

**Regulation der Aktivität
des Anti-Sigmafaktors RsiX
aus *Bacillus subtilis***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin

Katharina Schäfer

Bayreuth, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2007 bis November 2011 am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wiegert (Hochschule Zittau/Görlitz) angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	04.11.2011
Zulassung durch die Promotionskommission:	16.11.2011
Wissenschaftliches Kolloquium am:	30.03.2012

Amtierende Dekanin: Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Wiegert	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Birgitta Wöhr	(Zweitgutachterin)
Prof. Dr. Ortwin Meyer	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Franz X. Schmid	
PD Dr. Steffen Kolb	

„Das Leben wird vorwärts gelebt und rückwärts verstanden!“

Søren Kierkegaard (1813 – 1855)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Bakterien im Allgemeinen und <i>B. subtilis</i> im Speziellen.....	5
1.2 Regulation der Genexpression in Bakterien.....	6
1.3 Regulation der Transkription	6
1.4 Initiation der Transkription durch Sigmafaktoren.....	7
1.5 Primäre und sekundäre Sigmafaktoren	7
1.6 ECF-Sigmafaktoren.....	8
1.6.1 Regulation von ECF-Sigmafaktoren	9
1.6.1.1 Regulation des ECF-Sigmafaktors σ^E aus <i>E. coli</i>	11
1.6.1.2 Regulation des ECF-Sigmafaktors σ^W aus <i>B. subtilis</i>	12
1.6.2 Der ECF-Sigmafaktor σ^X aus <i>B. subtilis</i>	13
1.6.2.1 Das σ^X -Regulon	14
1.6.2.2 Physiologische Rolle von σ^X	16
1.6.2.3 σ^X -Regulation durch einen Anti-Sigmafaktor	17
1.7 Termination der Transkription	19
1.7.1 Faktorunabhängige Termination	19
1.7.2 Faktorabhängige Termination	20
1.7.2.1 Der Faktor Rho	21
1.7.2.2 Mechanismus der faktorabhängigen Termination.....	22
1.7.2.3 Die Nus-Faktoren.....	24
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	25

2	Material und Methoden	26
2.1	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	26
2.2	Verwendete Puffer und Lösungen.....	33
2.3	Antibiotika-Lösungen.....	43
2.4	Antikörper	43
2.5	Längenstandards.....	44
2.6	Mikrobiologische Methoden	45
2.6.1	Nährmedien	45
2.6.2	Kulturverfahren	46
2.6.2.1	Aufnehmen von Wachstumskurven.....	46
2.6.2.2	Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen.....	47
2.6.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	47
2.6.3.1	Fluoreszenzmikroskopie und -quantifizierung von GFP-Fusionen	47
2.6.3.2	Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Zellmorphologie.....	48
2.6.4	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	48
2.6.4.1	Genetische Manipulation von <i>E. coli</i> -Zellen	48
2.6.4.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	48
2.6.4.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	49
2.6.4.1.3	Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	49
2.6.4.1.4	Elektroporation von <i>E. coli</i> -Zellen	50
2.6.4.2	Genetische Manipulation von <i>B. subtilis</i> -Zellen.....	50
2.6.4.2.1	Herstellung kompetenter <i>B. subtilis</i> -Zellen	50
2.6.4.2.2	Transformation von Plasmid- oder chromosomaler DNA in kompetente <i>B. subtilis</i> -Zellen.....	51
2.6.4.2.3	SPP1-Phagen Transduktion in <i>B. subtilis</i>	52
2.6.4.2.4	Transposonmutagenese.....	52

2.7	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	52
2.7.1	Isolierung von Nukleinsäuren	52
2.7.1.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>B. subtilis</i>	52
2.7.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	53
2.7.1.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA durch Mini-Präparation (Boiling Präparation)	53
2.7.1.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA durch Midi-Präparation	54
2.7.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>B. subtilis</i>	54
2.7.2	Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration.....	55
2.7.3	Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	56
2.7.3.1	Standard-PCR	56
2.7.3.2	Kolonie-PCR.....	57
2.7.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	58
2.7.4.1	Enzymatische Hydrolyse von Nukleinsäuren	58
2.7.4.2	Ligation von Nukleinsäuren.....	59
2.7.5	Reinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR bzw. nach anderen enzymatischen Reaktionen	60
2.7.6	Agarose-Gelelektrophorese	61
2.7.6.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	61
2.7.6.2	RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	61
2.7.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen (Gelextraktion)	62
2.7.8	Sequenzierung	62
2.7.9	Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde.....	62
2.7.10	Reinigung von DNA-/RNA-Sonden durch Präadsorption	62
2.7.11	Southern Blot.....	63
2.7.12	Hybridisierung und Nachweis DIG-markierter Nukleinsäure-Sonden durch Chemolumineszenz	63
2.7.13	RNA-Analytik	64

2.7.13.1	<i>In vitro</i> -Transkription.....	64
2.7.13.2	Northern Blot	65
2.8	Proteinbiochemische Methoden	66
2.8.1	Gewinnung und Aufreinigung verschiedener Fraktionen aus <i>B. subtilis</i>	66
2.8.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
2.8.3	Western Blot.....	68
2.8.3.1	Immunologischer Nachweis von Proteinen	68
2.8.4	Aktivitätstests	69
2.8.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford Assay	69
2.8.4.2	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	69
2.9	Konstruktion von Plasmiden	70
2.10	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> Stämmen.....	72
3	Ergebnisse	75
3.1	Das <i>sigX-rsiX</i> -Operon	75
3.2	RsiX fungiert als negativer Regulator von SigX.....	75
3.3	Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX	79
3.4	Screening nach Genen mit Einfluss auf die zelluläre Konzentration von RsiX.....	82
3.4.1	Transposonmutagenese mit dem Plasmid pIC333	82
3.4.2	Screening nach fluoreszierenden Klonen	84
3.4.3	Retransformation der chromosomalen DNA von scheinbar positiven Klonen nach der Transposonmutagenese	85
3.4.4	Plasmid- <i>rescue</i>	87
3.4.5	Retransformation von Plasmid-DNA nach Plasmid- <i>rescue</i>	88
3.4.6	Sequenzierung der Integrationsstelle des Transposons mini-Tn10.....	89
3.5	Analyse des Einflusses von Rho bei der <i>rsiX</i> -Expression.....	90
3.5.1	Konstruktion eines <i>rho</i> -Deletionsstammes	90
3.5.2	Einfluss von Δrho auf die Konzentration des Anti-Sigmafaktors RsiX.....	91
3.6	Das <i>sigX-rsiX</i> -Operon – reguliert durch Translationskopplung?.....	94

3.7	Die Transkriptionstermination durch Rho nach Bicyclomycin-Zugabe	98
3.8	Kartierung der rut-site im Gen <i>rsiX</i>	101
3.8.1	Fluoreszenzmessungen der GFP-Reporterstämme.....	102
3.8.2	Western Blot Analysen zur Lokalisation der rut-site	105
3.8.3	Northern Blot Analysen und die Einführung von Punktmutationen zur genauen Bestimmung der rut-site in <i>rsiX</i>	107
3.9	Proteolyse von RsiX.....	110
3.9.1	Intramembrane Proteolyse von RsiX durch RasP	111
3.9.2	Untersuchung zur Beteiligung weiterer Proteasen an der RsiX-Proteolyse.....	115
3.10	Der Einfluss von Δrho <i>in vivo</i>	119
4	Diskussion	121
4.1	RsiX ist der negative Regulator von σ^X	121
4.2	Der Transkriptionsterminator Rho beeinflusst die Transkription des <i>sigX-rsiX</i> -Operons	122
4.3	Mögliche Translationskopplung im <i>sigX-rsiX</i> -Operon	125
4.4	Die rut-site im Gen <i>rsiX</i>	127
4.5	Die Proteolyse von RsiX mit RasP-Beteiligung	130
4.6	Der Einfluss von Rho auf die Zellmorphologie	133
5	Ausblick.....	134
	Abkürzungsverzeichnis.....	136
	Literaturverzeichnis.....	139
	Publikationsliste	155
	Danksagung.....	156
	Erklärung.....	158

Zusammenfassung

Der Gram-positive Modellorganismus *Bacillus subtilis* besitzt 17 alternative Sigmafaktoren, von denen 7 zur Gruppe der ECF (extra-cytoplasmic function)-Sigmafaktoren gehören. Einer dieser ECF-Sigmafaktoren, σ^X , und sein entsprechender Anti-Sigmafaktor, RsiX, sind Gegenstand dieser Arbeit. Dabei handelt es sich bei RsiX um ein Transmembranprotein, während σ^X im Cytoplasma lokalisiert ist und von der N-terminalen RsiX-Domäne von einer Interaktion mit der RNA-Polymerase abgehalten wird. σ^W , ein weiterer ECF-Sigmafaktor, und RsiW, der dazugehörige Anti-Sigmafaktor, sind bereits sehr gut untersucht. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zwischen σ^X /RsiX und σ^W /RsiW wurde angenommen, dass die Aktivierung des σ^X -Regulons in vergleichbarer Weise erfolgt, wie es für das σ^W -Regulon aufgrund intensiver Analysen sehr gut untersucht ist.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Transposonmutagenese lieferte entscheidende Hinweise über die Regulation des *sigX-rsiX*-Operons. Es konnte gezeigt werden, dass das *sigX-rsiX*-Operon einer Regulation durch den Transkriptionsterminator Rho unterliegt. Damit wurde das erst dritte Beispiel für eine Termination der Transkription durch den Faktor Rho in *B. subtilis* bekannt.

Als wichtiges Element für die faktorabhängige Termination der Transkription gilt das Vorhandensein einer rut-site, der Bindestelle des Faktors Rho in der naszierenden mRNA. In dieser Arbeit wurden verschiedene Analysetechniken angewandt, um mit Hilfe eines GFP-RsiX-Reporters erstmals eine rut-site in *B. subtilis* zu kartieren. Die hier identifizierte rut-site von *rsiX* ist am 5'-Ende dieses Gens lokalisiert. Bei diesen Analysen wurde außerdem deutlich, dass es im *sigX-rsiX*-Operon zu einer faktorabhängigen intragenischen Termination der Transkription kommt, bei welcher nicht nur die Transkription von *rsiX*, sondern auch die Expression des stromaufwärts liegenden *sigX* beeinflusst wird.

Punktmutationen in der Sequenz für die rut-site von *rsiX* zerstörten den Einfluss des Faktors Rho auf das *sigX-rsiX*-Operon, so dass keine Termination der Transkription mehr stattfand und die detektierbare Menge an *sigX-rsiX*-Transkript deutlich anstieg. Nur so war es möglich, einen *rsiX*-Knockout zu komplementieren. Messungen der β -Galaktosidase-Aktivität eines *lacZ*-Reporters belegten zudem die Funktion von RsiX als Anti-Sigmafaktor von σ^X .

Der Verlust des Einflusses von Rho auf das *sigX-rsiX*-Operon aufgrund einer mutierten rut-site machte auch immunologische Nachweise des Anti-Sigmafaktors möglich.

Infolgedessen konnte der Frage einer möglichen RsiX-Proteolyse nach dem Vorbild der RsiW-Proteolyse nachgegangen werden. Für RsiW wurde bereits gezeigt, dass ein bestimmtes Stress-Signal den Abbau des Anti-Sigmafaktors einleitet. Die Proteolyse von RsiW erfolgt dann nach dem Mechanismus der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP) unter der Beteiligung mehrerer Proteasen. Neben der Beteiligung der Protease RasP an der RsiW-Proteolyse konnte hier auch die Beteiligung von RasP an der RsiX-Proteolyse nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde aber ausgeschlossen, dass die Protease PrsW, welche auch an der RsiW-Proteolyse beteiligt ist, in die RsiX-Proteolyse involviert ist. Demnach können die einzelnen Schritte der RsiW-Proteolyse nicht einfach auf die RsiX-Proteolyse übertragen werden, obwohl es sich bei beiden Transmembranproteinen um Anti-Sigmafaktoren ihrer jeweiligen ECF-Sigmafaktoren handelt.

Summary

The Gram-positive model organism *Bacillus subtilis* encodes 17 alternative sigma factors. 7 of these sigma factors belong to the group of ECF (extra-cytoplasmic function) sigma factors. The subject of this work is about σ^X , one of those ECF sigma factors, and RsiX, its corresponding anti-sigma factor. RsiX is a transmembrane protein, whereas σ^X is located in the cytoplasm and is sequestered by the N-terminal part of RsiX from its interaction with RNA-Polymerase. σ^W , another ECF sigma factor, and RsiW, its corresponding anti-sigma factor, are already very well investigated. Due to structural similarities between σ^X /RsiX and σ^W /RsiW it was assumed that the activation of the σ^X regulon occurred in a way similar to that of the σ^W regulon, which is very well known through intensive studies.

