis* und andere Mikroorganismen den Wasserfluss direkt durch eine gezielte Veränderung des osmotischen Potentials innerhalb des Zytoplasmas der Zelle steuern (27).

### 3.2.2 Die „salt out“ Strategie

Um sich an Änderungen der äußeren Osmolarität anzupassen benutzt *B. subtilis* die sogenannte „salt out“ Strategie (Abb. 1) (27). Hierbei wird die Anzahl der gelösten Teilchen innerhalb der Zelle durch die Akkumulation von osmotisch wirkenden Schutzsubstanzen, den kompatiblen Soluten erhöht und somit dem externen Milieu angeglichen. Dieser Prozess untergliedert sich in zwei Phasen. In der Initialen Phase kommt es direkt nach Erhöhung der externen Osmolarität zu einer Zunahme des intrazellulären Kaliumspiegels (204). Das Kalium gelangt dabei über die spezifischen Kalium-Transporter, die Ktr-Systeme, in die Zelle (96). In *B. subtilis* konnten zwei Systeme identifiziert werden. Sowohl das hochaffine Transportsystem KtrAB als auch das niederaffine Transportsystem KtrCD sind an der Aufnahme von Kalium beteiligt (Abb. 1) (96). Die Akkumulation von Kalium dient dabei als erste Antwort zur Stabilisierung des Turgors. Da aber die Ktr-Systeme Kalium nur in Verbindung mit Natrium in die Zelle transportieren, kommt es neben der Erhöhung der Kaliumkonzentration auch zu einer Erhöhung der Konzentration an Natrium in der Zelle (49). Hohe Konzentrationen an Natrium-Ionen sind toxisch und auf Dauer können hohe Mengen an intrazellulärem Kalium die Zellphysiologie stören. Um dies zu verhindern gibt es die zweite Phase im Anpassungsprozess an hohe Osmolaritäten. In ihr kommt es zu einem Austausch von  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{K}^+$  mit für den Zellstoffwechsel kompatiblen Soluten. Der Export von Kalium erfolgt vermutlich über den Zwei-Komponenten Transporter YhaTU (Abb. 1) (64, 65). Da dieser Transporter aber nicht essentiell ist, muss es noch weitere Exportsysteme für Kalium in *B. subtilis* geben (pers. Mitteilung: E. Bremer). Der Hauptexporter von Natrium ist das Mrp-System (100, 101). Weiterhin wird eine Beteiligung der Einzelkomponenten-Systeme NhaK und NhaC am Natriumexport diskutiert (151). Kompatible Solute können in extrem hohen

Konzentrationen in der Zelle akkumuliert werden ohne dabei die Zellphysiologie negativ zu beeinträchtigen (31). Die Akkumulation der kompatiblen Solute, die entweder über deren Aufnahme oder Synthese erfolgt, stellt das entscheidende Ereignis in der „salt out“ Strategie dar (Abb. 1) (151).



**Abb. 1: Die „Salt out“ Strategie: Anpassung von *B. subtilis* an Hyperosmolarität.**

Schematische Übersicht über die Anpassung von *B. subtilis* an hohe Osmolaritäten. Bei steigender externer Osmolarität ( $NaCl \uparrow$ ) werden zuerst Kaliumionen aktiv in die Zelle transportiert. In einem zweiten Schritt werden kompatible Solute über spezifische Aufnahmesysteme (OpuA-E) aufgenommen oder von der Zelle synthetisiert (Prolin, Glycin Betain), was mit dem gleichzeitigen Export von Kalium aus der Zelle einhergeht (verändert nach Pittelkow & Bremer 2001 (151)).

### 3.2.3 Kompatible Solute: Eigenschaften und Wirkungsweise

Kompatible Solute sind als Substanzen definiert, die bei hoher externer Osmolarität (niedriger Wasseraktivität) in Molaren Konzentrationen im Zytoplasma akkumuliert werden können, ohne dabei die physiologischen Prozesse der Zelle zu stören (31). Dies ist möglich, da sie über eine gute Wasserlöslichkeit verfügen, ladungsneutral sind, sowie nicht direkt mit Proteinen interagieren können (51). Vertreter für kompatible Solute lassen sich in den verschiedensten Stoffklassen finden: den Aminosäuren und Aminosäurederivaten (z.B. Glutamat, Prolin, Ectoin, Prolin Betain), den Zuckern und Polyolen (z.B. Trehalose, Glycerin, Glykosyl-Glycerin), den kleinen Peptiden (z.B. N-Acetylglutaminyl-Glutaminamid), den Trimethylammonium-Verbindungen und deren Sulfonium-Analoga (z.B. Glycin Betain, Dimethylsulfoniumpropionat), den Sulfateestern (z.B. Cholin-O-Sulfat) oder den Tetrahydropyrimidinen (z.B. Ectoin, Hydroxy Ectoin) (27, 108, 151).

Neben ihrer Eigenschaft als osmotische Schutzsubstanz zu wirken, zeichnen sich kompatible Solute über weitere Eigenschaften aus. Sie sind in der Lage die Zelle vor Hitze sowie Kälte zu schützen, sie stabilisieren Nukleinsäuren und wirken ebenso bei der Stabilisierung von Proteinen mit und sind auch an deren korrekter Faltung beteiligt (92, 97, 117). Diese letztgenannte Eigenschaft kann mit dem „*preferential exclusion model*“ erklärt werden. Dies besagt, dass es aufgrund negativer Wechselwirkungen zwischen kompatiblen Soluten und dem Rückgrat der Proteine zu einem Ausschluss der Solute von der Hydrathülle der Proteine kommt (179). Dadurch lagern sich die kompatiblen Solute in einem bestimmten Abstand schützend um die Proteine. Aus diesem Grund werden sie oft auch als „chemische Chaperone“ bezeichnet (151).

### 3.2.4 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt

Nicht alle kompatiblen Solute werden von allen Organismen gleichermaßen verwendet. Für *B. subtilis* beispielsweise sind Prolin und Glycin Betain die wichtigsten Vertreter, da Prolin *de novo* und Glycin Betain aus dem Vorläufer Cholin synthetisiert werden kann (23, 204). Nichtsdestotrotz ist *B. subtilis* in der Lage eine Vielzahl weiterer kompatibler Solute zu nutzen, indem er sie über spezifische Aufnahmesysteme, den osmotisch induzierbaren Opu-Transportern (*Osmoprotectant uptake*) aus der Umwelt in die Zelle transportiert. Fünf dieser Transporter konnten bislang identifiziert und deren Substratspektrum eingehend analysiert werden (26, 27, 108). Während drei dieser Aufnahmesysteme (OpuA, OpuB, OpuC) hochaffine ABC-Transporter sind, handelt es sich bei OpuD und OpuE um sekundäre Transporter mit nur jeweils einer einzelnen membrandurchspannenden Domäne (Abb. 1) (105-107, 155, 199).

Der Import kompatibler Solute ist physiologisch vorteilhafter für die osmotisch gestresste Zelle, da in der Regel weniger Energie für die Aufnahme als für deren Synthese verbraucht wird (1, 151). So verwundert es nicht, dass Glycin Betain und Prolin nicht nur synthetisiert, sondern ebenfalls von den Opu-Systemen in die Zelle transportiert werden können. Glycin Betain wird sogar von drei der Opu-Transporter, nämlich OpuA, OpuC und OpuD in die Zelle transportiert, Prolin hingegen gelangt ausschließlich über OpuE in die Zelle.

OpuE nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Opu-Systeme ein. Er gehört der Familie der Natrium/Substrat Symporter (SSSF) an, was die gekoppelte Aufnahme von Natrium (zusätzlich zu Prolin) bedeutet (104, 199). Ebenfalls besitzt OpuE eine hohe Affinität zu seinem Substrat Prolin mit einer  $K_m$  von 20  $\mu\text{M}$  und zeichnet sich zudem noch bei

hochosmolaren Bedingungen durch eine sehr hohe Transportkapazität ( $V_{max}$ ) von  $250 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  aus (176, 199). All dies macht OpuE zu einem besonders effektiven Transporter für die Akkumulation von Prolin als kompatibles Solut bei Hyperosmolarität. Diese Funktion zeigt sich auch im Expressionsmuster von *opuE*, da dessen Transkription durch hochosmolare Bedingungen induziert und durch zwei verschiedene Typen von Promotoren reguliert wird, dem vegetativen SigA- und dem Stress-bedingten SigB-abhängigen Promotor (176). Das Vorhandensein des zweiten Promotors offenbart eine übergeordnete Verbindung von OpuE mit dem generellen Stress-Regulon in *B. subtilis* und weist darauf hin, dass die Aufgabe von OpuE nicht nur im Schutz der Zelle vor osmotischem Stress liegt (142). Erst kürzlich konnte eine weitere Funktion von OpuE entschlüsselt werden: die Beteiligung von OpuE an einem Prolin „recycle“-Kreislauf (93). Unter hochosmolaren Bedingungen und ohne das Vorhandensein externer kompatibler Solute werden große Mengen von Prolin als osmotische Schutzsubstanz synthetisiert (3.3.1). Dabei kommt es zu einem konstanten Export eines Teils des neu hergestellten Prolins, welches umgehend von OpuE wieder in die Zelle zurück transportiert wird (93). Es wird dabei angenommen, dass dieser Kreislauf eine wichtige Rolle bei der Feinabstimmung der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin und damit des Turgors in *B. subtilis* spielt (93).

### **3.3 Die Rolle der Aminosäure Prolin in *Bacillus subtilis***

Neben der oben beschriebenen Rolle als osmotische Schutzsubstanz, ist Prolin auch in anderen Gebieten von großer Bedeutung für *B. subtilis*. Wie auch andere kompatible Solute besitzt Prolin hitzeprotektive Eigenschaften (97). Prolin ist außerdem eine proteinogene Aminosäure und demzufolge für die Synthese von Proteinen essentiell. Wie schon mehrfach angemerkt kann Prolin von *B. subtilis* *de novo* synthetisiert werden (204). Bei der Synthese kann dabei ganz gezielt zwischen dem Bedarf als proteinogene Aminosäure und als osmotische Schutzsubstanz unterschieden werden (26). Weiterhin ist *B. subtilis* in der Lage mit Prolin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen (60). Die Nutzung von Prolin ist dabei unabhängig von der externen Osmolarität.

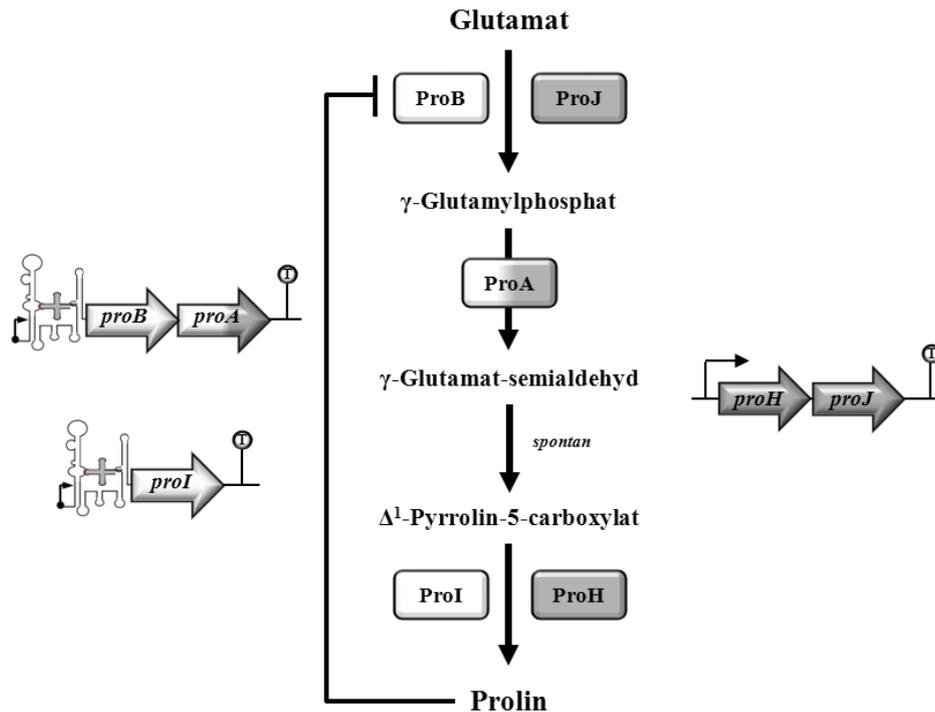
#### **3.3.1 Prolinbiosynthese in *Bacillus subtilis***

In *B. subtilis*, wie auch in einer Vielzahl anderer Organismen, erfolgt die Prolinbiosynthese ausgehend von Glutamat über drei Enzyme (Abb. 2): der  $\gamma$ -Glutamat

Kinase (ProB, ProJ) (EC 2.7.2.11), der  $\gamma$ -Glutamylphosphat Reduktase (ProA) (EC 1.2.1.41) und der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase (ProI, ProH) (EC 1.5.1.2) (17). In der ersten Reaktion wird durch den Verbrauch von ATP Glutamat durch ProB bzw. ProJ zu  $\gamma$ -Glutamylphosphat phosphoryliert. Anschließend reduziert ProA das Zwischenprodukt zu  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd. In einer spontanen Reaktion reagiert  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd unter Abspaltung von Wasser zu  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-Carboxylat. Dieses wird in einem letzten Schritt durch ProI bzw. ProH zu dem Endprodukt Prolin reduziert. Ein weiteres Enzym mit  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase-Aktivität (ProG) konnte in *B. subtilis* identifiziert werden, aber seine physiologische Rolle in der Prolinbiosynthese wurde bislang nicht eindeutig geklärt (17). Die Biosynthese von Prolin muss zwischen der Funktion von Prolin als Aminosäure und als osmotische Schutzsubstanz je nach Bedarf der Zelle unterscheiden. Dies gelingt, da *B. subtilis* zwei verschiedene Wege zur Prolinsynthese mit unterschiedlichen Regulationsmechanismen besitzt: (i) der anabole und (ii) der osmoadaptive Prolinbiosynthese-Weg. Beide Wege sind durch die  $\gamma$ -Glutamylphosphat Reduktase (ProA) miteinander verknüpft (Abb. 2).

(i) Die anabole Prolinbiosynthese wird durch ProB-ProA-ProI katalysiert (Abb. 2). Das durch diesen Weg produzierte Prolin wird ausschließlich zur Proteinbiosynthese verwendet. Die Regulation erfolgt zum einen auf Proteinebene, da das erste Enzym ProB einer allosterischen *feedback*-Hemmung durch das Endprodukt Prolin unterliegt (44). Auf der anderen Seite findet zusätzlich eine Regulation auf transkriptioneller Ebene statt. Die Transkription sowohl des *proBA*-Operons, als auch des *proI*-Gens wird durch eine T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination reguliert (74). Dies bedeutet, dass einzig die Limitation von Prolin zur Induktion von *proBA* bzw. *proI* führt (30). Dadurch wird ausreichend Prolin für die Proteinsynthese zur Verfügung gestellt und gleichzeitig die verschwenderische Prolin-Überproduktion verhindert, was zu einem konstanten Basal-Level von etwa 20 mM freiem Prolin in der Zelle führt (204, 213).

Unter hochosmolaren Bedingungen kommt es in *B. subtilis* zur Akkumulation von Prolin und damit einhergehend zum Aufbau eines erheblichen intrazellulären Prolinpools (131). Ebenso führt der plötzliche Anstieg der externen Salzkonzentration auf 0,4 M NaCl zu einem Anstieg des Prolinpools von dem Basal-Level auf 700 mM innerhalb von nur 7 Stunden (204). Offensichtlich kann aufgrund der strikten Regulation der anabole Prolinbiosynthese-Weg die Herstellung solcher Mengen an Prolin nicht gewährleisten.



**Abb. 2: Die verschiedenen Wege der Prolinbiosynthese und deren Regulation in *B. subtilis*.**

Die Prolinbiosynthese in *B. subtilis*, ausgehend von Glutamat, wird von 3 Enzymen katalysiert: der  $\gamma$ -Glutamat Kinase (ProB, ProJ), der  $\gamma$ -Glutamylphosphat Reduktase (ProA) und der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase (ProI, ProH). Die anabole Prolinbiosynthese erfolgt über den ProB-ProA-ProI-Weg (weiße Boxen) und die osmoadaptive Prolinbiosynthese erfolgt über den ProJ-ProA-ProH-Weg (graue Boxen) (29, 30). Beide Prolin-Biosynthesewege sind durch das gemeinsam genutzte ProA Protein miteinander verknüpft. Das ProB Enzym unterliegt einer Feedback-Hemmung durch das Synthese-Endprodukt Prolin (43). Die Transkription des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens wird durch ein Prolin-abhängiges T-Box System reguliert, wohingegen die Transkription des *proHJ*-Operons osmotisch induziert wird (29, 30). Modifiziert nach Brill *et al.* 2011 (29).

(ii) Deswegen besitzt *B. subtilis* einen zweiten Weg, die osmoadaptive Prolinbiosynthese, die Prolin als osmotische Schutzsubstanz durch die Enzyme ProJ-ProA-ProH produziert (Abb. 2) (29). Dieser Weg synthetisiert große Mengen an Prolin in Abhängigkeit der externen Osmolarität (29). Bei einer Salzkonzentration von 1,2 M NaCl, bei der gerade noch Wachstum von *B. subtilis* stattfindet, kommt es zu einem intrazellulären Prolinpool von etwa 500 mM (24, 139). Obwohl noch nicht biochemisch bestätigt, scheint demzufolge eine *feedback*-Kontrolle durch das Endprodukt Prolin, wie sie bei ProB zu finden ist, auf ProJ nicht zutreffen zu können. Die Transkription des *proHJ*-Operons unterliegt der osmotischen Kontrolle und dabei ist es unerheblich, ob durch kontinuierlich hohe Salzkonzentrationen, oder ob durch einen plötzlichen Anstieg der externen Osmolarität (29, 79, 143, 178). Im Vergleich mit anderen osmotisch induzierten Genen in *B. subtilis*, besitzt das *proHJ*-Operon den stärksten Induktionsfaktor (178). Die Anwesenheit des kompatiblen Solut Glycin Betain

verringert die Prolinbiosynthese, da die Transkription von *proHJ* teilweise durch Glycin Betain reprimiert wird (29, 204). Die Deletion des *proHJ*-Operons führt zu einem osmosensitiven Wachstumsphänotyp, was die zentrale Bedeutung der osmoadaptiven Prolinbiosynthese bei der Anpassung von *B. subtilis* an hohe Osmolaritäten zeigt (29).

### 3.3.2 Die Nutzung von Prolin als Nährstoffquelle

*B. subtilis* lebt vorwiegend in den oberen Bodenschichten (56). Hier wie auch in anderen Habitaten, ist die unzureichende Nährstoffverfügbarkeit ein ernstes Problem für Mikroorganismen. Aminosäuren, welche im Boden vorkommen, stellen dabei eine echte Alternative zu Zuckern oder ähnlichen Verbindungen dar, da sie eben nicht nur in der Proteinbiosynthese Verwendung finden, sondern ebenso als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- (ggf. Schwefel-) und Energiequelle dienen können (60). Sie gelangen über Wurzelausscheidungen, durch abgestorbenes Pflanzenmaterial, durch die Freisetzung kompatibler Solute bei Hypoosmolarität, oder als Produkt lysierter Zellen in den Boden (197, 203, 208).

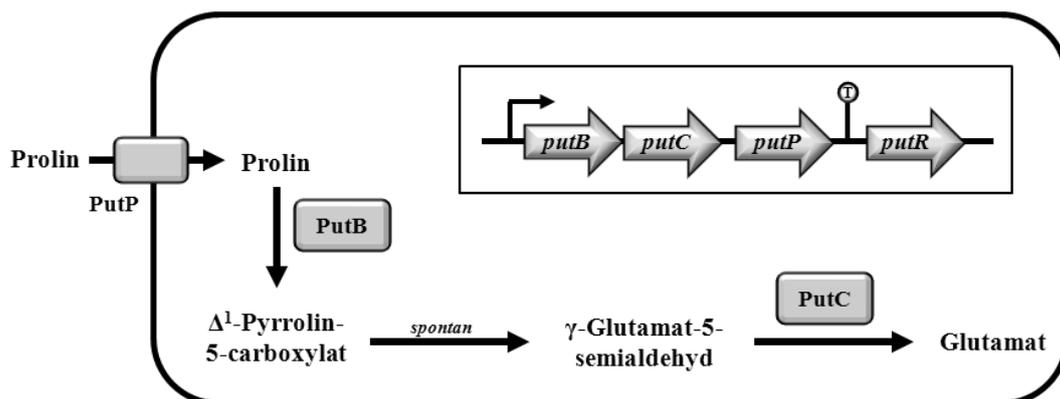
Alle 20 proteinogenen Aminosäuren können von *B. subtilis* mittels Chemotaxis aufgespürt werden (146). Verantwortlich hierfür sind die beiden Chemorezeptoren McpB und McpC, wobei einzig McpC an der Erkennung der Aminosäure Prolin beteiligt ist (141). Befindet sich Prolin im Boden, so gelangt dieses über den spezifischen Prolintransporter PutP in die Zelle (139). PutP ist nah verwandt mit dem osmotisch induzierbaren Transporter OpuE (siehe oben) und ebenfalls ein Mitglied der Natrium/Substrat Symporter Familie (SSSF), was einen Natrium-gekoppelten Prolintransport bedeutet (104).

In *B. subtilis* erfolgt der Abbau von Prolin über zwei Enzyme (Abb. 3): der Prolin Dehydrogenase (PutB) (EC 1.55.99.8) und der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase (PutC) (EC 1.5.1.12). Prolin wird intrazellulär durch PutB zu  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat oxidiert, welches spontan zu  $\gamma$ -Glutamat-5-semialdehyd hydrolysiert. Dieses wird anschließend durch PutC zu dem Endprodukt Glutamat oxidiert. Glutamat ist von ganz besonderer Bedeutung (nicht nur für *B. subtilis*, sondern für alle Mikroorganismen), da es das zentrale Stoffwechselprodukt darstellt, welches den Stickstoffmetabolismus mit den Kohlenstoffmetabolismus verknüpft (46, 76, 173).

Die strukturellen Gene der Dehydrogenasen PutB und PutC bilden zusammen mit dem Prolinimporter PutP ein Operon, *putBCP* (Abb. 3) (26, 139). Stromabwärts gelegen befindet sich das Gen *putR*, welches für den transkriptionellen Aktivator PutR kodiert (Abb. 3) (99).

Dieser bindet in Anwesenheit von Prolin an die Promotorregion von *putBCP* und interagiert mit der RNA-Polymerase, was die Induktion der *putBCP*-Expression zur Folge hat (16). Der globale Regulator CodY ist ebenfalls an der Regulation beteiligt, da er die Transkription des *putBCP*-Operons in Gegenwart anderer Aminosäuren hemmt. Dies geschieht, indem CodY den gebundenen Aktivator PutR vom *putBCP*-Promotorbereich verdrängt (16, 172, 173).

Die Verstoffwechslung von Prolin ist auch bei hochosmolaren Bedingungen möglich: (i) Auch bei hohen externen Salzkonzentrationen kommt es in Anwesenheit von Prolin zur Induktion der Transkription des *putBCP*-Operons (139). (ii) Obwohl die Aktivität des Prolinimporters PutP durch steigende externe Salzkonzentration drastisch abnimmt, kommt es aufgrund des osmotisch induzierten Prolintransporters OpuE weiterhin zur Aufnahme von Prolin (139). (iii) Die anschließende intrazelluläre Umsetzung von Prolin zu Glutamat ist ebenfalls gewährleistet, da die Aktivität der Prolin Dehydrogenase PutB salzunabhängig ist (gleiches lässt sich für PutC vermuten) (138).



**Abb. 3: Prolinabbau in *B. subtilis*.**

*B. subtilis* nimmt externes Prolin über den Na<sup>+</sup>-Symporter PutP in die Zelle auf und wandelt es durch eine zweistufige Oxidation (katalysiert von PutB und PutC) zu Glutamat um. In dem Kasten ist die genomische Organisation des *putBCP*-Operons dargestellt. Das Gen *putB* kodiert für die Prolin Dehydrogenase, *putC* für die  $\Delta^1$ -Pyrrolin-carboxylat Dehydrogenase und *putP* für den Prolinimporter. Ebenfalls dargestellt ist das stromabwärts gelegene Gen *putR*, welches für den transkriptionellen Aktivator des *putBCP*-Operons kodiert. Modifiziert nach Moses *et al.* 2012 (139).

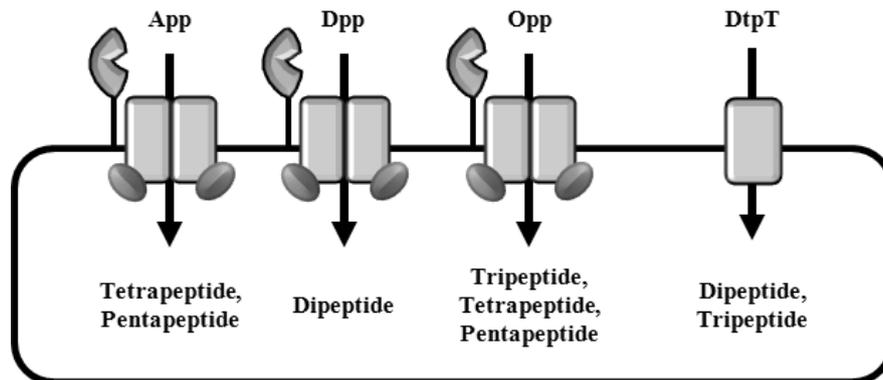
### 3.4 Die Rolle der Peptide in *Bacillus subtilis*

Peptide haben eine vielfache Bedeutung für *B. subtilis*. Zum einen können Peptide als Signalverbindungen (regulatorische Peptide) dienen (214). Diese regulatorischen Peptide werden von *B. subtilis* selbst synthetisiert und in die Umgebung als Signalstoff abgegeben. Dies kann der Kommunikation zwischen verschiedenen *B. subtilis* Stämmen, dem Quorum

sensing dienen (153). Diese Peptide werden extrazellulär prozessiert und nach anschließendem Rückimport in die Zelle durch spezielle Peptidtransporter (siehe unten) kommt es nun intrazellulär zur Induktion physiologischer Prozesse (149). Sie wirken beispielsweise bei der Differenzierung von *B. subtilis* mit, wie der Ausbildung der Kompetenz oder der Sporulation (120). Weiterhin können Peptide von *B. subtilis* als Sekundärmetabolite synthetisiert werden. Sie dienen der Abwehr von Mikroorganismen oder auch Pilzen (113, 184).

Die wohl wichtigste Aufgabe von Peptiden ist deren Nutzung als Nährstoff- und Aminosäurequelle. Sie entstehen hauptsächlich durch die Proteolyse von Proteinen und *B. subtilis* ist bekannt für sein besonders aktives proteolytisches System (192). Peptide können mittels spezifischer Peptidtransporter aus der Umwelt aufgenommen werden. In *B. subtilis* wurden bislang vier dieser Aufnahmesysteme identifiziert (Abb. 4). Dabei handelt es sich um das Dipeptid-Transportsystem Dpp (*Dipeptide permease*), sowie um die Oligopeptid-Transportsysteme Opp (*Oligopeptide permease*) und App (*A peptide permease*) (112, 130, 148). Diese drei Systeme gehören der Familie der ABC-Transporter an (155). Dpp transportiert ausschließlich Dipeptide in die Zelle und ist nicht am Import von Signalpeptiden beteiligt (130). Die Hauptaufgabe dieses Systems scheint daher einzig die Anpassung an mangelnde Nährstoffverfügbarkeit zu sein (42). Opp zeichnet sich für den Transport von Tri- Tetra- und Pentapeptiden aus (148). Dieses System ist zusätzlich an der Aufnahme von Signalpeptiden beteiligt, welche für das Auslösen der Kompetenz bzw. der Sporulation in *B. subtilis* wichtig sind (147, 155). App ist hauptsächlich an dem Import von Tetra- und Pentapeptiden beteiligt, kann aber (da beide Transporter zueinander homolog sind) die Funktion von Opp bei dessen Ausfall vollständig übernehmen (112). App spielt demzufolge ebenso eine Rolle in der Kompetenz und in der Sporulation. In dem gewöhnlich benutzten *B. subtilis* Laborstamm 168, sowie dessen Abkömmlingen (z.B. JH642), ist das *appA*-Gen aufgrund einer Mutation nicht funktionsfähig, aber Revertanten mit intaktem App-System lassen sich sehr leicht gewinnen (10, 112, 177).

Der vierte Peptidtransporter DtpT (Abb. 4), Mitglied der POT-Transporter Familie, ist bislang nicht gut untersucht worden in *B. subtilis* (39, 170). Vergleiche mit DtpT-artigen Transportern in anderen Organismen, legt aber die Vermutung nahe, dass DtpT in *B. subtilis* an der Aufnahme von Di- und Tripeptiden beteiligt ist (58, 91, 196, 211).



**Abb. 4: Peptidaufnahmesysteme in *B. subtilis*.**

*B. subtilis* ist in der Lage Peptide unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung aus der Umwelt mittels verschiedener Peptid-Transporter aufzunehmen. Drei der identifizierten Aufnahmesysteme (App, Dpp, Opp) sind sehr gut charakterisiert und gehören der Familie der ABC-Transporter an (112, 130, 148, 155). DtpT ist mutmaßlich an der Aufnahme von Di- und Tripeptiden beteiligt und gehört der POT Familie an (39, 170).

### 3.5 Zielsetzung

Prolin ist von ganz besonderer Bedeutung für *B. subtilis*, da es eine Vielzahl von Aufgaben übernimmt: (i) Prolin als proteinogene Aminosäure ist an der Synthese von Proteinen beteiligt; (ii) Prolin als osmotische Schutzsubstanz ist an der Anpassung an hochosmolare Umweltbedingungen beteiligt; (iii) Prolin als Nährstoff ist an der Herstellung von Energie und Stoffwechselprodukten beteiligt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von *B. subtilis* im Hinblick auf die Herstellung und Nutzung von Prolin, sowie der Identifizierung und Charakterisierung unbekannter am Prolinmetabolismus beteiligter Proteine. Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

(i) Die anabole Prolinbiosynthese wird durch die Proteine ProB-ProA-ProI katalysiert (3.3.1). Durch den Verlust von ProA kann Prolin nicht mehr in ausreichender Menge für die Herstellung von Proteinen synthetisiert werden. Suppressor-Mutationen führen zur Bildung Prolin-prototropher Stämme. Wie kommt es durch einfache Mutationen zur Aufrechterhaltung der anabolen Prolinbiosynthese in Abwesenheit von ProA? Sind diese Mutationen ebenfalls fähig die osmoadaptive Prolinbiosynthese (ProJ-ProA-ProH, 3.3.1) bei Hyperosmolarität zu gewährleisten?

(ii) Peptide unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung werden von *B. subtilis* mittels spezifischer Peptidtransporter (App, Dpp, Opp, DtpT) aufgenommen (3.4). Können prolinhaltige Peptide nach deren Aufnahme intrazellulär hydrolysiert und das freigesetzte

Prolin zur Akkumulation als osmotische Schutzsubstanz verwendet werden? Welche Peptidasen sind an dem Prozess der Hydrolyse beteiligt?

(iii) Die Aufnahme von Prolin erfolgt über die Prolinpermease PutP, sowie über den osmotisch induzierten Transporter OpuE (3.2.4; 3.3.2). *B. subtilis* besitzt mindestens noch ein weiteres Prolin-Transportsystem (139). Gibt es die Möglichkeit den dritten Prolin-Transporter zu identifizieren?

Die Erkenntnisse aus der Arbeit werden zu einem besseren Verständnis der physiologischen Rolle von Prolin in *B. subtilis* beitragen.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Material**

Alle die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, wie Chemikalien, Enzyme, Medien, usw. werden im Folgenden aufgeführt.

#### **4.1.1 Chemikalien**

Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien, welche nicht gesondert im Text erwähnt werden, stammen von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs), Roth (Karlsruhe), und Merck (Darmstadt). Die Bestandteile der Komplexmedien wurden von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen. Die verwendeten Peptide stammen von der Firma Bachem (Bubendorf). Die Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetrazyklin, Erythromycin, Lincomycin, Spectinomycin wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) und Zeocin wurde von Invitrogen (Carlsbad) bezogen. Die toxischen L-Prolin-Analoga L-Azetidin-2-carbonsäure (AC) und 3,4-Dehydro-DL-Prolin (DHP), das TreA Substrat p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid ( $\alpha$ -PNPG) und das Ninhydrin Reagenz wurden von der Firma Sigma (Steinheim) bezogen. Das LacZ Substrat o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid ( $\beta$ -ONPG) stammt von der Firma Serva (Heidelberg).

#### **4.1.2 Enzyme und Oligonukleotide**

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligasen, Phosphatasen, stammen von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert und sind im Anhang in Tabelle 7 aufgelistet.

#### **4.1.3 Medien**

Puffer, Lösungen und Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Thermolabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2  $\mu$ m, Sarstedt, Nümbrecht) und Glaswaren für min. 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

#### **Grundmedium**

Zur Herstellung von Festmedien wurde den aufgeführten Grundmedien 15 g/l Agar zugesetzt.

**Tabelle 1: Verwendete Grundmedien**

| Medium  | Zusammensetzung (1l)   |
|---|--|
| LB-Medium (136)                               | 10 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>10 g NaCl   |
| 5x Spizizen's Minimal Medium<br>(5x SMM) (84) | 10 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>70 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>5 g Na <sub>3</sub> Citrat x 2H <sub>2</sub> O<br>1 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O  |
| 100x Spurenelemente (85)                      | 0,55 g CaCl <sub>2</sub><br>1,35 g FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O<br>0,1 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O<br>0,17 g ZnCl <sub>2</sub><br>0,05 g CuCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O<br>0,06 g CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O<br>0,06 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O |
| Stärkeplatten                                 | 7,5 g Nutrient-Broth<br>5 g Stärke   |

### Minimalmedium

Für die Kultivierung von *B. subtilis* wurde SMM mit zusätzlichen Spurenelementen verwendet (Tabelle 1). Zur Komplementation der Auxotrophien der Derivate des *B. subtilis*-Stammes JH642 (Tabelle 8) wurde L-Tryptophan (20 mg/l) und L-Phenylalanin (18 mg/l) zugesetzt. Als Kohlenstoffquelle diente 0,5 % (w/v) Glucose. Für Untersuchungen unter hochosmolaren Bedingungen wurde dem Medium ausgehend von einer 5 M NaCl Stammlösung die gewünschte Konzentration an NaCl zugegeben.

### Antibiotika

Die Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Dazu wurden Ampicillin, Kanamycin, Spectinomycin und Zeocin in destilliertem Wasser, sowie Tetrazyklin, Erythromycin, Lincomycin und Chloramphenicol in 70 % Ethanol gelöst und sterilfiltriert. Nach Abkühlung der Medien wurden die Antibiotika zu den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben.

### Selektionskonzentration für *E. coli*

Ampicillin 100 µg ml<sup>-1</sup>

### Selektionskonzentration für *B. subtilis*

Kanamycin 5 µg ml<sup>-1</sup>  
Tetrazyklin 10 µg ml<sup>-1</sup>  
Erythromycin<sup>1</sup> 0,5 µg ml<sup>-1</sup>  
Lincomycin<sup>1</sup> 15 µg ml<sup>-1</sup>  
Spectinomycin 100 µg ml<sup>-1</sup>  
Chloramphenicol 5 µg ml<sup>-1</sup>  
Zeocin 70 µg ml<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> Für die Selektion auf Erythromycin-Resistenz (Er<sup>R</sup>) wurde eine Mischung aus Erythromycin und Lincomycin in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet.

### **Aminosäuren, osmoprotektive Substanzen, Peptide**

Die verwendeten Aminosäuren, Peptide und osmoprotektiven Substanzen wurden als Stammlösungen in destilliertem Wasser gelöst. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert, bei 4 °C aufbewahrt und entsprechend ihren Endkonzentrationen den Medien zugegeben.

### Konzentration der Zusätze in Festmedien

L-Prolin 10 mM  
L-Arginin 10 mM

### Konzentration der Zusätze in Flüssigkulturen

|               |                           |                      |      |
|---------------|---------------------------|----------------------|------|
| L-Prolin      | 1 mM / 20 mM <sup>1</sup> | H-Phe-Pro-OH         | 1 mM |
| L-Arginin     | 20 mM <sup>1</sup>        | H-Val-Pro-OH         | 1 mM |
| L-Citrullin   | 20 mM <sup>1</sup>        | H-Pro-Gly-OH         | 1 mM |
| L-Ornithin    | 20 mM <sup>1</sup>        | H-Pro-Phe-OH         | 1 mM |
| Glycin Betain | 1 mM                      | H-Pro-Val-Gly-OH     | 1 mM |
| H-Ala-Pro-OH  | 1 mM                      | H-Pro-Phe-Gly-Lys-OH | 1 mM |
| H-Gly-Pro-OH  | 1 mM                      | H-Ala-Pro-Ala-OH     | 1 mM |

<sup>1</sup> Verwendete Endkonzentration der zugesetzten Aminosäuren zur Anzucht der Zellen für die β-Galaktosidase-Aktivitäts-Assays (4.4.2).

## **4.2 Mikrobiologische Methoden**

### **4.2.1 Bakterienstämme und Plasmide**

Die in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Stämme (Tabelle 8) und Plasmide (Tabelle 9) befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

#### 4.2.2 Wachstum von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Bakterienkulturen aerob bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte im Brutschrank. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Roller und Kulturen mit größeren Volumina in Erlenmeyerkolben im Wasserbad bei 220 rpm (Aquatron; Invors HT; Hamburg) inkubiert. Beimpft wurde von frisch ausgestrichenen Vereinzelungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen.

#### 4.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt (Ultraspec 3100 pro; Amersham Bioscience, Freiburg,). Dabei entspricht eine OD<sub>578</sub> von 1 ca. 1 x 10<sup>9</sup> Zellen/ml (159).

#### 4.2.4 Bestimmung von Mutationsraten

Die Mutationsrate der Bildung von *proBA*-Suppression wurde bestimmt, indem der Stamm GWB101 (*proBA*) in SMM mit 10 mM Prolin bis zur stationären Phasen angezogen wurde. Anschließend wurden die Kulturen 3 mal mit SMM gewaschen, um das im Medium befindliche Prolin vollständig zu entfernen. Von den Kulturen wurden serielle Verdünnungsreihen angesetzt und von jeder Verdünnungsstufe jeweils 100 µl auf SMM-Platten bzw. SMM-Prolin-Platten ausplattiert, für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die Mutationsrate der *proBA*-Suppression ( $MR_{proBA}$ ) lässt sich wie folgt berechnen:

$$MR_{proBA} = \frac{SZZ}{LZZ} = \frac{(n_{SMM} \cdot Vf \cdot 10)}{(n_{SMM+Pro} \cdot Vf \cdot 10)} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

Dabei ist:

*SZZ* die Suppressorzellzahl

*LZZ* die Lebendzellzahl

*n<sub>SMM</sub>* die Anzahl der Kolonien gewachsen auf SMM-Platten

*n<sub>SMM+Pro</sub>* die Anzahl der Kolonien gewachsen auf SMM-Prolin-Platten

*Vf* der Verdünnungsfaktor (ausgezählte Verdünnungsstufe)

### 4.2.5 Wachstumshemmung durch toxische Prolinanaloga

Zur Untersuchung der toxischen Wirkung der Prolinanaloga L-Azetidin-2-carbonsäure (AC) und 3,4-Dehydro-DL-Prolin (DHP) wurden die Kulturen der zu testenden *B. subtilis* Stämme bis zur exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578} = 1,5$ ) in SMM ohne und mit 0,6 M NaCl angezogen. 300  $\mu$ l der gewachsenen Kulturen wurde auf SMM-Agarplatten mit den jeweiligen Osmolaritäten ausplattiert. In die Mitte der Platten wurden je ein steriles mit 10  $\mu$ l der toxischen Prolinanaloga Lösung AC bzw. DHP (20 mg/ml) benetztes Filterpapier aufgebracht. Die Agarplatten wurden bei 37 °C für 24 - 48 Stunden inkubiert und die Größe des entstandenen Hemmhofes analysiert.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Präparation und Nachweis von DNA

#### Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Präparation von chromosomaler DNA aus *B. subtilis* erfolgte nach der Methode von Marmur (129). 5 ml einer in LB gewachsenen *B. subtilis* Kultur wurden zentrifugiert (10 min, 5.000 rpm), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l Saline-EDTA (pH 8) resuspendiert. Nach der Zugabe von 50  $\mu$ l Lysozym (50 mg/ml) erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde 62  $\mu$ l 20 % SDS zugegeben und bei 60 °C inkubiert. Nach Erhalt eines klaren Lysats wurden 120  $\mu$ l 5 M Na-Perchlorat und 800  $\mu$ l Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben und bei starkem Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm). Die obere Phase wurde abgenommen und die darin befindlichen Nukleinsäuren mittels Ethanol gefällt (159). Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden in großen Mengen wurde unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. In kleinerem Maßstab und zur Überprüfung von Transformanden wurde für die Isolierung der Plasmid-DNA die Methode des Plasmid Mini Kits von Qiagen in abgewandelter Form angewendet.

### **Reinheitskontrolle und Quantifizierung der DNA**

Quantität und Qualität der Nukleinsäuren wurden durch spektrophotometrische Messungen mit dem NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen) überprüft. Bestimmt wurden die Absorptionen bei 260 nm, 280 nm und 230 nm, sowie die Koeffizienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$ . Aus  $A_{260}$  lässt sich über das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 6, 8.5.2) die Konzentration der Nukleinsäuren berechnen. Der Koeffizient  $A_{260}/A_{280}$  gibt Aufschluss über eine mögliche Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen und liegt im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0 (159). Eine hohe  $A_{230}$  und folglich ein niedriges Verhältnis von  $A_{260}/A_{230}$  deutet auf eine Kontamination der Nukleinsäuren durch Phenol, da dessen Anion (Phenoxid) eine starke Absorption bei 230 nm zeigt, oder anderen organischen Verbindungen hin (159). Bei einem Verhältnis von  $A_{260}/A_{230} > 2$  liegt in der Regel keine Verunreinigung vor.

### **Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente (PCR-Produkte, Restriktionsverdau, DNA-Extrakte) wurden nach ihrer Größe mit Hilfe der horizontalen Gelelektrophorese mit 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer aufgetrennt (159). Die Nukleinsäureproben wurden vor der Auftragung mit einem 6x Loading Dye versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Zur Auftrennung der Nukleinsäuren wurde eine Spannung von 120 V an die Elektrophoresekammer angelegt. Im Spannungsfeld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung Anode. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Agarosegel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der  $\lambda$ -DNA-Marker verwendet. Die Visualisierung der Nukleinsäurebanden erfolgte auf einem UV-Tisch mit einer UV-Anregung von 302 nm, was eine Fluoreszenz von den in der DNA-Doppelhelix interkalierenden Ethidiumbromidmolekülen verursacht. Die UV-bestrahlten Agarosegele wurden mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (Gel Jet Imager, INTAS GmbH, Göttingen) fotografiert.

### **Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierungen wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit dem Software Paket Mega 5.05 analysiert (189).

### Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragmenten erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die geschnittenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Thermosensitiven-Alkalinen-Phosphatase (FastAP) nach Herstellerangaben.

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von Genfragmenten (158). Sie wurde stets mit chromosomaler DNA oder zirkulärer Plasmid-DNA als Matrizen-DNA nach Standardprotokollen durchgeführt (206). Die PCR wurde mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase in folgendem Reaktionsansatz angesetzt:

#### Reaktionsansatz 50 µl

- 31,5 µl dH<sub>2</sub>O
- 10 µl 5x Phusion® HF Puffer
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 2,5 µl Vorwärtsprimer (10 pmol)
- 2,5 µl Rückwärtsprimer (10 pmol)
- 2 µl Matrizen-DNA (200-300 ng)
- 0,5 µl Phusion® DNA Polymerase

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen bzw. Primus 25 advanced, Peqlab, Erlangen) mit folgendem Programm durchgeführt:

**Tabelle 2: PCR-Temperaturprogramm**

| Anzahl der Zyklen | Reaktion             | Temperatur         | Dauer der Reaktion |
|-------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| 1                 | Anfangsdenaturierung | 98 °C              | 30 sek             |
| 30                | Denaturierung        | 98 °C              | 10 sek             |
|                   | Annealing            | T <sub>m</sub> + 3 | 30 sek             |
|                   | Elongation           | 72 °C              | 15-30 sek/kb       |
| 1                 | Endelongation        | 72 °C              | 5 min              |

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15 °C abgekühlt und die PCR-Produkte anschließend bei 4 °C gelagert.

### LFH-PCR-Methode

Für die Konstruktion einer Gendeletion auf dem Chromosomen von *B. subtilis*, wurde das Zielgen durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette deletiert. Es wurde dazu die LFH-PCR-Methode (**L**ong **F**lanking **H**omology) angewendet, die in zwei PCR-basierenden Schritten erfolgt (118, 200).