The transposon screen used in this study yielded some crucial information about the regulation of the *sigX-rsiX* operon. It was shown that the *sigX-rsiX* operon is regulated by the transcriptional termination factor Rho. Including the Rho-dependent regulation of the *sigX-rsiX* operon there are so far only three processes known to be regulated by the factor Rho in *B. subtilis*.

An important element for the factor-dependent termination of the transcription is the existence of a rut-site, the Rho binding site in the nascent mRNA. In this study a GFP-RsiX reporter was used in several approaches to map a rut-site in *B. subtilis* for the first time. The rut-site for *rsiX* is located at the 5'-end of this gene. During those analyses it became evident that a factor-dependent intragenic transcriptional termination exists in the *sigX-rsiX* operon. In this case not only the transcription of *rsiX*, but also the expression of the upstream located *sigX* is influenced by the activity of Rho.

Pointmutations in the sequence of the rut-site for *rsiX* abolished the influence of Rho on the *sigX-rsiX* operon so that transcriptional termination no longer occurred and the detectable amount of *sigX-rsiX* transcript considerably increased. In this way it was possible to complement a *rsiX* knockout. Measurements of the β -Galactosidase activity of a *lacZ* reporter showed that RsiX acts as the anti-sigma factor of σ^X .

The loss of the influence of Rho on the *sigX-rsiX* operon due to the mutated rut-site enabled us to detect the anti-sigma factor immunologically. Therefore it was possible to analyze similarities between the proteolysis of RsiX and RsiW. For RsiW it has been shown that a certain stress signal triggers degradation of the anti-sigma factor. The proteolysis of RsiW

occurs in a mechanism called regulated intramembrane proteolysis (RIP) with the involvement of several proteases. Besides the participation of the protease RasP in the RsiW proteolysis this study also revealed the involvement of RasP in the RsiX proteolysis. Concomitant the results of this study exclude the protease PrsW being involved in RsiX proteolysis, although PrsW acts as site-1 protease in the RsiW proteolysis. Although both, RsiX and RsiW, are transmembrane proteins acting as anti-sigma factors of their respective ECF sigma factors, the mechanism of RsiW proteolysis cannot be simply transferred to RsiX proteolysis.

1 Einleitung

1.1 Bakterien im Allgemeinen und *B. subtilis* im Speziellen

Das Vorkommen von Bakterien kann als ubiquitär bezeichnet werden. Dies liegt auch in ihrer enormen Anpassungsfähigkeit begründet. Extreme Werte der Temperatur, des pH-Wertes oder auch des Salzgehaltes stellen bei der Besiedelung eines Habitats durch Bakterien kein Problem dar. Obwohl Bakterien Eigenschaften besitzen, die sie auch für den Menschen zum Pathogen werden lassen, gibt es sehr viel mehr nützliche Funktionen, wodurch Bakterien sowohl im Haushalt als auch in der Industrie zum Einsatz kommen (Schlegel 1992).

Daneben werden Bakterien auch in der Grundlagenforschung als Modellorganismen verwendet. Zwei der häufigsten Vertreter sind hier *Escherichia coli*, ein Gram-negatives Bakterium, und *B. subtilis*, ein Gram-positiver Organismus.

Im Fokus dieser Arbeit steht das Bodenbakterium *B. subtilis*, welches auch unter dem Namen „Heubacillus“ bekannt geworden ist, da man es leicht aus einem Heuaufguss isolieren kann. Erstmals wurde dieses Bakterium 1838 von Ehrenberg als *Vibrio subtilis* beschrieben und wenig später von Cohn in *Bacillus subtilis* umbenannt. Dieses stäbchenförmige Bakterium kann eine Größe von etwa 2-3 μm erreichen. *B. subtilis* wurde aber nicht nur im Boden oder Heuaufgüssen gefunden, sondern auch in Milch (Lawrence & Ford 1916). Das zeigt, dass *B. subtilis* als nicht-pathogen gilt. Es wurde dem Bakterium sogar der Status eines GRAS-Organismus (generally recognized as safe) verliehen (Kayser 2002).

Eigenschaften wie die Apathogenität, die leichte Kultivierbarkeit und auch die kurze Generationszeit von nur 26 min bei 40 °C begründen u. a. die Verwendung von *B. subtilis* als Modellorganismus (Schlegel 1992). Ferner gehört *B. subtilis* mit zu den ersten Bakterien, deren Genom vollständig sequenziert wurde. Bereits 2 Jahre nachdem das erste vollständig sequenzierte Genom eines Bakteriums veröffentlicht wurde (Fleischmann *et al.* 1995), publizierten Kunst *et al.* die Ergebnisse der Sequenzierung des *B. subtilis* Genoms. Demnach kodiert dieses Bakterium für ca. 4100 Proteine (Kunst *et al.* 1997). In der Verfügbarkeit der gesamten Sequenz des Genoms liegt ein weiterer wichtiger Grund für den Einsatz von *B. subtilis* in der Grundlagenforschung über Genregulation. Wichtige regulatorische Grundprinzipien, z. B. die Entdeckung des ersten alternativen Sigmafaktors (Fox & Pero 1974; Haldenwang & Losick 1980), sind an *B. subtilis* aufgeklärt worden.

Zusätzlich zur Verwendung von *B. subtilis* in der biologischen und medizinischen Forschung kommt das Gram-positive Bakterium auch in der Industrie zum Einsatz. So benutzt die Waschmittelindustrie den Vorteil, dass extrazelluläre Enzyme wie z. B. Subtilisin E (Wong *et al.* 1984) von *B. subtilis* in das umgebende Medium sekretiert werden (Simonen & Palva 1993; Antelmann *et al.* 2001). Des Weiteren wird *B. subtilis* in der Landwirtschaft als natürliches Fungizid verwendet (Leibinger *et al.* 1997).

1.2 Regulation der Genexpression in Bakterien

In jeder Zelle muss die Expression der Gene in einer geregelten Art und Weise erfolgen. Dies gilt in besonderer Weise für Bakterien. Aufgrund ihrer sehr geringen Größe von nur wenigen Mikrometern können nicht zu jeder Zeit alle kodierten Proteine in großer Menge in einer bakteriellen Zelle vorrätig sein. In Abhängigkeit der äußeren Bedingungen muss die Zelle entscheiden, welche Proteine benötigt werden und die entsprechende Genexpression regeln. Eine Vielzahl verschiedener Regulationsmechanismen steht dafür zur Verfügung (Schlegel 1992). Eine Regulation kann dabei schon auf dem Level der Transkription erfolgen oder erst später während der Translation, sowie z. T. auch posttranslational. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt jedoch auf der Regulation der Transkription.

1.3 Regulation der Transkription

Die Transkription bezeichnet den Prozess der RNA-Synthese anhand einer DNA-Matrize (Jacob & Monod 1961). Essentiell für diesen Prozess ist das Vorhandensein einer RNA-Polymerase (Weiss 1960; Hurwitz *et al.* 1961; Chamberlin & Berg 1962). Im Gegensatz zu den Eukaryoten verfügen die Bakterien nur über eine RNA-Polymerase, welche für die Synthese der mRNA, rRNA und auch der tRNA (Hoagland 1960; Brenner *et al.* 1961) verantwortlich ist. Es wird dabei zwischen zwei verschiedenen Formen der RNA-Polymerase unterschieden, dem Core-Enzym und dem Holo-Enzym (Burgess *et al.* 1969). Welche Form vorliegt, wird dabei von den einzelnen Untereinheiten bestimmt, aus denen die RNA-Polymerase zusammengesetzt ist. Das RNA-Polymerase Core-Enzym wird von fünf Untereinheiten gebildet, welche die Bezeichnung α_2 , β , β' und ω tragen und zusammen das katalytische Zentrum bilden (Haldenwang 1995; Mathew & Chatterji 2006). Sobald sich eine

weitere Untereinheit, der Sigmafaktor (σ), mit dem Core-Enzym verbindet, spricht man von dem RNA-Polymerase Holo-Enzym.

1.4 Initiation der Transkription durch Sigmafaktoren

Die Promotor-Spezifität, durch welche das RNA-Polymerase Holo-Enzym die Transkription von Genen spezifisch initiiert, wird allein durch die σ -Untereinheit hervorgerufen (Dunn & Bautz 1969; Travers & Burgess 1969; Burgess & Travers 1970). Das Core-Enzym weist im Gegensatz dazu eine sehr unspezifische Bindung der DNA auf. Die σ -Untereinheit ist in der Lage, gezielt zwischen einzelnen DNA-Sequenzen zu unterscheiden und erkennt somit eine spezifische Promotorregion (Dombroski *et al.* 1992; Borukhov & Severinov 2002).

Sequenzanalysen unter vielen Sigmafaktoren haben gezeigt, dass man diese in zwei große Gruppen einteilen kann: erstens in die Gruppe mit Sequenzhomologien zu σ^{70} , dem primären Sigmafaktor aus *E. coli*, und zweitens in die Gruppe mit Sequenzhomologien zu σ^{54} , dem für die Transkription von Stickstoff-regulierten Genen benötigten Sigmafaktor aus *E. coli* (Gross *et al.* 1992).

Beide Gruppen zeigen zudem noch Unterschiede in der Erkennung von Promotorregionen auf. Sigmafaktoren aus der σ^{70} -Familie erkennen DNA-Sequenzen, welche ungefähr 10 bp und 35 bp stromaufwärts von dem ersten Nukleotid des zu transkribierenden Genes liegen. Man spricht auch von der -35 und der -10 Region (Reznikoff *et al.* 1985; Doi & Wang 1986). Die Promotorregionen, die von der σ^{54} -Familie erkannt werden, liegen hingegen 12 bp und 24 bp (-24 und -12 Region) stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (Gussin *et al.* 1986). Die Stärke eines Promotors hängt aber allein von der Länge der Sequenz zwischen den zwei Regionen ab und nicht von der Nukleotidzusammensetzung (Stefano & Gralla 1982). Für σ^{70} aus *E. coli* wurde gezeigt, dass dieser Sigmafaktor an die -35 und die -10 Region bindet und dabei den Abstand zwischen beiden Regionen erkennt (Dombroski *et al.* 1996).

1.5 Primäre und sekundäre Sigmafaktoren

Neben der beschriebenen Unterscheidung von Sigmafaktoren anhand von Sequenzhomologien kann man diese auch in primäre und sekundäre Sigmafaktoren einteilen. Gene, die z. B. für essentielle Biosynthesen exprimiert werden müssen, werden mit Hilfe der

primären Sigmafaktoren transkribiert (Hughes & Mathee 1998). In *B. subtilis* ist der essentielle, primäre Sigmafaktor σ^A (Price *et al.* 1983) und in *E. coli* ist es σ^{70} (Berg *et al.* 1971). Alternative (sekundäre) Sigmafaktoren sind für die Transkription von speziellen Regulons nötig. Sie dienen der Expression von bestimmten Genen als Anpassung auf veränderte Umweltbedingungen und Nährstoffvorkommen oder auch unter Stressbedingungen (Helmann 2002). Der erste alternative Sigmafaktor überhaupt wurde in *B. subtilis* durch Studien mit dem Bakteriophagen SPO1 entdeckt. Hierbei handelt es sich um σ^B , welcher für die allgemeine Stressantwort in *B. subtilis* benötigt wird (Fox & Pero 1974; Haldenwang & Losick 1980).

Aufgrund der Vielzahl an identifizierten Sigmafaktoren wurden die Sigmafaktoren mit Sequenzhomologien zu σ^{70} von Lonetto *et al.* in drei Gruppen eingeteilt und später von Helmann um zwei weitere Gruppen ergänzt (Lonetto *et al.* 1992; Helmann 2002). In einer dieser Gruppen, Gruppe 4, werden die ECF-Sigmafaktoren zusammengefasst, welche im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

1.6 ECF-Sigmafaktoren

Die ECF-Sigmafaktoren wurden so benannt, weil diese Sigmafaktoren im Allgemeinen an der Regulation von Genen beteiligt sind, die für Proteine mit extracytoplasmatischer Funktion (extra-cytoplasmic function) kodieren. Die ECF-Sigmafaktoren fungieren dabei als Effektoren nach extracytoplasmatischem Stimulus (Lonetto *et al.* 1994). Beispielhaft für die Vielzahl der mit ECF-Sigmafaktoren verbundenen Prozesse sollen hier der Eisen-Transport (σ^{FecI} aus *E. coli*) (Braun 1997), die Alginat-Sekretion (AlgU/T in *P. aeruginosa*) (Hershberger *et al.* 1995) und die Hitze-Schock-Antwort (σ^E aus *E. coli*) (De Las Penas *et al.* 1997b) genannt werden. Allgemein können diese Prozesse als Transport, Sekretion und extracytoplasmatischer Stress zusammengefasst werden (Helmann 2002).

Wie bereits im Kapitel 1.5 erwähnt, zeigen alle ECF-Sigmafaktoren Sequenzhomologien zu σ^{70} aus *E. coli*. Allerdings unterscheiden sie sich von den Sequenzen der meisten anderen Sigmafaktoren dieser Gruppe und bilden auch kleinere Proteine. Man hat festgestellt, dass die Sigmafaktoren, welche zur σ^{70} -Familie gehören, vier konservierte Regionen in ihrer Aminosäuresequenz besitzen. Lonetto *et al.* zeigten anhand von sieben Beispielen für ECF-Sigmafaktoren aus verschiedenen Organismen, darunter auch σ^X aus *B. subtilis*, dass sich die ECF-Sigmafaktoren von anderen σ^{70} -Sigmafaktoren darin unterscheiden, dass sie kürzere

Peptide bilden, da ihnen der größte Teil der konservierten Region 3 fehlt (Lonetto *et al.* 1994). Auch phylogenetische Untersuchungen wurden von Lonetto *et al.* durchgeführt. Sie führten zu dem Schluss, dass man die ECF-Sigmafaktoren zusätzlich in zwei Untergruppen aufteilen kann (Lonetto *et al.* 1994). Spätere phylogenetische Untersuchungen deckten sogar eine viel größere Diversität unter den ECF-Sigmafaktoren auf (Paget & Helmann 2003; Staron *et al.* 2009).

Wie schon im Kapitel 1.4 erläutert, wird die Promotorspezifität der RNA-Polymerase allein durch die Sigmafaktoren vermittelt. Dabei haben besonders die -35 und die -10 Region des Promotors eine große Bedeutung für die σ^{70} -Familie. Für ECF-Sigmafaktoren wurden Konsensussequenzen für diese Regionen gefunden. Es handelt sich um das AAC-Motiv für die -35 Region und das CGT-Motiv für die -10 Region (Helmann 2002).

Die ECF-Sigmafaktoren findet man nicht nur bei *E. coli*. Sie sind, oft in großer Anzahl, bei vielen weiteren Organismen vertreten. So besitzt z. B. *Mycobacterium tuberculosis* gleich 10 (Cole *et al.* 1998) der ECF-Sigmafaktoren und *Streptomyces coelicolor* sogar 49 (Bentley *et al.* 2002; Helmann 2002). Der erste ECF-Sigmafaktor überhaupt wurde ebenfalls in *S. coelicolor* entdeckt (Lonetto *et al.* 1994).

Von den 17 alternativen Sigmafaktoren, die das Genom von *B. subtilis* kodiert, konnten ebenso sieben in die Gruppe der ECF-Sigmafaktoren eingeordnet werden (Kunst *et al.* 1997; Helmann 2002; MacLellan *et al.* 2008). σ^M , σ^V , σ^W , σ^X , σ^Y , σ^Z und σ^{YlaC} sind die ECF-Sigmafaktoren aus *B. subtilis*.

1.6.1 Regulation von ECF-Sigmafaktoren

Die Regulation der Genexpression auf der Ebene der Transkriptionsinitiation erfolgt u. a. durch die Sigmafaktoren. Des Weiteren können auch Repressoren und Aktivatoren die Transkription beeinflussen. Zudem unterliegen die Sigmafaktoren selbst auch einer Regulation durch Antagonisten. Diese Antagonisten werden als Anti-Sigmafaktoren bezeichnet und fungieren als negative Regulatoren. Aufgrund ihrer Lokalisation, dem Cytoplasma, wird eine Gruppe von Anti-Sigmafaktoren als cytoplasmatische Anti-Sigmafaktoren bezeichnet (Hughes & Mathee 1998). Zu dieser Gruppe zählen z. B. FlgM, der negative Regulator von σ^{28} (Chadsey *et al.* 1998) und DnaK, der negative Regulator von σ^{32} (McCarty *et al.* 1996).

Die in Kapitel 1.6 beschriebenen ECF-Sigmafaktoren werden im Gegensatz dazu oft von membrangebundenen Anti-Sigmafaktoren reguliert. Die Gene für diese Anti-Sigmafaktoren liegen zumeist im gleichen Operon wie die stromaufwärts gelegenen Gene für die entsprechenden ECF-Sigmafaktoren (Hughes & Mathee 1998). Die Anti-Sigmafaktoren sind meistens Transmembranproteine, deren N-terminale Domäne direkt mit den jeweiligen ECF-Sigmafaktoren interagiert. Der Umstand zeigt, dass sich diese Domäne im Cytoplasma befinden muss. Yoshimura *et al.* (2004) sprechen deshalb von einer intrazellulären inhibierenden Domäne und bezeichnen die C-terminale Domäne im Gegensatz dazu als extracytoplasmatische sensorische Domäne. Das direkte Zusammenspiel zwischen Sigma- und Anti-Sigmafaktor wurde u. a. in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten gezeigt (Yoshimura *et al.* 2004).

Die inhibierende Wirkung des Anti-Sigmafaktors gegenüber dem ECF-Sigmafaktor wird aufgehoben sobald dieser einen extracytoplasmatischen Stimulus erhält. Im Anschluss kann die spezifische Transkription erfolgen. Helmann vergleicht deshalb das System aus Anti-Sigmafaktor und Sigmafaktor sogar mit dem Zwei-Komponenten-System (Stock *et al.* 2000), bei welchem auch extrazelluläre Proteindomänen einer Histidin-Kinase Signale wahrnehmen und damit im Cytoplasma durch DNA-bindende Proteine zur Transkription führen (Helmann 2002).

Bei einer allgemeinen Betrachtung der Regulation von Anti-Sigmafaktoren nach einem zellulären Stimulus kann diese beispielsweise durch ein weiteres Protein, dem Anti Anti-Sigmafaktor, oder durch den Transport des Anti-Sigmafaktors aus der Zelle erfolgen. Weiterhin spielt auch der proteolytische Abbau des Anti-Sigmafaktors eine Rolle (Brown & Hughes 1995). Der negative Regulator von σ^{28} , FlgM, wird z. B. aus der Zelle exportiert, wenn die σ^{28} -spezifische Transkription beginnen soll (Hughes *et al.* 1993). RsbW, der negative Regulator von σ^B aus *B. subtilis*, wird durch den Anti Anti-Sigmafaktor RsbV von einer Interaktion mit dem Sigmafaktor abgehalten (Dufour & Haldenwang 1994).

Die Regulation von ECF-Sigmafaktoren konnte bislang nur für sehr wenige Beispiele detailliert aufgeklärt werden. Dazu zählen σ^E aus *E. coli* und σ^W aus *B. subtilis* (Heinrich & Wiegert 2009). Es gibt jedoch viele Hinweise, dass bei der Regulation von ECF-Sigmafaktoren der Prozess der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP) der jeweiligen Anti-Sigmafaktoren eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 1) (Brown *et al.* 2000). Exemplarisch sollen hier die Freisetzung von σ^E aus *E. coli* (Kapitel 1.6.1.1) sowie von σ^W aus *B. subtilis* (Kapitel 1.6.1.2) durch RIP erläutert werden.

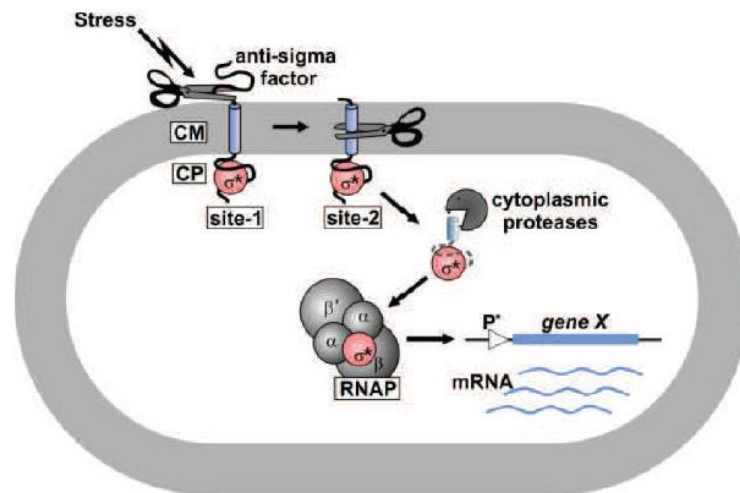


Abbildung 1: Modell der Regulation von ECF-Sigmafaktoren durch regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) der entsprechenden Anti-Sigmafaktoren. Der Anti-Sigmafaktor wird nach einem spezifischen Stress-Stimulus von einer site-1 Protease (site-1) und einer site-2 Protease (site-2) prozessiert, bevor er im Cytoplasma (CP) vollständig von einer cytoplasmatischen Protease abgebaut wird und den Sigmafaktor (σ^*) entlässt, welcher dann zusammen mit der RNA-Polymerase (RNAP) die Transkription spezifischer Gene initiieren kann. CM: cytoplasmatische Membran. Aus: Heinrich & Wiegert (2009).

Zunehmende Bedeutung gewinnen die ECF-Sigmafaktoren und ihre Regulation auch bei der Untersuchung der pathogenen Wirkung von Mikroorganismen (Bashyam & Hasnain 2004; Urban 2009). Der ECF-Sigmafaktor σ^E aus *M. tuberculosis* z. B. spielt auch eine Rolle beim Überleben von *M. tuberculosis* in Makrophagen vom Mensch und der Maus (Manganelli *et al.* 2001). Des Weiteren ist die site-2 Protease Rv2869c aus *M. tuberculosis* für die Persistenz von *M. tuberculosis* in Mäuse-Lungen verantwortlich (Makinoshima & Glickman 2005) und beeinflusst die Transkription z. B. von Genen, die in die Lipid-Biosynthese involviert sind, durch die Proteolyse der drei Anti-Sigmafaktoren Anti-SigK, Anti-SigL und Anti-SigM (Sklar *et al.* 2010). Site-2 Proteasen sind auch am Prozess der regulierten intramembranen Proteolyse von ECF-Sigmafaktoren beteiligt (Weihofen & Martoglio 2003).

1.6.1.1 Regulation des ECF-Sigmafaktors σ^E aus *E. coli*

E. coli reagiert auf extracytoplasmatischen Stress wie z. B. Hitze u. a. durch Aktivierung von σ^E (Erickson & Gross 1989). Der ECF-Sigmafaktor σ^E wird aber auch durch große Mengen falsch gefalteter Proteine der äußeren Membran (outer membrane proteins; OMPs) aktiviert (Meccas *et al.* 1993) und ist zusätzlich schon bei normalen Temperaturen für *E. coli* essentiell (De Las Penas *et al.* 1997a). Das Gen, welches für σ^E kodiert, ist mit drei weiteren Genen,

welche stromabwärts von diesem liegen, in einem Operon lokalisiert. Von diesen drei Genen werden die Proteine RseABC (regulator of σigma E, Protein A, B, C) kodiert (De Las Penas *et al.* 1997b). RseA ist der Anti-Sigmafaktor von σ^E . Dieser ist in der inneren Membran lokalisiert und inhibiert σ^E mit seiner N-terminalen cytoplasmatischen Domäne (Missiakas *et al.* 1997; De Las Penas *et al.* 1997b). Durch beispielsweise einen Hitzeschock denaturieren die Porine der äußeren Membran. Dadurch kommt es zur Bindung zwischen den C-terminalen Enden der Porinen und der periplasmatischen PDZ-Domäne der Membranprotease DegS, wodurch diese in einen aktiven Zustand übergeht und die site-1 Proteolyse des Anti-Sigmafaktors RseA katalysiert. Man kann diesen Prozess auch als allosterische Aktivierung der Protease DegS bezeichnen (Walsh *et al.* 2003; Sohn *et al.* 2007; Sohn & Sauer 2009). Durch die site-1 Proteolyse wird RseA in der periplasmatischen Domäne geschnitten und wird damit zum Substrat für RseP (regulator of σigma E Protease), einer intramembran-schneidenden Zink-abhängigen Protease der site-2 Protease-Familie, welche den sogenannten iCliPs (interamembrane cleaving proteases) zugeordnet wird (Alba *et al.* 2002; Kanehara *et al.* 2002; Weihofen & Martoglio 2003). In einem letzten Schritt nach der site-2 Proteolyse wird nun RseA mit dem immer noch gebundenen σ^E ins Cytoplasma entlassen, wo mit Hilfe des Adapters SspB und der cytoplasmatischen Protease ClpXP RseA vollständig prozessiert wird, was dann zur Freisetzung von σ^E und damit zur Transkriptionsinitiation führt (Flynn *et al.* 2004; Chaba *et al.* 2007).