Im Ersten Schritt werden zunächst drei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt (Tabelle 2): (i) 5'-Region des Zielgens (Primer P1 und P2), (ii) 3'-Region des Zielgens (Primer P3 und P4) und (iii) Antibiotika-Kassette (Primer P2rev und P3rev). Die Primer P2 und P3 verfügen über 30 bp lange Überhänge, welche komplementär zur ausgewählten Antibiotika-Resistenzkassette sind. Die Primer P2rev und P3rev verfügen ebenfalls über 30 bp lange Überhänge, die aber komplementär zur 5'- bzw. 3'-Region des Zielgens sind. Die verwendeten Primer für die LFH-PCR-Methoden sind in Tabelle 7 aufgelistet und entsprechend gekennzeichnet.

Im zweiten Schritt werden die drei zuvor gereinigten PCR-Fragmente, aufgrund ihrer komplementären Enden, in einer Fusions-PCR unter Verwendung der Primer P1 und P4 zusammengefügt (Tabelle 3). Nach der Transformation kommt es über homologe Rekombination zu einer stabilen Integration des Fusions-Konstrukts in das Genom von *B. subtilis*. Die Selektion auf eine erfolgreiche Integration erfolgte durch Kultivierung auf Agarplatten, welche das zur inserierten Resistenzkassette entsprechende Antibiotikum enthalten. Im Anschluss wurden die entsprechenden chromosomalen Bereiche des Ausgangstammes als auch der erstellten Mutanten durch PCR mit den Primern P1 und P4 überprüft.

**Tabelle 3: Temperaturprogramm einer Fusions-PCR**

| Anzahl der Zyklen | Reaktion             | Temperatur | Dauer der Reaktion |
|-------------------|----------------------|------------|--------------------|
| 1                 | Anfangsdenaturierung | 98 °C      | 30 sek             |
| 30                | Denaturierung        | 98 °C      | 10 sek             |
|                   | Annealing            | 50 °C      | 20 sek             |
|                   | Elongation           | 72 °C      | 120 sek            |
| 1                 | Endelongation        | 72 °C      | 5 min              |

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15 °C abgekühlt und die PCR-Produkte anschließend bei 4 °C gelagert.

### Aufreinigung von PCR-Produkten

Bei dem Auftreten von Mehrfachbanden wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel aufgereinigt. Der Reaktionsansatz jeder PCR-Reaktion wurde dafür vollständig aufgetragen und in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die betreffenden Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel mit Hilfe des Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert.

PCR-Produkte, die keine Mehrfachbanden aufwiesen und daher nicht aus dem Agarosegel aufgereinigt werden mussten, wurden mit dem PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### Lösungen für das Arbeiten mit DNA

|   |  |
|---|--|
| <b>1 % Agarosegel</b>   | 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE   |
| <b>6x Loading Dye Solution</b><br>(MBI Fermentas, St. Leon-Rot) | 60 % Glycerin<br>60 mM EDTA<br>10 mM Tris-HCl, pH 7,6<br>0,03 % (w/v) Bromphenolblau<br>0,03 % (w/v) Xylen-Cyanol FF |
| <b>Saline-EDTA (pH8)</b>  | 150 mM NaCl<br>100 mM EDTA   |
| <b>1x TAE-Puffer</b>  | 40 mM Tris-HCl<br>20 mM Essigsäure<br>1 mM EDTA  |

### 4.3.2 Transformation von Bakterien

#### Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung elektro-kompetenter Zellen wurden 400 ml LB-Medium mit den entsprechenden *E. coli*-Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Bei dem Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,3-0,4 wurden die Zellen geerntet (10 min, 5.000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde dann 2 mal mit eiskaltem Wasser und 1 mal mit eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen (6 min, 5.000 rpm, 4 °C). Anschließend wurde das

Pellet in 4 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Aliquots von 40 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **Transformation von elektro-kompetenten *E. coli* Zellen**

Für die Transformation wurden 40 µl elektro-kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und entweder mit 0,5 µl gereinigter Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatzes versetzt. Nach Inkubation auf Eis (2 min) wurde das Gemisch in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite (Electroporation Cuvettes LE, Peglab, Erlangen) überführt. Danach erfolgte die Elektroporation am Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, München) mit einem Puls von 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmten LB-Medium gemischt, für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd (800 rpm) inkubiert, auf Selektivagarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsanalyse und/oder Sequenzierung überprüft (4.3.1).

### **Herstellung natürlich kompetenter *B. subtilis*-Zellen**

*B. subtilis* besitzt im Gegensatz zu anderen Bakterien eine natürliche Kompetenz und kann somit ohne zusätzliche chemische oder physikalische Behandlung DNA aus der Umgebung aufnehmen. Es wurde die Methode nach Cutting und Vander Horn angewendet (53). 3 ml SMM wurde mit drei Einzelkolonien von einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte des zu transformierenden Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Roller inkubiert. Mit 1 ml dieser Übernachtskultur wurden anschließend 20 ml des vorgewärmten LS-Mediums beimpft und für drei Stunden im Wasserbad inkubiert (100 rpm, 30 °C). Der zu transformierende *B. subtilis* Stamm befindet sich nun am Beginn der Stationären Phase und ist für kurze Zeit in der Lage, die ihm zugeführte DNA ins Zellinnere aufzunehmen und ins Genom zu integrieren.

### **Transformation von natürlich kompetenten *B. subtilis* Zellen**

Für die Transformation wurde 1 ml der in LS-Medium gewachsenen *B. subtilis* Kultur (siehe oben) mit 10 µg DNA-Lösung vermischt. Der Transformationsansatz wurde dann für 2 Stunden bei 37 °C auf dem Roller inkubiert, anschließend auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die erhaltenen Transformanten wurden jeweils 2 mal auf Antibiotika-Platten aufgereinigt und anschließend auf das Vorhandensein (möglicher) ursprünglicher Resistenzen hin überprüft.

### Lösungen für die Transformation von Bakterien

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>10x S-Base (100 ml)</b>         | 2 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|                                    | 14 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                |
|                                    | 6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 |
|                                    | 1 g Na <sub>3</sub> -Citrat x 2H <sub>2</sub> O     |
| <b>Low Salt-Medium (LS-Medium)</b> | 2 ml 10x S-Base                                     |
|                                    | 0,5 ml 20 % (w/v) Glucose                           |
|                                    | 40 µl L-Tryptophan (5 µg/µl)                        |
|                                    | 30 µl L-Phenylalanin (3 µg/µl)                      |
|                                    | 10 µl 2 % (w/v) Casein-Hydrolysat                   |
|                                    | 0,2 ml 10 % (w/v) Hefeextrakt                       |
|                                    | 0,2 ml 50 mM Spermin                                |
|                                    | 50 µl 1 M MgCl <sub>2</sub>                         |
|                                    | 17 ml dH <sub>2</sub> O                             |

### 4.3.3 Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen

#### Konstruktion von *lacZ*-Reporterfusionen

Zur Konstruktion von *lacZ*-Reporterfusionen wurde das Plasmid pAC6 verwendet (180). Neben dem *lacZ*-Reporter gen trägt das Plasmid eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette, unterschiedliche Schnittstellen für das Klonieren der Promotorfragmente, sowie 3'- und 5'-Regionen des *amyE*-Gens aus *B. subtilis*. Es wurden die *rocDEF* Promotorregionen der Stämme JH642, GWB120 und GWB127 mit dem Primerpaar AC61 und AC62 (Tabelle 7) amplifiziert, mit *Bam*HI und *Sal*I geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen Vektor ligiert. Dabei entstanden folgende Plasmide: pZAZA16, pZAZA17 und pZAZA18 (Tabelle 9). Die zur Konstruktion von *lacZ*-Reporterfusionen verwendeten Plasmide (pZAZA16-18) wurden zunächst durch die Endonuklease *Pst*I linearisiert und anschließend durch doppelt homologe Rekombination in das chromosomale *amyE*-Gen der *B. subtilis* Stämme integriert (Tabelle 8). In den daraus entstandenen Stämmen ist das *amyE*-Gen durch die Insertion der Fusion und des Chloramphenicol-Resistenz-Markers unterbrochen, was zu einem Verlust der AmyE-Aktivität führt. Sämtliche Fusionsstämmen wurden daher zunächst als Cm<sup>R</sup> selektioniert und anschließend auf den Verlust ihrer AmyE-Aktivität mittels des Amylasetests auf Stärkeplatten (4.4.2) hin überprüft.

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Quantifizierung von Prolin

Die Quantifizierung von Prolin erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen sauren Ninhydrin-Methode (14). Dabei reagiert Ninhydrin bei niedrigem pH mit Aminogruppen von Aminosäuren und bildet einen blauen Farbstoff, bei sekundären Aminosäuren, wie Prolin, hingegen entsteht ein roter Farbkomplex. Die Extinktion des Prolinderivates kann dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen werden. Dabei ist die Intensität der Farbe der Konzentration des Farbstoffes und damit der Konzentration von Prolin proportional (Lambert Beersches Gesetz, 8.5.2).

Für den Test wurden die zu untersuchenden Stämme bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,8 - 2 angezogen. Anschließend wurden 8 ml Bakterienkultur abzentrifugiert (8 min, 5.000 rpm, 20 °C), den Überstand verworfen und das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen bei -20 °C eingefroren. Das Pellet wurde in 900 µl SSA-Lösung resuspendiert und die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur unter starkem Schütteln (750 rpm) aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm) und der erhaltene Überstand (Zellextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Zellextrakt wurden 500 µl entnommen, mit 500 µl Ninhydrin-Lösung und 500 µl Eisessig versetzt und für 1 h im Wasserbad (100 °C) gekocht. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Danach wurde 2 ml Toluol zugegeben, die Proben für 30 sek gründlich gewortext und nach anschließender Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm) wurde das farbige Endprodukt in die Toluolphase extrahiert. Die Extinktion des roten Prolin-Ninhydrin-Farbkomplexes in der Toluolphase wurde gegen Toluol als Blindwert bei 480 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung von L-Prolin erfolgte unter Verwendung einer Kalibrationsgeraden (0 – 8 mM L-Prolin).

#### Lösungen zur Quantifizierung von Prolin

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>SSA-Lösung</b>       | 3 % (wt/vol) 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat |
| <b>Ninhydrin-Lösung</b> | 1,25 g Ninhydrin                          |
|                         | 30 ml Eisessig                            |
|                         | 20 ml 6 M Phosphorsäure                   |

### 4.4.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### Amylasetest auf Stärkeplatten

*B. subtilis* besitzt ein Amylase-Gen, *amyE*. Dieses Gen findet häufig Anwendung, wenn Reporter-genkonstrukte über doppelt homologe Rekombination in das Genom von *B. subtilis* eingeführt werden sollen. Das funktionale *amyE* kann sehr einfach nachgewiesen werden und hat zusätzlich den Vorteil, dass es für *B. subtilis* nicht essentiell ist. Der Nachweis erfolgt auf Stärkeplatten (Tabelle 1). Ist das Gen intakt, wird extrazelluläre Amylase gebildet und die Stärke wird von den Bakterienzellen abgebaut. Wurde das Gen durch Rekombinationsereignisse zerstört, wird keine Amylase gebildet und die Stärke wird nicht angegriffen. Der Nachweis erfolgt, indem auf Platten jeweils ein *amyE*-Wildtypstamm und die Stämme mit der erwarteten Rekombination auf einer Stärkeplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Am nächsten Morgen wird eine Iod-Kaliumiodid-Lösung aufgetropft und auf der Platte verteilt. Um die Ausstriche mit einem intakten *amyE*-Gen bildet sich ein deutlich sichtbarer Hof. Wurde das *amyE*-Gen jedoch zerstört, ist kein Hof erkennbar.

#### Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach der Methode von Miller durchgeführt (135). Die Messung beruht auf der enzymatischen Umwandlung von o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid in Galaktose und o-Nitrophenol durch die  $\beta$ -Galaktosidase. o-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ bestimmt werden.

Die Expression des Reportergens *lacZ* unter der Kontrolle der Promotorregion des *rocDEF*-Operons wurde nach Zugabe von L-Prolin, L-Arginin, L-Ornithin oder L-Citrullin in SMM ohne oder mit Ammonium untersucht.

Für den Enzymtest wurden die Stämme bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,6 - 0,8 angezogen. Anschließend wurden 1,6 ml der Kultur abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen auf Eis gestellt. Danach wurde das Pellet in 400  $\mu$ l Z-Puffer resuspendiert, mit 30  $\mu$ l Lysozym versetzt, für 10 min bei 37 °C inkubiert und dann abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der erhaltene Überstand (Zellextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 100  $\mu$ l des Zellextraktes wurden mit 700  $\mu$ l Z-Puffer vermischt und für 5 min bei 28 °C vorinkubiert. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 200  $\mu$ l einer  $\beta$ -ONPG-Lösung zugegeben. Sobald eine deutliche

Gelbfärbung festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 420 nm (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Freiburg). Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Zellextrakt. Der Proteingehalt wurde über die optische Dichte (OD<sub>578</sub>) abgeleitet (135).

Die spezifische β - Galaktosidaseaktivität (A<sub>LacZ</sub>) in Units/mg Protein lässt sich wie folgt berechnen:

$$A_{LacZ} = \frac{(1000 \cdot \Delta E_{420nm})}{OD \cdot V_{ml} \cdot \Delta t_{min} \cdot 0,32} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Dabei ist:

$A_{LacZ}$  die spezifische LacZ-Aktivität (U/mg Protein)

$\Delta E_{420nm}$  die Extinktion von o-Nitrophenol bei 420 nm abzüglich des Blindwertes

$V_{ml}$  das Volumen des eingesetzten Zellextraktes in ml

$\Delta t_{min}$  die Reaktionsdauer vom Start durch Zugabe von β-ONPG bis zum Stoppen durch Zugabe von 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in min

### **Bestimmung der Phosphoglukosidase-Aktivität**

Die Bestimmung der Phosphoglukosidase-Aktivität erfolgt mittels des *treA*-Reportergens, welches für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glucosidase (TreA) kodiert (73, 166).

Die Expression des Reportergens *treA* unter der Kontrolle der Promotorregion des *putBCP*-Operons wurde nach Zugabe von L-Prolin oder verschiedener prolinhaltiger Aminosäuren in SMM ohne oder mit 1,2 M NaCl zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Für den Enzymtest wurden 1,5 ml der Kultur genommen und abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl Z-Puffer resuspendiert, mit 30 µl Lysozym versetzt, für 10 min bei 37 °C inkubiert und dann erneut abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der erhaltene Überstand (Zellextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 400 µl des Zellextraktes wurden anschließend mit 400 µl Z- Puffer vermischt und für 5 min bei 28 °C vorinkubiert. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 200 µl einer α-PNPG-Lösung zugegeben. Sobald eine deutliche Gelbfärbung festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung

der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 420 nm (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Freiburg). Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Zellextrakt. Der Proteingehalt wurde über die optische Dichte ( $OD_{578}$ ) abgeleitet (135).

Die spezifische Phosphoglukosidase-Aktivität ( $A_{TreA}$ ) in Units/mg Protein lässt sich wie folgt berechnen:

$$A_{TreA} = \frac{(15000 \cdot \Delta E_{420nm})}{OD \cdot V_{ml} \cdot \Delta t_{min} \cdot 0,75} \quad \text{(Gleichung 3)}$$

Dabei ist:

$A_{TreA}$  die spezifische TreA-Aktivität (U/mg Protein)

$\Delta E_{420nm}$  die Extinktion von o-Nitrophenol bei 420 nm abzüglich des Blindwertes

$V_{ml}$  das Volumen des eingesetzten Zellextrakts in ml

$\Delta t_{min}$  die Reaktionsdauer vom Start durch Zugabe von  $\alpha$ -PNPG bis zum Stoppen durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  in min

### Lösungen für die Bestimmung von Enzymaktivitäten

|  |   |
|--|---|
| <b>Iod-Kaliumiodidlösung</b>           | 0,5 % (w/v) Iod<br>1 % (w/v) Kaliumiodid  |
| <b>Lysozym</b>                         | 20 mg/ml; frisch ansetzen   |
| <b><math>\alpha</math>-PNPG-Lösung</b> | 4 mg/ml in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH7,5); frisch ansetzen  |
| <b><math>\beta</math>-ONPG-Lösung</b>  | 4 mg/ml in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH7,5); frisch ansetzen  |
| <b>Z-Puffer (1l, pH7)</b>              | 10,7 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$<br>5,5 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$<br>0,75 g KCl<br>0,246 g $MgSO_4 \times 7H_2O$ |

## 5 Ergebnisse

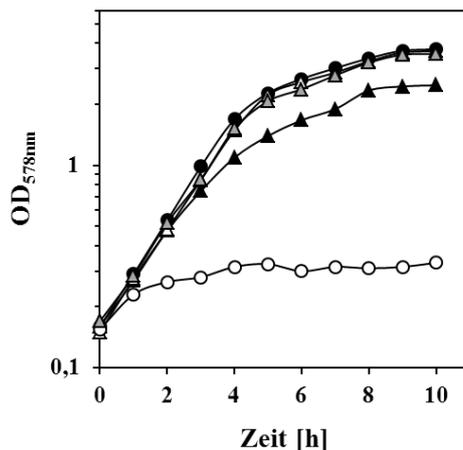
### 5.1 Untersuchungen zur Umgehung der *proA* Deletion

*B. subtilis* kann Prolin einerseits für anabole Zwecke über den ProB-ProA-ProI-Weg, andererseits als osmotische Schutzsubstanz über ProJ-ProA-ProH synthetisieren (Abb. 2) (29, 30). Die beiden  $\gamma$ -Glutamyl-Kinasen, ProB und ProJ sowie die  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktasen, ProI und ProH sind Iso-Enzyme und demzufolge in der Lage bei Verlust die Funktion des jeweils anderen Enzyms zu übernehmen (17). *B. subtilis* besitzt hingegen kein paralogenes Enzym zu der  $\gamma$ -Glutamylphosphat Reduktase ProA. Es ist also vorstellbar, dass bei dessen Deletion die Prolinbiosynthese nicht mehr ablaufen kann und es zur Ausbildung eines Prolin-auxotrophen Phänotyps kommt. Tatsächlich war das Wachstum der *proBA*-Deletionsmutante in Minimalmedium ohne Prolin erheblich vermindert (13, 28, 212). Umso überraschender war das Ergebnis eines Wachstumsexperimentes, in dem die *proBA*-Mutante plötzlich ein wildtypartiges Wachstum zeigte, sie demzufolge ohne die Zugabe von externem Prolin in der Lage war normal zu wachsen (212). Der folgende Abschnitt befasst sich mit der genaueren Untersuchung dieses Phänomens.

#### 5.1.1 Isolierung von Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten

Vergleicht man das Wachstum der *proBA*-Deletionsmutante GWB101 mit dem *B. subtilis* Wildtyp JH642 [*proBA*<sup>+</sup>] in flüssigem Minimalmedium ohne Prolin, so fiel auf, dass die Deletionsmutante ein extrem vermindertes Wachstum in diesem Medium besaß (Abb. 5). Nichtsdestotrotz konnte ein geringes Wachstum dieses Stammes beobachtet werden; dies widerspricht der Definition eines wirklichen auxotrophen Stammes. Das gleiche Wachstumsverhalten zeigte sich auch in dem *proA*-Deletionsstamm GWB99 (Daten nicht gezeigt).

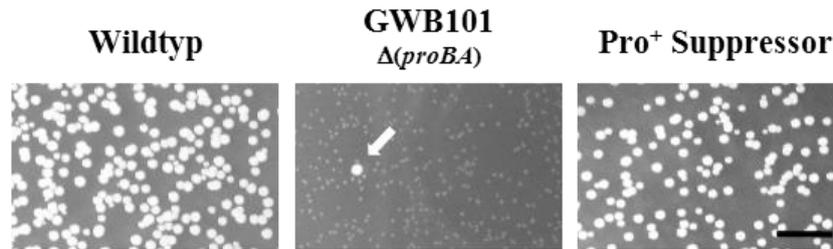
Noch deutlicher war das Wachstum auf festem Minimalmedium ohne Prolin zu beobachten. Die *proBA*- bzw. *proA*-Deletionsstämme waren in der Lage mit der gleichen Effizienz wie der Wildtyp Kolonien auf SMM-Agarplatten zu bilden (Abb. 6, Daten nicht gezeigt). Sie unterscheiden sich einzig in ihrer Größe, da die Kolonien der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp sehr klein waren. Ganz besonders auffällig war in diesem Zusammenhang die vereinzelte Bildung von größeren, mutmaßlich schneller wachsenden Kolonien (Abb. 6; markiert mit einem Pfeil).



**Abb. 5: Einfluss der Suppressor-Mutationen auf das Wachstum von *B. subtilis* *proBA*-Deletionsstämmen unter isoosmolaren Bedingungen.**

Wachstum des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 (●) und dessen Derivate GWB101 [*proBA*] (○), GWB120 [*proBA*; Pro<sup>+</sup>-1] (△), GWB123 [*proBA*; Pro<sup>+</sup>-4] (▲) und GWB128 [*proBA*; Pro<sup>+</sup>-9] (▲) in SMM (ohne Prolin). Die OD<sub>578</sub> wurde jede Stunde photometrisch bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei Parallelen berechnet (8.5.1). Den Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen wurde nach ihrer Isolierung Nummern zugewiesen (Tabelle 8).

Zunächst wurden einige der größeren Kolonien isoliert. Testet man nun diese schneller wachsenden Stämme in Minimalmedium, so waren sie alle in der Lage wie der Wildtyp zu wachsen (Abb. 5). Demzufolge besitzen diese Kolonien trotz des Fehlens von ProA einen Prolin-prototrophen Phänotyp (Pro<sup>+</sup>). Dies könnte mit der Bildung sogenannter Suppressor-Mutationen erklärt werden, die es den Stämmen ermöglichen würden, den ProA-katalysierten Schritt durch Proteine anderer Stoffwechselwege zu ersetzen. Um die Rate für das Auftreten dieser Suppressor-Mutationen zu quantifizieren (4.2.4), wurde stellvertretend die *proBA*-Mutante GWB101 in SMM mit ausreichend Prolin (10 mM) angezogen. Das externe Prolin wurde hinzugegeben, um die Bildung von Suppressor-Mutanten während der Kultivierung zu unterbinden. Nach anschließender Entfernung des Prolins wurden verschiedene Verdünnungen auf SMM-Agarplatten in An- und Abwesenheit von Prolin plattiert, und die gebildeten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Kolonien gezählt. Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen traten mit einer Wahrscheinlichkeit von 10<sup>-6</sup> pro Genom auf. Die Häufigkeit in der typischerweise in Bakterien Mutationen auftreten liegt in der Größenordnung 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-8</sup> (114). Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen traten aber mit einer 10-fach höheren Häufigkeit auf, was darauf hindeutet, dass bedingt durch den experimentellen Ansatz es zu einer Überschätzung der tatsächlichen Mutationsrate kam.



**Abb. 6: Wachstum verschiedener *B. subtilis* Deletionsstämme auf Minimal-Agarplatten.**

Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 und dessen Derivate GWB101 [*proBA*], sowie ein repräsentativer Pro<sup>+</sup> Suppressor Stamm GWB120 [*proBA*, Pro<sup>+</sup>-1] wurden bis zur stationären Phase angezogen. 100 µl der verdünnten Kulturen (10<sup>-5</sup>) wurden auf SMM-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Der Pfeil zeigt eine Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutante. Längenstandart: 5 mm.

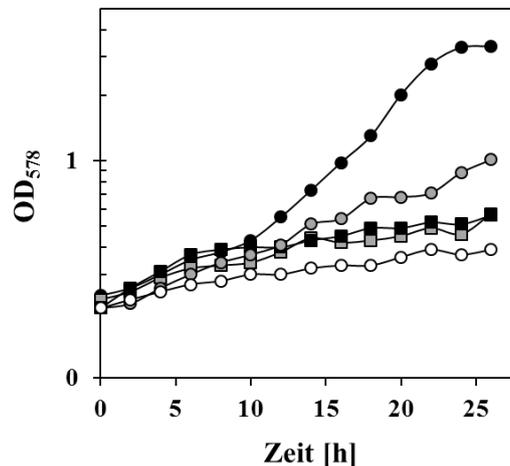
Für weitergehende Untersuchungen wurden insgesamt 19 unabhängige Pro<sup>+</sup> Suppressor Stämme isoliert: 11 dieser Stämme sind Derivate von GWB101 [*proBA*], besitzen demzufolge eine *proBA*-Deletion und wurden von Guido Wünsche im Laufe seiner Masterarbeit unter folgender Bezeichnung GWB120-133 isoliert (212); 8 dieser Stämme sind Derivate von GWB99 [*proA*], besitzen demzufolge eine *proA*-Deletion und wurden im Laufe dieser Arbeit unter folgender Bezeichnung ACB88-95 isoliert (Tabelle 8).

### 5.1.2 Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen erlauben keine Osmoprotektion von *B. subtilis* bei Hyperosmolarität

Das ProA Protein hat eine besondere Stellung innerhalb der Prolinbiosynthese von *B. subtilis*: ProA verlinkt den anabolen mit dem osmoadaptiven Prolin-biosynthetischen Stoffwechselweg (Abb. 2) (26). Demzufolge hat ProA eine zentrale Rolle in der Synthese von Prolin für die Proteinbiosynthese, aber auch in der Bereitstellung enormer Mengen an Prolin als osmotische Schutzsubstanz (29, 30).

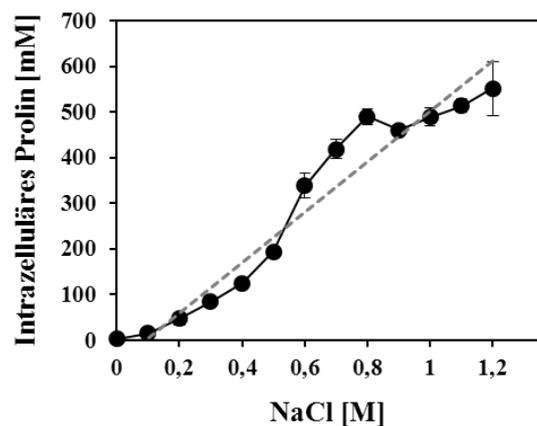
Da es sich zeigte, dass die Pro<sup>+</sup> Suppressor Mutationen das Wachstum der *pro(B)A*-Deletionsmutante in Minimalmedium ohne zusätzlichen osmotischen Stress ermöglichen (Abb. 5), stellt sich nun die Frage, ob sie ebenfalls in der Lage sind die Funktion von ProA unter hochosmolaren Bedingungen zu übernehmen. Hierzu wurde das Wachstum der *proBA* Mutante, der *proHJ* Mutante, sowie repräsentativer Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten mit dem Wachstum des Wildtypstammes in SMM mit 1,2 M NaCl verglichen (Abb. 7). Erwartungsgemäß ist der *B. subtilis* Wildtypstamm in der Lage sich an hochosmolare Bedingungen anzupassen, während die Deletion des *proHJ*-Operons zu einem osmotisch sensitiven Phänotyp führt (Abb. 7) (29). Die getesteten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme konnten

nicht unter den hohen Salzkonzentrationen wachsen. Daraus kann man Schlussfolgern, das obwohl diese Stämme über ein intaktes *proHJ*-Operon verfügen, die  $Pro^+$  Suppressor-Mutanten nicht in der Lage sind genügend  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd für die osmoadaptive Prolinbiosynthese bereit zu stellen (Abb. 7).



**Abb. 7: Einfluss der Suppressor-Mutationen auf das Wachstum von *B. subtilis* *proA*-Deletionsstämmen unter hochosmolaren Bedingungen.**

Wachstum des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 (●) und dessen Derivate JSB8 [*proHJ*] (○), GWB101 [*proBA*] (○), GWB120 [*proBA*;  $Pro^+$ -1] (■) und GWB128 [*proBA*;  $Pro^+$ -9] (■) in SMM mit 1,2 M NaCl (ohne Prolin). Die  $OD_{578}$  wurde alle zwei Stunden photometrisch bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Wachstumsexperiment, dessen Daten in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden konnte.

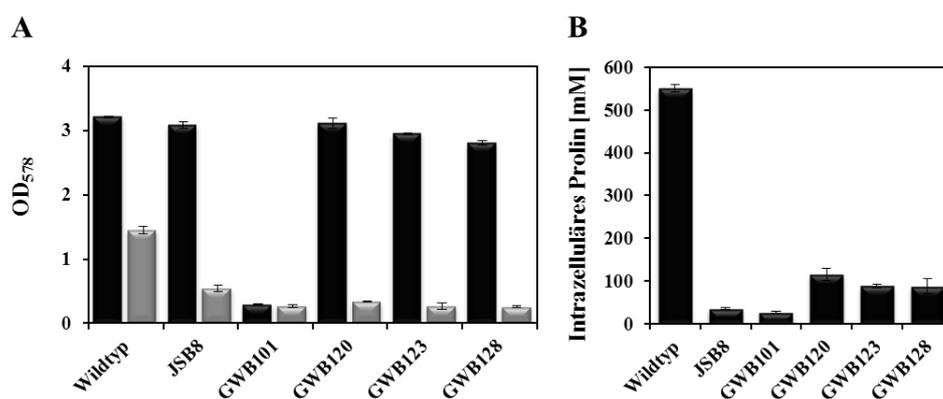


**Abb. 8: Einfluss der externen Salzkonzentration auf die Höhe des intrazellulären Prolinpools des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642.**

Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 (●) wurde bis zu einer  $OD_{578}$  von 1,8 – 2 in SMM mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (4.4.1;(14)). Für jede Probe wurde die Prolinkonzentration doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1). Die gestrichelte graue Linie verdeutlicht die lineare Abhängigkeit zwischen dem intrazellulären Prolin und der extrazellulären NaCl-Konzentration.

Durch die Akkumulation von intrazellulär synthetisiertem Prolin passt sich *B. subtilis* an hohe externe Salzkonzentrationen an (29). Misst man den intrazellulären Prolinpool des Wildtypstammes JH642 bei verschiedenen Osmolaritäten von 0 M bis 1,2 M NaCl, so zeigt sich eine lineare Abhängigkeit des intrazellulär akkumulierten Prolins und der extrazellulären Salzkonzentration (Abb. 8) (29). *B. subtilis* ist demzufolge in der Lage die Menge an externem Salz genau zu bestimmen und seinen internen Prolinpool exakt daran anzupassen.

Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen erlauben das Wachstum unter isoosmolaren Bedingungen, nicht aber unter hochosmolaren (SMM + 1,2 M NaCl) (Abb. 7 und Abb. 9A). Es stellt sich nun die Frage, ob die Suppressor-Stämme in der Lage sind ausreichend hohe Konzentrationen an intrazellulärem Prolin zu synthetisieren. Dazu wurde der interne Prolingehalt des *B. subtilis* Wildtypstammes, sowie dessen Derivate JSB8 [*proHJ*], GWB101 [*proBA*] und repräsentative Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten GWB120, GWB123 und GWB128 untersucht. Erwartungsgemäß besitzt die *proHJ*-Mutante einen osmosensitiven Phänotyp, da sie nicht in der Lage ist, Prolin in hohen Konzentrationen als osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren (Abb. 9) (29). Mit Ausnahme des Wildtypstammes, der mehr als 500 mM Prolin akkumulieren konnte, war keiner der getesteten Suppressor-Stämme in der Lage Prolin als interne Schutzsubstanz anzuhäufen (Abb. 9B). Demzufolge kann die Unfähigkeit der Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme bei hohen Osmolaritäten zu wachsen, auf das Unvermögen einen Osmostress protektiven intrazellulären Prolinpool zu generieren, zurückgeführt werden.



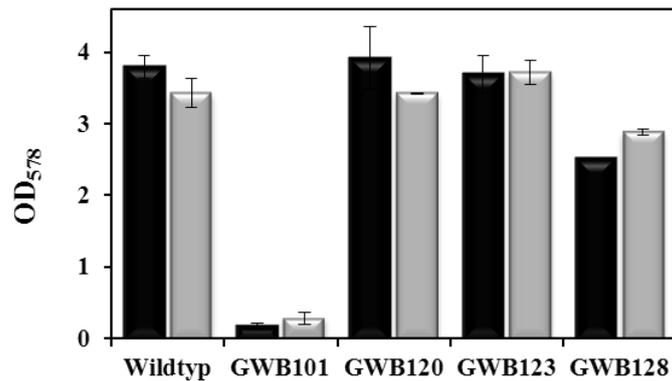
**Abb. 9: Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin.**

(A) Der Wildtypstamm JH642 und dessen Derivate JSB8 [*proHJ*], GWB101 [*proBA*], GWB120 [*proBA*; Pro<sup>+</sup>-1], GWB123 [*proBA*; Pro<sup>+</sup>-4] und GWB128 [*proBA*; Pro<sup>+</sup>-9] wurden in SMM (schwarze Balken) bzw. SMM + 1,2 M NaCl (graue Balken) inkubiert. Der Wachstumsertrag wurde nach 20 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. (B) Die Stämme wurden bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,8 – 2 in SMM + 1,2 M NaCl angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (4.4.1) (14). Für jede Probe wurde die Prolinkonzentration doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme ein Wachstum unter isoosmolaren Bedingungen ermöglichen, da sie ausreichendes Prolin für die Proteinbiosynthese durch die Umgehung von ProA zur Verfügung stellen können. Ein Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen ist hingegen nicht möglich, da die enorme Menge (ca. 500 mM) des kompatiblen Solut Prolin, welches bei äußeren Salzkonzentrationen von 1,2 M NaCl hergestellt werden muss, nicht durch die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen erreicht werden kann.

### **5.1.3 Der Prolinkatabolismus ist nicht an der Umgehung der *proA*-Deletion beteiligt**

Die Prolinbiosynthese (Abb. 2) und der Prolinabbau (Abb. 3) sind stark miteinander vernetzt. Die in der Prolinbiosynthese beteiligten Enzyme ProB und ProA katalysieren die Umwandlung von Glutamat zu  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd und das im Abbau von Prolin beteiligte Enzym PutC katalysiert die Umwandlung von  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd zu Glutamat, demzufolge die Rückreaktion von ProA und ProB (30, 139). Es stellt sich nun die Frage, ob durch eine mutationsbedingte Umkehrung der PutC-katalysierten Enzymreaktion es zu einer Synthese von Prolin kommt und dabei die *proA*-Deletion umgangen werden kann. Zur Untersuchung ob PutC an der Umgehung von ProA beteiligt ist, wurde das *putC*-Gen im Wildtyp JH642, in der *proBA*-Mutante GWB101 und in allen isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen deletiert. Mittels dieser Stämme wurde der Einfluss der *putC*-Deletion auf das Wachstum in Minimalmedium untersucht. Vergleicht man das Wachstum der Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme mit intaktem PutC (Abb. 10; schwarze Balken) mit den Stämmen mit deletiertem *putC* (Abb. 10; graue Balken), so ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass PutC nicht an der Umgehung von ProA beteiligt ist.

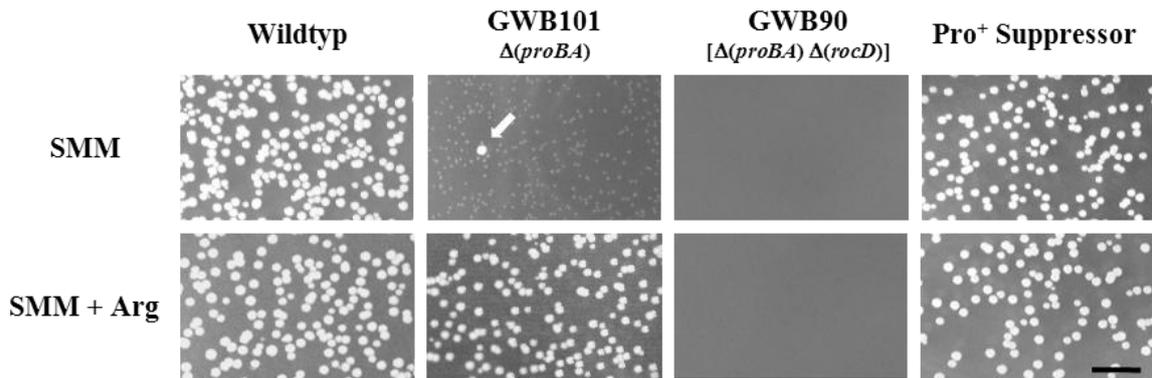


**Abb. 10: Einfluss der *putC*-Deletion auf das Wachstum verschiedener *B. subtilis* Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme.**

Wachstum verschiedener *B. subtilis* Stämme (schwarze Balken) und deren abgeleiteten Stämme mit *putC*-Deletion (graue Balken) in SMM ohne Prolin. Folgende Stämme wurden verwendet: Wildtyp JH642/SMB32, *proBA*-Mutante GWB101/GWB87, Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten GWB120/ACB41, GWB123/ACB44 und GWB128/ACB49 (Tabelle 8). Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1). Abgebildet wurden drei repräsentative Vertreter der insgesamt 19 isolierten Pro<sup>+</sup>-Suppressor-Mutanten, da alle Stämme das gleiche Wachstumsverhalten in Minimalmedium offenbarten (Daten nicht gezeigt).

#### 5.1.4 Der Argininkatabolismus ist an der Synthese von Prolin beteiligt

Der Prolin-auxotrophe Phänotyp von *B. subtilis* kann durch die Zugabe von Arginin, Ornithin oder Citrullin komplementiert werden (33). Dies traf ebenfalls auf die *proBA*-Mutante GWB101 zu, da sie durch die Zugabe von 10 mM Arginin wieder in der Lage war Kolonien in der Größe des Wildtyps auf Minimal-Agarplatten zu bilden (Abb. 11). Ebenso kam es zu einer Komplementation des Wachstumsphänotyps der *proA*-Mutante GWB99 in Anwesenheit von Arginin in Flüssigkultur (Daten nicht gezeigt). Eine Überschneidung zwischen der Prolinbiosynthese und dem Arginin-Katabolismus scheint in diesem Zusammenhang wahrscheinlich. Tatsächlich ist *B. subtilis* in der Lage ausgehend von Ornithin mittels der Ornithin-Aminotransferase (RocD, dem Schlüsselenzym im Argininabbau)  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd zu bilden, eben jenes Produkt, welches von ProA als Intermediat in der Prolinbiosynthese generiert wird (Abb. 12) (15, 60, 67). Dies würde eine Umgehung der ProB und ProA katalysierten Schritte der Prolinbiosynthese ermöglichen. Man darf aber nicht vergessen, dass mindestens eine der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktasen (ProI, ProH) vorhanden sein muss, die das von RocD gebildete  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd schlussendlich zu Prolin umwandeln (Abb. 12) (17).

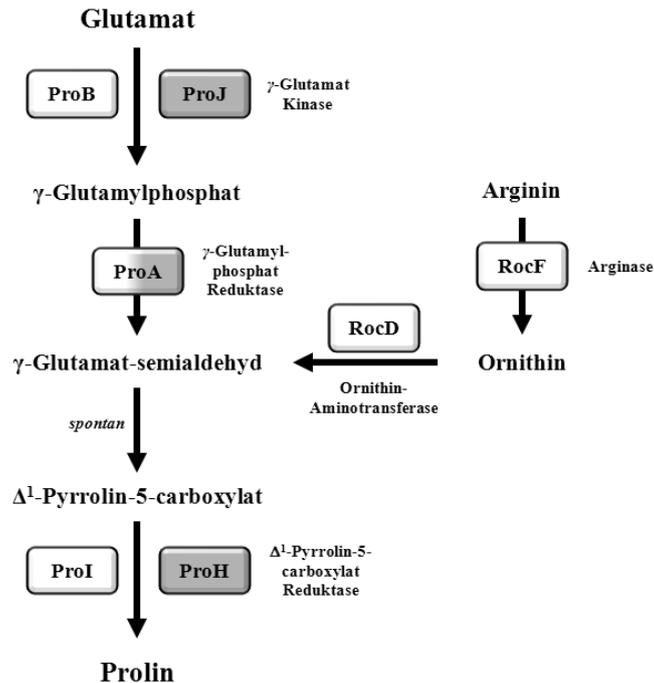


**Abb. 11: Einfluss von Arginin auf das Wachstum verschiedener *B. subtilis* Deletions-Stämme auf Minimal-Agarplatten.**

Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 und dessen Derivate GWB101 [*proBA*], GWB90 [*proBA*, *rocD*], sowie ein repräsentativer Pro<sup>+</sup> Suppressor Stamm GWB120 [*proBA*, Pro<sup>+</sup>-1] wurden bis zur stationären Phase angezogen. 100 µl der verdünnten Kulturen (10<sup>-5</sup>, im Fall von GWB90: unverdünnt) wurden auf SMM-Agarplatten in An- und Abwesenheit von 10 mM Arginin ausplattiert und bei 37° C für 24 - 48 h inkubiert. Der Pfeil zeigt eine Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutante. Längenstandart: 5 mm.

Führt man sich nun nochmal die Tatsache vor Augen, dass die *proBA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nur extrem kleine Kolonien bilden kann, so wird einem deutlich bewusst, dass die Prolinbiosynthese ausgehend von Arginin in *B. subtilis* nicht in gleichem Maße Effizient ist, wie die Prolinbiosynthese ausgehend von Glutamat. Deletiert man zusätzlich das *rocD*-Gen in der *proBA*-Mutante, so zeigte die Doppelmutante wie erwartet keine Kolonien auf der Minimal-Agarplatte, ebenso konnte die Zugabe von Arginin dies nicht mehr ausgleichen (Abb. 11). Die Deletion von *proA* zusammen mit *rocD* führt zu einer dichten Prolin-Auxotrophie.

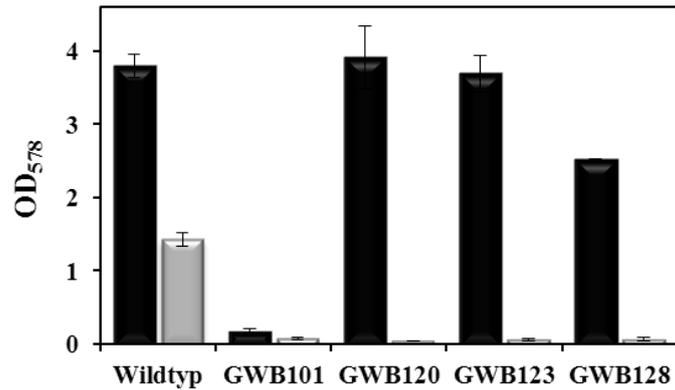
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *B. subtilis* Prolin über zwei verschiedene Wege synthetisieren kann. Prolin wird hauptsächlich ausgehend von Glutamat mittels des anabolen Prolin-Biosynthesewegs (ProB-ProA-ProI) synthetisiert und nur ein geringer Teil des für die Proteinbiosynthese benötigten Prolins kann aus dem Arginin-Katabolismus gewonnen werden, da Arginin hierzu zuerst neu synthetisiert werden muss. Bei externer Zugabe von Arginin hingegen, ist dieser Weg der Prolinsynthese durchaus effizient (Abb. 12).



**Abb. 12: Prolinbiosynthese ausgehend von Glutamat und ausgehend von Arginin.**

Die Prolinbiosynthese ausgehend von Glutamat wird von 3 Enzymen katalysiert: der  $\gamma$ -Glutamat Kinase (ProB, ProJ), der  $\gamma$ -Glutamylphosphat Reduktase (ProA) und der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase (ProI, ProH). Die Enzyme, die in der anabolen Prolinbiosynthese involviert sind, wurden als weiße Boxen dargestellt und die Enzyme der osmoadaptiven Prolinbiosynthese als graue Boxen (29, 30). Die Prolinbiosynthese ausgehend von Arginin erfolgt über die Arginase (RocF) und der Ornithin-Aminotransferase (RocD). Beide Enzyme sind Teil des Argininabbau-Wegs und ermöglichen die Umwandlung von Arginin (über Ornithin) zu  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd (68).

In einem nächsten Experiment wurde die Rolle von RocD in den Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen untersucht. Hierzu wurde das *rocD*-Gen in dem *B. subtilis* Wildtyp JH642, in der *proBA*-Mutante GWB101, sowie in allen isolierten Suppressor-Stämmen deletiert und der Wachstumsertrag in Minimalmedium nach 16 Stunden gemessen (Abb. 13). Interessanterweise führte die Deletion von *rocD* im Wildtyp zu einem signifikanten Wachstumsdefizit, obwohl der anabole Prolin-Biosyntheseweg intakt war und ohne Zugabe von Ornithin im Medium, dessen Abbau gewissermaßen nicht benötigt wurde. In diesem Zusammenhang lässt sich die Akkumulation eines toxischen Zwischenproduktes des Arginin-Katabolismus in diesem Stamm vermuten. Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme hingegen konnten nach der Deletion des *rocD*-Gens überhaupt nicht mehr wachsen (Abb. 13, graue Balken, gezeigt wurden 3 repräsentative Stämme). Sie zeigten also den gleichen Prolin-auxotrophen Phänotyp wie die *rocD proBA* Doppelmutante. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Synthese von Prolin in allen isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten strikt an die Aktivität von RocD gekoppelt ist.