1.6.1.2 Regulation des ECF-Sigmafaktors σ^W aus *B. subtilis*

Neben σ^E aus *E. coli* zählt auch der ECF-Sigmafaktor σ^W aus *B. subtilis* zu den am besten untersuchten alternativen Sigmafaktoren der ECF-Familie. σ^W wird von dem Gen *sigW* kodiert und ist zusammen mit *rsiW* in einem Operon lokalisiert. *rsiW* kodiert für den membrangebundenen Anti-Sigmafaktor RsiW (regulator of σigma W) (Huang *et al.* 1998). Außer seinem eigenen Operon kontrolliert σ^W zusätzlich die Expression von ca. 60 Genen in 30 Operons (Helmann 2006). Helmann spricht in diesem Zusammenhang von einem „Antibiosis“-Regulon, da das σ^W -Regulon zum einen durch Zellwandbiosynthese-inhibierende Antibiotika induziert wird, und zum anderen spielen viele Proteine, deren Gene von σ^W kontrolliert werden, eine Rolle bei der Detoxifikation bzw. der Antibiotika-Synthese (Helmann 2002). So wird beispielsweise die Synthese eines Penicillin-bindenden Proteins,

PbpE, von σ^W ebenso kontrolliert wie die Bildung des Fosfomycin-Resistenz Proteins FosB (Huang *et al.* 1999; Cao *et al.* 2001). Sogar eine intrinsische Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen anderer *Bacilli* geht auf σ^W zurück (Butcher & Helmann 2006).

Das σ^W -Regulon wird durch eine Vielzahl verschiedener Substanzen induziert. Es wurden bereits Alkali-Stress sowie die Infektion mit Phagen (Wiegert *et al.* 2001), Salz-Stress (Petersohn *et al.* 2001), antimikrobielle Peptide (Pietiainen *et al.* 2005) und zellwandspezifische Antibiotika wie Vancomycin (Cao *et al.* 2002) als spezifische Stimuli identifiziert, die zur Transkriptionsinitiation σ^W -kontrollierter Gene führen.

Bevor die Transkription eingeleitet werden kann, muss der ECF-Sigmafaktor σ^W in ungebundener Form im Cytoplasma vorliegen, was nur durch Proteolyse seines Anti-Sigmafaktors RsiW erfolgen kann. RsiW ist in der Membran lokalisiert, nimmt die verschiedenen Stimuli mit der C-terminalen Domäne wahr und inhibiert mit der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne σ^W (Schöbel *et al.* 2004). Die Freisetzung des Sigmafaktors erfolgt durch den Prozess der regulierten intramembranen Proteolyse, wie er bereits für σ^E aus *E. coli* (Kapitel 1.6.1.1) beschrieben wurde, wobei jedoch kleine Unterschiede vorhanden sind. Durch einen der oben genannten Stimuli wird die site-1 Proteolyse von RsiW eingeleitet. Die site-1 Protease PrsW (protease responsible for activating sigma W) schneidet RsiW in der extracytoplasmatischen Domäne (Heinrich & Wiegert 2006; Ellermeier & Losick 2006). Die nun verkürzte Form von RsiW wird nachfolgend von einer noch unbekanntem weiteren Protease prozessiert, bevor RsiW zum Substrat für die site-2 Protease RasP werden kann (Heinrich *et al.* 2009). Die site-2 Protease RasP (regulating alternative sigma factor protease), welche auch zur Gruppe der iClip (intramembrane cleaving protease) gehört (Weihofen & Martoglio 2003), schneidet im Anschluss den weiter verkürzten Anti-Sigmafaktor RsiW innerhalb seiner Transmembrandomäne, sodass im Resultat der verkürzte Anti-Sigmafaktor mit gebundenem Sigmafaktor ins Cytoplasma übergehen kann (Schöbel *et al.* 2004). Hier wird schließlich der verbliebene Teil von RsiW vollständig durch die Clp-Protease prozessiert (Zellmeier *et al.* 2006) und σ^W kann sich mit dem Core-Enzym der RNA-Polymerase verbinden und die Transkription einleiten.

1.6.2 Der ECF-Sigmafaktor σ^X aus *B. subtilis*

Der erste der sieben ECF-Sigmafaktoren aus *B. subtilis*, welcher als solcher identifiziert wurde, war σ^X (Lonetto *et al.* 1994; Kunst *et al.* 1997). Das Gen des ECF-Sigmafaktors σ^X ,

sigX, wurde ursprünglich als *orfX20* in der chromosomalen Region von *spoVA* bis *serA* identifiziert. Es wurde dabei eine Sequenzübereinstimmung von 25 % mit dem Gen des ECF-Sigmafaktors σ^{FecI} , *fecI*, aus *E. coli* gefunden (Sorokin *et al.* 1993). σ^{FecI} ist an der Eisencitrat-Verwertung in *E. coli* beteiligt. Als Sigmafaktor initiiert es die Transkription der Eisentransport-Gene *fecABCDE* (Van Hove *et al.* 1990). Brutsche & Braun vermuteten daher auch eine Beteiligung von σ^{X} an der Eisencitrat-Verwertung in *B. subtilis*. In der Tat konnte eine Komplementation eines *fecI*-Knockouts durch *sigX* in *E. coli* gezeigt werden. Jedoch führten die Analysen in *B. subtilis* zu dem Ergebnis, dass σ^{X} nicht an einer Eisencitrat-Verwertung beteiligt ist, auch da Eisencitrat von *B. subtilis* nicht als Eisen-Quelle benutzt wird. Des Weiteren konnte eine Beteiligung von σ^{X} an der Regulation des Transportsystems von Eisen-Siderophoren ausgeschlossen werden (Brutsche & Braun 1997). Demzufolge sind σ^{FecI} und σ^{X} keine Orthologe, sondern lediglich Homologe (Helmann 2002).

1.6.2.1 Das σ^{X} -Regulon

Für σ^{X} wurde eine Zugehörigkeit zur Gruppe 4 der σ^{70} -Familie, den ECF-Sigmafaktoren, gezeigt (Lonetto *et al.* 1994; Helmann 2002). Als Sigmafaktor erkennt σ^{X} ganz spezifische Promotorsequenzen und führt so zur Transkription des σ^{X} -kontrollierten Regulons. Eine Promotor-Konsensus-Suche ermöglichte die Identifizierung von 15 mutmaßlichen Genen, die unter der Kontrolle von σ^{X} stehen. Die hierfür verwendete Konsensussequenz für die -35 Region lautet tgtAACnww, die für die -10 Region lautet CGwCww. Dabei bedeuten große Buchstaben, dass diese Basen unverändert sind, w steht für entweder A oder T und n steht für eine beliebige Base (Huang & Helmann 1998). Als Ergebnis dieser Suche wurden als Mitglieder des σ^{X} -Regulons u. a. *csbB*, das Gen für eine membrangebundene Glykosyltransferase (Akbar & Price 1996), *lytR*, das Gen für einen negativen Regulator der Autolysin-Expression (Lazarevic *et al.* 1992), das *pss*-Operon, welches in die Phosphatidylethanolamin-Synthese involviert ist (Okada *et al.* 1994; Matsumoto *et al.* 1998), und auch das *dlt*-Operon, welches an der D-Alanylierung von Teichonsäuren beteiligt ist (Perego *et al.* 1995), identifiziert (Huang & Helmann 1998; Helmann 2002). Daneben wurde von Huang & Helmann auch das *sigX*-Operon als σ^{X} -kontrolliert gefunden. Allerdings wurde zuvor bereits von Brutsche & Braun die Autoregulation von *sigX* nachgewiesen (Brutsche & Braun 1997; Huang & Helmann 1998).

Anhand der von σ^X kontrollierten Gene können Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von σ^X gezogen werden. Zusammenfassend kann daher σ^X eine wichtige Rolle bei Prozessen zugesprochen werden, die die Zusammensetzung oder den Metabolismus der Zellhülle beeinflussen (Helmann 2002). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass sich durch die Einführung von positiv geladenen Aminogruppen (bedingt durch die σ^X -kontrollierte Expression des *dlt*-Operons und des *pss*-Operons) in die Teichonsäuren der Zellwand bzw. in die Zellmembran die Ladung der Zellhülle insgesamt zum Positiven hin verschiebt. Dieser Umstand resultiert in einer Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (Cao & Helmann 2004) wie z. B. Nisin, einem lanthioninhalten Peptid aus *Lactococcus lactis* (Jack *et al.* 1995). Ferner ist σ^X an der Regulation der *abh*-Expression beteiligt. *abh* kodiert für einen Regulator der am Aufbau des *B. subtilis*-Biofilms beteiligt ist (Murray *et al.* 2009). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass viele Gene des σ^X -Regulons nicht nur von σ^X sondern auch von anderen Sigmafaktoren exprimiert werden können. Es gibt Gene, wie z. B. *csbB*, die multiple Promotoren besitzen. Andere Gene, z. B. *pbpX* (Cao & Helmann 2004), werden von verschiedenen Sigmafaktoren, aber von dem gleichen Promotor exprimiert (Helmann 2002). Dabei kommt es nicht nur unter den Sigmafaktoren im Allgemeinen zu einer überlappenden Promotorerkennung, sondern auch in der Gruppe der ECF-Sigmafaktoren gibt es diese Überlappung. Huang *et al.* konnten zeigen, dass es zu einer Überlappung zwischen dem σ^X - und σ^W -Regulon kommt. Weiter konnte festgestellt werden, dass dafür nur die -35 Region des Promotors verantwortlich sein kann, da diese Region unter den ECF-Sigmafaktoren ähnlich ist (Huang *et al.* 1998). Wenig später wurde gezeigt, dass in der Tat die -10 Region eines Promotors für eine spezifische Erkennung entweder durch σ^X oder σ^W verantwortlich ist und dass die Ursache dafür in der Aminosäuresequenz in der konservierten Region 2 der σ^{70} -Familie zu finden ist (Qiu & Helmann 2001). Ferner gibt es auch Überlappungen zwischen dem σ^X - und σ^M -Regulon. Das Gen für eine Bacitracin-Transportpermease, *bcrC*, besitzt einen Promotor, der von beiden ECF-Sigmafaktoren erkannt wird (Cao & Helmann 2002; Ohki *et al.* 2003; Rietkotter *et al.* 2008). Weiterführende Analysen konnten darlegen, dass sogar alle drei Regulons, das σ^X -, σ^M - und das σ^W -Regulon, in ihrer Promotor-Spezifität überlappen. Ein gleichzeitiger Knockout aller drei Gene *sigX*, *sigM* und *sigW* zeigte einen signifikanten Phänotyp im Gegensatz zu einem Einfach- oder Doppel-Knockout dieser Gene, was als ein weiterer Beweis für die Überlappung dieser drei Sigmafaktor-Regulons gilt (Mascher *et al.* 2007).

1.6.2.2 Physiologische Rolle von σ^X

σ^X wird von einem nicht essentiellen Gen, *sigX*, kodiert. Daher wurden bereits einige Deletionsexperimente durchgeführt, um einen Hinweis auf die physiologische Rolle von σ^X zu erhalten. Durch die im Kapitel 1.6.2.1 erwähnten Überlappungen mit verschiedenen Sigmafaktor-Regulons, erwies es sich als schwierig, signifikante Phänotypen für den *sigX*-Knockout zu beobachten. Dennoch konnten einige Aussagen getroffen werden.

Obwohl die Hitze-Schock Regulation und die Regulation bei oxidativem Stress in keiner Weise σ^X -kontrolliert scheinen, wurde in *sigX*-Mutanten festgestellt, dass diese Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Hitze und oxidativem Stress aufwiesen. Es wird daher an dieser Stelle vielmehr von einem indirekten σ^X -Einfluss ausgegangen (Huang *et al.* 1997; Price 2000; Hecker & Volker 2001).

Durch die Zugehörigkeit bestimmter Gene zum σ^X -Regulon konnte der Einfluss von σ^X auf die Zusammensetzung und den Metabolismus der Zellhülle nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 1.6.2.1). Daher führt auch die Aktivität von σ^X zur Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden (Cao & Helmann 2004).

Minnig *et al.* (2003) erkannten in Doppelmutanten für *sigX* und *sigM* einen dramatischen Phänotyp. Es handelt sich dabei im Übergang zur stationären Phase um lange Zellen, die verdeutlichen, dass die Chromosomen-Segregation und die Bildung eines Septums gehemmt sind. Weiter wurde dabei auch eine vorübergehende Reduktion der OD um 20-30 % beobachtet. Essentiell für die Bildung eines Septums ist die Expression von *divIC*, ein Gen unter der Kontrolle von sowohl σ^X als auch von σ^M (Huang *et al.* 1998; Minnig *et al.* 2003). Weiter wird auch das *tarABIJKL*-Operon, welches in die Polyribitolphosphatsynthese involviert ist, von σ^X und σ^M kontrolliert. Die im Doppelknockout von *sigX* und *sigM* reduzierte Synthese von Polyribitolphosphat, der wichtigsten Teichonsäure der Zellwand, beeinflusst auch die Bildung eines Septums. Die vorübergehende Reduktion der OD liegt darin begründet, dass durch den Knockout von *sigX* die Expression von *lytR* und die Expression des *dlt*-Operons reduziert sind (Huang & Helmann 1998; Helmann 2002), sodass die autolytische Aktivität erhöht ist (Wecke *et al.* 1997). Durch diese Beobachtungen kamen Minnig *et al.* zu dem Schluss, dass die ECF-Sigmafaktoren σ^X und σ^M für ein normales Zellwachstum nötig sind und dass beide Sigmafaktoren an der Regulation der Septum- und Zellwandbildung beteiligt sind (Minnig *et al.* 2003).

Huang & Helmann identifizierten auch *abh* als zum σ^X -Regulon gehörend (Huang & Helmann 1998). *abh* kodiert für den Transkriptionsregulator Abh, einem Paralogen von AbrB, dem globalen Transkriptionsregulator, der die Expression von Genen während des Übergangs vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase hemmt (Strauch *et al.* 2007). Mit dem Nachweis, dass σ^X (und auch σ^M) für die *abh*-Expression verantwortlich ist, konnten neue Erkenntnisse auf die Regulation durch den ECF-Sigmafaktor σ^X zurückgeführt werden. Für die Sublancin-Synthese, einem Lantibiotikum (Paik *et al.* 1998), werden u. a. AbrB und Abh als Transkriptionsregulatoren benötigt. Damit ist σ^X auch in die Antibiotika-Produktion involviert, während dagegen σ^W den Zellen eine intrinsische Resistenz gegen Sublancin verleiht (Butcher & Helmann 2006; Luo & Helmann 2009). Des Weiteren nimmt σ^X durch die Aktivierung der *abh*-Transkription Einfluss auf die Regulierung der Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika (Murray & Stanley-Wall 2010). Als Transkriptionsregulator wirkt Abh, und damit auch σ^X , aber auch an der Kontrolle der Biofilm-Bildung mit. Die für die Biofilm-Matrix benötigten Proteine und Polysaccharide werden durch Genexpression mit Abh Beteiligung erhalten (Murray *et al.* 2009). In diesem Zusammenhang ist σ^X auch an der Pellikula-Ausbildung beteiligt, welche mit der Bildung von Zell-Ketten beginnt und schließlich zu Zell-Ketten-Clustern führt. Es konnte nachgewiesen werden, dass *sigX*- und *abh*-Mutanten in der Bildung dieser Cluster beeinträchtigt sind. Möglicherweise ist also die Zellhüllen-Struktur wichtig für die Bildung dieser Cluster (Kobayashi 2007).

1.6.2.3 σ^X -Regulation durch einen Anti-Sigmafaktor

Das Gen des Sigmafaktors σ^X , *sigX*, ist zusammen mit dem stromabwärts gelegenen Gen *rsiX* in einem Operon angeordnet (vgl. Abbildung 3, Seite 75). Brutsche & Braun konnten zeigen, dass *rsiX* für einen negativen Regulator von σ^X kodiert und bezeichneten diesen als RsiX – regulator of sigma X (Brutsche & Braun 1997). Unabhängig davon erhielt eine zweite Gruppe das gleiche Ergebnis (Huang *et al.* 1997). RsiX stellt demnach den Anti-Sigmafaktor von σ^X dar und inhibiert sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die σ^X -Aktivität und stabilisiert das σ^X -Protein (Brutsche & Braun 1997).

RsiX wurde als ein Membranprotein identifiziert. So wurde das Protein bei Expression in *E. coli* nach Fraktionierung des Zellextraktes in der Membranfraktion gefunden. Bei gleichzeitiger Expression von *sigX* und *rsiX* wurde der Sigmafaktor zusammen mit dem Anti-

Sigmafaktor in der Membranfraktion nachgewiesen, wohingegen σ^X ohne *rsiX*-Expression in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert wurde (Brutsche & Braun 1997). Brutsche & Braun sagten daher und aufgrund von 18 hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz von RsiX eine Lokalisation dieses Proteins in der Membran vorher, ordneten den N-terminalen Teil von RsiX dem Cytoplasma und den C-terminalen Teil dem extracytoplasmatischen Raum zu. Durch die Membranlokalisierung von RsiX könnten demnach extrazelluläre Signale registriert und diese Informationen über die Membran zum Cytoplasma geleitet werden (Brutsche & Braun 1997). Zusätzliche Analysen bestätigten die Membranlokalisierung von RsiX sowie eine C-terminale extracytoplasmatische Domäne und eine N-terminale cytoplasmatische Domäne. Yeast-Two-Hybrid-Experimente zeigten außerdem eine direkte Wechselwirkung zwischen der N-terminalen Domäne von RsiX und dem Sigmafaktor σ^X (Yoshimura *et al.* 2004).

Es liegt demnach die Vermutung nahe, dass RsiX aufgrund der Gemeinsamkeiten mit einem weiteren Anti-Sigmafaktor aus *B. subtilis*, RsiW, in einer ähnlichen Art reguliert wird (vgl. Kapitel 1.6.1.2).

Um das σ^X -Regulon zu aktivieren, wird ein spezifischer Stimulus benötigt, der, wie von Brutsche & Braun bereits postuliert, von der extracytoplasmatischen Domäne des Anti-Sigmafaktors RsiX registriert werden könnte und dann zu einer Inaktivierung der Anti-Sigmafaktor-Funktion führen würde (Brutsche & Braun 1997). Ein breit angelegter Screen nach Faktoren mit Einfluss auf die σ^X -Aktivität zeigte, dass besonders Defekte im Transportsystem, im Zucker-Metabolismus und in der Produktion von antimikrobiellen Stoffen zu einer gesteigerten σ^X -Aktivität führen. Demnach reagiert das σ^X -Regulon auf ganz bestimmte Moleküle, z. B. auf zu exportierende giftige Moleküle oder antimikrobielle Stoffe (Turner & Helmann 2000). Turner & Helmann vermuten, dass in dem Zusammenhang der Anti-Sigmafaktor direkt oder indirekt die Moleküle erkennt, welche aus der Zelle exportiert werden sollen. Des Weiteren konnten einige Antibiotika, die Prozesse in der Zellwand beeinflussen, als starke Induktoren des σ^X -Regulons identifiziert werden. Inhibitoren der Peptidoglycan-Biosynthese und auch Tunicamycin, ein spezifischer Inhibitor der Synthese von Zellwandteichonsäuren (Pooley & Karamata 2000), gehören u. a. zu dieser Gruppe von Antibiotika (Helmann 2002). Allerdings muss auch erwähnt werden, dass in einer anderen Arbeit die Funktion von Tunicamycin als Induktor des σ^X -Regulons nicht bestätigt werden konnte (Schäfer 2007).

1.7 Termination der Transkription

Die Transkription durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase benötigt bestimmte Signale, damit sie terminiert werden kann. Ohne eine Termination würde die RNA-Polymerase kontinuierlich neue RNA synthetisieren. Auch im Hinblick auf Mutations-Polarität ist die Termination wichtig. So kann verhindert werden, dass RNA synthetisiert wird, die z. B. durch eine *frameshift*-Mutation nicht weiter translatiert werden wird (Platt 1985). Sobald die RNA-Polymerase ein solches Signal, den Transkriptions-Terminator, erreicht, erfolgt die Termination der Transkription. Ein solcher Terminator ist teilweise auf ein zusätzliches Protein, den Faktor Rho, angewiesen (Roberts 1969). Man spricht daher von der faktorabhängigen und faktorunabhängigen Termination - Prozesse, die in verschiedenen Prokaryoten unterschiedliche Wichtigkeiten besitzen. In *E. coli* wird die Transkriptionstermination zum einen durch den Faktor Rho, zum anderen aber auch Rho-unabhängig erzielt, während in *B. subtilis* die faktorunabhängige Termination zu dominieren scheint (de Hoon *et al.* 2005). Im Folgenden werden die faktorunabhängige (Kapitel 1.7.1) und die faktorabhängige (Kapitel 1.7.2) Termination näher besprochen.

1.7.1 Faktorunabhängige Termination

Die faktorunabhängige Termination wird auch als Rho-unabhängige Termination bezeichnet. Sie benötigt einen intrinsischen Terminator stromabwärts von dem letzten Gen in einem Operon. Der intrinsische Terminator wird von 30-50 bp mit Wiederholungen aus GC-(Guanosin-, Cytidin-) Nukleotiden sowie einer 7-9 bp stromabwärts davon liegenden Sequenz aus mehreren Thymidin-Nukleotiden (T-stretch) gebildet. Als Folge dieser Sequenz in der DNA bildet sich in der naszierenden mRNA eine haarnadelförmige Sekundärstruktur aus, gefolgt von einer Sequenz aus Uridin-Nukleotiden (d'Aubenton *et al.* 1990; Reynolds & Chamberlin 1992; Richardson 1993).

Für den Mechanismus der intrinsischen Termination existierten zunächst zwei verschiedene Modelle. Das erste besagte, dass es durch die Bildung der Sekundärstruktur zu einer Pause der RNA-Polymerase kommt. Gleichzeitig kommt es durch die sehr schwache Hybridisierung zwischen der Poly-Uridin-Sequenz der mRNA und der Poly-Adenosin-Sequenz der DNA zur Entlassung des Transkriptes und damit auch zur Dissoziation des Komplexes aus RNA-Polymerase, DNA und RNA (von Hippel & Yager 1991). Nach dem zweiten Modell kommt

es zur Entlassung des Transkriptes aufgrund von Wechselwirkungen zwischen der RNA-Polymerase und dem doppelsträngigen Teil der Sekundärstruktur der mRNA (Altmann *et al.* 1994). Moderne Analysen-Methoden deckten jedoch den eigentlichen Mechanismus der Termination auf. Demnach kommt es durch den T-stretch zu einer Pause in der Transkriptionselongation, und die schwache Bindung zwischen dem Uridin-Adenosin-Hybrid löst sich. Durch diese Pause entsteht Zeit, in der sich die Sekundärstruktur der mRNA bilden kann, welche wiederum zu einer Destabilisierung des Elongationskomplexes und damit zur Termination führt. Weitere Faktoren, wie z. B. NusA, stimulieren zudem die Termination. NusA fördert hier die Bildung der Sekundärstruktur der mRNA (Gusarov & Nudler 1999; Nudler & Gottesman 2002).

Zusätzliche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Effizienz der Termination auch entscheidend von Sequenzen abhängt, die zum einen weit stromaufwärts vom Terminator und zum anderen sehr nah stromabwärts von der Poly-Thymidin-Sequenz liegen (Goliger *et al.* 1989; Telesnitsky & Chamberlin 1989a; Telesnitsky & Chamberlin 1989b). Des Weiteren scheint auch der Prozess der Translation an der Regulation der intrinsischen Termination beteiligt zu sein (Abe *et al.* 1999).

Aufgrund der spezifischen Sequenz eines intrinsischen Terminators aus GC-Nukleotiden und der Poly-Thymidin-Sequenz ist es möglich, allein anhand der DNA-Sequenz einen Transkriptionsterminator zu identifizieren (de Hoon *et al.* 2005).

1.7.2 Faktorabhängige Termination

Die Rho- bzw. faktorabhängige Termination der Transkription benötigt sowohl cis- als auch trans-aktive Elemente. Die cis-aktiven Elemente befinden sich in der mRNA (rut-site und Terminationsstellen). Trans-aktive Elemente sind z. B. der Faktor Rho oder die Proteine NusG und NusA (Ciampi 2006).

Als rut-site (Rho ut^{il}ization) wird die Rho-Bindestelle in der mRNA bezeichnet (Salstrom *et al.* 1979). Sie ist ein essentielles Element der Rho-abhängigen Termination und zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an dem Nukleotid Cytidin sowie einem geringen Gehalt an dem Nukleotid Guanosin aus und bildet keine Sekundärstrukturen aus (Morgan *et al.* 1985; Alifano *et al.* 1991; Hart & Roberts 1991). Die optimale Länge der rut-site beträgt ca. 70-90 Nukleotide (Morgan *et al.* 1983a).

Anders als intrinsische Terminationssignale sind die Signale der Rho-abhängigen Termination zweigeteilt und erstrecken sich über etwa 200 bp in der DNA (Nudler & Gottesman 2002). Der stromaufwärts liegende Teil wird von der oben beschriebenen rut-site gebildet. Der etwa 60-90 Nukleotide stromabwärts von der rut-site liegende Teil wird als Terminationszone bezeichnet. In dieser Zone findet die Termination an verschiedenen Stellen statt, welche als Terminationsstellen bezeichnet werden (Lau *et al.* 1982; Morgan *et al.* 1983b; Banerjee *et al.* 2006). Am häufigsten handelt es sich bei den Terminationsstellen um die Stellen, wo der Transkriptionselongation-Komplex pausiert (pause site), aber nicht jede pause site ist gleichzeitig eine Rho-Terminationsstelle (Kassavetis & Chamberlin 1981; Lau *et al.* 1983).