**Abb. 13: Einfluss der *rocD*-Deletion auf das Wachstum verschiedener *B. subtilis* Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme.**

Wachstum verschiedener *B. subtilis* Stämme (schwarze Balken) und deren abgeleiteten Stämme mit *rocD*-Deletion (graue Balken) in SMM ohne Prolin. Folgende Stämme wurden verwendet: Wildtyp JH642/GWB98, *proBA*-Mutante GWB101/GWB90, Pro<sup>+</sup>-Suppressor-Mutanten GWB120/ACB27, GWB123/ACB30 und GWB128/ACB35 (Tabelle 8). Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1). Abgebildet wurden drei repräsentative Vertreter der insgesamt 19 isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten, da sie alle das gleiche Wachstumsverhalten in Minimalmedium offenbarten (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.5 Lokalisierung der Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen im Chromosomen von *B. subtilis*

Betrachtet man, wie die Transkription des *rocD*-Gens in *B. subtilis* reguliert wird, so lässt sich leicht die geringe Beteiligung des Arginin-Katabolismus an der Prolin-Biosynthese verstehen. Die Gene, die für die Enzyme des Arginin-Abbaus kodieren sind in den beiden Operon *rocABC* und *rocDEF* organisiert (40, 67). Die Transkription beider Operon wird in Gegenwart des Induktors Arginin, Ornithin oder Citrullin von den Aktivator-Proteinen RocR und AhrC aktiviert, wobei Ornithin vermutlich der wahre Induktor ist (Abb. 15) (2, 40, 67, 68, 109, 134). Weiterhin wird die Menge an AhrC in der Zelle durch die Antisense-RNA *srI* reguliert, die an die *ahrC* mRNA binden kann um deren Translation zu unterbinden (Abb. 15) (87, 88). In Abwesenheit des Induktors wird demnach nur eine sehr geringe Menge an RocD in der Zelle gebildet, was wiederum mit der geringen Synthese von Prolin aus Ornithin im Minimalmedium einhergeht und die Bildung der kleinen Kolonien in dem *proA*-Deletionsstamm erklärt (Abb. 6).

Es stellt sich nun die Frage, ob die Suppressor-Mutationen die Menge an RocD in der Zelle erhöhen oder zu einer Steigerung der RocD-Enzymaktivität führen. Beides würde den Anteil an synthetisiertem Prolin aus dem Arginin-Katabolismus vergrößern und somit einen

Pro<sup>+</sup> Phänotyp auch in Abwesenheit von ProA gewährleisten. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die DNA-Sequenz des *rocR*-Gens, sowie die regulatorische Region zwischen *rocR* und *rocDEF* in allen 19 isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen analysiert. Dies offenbarte drei unterschiedliche Klassen von Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen basierend auf deren Lokalisation (Tabelle 4). Acht der Mutationen konnten innerhalb des *rocR*-Gens lokalisiert werden (Klasse I), in sieben Stämmen befanden sich die Mutationen innerhalb der regulatorischen Region des *rocDEF*-Operons (Klasse II) und in 4 Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen konnten keine Mutationen im untersuchten Bereich gefunden werden. Diese vier Stämme wurden als Klasse III Mutationen zusammengefasst (Tabelle 4).

Da die Klasse III Suppressor-Mutationen weder in *rocR*, noch in der intergenen Region von *rocR-rocDEF* zu finden waren, wurden weitere Bereiche des Genoms eines repräsentativen Vertreters der Klasse III untersucht. Hierbei konnte als Ort der Mutation das Strukturgen des zweiten Regulators AhrC, das *rocD*-Gen, sowie der Antisense-RNA *srI* ausgeschlossen werden. Ebenso befanden sich keine Mutationen im *gltR*-Gen, welches für ein weiteres Aktivatorprotein in *B. subtilis* kodiert und im Stickstoffmetabolismus involviert ist (18). Weitere Gene von Regulatorproteinen des Stickstoffmetabolismus wiesen gleichfalls keine Mutationen auf: *rocG*, *tnrA*, *codY* (76, 173). In *E. coli* und *S. typhimurium* kann eine *proA*-Deletion durch den gleichzeitigen Ausfall von ArgD (bedingt durch Mutationen innerhalb von *argD*) umgangen werden (21, 116). Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Mechanismus auch der Klasse III Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen zugrunde liegt, wurde das *argD*-Gen sequenziert. Mutationen innerhalb dieses Gens wurden nicht gefunden. In einem neuen Ansatz wurde die Genom-Resequenzierung eines Vertreters der Klasse III für die eindeutige Lokalisierung der Suppressor-Mutation in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Daniel (Göttingen Genomics Laboratory) eingeleitet. Bis zur Erstellung dieser Arbeit lagen noch keine abschließenden Daten der Genom-Resequenzierung vor.

Alle drei Klassen konnten in den isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen des *proBA*-Deletionsstammes GWB101 und des *proA*-Deletionsstammes GWB99 gefunden werden. Der genetische Hintergrund hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Lage bzw. der Art der Suppressor-Mutationen. In beiden Fällen wurde aber das *proA*-Gen deletiert, es ist somit sicher, dass der Verlust von ProA der Auslöser für das Auftauchen der Suppressor-Mutationen ist und nicht etwa die Kombination aus dem Fehlen von ProA und ProB.

**Tabelle 4: Die drei Klassen von Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen<sup>1</sup>.**

| Klasse                             | I <sup>2</sup>   | II <sup>3</sup>  | III                                       |
|------------------------------------|--|--|---|
| <b>Ort der Punktmutation</b>       | innerhalb des <i>rocR</i> -Gens  | in der regulatorischen Region von <i>rocDEF</i>                                      | nicht innerhalb der untersuchten Regionen |
| <b>Beschreibung</b>                | Aminosäuresubstitution: K83N; K93E; D118N; L250H; A252P; Q259E; I279T; I287T | SigA-P1: Insertion eines A/T Basenpaares<br>SigA-P2: Basenpaaraustausch (T/A zu A/T) | unbekannte Mutation                       |
| <b>Anzahl unabhängiger Isolate</b> | Jede Mutation entspricht einem Isolat (Gesamt: 8 Isolate)                    | SigA-P1: 5 Isolate<br>SigA-P2: 2 Isolate   | 4 Isolate                                 |

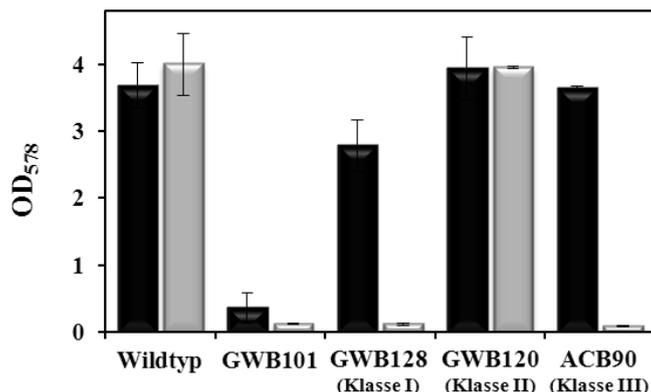
<sup>1</sup> Die Pro<sup>+</sup> Suppressor Stämme sind in Tabelle 8 unter den folgenden Stammnamen zu finden: GWB120-133 (isolierte Derivate der *proBA*-Deletionsmutante GWB101); ACB88-95 (isolierte Derivate der *proA*-Deletionsmutante GWB99).

<sup>2</sup>Die Position der Punktmutationen in RocR sind in Abb. 15 gezeigt.

<sup>3</sup> SigA-P1, Insertion einer A/T Basenpaarung in der Promotorregion des *rocDEF*-Operons (Abb. 16). SigA-P2, Austausch der T/A Basenpaarung zu A/T in der Promotorregion des *rocDEF*-Operons (Abb. 16).

### 5.1.6 Physiologische Charakterisierung der verschiedenen Klassen von Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen

Das *rocDEF*-Operon wird in Abhängigkeit des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^L$  (SigL) von einem spezifischen -12/-24 Promotor transkribiert (Abb. 15A) (67, 68). Es stellt sich nun die Frage, ob die Transkription des *rocDEF*-Operons in den Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen weiterhin von SigL abhängig ist. Hierzu wurde das *sigL*-Gen im Wildtyp JH642, in der *proBA*-Mutante GWB101 und in allen isolierten Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen deletiert und das Wachstum in Minimalmedium analysiert (Abb. 14). Erwartungsgemäß hat die Deletion von *sigL* im Wildtyp keinen Effekt auf das Wachstum, da zum einen der anobole Prolin-Biosyntheseweg intakt und zum anderen der Sigmafaktor  $\sigma^L$  nicht essentiell in *B. subtilis* ist (54). Unterschiede im Wachstum der drei Klassen von Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten in Abhängigkeit von SigL konnte jedoch beobachtet werden. Die Suppressor-Stämme der Klasse I (Mutationen in *rocR*) und Klasse III (Mutationsort unbekannt) konnten nur in Gegenwart von SigL wachsen, wohingegen das Wachstum der Klasse II (Mutationen in der regulatorischen Region von *rocDEF*) unabhängig von SigL war (Abb. 14). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass es innerhalb der unbekanntes Klasse III einen Stamm gibt (GWB123), der auch nach der Deletion von SigL in der Lage war zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von *rocDEF* in den Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen unterschiedlich reguliert wird.



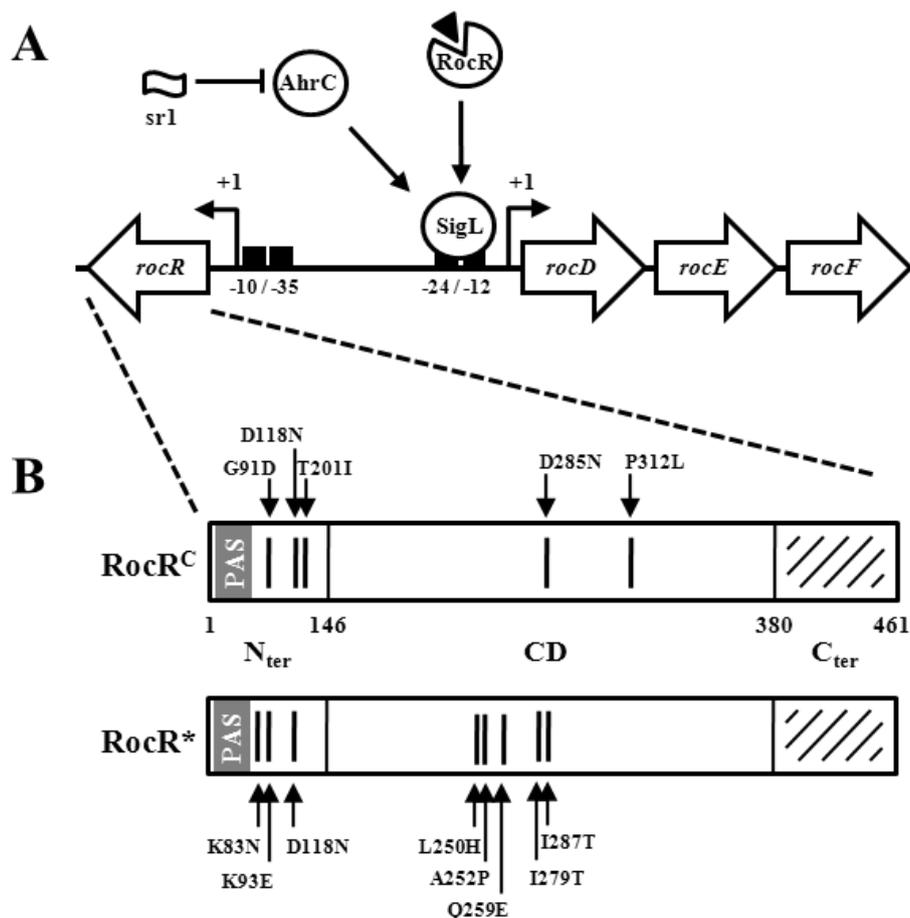
**Abb. 14: Einfluss der *sigL*-Deletion auf das Wachstum verschiedener *B. subtilis* Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme.**

Wachstum verschiedener *B. subtilis* Stämme (schwarze Balken) und deren abgeleiteten Stämme mit *sigL*-Deletion (graue Balken) in SMM ohne Prolin. Folgende Stämme wurden verwendet: Wildtyp JH642/GWB92, *proBA*-Mutante GWB101/GWB88, Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten GWB128/ACB85, GWB120/ACB78 und ACB90/ACB218 (Tabelle 8). Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1). Abgebildet wurde jeweils ein repräsentativer Vertreter der Klasse I-III, da die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme innerhalb ihrer Klasse ein gleiches Wachstumsverhalten in Minimalmedium offenbarten (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.7 Klasse I: Punktmutationen im Aktivatorprotein RocR (RocR\*)

Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme der Klasse I besitzen Punktmutationen in dem *rocR*-Gen, welche zu Aminosäuresubstitutionen in RocR führen (Tabelle 4). Um sie von dem Wildtyp-RocR zu unterscheiden, werden diese modifizierten Proteine im Folgenden als RocR\* bezeichnet.

RocR ist einer der beiden positiven Aktivatorproteine, welche Zusammen mit SigL in Anwesenheit des Induktors Ornithin, Arginin oder Citrullin die Transkription von *rocDEF* aktivieren (Abb. 15A) (40, 68, 103). RocR gehört der NtrC/NifA-Familie der prokaryotischen *enhancer*-bindenden Proteine an (32, 40). Wie auch die anderen Mitglieder dieser Familie, so besteht auch RocR (UniProt: P38022) aus drei Domänen: (i) N-terminale Domäne mit der PAS-Domäne (SMART: Aminosäuren 10-75), (ii) Zentrale Domäne mit der AAA<sup>+</sup>-Domäne (SMART: Aminosäuren 163-305), (iii) C-terminale Domäne mit dem Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv (SMART: Aminosäuren 434-453) (Abb. 15B) (68, 123). Betrachtet man sich die Positionen der Aminosäuresubstitutionen in RocR\*, so erkennt man zwei Bereiche in denen die Mutationen gehäuft auftreten. Zum einen in der Nähe des N-terminus (K83N; K93E; D118N) und zum anderen im mittleren Bereich der Zentralen Domäne (L250H; A252P; Q259E; I279T; I287T) (Abb. 15B). Keine Mutationen wurden hingegen in der PAS-Domäne oder in dem DNA-Bindemotiv gefunden (Abb. 15B).



**Abb. 15: Regulation der *rocDEF* Transkription in *B. subtilis* und Lokalisierung der Punktmutationen in RocR.**

(A) Die Transkription des *rocDEF*-Operons erfolgt durch einen SigL-abhängigen Promotor von der -12/-24 Promotor Region und wird durch die beiden positiven Regulatorproteine, RocR und AhrC induziert. Das Protein RocR wird durch die Bindung eines Induktors (schwarzes Dreieck) aktiviert, AhrC hingegen wird negativ durch die Antisense-RNA *sr1* reguliert. Das Strukturgen, welches für RocR kodiert, befindet sich stromaufwärts zum *rocDEF*-Operon. (B) RocR besteht aus drei funktionellen Domänen: N-terminale Domäne (1-146, N<sub>ter</sub>) mit der eingezeichneten PAS-Domäne, der zentralen Domäne (146-380, CD) und der C-terminalen Domäne (380-461, C<sub>ter</sub>). Die Positionen der Punktmutationen, die in der Arbeit von Gardan et al. (68) (RocR<sup>C</sup>) bzw. während dieser Arbeit gefunden wurden (RocR\*) sind mit Pfeilen markiert und der Aminosäureaustausch eingezeichnet.

Eine vorangegangene Studie hat sich mit der Rolle von RocR bei der Transkription des *rocDEF* Operons befasst (68). In ihr gelang es mittels eines genetischen Screening-Verfahrens RocR-Varianten (RocR<sup>C</sup>) zu isolieren, die die Transkription des *rocDEF*-Operons auch ohne die Zugabe eines Induktors aktivieren können (Abb. 15B) (68). Trotz der unterschiedlichen Methoden die für die Isolierung der modifizierten RocR-Proteine verwendet wurden, konnte die D118N-Punktmutation sowohl in der schon publizierten Studie (68), als auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden werden (Abb. 15B). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Schlussfolgerung von Gardan *et al.* (68) basierend auf der Isolierung

der RocR<sup>C</sup>-Varianten, auch auf die hier isolierten RocR\* Mutationen zutreffen; nämlich die Transkription von *rocDEF* in Abwesenheit eines Induktors.

Um diese Hypothese experimentell zu testen, wurde eine *rocD-lacZ* Reporterfusion konstruiert und anschließend in das chromosomale *amyE*-Gen des *B. subtilis* Wildtyps, sowie aller 8 RocR\*-Stämme integriert und dessen Expression in An- und Abwesenheit der Induktoren Arginin oder Ornithin untersucht (Tabelle 5). In völliger Übereinstimmung mit schon publizierten Daten, konnte im Wildtyp keine Expression der *rocD-lacZ* Fusion in Minimalmedium gemessen werden. Durch die Zugabe eines Induktors, beispielsweise Arginin oder Ornithin, konnte die Expression jedoch stark gesteigert werden (Tabelle 5). Das gleiche Expressionsmuster nach Zugabe von Arginin bzw. Ornithin zeigte sich ebenfalls in den Stämmen mit RocR\*. Viel interessanter in diesem Zusammenhang war aber die Tatsache, dass die *rocD-lacZ* Expression der Stämme mit RocR\* auch ohne Induktor hohe Werte aufwies (Tabelle 5). Demzufolge sind die RocR\*-Varianten in der Lage die Transkription des *rocDEF*-Operons partiell Induktor-unabhängig zu aktivieren.

Zusätzlich wurde der Einfluss der *sigL*-Deletion untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression der *rocD-lacZ* Fusion nicht nur im Wildtyp, sondern auch in den RocR\* Stämmen abhängig von SigL war (Tabelle 5). Dies ist konsistent mit den in Abb. 14 gezeigten Daten, da es sich ja schon im Wachstumsexperiment zeigte, dass die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme der Klasse I nach der Deletion von *sigL* ihre Fähigkeit verloren, in Minimalmedium ohne Prolin wachsen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Punktmutationen in RocR die Transkription des *rocDEF*-Operons auch in Abwesenheit eines Induktors ermöglichen. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Menge an RocD in der Zelle, was wiederum eine Zunahme an produziertem  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd ausgehend von Ornithin zur Folge hat. Dieses  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd kann anschließend von den  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktasen zur Prolinsynthese verwendet werden. Dies erklärt schlussendlich den Pro<sup>+</sup> Phänotyp der Klasse I Suppressor-Mutanten in Minimalmedium ohne Prolin (Abb. 5).

**Tabelle 5: Einfluss der Punktmutationen im positiven Regulator RocR auf die Transkription des *rocDEF*-Operons.**

| Stamm <sup>1</sup> | Mutation    | SMM    | Beta-Galaktosidase-Aktivität [U/mg Protein] <sup>3</sup> |                   |          |                                      |                    |       |
|--------------------|-------------|--------|--|-------------------|----------|--------------------------------------|--------------------|-------|
|                    |             |        | Orn  | SigL <sup>+</sup> |          |                                      | SigL <sup>-2</sup> |       |
|                    |             |        |  | Arg               | Pro      | Pro [-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] | SMM                | Arg   |
| ACB136             | WT          | 1 ± 0  | 389 ± 40   | 388 ± 18          | 3 ± 1    | 117 ± 10                             | 1 ± 0              | 2 ± 0 |
| ACB145             | RocR*:D118N | 57 ± 6 | 338 ± 40   | 322 ± 10          | 346 ± 23 | 239 ± 48                             | 1 ± 0              | 1 ± 0 |
| ACB146             | RocR*:I287T | 6 ± 0  | 341 ± 13   | 340 ± 20          | 45 ± 4   | 128 ± 43                             | 1 ± 0              | 1 ± 0 |
| ACB147             | RocR*:L250A | 13 ± 0 | 324 ± 13   | 325 ± 27          | 99 ± 19  | 223 ± 26                             | 2 ± 0              | 1 ± 0 |
| ACB148             | RocR*:279T  | 22 ± 1 | 389 ± 19   | 382 ± 17          | 157 ± 18 | 246 ± 10                             | 1 ± 0              | 2 ± 0 |
| ACB149             | RocR*:K83N  | 33 ± 2 | 355 ± 21   | 364 ± 24          | 239 ± 6  | 255 ± 32                             | 1 ± 1              | 1 ± 0 |
| ACB150             | RocR*:A252P | 56 ± 8 | 341 ± 26   | 308 ± 15          | 248 ± 27 | 198 ± 18                             | 2 ± 0              | 2 ± 0 |
| ACB151             | RocR*:K93E  | 26 ± 4 | 344 ± 14   | 341 ± 17          | 191 ± 10 | 247 ± 20                             | 2 ± 0              | 2 ± 0 |
| ACB152             | RocR*:Q259E | 30 ± 1 | 340 ± 24   | 322 ± 13          | 265 ± 13 | 210 ± 7                              | 2 ± 1              | 2 ± 1 |

<sup>1</sup>Die *rocD-lacZ* Reporterstämme wurden bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub>: 0,8) in SMM in An- und Abwesenheit von 20 mM Arginin (Arg), Ornithin (Orn) bzw. Prolin (Pro) angezogen. Anschließend wurden die Zellen für die LacZ-Enzymmessungen geerntet (4.4.2); [-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] in diesem Ansatz befindet sich kein Ammonium im Medium. Hier diente das zugeführte Prolin (20 mM) sowohl als Induktor, als auch als Stickstoffquelle.

<sup>2</sup>Zusätzlich zu der *rocD-lacZ* Reporterfusion besaßen die Stämme eine Deletion des *sigL*-Gens. Die verwendeten Stämme von oben nach unten: ACB142, ACB155-162 (Tabelle 8).

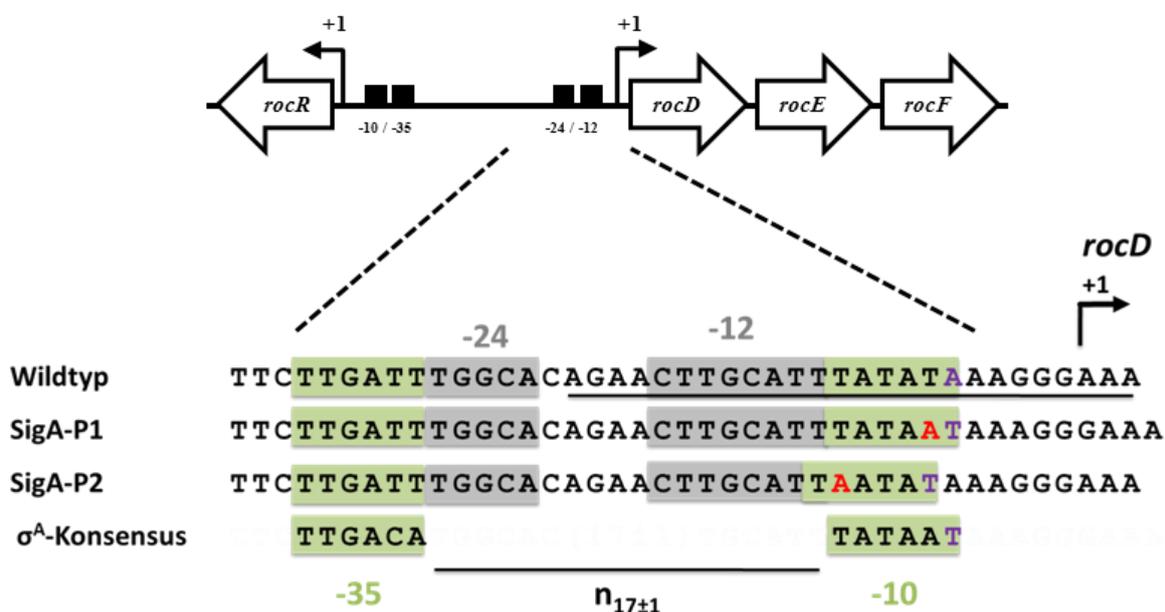
<sup>3</sup>Für jede Probe wurde die LacZ-Aktivität doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mind. zwei unabhängigen Parallelen berechnet (8.5.1).

### 5.1.8 Klasse II: Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors

Das *rocDEF*-Operon wird von dem SigL-abhängigen Promotor ausgehend von der -12/-24 Promotorregion transkribiert (Abb. 16) (54, 67, 68). Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme der Klasse II besitzen Mutationen in der regulatorischen Region von *rocDEF*; in direkter Nachbarschaft zur -12 Region des  $\sigma^L$ -Promotors (Tabelle 4; Abb. 16). Folgende zwei Typen von Promotormutanten wurden isoliert: (SigA-P1) in 5 der isolierten Stämme kam es zu einer Insertion einer A/T Basenpaares 6 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes; (SigA-P2) in 2 der isolierten Stämme wurde 10 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes die T/A Basenpaarung zu einer A/T Basenpaarung umgewandelt (Abb. 16).

Schaut man sich die Promotorregion des *rocDEF*-Operons genau an, so kann man eine mögliche -35 und -10 Promotorregion eines *B. subtilis* typischen SigA-abhängigen Promotors

mit einem spezifischen Abstand von 17 bp erkennen, der mit dem SigL-abhängigen Promotors (-12/-24) überlappt (Abb. 16). Obwohl die mögliche -35, als auch die mögliche -10 Promotorregion eine hohe Ähnlichkeit zur SigA-Konsensus Sequenz von *B. subtilis* aufweisen, so fehlt doch der möglichen -10 Region das für die Funktion von SigA-Promotoren wesentliche T/A-Basenpaar (89). Dies konnte (neben einer Vielzahl anderer Studien) anhand des *yqiHIK* Promotors gezeigt werden, in dem die entscheidende T/A Basenpaarung zu einer G/C Basenpaarung ausgetauscht wurde, was zu einem vollständigen Verlust der Promotoraktivität führte (59).



**Abb. 16: Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors innerhalb der *rocDEF* Promotorregion.**

Sequenzalignment der *rocDEF* Promotorregion des *B. subtilis* Wildtyps und zwei repräsentativer Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten. Die Regionen des SigL-abhängigen Promotors (-12/-24) sind grau hervorgehoben, der Bereich wo AhrC bindet ist unterstrichen und die Regionen des kryptischen/aktiven SigA-abhängigen Promotors (-35/-10) ist grün hinterlegt. Die Konsensus-Sequenz der *B. subtilis* SigA-abhängigen Promotoren mit dem typischen Abstand von  $17\pm 1$  Basenpaaren ist gezeigt. Das „invariante“ T innerhalb der -10 Region ist lila und die Mutationen der Suppressor-Stämme sind rot hervorgehoben.

Die Mutationen innerhalb der *rocDEF* Promotorregion der SigA-P1- und SigA-P2-Suppressor-Mutanten führten zu einer Umformung der möglichen -10 Region, was zur Bildung einer neuen -10 Region mit einem T/A Basenpaar an der entscheidenden Stelle (Abb. 16, lila Buchstabe). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Mutationen nicht in dem direkten Bereich des -24/-12 Promotors fallen und demzufolge dessen Aktivität

nicht stören sollten. Es stellt sich nun die Frage, ob durch die Neugestaltung der möglichen -10 Promotorregion, ein funktionstüchtiger SigA-abhängiger Promotor gebildet wurde, der zusammen mit dem natürlichen SigL-abhängigen Promotor aber auch unabhängig von diesem, die Transkription von *rocDEF* ermöglicht.

Um dies experimentell zu testen, wurden jeweils die SigA-P1 bzw. SigA-P2 Mutationen in die *rocD-lacZ* Reporterfusion integriert und anschließend in das chromosomale *amyE*-Gen des *B. subtilis* Wildtyps eingeführt. In den daraus resultierenden Stämmen ACB137 (*rocD*<sub>SigA-P1</sub>-*lacZ*-Fusion) und ACB138 (*rocD*<sub>SigA-P2</sub>-*lacZ*-Fusion) wurde die Beta-Galaktosidase-Aktivität in SMM in An- und Abwesenheit der Induktoren Arginin oder Ornithin untersucht (Tabelle 6). Es zeigt sich dabei sehr deutlich, dass die Transkription des *rocDEF*-Operons auch in Abwesenheit eines Induktors möglich war. Dies spricht für die Tatsache, dass der kryptische SigA-abhängige Promotor aktiviert wurde und funktionsfähig ist. Außerdem kann man erkennen, dass die Mutationen tatsächlich keinen Einfluss auf die Aktivität des natürlichen SigL-abhängigen Promotors hatten, da die Expression der *rocD-lacZ*-Fusionen weiterhin mit der Zugabe von Ornithin bzw. Arginin induzierbar waren. Dieser letzte Fall ist natürlich nur möglich, wenn der SigL-abhängige Promotor weiterhin intakt ist.

Da nun eindeutig gezeigt werden konnte, dass beide Promotoren aktiv und an der Transkription von *rocDEF* beteiligt sind, galt es nun den Einfluss von RocR und AhrC auf die Promotoraktivität der Klasse II Suppressor-Stämmen zu untersuchen. Hierzu wurde in den *rocD-lacZ* Reporterstämmen ACB137 und ACB138 das *rocR*-Gen bzw. das *ahrC*-Gen deletiert. Tabelle 6 zeigt, dass die Abwesenheit von RocR und AhrC dazu führte, dass die Promotoraktivität nicht mehr mit der Zugabe von Arginin und Ornithin induziert werden konnte. Dessen ungeachtet wurde aber eine kontinuierliche *rocD-lacZ* Expression unter allen getesteten Bedingungen gemessen. In diesem Zusammenhang sollte noch erwähnt werden, dass die AhrC-Bindestelle nicht nur mit der -12 Region des SigL-abhängigen Promotors, sondern ebenso mit dem Ort der Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutationen überlappt (Abb. 16). Da es aber zu keiner Beeinträchtigung der *rocD-lacZ* Expression (ausgelöst durch die SigA-P1 bzw. SigA-P2) kam, haben diese Mutationen keinen Einfluss auf die Bindung und damit die Funktionalität von AhrC.

Daraus lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Die Transkription des *rocDEF*-Operons ist weiterhin abhängig von den Aktivatorproteinen RocR und AhrC und ist außerdem

## ERGEBNISSE

durch den Induktor Ornithin stimulierbar. Aber auch in deren Abwesenheit sorgt der neue  $\sigma^A$ -Promotor für eine konstante Expression der Argininabbau-Gene.

**Tabelle 6: Rolle des aktivierten SigA-abhängigen Promotors und der Einfluss von Prolin auf die Transkription des *rocDEF*-Operons.**

| Stamm <sup>2</sup> | Mutation <sup>3</sup> | Relevanter Genotyp <sup>1</sup> |      |      | Beta-Galaktosidase-Aktivität [U/mg Protein] <sup>4</sup> |          |          |          |                                      |
|--------------------|-----------------------|---------------------------------|------|------|--|----------|----------|----------|--------------------------------------|
|                    |                       | SigL                            | RocR | AhrC | SMM  | Orn      | Arg      | Pro      | Pro [-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] |
| ACB136             | WT                    | +                               | +    | +    | 1 ± 0  | 403 ± 35 | 432 ± 9  | 4 ± 1    | 134 ± 12                             |
| ACB137             | SigA-P1               | +                               | +    | +    | 53 ± 11  | 424 ± 26 | 446 ± 7  | 148 ± 9  | 274 ± 26                             |
| ACB138             | SigA-P2               | +                               | +    | +    | 56 ± 8   | 438 ± 19 | 453 ± 16 | 225 ± 9  | 282 ± 19                             |
| ACB139             | WT                    | +                               | -    | +    | 1 ± 0  | 1 ± 0    | 1 ± 1    | 2 ± 0    | 5 ± 1                                |
| ACB140             | SigA-P1               | +                               | -    | +    | 51 ± 2   | 58 ± 5   | 53 ± 3   | 189 ± 4  | 226 ± 29                             |
| ACB141             | SigA-P2               | +                               | -    | +    | 56 ± 4   | 62 ± 10  | 61 ± 10  | 240 ± 6  | 254 ± 24                             |
| ACB142             | WT                    | -                               | +    | +    | 1 ± 0  | 2 ± 0    | 1 ± 0    | 2 ± 0    | 2 ± 1                                |
| ACB143             | SigA-P1               | -                               | +    | +    | 173 ± 9  | 182 ± 16 | 134 ± 23 | 269 ± 42 | 224 ± 35                             |
| ACB144             | SigA-P2               | -                               | +    | +    | 148 ± 21   | 139 ± 17 | 134 ± 11 | 271 ± 29 | 249 ± 30                             |
| ACB167             | WT                    | +                               | +    | -    | 2 ± 0  | 2 ± 0    | 2 ± 0    | 3 ± 0    | 70 ± 2                               |
| ACB168             | SigA-P1               | +                               | +    | -    | 68 ± 5   | 86 ± 1   | 48 ± 3   | 174 ± 24 | 257 ± 8                              |
| ACB169             | SigA-P2               | +                               | +    | -    | 78 ± 4   | 97 ± 16  | 50 ± 9   | 170 ± 11 | 285 ± 15                             |

<sup>1</sup> +, das entsprechende Gen ist intakt; -, das entsprechende Gen wurde deletiert.

<sup>2</sup> Die *rocD-lacZ* Reporterstämme wurden bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub>: 0,8) in SMM in An- und Abwesenheit von 20 mM Arginin (Arg), Ornithin (Orn) bzw. Prolin (Pro) angezogen. Anschließend wurden die Zellen für die LacZ-Enzymmessungen geerntet (4.4.2); [-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] in diesem Ansatz befindet sich kein Ammonium im Medium. Hier diente das zugeführte Prolin (20 mM) sowohl als Induktor, als auch als Stickstoffquelle.

<sup>3</sup> SigA-P1, Insertion eines A/T Basenpaares; SigA-P2, Umwandlung des T/A Basenpaares zu einem A/T Basenpaar in der Promotorregion des *rocDEF*-Operons.

<sup>4</sup> Für jede Probe wurde die LacZ-Aktivität doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mind. zwei unabhängigen Parallelen berechnet (8.5.1).

Abschließend wurde der Einfluss von SigL auf die Promotoraktivität der Klasse II Suppressor-Stämme untersucht. Hierzu wurden in den *rocD-lacZ* Reportergeräten ACB137 und ACB138 das *sigL*-Gen deletiert und die *rocD-lacZ* Expression in An- und Abwesenheit von Arginin und Ornithin analysiert. Wie erwartet konnte bedingt durch den Verlust von SigL die Zugabe von Arginin und Ornithin die Expression des *rocDEF*-Operons nicht mehr induzieren. Die gemessene Expression stammt demzufolge ausschließlich von der

$\sigma^A$ -Promotoraktivität. Bei dem Vergleich der Stämme ACB137 [SigL<sup>+</sup>] und ACB143 [SigL<sup>-</sup>] fällt auf, dass in Abwesenheit von SigL die Expression der *rocD-lacZ*-Fusion dreimal so hoch war wie in dessen Anwesenheit (Tabelle 6). Dies weist darauf hin, dass das Vorhandensein eines intakten SigL die Aktivität des SigA-Promotors negativ beeinflusst.

Die Daten der *rocD-lacZ* Expression stimmen dabei völlig mit dem zuvor durchgeführten Wachstumsversuch überein, der zeigte dass die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme der Klasse II nach der Deletion von *sigL* auch weiterhin in der Lage waren in Minimalmedium ohne Prolin wachsen zu können (Abb. 14).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung des kryptischen SigA-abhängigen Promotors die Transkription des *rocDEF*-Operons auch in Abwesenheit eines Induktors ermöglicht. Hier wie auch schon im Fall der Klasse I Pro<sup>+</sup> Suppressor-Mutanten kommt es zu einer Erhöhung der Menge an RocD, mit der darauf basierenden Zunahme an  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd in der Zelle. Dieses kann dann von den  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktasen zur Prolinsynthese verwendet werden. Dies erklärt den Pro<sup>+</sup> Phänotyp der Klasse II Suppressor-Mutanten in Minimalmedium ohne Prolin (Abb. 5).

### **5.1.9 Mutationen ermöglichen neues Expressionsmuster des Argininabbau Clusters *rocDEF***

Neben Arginin, Ornithin und Citrullin wirkt Prolin ebenfalls als Induktor für die Transkription des *rocDEF*-Operons (15). Die Induktion durch Prolin unterscheidet sich dabei im Wesentlichen in zwei Punkten von der Induktion durch die anderen Aminosäuren: (i) Prolin ist nur in der Lage die Transkription des *rocDEF*-Operons zu induzieren, wenn sich im Medium kein Ammonium befindet; (ii) selbst in ammoniumfreiem Medium ist die Induktion von Prolin geringer als die Induktion durch Arginin, Ornithin oder Citrullin (67, 68). Misst man die *rocD-lacZ* Expression der Wildtyppromotors, so zeigte sich dieses Expressionsmuster eindeutig (Tabelle 5; Tabelle 6). Untersucht man hingegen die *rocD-lacZ* Expression in den Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämmen der Klasse I und Klasse II, so zeigte sich ein ganz anderes Bild. Überraschenderweise ist Prolin in diesen Stämmen plötzlich auch in Anwesenheit von Ammonium in der Lage *rocDEF* zu induzieren (Tabelle 5; Tabelle 6). Ebenso fällt auf, dass in den Stämmen mit Promotormutationen (SigA-P1 und SigA-P2) die Induktion von Prolin unabhängig von der Anwesenheit von RocR, SigL und AhrC war, da deren Deletion zu keiner signifikanten Änderung der *rocD-lacZ* Expression führte (Tabelle 6).

Dies steht im Gegensatz zur Induktion mit Arginin, die mit Abwesenheit der genannten Proteine auf dem Level vergleichbar ohne Induktion herabsinkt (5.1.8).

### **5.2 Untersuchungen der osmoprotektiven Wirkung prolinhaltiger Peptide in *B. subtilis***

Unter hochosmolaren Bedingungen kommt es in *B. subtilis* zur Akkumulation des kompatiblen Solut, Prolin (131). Prolin kann entweder aus der Umgebung aufgenommen, oder *de novo* synthetisiert werden. Eine weitere Quelle für das kompatible Solut Prolin stellen Peptide dar. Es ist von einigen Mikroorganismen (*Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus casei*, *Oenococcus oeni*) bekannt, dass prolinhaltige Peptide aufgenommen, intrazellulär hydrolysiert werden und das freigesetzte Prolin als osmotische Schutzsubstanz Verwendung findet (5, 121, 152, 196, 211). Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Möglichkeit, dass dieser Prozess ebenfalls für *B. subtilis* zutrifft.

Für die folgenden Untersuchungen zur osmoprotektiven Wirkung prolinhaltiger Peptide in *B. subtilis* wurde der Wildtypstamm JH14115, sowie dessen Derivate verwendet. Dieser Stamm besitzt alle bekannten Peptidaufnahmesysteme (App, Opp, Dpp und DtpT; Abb. 4) und sollte demzufolge in der Lage sein ein breites Spektrum an Peptiden aufzunehmen (39, 112, 130, 148).

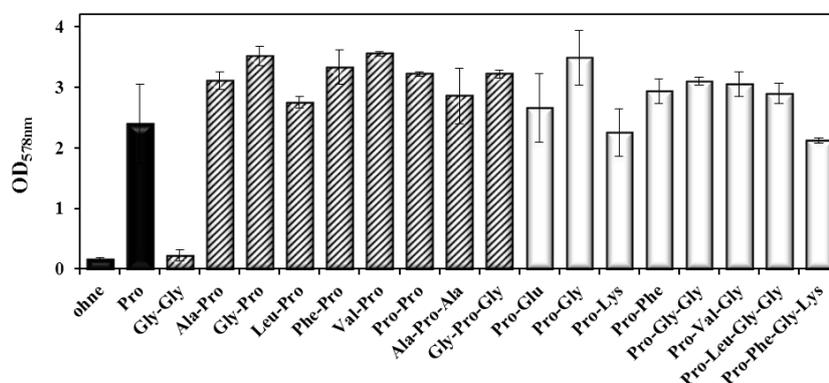
#### **5.2.1 Komplementation der Prolin-Auxotrophie durch die Spaltung prolinhaltiger Peptide**

Prolin ist eine proteinogene Aminosäure und deshalb notwendig für die Synthese von Proteinen. *B. subtilis* kann Prolin für diesen Zweck über die anabole Prolinbiosynthese (ProB-ProA-ProI) herstellen (Abb. 2; 3.3.1). In einem Prolin auxotrophen Stamm, einem Stamm der nicht mehr in der Lage ist Prolin selbst zu synthetisieren muss Prolin von außen zugeführt werden. Dies könnte durch die Zugabe von prolinhaltigen Peptiden erfolgen. Es stellt sich nun die Frage, ob prolinhaltige Peptide von *B. subtilis* genutzt werden können, um den Prolin auxotrophen Phänotyp zu komplementieren. Dies würde die Spaltung der Peptide und der daraus resultierenden Freisetzung von Prolin, voraussetzen.

Das im folgenden Abschnitt beschriebene Experiment zur Untersuchung der Nutzung von prolinhaltigen Peptiden zur Auxotrophie-Komplementation wurde von Marietta Thüring als Teil ihrer Bachelor-Arbeit unter meiner Betreuung durchgeführt (191). Hierzu wurde ein Prolin

auxotropher Stamm hergestellt, in dem das *proBA*-Operon zusammen mit dem *rocD*-Gen deletiert wurde. Nachweislich führt nur die Deletion beider Gene zu einer dichten Prolin Auxotrophie (5.1.4). Anschließend wurde das Wachstum dieses Stammes durch die Zugabe von 16 prolinhaltigen Peptiden untersucht. Es zeigte sich, dass alle getesteten prolinhaltigen Peptide den auxotrophen Phänotyp komplementieren konnten (Abb. 17). Die Zugabe des Peptides Gly-Gly, welches über kein Prolin verfügt, war hingegen nicht in der Lage das Wachstumsdefizit des Stammes ACB73 zu beheben (Abb. 17).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es zu einer Spaltung der prolinhaltigen Peptide kam und dass das freigesetzte Prolin schließlich für die Proteinbiosynthese genutzt werden konnte.



**Abb. 17: Prolinhaltige Peptide ermöglichen Wachstum eines Prolin auxotrophen *B. subtilis* Stammes.**

Wachstum des *B. subtilis* Stammes ACB73 [*proBA*, *rocD*] in SMM in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (1 mM). Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die gestreiften Balken repräsentieren das Wachstum des Stammes durch Zugabe von Xaa-Pro bzw. Xaa-Pro-Xaa Peptiden. Die weissen Balken repräsentieren das Wachstum des Stammes durch Zugabe von Pro-Xaa Peptiden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen ermittelt. Der Graph wurde von Marietta Thüning während ihrer Bachelor-Arbeit angefertigt, aus Zaprasis *et al.* 2013 entnommen und modifiziert (191, 213).

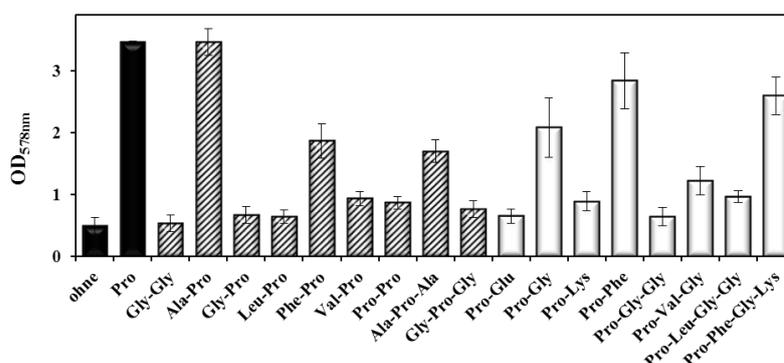
### 5.2.2 Prolinhaltige Peptide besitzen eine osmoprotektive Wirkung auf das Wachstum der *B. subtilis proHJ*-Mutante

Um die osmoprotektive Wirkung von prolinhaltigen Peptiden zu untersuchen, wurde der *proHJ*-Deletionsstamm GWB100 verwendet. Die Deletion des *proHJ* Operons führt zu einem Defekt in der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese (ProJ-ProA-ProH; Abb. 2), was zur Bildung eines osmosensitiven Wachstumsphenotyps führt (29).

Mit diesem Stamm wurde ein Experiment von Guido Wünsche im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt, in dem 16 prolinhaltige Peptide auf deren osmoprotektive Wirkung unter hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) getestet wurden (212). Das

Wachstum der *proHJ* Mutante wurde nach Zugabe der verschiedenen Peptide mit dem Wachstum ohne Peptide photometrisch (OD<sub>578</sub>) nach 20 h verglichen (Abb. 18). Dabei wurde ersichtlich, dass lediglich ein Teil der getesteten Peptide eine osmoprotektive Wirkung besaßen, deren Einfluss auf das Wachstum zudem noch sehr variierte (Abb. 18). Folgende Peptide besaßen gute (+) bis sehr gute (++) osmoprotektive Eigenschaften: Ala-Pro (++) , Phe-Pro (+), Ala-Pro-Ala (+), Pro-Gly (++) , Pro-Phe (++) , Pro-Val-Gly (+) und Pro-Phe-Gly-Lys (++) . Keine osmoprotektiven Eigenschaften konnten bei den folgenden prolinhaltigen Peptiden beobachtet werden: Gly-Pro, Leu-Pro, Pro-Glu, Pro-Lys, Pro-Pro, Val-Pro, Gly-Pro-Gly, Pro-Gly-Gly und Pro-Leu-Gly-Gly. Als Kontrolle wurde ein nicht-prolinhaltiges Peptid (Gly-Gly) verwendet, welches erwartungsgemäß keinen Effekt auf das Wachstum zeigte.

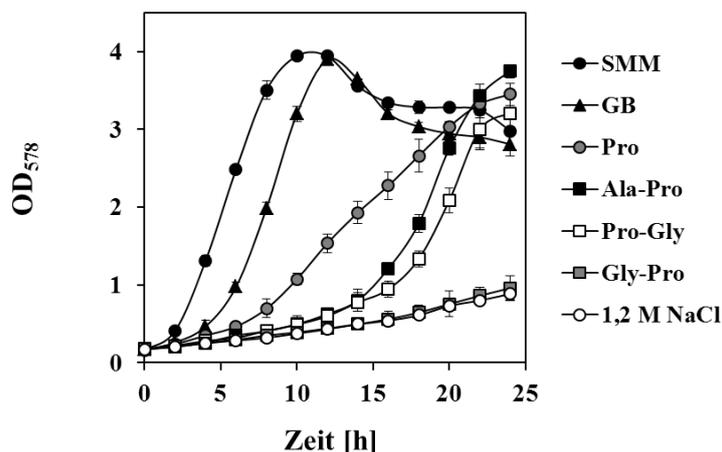
Interessanterweise unterscheiden sich die Peptide Pro-Gly und Gly-Pro ganz erheblich in ihrem Vermögen die Zelle vor starken osmotischen Bedingungen zu schützen, obwohl sie aus den gleichen Aminosäuren, Prolin und Glycin bestehen. Beide Peptide sind zwar in der Lage den Prolin auxotrophen Phänotyp vollständig zu komplementieren (Abb. 17), aber nur Pro-Gly besitzt eine osmotisch protektive Wirkung auf das Wachstum von *B. subtilis* bei hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl; Abb. 18). Aufgrund dieser unterschiedlichen Wirkungsweise wurden beide Dipeptide Pro-Gly und Gly-Pro für weitergehende Untersuchungen ausgewählt; sowie das Dipeptid Ala-Pro, welches den stärksten osmoprotektiven Effekt auf das Wachstum der *proHJ*-Mutante hatte.



**Abb. 18: Die osmoprotektive Wirkung verschiedener prolinhaltiger Peptide auf das Wachstum von *B. subtilis*.**

Wachstum des *B. subtilis* Stammes GWB100 [*proHJ*] in SMM + 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (1 mM). Der Wachstumsertrag wurde nach 20 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die gestreiften Balken repräsentieren das Wachstum des Stammes durch Zugabe von Xaa-Pro bzw. Xaa-Pro-Xaa Peptiden. Die weisen Balken repräsentieren das Wachstum des Stammes durch Zugabe von Pro-Xaa Peptiden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen ermittelt. Der Graph wurde von Guido Wünsche während seiner Master-Arbeit angefertigt, aus Zaprasis *et al.* 2013 entnommen und modifiziert (212, 213).

Zur näheren Charakterisierung des wachstumsfördernden Einflusses der Peptide Ala-Pro, Pro-Gly und Gly-Pro wurde das Wachstum der osmosensitiven *proHJ* Mutante (GWB100) unter verschiedenen physiologischen Bedingungen (SMM, SMM + 1,2 M NaCl) in An- und Abwesenheit verschiedener Zusätze (Prolin, Glycin Betain, Ala-Pro, Pro-Gly und Gly-Pro) analysiert. Das Wachstum wurde alle 2 Stunden photometrisch ( $OD_{578}$ ) bestimmt (Abb. 19).



**Abb. 19: Einfluss prolinhaltiger Peptide auf das Wachstum der *proHJ*-Mutante GWB100 unter hochosmolaren Bedingungen.**

Wachstum des *B. subtilis* Stammes GWB100 [*proHJ*] in SMM oder SMM mit 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (Konzentration: 1 mM). Die  $OD_{578}$  wurde alle 2 Stunden photometrisch bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

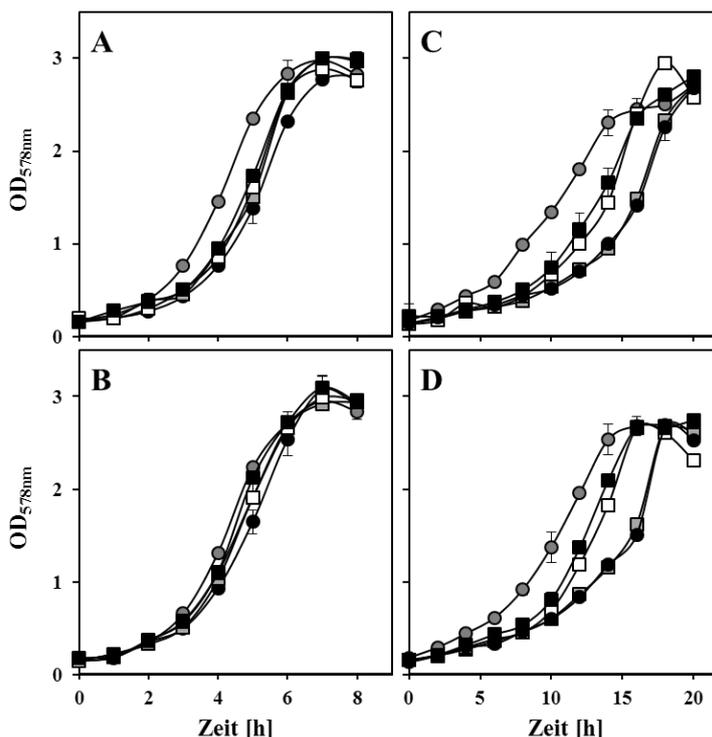
Es zeigte sich, dass die Deletion des *proHJ*-Operons keinen Einfluss auf das Wachstum unter isoosmolaren Bedingungen hatte, da GWB100 ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigte (29). Dies ändert sich jedoch dramatisch durch die Zugabe von 1,2 M NaCl. *B. subtilis* schützt sich gegen hohe Osmolaritäten durch die Akkumulation von kompatiblen Soluten, wie Prolin oder Glycin Betain (151). Durch den Defekt in der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese konnte das kompatible Solut Prolin nicht mehr in ausreichender Menge synthetisiert werden und es kam zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Wachstums (Abb. 19) (29). Dieser Phänotyp konnte durch die Zugabe von Glycin Betain jedoch im Wesentlichen aufgehoben werden, da im Vergleich zum Wachstum in isoosmolarem Medium der Eintritt in die stationäre Phase lediglich um 2 Stunden verzögert war. Dies verwundert nicht, da Glycin Betain für *B. subtilis* eines der besten Osmoprotektiva darstellt (23). Externes Prolin hingegen, ist ein wesentlich schlechteres Osmoprotektivum, da trotz dessen Zugabe der Stamm GWB100 keine echte exponentielle Wachstumsphase besitzt (Abb. 19). Es konnte

lediglich ein lineares Wachstum beobachtet werden, weshalb die stationäre Phase auch erst nach einem Zeitraum von ca. 22 Stunden erreicht wurde. Die zugegebenen osmoprotektiven Peptide hingegen führten zu einem exponentiellen Wachstumsanstieg. Wie schon Anhand der Messungen der Wachstumserträge nach einer Inkubation von 20 h (212), zeigt sich auch in dieser Wachstumskurve, dass das Peptid Gly-Pro nicht in der Lage ist den durch die Deletion des *proHJ*-Operons hervorgerufenen Wachstumsdefizits zu beheben.

### 5.2.3 Untersuchungen zur Verstoffwechslung prolinhaltiger Peptide

Das Wachstum von *E. coli* unter hochosmolaren Bedingung wird durch die Zugabe von Pepton (Komplexmedium, welches hauptsächlich aus verschiedensten Peptiden besteht) signifikant verbessert (4). Die Osmoprotektion wird dabei aber nicht durch die Aufnahme und Akkumulation von kompatiblen Soluten aus dem Pepton erreicht, sondern die Peptide innerhalb des Peptons werden als zusätzliche Nährstoffquelle verstoffwechselt (4). Es stellt sich nun die Frage, ob die Osmoprotektion, welche durch die Zugabe von prolinhaltigen Peptiden zu beobachten war (Abb. 19), ebenfalls auf die Verstoffwechslung der Peptide zurückzuführen ist. Dazu wurde das Wachstum des Stammes JH14115 mit dem *putBCP*-Deletionsstamm ACB221 verglichen. *B. subtilis* ist in der Lage Prolin mittels des PutBCP-Systems, sowohl über die Prolinpermease PutP aufzunehmen, als auch vollständig in zwei enzymatisch gekoppelten Reaktionen zu Glutamat abzubauen (Abb. 3) (139). Der Abbau wird dabei durch die beiden Enzyme PutB und PutC katalysiert. Wird das komplette *putBCP*-Operons deletiert, so ist *B. subtilis* nicht mehr in der Lage Prolin zu verwerten (139). Das Wachstum der Stämme JH14115 und ACB221 wurden dazu ohne osmotische Stressbedingungen, als auch unter hochosmolaren Bedingungen in An- und Abwesenheit von Prolin, Ala-Pro, Pro-Gly oder Gly-Pro analysiert.

In Minimalmedium ohne die Zugabe von Salz zeigte sich, dass die zugegebenen Peptide keinen positiven Effekt auf das Wachstum der getesteten Stämme haben (Abb. 20A und Abb. 20B). Einzig Prolin führte im Stamm mit intaktem Prolinabbau-System zu einer leichten Verbesserung des Wachstums. Demzufolge konnte dieser Stamm zusätzlich zu der Glukose und dem Ammonium im Medium Prolin als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle nutzen. Unter hyperosmotischen Bedingungen konnte in beiden Stämmen ein beinahe identisches Wachstum beobachtet werden, da beide osmoprotektiven Peptide und Prolin unabhängig vom PutBCP-System einen positiven Effekt auf das Wachstum der Stämme hatten (Abb. 20C und Abb. 20D).



**Abb. 20: Einfluss der *putBCP* Deletion auf das Wachstum von *B. subtilis* in der Anwesenheit prolinhaltiger Peptide.**

Wachstum der *B. subtilis* Stämme JH14115 (A, C) und ACB221 [*putBCP*] (B, D) in SMM (A, B) oder SMM + 1,2 M NaCl (C, D) in Anwesenheit von Prolin (●), den prolinhaltigen Peptiden Ala-Pro (■), Pro-Gly (□), Gly-Pro (▣), oder in Abwesenheit von Zusätzen (○). Die Konzentration der zugeführten Zusätze betrug 1 mM. Die OD<sub>578</sub> wurde jede Stunde (SMM) bzw. alle 2 Stunden (1,2 M NaCl) photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Peptide nicht generell, sondern nur unter hochosmolaren Bedingungen das Wachstum von *B. subtilis* stimulieren. Außerdem konnte eine Nutzung prolinhaltiger Peptide als Nährstoff zur Verbesserung des Wachstums bei hohen Salinitäten ausgeschlossen werden.

#### 5.2.4 Die Spaltung prolinhaltiger Peptide führt zur Akkumulation der osmotischen Schutzsubstanz Prolin

Wie in dem vorangegangenen Experiment gezeigt werden konnte, kommt es nicht durch die Verstoffwechslung der Peptide zu einer Verbesserung des Wachstums von *B. subtilis* unter hyperosmolaren Bedingungen. Der beobachtete osmoprotektive Effekt der Peptide kann sich aber durch folgende Hypothese erklären lassen. Durch die Spaltung der Prolylpeptide könnte es in der Zelle zu einer Akkumulation des freigesetzten Prolins als osmotische Schutzsubstanz kommen. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass prolinhaltige Peptide

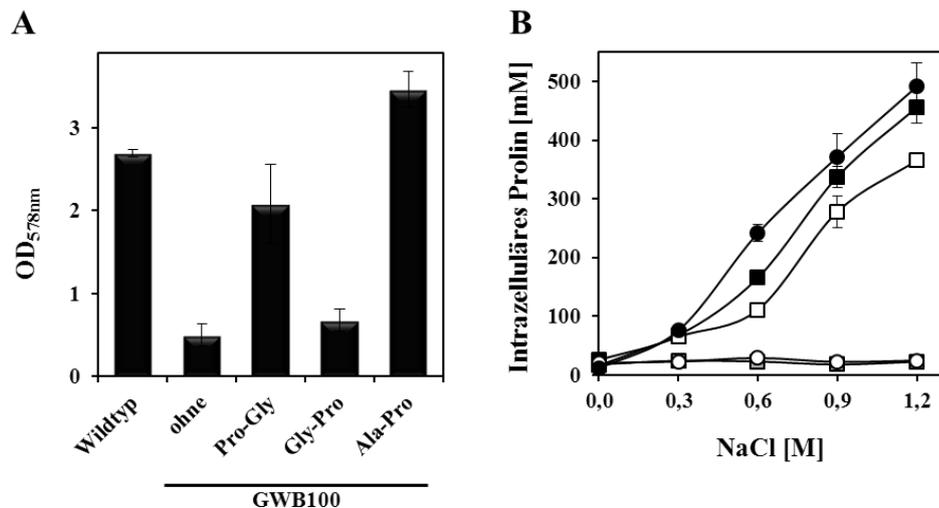
in der Lage sind das beeinträchtigte Wachstum eines Prolin auxotrophen *B. subtilis* Stammes in Minimalmedium durch deren Zugabe positiv zu beeinflussen (Abb. 17) (191, 213). Für diese Art der Komplementation ist die Spaltung der Peptide und der dadurch bedingten Freisetzung von Prolin, absolut notwendig.

Um zu testen, ob es zu einer Akkumulation von Prolin in der Zelle kommt, wurde der intrazelluläre Prolinpool des Wildtyps mit dem der *proHJ*-Mutante GWB100, in Abhängigkeit der osmoprotektiven Peptide Ala-Pro und Pro-Gly, sowie des nicht osmoprotektiven Peptids Gly-Pro bei verschiedenen Salzkonzentrationen verglichen. Für dieses Experiment war es essentiell einen Stamm zu verwenden (GWB100), der selbst nicht mehr in der Lage ist Prolin unter hochosmolaren Bedingungen zu synthetisieren (29). Dadurch kann eindeutig unterschieden werden, ob der gemessene intrazelluläre Prolinpool von der Zelle selbst, oder durch die Spaltung der prolinhaltigen Peptide generiert wurde.

Erwartungsgemäß war die *proHJ*-Mutante nicht in der Lage Prolin in hohen Konzentrationen zu synthetisieren (Abb. 21B). Unabhängig der Salzkonzentration im Medium konnten nur 20 mM an Prolin gemessen werden. Diese Menge ist dabei mit der Menge an freiem Prolin im Zytoplasma nicht-gestresster *B. subtilis* Zellen vergleichbar (204). Führt man der *proHJ*-Mutante nun die osmoprotektiven Peptide Ala-Pro und Pro-Gly zu, so kam es in den Zellen zu einem Aufbau des intrazellulären Prolinpools (Abb. 21B). Bei Zugabe des nicht-protpektiven Peptides Gly-Pro was dies hingegen nicht der Fall.

Die prolinhaltigen Peptide werden demzufolge gespalten und das freie Prolin wird von den Zellen zum Aufbau ihres intrazellulären Prolinpools verwendet. Die Menge an akkumuliertem Prolin, stieg dabei proportional zur steigenden externen Salzkonzentration an (Abb. 21B). Dieses Muster ließ sich ebenfalls bei dem *B. subtilis* Wildtypstamm JH14115 beobachten, welcher über einen intakten osmotisch regulierten Prolin-Biosyntheseweg (ProJ-ProA-ProH; Abb. 2) verfügt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *B. subtilis* durch die Hydrolyse osmoprotektiver prolinhaltiger Peptide in der Lage ist, einen der externen Salzkonzentration entsprechenden Prolinpool zu erzeugen. Außerdem fällt auf, dass das verbesserte Wachstum der Zellen in hochosmolarem Medium, mit der Menge an gemessenem intrazellulärem Prolinpool korreliert (Abb. 21A und Abb. 21B).



**Abb. 21: Das Wachstum und der intrazelluläre Prolinpool osmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen in der Anwesenheit prolinhaltiger Peptide.**

(A) Der Wildtypstamm JH14115 und die *proHJ*-Mutante GWB100 wurden in SMM + 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen prolinhaltigen Peptide inkubiert. Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. (B) Der Stamm GWB100 [*proHJ*] wurde bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,8 – 2 in SMM mit den angegebenen NaCl-Konzentration in Anwesenheit der prolinhaltigen Peptide Ala-Pro (■), Pro-Gly (□), Gly-Pro (▣), oder in deren Abwesenheit (○) angezogen. Die Konzentration der zugeführten Zusätze betrug 1 mM. Der Stamm JH14115 (●) diente als Kontrolle für die Menge an Prolin, welche durch die *de novo* Prolinbiosynthese bei den verschiedenen Osmolaritäten synthetisiert wurde. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (4.4.1) (14). Für jede Probe wurde die Prolinkonzentration doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

### 5.2.5 *In silico* Identifizierung möglicher Prolin Iminopeptidasen in *B. subtilis*

Welche Peptidasen sind an der Hydrolyse der prolinhaltigen Peptide beteiligt? Durch die Verwendung von *SubtiWiki* mit anschließender BLAST-Recherche konnten zwei mögliche Peptidasen gefunden werden: YclE und YbaC (3). Diese Proteine wurden mit Hilfe von MEROPS, einer Datenbank zur Klassifizierung proteolytischer Enzyme weiter charakterisiert (156). Beide Enzyme gehören der Peptidasefamilie S33 an. Diese besteht aus Prolyl-Amino-Peptidasen, auch bekannt als Prolin Iminopeptidasen, die in der Lage sind, N-terminales Prolin (nicht ausschließlich) freizusetzen (BRENDA: EC 3.4.11.5; (165)).

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| XPI P | MRTLYPEI TPYQQGSLKVDDRHTLYFEQCGNPHGKPVVMLHGGPGGGNCNDKMRRFHDP           | 60  |
| Ycl E | -----MERAGI CHSDGFDLAYRI EG - EGAPI LVI G - - SAVYYPRLFSSDI KQK        | 45  |
| YbaC  | M PEKCSI AI MKELSI GNTKQMLM NGVDVKNPLLLFLHGGPGTPQI GYVRHYQKELEQY       | 60  |
| *     |  |     |
| XPI P | YRI VLF DQRGS - - - - - GRSTPHADLVDNTTWDLVADI ERLRTHLGVDRWQVFCGS       | 115 |
| Ycl E | YQWVFDHRGF - - - - - AKPKRELRAEDSRLDAVLADI ERMRTFLQLEDVTI LGHS         | 100 |
| YbaC  | FTV VHW DQRGSLSYSKRI SHHSMTI NHFI KDTI QVTQWLLAHFSKSKLYLAGHS           | 120 |
| *     |  |     |
| XPI P | ALAYAQTHPQQVTELVLR - - - - - GILLRRFELEWFYQEGASRLFPDA - - WEHYLNAI     | 168 |
| Ycl E | ALEYARTYPKQVRKVALFNTAPDNSEERQRKSESFFMETASLERKKR - - FEKDIENLP          | 158 |
| YbaC  | ALHVLQORPDLFYTYGI SQVVPQDEESTAYQHI REI SESKKASILSFLTRFI GAPPWK         | 180 |
| *     |  |     |
| XPI P | VERADLM5AFHRRLTSD - - DEATRLAAAKAWSVWEGATSF LHVDEDFVTGHEDAHFALAF       | 226 |
| Ycl E | IDKDPERR - FVHMCI RAE - AKSFYQERPHAAALWDGVFTNMPI I DELWG - - - - - NTF | 208 |
| YbaC  | QDI QHLI YRF CVELTRGGFTHRHRQSLAVLFQMLTGNEYGVRNMHSFLNG - - - - - LRF    | 233 |
| *     |  |     |
| XPI P | ARI ENHYFVNGGFFEVEDQLLRDAHRI ADI PGVI VHGRYDVVCP LQ - SAWDLHK - AWPKA  | 284 |
| Ycl E | ARI D - - - - - LLQRLADVR - MPVYI GLGRYDYL VAPV - SLWDAVDGLYPHV        | 251 |
| YbaC  | SKKHLTDELYR - - - - - FNAFTSVPSI K - VPCVFI SGKHDLI VPAEISKQYYQELEAPEK | 286 |
| *     |  |     |
| XPI P | QLQI SPASGHS AF - - EPE NVDALVRATDGF A -                               | 313 |
| Ycl E | DKVI FEKSGHQPML EEP EAFDQSF RKWLDQ - -                                 | 281 |
| YbaC  | RWFQFENSAHTPHI EEP SLFANTLSRHARHHL                                     | 318 |

**Abb. 22: Sequenzalignment der möglichen Peptidasen YclE und YbaC aus *B. subtilis* mit der Imino-peptidase XPIP aus *X. campestris*.**

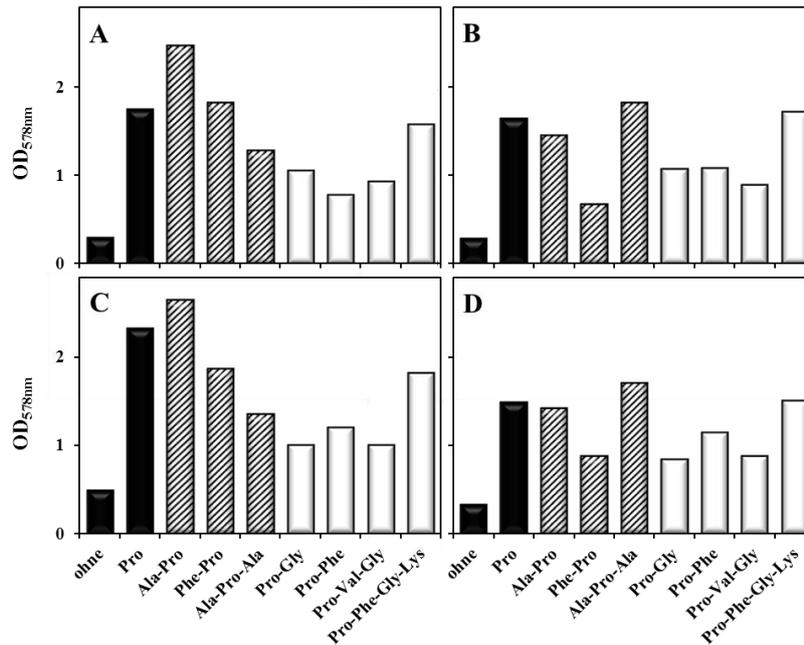
Es wurde ein Sequenzalignment von XPIP aus *Xanthomonas campestris* pv. *citri* sowie den beiden möglichen Peptidasen YclE und YbaC aus *Bacillus subtilis* erstellt. Konservierte Aminosäuren die in allen der untersuchten Sequenzen zu finden sind, wurden schwarz unterlegt. Aminosäuren die sowohl in YclE als auch in YbaC zu finden sind wurden grau unterlegt. Die katalytischen Aminosäuren wurden mit einem \* markiert.

Vergleicht man die Sequenzen von YbaC und YclE, so zeigt sich das beide Enzyme eine Sequenzähnlichkeit von 32 % zueinander haben. YbaC weist darüber hinaus eine Sequenzähnlichkeit von 34 % zu der Imino-peptidase XPIP von *Xanthomonas campestris* (pdb: 1AZW) auf. YclE ist sogar zu 38 % ähnlich zu XPIP. Diese Peptidase gehört laut MEROPS ebenfalls der Peptidasefamilie S33 an (156). Die für diese Gruppe von Peptidasen typischen katalytischen Aminosäuren (S110, D266, C269, H294) konnten im aktiven Zentrum von XPIP lokalisiert werden (132), und sind ebenfalls in YbaC und auch in YclE aus *B. subtilis* zu finden (Abb. 22). Dies lässt einen ähnlichen katalytischen Mechanismus beider Proteine vermuten, der mit dem von XPIP aus *Xanthomonas campestris* vergleichbar ist.

## 5.2.6 YbaC und YclE sind nicht an der Spaltung prolinhaltiger Peptide beteiligt

Im Folgenden wurde untersucht, ob die mutmaßlichen Peptidasen YbaC und YclE an der Spaltung prolinhaltiger Peptide unter hochosmolaren Bedingungen beteiligt sind. Hierzu wurde der Einfluss von *ybaC*- und *yclE*-Deletionen auf das Wachstum und demzufolge auf

das osmoprotektive Potential prolinhaltiger Peptide getestet. Vergleicht man das Wachstum der *proHJ*-Mutante (GWB100) mit ihren Derivaten ACB121 [*yclE*, *proHJ*], ACB125 [*ybaC*, *proHJ*] und ACB123 [*yclE*, *ybaC*, *proHJ*], so zeigte sich das weder die Deletion der einzelnen Gene *ybaC* oder *yclE*, noch deren Kombination einen Einfluss auf das Wachstum der Stämme hatte (Abb. 23). Ganz im Gegenteil, in allen Stämmen führte die Zugabe von Prolin bzw. prolinhaltigen Peptiden zu einer Osmoprotektion.



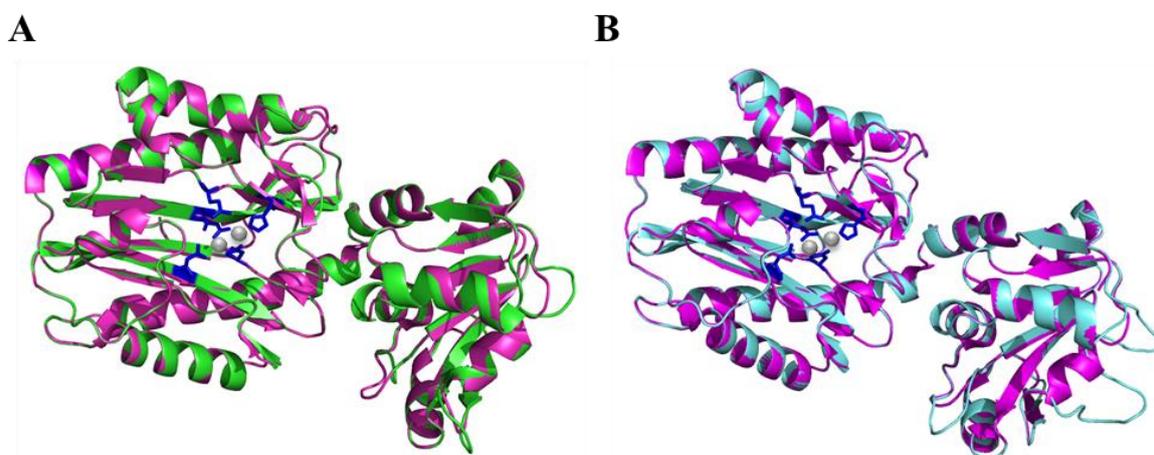
**Abb. 23: Der Einfluss der Deletion von *yclE* und *ybaC* auf das Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen in Anwesenheit osmoprotektiver Peptide.**

Wachstum der *B. subtilis* Stämme (A) GWB100 [*proHJ*], (B) ACB121 [*yclE*, *proHJ*], (C) ACB125 [*ybaC*, *proHJ*] und (D) ACB123 [*yclE*, *ybaC*, *proHJ*] in SMM + 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (1 mM). Der Wachstumsertrag wurde nach 20 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Wachstumsexperiment, dessen Daten in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden konnte.

Die verwendeten Peptide waren demzufolge trotz des Verlustes von YbaC und YclE weiterhin in der Lage das Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen zu verbessern. Dies legt den Schluss nahe, dass weder YbaC, noch YclE an der Spaltung der getesteten Prolylpeptide beteiligt sind. Die Funktionen beider Proteine konnte mit diesem experimentellen Ansatz nicht aufgeklärt werden.

### 5.2.7 *In silico* Identifizierung möglicher Prolin Amino-Peptidasen in *B. subtilis*

Da sowohl YbaC, als auch YclE nicht an der Hydrolyse prolinhaltiger Peptide beteiligt sind, wurde die Suche nach möglichen Peptidasen weiter intensiviert und führte zu zwei weiteren möglichen Kandidaten: YqhT und YkvY. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen beider Proteine, so zeigt sich, dass sie eine hohe Sequenzidentität von 35 % zueinander aufweisen. Beide Enzyme konnten mittels MEROPS der Peptidasefamilie M24B zugeordnet werden (156).



**Abb. 24:** *In silico* Modell der Peptidasen YqhT und YkvY aus *B. subtilis*.

Überlagerung der Kristallstruktur eines Monomers der Prolidase PepQ aus *P. furiosus* (rosa) mit durch das Programm SWISS-Model erstellten Modellen der Proteine (A) YqhT (grün) und (B) YkvY (türkis). Die an der Metallbindung beteiligten Aminosäuren sind in blau gekennzeichnet. Die im Aktiven Zentrum befindlichen beiden Metallionen sind als graue Kugeln dargestellt.

Die M24 Peptidasefamilie besteht aus zwei Untergruppen: (i) M24A, Xaa-Pro Dipeptidasen (Prolidasen) sind sowohl in der Lage Xaa-Pro Dipeptide, als auch Aminoacyl-Hydroxyprolin-Analoga zu hydrolysieren, können aber Pro-Pro Peptide nicht spalten (BRENDA: EC 3.4.13.9) (165). (ii) M24B, Xaa-Pro Amino-Peptidasen (Prolin Amino-Peptidasen) sind hingegen in der Lage Pro-Pro Peptide zu spalten und können außerdem jede N-terminale Aminosäure, die mit einem Prolin verbunden ist freisetzen (BRENDA: EC 3.4.11.9) (165). Dabei können sowohl Di- aber auch Tri-Peptide als Substrat verwendet werden. Alle Mitglieder der M24 Familie sind Metallopeptidasen, deren Aktive Zentren über zwei Metallionen verfügen (125).

Durch die Verwendung des internetbasierten Programms SWISS-Model wurden die Proteine YqhT und YkvY mit strukturell ähnlichen Proteinen verglichen (Abb. 24) (7). Es

## ERGEBNISSE

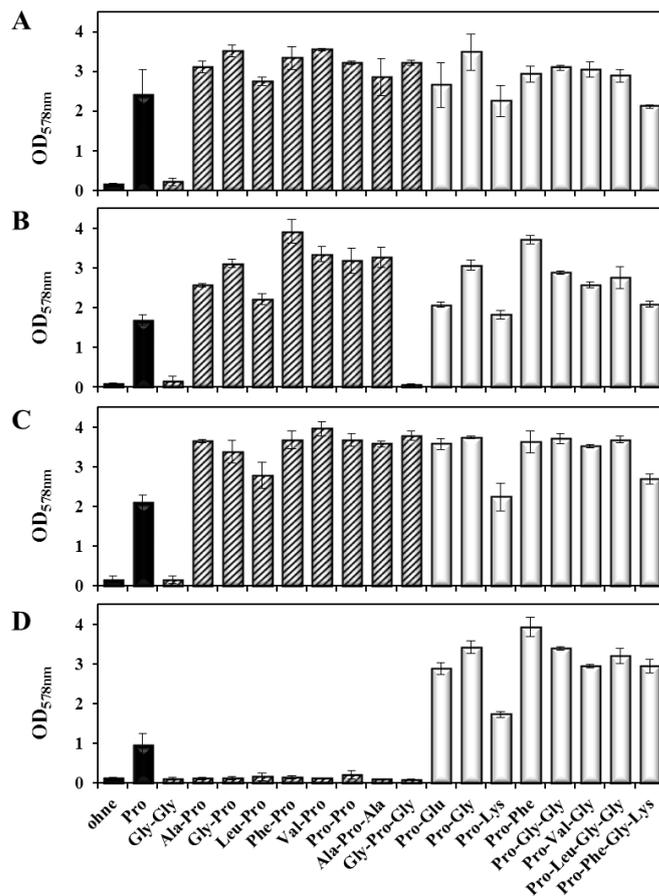
zeigt sich, dass die beiden Proteine eine hohe strukturelle Verwandtschaft zu der Peptidase PepQ aus *Pyrococcus furiosus* (pdb: 1PV9) besitzen. Diese strukturelle Ähnlichkeit konnte durch ein Alignment der Aminosäuresequenzen untermauert werden, da YqhT zu 41 % und YkvY zu 36 % identisch zu PepQ sind. PepQ ist ebenfalls ein Vertreter der Peptidase Familie M24, aber im Gegensatz zu YqhT und YkvY gehört PepQ zu der Untergruppe M24A, den Prolidasen (156).

|             |  |
|-------------|--|
| PepQ        | MKERLEKLVKFDENSI DRVFI AKPVNVYFSGT SPLGGG- - - YI I VDGDEATLYVPEL 56                 |
| PapA( YqhT) | -- MKLEKLRNLF GQLGI DGMLI TSNVRYMTGFTGSAG- - - - LAVI SGDKAAFI TDFR 53               |
| PapB( YkvY) | - MNRI QRVSSWLKEAGHTAAFI HTKENVYFYLTFYTEPHERLMGLFI FQEEEPFVCPGM 59                   |
| PepQ        | EYEMAK- - - - EESKLPVVKFKKFDEIYEI LKNTETLGE- - - - - TLSYSWMENFKEK 105               |
| PapA( YqhT) | YTECAK- - - - VQVKGFEI I EHGGLI QTTADTVE SFG KRLGFEQNSMTYGTYSYSAV 108                |
| PapB( YkvY) | EAGCARNAGWNHEI I GYADHENPWELI EKALK- KRNI S I HMLAVEKDSI SLSRAEQLKHA 118             |
| PepQ        | SNVKEFKKI DDVI KDLRI I KTKEE I E I EKACEI ADKAVMAAI EEI TECKREREVAAKVE 165           |
| PapA( YqhT) | I SDAELVPVAESVEKLRLLI KSSEEI KI LEEAAKI ADDAFRHI LTFMKPGI SEI AVANELE 168            |
| PapB( YkvY) | TGGAQFVSAEETLNQFRLLI KDDNEI RLLKEAAKLADYGVEVGTAAALREGI SEVEVLAQI E 178               |
| PepQ        | YLMKMGAEKPAFDTI I ASGHRSA LPHGVASDKRI ERGDLVVI DLGALYNHYNSDI TRTI 225                |
| PapA( YqhT) | FYMRSQGADSSSFDI VASGLRSSLP HGVASDKLI ESGDLVTLDFGAYYKGYCSDI TRTV 228                  |
| PapB( YkvY) | YELKKKGI QGVFSTMLFGEKSGQPHGNPGTATLKKGDFVLFDLGVI LDGYCSDI TRTF 238                    |
| PepQ        | VVGSPNEKQREIYEI VLEAQKRAVEAAKPGMTAKELDSI AREI I KEYGYGDYFI I SLGHG 285               |
| PapA( YqhT) | AVGOPSDQLKEI YQVVFDAQALGVAHI KPGMTGKEADALTRDHI AAKGYGDYFGHSTGHG 288                  |
| PapB( YkvY) | AYKTI NPKQEA I YETVLQAEKAAI EASKPGVRI GDLDTARGI I EKAGYGDYFPHRLGHG 298               |
| PepQ        | VGLEI HEVPRI SQYDETVLKEGM I I EPGI YI I PKLGGVRI EDTVLI I ENGAKRL I KTER 345         |
| PapA( YqhT) | LGMEVHESPLGSVRSSAI LEPGMV I I EPGI YI I PETGGVRI EDDI VI I ENGNRTI I HSPK 348        |
| PapB( YkvY) | LG I SVHEYPS I SQANDTLL I QEGMY I I EPGI YVPEI I GGVRI EDDVHVI I KDGAVALT I QYPK 358 |
| PepQ        | ELL- - 348   |
| PapA( YqhT) | ELI I L 353  |
| PapB( YkvY) | DLI I L 363  |

**Abb. 25: Sequenzalignment der Peptidasen PapA (YqhT) und PapB (YkvY) aus *B. subtilis* mit der Peptidase PepQ aus *P. furiosus*.**

Es wurde ein Sequenzalignment von PepQ aus *Pyrococcus furiosus* sowie den beiden Peptidasen PapA (YqhT) und PapB (YkvY) aus *Bacillus subtilis* erstellt. Konservierte Aminosäuren die in allen der untersuchten Sequenzen zu finden sind, wurden schwarz unterlegt. Aminosäuren die sowohl in PapA als auch in PapB zu finden sind wurden grau unterlegt. Aminosäuren die an der Metallbindung beteiligt sind, wurden mit einem \* markiert.

Anhand der Kristallstruktur von PepQ konnten die an der Metallbindung von Co(II) beteiligten Aminosäuren identifiziert werden: D209, D220, H284, E313 und E327 (128) (Abb. 24). Diese Aminosäuren sind sowohl in YqhT als auch in YkvY aus *B. subtilis* hoch konserviert (Abb. 25). Dies legt den Schluss nahe, dass YqhT und YkvY ebenfalls Metallopeptidasen sind.



**Abb. 26: Die Peptidasen PapA und PapB sind an der Spaltung von Xaa-Pro und Xaa-Pro-Xaa Peptiden beteiligt.**

Wachstum der *B. subtilis* Stämme ACB73 [*proBA*, *rocD*] (A), ACB108 [*proBA*, *rocD*, *papA*] (B), ACB109 [*proBA*, *rocD*, *papB*] (C) und ACB97 [*proBA*, *rocD*, *papA*, *papB*] (D) in SMM in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (1 mM). Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. Die gestreiften Balken repräsentieren das Wachstum des Stammes durch Zugabe von Xaa-Pro bzw. Xaa-Pro-Xaa Peptiden. Die weißen Balken repräsentieren das Wachstum des Stammes durch Zugabe von Pro-Xaa Peptiden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen ermittelt. Die Graphen wurde von Marietta Thüring während ihrer Bachelor-Arbeit angefertigt, aus Zaprasis *et al.* 2013 entnommen und modifiziert (191, 213)

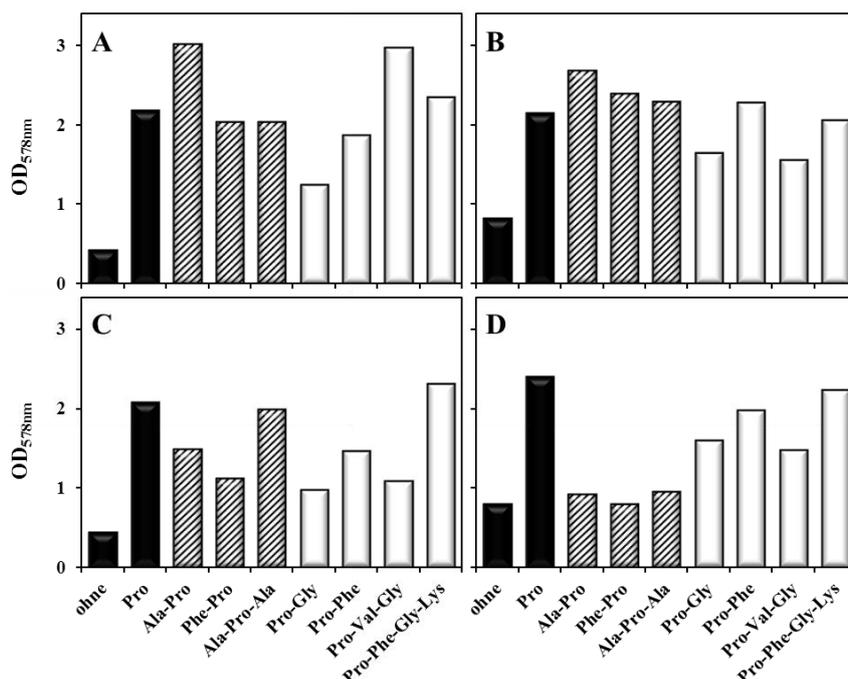
Die von der MEROPS Datenbank vorgeschlagenen Klassifizierung der Peptidasen YqHT und YkvY als Prolin Amino-Peptidasen (M24B-Familie) konnte mittels eines Wachstumsversuches unter Verwendung eines Prolin-auxotrophen Stammes bestätigt werden. Dieses Experiment, sowie die dafür notwendigen Stamm-Konstruktionen wurden von Marietta Thüring als Teil ihrer Bachelor-Arbeit unter meiner Betreuung durchgeführt (191). Hierzu wurde jeweils das Gen *yqht* und *ykvY* oder beide Gene zusammen in einem Prolin auxotrophen Stamm deletiert. Es entstanden folgende Deletions-Stämme: ACB108 [*proBA*, *rocD*, *papA*], ACB109 [*proBA*, *rocD*, *papB*], ACB97 [*proBA*, *rocD*, *papA*, *papB*]. Unter

Verwendung dieser Stämme wurden Wachstumsexperimente in An- und Abwesenheit von prolinhaltigen Peptiden durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Peptidasen ein überlappendes Substratspektrum besaßen, da die Einzelmutationen keinen Einfluss auf den Wachstumsphänotyp des auxotrophen *B. subtilis*-Stammes hatten (Abb. 26). Dies ändert sich hingegen, deletiert man beide Peptidasen gemeinsam. Alle Xaa-Pro, sowie die Xaa-Pro-Xaa Peptide waren nun nicht mehr in der Lage den Phänotyp zu komplementieren. Es zeigten sich aber auch Unterschiede im Substratspektrum beider Peptidasen, da ausschließlich YqhT in der Lage ist Pro-Gly-Pro zu hydrolysieren, YkvY hingegen nicht (Abb. 26). Die Deletion beider Peptidasen hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die getesteten Pro-Xaa Peptide (Abb. 26).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Peptidasen (YqhT, YkvY) ein überlappendes Substratspektrum besitzen und sowohl in der Lage sind N-ständiges Prolin freizusetzen, als auch Pro-Pro Peptide zu hydrolysieren (Abb. 26). Ebenso konnten die getesteten Tri-Peptide Ala-Pro-Ala und Gly-Pro-Gly gespalten werden, wobei sich Unterschiede im Substratspektrum beider Peptidasen offenbarten. Dies führte zu dem Vorschlag der Umbenennung der Peptidasen YqhT in PapA und YkvY zu PapB. Pap ist in diesem Fall das Akronym für Prolin Amino-Peptidase.

### **5.2.8 Die Rolle der Prolin Amino-Peptidasen PapA und PapB im Schutz vor Hyperosmolarität**

Die beiden Prolin Amino-Peptidasen PapA (YqhT) und PapB (YkvY) sind an der Spaltung prolinhaltiger Peptide unter isoosmolaren Bedingungen beteiligt (191). Es stellt sich nun die Frage, ob dies auch unter hyperosmolaren Bedingungen zutrifft. Hierzu wurde der Einfluss von *papA*- und *papB*-Deletionen auf das Wachstum einer *proHJ*-Mutante in Anwesenheit verschiedener osmoprotektiver Peptide getestet. Es zeigte sich, dass die Deletion von nur einer Peptidase keinen Effekt auf das Wachstum hatte (Abb. 27). Untersucht man hingegen die *papA/papB*-Doppelmutante ACB118, so zeigt sich ein ähnliches Bild wie unter isoosmotischen Wachstumsbedingungen (191). Auch bei hohen Salzkonzentrationen kam es trotz Anwesenheit der Peptide Ala-Pro, Phe-Pro und Ala-Pro-Ala zu einem schwächeren Wachstum (vergleichbar mit dem Wachstum ohne Zusätze; Abb. 27D). Erwartungsgemäß beeinflusste das Fehlen von PapA und PapB hingegen nicht das verbesserte Wachstum der Pro-Xaa Peptide.



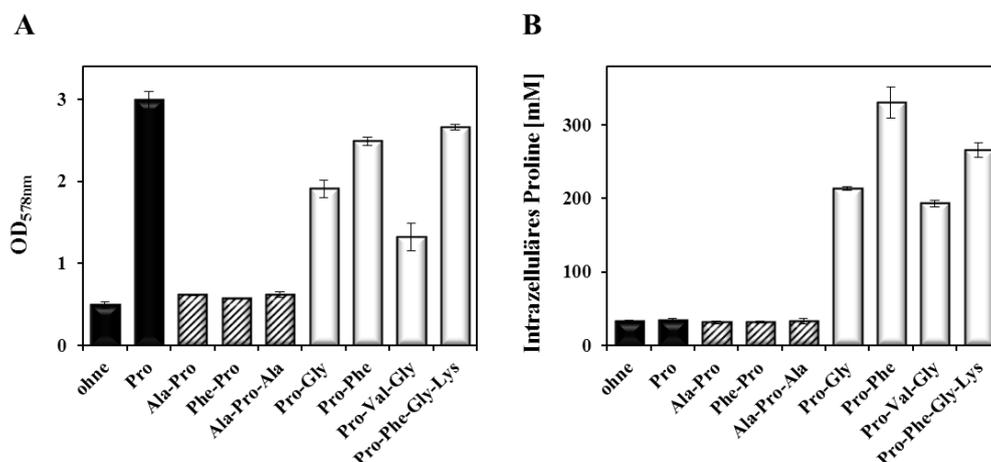
**Abb. 27: Einfluss der Deletion von *papA* und *papB* auf das Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen in Anwesenheit osmoprotektiver Peptide.**

Wachstum der *B. subtilis* Stämme (A) GWB100 [*proHJ*], (B) ACB116 [*papA*, *proHJ*], (C) ACB117 [*papB*, *proHJ*] und (D) ACB118 [*papA*, *papB*, *proHJ*] in SMM + 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (1 mM). Der Wachstumsertrag wurde nach 20 Stunden photometrisch ( $OD_{578}$ ) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Wachstumsexperiment, dessen Daten in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden konnte.