1.7.2.1 Der Faktor Rho

Der für die faktorabhängige Termination zwingend nötige Faktor Rho wurde bereits 1969 entdeckt (Roberts 1969). Die meisten Prokaryoten besitzen ein homologes Protein zu Rho aus *E. coli* (Opperman & Richardson 1994; Fraser *et al.* 1995). In Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies besitzt Rho ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Quirk *et al.* 1993; Banerjee *et al.* 2006). In den Proteobakterien *E. coli* und *Rhodobacter sphaeroides* ist Rho ein essentielles Protein (Das *et al.* 1976; Gomelsky & Kaplan 1996). Dagegen stellt Rho in den Gram-positiven Organismen *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus* kein essentielles Protein dar (Quirk *et al.* 1993; Washburn *et al.* 2001). In diesem Umstand liegt auch die Ursache für die Annahme, dass die faktorabhängige Termination in z. B. *B. subtilis* nur eine untergeordnete Rolle spielt, wohingegen in *E. coli* etwa die Hälfte der Terminationen vom Faktor Rho abhängen (de Hoon *et al.* 2005). Analysen haben gezeigt, dass Rho aus *E. coli* und aus *B. subtilis* trotzdem ähnliche Eigenschaften z. B. hinsichtlich der RNA-aktivierten ATPase-Aktivität besitzen (Ingham *et al.* 1999).

Rho ist ein homohexameres Protein (Skordalakes & Berger 2003). Das Enzym besitzt sowohl eine ATPase-Aktivität als auch eine RNA/DNA-Helikase-Aktivität und bindet an naszierende mRNA (Ciampi 2006). Jedes Rho-Monomer besitzt eine N-terminale und eine C-terminale Domäne. Die kleinere, N-terminale Domäne bildet die primere RNA-bindende Stelle. Sie kann sowohl einzelsträngige DNA als auch einzelsträngige RNA binden und ist für die Bindung von Rho an die rut-site verantwortlich (Galluppi & Richardson 1980; Richardson 1982; Skordalakes & Berger 2003). In der größeren, C-terminalen Domäne befindet sich die sekundäre RNA-bindende Stelle. Sie wird für die Translokation von Rho entlang der mRNA

benötigt. Innerhalb der C-terminalen Domäne wird sie von dem Q- und dem R-Loop gebildet (Wei & Richardson 2001; Burgess & Richardson 2001; Skordalakes & Berger 2003). Ferner wird auch der P-Loop von der C-terminalen Domäne ausgebildet. Der P-Loop ist für die ATP-Bindung und die ATPase-Aktivität von Rho verantwortlich (Dombroski & Platt 1988; Dolan *et al.* 1990; Wei & Richardson 2001; Skordalakes & Berger 2003).

1.7.2.2 Mechanismus der faktorabhängigen Termination

Der Mechanismus der Rho-abhängigen Termination wird auch gegenwärtig sehr intensiv untersucht. Bisher sind noch nicht alle involvierten Prozesse bis ins Detail aufgeklärt. An dieser Stelle sollen daher kurz die neuesten Erkenntnisse erwähnt werden.

Kristallographische (Skordalakes & Berger 2003) und kinetische (Jeong *et al.* 2004) Untersuchungen konnten aufklären wie Rho die naszierende mRNA bindet. Das Modell von Jeong *et al.* (2004) weicht etwas von dem von Skordalakes & Berger (2003) ab. Während Skordalakes & Berger (2003) von einem an einer Stelle geöffnetem Rho-Hexamer ausgehen, welches sich nach der Bindung der mRNA schließt, halten Jeong *et al.* (2004) es für wahrscheinlicher, dass das Rho-Hexamer ohne eine mRNA eine geschlossene Konformation einnimmt, in welcher die ATP-bindenden Domänen eingeeengt werden. Nach dem Modell von Jeong *et al.* (2004) bindet die primäre RNA-bindende Stelle von Rho an die rut-site wodurch die ATP-bindenden Domänen frei nach außen exponiert werden können. Dadurch kann ATP sehr schnell binden und induziert so eine Änderung der Konformation des Hexamers. Infolgedessen befindet sich die mRNA, an die sekundäre RNA-bindende Stelle assoziiert, im Zentrum des Hexamers. Die ATP-bindenden Domänen sind weiter nach außen exponiert, so dass die Translokation des Rho-RNA-ATP-Komplexes beginnen kann.

Für die Translokation des Rho-RNA-ATP-Komplexes entlang der mRNA ist die Energie aus der ATP-Hydrolyse notwendig. Für den Prozess der Translokation wurden zwei Modelle aufgestellt (Abbildung 2A). Das „pure tracking“-Modell besagt, dass sich die Bindung zwischen Rho und der rut-site löst. Rho bewegt sich dann in 5'-3'-Richtung an der naszierenden mRNA entlang bis zum Transkriptionselongations-Komplex. Dort angekommen, sorgt Rho durch seine 5'-3'-RNA-DNA-Helikase-Aktivität dafür, dass die mRNA den Komplex verlässt. Darauf folgt die Dissoziation des gesamten Transkriptionselongations-Komplexes (Geiselman *et al.* 1993). Das zweite Modell ist das „tethered tracking“-Modell. In diesem Modell bleibt die Bindung zwischen Rho und der rut-

site bestehen. Rho bewegt sich, an die rut-site gebunden, die mRNA in 5'-3'-Richtung entlang bis zum Transkriptionselongations-Komplex, um dort durch seine 5'-3'-RNA-DNA-Helikase-Aktivität die Dissoziation des gesamten Transkriptionselongations-Komplexes einzuleiten (Steinmetz & Platt 1994). Allerdings ist für beide Modelle der genaue Mechanismus, nach welchem Rho die mRNA von der RNA-Polymerase trennt, noch nicht bekannt.

Unabhängig von diesen beiden relativ ähnlichen Modellen schlagen Epshtein *et al.* einen ganz anderen Mechanismus vor (Abbildung 2B) (Epshtein *et al.* 2010). Demnach ist Rho mit Beginn der Initiation der Transkription mit der RNA-Polymerase in einem Komplex vereint. Sobald die naszierende mRNA lang genug ist, wird sie von Rho gebunden. Rho sorgt dann für eine schnelle Inaktivierung der RNA-Polymerase und eine vergleichsweise langsame Dissoziation des Transkriptionselongations-Komplexes. Hierbei spielen Veränderungen in der Konformation des katalytischen Zentrums der RNA-Polymerase durch einen allosterischen Mechanismus eine wichtige Rolle.

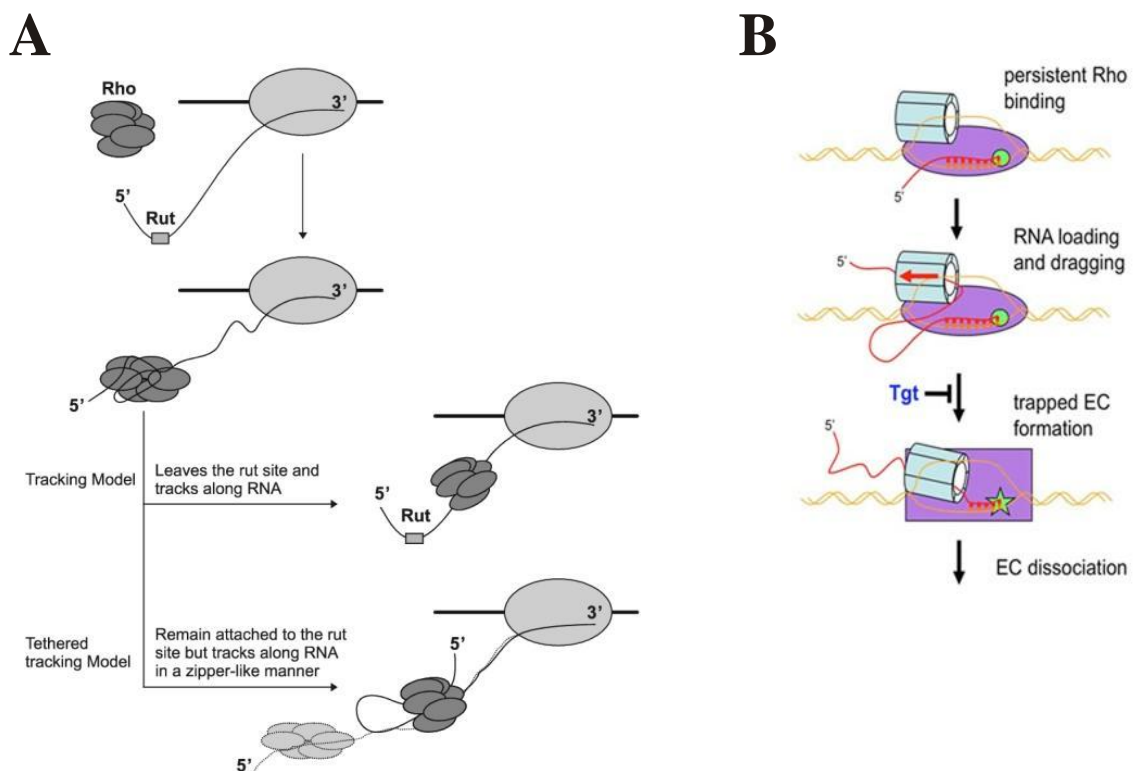


Abbildung 2: Rho-abhängige Termination. A: Modelle der Translokation von Rho entlang der mRNA. Der Faktor Rho bindet an die rut-site. Die Translokation von Rho entlang der mRNA bis zum Transkriptions-Elongationskomplex erfolgt nach dem „(pure) tracking“-Modell, nach welchem Rho die rut-site für die Translokation verlässt, oder nach dem „tethered tracking“-Modell, bei welchem Rho auch während der Translokation an die rut-site gebunden ist. Aus: Banerjee *et al.* (2006). **B: allosterischer Mechanismus der Rho-abhängigen Termination.** Rho ist mit Beginn der Transkriptionsinitiation mit der RNA-Polymerase assoziiert und bindet bei ausreichender Länge des Transkriptes an die rut-site. Es kommt folglich zur Inaktivierung der RNA-Polymerase durch einen allosterischen Mechanismus und damit zur Dissoziation des Transkriptions-Elongationskomplexes. Das Antibiotikum Tagetitoxin (Tgt) inhibiert die Termination durch Rho. Aus: Epshtein *et al.* (2010).

1.7.2.3 Die Nus-Faktoren

Weitere wichtige Faktoren für die faktorabhängige Termination der Transkription sind die Nus-Faktoren. NusA und NusG interagieren mit dem Faktor Rho und erhöhen so die Effizienz der Termination *in vivo* (Ciampi 2006; Burmann & Rösch 2011).

Für NusG wurde gezeigt, dass das Protein direkt mit der RNA-Polymerase und dem Faktor Rho interagiert (Pasman & von Hippel 2000). So ist es möglich, dass NusG für eine höhere Rate beim Entlassen der naszierenden mRNA aus der RNA-Polymerase und damit für eine schnellere Dissoziation des Transkriptionselongations-Komplexes beim Erreichen einer Terminationsstelle sorgt (Burns *et al.* 1999). Des Weiteren wurde aber auch gezeigt, dass NusG für eine Erhöhung der Elongationsrate der RNA-Polymerase um 25 % verantwortlich ist (Burns *et al.* 1998).

Das Protein NusA ist, wie auch NusG, in der Lage, den Faktor Rho mit der RNA-Polymerase zu verbinden (Schmidt & Chamberlin 1984). Außerdem ist NusA in der Lage, durch Förderung von Pausen der RNA-Polymerase den Prozess der Transkriptionselongation zu verlangsamen (Artsimovitch & Landick 2000). Dadurch gibt es eine enge Kopplung zwischen der Transkription und der Translation, was letztendlich zu einer Hemmung der vorzeitigen Termination der Transkription führt (Zheng & Friedman 1994).

In *E. coli* sind die Proteine NusG und NusA essentiell (Sullivan & Gottesman 1992; Kainz & Gourse 1998; Ciampi 2006). Dagegen ist in *B. subtilis* der Faktor NusG nicht essentiell, aber NusA ist es auch für diesen Organismus (Ingham *et al.* 1999). Dies zeigt, dass der Prozess der Transkriptionstermination durch den Faktor Rho in beiden Organismen Unterschiede aufweisen muss (Ingham *et al.* 1999).