Der Stamm ACB118 [*papA*, *papB*, *proHJ*] ist selbst nicht mehr in der Lage Prolin zu synthetisieren und demzufolge auch nicht mehr in der Lage große Menge dieses kompatiblen Soluts zu akkumulieren, da das *proHJ*-Operon deletiert wurde (29). Die zugeführten Pro-Xaa Peptide führten in diesem Stamm zu dem Aufbau eines Prolin-pools (Abb. 28B). Dies korreliert mit dem Vermögen des Stammes in Anwesenheit dieser Peptide zu wachsen (Abb. 28A). Dies zeigt, dass es zur Hydrolyse dieser Peptide und zur Akkumulation des freigesetzten Prolins zum Schutz vor hohen Osmolaritäten kam. Auf der anderen Seite, kommt es weder zur Akkumulation der osmotischen Schutzsubstanz Prolin noch zu einem Wachstum des Stammes in Anwesenheit von Xaa-Pro Peptiden (Abb. 28). Durch die Deletion von *papA* und *papB* kann der *B. subtilis*-Stamm das Prolin innerhalb der Peptide Ala-Pro, Phe-Pro sowie Ala-Pro-Ala durch Spaltung nicht mehr freisetzen und demzufolge nicht mehr als Schutz vor Hyperosmolarität akkumulieren, was den Wachstumsdefizit dieses Stammes erklärt (Abb. 28).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Prolin, welches durch die Spaltung der prolinhaltigen Peptide vom Typ Xaa-Pro oder Xaa-Pro-Xaa unter Verwendung der Peptidasen

PapA und PapB freigesetzt wird, nicht nur für die Proteinbiosynthese sondern ebenso für den Aufbau des intrazellulären Prolinpools von *B. subtilis* verwendet wird.



**Abb. 28: Einfluss der Peptidasen PapA und PapB auf den intrazellulären Prolinpool osmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen.**

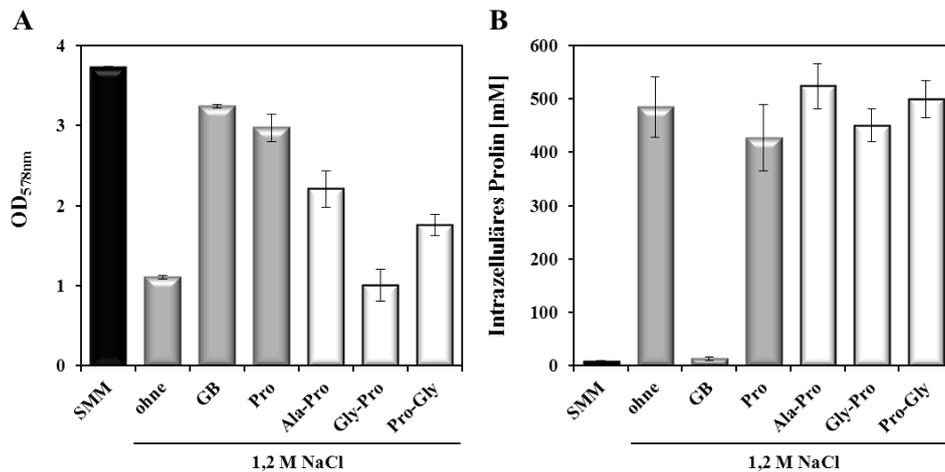
(A) Wachstum des *B. subtilis* Stammes ACB118 [*papA*, *papB*, *proHJ*] in SMM + 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze. Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. (B) Die Zellen des Stammes ACB118 wurden nach Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1,8 - 2 geerntet. Der Prolingehalt wurde nach Bates *et al.* bestimmt (4.4.1) (14). Für jede Probe wurde die Prolinkonzentration doppelt bestimmt. Die Konzentration der zugeführten Zusätze betrug 1 mM. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

### 5.2.9 Der *B. subtilis* Wildtypstamm wird in Anwesenheit prolinhaltiger Peptide vor hohen Osmolaritäten geschützt

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass prolinhaltige Peptide in der Lage waren, das Wachstum der *proHJ*-Mutante bei hoher Osmolarität durch den Aufbau eines intrazellulären Prolinpools zu verbessern. Daraus ergibt sich die Frage, ob prolinhaltige Peptide auch im *B. subtilis* Wildtyp zu einem Wachstumsvorteil führen können. Es ist dabei anzumerken, dass dieser Stamm über einen intakten osmotisch induzierbaren Prolinbiosyntheseweg (ProJ-ProA-ProH) verfügt und demzufolge keinen osmotisch sensitiven Phänotyp wie die *proHJ*-Mutante besitzt. Um dies zu testen, wurde sowohl das Wachstum, als auch der intrazelluläre Prolinpool bei hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) in An- und Abwesenheit der prolinhaltigen Peptide, Ala-Pro, Pro-Gly, sowie Gly-Pro im *B. subtilis* Wildtypstamm JH14115 untersucht (Abb. 29).

Trotz des vorhandenen ProJ-ProA-ProH Syntheseweges, kommt es zu einer Beeinträchtigung des Wachstums bei 1,2 M NaCl im Vergleich zum Wachstum ohne externes

NaCl (Abb. 29A). Die Peptide Ala-Pro und Pro-Gly, welche in der *proHJ*-Mutante eine osmoprotektive Wirkung besaßen, waren auch in der Lage das Wachstum des Wildtypstammes zu verbessern. Erwartungsgemäß traf dies nicht auf das nicht-osmostress-protektive Peptid Gly-Pro zu (Abb. 29A). Demzufolge scheint die osmoprotektive Wirkung der Peptide Ala-Pro und Pro-Gly unabhängig vom Vorhandensein des osmotisch induzierbaren Prolinbiosyntheseweges zu sein.



**Abb. 29: Wachstum und intrazellulärer Prolingehalt des *B. subtilis* Wildtypstammes JH14115.**

(A) Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH14115 wurde in SMM bzw. in SMM + 1,2 M NaCl in An- und Abwesenheit der angegebenen Zusätze (1 mM) inkubiert. Der Wachstumsertrag wurde nach 18 Stunden photometrisch (OD<sub>578</sub>) bestimmt. (B) Beim Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1,8 - 2 wurde der Stamm gerettet. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (4.4.1) (14). Für jede Probe wurde die Prolinkonzentration doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei Parallelen berechnet (8.5.1).

Abb. 21B zeigte, dass die Menge an akkumuliertem Prolin linear zur steigenden externen Salzkonzentration ebenfalls anstieg. Um zu testen, ob es zu einer Erhöhung des intrazellulären Prolin pools durch Anwesenheit von prolinhaltigen Peptiden kommt, wurde das intern akkumulierte Prolin des Wildtypstammes JH14115 untersucht (Abb. 29B). Weder die Zugabe der Peptide noch die Zugabe von Prolin führten zu einer Erhöhung des Prolin pools (Abb. 29B). Diese Beobachtung stimmt mit zuvor publizierten Daten überein, dass *B. subtilis* irgendwie in der Lage ist, die Höhe der externen Salzkonzentration zu messen und die Menge an akkumuliertem Prolin präzise daran anzupassen (29, 93). Bei einer externen Salzkonzentration von 1,2 M NaCl wird stets ein Prolin pool mit einem Ausmaß von ca. 500 mM gebildet (siehe Abb. 21B und Abb. 29B). Es scheint aber, dass der Aufbau des Prolin pools durch extern zugeführtes Prolin, aber auch durch die Spaltung der prolinhaltigen

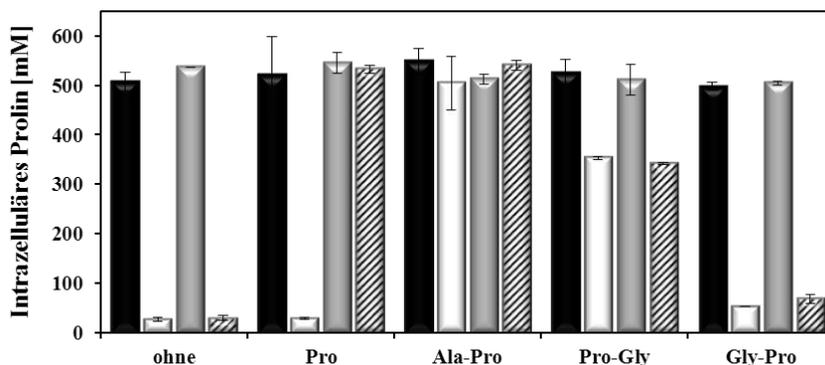
Peptide energetisch günstiger, als die Prolin *de novo* Synthese zu sein, was sich in dem verbesserten Wachstum in Anwesenheit von Prolin bzw. Peptiden erkennen lässt (Abb. 29A).

### **5.2.10 Der Abbau von externem Prolin ist bevorzugt unter hochosmolaren Bedingungen**

*B. subtilis* akkumuliert das kompatible Solut Prolin um sich vor externem Salz zu schützen (29). Die Betrachtung der Abb. 28 verdeutlicht aber, dass durch die Zugabe von externem Prolin es zwar zu einer Verbesserung des Wachstums der *proHJ*-Mutante unter hochosmolaren Bedingungen kommt, ein Prolinpool dabei aber nicht gebildet wird. Es stellt sich nun die Frage, ob dieses Phänomen auf die Tatsache zurückzuführen ist, das Prolin nicht nur als osmotische Schutzsubstanz Verwendung findet, sondern auch als Nährstoff nach dessen Import durch PutP, über PutB und PutC abgebaut werden kann (Abb. 3) (139).

Für dessen Untersuchung wurden verschiedene Stämme konstruiert. In ihnen wurden die Gene für die osmotisch regulierte Prolinbiosynthese (*proHJ*) bzw. für den Prolinabbau (*putBCP*) sowie deren Kombination deletiert. Anhand dieses Sets an Stämmen wurde getestet ob es durch die Zugabe von externem Prolin zum Aufbau eines intrazellulären Prolinpools kommt. Es zeigte sich, dass der Verlust der Prolinabbaugene weder einen Einfluss auf die Bildung noch auf die Größe des intrazellulären Prolinpools in einem Stamm hatte, der über einen intakten osmotisch regulierten Prolinbiosyntheseweg (ProJ-ProA-ProH) verfügte (Abb. 30, graue Balken). Ein ganz anderes Bild kann man in der *proHJ/putBCP*-Doppelmutante beobachten. Erwartungsgemäß war dieser Stamm nicht mehr in der Lage Prolin in hohen Mengen selbst zu synthetisieren. Gibt man aber 1 mM Prolin extern hinzu, kommt es zur Bildung einem dem Wildtyp entsprechenden Prolinpools (Abb. 30, gestreifte Balken).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *B. subtilis* bei hohen Osmolaritäten externes Prolin vorrangig als Nährstoff verstoffwechselt, anstatt es als osmotische Schutzsubstanz zu akkumulieren.



**Abb. 30: Einfluss des PutBCP Systems auf den intrazellulären Prolinpool verschiedener *B. subtilis* Deletionsstämme.**

Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH14115 (schwarze Balken) und dessen Derivate GWB100 [*proHJ*] (weise Balken), ACB221 [*putBCP*] (graue Balken) und ACB223 [*proHJ, putBCP*] (gestreifte Balken) wurden in SMM + 1,2 M NaCl In An- und Abwesenheit von 1 mM Prolin, oder der Dipeptide Ala-Pro, Pro-Gly oder Gly-Pro bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1,8 – 2 angezogen und sofort geerntet. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (4.4.1) (14). Für jede Probe wurde die Prolinkonzentration doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

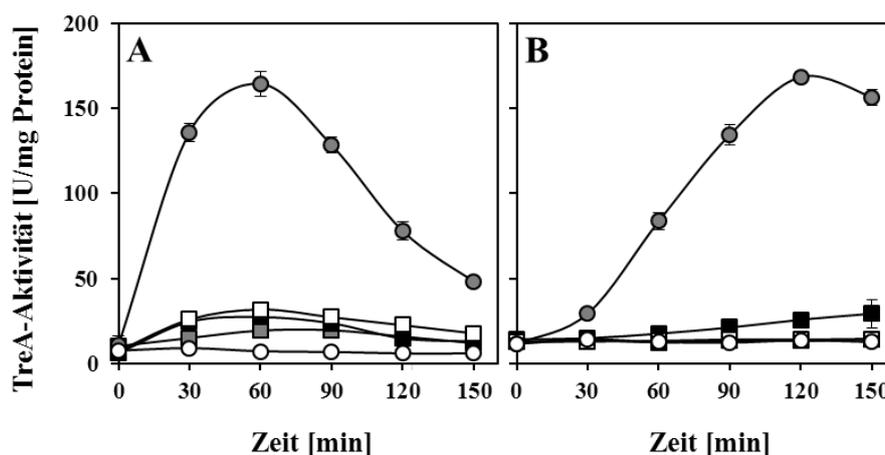
### 5.2.11 Der Einfluss der prolinhaltigen Peptide auf die Transkription von *putBCP*

*B. subtilis* kann unter Verwendung der Enzyme PutB und PutC Prolin zu Glutamat abbauen (26). Die dafür verantwortlichen Gene sind zusammen mit dem Gen für den Prolintransporter PutP in dem *putBCP*-Operon organisiert, dessen Transkription von extern zugeführtem Prolin mittels des Aktivatorproteins PutR induziert wird (16, 139). Intern synthetisiertes Prolin, welches von *B. subtilis* vor allem bei hochosmolaren Bedingungen in hohen Mengen hergestellt wird, ist nicht in der Lage das *putBCP*-Operon zu induzieren (139).

Da es nach dem Import der prolinhaltigen Peptide zu deren Spaltung kommt, stellt sich nun die Frage, ob das freigesetzte Prolin in der Lage ist das *putBCP*-Operon ebenso wie externes Prolin zu induzieren. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die während dieser Arbeit identifizierten Peptidasen (PapA, PapB) die Peptide nach deren Import intrazellulär hydrolysieren und daher eine Induktion des *putBCP*-Operons durch das Prolin der Peptide nicht sehr wahrscheinlich ist. Für die Untersuchung wurden die Peptide Ala-Pro, Pro-Gly und Gly-Pro auf ihre induzierende Wirkung auf die Transkription von *putBCP* unter isoosmotischen (0 M NaCl) sowie hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) untersucht. Hierzu wurde der Stamm ACB225 verwendet, der eine *putB-treA* Reportergenfusion innerhalb des chromosomalen *amyE*-Gens trägt. Erwartungsgemäß war externes Prolin in der Lage das *putBCP*-Operon unabhängig der Salzkonzentration im Medium zu induzieren (Abb.

31). Außerdem führte keines der getesteten Peptide zu einem Anstieg der TreA-Aktivität (Abb. 31).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ebenso wie intern synthetisiertes Prolin auch das intern freigesetzte Prolin die Prolinabbaugene nicht induzieren kann. Einzig externes Prolin ist dazu in der Lage. Der Aufbau eines intrazellulären Prolin-pools durch die Hydrolyse prolinhaltiger Peptide bei hohen Osmolaritäten wäre andernfalls auch nicht zu gewährleisten (5.2.4).



**Abb. 31: Einfluss prolinhaltiger Peptide auf die Induktion der *putBCP*-Transkription.**

Der *putB-treA* Reporterstamm ACB225 [ $\Phi$ (*putB'*-*treA cat*)] wurde in SMM (A) bzw. in SMM + 1,2 M NaCl (B) bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen. Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde den Kulturen Prolin (●) oder prolinhaltige Peptide Ala-Pro (■), Pro-Gly (□) bzw. Gly-Pro (▣) hinzugegeben. Eine Kultur erhielt keinen Zusatz (○). Die Konzentration der Zusätze betrug 1 mM. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen für den TreA-Enzymtest geerntet. Für jede Probe wurde die TreA-Aktivität doppelt bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

### 5.3 Untersuchungen zur Identifizierung des dritten Prolintransporters in *B. subtilis*

Die Aufnahme der Aminosäure Prolin aus der Umgebung erfolgt durch spezielle Prolinaufnahmesysteme. In *B. subtilis* sind zwei dieser Aufnahmesysteme bekannt: PutP und OpuE. Die Prolinpermease PutP nimmt Prolin als Nährstoffquelle (Katabolismus) in die Zelle auf (139). OpuE hingegen transportiert Prolin ausschließlich unter hochosmolaren Bedingungen als osmotische Schutzsubstanz in die Zelle (199), da nur bei hohen Osmolaritäten dessen Strukturgen *opuE* induziert wird (176). Ein Stamm bei dem beide Transporter deletiert wurden, zeigte sich weiterhin sensitiv gegenüber toxischer Prolinanaloga (AC, DHP) (139). Diese Substanzen werden typischerweise von Prolintransportern in die

Zellen von Bakterien transportiert (209). Da in diesem Stamm aber PutP und OpuE nicht intakt sind, wird aufgrund der weiterhin vorhandenen Sensitivität gegenüber AC bzw. DHP die Möglichkeit eines dritten Prolintransporters in *B. subtilis* diskutiert (139). Lässt man außerdem diesen Stamm [*putP*, *opuE*] mit Prolin als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen, so zeigte sich zwar ein stark vermindertes Wachstum, nichtsdestotrotz war er dazu in der Lage, indem er Prolin aus dem Medium in die Zelle transportieren und verwerten konnte (138). Beide Experimente führen also zu der Annahme, dass *B. subtilis* mindestens noch einen weiteren, bisher unbekanntem Prolintransporter besitzen muss (138, 139). Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage nach dem Prolintransport und der Identifizierung des unbekanntem Transporters in *B. subtilis*.

### 5.3.1 Bioinformatische Analyse möglicher Prolintransporter

Der Prolintransporter PutP ist mit dem osmotisch induzierbaren Transporter OpuE sehr nah verwandt (60 % Sequenzidentität). Beide Proteine gehören der Natrium/Substrat Symporter Familie (SSSF) an (104). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie transportieren dabei stets ein spezifisches Substrat gemeinsam mit Natrium in die Zelle. PutP ist außerdem sehr nah mit dem gleichnamigen Transporter aus *E. coli* (54 % Sequenzidentität) verwandt. Anhand dieser Struktur konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung von Prolin (W85, Y166, W270, Y274) oder an der Bindung von Natrium (Y15, A79, M83, A359, S362, T363) beteiligt sind (145). Diese Aminosäuren sind sowohl in PutP als auch in OpuE aus *B. subtilis* hoch konserviert (Abb. 32).

Zur Identifizierung des unbekanntem Prolintransporters wurde *in silico* mittels einer BLAST-Recherche nach *putP*-ähnlichen Genen im Genom von *B. subtilis* in der Datenbank Genolist gesucht (3). Unter den gefundenen Proteinen, besaßen Ywca mit 24 % und YodF mit 21 % die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu PutP und wurden aufgrund dessen im Folgenden auf ihre mögliche Fähigkeit zum Prolintransport hin untersucht. Zuerst wurde unter Verwendung der SMART-Datenbank in beiden Proteinen nach funktionellen Proteindomänen gesucht (123). Es wurde jeweils eine SSF-Domäne in Ywca (Aminosäuren: 33-434; PF00474) und YodF (Aminosäuren: 38-432; PF00474) gefunden, was auf eine Zugehörigkeit beider Proteine zu der Natrium/Substrat Symporter-Familie hindeutet.

Sequenzvergleiche von Ywca und YodF mit den Sequenzen der bekannten Prolin Transporter zeigen, dass die essentiellen, für die Bindung von Prolin und Natrium verantwortlichen Aminosäuren in Ywca und YodF nicht konserviert sind (Abb. 32). Dies

## ERGEBNISSE

kann zum einen bedeuten, dass YwcA und YodF keine Prolintransporter sind. Es kann aber auch bedeuten, dass der Mechanismus des Prolintransportes von YwcA und YodF von PutP verschieden ist. Um zu klären, ob es sich bei den unbekanntenen Proteinen um Prolintransporter handelt, wurden die betreffenden Gene deletiert und auf ihre Beteiligung am Transport toxischer Prolinanaloga hin untersucht.

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| Put P | MLLI GYFAYKRTSN- - - LT DYML GGRSL GPVAVTALSAGAADMS                          | 40  |
| OpuE  | -- MSIEIIISLGIYFIAMLLI GWFYAFKKTID- - - I NDYML GGRGL GPVAVTALSAGAADMS       | 55  |
| YwcA  | -- MNMTAFLLFLAVGLTLI IYFAAKRTKT- - - TSEFYTAGGGLTGVQNGLAAGDYMS               | 55  |
| YodF  | MQGNLTALLI TAI I VLTVVC I GFLAGRDKSSRTSVEEWSVGGRRFGLLLVWFLVGDLYT             | 60  |
| *     |  |     |
| Put P | GWLMGLPGAMFSTGLSGAWI V I GLCLGAWANWLYVAPRLRTYTEKAGNSITIPGFLENR               | 100 |
| OpuE  | GWLMGVPGAMFATGLSTLWALGLTI GAYSNYLLAPRLRAYTEAADDATIIPDFDKR                    | 115 |
| YwcA  | AASFLLGIAGMIALYGFDFGFYS I GFLVAYLVVLYI VAEPLRN- - - - LGKYTMADMI AAR         | 110 |
| YodF  | AYTFLGLTSTAFITGGSVAFFAI PYSVLAYFIAYFFLPKLWVAK- - I HKLTL LADYARER            | 118 |
| *     |  |     |
| Put P | FGDQTKLLRLLFSGI VI LVFFTFYVSSGMVSGGVLFNSI LG- - MDYHTGLWVTGVVAYT             | 158 |
| OpuE  | FQHSSSLKI VSALI I MI FFTLYTSSGMVSGGRLFESAFG- - ADYKLGFLTTAVVLYT              | 173 |
| YwcA  | FKEKK- - I RGVAAALNTI AISTFYMI AOLVGAGALI KLL LG- - LDYTAAVL I VGVLMTIYV     | 166 |
| YodF  | FNSKLL- - LASLVAI VGVLM I PYI CLQLSGI QDTLQVAGTGYI NVKFVVI I SFI LVALYT      | 176 |
| *     |  |     |
| Put P | LFGGFLAVSWDFVQGI I MFAALI LVPI VTFHTG- GAGDTVAEIRSVDPDMFNIFKG- -             | 215 |
| OpuE  | LFGGFLAVSITDFVQGI I MFAALVLPVIAFT HVG- GVAPTFHEI DAVNPHLDFIKG- -             | 230 |
| YwcA  | VFGGMIATSWQI I KAVLLMAGTLVI SI I VFSKFGFSLNTMFEQMKATPLGADFLNPGN              | 226 |
| YodF  | FESGI KGPTYT I I KDI LVWVI MLFMVSLPLI HFNGWTPMI DTLVKEAPQMLTIPSEGP           | 236 |
| *     |  |     |
| Put P | --- TSVLGI I SLFAWGLGYFGQPHI I VRFMAI TSVKEI KRARRI GMGMMI LSAVGAULTG        | 272 |
| OpuE  | --- ASVLSI I SYLAWGLGYFGQPHI I VRFMAI KDI KDKPARRI GMSMMI I TVLGSVLTG        | 287 |
| YwcA  | KYKVPLETLSLNLALVLTAGLPHI I RFYTVKDAKTARTSVVSATW I GVFI I MTVFLG              | 286 |
| YodF  | -- KGI PWFITASI VSALALFMWAHAATGVFTAKSADAVRKNS- MFLPLYNI VLI LVI FLG          | 293 |
| ~ ~ ~ |  |     |
| Put P | LGGI AYYHQRGMTLKDPE- - TFI I QLGNL FHP I I TGFLLSAI LAAI MSTI SSQLLVTS       | 330 |
| OpuE  | LTGVAYAHKFGVAVKDPE- - MFI I FSKI L FHP I I TGFLLSAI LAAI MSTI SSQLLVTS       | 345 |
| YwcA  | FGAAAFVGFDAI TAAADQAGNMAAPL LAKALGGDFLFAEVS I AFATI LAVVTGLVLSAAS            | 346 |
| YodF  | FI AFLVLPED- - - TNPR- - LALLHLI QTSYGGVAQGFAYATI ALASLI PCSI MAI GASN       | 347 |
| *     |  |     |
| Put P | SLVEDLYKSMFRR- SASDKELVFLGRLAVLAVSI VALVLAWEKNNT- I LGLVSYAWAGFG             | 388 |
| OpuE  | AVTEDLYRSFFRR- KASDKELVMI GRLSVLVI AVI AVLLSLNPNST- I LDLVGYAWAGFG           | 403 |
| YwcA  | AFAHDIYSQI I RKGATEKEQMKAAWASVAVSVLSI LLA I FAQSLNVAF LVALAFVAA              | 406 |
| YodF  | LFANNLYRDLI HP- NVSQSKLTLVTRSMVFFVI GLALLFGMLFPTA- LVT LQLLGVSGMV            | 405 |
| *     |  |     |
| Put P | ASFGPVLLSLFWKRMTKWGALAGMI VGAATVI I WANAGLSD- - - - - - - - - - - - - - -    | 430 |
| OpuE  | SAFGPAILLSLYWKRMEWALAGMI VGAATVLI WTTGLAKST- - - - - - - - - - - - - - -     | 447 |
| YwcA  | SANLPLI VFTVFWKRFNASGAL WGSLTGLI SALVLSMSPSVWDPAGGAI FTGDPLI PLS             | 466 |
| YodF  | QIF- PAI AVSLFWKNQTKAATVI GLLAGLAVTFI VYI TQSAH- - - - - - - - - - - - - - - | 446 |
| *     |  |     |
| Put P | -- FLYEMPGFAASLLSVFFVS- - - I LITQAPSQAVTDQFNDYQDTMSQ- - - - -               | 473 |
| OpuE  | -- GVEI I PGF I LSM I AGI I VS- - - M I TKRPAKASYRLEGVMEKLLKRKK- - -         | 492 |
| YwcA  | NPGI I SI PLGFLGAWLGTVLS- - - DKT I DEDTFAE I QVKAHTGVHMEQE- - -             | 513 |
| YodF  | -- GI YEGFVGLAANMI AVVI LNPLFVKNAGSNPVI EGLEGKKQDANPNQKGA                    | 496 |

**Abb. 32: Sequenzalignement der bekannten (PutP, OpuE) und der möglichen (YwcA, YodF) Prolintransporter aus *B. subtilis*.**

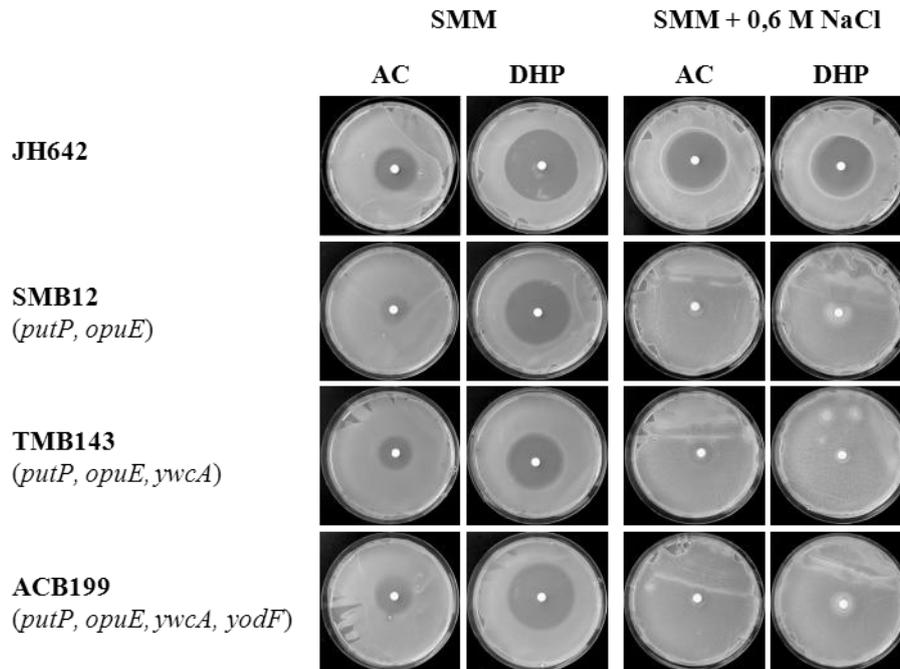
Es wurde ein Sequenzalignement bestehend aus PutP, OpuE, YwcA und YodF erstellt. Konservierte Aminosäuren die in PutP und in mind. einem anderen der untersuchten Sequenzen zu finden sind, wurden schwarz unterlegt. Aminosäuren die sowohl in YwcA als auch in YodF zu finden sind wurden grau unterlegt. Aminosäuren die in der Bindung von Prolin oder Natrium involviert sind, wurden mit einem \* oder ~ markiert.

### 5.3.2 Untersuchungen zum Prolintransport in *B. subtilis*

Zur Untersuchung, ob die Proteine YwcA und YodF Prolintransportsysteme sind, wurde ein Test mit den toxischen Prolinanaloga L-Azetidin-2-carbonsäure (AC) und 3,4-Dehydro-DL-Prolin (DHP) durchgeführt. Dieser Test beruht auf der toxischen Wirkung von AC und DHP auf das Wachstum von Zellen. Diese entsteht dadurch, dass die Prolinanaloga aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zu Prolin von den Prolintransportern erkannt, in die Zelle transportiert und dann anstelle von Prolin in die Proteine eingebaut werden, was zu einer fehlerhaften Faltung der Proteine führt (139, 209). Für den Test wurden die verschiedenen *B. subtilis* Stämme in SMM ohne oder mit 0,6 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Phase kultiviert und auf SMM-Agarplatten gleicher Osmolarität ausplattiert. In die Mitte der SMM-Platten wurde ein mit AC oder DHP benetztes Filterplättchen plaziert. Die Agarplatten wurden dann bei 37 °C für 24 - 48 h inkubiert, bis die *B. subtilis* Kulturen zu einem Bakterienrasen herangewachsen waren. Ein um das Filterpapier auftretender Hemmhof ist ein Maß für den Transport der Analoga durch die in den Stämmen vorhandenen Prolintransporter.

Erwartungsgemäß war der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 sensitiv gegenüber den beiden Prolinanaloga (AC, DHP) (Abb. 33). Es kam also zur Bildung von Hemmhöfen und das änderte auch eine äußere Salzkonzentration von 0,6 M NaCl nicht. Bei dem Stamm SMB12, wo sowohl *putP* als auch *opuE* deletiert wurden, zeigte sich hingegen ein ganz anderes Bild. Die Bildung eines Hemmhofes ließ sich nur unter isoosmolaren Bedingungen beobachten, bei 0,6 M NaCl war das aber nicht der Fall (Abb. 33). Daraus kann man schließen, dass es neben PutP und OpuE noch mind. einen weiteren Prolintransporter in *B. subtilis* geben muss und das dieser bei hohen Salzkonzentrationen aufgrund des fehlenden Hemmhofes nicht aktiv sein kann. Zur Untersuchung, ob YwcA bzw. YodF Prolintransporter sind, wurden Deletionsstämme konstruiert: TMB143 [*putP*, *opuE*, *ywcA*]; ACB199 [*putP*, *opuE*, *ywcA*, *yodF*]. Die zusätzliche Deletion der Gene *ywcA* und *yodF* führte zu keiner Änderung des für SMB12 beschriebenen Phänotyps, da die toxischen Prolinanaloga auch weiterhin unter isoosmotischen Bedingungen (nicht bei 0,6 M NaCl) in die Zelle transportiert wurden, was die Bildung von Hemmhöfen nach sich zog (Abb. 33).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass beide Proteine, YwcA und YodF, nicht an dem Transport der Analoga beteiligt sind und demzufolge trotz hoher Sequenzähnlichkeit zu PutP keine Prolintransportsysteme in *B. subtilis* sind.

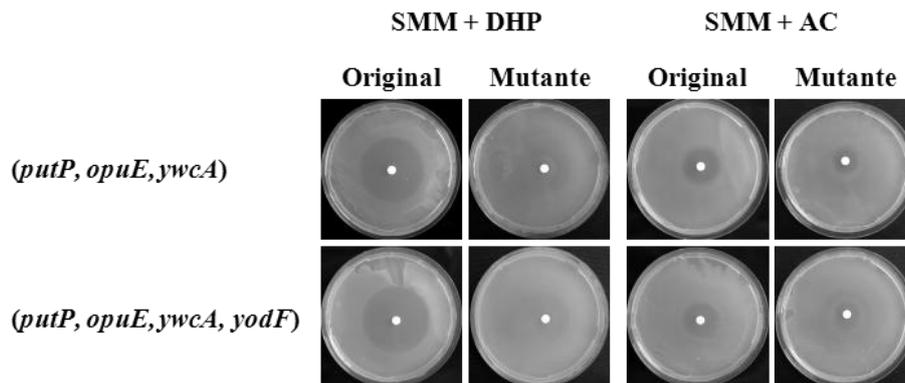


**Abb. 33 Sensitivität verschiedener *B. subtilis* Prolintransportermutanten gegen toxische Prolinanaloga bei verschiedenen Salzkonzentrationen.**

Die Kulturen des *B. subtilis* Wildtypstammes und dessen Derivate SMB12 (*putP, opuE*), TMB143 (*putP, opuE, ywcA*) und ACB199 (*putP, opuE, ywcA, yodF*) wurden in SMM bzw. SMM mit 0,6 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen. 300 µl dieser Zellen wurden auf SMM-Platten mit und ohne 0,6 M NaCl ausplattiert. In die Mitte dieser Platten wurde ein mit 10 µl AC (25 mg/ml) oder 10 µl DHP (25 mg/ml) benetztes Filterpapier plaziert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C inkubiert.

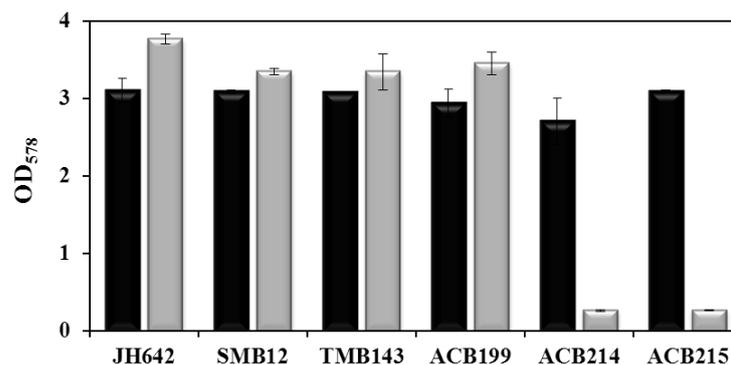
Inkubiert man die SMM-Platten mit den toxischen Prolinanaloga für einen längeren Zeitraum bei 37° C, so kam es zur Bildung einzelner Kolonien in dem Bereich des Hemmhofes. In dem Ansatz mit DHP wurden resistente Kolonien der Stämme TMB143 (*putP, opuE, ywcA*) und ACB199 (*putP, opuE, ywcA, yodF*) gepickt und mehrmals aufgereingt. Die isolierten Stämme ACB215 (*putP, opuE, ywcA, DHP<sup>R</sup>*) und ACB214 (*putP, opuE, ywcA, yodF, DHP<sup>R</sup>*) wurden anschließend dahingehend überprüft, ob sie ausschließlich gegenüber DHP resistent sind oder ob dies auch auf AC zutrifft. Abb. 34 zeigt eindeutig, dass die DHP-resistenten *B. subtilis* Stämme auch ihre Sensitivität gegenüber AC verloren haben. Dieses Phänomen könnte sich wie folgt erklären lassen. Die Resistenz gegenüber den toxischen Prolinanaloga (DHP, AC) könnte auf einer Inaktivierung des unbekanntes dritten Prolintransporters beruhen. Ein Stamm der also über keinen funktionsfähigen Prolintransporter mehr verfügt, wäre demnach nicht mehr in der Lage das toxische Prolinanaloga aufzunehmen und es käme zu keiner Hemmhofbildung mehr. Ist dies hier der Fall, so sollten beide Stämme (ACB214, ACB215) nicht mehr in der Lage sein Prolin von außen in die Zelle zu transportieren. Um dies experimentell zu untersuchen, wurde das

Wachstum der DHP-resistenten Stämme im Vergleich zu ihren Väter-Stämmen in Minimalmedium mit Prolin als alleinige Stickstoffquelle untersucht (Abb. 35). Mit Ausnahme der DHP-resistenten Stämme ACB214 und ACB215 waren alle anderen getesteten Stämme in der Lage mit Prolin als Stickstoffquelle zu wachsen (Abb. 35). Dies legt den Schluss nahe, dass in beiden Stämmen (ACB214, ACB215) das Prolin nicht mehr in die Zelle transportiert werden kann, was auf das Fehlen eines intakten Prolintransporters zurückzuführen ist.



**Abb. 34: Verlust der Sensitivität DHP-resistenter *B. subtilis* Prolintransportermutanten gegenüber den toxischen Prolinanaloga DHP und AC.**

Die Kulturen der *B. subtilis* Transporter Mutanten TMB143 [*putP, opuE, ywca*] und ACB199 [*putP, opuE, ywca, yodF*] sowie deren DHP-resistenten Derivate: ACB215 [*putP, opuE, ywca, DHP<sup>R</sup>*] und ACB214 [*putP, opuE, ywca, yodF, DHP<sup>R</sup>*] wurden in SMM bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen und auf SMM-Platten ausplattiert (300 µl Kultur). In die Mitte dieser Platten wurde ein mit 10 µl AC (25 mg/ml) oder 10 µl DHP (25 mg/ml) benetztes Filterpapier plaziert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C inkubiert.

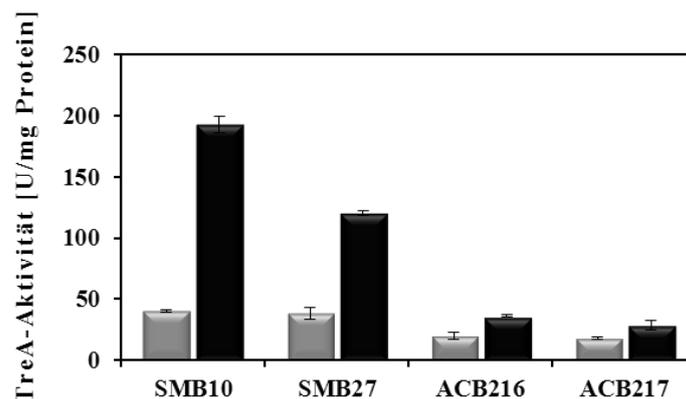


**Abb. 35: Wachstum DHP-resistenter *B. subtilis* Prolintransportermutanten bei verschiedenen Stickstoff-Quellen.**

Wachstum des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 sowie dessen Derivate SMB12 [*putP, opuE*], TMB143 [*putP, opuE, ywca*], ACB199 [*putP, opuE, ywca, yodF*], ACB214 [*putP, opuE, ywca, yodF, DHP<sup>R</sup>*] und ACB215 [*putP, opuE, ywca, DHP<sup>R</sup>*] in SMM mit Ammonium als Stickstoffquelle (schwarze Balken) oder Prolin (30 mM) als Stickstoffquelle (graue Balken). Der Wachstumsertrag wurde nach 16 Stunden photometrisch ( $OD_{578}$ ) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei Parallelen berechnet (8.5.1).

Die für den Abbau von Prolin verantwortlichen Gene sind zusammen mit dem Gen für den Prolintransporter PutP in einer Transkriptionseinheit organisiert; dem *putBCP*-Operon (139). Die Transkription dieses Operons wird in Gegenwart von Prolin von dem Aktivator PutR induziert (16). Dabei ist *B. subtilis* in der Lage zwischen externem zugeführtem und intern synthetisiertem Prolin zu unterscheiden, da nur externes Prolin die Transkription initiiert (139). In diesem Zusammenhang wurde getestet, ob externes Prolin im umgebenden Medium ausreichend für die Induktion des *putBCP*-Operons ist (möglicherweise mittels eines extrazellulären Prolinsensors), oder ob der Import von Prolin dazu essentiell ist. Hierzu wurde der *putB-treA* Reporterstamm SMB10 und die von ihm abgeleitete *putP/opuE* Transportermutante auf die Induktion des *putBCP*-Operons untersucht. Durch das Fehlen von PutP und OpuE konnte ein signifikanter Rückgang der TreA-Aktivität festgestellt werden (Abb. 36). Ebenfalls wurden die DHP-resistenten Stämme ACB214 und ACB215 getestet. Beide Stämme können nachweislich Prolin nicht mehr aktiv in die Zelle transportieren (Abb. 35). Die *putB-treA* Reporterfusion wurde stabil in das Chromosom beider Stämme integriert. In den dabei entstandenen Stämmen (ACB216, ACB217) konnte der Verlust der prolininduzierten Transkription des *putBCP*-Operons beobachtet werden (Abb. 36).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Import von extrazellulärem Prolin eine Voraussetzung in der Aktivierung der Transkription von *putBCP* zu sein scheint. Ein externer Sensor, der das extrazelluläre Prolin erkennt und die Transkription des *putBCP*-Operons in die Wege leitet, scheint also eher unwahrscheinlich.



**Abb. 36: Einfluss der DHP-Resistenz auf die Induktion der *putBCP*-Transkription**

Der *putB-treA* Reporterstamm SMB10 [ $\Phi(\textit{putB}'\textit{-treA cat})$ ] sowie dessen Derivate SMB27 [*putP*, *opuE*,  $\Phi(\textit{putB}'\textit{-treA cat})$ ], ACB216 [*putP*, *opuE*, *ywcA*,  $\Phi(\textit{putB}'\textit{-treA cat})$ , DHP<sup>R</sup>], ACB217 [*putP*, *opuE*, *ywcA*, *yodF*,  $\Phi(\textit{putB}'\textit{-treA cat})$ , DHP<sup>R</sup>] wurden in SMM bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen. Nach Zugabe von 1 mM Prolin (schwarze Balken) oder ohne dessen Zugabe (graue Balken) wurden die Kulturen für weitere 60 min inkubiert und die Zellen für den TreA-Enzymtest geerntet. Für jede Probe wurde die TreA-Aktivität doppelt bestimmt.

## 6 Diskussion

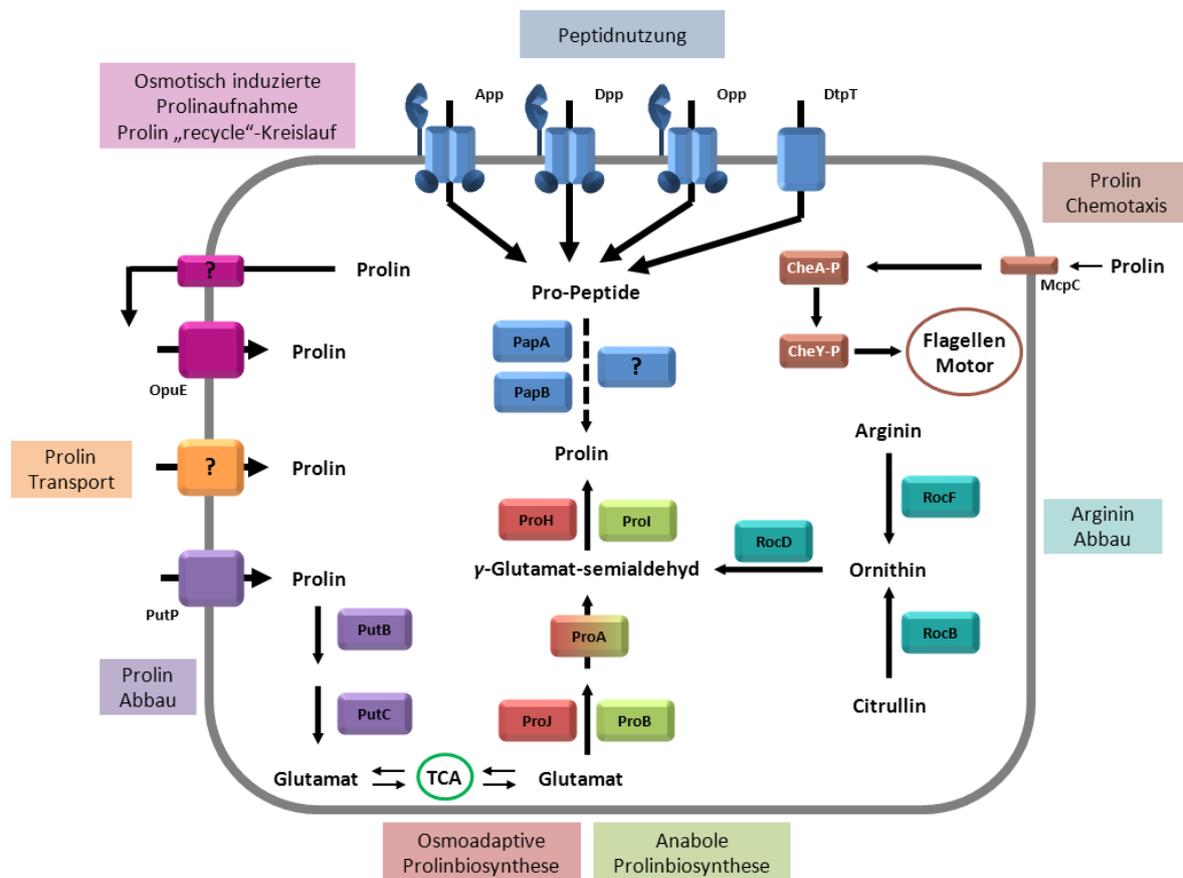
Das Gram<sup>+</sup> Bakterium *Bacillus subtilis* ist in seinem natürlichen Habitat, den oberen Bodenschichten, permanent wechselnden Umweltbedingungen, wie Schwankungen der äußeren Osmolarität ausgesetzt (56). Dies bringt die Gefahr des Wasserein- bzw. Wasserausstroms mit sich, was letzten Endes auf die Stabilität des Turgors, des Zellinnendruckes, Auswirkungen hat. Da der Turgor entscheidend für das Überleben der Zelle ist (210), stellt dessen Aufrechterhaltung eine große physiologische Herausforderung dar. Bei hochosmolaren Bedingungen werden kompatible Solute in hohen Konzentrationen im Inneren der Zelle akkumuliert, um dem Wassereinstrom entgegenzuwirken und damit den Turgor zu stabilisieren. Die kompatiblen Solute werden dabei vorzugsweise über spezielle Transportsysteme aus der Umgebung aufgenommen. Da diese aber aufgrund unsteter Verfügbarkeit im Boden nicht immer vorhanden sind, häuft *B. subtilis* in deren Abwesenheit das kompatible Solut Prolin durch endogene *de novo* Synthese an (29). Prolin ist dabei das einzige kompatible Solut, was *B. subtilis* aus eigener Kraft synthetisieren kann. Die Wirkung von Prolin als osmotische Schutzsubstanz, ist aber nicht seine alleinige Aufgabe. Prolin als proteinogene Aminosäure wird natürlich für die Synthese von Proteinen benötigt. Außerdem findet Prolin als alleinige Stickstoff- und/oder Kohlenstoffquelle in *B. subtilis* Verwendung (60). Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei neue Aspekte im Prolinmetabolismus von *B. subtilis* aufgedeckt werden:

- (i) Umgehung der *proA*-Deletion in der anabolen Prolinbiosynthese:  
Entwicklung neuer regulatorischer Mechanismen
- (ii) Anpassung an hohe Osmolaritäten: Nutzung verfügbarer Ressourcen
- (iii) Der dritte Prolintransporter: Prolintransport als Voraussetzung für die Induktion der Prolinabbau-Gene

Dies fügt der Rolle von Prolin in *B. subtilis* weitere Facetten hinzu. Im Folgenden wird auf die drei Aspekte eingegangen, sowie die Bedeutung von Prolin für die Physiologie von *B. subtilis* auf globaler Ebene betrachtet.

## 6.1 Die physiologische Rolle von Prolin in *B. subtilis*

Fasst man das bekannte Wissen über *Bacillus subtilis* und Prolin mit den in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse zusammen, so zeigt sich eine vielfältige Beteiligung von Prolin in den unterschiedlichsten physiologischen Prozessen (Abb. 37): **Prolinbiosynthese, Argininabbau, Prolin Chemotaxis, Prolinabbau, Peptidnutzung, Vernetzung des Argininabbaus mit der Prolinbiosynthese, Prolin „recycle“ Kreislauf und Prolintransport.** Im folgenden Abschnitt wird auf jedes dieser Prozesse näher eingegangen.



**Abb. 37: Prolin in *B. subtilis*: Eine schematische Darstellung.**

Allgemeines Schema über die verschiedenen Aufgaben die Prolin in *B. subtilis* erfüllt. Der Übersichtlichkeit halber wurden 8 Bereiche definiert: (i) anabole und osmoadaptive Prolinbiosynthese, (ii) Argininabbau, (iii) Prolin Chemotaxis, (iv) Prolinabbau, (v) Peptidnutzung, (vi) Vernetzung des Argininabbaus mit der Prolinbiosynthese, (vii) Prolin „recycle“ Kreislauf und (viii) Prolintransport. Genauere Erläuterungen der einzelnen Bereiche befinden sich im Text.

### 6.1.1 Prolinbiosynthese

*B. subtilis* besitzt die Fähigkeit Prolin ausgehend von Glutamat über drei enzymatische Schritte *de novo* zu synthetisieren:  $\gamma$ -Glutamat Kinase (ProB, ProJ),  $\gamma$ -Glutamylphosphat

Reduktase (ProA) und der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase (ProI, ProH). Prolin wird auf der einen Seite für die Synthese von Proteinen verwendet und auf der anderen Seite fungiert Prolin als osmotische Schutzsubstanz. Die benötigten Prolinmengen beider Funktionen unterscheiden sich bei dabei aber erheblich (29, 30, 204). Dies findet bei der Synthese Beachtung, weswegen *B. subtilis* zwei Wege besitzt Prolin für die jeweilige Aufgabe zu synthetisieren, die anabole bzw. die osmoadaptive Prolinbiosynthese.

Die anabole Prolinbiosynthese wird durch ProB-ProA-ProI katalysiert. Das ProB und das ProA Protein bilden typischerweise in Bakterien einen Proteinkomplex, um die Freisetzung des instabilen Intermediates  $\gamma$ -Glutamylphosphat in das Zytoplasma der Zelle zu verhindern (169). Dies deckt sich mit der Tatsache, dass die prokaryotischen Enzyme ProB und ProA bei der Prolinbiosynthese in Pflanzen durch ein bifunktionelles Enzym, die Pyrrolin-5-carboxylat Synthetase (P5Cs) ersetzt wurde, was in diesem Fall die Komplexbildung erübrigt (98). Da für die Proteinbiosynthese nur eine relativ geringe Menge an Prolin benötigt wird, ist sie besonders streng reguliert. Zum einen auf transkriptioneller Ebene: Das *proBA*-Operon, genauso wie das *proI*-Gen unterliegen der Kontrolle durch eine Prolin-regulierte T-box-abhängige transkriptionelle Antitermination, die deren Transkription einzig bei Prolinmangel induziert (30). Ein Mechanismus, der weit verbreitet innerhalb der Gram<sup>+</sup> Bakterien zu sein scheint (78, 198, 202). Sie ist aber auch auf der Proteinebene reguliert: Das ProB-Enzym unterliegt einer allosterischen *feedback*-Hemmung durch das Endprodukt Prolin (44). Schon bei Konzentrationen von  $7,5 \cdot 10^{-6}$  M reduziert sich die Aktivität von ProB um die Hälfte (44). Diese strenge Regulation stellt sicher, dass ausreichend Prolin für die Synthese von Proteinen zur Verfügung steht aber gleichzeitig eine verschwenderische Prolin-Überproduktion unterbunden wird, was zu einem konstanten Basal-Level von etwa 20 mM freiem Prolin in der Zelle führt (204, 213).

*B. subtilis* passt sich an hohe externe Salzkonzentrationen durch eine intrazelluläre Akkumulation des kompatiblen Soluts Prolin an. Dabei können sogar mehrere Hundert mM an Prolin in der Zelle angehäuft werden (93, 139, 213). Solch große Mengen können nicht von dem streng regulierten anabolen Prolinbiosyntheseweg synthetisiert werden. Dies ermöglicht aber der osmoadaptive Prolinbiosyntheseweg, der durch die Enzyme ProJ-ProA-ProH katalysiert wird (29). Kennzeichnend für diese Form der Prolinsynthese ist das osmotisch induzierbare *proHJ*-Operon. Die Höhe der Transkription von *proHJ* ist dabei linear zur Höhe des externen osmotischen Stresses (29). Wie die Höhe der externen Osmolarität gemessen wird und durch welches Signal *B. subtilis* allgemein den osmotischen Stress

erkennt, konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Prozess der Erkennung des osmotischen Signals eingehend untersucht und es konnten die daran beteiligten Proteine charakterisiert werden (94, 127). Das osmotische Signal wird direkt mittels des HOG (*high osmolarity glycerol*) Weges durch spezifische Osmosensoren (Sho1p, Sln1p) erkannt und weitergeleitet, was die Synthese von Glycerin als kompatibles Solut zum Schutz vor den hohen externen Osmolaritäten zur Folge hat (94, 133, 144). In *B. subtilis* hingegen konnte solch ein System nicht nachgewiesen werden. Statt dessen wird die Beteiligung des Zwei-Komponenten-Systems DegS-DegU in der osmotischen Signalerkennung und anschließender Weiterleitung des Signals an der transkriptionellen Apparat einiger Gene in der Zelle diskutiert (178). Dadurch das sich DegS im Zytoplasma der Zelle befindet (140), geht man von einem intrazellulären Signal aus (178). In *E. coli* ist der Fluss von Kalium-Ionen in die Zelle aber auch daraus heraus ganz entscheidend für die Art der Anpassung gegen externe Osmolaritäten (168). Kalium könnte also das osmotische Signal in Bakterien sein. Dies würde auch die so wichtige Initiale Phase im Anpassungsprozess von *B. subtilis* an hohe Osmolaritäten erklären, bei der sich der intrazelluläre Kaliumspiegel drastisch erhöht, um den Turgor als erste Antwort zu stabilisieren (204). Die erhöhte Kaliumkonzentration könnte also nicht bloß zur Stabilisierung des Turgors genutzt werden, sie könnte ebenso als Maß für die Höhe der externen Osmolarität dienen und dabei einen Einfluss auf die Höhe der Transkription des *proHJ*-Operons haben. Weitergehende Untersuchungen auf diesem Gebiet könnten die so wichtige Frage aufklären, wie *B. subtilis* die Höhe der externen Osmolarität misst.

Daraus, dass der anabole Prolinbiosyntheseweg die Proteine ProB-ProA-ProI benutzt und die osmoadaptive Prolinbiosynthese durch die Enzyme ProJ-ProA-ProH katalysiert wird, ist es ersichtlich, dass beide Synthesewege über das gemeinsam genutzte ProA-Protein miteinander verschränkt sind. Dies kommt zustande, weil *B. subtilis* kein paralogenes Enzym zu ProA besitzt. Daraus resultiert, dass beide Synthesewege nicht unabhängig voneinander fungieren können. Eine solche Verschränkung beider Prolinsynthesewege miteinander ist aber nicht die Regel in Bakterien. *Bacillus licheniformis* beispielsweise, ein naher Verwandter von *B. subtilis* besitzt zwei parallele Synthesewege für Prolin (55, 195). Dies ist möglich, da *B. licheniformis* über zwei ProA Homologe verfügt, ProA und ProAA (55). Wie auch in *B. subtilis* bildet das *proA* und *proB*-Gen aus *B. licheniformis* ein Operon, welches ebenso unabhängig von der externen Osmolarität transkribiert wird (55). Der entscheidende Unterschied in beiden Organismen ist, dass *B. licheniformis* ein osmotisch reguliertes

*proHJAA*-Operon besitzt, *B. subtilis* hingegen nicht (55). Dadurch ist *B. licheniformis* in der Lage, die osmoadaptive Prolinbiosynthese völlig unabhängig von der anabolen Prolinbiosynthese zu nutzen, was die Synthese von Prolin als Aminosäure und die Synthese von Prolin als kompatibles Solut voneinander trennt.

*Halobacillus halophilus* entwickelte eine völlig andere Möglichkeit dieser Trennung. *H. halophilus* besitzt ein einziges Prolinbiosynthese-Cluster, das osmotisch induzierte *proHJA*-Operon (161). Über weitere Gene, die für Enzyme der Prolinbiosynthese kodieren verfügt dieses halophile Bakterium nicht (163). Da war es doch sehr erstaunlich, dass bei der Deletion von *proHJA* *H. halophilus* zwar die Fähigkeit verlor Prolin als kompatibles Solut zu produzieren, aber trotzdem keine Prolin Auxotrophie aufwies (111). Wie ist dies möglich? Dies ist einfach zu erklären, da die anabole Prolinbiosynthese in *H. Halophilus* über Ornithin erfolgt, einem Zwischenprodukt aus dem Arginin-Metabolismus. Demzufolge wird in *H. halophilus* Prolin nicht wie in *B. licheniformis* über zwei parallele, nur unterschiedlich regulierte Biosynthesewege hergestellt, sondern über zwei komplett verschiedene Wege. Das kompatible Solut Prolin wird ausgehend von Glutamat durch die Enzyme ProJ-ProA-ProH produziert, wohingegen die proteinogene Aminosäure Prolin ausgehend von Glutamat über Ornithin entweder direkt durch das Enzym ArcB (Ornithin Cyclodeaminase) oder indirekt durch die Enzyme RocD (Ornithin Aminotransferase) und ProC (Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase) synthetisiert wird (111).

*H. halophilus* unterscheidet sich noch durch einen weiteren Punkt von *B. subtilis*. Während die Deletion des osmotisch regulierten *proHJ*-Operons in *B. subtilis* dazu führt, dass Prolin nicht mehr in großen Mengen synthetisiert werden kann, was zu einem erheblichen Wachstumsnachteil bei hohen Osmolaritäten führt (29), ist dies bei *H. halophilus* anders. Dieses Bakterium ist zwar nach der Deletion von *proHJA* ebenfalls nicht mehr in der Lage Prolin als osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren, was aber dessen Wachstum bei hohen Osmolaritäten in keiner Weise beeinträchtigt (111). Das fehlende Prolin wird durch andere kompatible Solute ersetzt, da *H. halophilus* (im Gegensatz zu *B. subtilis*) in der Lage ist neben Prolin weitere kompatible Solute *de novo* zu synthetisieren: Glutamat, Glutamin und Ectoin (111, 160-164). Bei deletiertem *proHJA*-Operon wird die Transkription der Synthese-Gene der verschiedenen kompatiblen Solute hochreguliert und es kommt zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Ectoin-Konzentration, was es *H. halophilus* auch ohne Prolin bei hohen Salzkonzentrationen ermöglicht, ungehindert zu wachsen (111).

### 6.1.2 Argininabbau

Neben der eben beschriebenen klassischen Prolinbiosynthese (anabole oder osmoadaptive), die Prolin ausgehend von Glutamat über drei enzymatische Schritte synthetisiert, kann *B. subtilis* Prolin ebenso ausgehend von Ornithin, einem Intermediat des Argininabbau-Weges synthetisieren. Ornithin wird dabei mittels RocD (Ornithin-Aminotransferase) zu  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd abgebaut. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass diese Verbindung ebenfalls von ProA produziert wird. Es kommt demnach in *B. subtilis* zu einer Vernetzung der Prolinbiosynthese und dem Argininabbau. In einem letzten Schritt wird das  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd dann von einem der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktasen (ProI, ProH, ProG) zu Prolin umgewandelt (17). Ornithin entsteht dabei entweder aus dem Abbau von Arginin durch RocF (Arginase), oder aus Citrullin durch (vermutlich) das Enzym RocB (67, 68). Die Enzyme die für die Proteine des Argininabbaus in *B. subtilis* kodieren sind zusammen in zwei Operon lokalisiert: *rocABC* und *rocDEF*. Die Transkription beider Operon wird dabei nur in Gegenwart von Induktoren (Arginin, Ornithin, Citrullin) durch die Aktivatorproteine RocR und AhrC induziert und in Zusammenspiel mit SigL (dem *B. subtilis* Sigmafaktor  $\sigma^L$ ) transkribiert (2, 40, 67, 68, 109, 134). Ohne die Mitwirkung der anabolen Prolinbiosynthese reicht das Basal-Level der Transkription dieser Gene aber nicht aus, um den anabolen Bedarf der Zelle an Prolin zu decken (Abb. 6). Dies steht im Gegensatz zu der anabolen Prolinbiosynthese in *H. halophilus* (siehe oben) (111). Unter normalen Bedingungen ist demnach diese Art der Prolinbiosynthese nicht sehr effizient in *B. subtilis*. Dies ändert sich erst in Gegenwart der Induktoren Arginin, Citrullin oder Ornithin. In anderen Organismen hingegen ist die Prolinbiosynthese ausgehend von Ornithin auch ohne Mitwirkung der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktasen (aus dem klassischen Prolinbiosynthese-Weg) möglich. Hierbei wird Ornithin mittels der Ornithin Cyclodeaminase (OCD) direkt in nur einem Schritt zu Prolin umgewandelt (111, 174). Dies ist bei *B. subtilis* nicht möglich, da es keine Ornithin Cyclodeaminase besitzt (17).

### 6.1.3 Prolin Chemotaxis

In seinem natürlichen Habitat (56), den oberen Bodenschichten konkurriert *B. subtilis* mit einer Vielzahl anderer Organismen um die zur Verfügung stehenden Nährstoffe. Um sich gegenüber starker Konkurrenz zu behaupten, muss es die vorkommenden Nährstoffe daher möglichst frühzeitig erkennen und schnell aufnehmen. Die Aminosäure Prolin ist eines dieser

begehrten Nährstoffe und da die Synthese von Aminosäuren stets energetisch kostenintensiver ist als dessen Import, ist *B. subtilis* darauf bedacht Prolin gezielt zu lokalisieren.

*B. subtilis* ist ein peritrich begeißeltes Bakterium mit der Fähigkeit die in seiner Umwelt vorkommenden Substanzen zu analysieren und sich in Bereiche günstiger Bedingungen hin zu bewegen. Einem Prozess den man als Chemotaxis bezeichnet (186). Der Kern des chemotaktischen Systems umfasst dabei die membranverankerten Chemorezeptoren Mcp (*Methylaccepting chemotaxis protein*), die Histidin-Kinase CheA und das Response-Regulator Protein CheY (186). *B. subtilis* besitzt drei Chemorezeptoren: McpA, McpB und McpC. McpA ist verantwortlich Glukose und  $\alpha$ -Methyl-glukoside aufzuspüren, wohingegen McpB und McpC zusammen in der Lage sind alle bekannten proteinogenen Aminosäuren ausfindig zu machen (81, 141). Befindet sich die Aminosäure Prolin in der Umgebung von *B. subtilis*, so kann es ausschließlich durch die Wirkung des Chemorezeptors McpC aufgespürt werden, da durch *in vitro* Messungen eindeutig die Bindung von Prolin an McpC nachgewiesen wurde ( $K_D = 14 \mu\text{M}$ ) (72, 141). Nach Bindung von Prolin an McpC kommt es zur Autophosphorylierung von CheA (CheA-P) mit anschließender Übertragung der Phosphorgruppe auf CheY (22, 69). Das phosphorylierte CheY (CheY-P) ist nun in der Lage an den Flagellen-Motor zu binden um somit die Rotationsrichtung zu verändern (185). Das auf diesem Weg lokalisierte Prolin kann von *B. subtilis* über spezifische Prolintransporter aufgenommen werden.

### 6.1.4 Prolinabbau

Das durch den Chemorezeptor aufgespürte Prolin gelangt über PutP in die nicht osmotisch gestresste Zelle. PutP ist ein Transporter der SSS Familie (Sodium/Substrat Symporter) (145). Außerdem ist PutP ein sehr effizientes Transportsystem mit einer hohen Affinität ( $K_m$  ca.  $8 \mu\text{M}$ ) zu seinem Substrat Prolin und besitzt in dessen Anwesenheit (sollten sich auch noch so geringe Mengen von Prolin in der Umgebung befinden) eine beträchtliche Transportkapazität ( $V_{max}$ ) von etwa  $158 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  (139). PutP ist Teil des PutBCP-Prolinabbausystems in *B. subtilis* (26, 139). Die Transkription der Prolinabbaugene wird indirekt durch den globalen Regulator CodY reprimiert, indem er an eine spezifische Region in der Nähe des *putBCP*-Promotors bindet (Abb. 38) (16). Diese Region überlappt dabei mit der -35 Promotorregion des *putBCP*-Operons, was dazu führt, dass die RNA-Polymerase nicht mehr an den Promotor binden kann. Dies ändert sich durch das Vorhandensein von externem Prolin. Nach dessen Import in die Zelle reagiert es mit dem

Aktivatorprotein PutR und es kommt zu dessen Bindung an eine regulatorische Region stromabwärts gelegen vom *putBCP*-Operon (16, 99). Die Binderegion von PutR überlappt dabei mit der von CodY und es kommt im Zuge dessen zu einer Verdrängung CodY's, was es der RNA-Polymerase nun ungestört erlaubt an den Promotor zu binden und die Transkription des *putBCP*-Operons einzuleiten (16). Prolin kann (*in vitro*) schon bei Konzentrationen von ca. 0,8 mM die Expression von *putBCP* induzieren (16). Dies ist interessant, da obwohl schon solch geringe Mengen an Prolin genügen, führt der intrazelluläre Prolin Basal-Level von ca. 16 mM *in vivo* nicht zur Induktion des *putB*-Promotors (16). Das selbst synthetisierte Prolin ist also nicht in der Lage die Transkription von *putBCP* zu initiieren, externes Prolin hingegen schon. Hierbei sollte man sich aber nochmal vor Augen führen, dass der Import von Prolin in die Zelle dafür absolut notwendig ist, da es ohne aktiven Transporter auch keine Induktion des *putBCP*-Operons zu beobachten war (Abb. 36). *B. subtilis* kann demnach im Inneren der Zelle zwischen intern synthetisiertem und extern aufgenommenem Prolin unterscheiden. Wie dies geschieht ist nach wie vor ungeklärt.

Da die Biosynthese von Prolin mehr Energie benötigt als dessen Abbau einbringen würde, wäre solch ein Zyklus eine Verschwendung von Energie. Wie also kann solch ein „*futile cycle*“ verhindert werden? *Salmonella typhimurium* entwickelte eine ganz eigene Strategie dafür (57). In *S. typhimurium* ist das intrazellulär synthetisierte Prolin fähig die *put*-Gene zu induzieren, aber unter normalen Wachstumsbedingungen ist der intrazelluläre Prolinpool zu niedrig um dies zu tun (57). Unter hochosmotischen Bedingungen kommt es ebenfalls zu keinem Abbau von Prolin, da die Aktivität der Prolin Oxidase (PutA) durch osmotischen Stress inhibiert wird (57). Erste Untersuchungen der Enzymaktivitäten der Prolin Dehydrogenase (PutB) in *B. subtilis* zeigten, dass die Aktivität von PutB in Anwesenheit von Salz nicht gehemmt wird (138). Demnach verwendet *B. subtilis* nicht sie selbe Strategie wie *S. typhimurium*.

Die beiden Enzyme PutB (Prolin Dehydrogenase) und PutC ( $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenasen) katalysieren die enzymatischen Reaktionen des Abbaus von Prolin über zwei Schritte zu Glutamat (139). Glutamat ist eine sehr bedeutende Verbindung in Bakterien. Sie ist der wichtigste Aminogruppendonor, sie ist an der Herstellung anderer Aminosäuren beteiligt und dient als Vorläufermolekül in der DNA- bzw. RNA-Synthese (76). Dabei überrascht es nicht, das Glutamat mit über 40 % Anteil an der gesamten Metabolit-Konzentration, dass am häufigsten vorkommende Stoffwechselprodukt in Bakterien darstellt (20, 63). Glutamat kann über RocG (Glutamat Dehydrogenase) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat abgebaut

werden (19). RocG ist Teil des Argininabbausystems und die Transkription von *rocG* wird (wie auch *rocABC* und *rocDEF*, siehe oben) durch die beiden positiven Regulatorproteine RocR und AhrC in Zusammenspiel mit SigL aktiviert (48, 54, 67, 68, 134). Das durch PutP aufgenommene Prolin dient hierbei als Induktor. Die Tatsache, dass  $\alpha$ -Ketoglutarat ein Intermediat des Citratzyklus (TCA) ist, zeigt das Glutamat den zentralen Knotenpunkt zwischen dem Stickstoffmetabolismus und dem Kohlenstoffmetabolismus darstellt (46, 47, 76, 173). Dadurch ist es *B. subtilis* auch möglich, Prolin nicht nur als Stickstoffquelle sondern auch als alleinige Kohlenstoffquelle sehr effizient zu nutzen.

### 6.1.5 Peptidnutzung

Peptide sind natürlich in der Umwelt vorkommende Ressourcen. Sie lassen sich in allen von *B. subtilis* (oder anderer *Bacillus*-Arten) bewohnten Gebieten finden: in oberen Bodenschichten, in Salzwassergebieten, auf der Oberfläche von Pflanzenwurzeln, im Inneren von Pflanzen, im Darm von Insekten und anderen Tieren (56, 124). Ihre Bedeutung geht aber weit über die einfache Nutzung als Nährstoff hinaus. Die während dieser Arbeit erhobenen Daten demonstrieren die Fähigkeit von *B. subtilis* Peptide zu nutzen, um sich an hohe externe Osmolaritäten anzupassen (5.2). Nicht alle Peptide eignen sich für diesen Zweck. Einzig prolinhaltige Peptide besitzen eine osmoprotektive Wirkung, da nicht die Peptide selbst, sondern das kompatible Solut Prolin zur Anpassung genutzt wird. In einem ersten Schritt werden die prolinhaltigen Peptide von *B. subtilis* über spezielle Transportsysteme aufgenommen: App, Dpp, Opp (ABC-Transporter) und DtpT (YclF; Einzelkomponententransporter). Während der Transport von Peptiden mittels App, Dpp und Opp bestätigt werden konnte, ist eine Beteiligung von DtpT am Peptidtransport nach wie vor nur eine Vermutung, die auf Vergleiche mit DtpT-artigen Transportern in anderen Organismen beruht. Im zweiten Schritt werden die prolinhaltigen Peptide im Inneren der Zelle von Peptidasen gespalten und das auf diesem Wege befreite Prolin wird für den Aufbau des intrazellulären Prolinpools verwendet, um den Turgor zu stabilisieren (213). Dabei lassen sich die Peptide in zwei Gruppen aufteilen: (i) Peptide mit N-ständigem Prolin, Pro-Xaa und (ii) Peptide mit Prolin an zweiter Stelle, Xaa-Pro bzw. Xaa-Pro-Xaa. Die Peptidasen, die an der Spaltung der ersten Gruppe beteiligt sind, konnten in *B. subtilis* bisher nicht identifiziert werden. Ganz anders sieht es für die Peptidasen mit der zweiten Gruppe als Substrat aus. In *B. subtilis* sind die beiden Prolin Amino-Peptidasen PapA (YqhT) und PapB (YkvY) für deren Spaltung verantwortlich (213). Beide Enzyme besitzen dabei ein ähnliches Substratspektrum, was es *B.*

*subtilis* ermöglichen würde die prolinhaltigen Peptide auch nach dem Ausfall eines der beiden Peptidasen weiterhin für den Aufbau des intrazellulären Prolinpools zu nutzen. Dies fügt eine neue Facette in der Nutzung von Prolin als kompatibles Solut durch *B. subtilis* hinzu. Diese Art des Anpassungsprozesses an hohe Osmolaritäten findet man ebenfalls in *L. monocytogenes*, *L. casei* und *O. oeni* (5, 121, 152, 196, 211). *E. coli* hingegen entwickelte eine gänzlich andere Strategie. Hier beruht der Effekt der Peptide nicht auf deren Spaltung, sondern einfach auf deren Nutzung als zusätzliche Nährstoffquelle (4). *B. subtilis* wurde dahingehend untersucht und die Verwendung prolinhaltiger Peptide als Nährstoffquelle zur Verbesserung des Wachstums bei hohen Osmolaritäten konnte experimentell eindeutig wiederlegt werden (Abb. 20). Nichtsdestotrotz zeigte das extern zugeführte Prolin solch einen Effekt (Abb. 20).

Die Effektivität mit der die prolinhaltigen Peptide *B. subtilis* vor osmotischen Stress schützen variiert beträchtlich (Abb. 18). Vor allem sind nicht alle der getesteten Peptide überhaupt dazu in der Lage. Dies lässt sich an den beiden Dipeptiden Pro-Gly und Gly-Pro deutlich erkennen. Trotz ihrer ähnlichen Zusammensetzung, sind ihre Eigenschaften sehr verschieden. Pro-Gly hat eine osmostress protektive Wirkung auf *B. subtilis*, da es zu dem Aufbau eines intrazellulären Prolinpools führt (Abb. 21). Ganz im Gegensatz dazu ist Gly-Pro keine osmotische Schutzsubstanz. Dies ist bedingt durch dessen Unvermögen den Prolinpool aufzubauen (Abb. 21). Die Unterschiede in der Effektivität der Peptide im Prozess der Anpassung an hohe externe Osmolaritäten könnten sich durch (i) unterschiedliche Transportraten oder (ii) unterschiedliche Spaltungseffizienz der Peptide erklären lassen.

Die Peptidtransportsysteme (App, Dpp, Opp, DtpT) sowie die Prolin Amino-Peptidasen (PapA, PapB) sind an dem Anpassungsprozess von *B. subtilis* an hohe externe Osmolaritäten beteiligt. In diesem Zusammenhang ist es unabdingbar nach der Art der Transkription dieser Gene zu fragen. Strukturelle Gene, die für Proteine kodieren, welche an der Anpassung an hohe Osmolaritäten beteiligt sind, unterliegen in *B. subtilis* sehr oft einer osmotischen Kontrolle (143, 178). Dies ist beispielsweise für das *proHJ*-Operon der Fall, ebenso wie für das *opuE*-Gen (29, 176, 199). Eine genomweite Transkriptom-Analyse Salz gestresster *B. subtilis* Zellen zeigt jedoch, dass weder die Transkription der Gene für den Peptidtransport, noch die der Peptidasen osmotisch induzierbar sind (143). Doch offensichtlich reicht das basale Transkriptions-Level dieser Gene aus, um die prolinhaltigen Peptide zum einen in ausreichender Menge in die Zelle zu transportieren und zum anderen sie in effizientem Maße zu spalten, um *B. subtilis* vor Hyperosmolarität zu schützen.

Die osmoprotektive Wirkung der prolinhaltigen Peptide ist ebenfalls in einem *B. subtilis* Stamm vorhanden, der über eine intakte osmoadaptive Prolinbiosynthese verfügt und beschränkt sich nicht bloß auf die Stämme, wo dies nicht der Fall ist (Abb. 20; Abb. 29). Dies zeigt zum einen die physiologische Relevanz der Peptide für die Anpassung an hohe Osmolaritäten im natürlichen Habitat von *B. subtilis*, offenbart aber auf der anderen Seite auch eine sehr interessante Thematik: der intrazelluläre Prolinpool. *B. subtilis* mit einer intakten osmoadaptiven Prolinbiosynthese ist in der Lage einen sehr großen Prolinpool als Anpassung an hohe Osmolaritäten zu synthetisieren, die Zugabe von prolinhaltigen Peptiden erhöhte diesen jedoch nicht (Abb. 30). Worauf beruht dann der wachstumsfördernde Effekt der Peptide? Der aufgebaute Prolinpool könnte eine Mischung aus eigens synthetisiertem Prolin und dem Prolin aus der Spaltung der prolinhaltigen Peptide sein. *B. subtilis* würde demnach einen Teil der Synthese von Prolin sparen, einem Prozess der sonst sehr viel Energie benötigt (1). Dies könnte den Wachstumsvorteil von *B. subtilis* erklären, der bei hochosmolaren Bedingungen durch die Anwesenheit prolinhaltiger Peptide sichtbar ist.

Bei der Untersuchung der osmoprotektiven Wirkung prolinhaltiger Peptide, wurde eine ungewöhnliche Beobachtung gemacht: die Zugabe von externem Prolin führte in einem *B. subtilis*-Stamm mit defekter osmoadaptiver Prolinbiosynthese, zwar zu einem Wachstumsvorteil unter hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) aber nicht wie eigentlich erwartet zu dem Aufbau eines intrazellulären Prolinpools (Abb. 28; Abb. 30). Der fehlende Prolinpool kann mit dem Vorhandensein des Prolinabbau-Systems (PutBCP) erklärt werden. Zum einen führte die Zugabe des externen Prolins zu einer Induktion des *putBCP*-Operons (Abb. 31) und zum anderen kam es nun durch die Deletion von *putBCP* zu dem Aufbau des intrazellulären Prolinpools (Abb. 30). Prolin wirkt in *B. subtilis* eben nicht nur als kompatibles Solut, sondern kann eben auch zu Glutamat abgebaut werden. Solch ein Phänomen ist dabei nicht auf *B. subtilis* beschränkt. In *Sinorhizobium meliloti* beispielsweise wirkt Ectoin ebenfalls als kompatibles Solut wachstumsfördernd bei hochosmolaren Bedingungen (188). Es wird aber, wie es bei *B. subtilis* und Prolin auch der Fall ist, von *S. meliloti* nicht akkumuliert (188). Statt dessen regt es die Synthese anderer kompatibler Solute, wie Glutamat und Trehalose an (188). Von ganz entscheidender Bedeutung ist hier, dass *S. meliloti* in der Lage ist Ectoin zu verstoffwechseln (102). *B. subtilis* ist fähig Prolin abzubauen (139). Es stellt für Bakterien anscheinend eine große physiologische Herausforderung dar, wenn ein kompatibles Solut gleichzeitig als osmotische Schutzsubstanz und als Nahrungsquelle fungiert. In solch einem Fall muss sichergestellt werden, das es nicht

zu einer Vermischung beider physiologischer Aufgaben kommt. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Prolin nicht nur das einzige kompatible Solut ist, welches von *B. subtilis* *de novo* synthetisiert wird, sondern ebenso das einzige, was als Nährstoff verstoffwechselt werden kann (26).

### 6.1.6 Vernetzung des Argininabbaus mit der Prolinbiosynthese

Die während dieser Arbeit erhobenen Daten demonstrieren die Fähigkeit von *B. subtilis* die defekte anabole Prolinbiosynthese durch die Akkumulation von Suppressor Mutationen zu umgehen (5.1). Hierfür wurde der Argininabbau-Weg genutzt. Zwei Klassen von Mutationen konnten identifiziert werden: (I) einzelner Aminosäureaustausch im Aktivatorprotein RocR führt zu teilweise induktor unabhängigen RocR\*-Proteinen; (II) Mutationen in der Promotorregion von *rocDEF* führen zur Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors. In beiden Fällen kam es durch die Mutationen zu einer erhöhten Transkription des *rocDEF*-Operons, was eine Erhöhung der Menge an RocD (Ornithin Aminotransferase) in der Zelle zur Folge hatte. RocD als Teil des Argininabbau-Weges synthetisiert dabei dasselbe Produkt wie ProA:  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd (15, 60, 67). Diese Verbindung kann dann mittels der  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase (ProI, ProH, ProG) zu Prolin umgewandelt werden (17). Die Rekrutierung des Argininabbau-Weges erlaubt somit die Umgehung der ProB- und ProA-vermittelten Enzymreaktionen der anabolen Prolinbiosynthese. Es kommt aber nicht nur zu einer bloßen Erhöhung der Transkription des *rocDEF*-Operons, sondern in den isolierten Suppressor Mutanten hat sich auch ein neuer regulatorischer Mechanismus entwickelt.

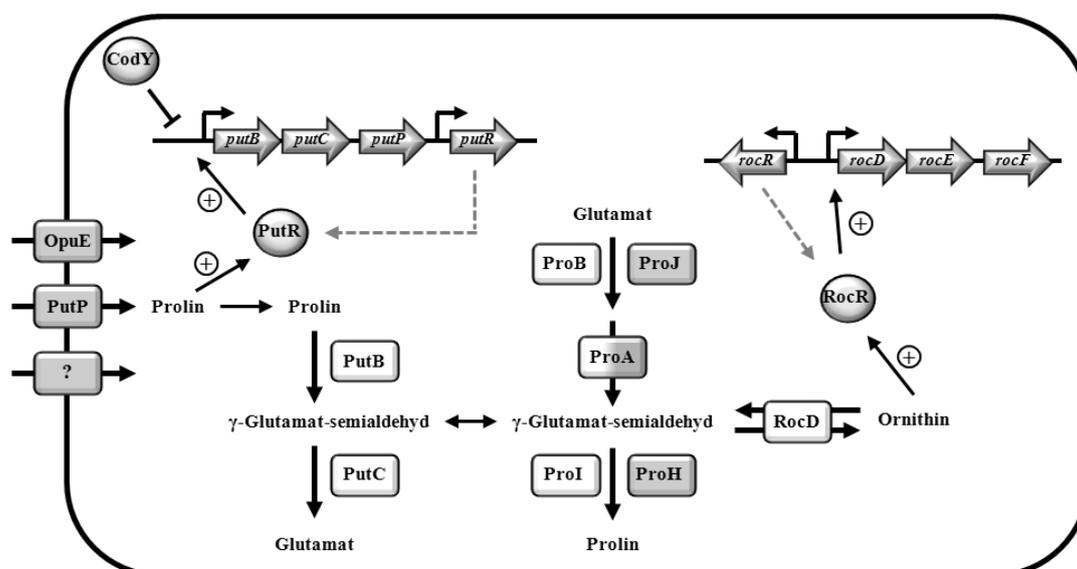
In den Klasse I Suppressor-Stämmen kommt es durch Punktmutationen in dem Aktivator RocR zur Bildung von RocR\*-Proteinen, die auch ohne Induktor in der Lage sind die Transkription des *rocDEF*-Operons zu aktivieren (Tabelle 5). Wie ist dies möglich? RocR gehört zu der NtrC/NifA Familie der *enhancer*-bindenden Proteine (32, 40) und besteht (wie auch andere Mitglieder dieser Familie) aus drei Domänen: N-terminale Domäne, Zentrale Domäne und C-terminale Domäne (68, 123). Die N-terminale Domäne ist an der Erkennung des Induktors involviert, wohingegen die Zentrale Domäne an der transkriptionellen Aktivierung und die C-terminale Domäne an der DNA-Bindung beteiligt sind (68). Im inaktiven Zustand von RocR interagiert die N-terminale Domäne mit der Zentralen Domäne. Die Bindung des Induktors führt dann zur Freisetzung des inhibierenden Effektes der N-terminalen Domäne, was zu einer Aktivierung von RocR führt. Schon in der Studie von Gardan *et al.* 1997 zeigte sich, dass die Interaktion der N-terminalen mit der Zentralen

Domäne durch Punktmutationen in einer der beiden Domänen gestört werden kann, was es RocR auch ohne Induktor befähigt die Transkription von *rocDEF* zu aktivieren (68). Dies lässt sich auch auf die hier isolierten Suppressor-Stämme anwenden, da in drei Fällen die Punktmutationen in der N-terminalen Domäne und in fünf Fällen in der Zentralen Domäne auftraten und die Expression der *rocD-lacZ*-Fusion ohne Induktor überall zu beobachten war (Abb. 15; Tabelle 5).

In den Klasse II Suppressor-Stämmen kommt es durch Punktmutationen im Promotor des *rocDEF*-Operons zur Aktivierung eines neuen Promotors. Ein ganz besonders interessanter Effekt offenbarte sich dann bei der Untersuchung des Einflusses dieser Mutationen (SigA-P1 und SigA-P2) auf die Transkription der *rocD-lacZ*-Fusion: eine erhöhte Transkription in Abwesenheit von SigL (Tabelle 6). Die Transkription des *rocDEF*-Operons erfolgt in Abhängigkeit des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^L$  (SigL) von einem spezifischen -12/-24 Promotor aus (67, 68). SigL bindet dabei zusammen mit der RNA-Polymerase an die -12/-24 Promotorregionen der DNA und es bildet sich ein geschlossener SigL/RNA-Polymerase-Komplex, der inaktiv ist (62). Das bedeutet, dass die Transkription der nachfolgenden Gene in diesem Stadium nicht möglich ist. Kommt es aber zu einer Interaktion mit einem transkriptionellen Regulator, welcher selbst erst mal durch die Bindung von Induktoren aktiviert werden muss (im Falle der Argininabbau-Gene ist dies RocR), so öffnet sich dieser Komplex, der Sigmafaktor wird freigesetzt und es wird die Transkription initiiert (32, 40, 62). Die Suppressor-Mutationen der Klasse II (SigA-P1, SigA-P2) führten zu der Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors des *rocDEF*-Operons. Dessen -10/-35 Promotorregion überlappt aber mit dem natürlichen -12/-24 Promotor. Durch die Bildung des geschlossenen SigL-RNA-Komplexes und bedingt durch eben diese Überlappung beider Promotoren wird der Zugang von SigA erschwert (157), was sich in der geringen Expressionsrate der *rocD-lacZ*-Fusion zeigt (Tabelle 6). Bei dem Fehlen von SigL hingegen kann SigA ungestört an die -35/-10 Promotorregion des *rocDEF*-Operons binden, was die gesteigerte Transkription der *rocD-lacZ*-Fusion erklärt (Tabelle 6).

Es zeigte sich, dass in *B. subtilis* die Induktion des *rocDEF*-Operons durch Prolin nur in Anwesenheit von RocD möglich war (67, 68). Es wurde in diesem Zusammenhang die mögliche Beteiligung der Rückreaktion von RocD diskutiert (68). Dies würde zur Umwandlung von  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd in Ornithin führen, dem mit aller Wahrscheinlichkeit wahren Induktor des *rocDEF*-Operons (Abb. 38).  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd wird von *B. subtilis* als Intermediat in der Prolinbiosynthese gebildet. In den

Suppressor-Stämmen kommt es aber auf diesem Weg nicht zu dessen Bildung, da durch die Deletion von *proA* (bzw. *proBA*) die Prolinbiosynthese gestört ist. Es gibt aber noch eine weitere Möglichkeit  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd zu produzieren, da es ebenso aus dem Abbau von Prolin durch die Enzyme PutB und PutC hergestellt werden kann (139). Die Expression der Prolinabbau-Gene (*putBCP*) wird durch externes Prolin induziert, indem es mit dem Aktivator PutR reagiert, was dessen Bindung an den Promotorbereich von *putBCP* mit gleichzeitiger Verdrängung des Repressors CodY zur Folge hat (Abb. 38) (16, 99, 139). Führt man sich noch einmal die erhöhte Expression der *rocD-lacZ*-Fusion der Klasse I und II Suppressor-Mutationen vor Augen (Tabelle 5; Tabelle 6), so könnte sie durch folgendes Szenario erklärt werden. Die Zugabe von externem Prolin führt nach dessen Import zur Expression des *putBCP*-Operons, was die Bildung von  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd durch PutB zur Folge hat (139). Die vorgeschlagene Umkehrung der Reaktion von RocD könnte dann das neu gebildete  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd zu Ornithin umwandeln, was zur Expression des *rocDEF*-Operons führen würde (Abb. 38). Die in den Suppressor-Mutationen der Klasse I (RocR\*) und der Klasse II (SigA-P1, SigA-P2) erhöhte Menge an RocD in der Zelle, könnte dieses Phänomen verstärken, was die erhöhte Expression der *rocD-lacZ*-Fusion in den Suppressor-Stämmen in Anwesenheit von Prolin erklären würde (Tabelle 5; Tabelle 6). Demnach fungiert Prolin nicht als eigentlicher Induktor für RocR, sondern muss erst in dessen (Ornithin) umgewandelt werden.



**Abb. 38: Modell für die Induktion der Transkription des *rocDEF*-Operons durch externes Prolin.**

Dargestellt ist ein mögliches Modell zu der durch Prolin induzierten Transkription des *rocDEF*-Operons. Hierfür wird die Beteiligung des Prolinabbau-Weges vorgeschlagen. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text.

Das Fehlen von ProA kann aber nicht nur durch die Rekrutierung des Argininabbau-Weges ausgeglichen werden, der Argininbiosynthese-Weg ist ebenfalls dazu geeignet. In *E. coli* und *Salmonella typhimurium* kam es durch die Deletion von *proA* ebenfalls zu Mutationen, die bei diesen Bakterien aber die Inaktivierung von ArgD (einem Enzym der Argininbiosynthese) zur Folge hatten (21, 116). Dadurch kam es zu einem Block in der Argininbiosynthese und es häufte sich das Zwischenprodukt N-acetylglutamat- $\gamma$ -semialdehyd an. Dies hatte zur Folge, dass ArgJ (dessen eigentliches Substrat N-acetylorithin ist) nun N-acetylglutamat- $\gamma$ -semialdehyd unspezifisch in  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd umwandelte. Im Zuge dessen kam es somit zur Entwicklung eines völlig neuen Stoffwechselschrittes in *E. coli* und *Salmonella typhimurium*. Dieser Mechanismus zur Umgehung der *proA* Deletion steht im Gegensatz zu dem Mechanismus der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Suppressor-Stämme. Hier kommt es zwar ebenfalls zur Erhöhung der Menge an produziertem  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd, doch geschieht dies auf direktem Weg, durch die Erhöhung von RocD, einem Enzym das direkt Ornithin in  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd umwandelt. Dies geschieht auf regulatorischer Ebene unter Einbeziehung eines vorhandenen Stoffwechselschrittes, durch Veränderungen der Eigenschaften des Aktivatorproteins RocR oder der Aktivierung eines kryptischen Promotors des *rocDEF*-Operons.