Das Zusammenspiel zwischen den Faktoren Rho, NusA und NusG wurde auch schon in einer genomweiten Analyse in *E. coli* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Rho als globaler Regulator auftritt, dessen Einfluss auf das Transkriptom sehr viel größer ist als auf das Proteom. Diese Studie zeigte, dass besonders Prophagen und andere Gene, welche durch horizontalen Gentransfer erhalten wurden, einer Termination durch Rho unterliegen. In Stämmen, in welchen genau diese Gene deletiert waren, wurde beobachtet, dass die Faktoren NusA und NusG nicht mehr benötigt wurden. Des Weiteren wiesen diese Stämme mit einem *nusA*- oder einem *nusG*-Knockout ähnliche Transkriptionsprofile auf. Das ist ein Hinweis, dass diese Proteine normalerweise zusammenarbeiten. Ein *E. coli*-Stamm, welcher nur den Knockout des *rac*-Prophagen enthielt, ermöglichte auch schon eine Deletion des essentiellen

nusG. Das zeigt, dass die entscheidende Funktion von NusG in *E. coli* die Unterdrückung der *rac*-Expression ist (Cardinale *et al.* 2008).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Der ECF-Sigmafaktor σ^X aus *B. subtilis* wurde hinsichtlich seines Regulons schon intensiv analysiert. Dabei wurden einige Gene, einschließlich des *sigX-rsiX*-Operons, gefunden, die unter der Kontrolle dieses Sigmafaktors stehen (Kapitel 1.6.2.1). Zusammengefasst kann demnach σ^X eine Funktion im Hinblick auf die Zusammensetzung und den Metabolismus der Zellhülle zugesprochen werden (Helmann 2002). Des Weiteren ist die Regulation von σ^X durch den Anti-Sigmafaktor RsiX bekannt (Brutsche & Braun 1997). Jedoch sind noch keine Erkenntnisse über die Regulation von RsiX vorhanden.

RsiX ist wie auch RsiW, der Anti-Sigmafaktor von dem ECF-Sigmafaktor σ^W (Kapitel 1.6.1.2), ein Transmembran-Protein, welches extrazelluläre Signale über die Membran ins Cytoplasma leiten kann. Damit extrazelluläre Informationen den ECF-Sigmafaktor σ^W erreichen, sind mehrere proteolytische Schritte nötig, die am Ende zum vollständigen Abbau von RsiW führen (Kapitel 1.6.1.2). Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den Anti-Sigmafaktoren RsiX und RsiW wird daher eine ähnliche Regulation vermutet, denn auch der Anti-Sigmafaktor RseA des ECF-Sigmafaktors σ^E aus *E. coli* (Kapitel 1.6.1.1) wird vergleichbar wie RsiW prozessiert. Es könnte sich dabei um eine generelle Regulation für ECF-Sigmafaktoren handeln. Im Hinblick auf den Einfluss von ECF-Sigmafaktoren bei der Pathogenität einiger Mikroorganismen (Kapitel 1.6.1) könnte dies einen sehr wichtigen Ansatz für die Medikamentenentwicklung darstellen.

Erste Experimente zur regulierten Proteolyse von RsiX zeigten allerdings keine eindeutigen Ergebnisse (Schäfer 2007). Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, durch einen genomweiten Screen in *B. subtilis* Faktoren mit Einfluss auf die Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX zu identifizieren und einen möglichen Mechanismus für die RsiX-Regulation aufzustellen. Für diesen Screen sollte die Methode der Transposonmutagenese angewandt werden. Der eindeutige Einfluss von durch den Screen identifizierten Faktoren sollte im Anschluss durch die Konstruktion der entsprechenden Knockout-Stämme verifiziert werden. Schließlich sollte versucht werden, einen möglichen Mechanismus der RsiX-Regulation zu postulieren. Zusätzlich sollte überprüft werden, inwieweit sich die gefundene Regulation von RsiX mit der von RsiW deckt.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (Tabelle 1), Plasmide (Tabelle 2) und Oligonukleotide (Primer; Tabelle 3 und Tabelle 4) sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind mit Bezeichnung, relevantem Genotyp sowie der Referenz angegeben. Wurde statt einer Referenz ein * angegeben, wurde der Stamm in dieser Arbeit konstruiert.

Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i> (Str ^r)	Grant <i>et al.</i> 1990
XL1-Blue	F ⁺ ::Tn10 <i>proA⁺B⁺ lacI^q</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 relA1 lac</i>	Stratagene
<i>B. subtilis</i>		
1012	<i>leuA8 metB5 trpC2 hsrM1</i>	Saito <i>et al.</i> 1979
NCIB 3610	wildtypischer <i>B. subtilis</i> -Stamm	Branda <i>et al.</i> 2001
1012 <i>amyE::cat</i>	1012 <i>amyE::cat</i> (Cm ^r)	Mogk <i>et al.</i> 1996
1012 <i>lacA::spec</i>	1012 <i>lacA::spec</i> (Spec ^r)	Härtl <i>et al.</i> 2001
1012 <i>rsiX::spec</i>	1012 <i>rsiX::spec</i> (Spec ^r)	Schäfer 2007
1012 <i>rasP::tet</i>	1012 <i>yluC::tet</i> (Tet ^r)	Schöbel <i>et al.</i> 2004
1012 <i>prsW::bleo</i>	1012 <i>ypdC::bleo</i> (Bleo ^r)	Heinrich & Wiegert 2006
1012 <i>clpX</i>	1012 <i>clpX::cat</i> (Cm ^r)	Wiegert & Schumann 2001
1012 <i>rho::bleo</i>	1012 <i>rho::bleo</i> (Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>sigXrsiX::spec</i>	1012 <i>sigXrsiX::spec</i> (Spec ^r)	*
WB800	Δ <i>trpC</i> Δ <i>nprE</i> Δ <i>aprE</i> Δ <i>opr</i> Δ <i>vpr</i> Δ <i>bpr</i> Δ <i>mpr::bleo</i> Δ <i>nprB::bsr</i> Δ <i>wprA::hyg</i> (Cm ^r)	Murashima <i>et al.</i> 2002
KS4	1012 <i>amyE::P_{altA}-lacZ</i> (Neo ^r)	Schäfer 2007
KS18	KS4 <i>rsiX::spec</i> (Neo ^r , Spec ^r)	Schäfer 2007
KS11	1012 <i>rsiX::spec amyE::P_{altA}-lacZ lacA::pAL-FLAG-</i> <i>rsiX</i> Δ71-368 (Spec ^r , Neo ^r , Em ^r)	Schäfer 2007

Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
KS12	1012 <i>rsiX::spec amyE::P_{dhA}-lacZ lacA::pAL-FLAG-rsiX</i> (Spec ^r , Neo ^r , Em ^r)	Schäfer 2007
KS41	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX</i> (Cm ^r)	Schäfer 2007
KS42	KS41 <i>rasP::tet</i> (Cm ^r , Tet ^r)	Schäfer 2007
1012 pHT <i>gfp-rsiW</i>	1012 <i>amyE::P_{yuaf}-lacZ pHTgfp-rsiW</i> (Neo ^r , Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 pHT <i>gfp-rsiW ΔrasP</i>	1012 <i>amyE::P_{yuaf}-lacZ pHTgfp-rsiW rasP::tet</i> (Neo ^r , Cm ^r , Tet ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 pHT <i>gfp-rsiW ΔprsW</i>	1012 <i>amyE::P_{yuaf}-lacZ pHTgfp-rsiW prsW::bleo</i> (Neo ^r , Cm ^r , Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS82	1012 pHT <i>gfp-rsiX</i> (Cm ^r)	*
KS83	1012 pHT <i>gfp-rsiX rasP::tet</i> (Cm ^r , Tet ^r)	*
KS94	1012 pHT <i>gfp-rsiX prsW::bleo</i> (Cm ^r , Bleo ^r)	*
KS115	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-bleo-rsiX</i> (Cm ^r)	*
KS119	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-bleo-rsiX pIC333</i> (Cm ^r , Spec ^r)	*
KS123	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-bleo-rsiX mini-Tn10</i> (Cm ^r , Spec ^r , Bleo ^r)	*
KS123a	1012 <i>amyE::P_{dhA}-lacZ mini-Tn10</i> (Neo ^r , Spec ^r)	*
KS149	1012 <i>lacA::pALFsigX-rsiX</i> (Em ^r)	*
KS155	1012 <i>lacA::pALFsigX-rsiX rho::bleo</i> (Em ^r , Bleo ^r)	*
KS162	1012 <i>lacA::pALFsigX-rsiX sigXrsiX::spec</i> (Em ^r , Spec ^r)	*
KS166	1012 <i>lacA::pALFsigX-rsiX sigXrsiX::spec rho::bleo</i> (Em ^r , Spec ^r , Bleo ^r)	*
KS148	1012 <i>lacA::pALFsigX_stop-rsiX</i> (Em ^r)	*
KS154	1012 <i>lacA::pALFsigX_stop-rsiX rho::bleo</i> (Em ^r , Bleo ^r)	*
KS161	1012 <i>lacA::pALFsigX_stop-rsiX sigXrsiX::spec</i> (Em ^r , Spec ^r)	*
KS165	1012 <i>lacA::pALFsigX_stop-rsiX sigXrsiX::spec rho::bleo</i> (Em ^r , Spec ^r , Bleo ^r)	*
1012 <i>ΔrasP Δrho</i>	1012 <i>rho::bleo rasP::tet</i> (Bleo ^r , Tet ^r)	*
1012- <i>gfp</i>	1012 <i>amyE::P_{groE}ΔCIRCE-gfp⁺</i> (Neo ^r)	Zellmeier <i>et al.</i> 2006
1012- <i>gfp Δrho</i>	1012- <i>gfp rho::bleo</i> (Bleo ^r , Neo ^r)	*
1012- <i>gfp ΔrasP</i>	1012- <i>gfp rasP::tet</i> (Tet ^r , Neo ^r)	*
1012- <i>gfp ΔrasP Δrho</i>	1012- <i>gfp rho::bleo rasP::tet</i> (Bleo ^r , Tet ^r , Neo ^r)	*

Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
KS187 - KS190	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX</i> (KS187; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS188; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS189; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS190; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS191 - KS194	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX Δ71-368</i> (KS191; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS192; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS193; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS194; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS195 - KS198	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX Δ146-368</i> (KS195; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS196; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS197; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS198; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS201/KS203/KS231/KS232	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX Δ1-21</i> (KS201; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS231; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS203; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS232; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS202/KS204/KS233/KS234	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX Δ1-43</i> (KS202; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS233; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS204; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS234; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS207/KS209/KS227/KS228	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX Δ1-70</i> (KS207; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS228; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS209; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS227; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS208/KS210/KS229/KS230	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-rsiX Δ1-99</i> (KS208; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP::tet</i> (KS230; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho::bleo</i> (KS210; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS229; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
1012 <i>gfp-RBS_rsiX</i>	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-RBS_rsiX</i> (Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp-RBS_rsiX ΔrasP</i>	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-RBS_rsiX rasP::tet</i> (Cm ^r , Tet ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp-RBS_rsiX Δrho</i>	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-RBS_rsiX rho::bleo</i> (Cm ^r , Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS235	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-RBS_rsiX rasP::tet rho::bleo</i> (Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
1012 <i>gfp-RBSmut_rsiX</i>	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-RBSmut_rsiX</i> (Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp-RBSmut_rsiX ΔrasP</i>	1012 <i>amyE::P_{groE}-gfp-RBSmut_rsiX rasP::tet</i> (Cm ^r , Tet ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)

Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
1012 <i>gfp</i> -RBSmut_ <i>rsiX</i> Δ <i>rho</i>	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> -RBSmut_ <i>rsiX</i> <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (Cm ^r , Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS236	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> -RBSmut_ <i>rsiX</i> <i>rasP</i> :: <i>tet</i> <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
KS157/KS172/KS173/KS174	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> _Stop- <i>rsiX</i> (KS157; Cm ^r) verknüpft mit <i>rasP</i> :: <i>tet</i> (KS173; Cm ^r , Tet ^r), <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (KS172; Cm ^r , Bleo ^r) oder beiden (KS174; Cm ^r , Tet ^r , Bleo ^r)	*
1012 <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> Δ 53-69	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> Δ 53-69 (Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> Δ 53-69 Δ <i>rho</i>	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> Δ 53-69 <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (Cm ^r , Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> wt*	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> _restauriert (Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> wt* Δ <i>rho</i>	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> _restauriert <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (Cm ^r , Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> _rut	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> _rut (Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
1012 <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> _rut Δ <i>rho</i>	1012 <i>amyE</i> ::P _{<i>groE</i>} - <i>gfp</i> - <i>rsiX</i> _rut <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (Cm ^r , Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS245	1012 <i>rsiX</i> :: <i>spec</i> <i>amyE</i> ::P _{<i>dtlA</i>} - <i>lacZ</i> <i>lacA</i> ::pALF <i>rsiX</i> wt* (Spec ^r , Neo ^r , Em ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS242/KS249/KS253/KS257	KS245 verknüpft mit <i>rasP</i> :: <i>tet</i> (KS242; Tet ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r), <i>clpX</i> :: <i>cat</i> (KS249; Cm ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r), <i>prsW</i> :: <i>bleo</i> (KS253; Bleo ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r) oder mit dem achtfach Proteasen-Knockout von WB800 (KS257; Cm ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r)	*
KS246	1012 <i>rsiX</i> :: <i>spec</i> <i>amyE</i> ::P _{<i>dtlA</i>} - <i>lacZ</i> <i>lacA</i> ::pALF <i>rsiX</i> _rut (Spec ^r , Neo ^r , Em ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS243/KS250/KS254/KS258	KS246 verknüpft mit <i>rasP</i> :: <i>tet</i> (KS243; Tet ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r), <i>clpX</i> :: <i>cat</i> (KS250; Cm ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r), <i>prsW</i> :: <i>bleo</i> (KS254; Bleo ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r) oder mit dem achtfach Proteasen-Knockout von WB800 (KS258; Cm ^r , Spec ^r , Neo ^r , Em ^r)	*
DS3290	[PY79] <i>amyE</i> ::P _{<i>hyspank</i>} - <i>lytF</i> (Spec ^r)	Chen <i>et al.</i> 2009
3610 <i>rho</i> :: <i>bleo</i>	3610 <i>rho</i> :: <i>bleo</i> (Bleo ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
KS267	3610 <i>rho</i> :: <i>bleo</i> <i>amyE</i> ::P _{<i>hyspank</i>} - <i>lytF</i> (Bleo ^r , Spec ^r)	*

Tabelle 2: Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind mit Bezeichnung, Beschreibung sowie der Referenz angegeben. Wurde statt einer Referenz ein * angegeben, wurde das Plasmid in dieser Arbeit konstruiert.