In der Natur gibt es eine Reihe von Beispielen, in denen sich Bakterien durch Mutationen gezielt an ändernde Bedingungen durch die Entwicklung neuer regulatorischer Mechanismen anpassen können. Mehrere Strategien sind dabei möglich. (i) Veränderung von transkriptionellen Regulatoren: *Geobacter sulfurreducens* ist ein Mikroorganismus, der unter normalen Bedingungen nicht auf Laktat wachsen kann (34). Überimpft man ihn jedoch in Laktat-haltiges Medium, so kommt es zu einer Anpassung von *G. sulfurreducens*, so dass dieser nun effizient auf Laktat als alleinigen Elektronendonator wachsen kann. Dies ermöglichte der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb des transkriptionellen Regulators, GSU0514 (182). (ii) Hochregulation von Promotoren: *Lactococcus lactis* kann Laktose nicht verstoffwechseln (70). Dies ändert sich jedoch durch Mutationen innerhalb der Promotorregion des Cellobiose-Genclusters (171). Dadurch kommt es zur Aktivierung und Hochregulation des unter normalen Bedingungen kryptischen (d.h. nicht exprimierten) Cellobiose-Genclusters, was es *L. lactis* ermöglicht nun doch auf Laktose zu wachsen (171). (iii) Schaffung neuer Stoffwechselwege: Die Deletion des *gshA*-Genes in *E. coli* bewirkt einen Defekt in der Glutathionsynthese, welche normalerweise durch die Enzyme GshA und GshB katalysiert wird (194). Dieser Defekt führt in *E. coli* zu der Ausbildung von Suppressor-

Mutationen in *proB* und *proA* und schuf damit einen ganz neuen Stoffwechselweg, mit dem es möglich war Glutathion auch ohne GshA zu synthetisieren (194). Die Umgehung von ProA in *B. subtilis* sowie auch diese Beispiele zeigen wie schnell und effizient Bakterien sich durch einfache Punktmutationen an verändernde Bedingungen durch die Schaffung/Rekrutierung von Stoffwechselwegen anpassen können.

Die Akkumulation von Mutationen die das Wachstum entweder wieder herstellen, oder schnelleres Wachstum erlauben, ist dabei ein übliches Phänomen bei den Bakterien (77). Es zeigte sich das Mutationen, die dabei halfen spezielle Limitationen zu überwinden, dabei vorzugsweise akkumuliert wurden (12, 36, 77). Die Ansammlung von Mutationen geschieht überwiegend während der DNA-Replikation, wobei die meisten durch spezielle DNA-Mismatch-Reparatur-Mechanismen (MMR) mittels des MutSL-Systems beseitigt werden (66, 71, 137). Eine geringe Genauigkeit in der DNA-Replikation und damit einhergehend in den Reparatur-Mechanismen dient der Evolution von Arten, der Entwicklung der Artenvielfalt und in diesem Zusammenhang besonders wichtig, es führt zu einem höheren Überleben von Bakterien sollten sie wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt sein (114). Mutationen können also von Vorteil für Bakterien sein. *B. subtilis* (wie auch andere Bakterien) besitzt ein System für die Induktion von Mutationen während der stationären Phase, die sogenannte adaptive Mutagenese (183). Ein Phänomen, was bei Bakterien auftritt, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden, sich demnach aufgrund von Nahrungslimitationen nicht mehr teilen können (35, 82, 183). Das Auftreten dieser Mutationen ist dabei eher mit der Transkription als mit der DNA-Replikation assoziiert und ist ein Beispiel dafür, dass die Anpassung der Bakterien auch auf genomischer Ebene geschieht (77). Die Akkumulation von Suppressor Mutationen herbeigeführt durch einen Defekt in der anabolen Prolinbiosynthese, zeigt an einem konkreten Beispiel wie Bakterien sich sehr schnell an Veränderungen innerhalb essentieller Stoffwechselwege anpassen können: (i) Bakterien machen sich andere Stoffwechselwege zunutze; (ii) Bakterien entwickeln neue regulatorische Mechanismen. Es zeigt, dass Anpassungen auf genomischer Ebene sogar zu einer Ausdehnung der Stoffwechsellleistungen von Bakterien führen können. Dies könnte dazu beitragen den evolutionären Erfolg von Bakterien sicherzustellen.

### **6.1.7 Prolin „recycle“ Kreislauf**

Ein Anstieg der extrazellulären Salzkonzentration hat zur Folge, das *B. subtilis* sich an die hohe Osmolarität anpassen muss, um den unkontrollierten Ausstrom von Wasser aus der

Zelle zu verhindern (26, 27). Dafür häuft *B. subtilis* das kompatible Solut Prolin in der externen Osmolarität angemessenen Konzentration im Inneren der Zelle an und erzeugt damit einen intrazellulären Prolinpool (151). Die Aktivität des Prolintransporters PutP wird durch hohe Salzkonzentrationen gehemmt und kann deshalb diese Aufgabe nicht übernehmen (139). Für diesen Fall besitzt *B. subtilis* einen zweiten osmotisch regulierten Prolintransporter OpuE (199). Er ist in der Lage die hohen Konzentrationen an Prolin, die benötigt werden um sich an die äußeren Salzkonzentrationen anzupassen, aus der Umgebung aufzunehmen (176, 199). Dies ist möglich, da die Transkription von *opuE* bei hochosmolaren Bedingungen durch zwei verschiedene Typen von Promotoren reguliert wird, dem vegetativen SigA- und dem Stressbedingten SigB-abhängigen Promotor (176). Das *opuE*-Gen gehört demnach zu dem generellen Stress-Regulon in *B. subtilis* (142). Dies ist aber nicht die alleinige Aufgabe von OpuE.

OpuE ist außerdem an einem Prolin „recycle“ Kreislauf beteiligt, einem Mechanismus der auch bei anderen salz-gestressten Bakterien zu finden ist (93, 119, 181). Hierzu wird kontinuierlich ein Teil des synthetisierten Prolins aus der Zelle über einen noch unbekanntem Mechanismus (vermutlich über einen Exporter) heraustransportiert und anschließend in sehr effizientem Maße über OpuE wieder in die Zelle hereingeholt (93). Bei einem Verlust von OpuE kann das Prolin nicht wieder zurückgeholt werden und es kommt deshalb zu einem Prolinpool, der für eine effiziente Anpassung an hohe Osmolaritäten nicht ausreichend ist. Der Versuch seitens *B. subtilis* dies durch eine gesteigerte Prolinbiosynthese zu kompensieren, bleibt dabei aber erfolglos (93). Diese Zellen besitzen einen extremen Wachstumsnachteil bei hohen Osmolaritäten gegenüber Zellen mit intaktem OpuE.

Auf den ersten Blick scheint solch ein „recycle“ Zyklus eine Verschwendung an Energie zu sein. Er kann aber zur Feinabstimmung des Turgors verwendet werden. Dies könnte ein Notfallsystem der Zelle sein, da der Turgor entscheidend für das Überleben einer Zelle ist (210). Die herrschenden äußeren Salzkonzentrationen bleiben nicht auf einem konstanten Level, sondern befinden sich so wie alles in ständigem Wechsel. Der „recycle“ Kreislauf kann von *B. subtilis* genutzt werden um solchen Schwankungen entgegenzuwirken.

### 6.1.8 Prolintransport

Die während dieser Arbeit erhobenen Daten demonstrieren, dass *B. subtilis* neben PutP, der Prolin für katabole Zwecke in die Zelle transportiert und dem osmotisch induzierten Transporter OpuE, noch einen weiteren Transporter für Prolin besitzt (Abb. 38). Auch wenn

er in dieser Arbeit nicht eindeutig identifiziert werden konnte, so wissen wir doch schon eine Menge über ihn. Zum einen ist er bei hohen Osmolaritäten nicht aktiv (Abb. 33) und zum anderen ist er ein niederaffiner Transporter. Die letzte Eigenschaft zeigt sich bei der Messung des Prolintransportes in einer *putP/opuE*-Doppelmutante. In ihr konnte auch bei der Zugabe von 40 µl Prolin kein Transport von Prolin nachgewiesen werden (138). Die eingeleitete Genom-Resequenzierung eines Stammes der nachweislich kein Prolin mehr in die Zelle transportieren kann, da er nicht mehr fähig ist mit Prolin als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen (Abb. 35), sowie die Entwicklung eines genetischen Screening-Verfahrens, öffnete nun die Tür für die Identifizierung des unbekanntes dritten Transporters. Seiner physiologischen und biochemischen Charakterisierung, sowie der Aufklärung seiner allgemeinen Bedeutung am Prolintransport in *B. subtilis* stünde dann nichts mehr im Wege.

Prolin in seiner Gesamtheit ist also mehr als wichtig für das Bodenbakterium *B. subtilis*. Prolin kann nicht nur mittels verschiedenster Biosynthesewege *de novo* synthetisiert werden, sondern es ist sowohl als Prolin selbst oder als dessen Vorläufer in prolinhaltigen Peptiden natürlicherweise im Habitat von *B. subtilis* vorhanden. Alle Geheimnisse des Prolinmetabolismus sind auch nach Abschluss dieser Arbeit nicht vollständig gelüftet. Doch was haben wir nun neues erfahren? Zum einen ist *B. subtilis* in der Lage einen Defekt in der anabolen Prolinbiosynthese durch die Rekrutierung des Argininabbau-Weges für die Prolin Neusynthese ausgleichen zu können. Zum anderen besitzen prolinhaltige Peptide osmoprotektive Eigenschaften für *B. subtilis*, da nach deren Spaltung das freigesetzte Prolin zum Aufbau des intrazellulären Prolinpools zum Schutz gegen osmotischen Stress genutzt werden kann. Und nicht zu vergessen besitzt *B. subtilis* einen dritten (noch unbekanntes) Prolintransporter, der genauso wie PutP oder (bei hochosmolaren Bedingungen) OpuE Prolin in die Zelle transportiert, was die Voraussetzung zur Induktion der Transkription der Prolinabbau-Gene ist. Künftige Untersuchungen zur Enthüllung weiterer Facetten Prolins in *B. subtilis* sind aber nach wie vor unabdingbar.

## 6.2 Ausblick

Die Aminosäure Prolin spielt in *B. subtilis* eine große Rolle in der Synthese von Proteinen, als osmotische Schutzsubstanz, sowie als Nahrungsquelle. Neben der „klassischen“ Prolinbiosynthese (anabole und osmoadaptive) und dessen Aufnahme durch die bekannten Transporter PutP und OpuE besitzt *B. subtilis* weitere Möglichkeiten Prolin zu gewinnen:

**(i) Die Prolinbiosynthese ausgehend vom Argininabbau (5.1).** Sie ist zwar unter physiologischen Bedingungen nur von untergeordneter Bedeutung, aber durch einfache Punktmutationen im Genom von *B. subtilis* kann dies geändert werden. Dabei kommt es zu einem Anstieg der Transkription der Argininabbau-Gene, was zu einer gesteigerten Umwandlung von Arginin (über Ornithin) zu  $\gamma$ -Glutamat-semialdehyd führt, einer wichtigen Zwischenstufe in der Synthese von Prolin. Bei der Untersuchung dieser Punktmutationen konnten bisher zwei Klassen charakterisiert werden. In der Klasse I kommt es zur Bildung teilweise induktoren unabhängiger RocR\*-Proteinen, wohingegen es in der Klasse II zur Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors des *rocDEF*-Operons. Eine dritte Klasse wurde zwar identifiziert, deren Mutationsort, sowie deren zugrundeliegender Mechanismus konnten bislang aber nicht aufgeklärt werden. Der Ansatz der Genom-Resequenzierung in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Daniel und dem Göttinger Genomics Laboratory wurde eingeleitet und könnte diesbezüglich in der Zukunft Aufschluss geben.

**(ii) Die Nutzung prolinhaltiger Peptide als Prolin-Quelle (5.2).** Peptide werden von *B. subtilis* über spezifische Peptidtransporter in die Zelle transportiert und anschließend unter Verwendung von Peptidasen gespalten. Das freigesetzte Prolin wird dann sowohl für die Proteinbiosynthese, als auch zur Akkumulation als osmotische Schutzsubstanz bei hochosmolaren Bedingungen verwendet. Die beiden Peptidasen PapA (YqhT) und PapB (YkvY), die an der Spaltung von Xaa-Pro bzw. Xaa-Pro-Xaa Peptiden involviert sind konnten identifiziert und physiologisch charakterisiert werden. Eine Identifizierung der an der Spaltung der Pro-Xaa Peptide beteiligten Peptidasen erfolgte bislang nicht. Ausgedehntere *in silico*-Analysen und die Untersuchung weiterer Deletions-Stämme könnte dies in Zukunft ändern.

**(iii) Die Aufnahme von externem Prolin über einen dritten Prolintransporter (5.3).** Prolin wird als Nährstoff über PutP oder als osmotische Schutzsubstanz über OpuE bei Hyperosmolarität aufgenommen. Trotz Deletion beider Transporter kommt es nach wie vor (unter isoosmotischen Bedingungen) zu einem Import von Prolin. *B. subtilis* besitzt demzufolge einen weiteren Prolintransporter (Abb. 37), der osmotisch sensitiv ist. Zwei mögliche Kandidaten (YodF, YwcA) wurden untersucht und deren Beteiligung am Prolintransport konnte ausgeschlossen werden. Ein genetisches Verfahren unter Verwendung von Transposons und einem anschließenden Screenings auf Agar-Platten mit toxischen Prolinanaloga kann in Zukunft zur Identifizierung des unbekanntes Prolintransporters führen.

## DISKUSSION

---

Die während dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse trugen zu einem deutlich besseren Verständnis der unterschiedlichen physiologischen Rollen von Prolin in *B. subtilis* bei. Es wurden aber im Zuge dessen auch eine ganze Reihe neuer Fragen aufgeworfen, die es nun zu beantworten gilt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Akashi H & Gojobori T** (2002) Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(6):3695-3700.
2. **Ali NO, Jeusset J, Larquet E, Le Cam E, Belitsky B, Sonenshein AL, Msadek T, & Debarbouille M** (2003) Specificity of the interaction of RocR with the *rocG-rocA* intergenic region in *Bacillus subtilis*. *Microbiology-Sgm* **149**:739-750.
3. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
4. **Amezaga MR & Booth IR** (1999) Osmoprotection of *Escherichia coli* by peptone is mediated by the uptake and accumulation of free proline but not of proline-containing peptides. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12):5272-5278.
5. **Amezaga MR, Davidson I, McLaggan D, Verheul A, Abee T, & Booth IR** (1995) The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology-Uk* **141**:41-49.
6. **Anonymous** (1969) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. *The Biochemical journal* **113**(1):1-4.
7. **Arnold K, Bordoli L, Kopp J, & Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**(2):195-201.
8. **Azevedo EC, Rios EM, Fukushima K, & Campostakaki GM** (1993) Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. extraction, purification, and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **42**(1):1-9.
9. **Bacher A, Eberhardt S, Fischer M, Kis K, & Richter G** (2000) Biosynthesis of vitamin B-2 (riboflavin). *Annual Review of Nutrition* **20**:153-167.
10. **Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, et al.** (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**:1758-1775.
11. **Barile M, Brizio C, Valenti D, De Virgilio C, & Passarella S** (2000) The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **267**(15):4888-4900.
12. **Barrick JE, Yu DS, Yoon SH, Jeong H, Oh TK, Schneider D, Lenski RE, & Kim JF** (2009) Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**(7268):1243-U1274.
13. **Barzantny H** (2008) Aufnahme und Verwertung von Prolin und prolinhaltigen Peptiden unter hyperosmolaren Umweltbedingungen in *Bacillus subtilis*. *Diplomarbeit:Philipps-Universität Marburg*.
14. **Bates LS, Waldren RP, & Teare ID** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**:205-207.

15. **Baumberg S & Harwood CR** (1979) Carbon and nitrogen repression of arginine catabolic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **137**(1):189-196.
16. **Belitsky BR** (2011) Indirect Repression by *Bacillus subtilis* CodY via Displacement of the Activator of the Proline Utilization Operon. *Journal of Molecular Biology* **413**(2):321-336.
17. **Belitsky BR, Brill J, Bremer E, & Sonenshein AL** (2001) Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183**(14):4389-4392.
18. **Belitsky BR & Sonenshein AL** (1997) Altered transcription activation specificity of a mutant form of *Bacillus subtilis* GltR, a LysR family member. *Journal of Bacteriology* **179**(4):1035-1043.
19. **Belitsky BR & Sonenshein AL** (1998) Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. *Journal of Bacteriology* **180**(23):6298-6305.
20. **Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Van Dien SJ, & Rabinowitz JD** (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* **5**(8):593-599.
21. **Berg CM & Rossi JJ** (1974) Proline excretion and indirect suppression in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **118**(3):928-939.
22. **Bischoff DS, Bourret RB, Kirsch ML, & Ordal GW** (1993) Purification and characterization of *Bacillus subtilis* CheY. *Biochemistry* **32**(35):9256-9261.
23. **Boch J, Kempf B, & Bremer E** (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of Bacteriology* **176**(17):5364-5371.
24. **Boch J, NauWagner G, Kneip S, & Bremer E** (1997) Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Archives of Microbiology* **168**(4):282-289.
25. **Boylan SA, Redfield AR, Brody MS, & Price CW** (1993) Stress-induced activation of the  $\sigma^B$  transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **175**(24):7931-7937.
26. **Bremer E** (2002) Adaptation to changing osmolarity. *Bacillus subtilis and its closest relatives*, eds Sonenshein AL, Hoch JA, & Losick R (ASM Press, Washington, D.C.), pp 385-391.
27. **Bremer E & Krämer R** (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial stress responses*, eds Storz G & Hengge-Aronis R (ASM, Washington, D.C.), pp 79-97.
28. **Brill J** (2001) Biosynthese und Anhäufung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels *de novo* Synthese und Aufnahme prolinhaltiger Peptide in *Bacillus subtilis*. *Dissertation. Philipps-Universität Marburg*.
29. **Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, & Bremer E** (2011) Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *Journal of Bacteriology* **193**(19):5335-5346.

30. **Brill J, Hoffmann T, Putzer H, & Bremer E** (2011) T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **157**.
31. **Brown AD** (1976) Microbial water stress. *Bacteriological Reviews* **40**(4):803-846.
32. **Bush M & Dixon R** (2012) The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of sigma(54)-Dependent Transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**(3):497-529.
33. **Buxton RS** (1980) Selection of *Bacillus subtilis* mutants with deletions of the PBSX prophage. *Journal of General Virology* **46**:427-437.
34. **Caccavo F, Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, & McInerney MJ** (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(10):3752-3759.
35. **Cairns J & Foster PL** (1991) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **128**(4):695-701.
36. **Cairns J, Overbaugh J, & Miller S** (1988) The origin of mutants. *Nature* **335**(6186):142-145.
37. **Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, & Agre P** (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**(49):29063-29066.
38. **Calamita G, Kempf B, Bonhivers M, Bishai WR, Bremer E, & Agre P** (1998) Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene aqpZ. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **95**(7):3627-3631.
39. **Caldwell R, Sapolsky R, Weyler W, Maile RR, Causey SC, & Ferrari E** (2001) Correlation between *Bacillus subtilis* scoC phenotype and gene expression determined using microarrays for transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology* **183**(24):7329-7340.
40. **Calogero S, Gardan R, Glaser P, Schweizer J, Rapoport G, & Debarbouille M** (1994) RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *Journal of Bacteriology* **176**(5):1234-1241.
41. **Cano RJ & Borucki MK** (1995) Revival and identification of bacterial-spores in 25- to 40-million-year-old dominican amber. *Science* **268**(5213):1060-1064.
42. **Cheggour A, Fanuel L, Duez C, Joris B, Bouillenne F, Devreese B, Van Driessche G, Van Beeumen J, et al.** (2000) The dppA gene of *Bacillus subtilis* encodes a new D-aminopeptidase. *Molecular Microbiology* **38**(3):504-513.
43. **Chen M, Cao J, Zheng C, & Liu Q** (2006) Directed evolution of an artificial bifunctional enzyme, gamma-glutamyl kinase/gamma-glutamyl phosphate reductase, for improved osmotic tolerance of *Escherichia coli* transformants. *Fems Microbiology Letters* **263**(1):41-47.
44. **Chen MQ, Wei HB, Cao JW, Liu RJ, Wang YL, & Zheng CY** (2007) Expression of *Bacillus subtilis* proBA genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Journal Of Biochemistry And Molecular Biology* **40**(3):396-403.

45. **Commichau F** (2006) Regulation der Glutamatsynthese in *Bacillus subtilis* durch die Glutamatdehydrogenase RocG und das Aktivatorprotein GltC. *Dissertation*:Georg-August-Universität zu Göttingen.
46. **Commichau FM, Forchhammer K, & Stulke J** (2006) Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology* **9**(2):167-172.
47. **Commichau FM, Gunka K, Landmann JJ, & Stuelke J** (2008) Glutamate metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *Journal of Bacteriology* **190**(10):3557-3564.
48. **Commichau FM, Wacker I, Schleider J, Blencke H-M, Reif I, Tripal P, & Stuelke J** (2007) Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **12**(1-2):106-113.
49. **Corratge-Faillie C, Jabnoute M, Zimmermann S, Very AA, Fizames C, & Sentenac H** (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**(15):2511-2532.
50. **Craig LC, Gregory JD, & Barry GT** (1949) Purity studies on polypeptide antibiotics: bacitracin. *Journal of Clinical Investigation* **28**(5):1014-1017.
51. **Csonka LN** (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Review* **53**(1):121-147.
52. **Curtis TP & Sloan WT** (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **7**(3):221-226.
53. **Cutting SM & Vander Horn PB** (1990) Genetic analysis. *Molecular biological methods for Bacillus*, eds Harwood CR & Cutting SM (John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK), pp pp. 27-74.
54. **Debarbouille M, Martinverstraete I, Kunst F, & Rapoport G** (1991) The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of sigma 54 from Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(20):9092-9096.
55. **Dolezal M** (2006) Die stressprotektive Wirkung von Aminosäuren in *Bacillus subtilis*: Endogene Synthese von Prolin und die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat zum Schutz vor Hyperosmolarität und Hitze. *Dissertation*. *Philipps-Universität Marburg*.
56. **Earl AM, Losick R, & Kolter R** (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **16**(6):269-275.
57. **Ekena K & Maloy S** (1990) Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: How do cells avoid a futile cycle? *Molecular & General Genetics* **220**(3):492-494.
58. **Fang G, Konings WN, & Poolman B** (2000) Kinetics and substrate specificity of membrane-reconstituted peptide transporter DtpT of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **182**(9):2530-2535.

59. **Fischer KE & Bremer E** (2012) Activity of the osmotically regulated *yqiHIK* promoter from *Bacillus subtilis* is controlled at a distance. *Journal of Bacteriology* **194**(19):5197-5208.
60. **Fisher SH** (1993) Utilization of amino acids and other nitrogen-containing compounds. *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, eds A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, & Losick R (ASM Press, Washington, DC), pp 221-235.
61. **Foster PL** (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **42**(5):373-397.
62. **Friedman LJ & Gelles J** (2012) Mechanism of Transcription Initiation at an Activator-Dependent Promoter Defined by Single-Molecule Observation. *Cell* **148**(4):679-689.
63. **Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikevich A, Wiehlmann L, & Schomburg D** (2010) How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental Microbiology* **12**(6):1734-1747.
64. **Fujisawa M, Ito M, & Krulwich TA** (2007) Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(33):13289-13294.
65. **Fujisawa M, Wada Y, & Ito M** (2004) Modulation of the K<sup>+</sup> efflux activity of *Bacillus subtilis* YhaU by YhaT and the C-terminal region of YhaS. *Fems Microbiology Letters* **231**(2):211-217.
66. **Fukui K** (2010) DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *Journal of nucleic acids* **2010**.
67. **Gardan R, Rapoport G, & Debarbouille M** (1995) Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **249**(5):843-856.
68. **Gardan R, Rapoport G, & Debarbouille M** (1997) Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **24**(4):825-837.
69. **Garrity LF & Ordal GW** (1997) Activation of the CheA kinase by asparagine in *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Microbiology-Uk* **143**:2945-2951.
70. **Gasson MJ** (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic Streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology* **154**(1):1-9.
71. **Ginetti F, Perego M, Albertini AM, & Galizzi A** (1996) *Bacillus subtilis* *mutS mutL* operon: Identification, nucleotide sequence and mutagenesis. *Microbiology-Uk* **142**:2021-2029.
72. **Glekas GD, Mulhern BJ, Kroc A, Duelfer KA, Lei V, Rao CV, & Ordal GW** (2012) The *Bacillus subtilis* Chemoreceptor McpC Senses Multiple Ligands Using Two Discrete Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **287**(47).
73. **Gotsche S & Dahl MK** (1995) Purification and characterization of the phospho-alpha(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **177**(10):2721-2726.

74. **Green NJ, Grundy FJ, & Henkin TM** (2010) The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *Febs Letters* **584**(2):318-324.
75. **Guerrero R & Berlanga M** (2006) Life's unity and flexibility: the ecological link. *International Microbiology* **9**(3):225-235.
76. **Gunka K & Commichau FM** (2012) Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Molecular Microbiology* **85**(2):213-224.
77. **Gunka K, Tholen S, Gerwig J, Herzberg C, Stuelke J, & Commichau FM** (2012) A High-Frequency Mutation in *Bacillus subtilis*: Requirements for the Decryptification of the gudB Glutamate Dehydrogenase Gene. *Journal of Bacteriology* **194**(5):1036-1044.
78. **Gutierrez-Preciado A, Henkin TM, Grundy FJ, Yanofsky C, & Merino E** (2009) Biochemical Features and Functional Implications of the RNA-Based T-Box Regulatory Mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**(1):36-+.
79. **Hahne H, Mader U, Otto A, Bonn F, Steil L, Bremer E, Hecker M, & Becher D** (2010) A Comprehensive Proteomics and Transcriptomics Analysis of *Bacillus subtilis* Salt Stress Adaptation. *Journal of Bacteriology* **192**(3):870-882.
80. **Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**(4):557-580.
81. **Hanlon DW & Ordal GW** (1994) Cloning and characterization of genes encoding methyl-accepting chemotaxis proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **269**(19):14038-14046.
82. **Harris RS, Longerich S, & Rosenberg SM** (1994) Recombination in adaptive mutation. *Science* **264**(5156):258-260.
83. **Hartig E & Jahn D** (2012) Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in Microbial Physiology* **61**:195-216.
84. **Harwood CR & Archibald AR** (1990) Growth, maintenance and general techniques. *Molecular biological methods for Bacillus*, eds Harwood CR & Cutting SM (John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK), pp 1-26.
85. Harwood CR & Cutting SM (1990) *Molecular biological methods for Bacillus* (John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U. K.) 1<sup>st</sup> Ed.
86. **Hecker M, Schumann W, & Völker U** (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **19**(3):417-428.
87. **Heidrich N, Chinali A, Gerth U, & Brantl S** (2006) The small untranslated RNA SR1 from the *Bacillus subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism. *Molecular Microbiology* **62**(2):520-536.
88. **Heidrich N, Moll I, & Brantl S** (2007) In vitro analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target *ahrC* mRNA. *Nucleic Acids Research* **35**(13):4331-4346.
89. **Helmann JD** (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 Research* **23**(13):2351-2360.

90. **Heun M** (2009) Funktionelle Charakterisierung der Xaa-Pro Dipeptidase YkvY aus *Bacillus subtilis*. *Bachelorarbeit*:Philipps-Universität Marburg.
91. **Hiron A, Borezee-Durant E, Piard J-C, & Juillard V** (2007) Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **189**(14):5119-5129.
92. **Hoffmann T & Bremer E** (2011) Protection of *Bacillus subtilis* against Cold Stress via Compatible-Solute Acquisition. *Journal of Bacteriology* **193**(7):1552-1562.
93. **Hoffmann T, Von Blohn C, Stanek A, Moses S, Barzantny H, & Bremer E** (2012) Synthesis, Release, and Recapture of Compatible Solute Proline by Osmotically Stressed *Bacillus subtilis* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(16):5753-5762.
94. **Hohmann S** (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(2):300-372.
95. **Holtje JV** (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1):181-203.
96. **Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N, & Bremer E** (2003) KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *Journal of Bacteriology* **185**(4):1289-1298.
97. **Holtmann G & Bremer E** (2004) Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: Involvement of Opu transporters. *Journal of Bacteriology* **186**(6):1683-1693.
98. **Hu CA, Delauney AJ, & Verma DP** (1992) A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **89**(19):9354-9358.
99. **Huang S-C, Lin T-H, & Shaw G-C** (2011) PrcR, a PucR-type transcriptional activator, is essential for proline utilization and mediates proline-responsive expression of the proline utilization operon *putBCP* in *Bacillus subtilis*. *Microbiology-Sgm* **157**:3370-3377.
100. **Ito M, Guffanti AA, Oudega B, & Krulwich TA** (1999) *mrp*, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to NA(+) and in pH homeostasis. *Journal of Bacteriology* **181**(8):2394-2402.
101. **Ito M, Guffanti AA, Wang W, & Krulwich TA** (2000) Effects of nonpolar mutations in each of the seven *Bacillus subtilis* *mrp* genes suggest complex interactions among the gene products in support of Na(+) and alkali but not cholate resistance. *Journal of Bacteriology* **182**(20):5663-5670.
102. **Jebbar M, Sohn-Bosser L, Bremer E, Bernard T, & Blanco C** (2005) Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *Journal of Bacteriology* **187**(4):1293-1304.
103. **Joly N, Zhang N, Buck M, & Zhang X** (2012) Coupling AAA protein function to regulated gene expression. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1823**(1):108-116.

104. **Jung H** (2002) The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *Febs Letters* **529**(1):73-77.
105. **Kappes RM, Kempf B, & Bremer E** (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. *Journal of Bacteriology* **178**(17):5071-5079.
106. **Kappes RM, Kempf B, Kneip S, Boch J, Gade J, Meier-Wagner J, & Bremer E** (1999) Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **32**(1):203-216.
107. **Kempf B & Bremer E** (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **270**(29):16701-16713.
108. **Kempf B & Bremer E** (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* **170**(5):319-330.
109. **Klingel U, Miller CM, North AK, Stockley PG, & Baumberg S** (1995) A binding-site for activation by the *Bacillus subtilis* AhrC protein, a repressor/activator of arginine metabolism. *Molecular & General Genetics* **248**(3):329-340.
110. **Koch AL** (1983) The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Advances in Microbial Physiology* **24**:301-366.
111. **Koecher S, Averhoff B, & Mueller V** (2011) Development of a genetic system for the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: generation and characterization of mutants defect in the production of the compatible solute proline. *Environmental Microbiology* **13**(8):2122-2131.
112. **Koide A & Hoch JA** (1994) Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. *Molecular Microbiology* **13**(3):417-426.
113. **Kumar A, Saini P, & Shrivastava JN** (2009) Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Experimental Biology* **47**(1):57-62.
114. **Kunkel TA** (2004) DNA replication fidelity. *Journal of Biological Chemistry* **279**(17):16895-16898.
115. **Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, et al.** (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**(6657):249-256.
116. **Kuo T-T & Stocker BAD** (1969) Suppression of proline requirement of *proA* and *proAB* deletion mutants in *Salmonella typhimurium* by mutation to arginine requirement. *Journal of Bacteriology* **98**(2):593-598.
117. **Kurz M** (2008) Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline systems* **4**:6-6.
118. **Kuwayama H, Obara S, Morio T, Katoh M, Urushihara H, & Tanaka Y** (2002) PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Research* **30**(2).

119. **Lamark T, Styrvoid OB, & Strom AR** (1992) Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters* **96**(2-3):149-154.
120. **Lanigan-Gerdes S, Briceno G, Dooley AN, Faull KF, & Lazizzera BA** (2008) Identification of residues important for cleavage of the extracellular signaling peptide CSF of *Bacillus subtilis* from its precursor protein. *Journal of Bacteriology* **190**(20):6668-6675.
121. **Le Marrec C, Bon E, & Lonvaud-Funel A** (2007) Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants. *International Journal of Food Microbiology* **115**(3):335-342.
122. **Lechat P, Hummel L, Rousseau S, & Moszer I** (2008) GenoList: an integrated environment for comparative analysis of microbial genomes. *Nucleic Acids Research* **36**:D469-D474.
123. **Letunic I, Doerks T, & Bork P** (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* **40**(D1):D302-D305.
124. **Logan N & de Vos P** (2009) *Bacillus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes.*, eds De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rainey F, Schleifer K-H, & Whitman W (Springer, Heidelberg, Germany), **Vol 3**, pp 21-128.
125. **Lowther WT & Matthews BW** (2002) Metalloaminopeptidases: Common functional themes in disparate structural surroundings. *Chemical Reviews* **102**(12):4581-4607.
126. **Maeder U, Schmeisky AG, Florez LA, & Stuelke J** (2012) SubtiWiki-a comprehensive community resource for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* **40**(D1):D1278-D1287.
127. **Mager WH & Varela JCS** (1993) Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology* **10**(2):253-258.
128. **Maher MJ, Ghosh M, Grunden AM, Menon AL, Adams MWW, Freeman HC, & Guss JM** (2004) Structure of the prolidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **43**(10):2771-2783.
129. **Marmur J** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**(2):208-IN201.
130. **Mathiopoulos C, Mueller JP, Slack FJ, Murphy CG, Patankar S, Bukusoglu G, & Sonenshein AL** (1991) A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. *Molecular Microbiology* **5**(8):1903-1913.
131. **Measures JC** (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**:398-400.
132. **Medrano FJ, Alonso J, Garcia JL, Romero A, Bode W, & Gomis-Ruth FX** (1998) Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. citri: a prototype for the prolyl oligopeptidase family. *Embo Journal* **17**(1):1-9.
133. **Meikle AJ, Reed RH, & Gadd GM** (1988) Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **134**:3049-3060.
134. **Miller CM, Baumberg S, & Stockley PG** (1997) Operator interactions by the *Bacillus subtilis* arginine repressor/activator, AhrC: novel positioning and DNA-

- mediated assembly of a transcriptional activator at catabolic sites. *Molecular Microbiology* **26**(1):37-48.
135. **Miller JH** (1972) Experiments in molecular genetics. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.), Cold Spring Harbor, NY. Ed.
136. **Miller JH** (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.).
137. **Modrich P & Lahue R** (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry* **65**:101-133.
138. **Moses S** (1999) Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. *Dissertation*:University of Marburg.
139. **Moses S, Sinner T, Zaprasis A, Stoeveken N, Hoffmann T, Belitsky BR, Sonenshein AL, & Bremer E** (2012) Proline Utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and Catabolism. *Journal of Bacteriology* **194**(4):745-758.
140. **Msadek T, Kunst F, & Rapoport G** (1993) Two-component regulatory systems. *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*, eds Sonenshein AL, Hoch JA, & Losick R (ASM Press, Washington D.C.), pp 72-745.
141. **Muller J, Schiel S, Ordal GW, & Saxild HH** (1997) Functional and genetic characterization of *mcpC*, which encodes a third methyl-accepting chemotaxis protein in *Bacillus subtilis*. *Microbiology-Uk* **143**:3231-3240.
142. **Nannapaneni P, Hertwig F, Depke M, Hecker M, Maeder U, Voelker U, Steil L, & van Hijum SAFT** (2012) Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology-Sgm* **158**:696-707.
143. **Nicolas P, Maeder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, et al.** (2012) Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**(6072):1103-1106.
144. **O'Rourke SM, Herskowitz I, & O'Shea EK** (2002) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends in Genetics* **18**(8):405-412.
145. **Olkhova E, Raba M, Bracher S, Hilger D, & Jung H** (2011) Homology Model of the Na<sup>+</sup>/Proline Transporter PutP of *Escherichia coli* and Its Functional Implications. *Journal of Molecular Biology* **406**(1):59-74.
146. **Ordal GW, Villani DP, & Gibson KJ** (1977) Amino acid chemoreceptors of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **129**(1):156-165.
147. **Perego M & Brannigan JA** (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* **22**(10):1541-1547.
148. **Perego M, Higgins CF, Pearce SR, Gallagher MP, & Hoch JA** (1991) The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Molecular Microbiology* **5**(1):173-185.
149. **Perego M & Hoch JA** (1996) Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus*

- subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(4):1549-1553.
150. **Pierce JA, Robertson CR, & Leighton TJ** (1992) Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* **8**(3):211-218.
151. **Pittelkow M & Bremer E** (2011) Cellular adjustment of *Bacillus subtilis* and other Bacilli to fluctuating salinities. *Halophiles and hypersaline environments. - Current research and future trends*, eds Ventosa A, Oren A, & (ed.) YM (Springer, Heidelberg), pp p. 275-302.
152. **Piuri M, Sanchez-Rivas C, & Ruzal SM** (2003) Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* **95**(2):372-379.
153. **Pottathil M, Jung A, & Lazizzera BA** (2008) CSF, a species-specific extracellular signaling peptide for communication among strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology* **190**(11):4095-4099.
154. **Price CW, Fawcett P, Ceremonie H, Su N, Murphy CK, & Youngman P** (2001) Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **41**(4):757-774.
155. **Quentin Y, Fichant G, & Denizot F** (1999) Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *Journal of Molecular Biology* **287**(3):467-484.
156. **Rawlings ND, Barrett AJ, & Bateman A** (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* **40**(D1):D343-D350.
157. **Reichenbach B, Goepel Y, & Goerke B** (2009) Dual control by perfectly overlapping sigma 54-and sigma 70-promoters adjusts small RNA GlmY expression to different environmental signals. *Molecular Microbiology* **74**(5):1054-1070.
158. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, & Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839):487-491.
159. **Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis TE** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.), Second edition Ed.
160. **Saum SH & Mueller V** (2008) Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology* **10**(3):716-726.
161. **Saum SH & Mueller V** (2007) Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology* **189**(19):6968-6975.
162. **Saum SH & Muller V** (2008) Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline systems* **4**:4-4.

163. **Saum SH, Pfeiffer F, Palm P, Rampp M, Schuster SC, Mueller V, & Oesterhelt D** (2012) Chloride and organic osmolytes: a hybrid strategy to cope with elevated salinities by the moderately halophilic, chloride-dependent bacterium *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology*.
164. **Saum SH, Sydow JF, Palm P, Pfeiffer F, Oesterhelt D, & Mueller V** (2006) Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology* **188**(19):6808-6815.
165. **Scheer M, Grote A, Chang A, Schomburg I, Mунaretto C, Rother M, Soehngen C, Stelzer M, et al.** (2011) BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Research* **39**:D670-D676.
166. **Schöck F, Gotsche S, & Dahl MK** (1996) Vectors using the phospho-alpha-(1,1)-glucosidase-encoding gene *treA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene* **170**(1):77-80.
167. **Setlow P** (2003) Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* **6**(6):550-556.
168. **Shabala L, Bowman J, Brown J, Ross T, McMeekin T, & Shabala S** (2009) Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotica. *Environmental Microbiology* **11**(1):137-148.
169. **Smith CJ, Deutch AH, & Rushlow KE** (1984) Purification and characteristics of a gamma-glutamyl-transferase kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **157**(2):545-551.
170. **Solcan N, Kwok J, Fowler PW, Cameron AD, Drew D, Iwata S, & Newstead S** (2012) Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *Embo Journal* **31**(16):3411-3421.
171. **Solopova A, Bachmann H, Teusink B, Kok J, Neves AR, & Kuipers OP** (2012) A Specific Mutation in the Promoter Region of the Silent *cel* Cluster Accounts for the Appearance of Lactose-Utilizing *Lactococcus lactis* MG1363. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(16):5612-5621.
172. **Sonenshein AL** (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **8**(2):203-207.
173. **Sonenshein AL** (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* **5**(12):917-927.
174. **Soto MJ, Vandillewijn P, Olivares J, & Toro N** (1994) Ornithine cyclodeaminase activity in *Rhizobium meliloti*. *Fems Microbiology Letters* **119**(1-2):209-213.
175. **Soupene E, King N, Lee H, & Kustu S** (2002) Aquaporin Z of *Escherichia coli*: Reassessment of its regulation and physiological role. *Journal of Bacteriology* **184**(15):4304-4307.
176. **Spiegelhalter F & Bremer E** (1998) Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis* - contributions of the  $\sigma^A$ - and  $\sigma^B$ -dependent stress-responsive promoters. *Molecular Microbiology* **29**(1):285-296.
177. **Srivatsan A, Han Y, Peng J, Tehranchi AK, Gibbs R, Wang JD, & Chen R** (2008) High-Precision, Whole-Genome Sequencing of Laboratory Strains Facilitates Genetic Studies. *Plos Genetics* **4**(8).

178. **Steil L, Hoffmann T, Budde I, Volker U, & Bremer E** (2003) Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Journal of Bacteriology* **185**(21):6358-6370.
179. **Street TO, Bolen DW, & Rose GD** (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(38):13997-14002.
180. **Stülke J, Martin-Verstraete I, Zagorec M, Rose M, Klier A, & Rapoport G** (1997) Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Molecular Microbiology* **25**(1):65-78.
181. **Styrvoid OB & Strom AR** (1991) Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K 12 strains: Influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *Journal of Bacteriology* **173**(3):1187-1192.
182. **Summers ZM, Ueki T, Ismail W, Haveman SA, & Lovley DR** (2012) Laboratory evolution of *Geobacter sulfurreducens* for enhanced growth on lactate via a single-base-pair substitution in a transcriptional regulator. *Isme Journal* **6**(5):975-983.
183. **Sung HM & Yasbin RE** (2002) Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **184**(20):5641-5653.
184. **Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, & Chikindas ML** (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology* **104**(4):1067-1074.
185. **Szurmant H, Bunn MW, Cannistraro VJ, & Ordal GW** (2003) *Bacillus subtilis* hydrolyzes CheY-P at the location of its action, the flagellar switch. *Journal of Biological Chemistry* **278**(49):48611-48616.
186. **Szurmant H & Ordal GW** (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**(2):301-319.
187. **Takamatsu H & Watabe K** (2002) Assembly and genetics of spore protective structures. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**(3):434-444.
188. **Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wróblewski H, Blanco C, & Bernard T** (1994) Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *Journal of Bacteriology* **176**(17):5210-5217.
189. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, & Kumar S** (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**(10):2731-2739.
190. **Tanghe A, Van Dijck P, & Thevelein JM** (2006) Why do microorganisms have aquaporins? *Trends in Microbiology* **14**(2):78-85.
191. **Thüring M** (2011) Osmoprotektive Eigenschaften von Prolylpeptiden in *Bacillus subtilis*: Charakterisierung involvierter Peptidaufnahmesysteme und Identifizierung der Peptid- hydrolysierenden Peptidasen. *Bachelorarbeit*. :Phillips-Universität Marburg.

192. **Turgay K** (2012) General and regulatory proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Bacillus. Cellular and molecular biology*, ed Graumann P (Caister Academic Press, Norwich, United Kingdom), pp 187-214.
193. **vanVeen JA, vanOverbeek LS, & vanElsas JD** (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(2):121-&.
194. **Veeravalli K, Boyd D, Iverson BL, Beckwith J, & Georgiou G** (2011) Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. *Nature Chemical Biology* **7**(2):101-105.
195. **Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Baumer S, Henne A, et al.** (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**(4):204-211.
196. **Verheul A, Hagting A, Amezaga MR, Booth IR, Rombouts FM, & Abee T** (1995) A dipeptide and tripeptide transport system can supply *Listeria monocytogenes* Scott A with amino acids essential for growth. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(1):226-233.
197. **Vilchez S, Molina L, Ramos C, & Ramos JL** (2000) Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: Cloning, characterization, and expression of the put genes in the presence of root exudates. *Journal of Bacteriology* **182**(1):91-99.
198. **Vitreschak AG, Mironov AA, Lyubetsky VA, & Gelfand MS** (2008) Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *Rna-a Publication of the Rna Society* **14**(4):717-735.
199. **von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, & Bremer E** (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Molecular Microbiology* **25**(1):175-187.
200. **Wach A** (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S-cerevisiae*. *Yeast* **12**(3):259-265.
201. **Wax R & Freese E** (1968) Initiation of germination of *Bacillus subtilis* spores by a combination of compounds in place of L-alanine. *Journal of Bacteriology* **95**(2):433-&.
202. **Wels M, Kormelink TG, Kleerebezem M, Siezen RJ, & Francke C** (2008) An *in silico* analysis of T-box regulated genes and T-box evolution in prokaryotes, with emphasis on prediction of substrate specificity of transporters. *Bmc Genomics* **9**.
203. **Welsh DT** (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**(3):263-290.
204. **Whatmore AM, Chudek JA, & Reed RH** (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* **136**:2527-2535.

205. **Whatmore AM & Reed RH** (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *Journal of General Microbiology* **136**:2521-2526.
206. **White BA** (1993) PCR protocols. *Methods in molecular biology*, ed Walker JM (Humana Press, Totowa, NJ), **Vol 15**.
207. **Whitman WB, Coleman DC, & Wiebe WJ** (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12):6578-6583.
208. **Wong LS, Johnson MS, Sandberg LB, & Taylor BL** (1995) Amino-acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **177**(15):4342-4349.
209. **Wood JM** (1981) Genetics of L-proline utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **146**(3):895-901.
210. **Wood JM** (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1):230-262.
211. **Wouters JA, Hain T, Darji A, Huffner E, Wemekamp-Kamphuis H, Chakraborty T, & Abee T** (2005) Identification and characterization of di- and tripeptide transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(10):5771-5778.
212. **Wünsche G** (2010) Bereitstellung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin durch Hydrolyse prolinhaltiger Peptide und Transformation verschiedener Aminosäuren in *Bacillus subtilis*. *Masterarbeit*:Philipps-Universität Marburg.
213. **Zaprasis A, Brill J, Thüring M, Wünsche G, Heun M, Barzantny H, Hoffmann T, & Bremer E** (2013) Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing peptides. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(2):576-587.
214. **Zuber P** (2001) A peptide profile of the *Bacillus subtilis* genome. *Peptides* **22**(10):1555-1577.

## 8 Anhang

### 8.1 Oligonukleotide

**Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide**

| Name | Bezeichnung         | Sequenz (5' → 3') <sup>1,2</sup>                                  | Verwendung <sup>3</sup>                                       |
|------|---------------------|---|---|
| AC1  | YbaC-P1             | CCATACATCGTTGTATTCTTAAACAAATGC                                    | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>ybaC</i>               |
| AC2  | YbaC-P2 (cat)       | ATATGAGATAATGCCGACTGTACTTTTTACTG<br>CTTTGTATTTCCAATGCTTAGTTCTTTC  | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>ybaC</i>               |
| AC3  | YbaC-P2rev<br>(cat) | GAAAGAACTAAGCATTGGAAATACAAAGCA<br>GTAAAAAGTACAGTCGGCATTATCTCATAT  | LFH-PCR (Cm <sup>R</sup> pJMB1)<br>Deletion von <i>ybaC</i>   |
| AC4  | YbaC-P3 (cat)       | TATCTAAAGTGAATTTAGGAGGCTTACTTGT<br>ATCGAAACAGTATTATCAAGAACTTGAGG  | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>ybaC</i>               |
| AC5  | YbaC-P3rev<br>(cat) | CCTCAAGTTCTTGATAACTGTTCGATACA<br>AGTAAGCCTCCTAAATTCACTTTAGATA     | LFH-PCR (Sp <sup>R</sup> pDG1727)<br>Deletion von <i>proJ</i> |
| AC6  | YbaC-P4             | TTTAGATACTCCTGTTACATCTACGATTTTC                                   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>ybaC</i>               |
| AC13 | ProJ-P1             | AATAATGGCCTTCAAACCTTGACATCATTTTC                                  | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>proJ</i>               |
| AC14 | ProJ-P2 (spc)       | TTATAACATGTATTCACGAACGAAAATCGCT<br>TTTCATGCTTGTATCAGGCGTCACTTTAT  | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>proJ</i>               |
| AC15 | ProJ-P2rev (spc)    | ATAAAGTGACGCCTGATACAAGCATGAAAAG<br>CGATTTTCGTTTCGTGAATACATGTTATAA | LFH-PCR (Sp <sup>R</sup> pDG1727)<br>Deletion von <i>proJ</i> |
| AC16 | ProJ-P3 (spc)       | TTTTAGAAAACAATAAACCCCTTGCATAGGGC<br>CTGTAAATTAATTTGCAGAAAAAACCCG  | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>proJ</i>               |
| AC17 | ProJ-P3rev (spc)    | CGGGTTTTTTTCTGCAAATTAATTTACAGGCC<br>CTATGCAAGGGTTTATTGTTTTCTAAAA  | LFH-PCR (Cm <sup>R</sup> pJMB1)<br>Deletion von <i>proJ</i>   |
| AC18 | ProJ-P4             | CCGGTCATAAAATCTAACAACCTCTATAATC                                   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>proJ</i>               |
| AC25 | YwcA-P1             | CATGTAAAAAAGATTTGGACAA  | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>ywcA</i>               |
| AC26 | YwcA-P2 (ery)       | TTGATATTTAAATTTATTAGGATCCCCGGGGC<br>CAACAATCGCCAAAAATAATAAAAAAGC  | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>ywcA</i>               |
| AC27 | YwcA-P2rev<br>(ery) | GCTTTTTTATTATTTTTGGCGATTGTTGGCCC<br>CGGGGATCCTAATAAATTTAAATATCAA  | LFH-PCR (Er <sup>R</sup> pDG646)<br>Deletion von <i>ywcA</i>  |
| AC28 | YwcA-P3 (ery)       | TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATTC<br>GTCTGATAAAACAATTGATGAAGATACG   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>ywcA</i>               |
| AC29 | YwcA-P2rev<br>(ery) | CGTATCTTCATCAATTGTTTTATCAGACGAAT<br>AACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA   | LFH-PCR (Er <sup>R</sup> pDG646)<br>Deletion von <i>ywcA</i>  |
| AC30 | YwcA-P4             | TTTGTCATCAATCTGAAAGAAGC   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>ywcA</i>               |
| AC31 | YodF-P1             | TGTATCCAAAGCTTTCGGTTAACAATTGTA                                    | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>yodF</i>               |

## Fortsetzung Tabelle 7

|      |                         |  |  |
|------|-------------------------|--|--|
| AC32 | YodF-P4                 | TGTCTATTCAGAGATGAAAGACAACAACAT                                     | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>yodF</i>              |
| AC33 | YodF-P2 (kan)           | TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATAA<br>CAATAATAGCAGTAATGAGAAGTGCAGT   | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>yodF</i>              |
| AC34 | YodF-P2rev<br>(kan)     | ACTGCACTTCTCATTACTGCTATTATTGTTAT<br>AACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA    | LFH-PCR (Km <sup>R</sup> pDG783)<br>Deletion von <i>yodF</i> |
| AC35 | YodF-P3 (kan)           | TTATCGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAAAA<br>TCCTGTCAATTGAAGGTTTATTTGGCAA   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>yodF</i>              |
| AC36 | YodF-P3rev<br>(kan)     | TTTGCCAAATAAACCTTCAATGACAGGATTTT<br>GTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGATAA   | LFH-PCR (Km <sup>R</sup> pDG783)<br>Deletion von <i>yodF</i> |
| AC37 | AhrC-P1                 | ATTAGATGTATTATTAGTGAAAGAGGGCT                                      | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>ahrC</i>              |
| AC38 | AhrC-P4                 | ATCAAATTCAGCTCATCCAGCATATTTCT                                      | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>ahrC</i>              |
| AC39 | AhrC-P2 (ery)           | TTGATATTTAAATTTATTAGGATCCCCGGGTT<br>CGATTCATTGCTTGTAATGATCTCTCT    | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>ahrC</i>              |
| AC40 | AhrC-P2rev<br>(ery)     | AGAGAGATCATTACAAGCAATGAAATCGAAC<br>CCGGGGATCCTAATAAATTTAAATATCAA   | LFH-PCR (Er <sup>R</sup> pDG646)<br>Deletion von <i>ahrC</i> |
| AC41 | AhrC-P3 (ery)           | TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATAT<br>CTAACAAAGATAAGAGGTGTAATGCTGT   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>ahrC</i>              |
| AC42 | AhrC-P3rev<br>(ery)     | ACAGCATTACACCTCTTATCTTTGTTAGATAT<br>AACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA    | LFH-PCR (Er <sup>R</sup> pDG646)<br>Deletion von <i>ahrC</i> |
| AC43 | TreA-P1                 | GATCTTGCTAATATGATTAACCTGATTGCA                                     | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>treA</i>              |
| AC44 | TreA-P2 (zeo)           | CCATATCAAGATAACTTCGTATAATGTATGA<br>TAATCACGAATATCGTACCCATTATCATG   | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>treA</i>              |
| AC45 | TreA-P2rev<br>(zeo)     | CATGATAATGGGTACGATATTCGTGATTATC<br>ATACATTATACGAAGTTATCTTGATATGG   | LFH-PCR (Zeo <sup>R</sup> p7Z6)<br>Deletion von <i>treA</i>  |
| AC46 | TreA-P3 (zeo)           | GGACTGAATAACTTCGTATAGCATAACATTAC<br>ATATGAGTCCATTGTTTATCGTTTAAACGA | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>treA</i>              |
| AC47 | TreA-P3rev<br>(zeo)     | TCGTAAACGATAAACAATGGACTCATATGT<br>AATGTATGCTATACGAAGTTATTCAGTCC    | LFH-PCR (Zeo <sup>R</sup> p7Z6)<br>Deletion von <i>treA</i>  |
| AC48 | TreA-P4                 | TGAAATTGTATGCATCCAGAATTTGTGTCT                                     | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>treA</i>              |
| AC61 | rocD_pAC6_<br>BamHI_for | AAAGGATCCAGCGGGTGATAATTGTTGGC                                      | Klonierung des <i>rocD</i> -<br>Promotorfragments in<br>pAC6 |
| AC62 | rocD_pAC6_<br>XmaI_rev  | AAACCCGGGTGTATGAACCTCCCTCAATTAT<br>TTTC                            | Klonierung des <i>rocD</i> -<br>Promotorfragments in<br>pAC6 |
| AC69 | GltR_+91_for            | GCTTTAGTTTACATGAAGCTCTGC   | Sequenzierung von <i>gltR</i>                                |
| AC70 | GltR_713_rev            | GAACGAGGCAGCAGTGAATC   | Sequenzierung von <i>gltR</i>                                |
| AC71 | GltR_180_for            | GGGCAAATCTTGTCTTACTCAG   | Sequenzierung von <i>gltR</i>                                |
| AC72 | GltR_-89_rev            | CTATACAAACATTGAGATGCGCC  | Sequenzierung von <i>gltR</i>                                |
| AC85 | AhrC-for                | AGAGGGACAGGAAGGCCAG  | Sequenzierung von <i>ahrC</i>                                |

Fortsetzung Tabelle 7

|       |                       |   |   |
|-------|-----------------------|---|---|
| AC86  | AhrC-rev              | GATTTGCCGGCTCCGGTTTC  | Sequenzierung von <i>ahrC</i>                                       |
| AC93  | rocD_675_for          | CAAGACATTCTCTTCCTTACAAATCG  | Sequenzierung von <i>rocD</i>                                       |
| AC94  | rocD_+119_rev         | CACCTTGTCTCGAAAATTGTAG  | Sequenzierung von <i>rocD</i>                                       |
| AC95  | rocD_-101_for         | GATACATTATACTAAAATACTGTAGCTGAGC                                   | Sequenzierung von <i>rocD</i>                                       |
| AC96  | rocD_508_rev          | GAATCAAACCTCATTCCCTTACGGC   | Sequenzierung von <i>rocD</i>                                       |
| AC105 | Arg_C1-P1             | TATGTCACGAATTACGTATTGGCTAATCAT                                    | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von Arg-Synthese-Operon             |
| AC106 | Arg_C1-P4             | AAATATGAATCTTCGGATTGAGGATTCCT                                     | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von Arg-Synthese-Operon             |
| AC107 | Arg_C1-P2<br>(zeo)    | CCATATCAAGATAACTTCGTATAATGTATGA<br>ATAAAGTATGCATTCCCTCTGCATGAGGAT | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von Arg-Synthese-Operon             |
| AC108 | Arg_C1-P2rev<br>(zeo) | ATCCTCATGCAGAGGAATGCATACTTTATTC<br>ATACATTATACGAAGTTATCTTGATATGG  | LFH-PCR (Zeo <sup>R</sup> p7Z6)<br>Deletion von Arg-Synthese-Operon |
| AC109 | Arg_C1-P3<br>(zeo)    | GGACTGAATAACTTCGTATAGCATAACATTAC<br>GTGATTTATTCTGATGTGTTTACAAGCAT | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von Arg-Synthese-Operon             |
| AC110 | Arg_C1-P3rev<br>(zeo) | ATGCTTGTAACACATCAGAATAAATCACGT<br>AATGTATGCTATACGAAGTTATTCAGTCC   | LFH-PCR (Zeo <sup>R</sup> p7Z6)<br>Deletion von Arg-Synthese-Operon |
| AC143 | ProB_+328_for         | CGGGCTATTTTTGATGACAAAAAAC   | Sequenzierung von <i>proB</i>                                       |
| AC144 | ProB_249_for          | CAGCAATATATGAATCAATTTAAACAATACT<br>CAC                            | Sequenzierung von <i>proB</i>                                       |
| AC145 | ProB_845_for          | CGAAGAGGCGATGATCCATAATG   | Sequenzierung von <i>proB</i>                                       |
| AC146 | ProJ_+360_for         | CAAATGGATATATTCACCGGAATTGC  | Sequenzierung von <i>proJ</i>                                       |
| AC147 | ProJ_258_for          | AGGCTTATTCAAAGCTGTTTTTGGC   | Sequenzierung von <i>proJ</i>                                       |
| AC148 | ProJ_857_for          | GATTGTTACGAAAAATAACAAACGGAC                                       | Sequenzierung von <i>proJ</i>                                       |
| AC149 | ProB-P2 (kan)         | TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATTC<br>ATATATTGCTGCATTAACAGTGTTTGTC  | LFH-PCR (5'-Flanke)<br>Deletion von <i>proB</i>                     |
| AC150 | ProB-P2rev<br>(kan)   | GACAAACACTGTTAATGCAGCAATATATGAA<br>TAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA   | LFH-PCR (Km <sup>R</sup> pDG783)<br>Deletion von <i>proB</i>        |
| AC151 | ProB-P3 (kan)         | TTATCGAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAAAA<br>ACGTTTGAGGTTATTCATAGGAATGACT   | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>proB</i>                     |
| AC152 | ProB-P3rev<br>(kan)   | AGTCATTCCCTATGAATAACCTCAAACGTTTTT<br>GTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGATAA | LFH-PCR (Km <sup>R</sup> pDG783)<br>Deletion von <i>proB</i>        |
| AC153 | ProB-P4               | CGCATTTTTGTCATTTTCAGTTAAAATCGC                                    | LFH-PCR (3'-Flanke)<br>Deletion von <i>proB</i>                     |
| AC154 | GltC_Seq1_for         | CGATCAATTTCCGATAAATACCGG  | Sequenzierung von <i>gltC</i>                                       |
| AC155 | GltC_Seq1_rev         | GATTGCCATCTCTCTAAGTACAAATC  | Sequenzierung von <i>gltC</i>                                       |
| AC156 | GltC_Seq2_for         | GAAAGAGCAAATTGATGAGTATCTTGAC                                      | Sequenzierung von <i>gltC</i>                                       |
| AC157 | GltC_Seq2_rev         | GAACTGACAAATAGAGCTCTAATTGATC                                      | Sequenzierung von <i>gltC</i>                                       |

## Fortsetzung Tabelle 7

|       |                |                                  |  |
|-------|----------------|----------------------------------|--|
| AC158 | RocG_Seq1_for  | GTACGGATCTTGCATGATGATAAG         | Sequenzierung von <i>rocG</i>                |
| AC159 | RocG_Seq1_rev  | GTTTCCAAAGCCCTGTATGATGATG        | Sequenzierung von <i>rocG</i>                |
| AC160 | RocG_Seq2_for  | CTTTATTACAGGTAAACCGCTTGTTTTG     | Sequenzierung von <i>rocG</i>                |
| AC161 | RocG_Seq2_rev  | GTCTAACAGGTGATCACCTTTCTC         | Sequenzierung von <i>rocG</i>                |
| AC162 | TnrA_Seq_for   | CTTGGGTGTTACGCATTATTCTTG         | Sequenzierung von <i>tnrA</i>                |
| AC163 | TnrA_Seq_rev   | CGATTATCCCTATTATTTTGCACAAACTG    | Sequenzierung von <i>tnrA</i>                |
| AC164 | CodY_Seq1_for  | CGATTACACCACAGTATGTCGAAG         | Sequenzierung von <i>codY</i>                |
| AC165 | CodY_Seq1_rev  | CAGCAATTTTACTTGCAACAAGAAG        | Sequenzierung von <i>codY</i>                |
| AC166 | CodY_Seq2_for  | CTCCTTGGGTATTCAATTAACCAGC        | Sequenzierung von <i>codY</i>                |
| AC167 | CodY_Seq2_rev  | GAAAGACTTTCAACCCAGGAAATAAAG      | Sequenzierung von <i>codY</i>                |
| AC168 | ArgD_Seq1_for  | TAAGGAGATTCAGATGCTGATCAAG        | Sequenzierung von <i>argD</i>                |
| AC169 | ArgD_Seq1_rev  | CCGGTCTGGATTCATCAATAATGAG        | Sequenzierung von <i>argD</i>                |
| AC170 | ArgD_Seq2_for  | GATCCTTCTGCTTTTAAAGCTCTTG        | Sequenzierung von <i>argD</i>                |
| AC171 | ArgD_Seq2_rev  | CATTCCTGTGAAAAAACAGCTTCTC        | Sequenzierung von <i>argD</i>                |
| AC172 | sr1_lang_for   | CATGGGGAATACCGCGGATATCGCATC      | Sequenzierung von <i>sr1</i>                 |
| AC173 | sr1_lang_rev   | CTTTATTGGCAATGACTCCGCGTGATGCTTTC | Sequenzierung von <i>sr1</i>                 |
|       | M13 rev (-49)  | GAGCGGATAACAATTCACACAGG          | Allgemeine Sequenzierprimer                  |
|       | M13 uni (-43)  | AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT          | Allgemeine Sequenzierprimer                  |
|       | pac5_seq_rev   | CTGCAAGCGATAAGTTGG               | Sequenzierung des Vektors pAC6               |
|       | pac5_seq_for   | GCGTAGCGAAAAATCCTTTTC            | Sequenzierung des Vektors pAC6               |
|       | proBA-P1       | CATTCGTGAAAAAAATCATCACTTCAGGC    | LFH-PCR (5'-Flanke) Deletion von <i>proB</i> |
|       | rocD +74 fwd   | AGCGGGTGATAATTGTTGGC             | Sequenzierung von <i>rocR-rocD</i>           |
|       | rocR -118 rev  | CGGGATTAGCCTTGCCATA              | Sequenzierung von <i>rocR-rocD</i>           |
|       | rocR +470 fwd  | CAAGACGTCATCGAAAACGC             | Sequenzierung von <i>rocR-rocD</i>           |
|       | rocR +470 rev  | GCGTTTTCGATGACGTCTTG             | Sequenzierung von <i>rocR-rocD</i>           |
|       | rocR +1142 fwd | GACGAGCAAACGATTACGGC             | Sequenzierung von <i>rocR-rocD</i>           |

<sup>1</sup>Die angefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.<sup>2</sup>Die fett hervorgehobenen Sequenzen führten bei gerichteter Mutagenese zu Basenaustausch.<sup>3</sup>LHF-PCR, *Long Flanking Homology* PCR (118, 200)

## 8.2 Bakterienstämme

**Tabelle 8: Verwendete und konstruierte Bakterienstämme**

| Stamm                           | relevanter Genotyp <sup>1,2</sup>  | Referenz bzw. Konstruktion <sup>3,4</sup> |
|---------------------------------|--|---|
| <i>E. coli</i>                  |  |   |
| DH5α                            | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17rK- mK+relA1 supE44</i><br>Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169   | (80)                                      |
| <i>B. subtilis</i> <sup>5</sup> |  |   |
| 168 <sup>+</sup>                |  | BGSC (10) <sup>6</sup>                    |
| JH642                           | <i>trpC2 pheA1 appA-168</i>  | J. Hoch; BGSC 1A96 (177) <sup>6</sup>     |
| JH14115 <sup>7</sup>            | <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>  | (112)                                     |
| ACB64                           | Δ( <i>papA::ery</i> )1 Δ( <i>papB::spc</i> )1 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>  | (191)                                     |
| ACB73                           | Δ( <i>rocD::tet</i> )1 Δ( <i>proBA::cat</i> )2 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>   | (191, 213)                                |
| ACB75                           | Δ( <i>yclE::zeo</i> )1 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>   | (191)                                     |
| ACB97                           | Δ( <i>rocD::tet</i> )1 Δ( <i>proBA::cat</i> )2 Δ( <i>papA::ery</i> )1<br>Δ( <i>papB::spc</i> )1 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>                        | (191, 213)                                |
| ACB100                          | Δ( <i>rocD::tet</i> )1 Δ( <i>proBA::cat</i> )2 Δ( <i>papA::ery</i> )1<br>Δ( <i>papB::spc</i> )1 Δ( <i>yclE::zeo</i> )1 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i> | (191)                                     |
| ACB108                          | Δ( <i>rocD::tet</i> )1 Δ( <i>proBA::cat</i> )2 Δ( <i>papA::ery</i> )1 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>  | (191, 213)                                |
| ACB109                          | Δ( <i>rocD::tet</i> )1 Δ( <i>proBA::cat</i> )2 Δ( <i>papB::spc</i> )1 <i>appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup></i>  | (191, 213)                                |
| GP656                           | Δ( <i>rocD::aphA3</i> )1   | (45)                                      |
| GWB87                           | Δ( <i>putC::neo</i> ) Δ( <i>proBA::cat</i> )2  | (212)                                     |
| GWB88                           | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 Δ( <i>sigL::aphA3</i> )1   | (212)                                     |
| GWB90                           | Δ( <i>rocD::aphA3</i> ) Δ( <i>proBA::cat</i> )2  | (212)                                     |
| GWB92                           | Δ( <i>sigL::aphA3</i> )1   | (212)                                     |
| GWB93                           | Δ( <i>rocR::neo</i> )1   | (212)                                     |
| GWB98                           | Δ( <i>rocD::aphA3</i> )1   | (212)                                     |
| GWB99                           | Δ( <i>proA::spc</i> )1   | (212)                                     |
| GWB100                          | Δ( <i>proHJ::tet</i> )1  | (212)                                     |
| GWB101                          | Δ( <i>proBA::cat</i> )2  | (212)                                     |
| GWB102                          | Δ( <i>proBA::tet</i> )3  | (212)                                     |
| GWB120 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (SigA-P1); Pro <sup>+</sup> -1   | (212)                                     |
| GWB121 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (SigA-P1); Pro <sup>+</sup> -2   | (212)                                     |
| GWB122 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (RocR*:D118N); Pro <sup>+</sup> -3   | (212)                                     |
| GWB123 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (Klasse III); Pro <sup>+</sup> -4  | (212)                                     |
| GWB124 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (SigA-P1); Pro <sup>+</sup> -5   | (212)                                     |
| GWB125 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (RocR*:I287T); Pro <sup>+</sup> -6   | (212)                                     |
| GWB126 <sup>8</sup>             | Δ( <i>proBA::cat</i> )2 (SigA-P1); Pro <sup>+</sup> -7   | (212)                                     |

## Fortsetzung Tabelle 8

|                                      |  |  |
|--------------------------------------|--|--|
| GWB127 <sup>8</sup>                  | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ (SigA-P2); Pro <sup>+</sup> -8   | (212)  |
| GWB128 <sup>8</sup>                  | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ (RocR*:L250H); Pro <sup>+</sup> -9   | (212)  |
| GWB131 <sup>8</sup>                  | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ (RocR*:I279T); Pro <sup>+</sup> -10  | (212)  |
| GWB133 <sup>8</sup>                  | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ (SigA-P1); Pro <sup>+</sup> -11  | (212)  |
| JSB8 <sub>ery</sub>                  | $\Delta(\text{proHJ}::\text{ery})1$  | (28)   |
| JSB8 <sub>tet</sub>                  | $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1$  | (30)   |
| QB5505                               | $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1$   | (54)   |
| SMB10                                | $\Delta(\text{treA}::\text{neo})1$ amyE:: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$  | (139)  |
| SMB12                                | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$  | (139)  |
| SMB27                                | $\Delta(\text{treA}::\text{neo})1$ amyE:: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$ $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$<br>$\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ | (139)  |
| SMB32                                | $\Delta(\text{putC}::\text{neo})2$   | (139)  |
| SMB44                                | $\Delta(\text{putBCP}::\text{spc})1$   | (138)  |
| SMB45                                | $\Delta(\text{putBCP}::\text{tet})2$   | (139)  |
| TMB31                                | $\Delta(\text{papB}::\text{spc})1$ appA <sup>+</sup> -neo <sup>R</sup>   | (90)   |
| TMB143                               | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$   | Tamara Hoffmann  |
| TSB2                                 | $\Delta(\text{treA}::\text{neo})1$ amyE:: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$ $\Delta(\text{putR}::\text{spc})1$                                       | (139)  |
| <b>In dieser Arbeit konstruiert:</b> |  |  |
| ACB27                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{rocD}::\text{aphA3})1$ (SigA-P1)   | GP656 → GWB120   |
| ACB30                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{rocD}::\text{aphA3})1$ (Klasse III)  | GP656 → GWB123   |
| ACB35                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{rocD}::\text{aphA3})1$ (RocR*:L250H)   | GP656 → GWB128   |
| ACB41                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{putC}::\text{neo})2$ (SigA-P1)   | SMB32 → GWB120   |
| ACB44                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{putC}::\text{neo})2$ (Klasse III)  | SMB32 → GWB123   |
| ACB49                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{putC}::\text{neo})2$ (RocR*:L250H)   | SMB32 → GWB128   |
| ACB58                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:D118N)  | GWB102 → GWB122  |
| ACB59                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:I287T)  | GWB102 → GWB125  |
| ACB61                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:L250H)  | GWB102 → GWB128  |
| ACB62                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:I279T)  | GWB102 → GWB131  |
| ACB78                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1$ (SigA-P1)   | QB5505 → GWB120  |
| ACB85                                | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1$ (RocR*:L250H)   | QB5505 → GWB128  |
| ACB88 <sup>8</sup>                   | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:K83N); Pro <sup>+</sup> -12  | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB89 <sup>8</sup>                   | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:A252P); Pro <sup>+</sup> -13   | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB90 <sup>8</sup>                   | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (Klasse III); Pro <sup>+</sup> -14  | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB91 <sup>8</sup>                   | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (SigA-P2); Pro <sup>+</sup> -15   | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |

## Fortsetzung Tabelle 8

|                    |  |  |
|--------------------|--|--|
| ACB92 <sup>8</sup> | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (Klasse III); Pro <sup>+</sup> -16  | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB93 <sup>8</sup> | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:K93E); Pro <sup>+</sup> -17  | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB94 <sup>8</sup> | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:Q259E); Pro <sup>+</sup> -18   | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB95 <sup>8</sup> | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (Klasse III); Pro <sup>+</sup> -19  | Ausstrich von GWB99<br>Isolierung von Suppressor-Mutante |
| ACB116             | $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \Delta(\text{papA}::\text{ery})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$  | ACB100 → GWB100  |
| ACB117             | $\Delta(\text{papB}::\text{spc})1 \Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$  | TMB31 → GWB100   |
| ACB118             | $\Delta(\text{papA}::\text{ery})1 \Delta(\text{papB}::\text{spc})1 \Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$                       | JSB8 <sub>tet</sub> → ACB64                              |
| ACB121             | $\Delta(\text{yclE}::\text{zeo})1 \Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$  | GWB100 → ACB75   |
| ACB122             | $\Delta(\text{ybaC}::\text{cat})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$  | LFH-PCR-Produkt → JH14115                                |
| ACB123             | $\Delta(\text{yclE}::\text{zeo})1 \Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \Delta(\text{ybaC}::\text{cat})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$                       | ACB122 → ACB121  |
| ACB125             | $\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})1 \Delta(\text{ybaC}::\text{cat})1 \text{appA}^+ \text{neo}^R$  | ACB122 → GWB100  |
| ACB136             | $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | pZAZA16 → JH642  |
| ACB137             | $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P1}}\text{-lacZ cat})1$   | pZAZA17 → JH642  |
| ACB138             | $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P2}}\text{-lacZ cat})1$   | pZAZA18 → JH642  |
| ACB139             | $\Delta(\text{rocR}::\text{aphA3})1 \text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | ACB136 → GWB93   |
| ACB140             | $\Delta(\text{rocR}::\text{aphA3})1 \text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P1}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB137 → GWB93   |
| ACB141             | $\Delta(\text{rocR}::\text{aphA3})1 \text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P2}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB138 → GWB93   |
| ACB142             | $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1 \text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | ACB136 → GWB92   |
| ACB143             | $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1 \text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P1}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB137 → GWB92   |
| ACB144             | $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1 \text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P2}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB138 → GWB92   |
| ACB145             | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:D118N) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB136 → ACB58   |
| ACB146             | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:I287T) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB136 → ACB59   |
| ACB147             | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:L250H) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB136 → ACB61   |
| ACB148             | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ (RocR*:I279T) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB136 → ACB62   |
| ACB149             | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:K83N) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB136 → ACB88   |
| ACB150             | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:A252P) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | ACB136 → ACB89   |
| ACB151             | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:K93E) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB136 → ACB93   |
| ACB152             | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ (RocR*:Q259E) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | ACB136 → ACB94   |
| ACB155             | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:D118N) $\text{amyE}::\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$ | QB5505 → ACB145  |

## Fortsetzung Tabelle 8

|        |   |   |
|--------|---|---|
| ACB156 | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:I287T)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | QB5505 → ACB146   |
| ACB157 | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:L250H)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | QB5505 → ACB147   |
| ACB158 | $\Delta(\text{proBA}::\text{tet})3$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:I279T)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | QB5505 → ACB148   |
| ACB159 | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:K83N)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | QB5505 → ACB149   |
| ACB160 | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:A252P)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | QB5505 → ACB150   |
| ACB161 | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:K93E)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$   | QB5505 → ACB151   |
| ACB162 | $\Delta(\text{proA}::\text{spc})1$ ( $\Delta\text{sigL}::\text{aphA3}$ )1 (RocR*:Q259E)<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | QB5505 → ACB152   |
| ACB164 | $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$  | LFH-PCR-Produkt → JH642   |
| ACB165 | $\Delta(\text{yodF}::\text{neo})1$  | LFH-PCR-Produkt → JH642   |
| ACB166 | $\Delta(\text{ahrC}::\text{ery})1$  | LFH-PCR-Produkt → JH642   |
| ACB167 | $\Delta(\text{ahrC}::\text{ery})1$ <i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{WT}}\text{-lacZ cat})1$  | ACB166 → ACB136   |
| ACB168 | $\Delta(\text{ahrC}::\text{ery})1$ <i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P1}}\text{-lacZ cat})1$   | ACB166 → ACB137   |
| ACB169 | $\Delta(\text{ahrC}::\text{ery})1$ <i>amyE</i> :: $\Phi(\text{rocD}_{\text{SigA-P2}}\text{-lacZ cat})1$   | ACB166 → ACB138   |
| ACB199 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{yodF}::\text{neo})1$   | ACB165 → TMB134   |
| ACB208 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{treA}::\text{zeo})3$<br>$\Delta(\text{yodF}::\text{neo})1$ (u.M.)  | ACB212 → ACB214   |
| ACB212 | $\Delta(\text{treA}::\text{zeo})3$  | LFH-PCR-Produkt → JH642   |
| ACB213 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{treA}::\text{zeo})3$   | ACB212 → ACB215   |
| ACB214 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{yodF}::\text{neo})1$<br>(u.M.)   | Ausstrich von ACB199<br>Isolierung von DHP-Resistenter<br>Kolonie |
| ACB215 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ (u.M.)   | Ausstrich von TMB143<br>Isolierung von DHP-Resistenter<br>Kolonie |
| ACB216 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{treA}::\text{zeo})3$<br>$\Delta(\text{yodF}::\text{neo})1$ <i>amyE</i> :: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$ (u.M.) | SMB10 → ACB208  |
| ACB217 | $\Delta(\text{putP}::\text{spc})1$ $\Delta(\text{opuE}::\text{tet})1$ $\Delta(\text{ywcA}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{yodF}::\text{neo})1$<br><i>amyE</i> :: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$ (u.M.)                                    | SMB10 → ACB213  |
| ACB218 | $\Delta(\text{proBA}::\text{cat})2$ $\Delta(\text{sigL}::\text{aphA3})1$ (Klasse III)   | QB5505 → ACB90  |
| ACB221 | $\Delta(\text{putBCP}::\text{tet})2$ <i>appA</i> <sup>+</sup> - <i>neo</i> <sup>R</sup>   | SMB45 → JH14115   |
| ACB222 | $\Delta(\text{treA}::\text{ery})2$ <i>appA</i> <sup>+</sup> - <i>neo</i> <sup>R</sup>   | GNB38 → JH14115   |
| ACB225 | $\Delta(\text{treA}::\text{ery})2$ <i>amyE</i> :: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$ <i>appA</i> <sup>+</sup> - <i>neo</i> <sup>R</sup>  | SMB10 → ACB222  |

<sup>1</sup>Die Bezeichnungen *amyE*:: $\Phi(\text{putB}'\text{-treA cat})1$  bzw. *amyE*:: $\Phi(\text{rocD}'\text{-lacZ cat})1$  kennzeichnen, dass die *put-treA* bzw. *rocD-lacZ* Genfusion mittels doppelter Rekombination stabil in das Genom (*amyE* Gen) von *B. subtilis*

integriert wurde. Durch die Integration der Fusionen in das genomische *amyE* Gen wird die Funktion der  $\alpha$ -Amylase zerstört.

<sup>2</sup>*aphA3* entspricht dem *Streptococcus faecalis* Kanamycin-Resistenzgen.

<sup>3</sup>Der Pfeil (→) steht für eine Transformation.

<sup>4</sup>Die gekennzeichneten Stämme wurden mit der Methode der *Long Flanking Homology* PCR (LFH-PCR) hergestellt (118, 200).

<sup>5</sup>Alle aufgeführten Stämme sind Derivate des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 und tragen daher zusätzlich zu den genannten Genotypen die *trpC2 pheA1* Mutationen. Ausnahmen sind die Stämme GP656 und QB5505, welche nur die *trpC2* Mutation tragen.

<sup>6</sup>*Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio; USA.

<sup>7</sup>*appA<sup>+</sup>-neo<sup>R</sup>*, Reversion der im Wildtyp JH642 vorkommenden *frameshift*-Mutation innerhalb des *appA168*-Allels, in unmittelbarer Nähe ist eine Kanamycin-(*neo*)-Resistenzkassette inseriert(112). Die Funktion des Oligo-Peptid-Transporters App wurde dadurch wieder hergestellt.

<sup>8</sup>Die Pro<sup>+</sup> Suppressor-Stämme wurden nach ihrer Isolierung mit Nummern versehen: Pro<sup>+</sup>-1 bis Pro<sup>+</sup>-19

### 8.3 Plasmide

**Tabelle 9: Verwendete und konstruierte Plasmide**

| Plasmid                              | Beschreibung  | Referenz     |
|--------------------------------------|---|--------------|
| pAC6                                 | <i>lacZ</i> -Fusions-Vektor, Cm <sup>R</sup> , Linearisierung <i>PstI</i> , Integration in das <i>amyE</i> Gen von <i>B. subtilis</i>   | (180)        |
| <b>In dieser Arbeit konstruiert:</b> |   |              |
| pZAZA16                              | die <i>rocD</i> -Promotorregion von JH642 wurde mit den Primern AC61 und AC62 durch PCR amplifiziert und über die <i>BamHI</i> und <i>XmaI</i> -Schnittstellen in den <i>lacZ</i> -Fusions-Vektor pAC6 ligiert  | diese Arbeit |
| pZAZA17                              | die <i>rocD</i> -Promotorregion von GWB120 wurde mit den Primern AC61 und AC62 durch PCR amplifiziert und über die <i>BamHI</i> und <i>XmaI</i> -Schnittstellen in den <i>lacZ</i> -Fusions-Vektor pAC6 ligiert | diese Arbeit |
| pZAZA18                              | die <i>rocD</i> -Promotorregion von GWB127 wurde mit den Primern AC61 und AC62 durch PCR amplifiziert und über die <i>BamHI</i> und <i>XmaI</i> -Schnittstellen in den <i>lacZ</i> -Fusions-Vektor pAC6 ligiert | diese Arbeit |

### 8.4 Bioinformatische Methoden

#### 8.4.1 Verwendete Computerprogramme

**Tabelle 10: Genutzte Computerprogramme**

| Programm  | Anwendung  |
|---|--|
| Paint Shop® Pro 9   | Digitale Bildbearbeitung   |
| Endnote X4  | Erstellung Referenzdatenbank   |
| Mega5.05 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (189) | Auswertung von Sequenzierdaten, Erstellen von Alignments               |
| PyMOL (TM) - DeLano Scientific LLC                        | Visualisierung von 3D Proteinstrukturen                                |
| ApE – A plasmid Editor                                    | Erstellen von Plasmiden, Verarbeitung von DNA-Sequenzen, Primer-Design |
| Microsoft® Office Standard Edition 2007/10                | Text- und Datenverarbeitung  |

## 8.4.2 Verwendete Internetplattformen

Tabelle 11: Genutzte Internetangebote

| URL   | Anbieter   | Anwendung  |
|---|--|--|
| <a href="http://genolist.pasteur.fr/">http://genolist.pasteur.fr/</a>   | Institut Pasteur, Paris (122)  | Sequenzrecherche im Genom von <i>B. subtilis</i>           |
| <a href="http://www.subtiwiki.unigoettingen.de/wiki/index.php">http://www.subtiwiki.unigoettingen.de/wiki/index.php</a> | Georg-August-Universität Göttingen (126)   | Genomrecherche in <i>B. subtilis</i>                       |
| <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/</a>   | EMBL, Heidelberg   | Erstellung von Sequenzalignments                           |
| <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>   | National Center for Biotechnology Information at the National Institutes of Health, Bethesda, USA (3)  | Literaturrecherche, BLAST server                           |
| <a href="http://merops.sanger.ac.uk/">http://merops.sanger.ac.uk/</a>   | Wellcome Trust, London (156)   | Identifizierung und Zuordnung möglicher Peptidasen         |
| <a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>   | SWISS-Model, SIB - Swiss Institute of Bioinformatics & the Biozentrum University of Basel, Schweiz (7) | Erstellung von 3D-Strukturmodellen aus Aminosäuresequenzen |
| <a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>   | EMBL, Heidelberg (123)   | Suche nach funktionellen Proteindomänen                    |
| <a href="http://apps.webofknowledge.com">http://apps.webofknowledge.com</a>   | Thomson Reuters, New York, USA   | Literaturrecherche   |

## 8.5 Formelsammlung

### 8.5.1 Fehlerrechnung

Die in Replikaten durchgeführten Experimente wurden folgenden statistischen Analysen unterzogen.

#### Mittelwert

Für den Mittelwert  $\bar{x}$  einer Reihe von Werten  $x_n$  gilt:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n x_n \cdot \frac{1}{n} \quad (\text{Gleichung 4})$$

#### Standartabweichung

Für die Standartabweichung ( $S$ ), die sich in den Fehlerbalken der Diagramme widerspiegelt, gilt:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}{n-1}} \quad \text{(Gleichung 5)}$$

### 8.5.2 Das Lambert-Beersche Gesetz

Das Lambert-Beersche-Gesetz ist eine Vereinigung des Bouguer-Lambertschen Gesetzes über die Schwächung der Strahlungsintensität mit der Weglänge beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz mit dem Beerschen Gesetz über den Zusammenhang der Intensitätsschwächung mit der Konzentration der absorbierenden Substanz.

Die Extinktion  $E_\lambda$  (Absorption des Materials für Licht der Wellenlänge  $\lambda$ ) lässt sich wie folgt berechnen:

$$E_\lambda = \lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad \text{(Gleichung 6)}$$

Dabei ist:

$I_1$  die Intensität des transmittierenden Lichtes

$I_0$  die Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichtes

$c$  die Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

$\epsilon_\lambda$  der dekadische molare Exstinktions-Koeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$

$d$  die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

## 9 Danksagung

Kommen wir jetzt also zu dem angenehmen Teil meiner Dissertation: der Danksagung.

**„Chef“** Ich möchte mich zuallererst bei dir dafür bedanken, dass du es gewagt hast mich als ehemalige „Wurmspezialistin“ mit dem Thema *Bacillus subtilis* und Prolin zu betrauen. Ich denke ich habe mich doch ganz gut geschlagen... Außerdem wollte ich mich auch noch für meinen Spitznamen (ZAZA) bedanken. Auch wenn ich nicht mehr da bin, so lebt er (dank deines Vorschlags) in meinen Plasmiden weiter!!

**Martin** Ich möchte mich bei dir bedanken, dass du dich dazu bereit erklärt hast der Zweitgutachter dieser Dissertation zu sein. Ganz besonders wenn man bedenkt wie wenig Zeit du hattest um mein Gutachten zu verfassen!!

**Patricia** Einen ganz großen Dank geht auch an dich!! Nicht nur das du es immer wieder geschafft hast mich aus misslichen Lagen (wie dem versäumten Reiseantrag) zu befreien sondern auch für die kunstvolle Verzierung meines ZAZA-Sacks und der Möglichkeit ihn zu erwichteln. Er wird mich immer an meine Zeit als Bremerling erinnern.

**Tamara** Ich möchte mich natürlich auch bei dir bedanken. Du hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Und eines habe ich in den drei Jahren mit dir im Labor gelernt. Es gibt keine Frage auf die du nicht eine Antwort hättest. Das kann ich bezeugen!!

**Jutta** Hallo Jutta, oder sollte ich besser sagen: hallo Labmanagerin und Co-Freezer-Betreuerin dir gilt mein Dank natürlich auch. Es war immer sehr angenehm mit dir zu arbeiten!! Und du warst mir eine riesige Hilfe, als wir gemeinsam an meiner „Revision des Grauens“ (Peptidpaper) gearbeitet haben. Und ja es stimmt du bist die Beste!!

**Jutta und Tama** Ja ihr seht richtig. Ihr bekommt noch einen Abschnitt zusammen!! Denn ich muss mich jetzt noch schnell für euer so manch absurdes, aber immer witziges Laborgeplänkel bedanken. Das hat mich immer aufgeheitert, auch wenn die Experimente nicht so wollten wie ich... Eins muss in diesem Zusammenhang noch gesagt werden: „ihr zwei im Doppelpack seit echt klasse!!“ (möge es Frau Becker auch erkennen...)

**Bachies** Marietta, Johanna für mich war es eine lehrreiche und sehr schöne Zeit als ich euch bei eurer Bachelor-Arbeit als Betreuerin zur Seite stand. Ich wünsche euch beiden Erfolg auf eurem weiteren Weg, wohin er auch immer führen wird. Ich finde es übrigens immer noch eine beachtliche Leistung von euch, dass ihr es trotz mir geschafft habt, euren Bachelor-Abschluss zu machen!! ☺

**Franzi und Kathrin** Es gibt sie wirklich, die alles verändernden Ereignisse. Euch damals in der 6. Klasse kennengelernt zu haben hat tatsächlich alles verändert!! Danke für die jahrelange Freundschaft. Ganz egal wohin es uns auch im Leben noch verschlägt ihr werdet mich nicht mehr los!! Danke dass es euch gibt!!

**Familie** Zu guter Letzt will ich mich nun auch noch bei meiner ganzen Familie bedanken, die während meiner Zeit hier in Marburg größer geworden ist: hallo Lara!! Danke für eure Unterstützung, die habe ich wirklich gebraucht.

Ihr wart alle daran beteiligt das es zu dem geführt hat, einem:

*Happy End*

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

|                |                                  |
|----------------|----------------------------------|
| Name:          | Adrienne Zaprasis                |
| Geburtsdatum:  | 02.07.1985                       |
| Geburtsort:    | Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz) |
| Familienstand: | ledig                            |
| Kinder:        | keine                            |
| Nationalität:  | Deutsch                          |

### Promotion

---

|                         |   |
|-------------------------|---|
| seit 10/2011            | Mitglied des SciMento Mentoring Programms für Frauen in den Natur- und Ingenieurwissenschaften  |
| seit 10/2010            | Assoziiertes Mitglied in der International Max Planck Research School (IMPRS) for Environmental, Cellular and Molecular Microbiology (MPI for Terrestrial Microbiology)         |
| seit 04/2010            | Philipps-Universität Marburg  |
| Lehrstuhl Doktorarbeit: | Mikrobiologie am Fachbereich Biologie   |
| Thema Doktorarbeit:     | Prolin als osmotische Schutzsubstanz und Nahrungsquelle<br>Hydrolyse prolinhaltiger Peptide und evolutionäre Anpassung des Argininabbau-Weges für die anabole Prolinbiosynthese |

### Schulbildung und Hochschulstudium

---

|                         |  |
|-------------------------|--|
| 2004 - 2010             | Universität Bayreuth   |
| Abschluss:              | Diplom in Biologie   |
| Lehrstuhl Diplomarbeit: | Ökologische Mikrobiologie  |
| Thema Diplomarbeit:     | Der Einfluss des Regenwurmes <i>Aporrectodea caliginosa</i> auf den mikrobiellen Abbau des Herbizides 4-Chlor-2-Methylphenoxyessigsäure (MCPA) |
| 1992 – 2004:            | Grundschule und Gymnasium in Chemnitz<br>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  |

## 11 Erklärung

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

**„Prolin als osmotische Schutzsubstanz und Nahrungsquelle“**

**Hydrolyse prolinhaltiger Peptide und evolutionäre Anpassung des Argininabbau-Weges  
für die anabole Prolinbiosynthese**

selbständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

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



.....  
Adrienne Zaprasis

Marburg, 10.06.2013

.....  
Ort, Datum