Plasmidbezeichnung	Beschreibung	Referenz
pIC333	Shuttle-Vektor für Transposonmutagenese in <i>B. subtilis</i> , kodiert das Transposon mini-Tn10 (Spec ^r , Em ^r)	Steinmetz & Richter 1994
pHTgfp	in <i>B. subtilis</i> autonom replizierendes Plasmid für translationelle <i>gfp</i> -Fusionen, Promotor P _{grac} ist IPTG induzierbar (Amp ^r , Cm ^r)	Heinrich <i>et al.</i> 2009
pHTgfp-rsiX	in <i>B. subtilis</i> autonom replizierendes Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> -Fusion, Promotor P _{grac} ist IPTG induzierbar (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBRgfp-bleo	Plasmid für translationelle <i>gfp-bleo</i> -Fusionen nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
pBRgfp-bleo-rsiX	Plasmid für translationelle <i>gfp-bleo-rsiX</i> -Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBR322rsiX::spec	Vektor für <i>rsiX::spec</i> Knockout (Amp ^r , Spec ^r)	Schäfer 2007
pBRsigXrsiX::spec	Plasmid für Knockout des <i>sigX</i> -Operons (Amp ^r , Spec ^r)	*
pAL-FLAGrsiW	<i>rsiW</i> N-terminal fusioniert mit 3x FLAG- <i>tag</i> , IPTG-induzierbarer Promotor P _{spac} (Amp ^r , Em ^r)	Schöbel <i>et al.</i> 2004
pALFsigX-rsiX	Vektor für die Integration des IPTG-induzierbaren <i>sigX</i> -Operons in den <i>lacA</i> -Locus von <i>B. subtilis</i> , dabei ist <i>sigX</i> N-terminal fusioniert mit einem 3x FLAG- <i>tag</i> (Amp ^r , Em ^r)	*
pALFsigX_stop-rsiX	Vektor für die Integration des IPTG-induzierbaren <i>sigX_stop</i> -Operons in den <i>lacA</i> -Locus von <i>B. subtilis</i> , dabei ist <i>sigX_stop</i> N-terminal fusioniert mit einem 3x FLAG- <i>tag</i> , <i>sigX_stop</i> bedeutet ein Stopp-Codon direkt nach dem Start-Codon von <i>sigX</i> (Amp ^r , Em ^r)	*
pBRgfp_amyE	Plasmid für translationelle <i>gfp</i> -Fusionen nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	T. Wiegert (unveröffentlicht)
pBRgfp-rsiX	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> -Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBRgfp-rsiX Δ71-368	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> Δ71-368-Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBRgfp-rsiX Δ146-368	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> Δ146-368-Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*

Plasmidbezeichnung	Beschreibung	Referenz
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-21	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> Δ1-21-Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-43	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> Δ1-43-Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-70	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> Δ1-70-Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-99	Plasmid für translationelle <i>gfp-rsiX</i> Δ1-99-Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*
pBR <i>gfp_Stop-rsiX</i>	Plasmid für transkriptionelle <i>gfp-rsiX</i> -Fusion nach Integration in <i>B. subtilis</i> 1012- <i>gfp</i> , konstitutiver Promotor P _{groE} (Amp ^r , Cm ^r)	*

Tabelle 3: Oligonukleotide für PCRs

Aufgeführt sind die PCR-Primer mit Bezeichnung und Sequenz in 5' – 3' Richtung sowie deren Größe.

Bezeichnung	Größe (b)	Sequenz in 5' → 3' Richtung
rsiX 5	33	GGCCATGAATCCGCACGCCATGTTGCGATAGA
rsiX 3	36	GGCCATGGATCCTACGAAGCTTAGAAATGAGCTTTG
spec5 Bsu36I	37	GGCCATCCTCAGGATCGATTTGACATTTTTCTTGTTGG
spec3 EcoRV	39	GGCCATGATATCCGATCAATAGTTACAAATTGTTTCACT
rsiX5' FLAG	35	GGCCATGGATCCATGATGAAGTCAGAATGGAACGA
rsiX70_3	41	GGCCATGCATGCTTAATCAAAGAAATGAGGAGAAATAATGA
rsiX3' FLAG	36	GGCCATGCATGCTTAGTTTAAGGAAATCGGATTTGG
lacI3'PCR	21	CGCCAGTTGTTGTGCCACGCG
sigX5'	21	GGTTTCAAATGGAAGAAACCT
sigX3'	21	ATCCTGAGGCGAACGATGGTC
rsiX RP 3	45	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATGCCGTAGCTGGCTGATGGAC
rsiX 3' SmaI	36	GGCCATCCCGGGTTAGTTTAAGGAAATCGGATTTGG
rsiX 70 3' SmaI	41	GGCCATCCCGGGTTAATCAAAGAAATGAGGAGAAATAATGA
rsiX 5' BamHI	35	GGCCATGGATCCATGATGAAGTCAGAATGGAACGA
rsiX 3' PstI	36	GGCCATCTGCAGTTAGTTTAAGGAAATCGGATTTGG
sigX 5' SmaI	30	GGCCATCCCGGGATGGAAGAAACCTTTCAA
sigX 3' SmaI	30	GGCCATCCCGGGTTAACTGCCGGAAGTTGA
sigX 5' SmaI+RBS	50	GGCCATCCCGGGAAAGGAGGTGATACAGCTATGGAAGAAACCTTTCAATT
rsiX 5' BglII	35	GGCCATAGATCTATGATGAAGTCAGAATGGAACGA

Bezeichnung	Größe (b)	Sequenz in 5' → 3' Richtung
rsiX 3' BamHI+SmaI	42	GGCCATCCCGGGGGATCCTTAGTTTAAGGAAATCGGATTTGG
sigX 5' BamHI+RBS	50	GGCCATGGATCCAAAGGAGGTGATACAGCTATGGAAGAAACCTTT CAATT
rsiX 3' KpnI	33	GGCCATGGTACCGTTTAAGGAAATCGGATTTGG
rho 5'	23	GAGTTCAATTCAAAGGCTCTGTC
rho 3'	22	CTTCCTGCTTGGCATAAGTTGC
bleo 5' BglII	37	GGCCATAGATCTTTGACATATGAGCGAATTGAATTTA
bleo 3' SacI	36	GGCCATGAGCTCCCCGATTGCTGAACAGATTAATAA
sigX5' -BamHI	39	GGCCATGGATCCATGGAAGAAACCTTTCAATTATTATAT
sigX5' -BamHI - Stop	42	GGCCATGGATCCATGTAAGAAACCTTTCAATTATTATATGAT
sigX3' -PaeI	37	GGCCATGCATGCCTCAAATCCTTTCAATCTTTACCTT
sigX5K-EcoRI	33	GGCCATGAATTCTAAAGCGCGGACAAGGGGCAG
sigX3K-Eco81I	40	GGCCATCCTCAGGAGTTACATTACAACATATTACGAGTA
rsiX 5' BglII Stop	39	GGCCATAGATCTTAAATGATGAAGTCAGAATGGAACGAA
rsiX 5' Δ70 BglII	38	GGCCATAGATCTCAGGCACAGCCTCAACAAAAAGAAGC
rsiX 5' Δ99 BglII	37	GGCCATAGATCTTTGGATCAGACATCGTTTGTCTGTC
rsiX 3' HindIII	36	GGCCATAAGCTTTTAGTTTAAGGAAATCGGATTTGG
rsiX-C1	36	GGCCATAGATCTAAAGACCATCGTTCGCCTCAGGAT
rsiX-C2	36	GGCCATAGATCTGCTGTGAGGTGGATTGGCCCCGCG
rsiX 145	38	GGCCATGCATGCTTACATATCCTGGATCGTTTGGTCTG
rsiX3' RP 2	45	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGCAGCTGGCACCGGAATT
rsiX5' RP 2	22	TCAAGCGGGTGCTGTCCAATCT

Tabelle 4: Sequenzierprimer

Bezeichnung der in dieser Arbeit als Sequenzierprimer verwendeten Oligonukleotide mit deren Sequenz in 5' – 3' Richtung.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
pHTforward	AGCTATTGTAACATAATCGGTACG
pHTreverse	TGTTTCAACCATTGTTCAGGT
bleo_seq	CTTTGGGCATTTTGCACCCCAAT
gfp_seq	CATTACCTGTGACACAATCTGC
pIC5	CCAATACGCAAACCGCCTCTC
pAspac_seq	CAACCTCTGCTAAAATTCCT
seq_pAL01-rev	CATATGTAAGATTTAAATGCAACC
pA1	CGATCAAGGCGAGTTACATGATCC

2.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Chloroform/Isoamylalkohol

v/v = 24/1

CTAB/NaCl

10 % CTAB in 0,7 M NaCl

EDTA 0,5 M

0,5 M EDTA in bidest. H₂O

pH 8,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei RT lagern

EGTA 0,1 M

380 mg EGTA in ca. 5 ml bidest. H₂O lösen; mit 10 N NaOH auf pH 7,2 einstellen,
auf 10 ml auffüllen und autoklavieren

Ethanol 50 %, 70 %, 100 %

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in bidest. H₂O

IPTG 1 M

1 M IPTG in bidest. H₂O lösen, sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern

Isopropanol

Loading Dye 6x (für DNA-Gele)

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)

0,03 % Bromphenolblau

0,03 % Xylencyanol

60 mM EDTA

60 % Glycerin

Lysozym-Lösung

5 mg/ml Lysozym in bidest. H₂O lösen
in Portionen zu je 300 µl aliquotieren und bei -20 °C lagern

NaCl 5 M

dNTPs

10 mM dNTPs in HPLC-H₂O, lagern bei -20 °C

Phenol

Phenol/Chloroform

v/v = 1/1

Proteinase K

20 mg/ml in bidest. H₂O, lagern bei -20 °C

RNase-Lösung

20 mg/ml in bidest. H₂O, lagern bei -20 °C

10x S-Base (Spizizens Salz)

2 g (NH₄)₂SO₄

14 g K₂HPO₄

6 g KH₂PO₄

1 g Na-Citrat x 2 H₂O

bidest. H₂O ad 100 ml; nach dem Autoklavieren 0,1 ml 1 M MgSO₄ zugeben

SDS-Lösung

10 % in bidest. H₂O

STETL-Lösung

STET plus 0,5 mg/ml Lysozym (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)

STET-Puffer

8 % Saccharose
50 mM EDTA
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
sterilfiltrieren
0,5 % Triton-X-100 nach Filtration zugeben
bei RT lagern

TBE-Puffer 5x

54 g Tris Base
27,5 g Borsäure
20 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0
ad 1000 ml bidest. H₂O

TE-Puffer 1x

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM EDTA
autoklavieren, lagern bei RT

Tris/HCl 1 M

1 M Tris in bidest. H₂O
pH 8,0 mit konzentrierter HCl einstellen, autoklavieren, bei RT lagern

X-Gal

4 % X-Gal in DMF, Endkonzentration in Platten ist 0,0112 %

Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität:

Z-Puffer

60 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
40 mM NaH₂PO₄ x H₂O
10 mM KCl
1 mM MgSO₄ x 7 H₂O

ONPG-Lösung

4,1 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,9 ml 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

5 ml bidest. H_2O

40 mg ONPG

DTT 1 M

1,6 g DTT ad 10 ml bidest. H_2O

à 60 μl aliquotieren, bei -20°C lagern

Lysislösung

1 mg/ml DNase I

10 mg/ml Lysozym

à 220 μl aliquotieren, bei -20°C lagern

Z-Puffer/DTT

50 ml Z-Puffer + 50 μl 1 M DTT

Z-Puffer/DTT/Lysislösung

20 ml Z-Puffer/DTT + 200 μl Lysislösung

Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen:

TfB I: 100 mM RbCl

50 mM MnCl_2

10 mM CaCl_2

30 mM Kaliumacetat

15 % (w/v) Glycerin

pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen

sterilfiltrieren, lagern bei -20°C

TfB II: 10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

15 % (w/v) Glycerin

pH 7,0 mit 1 M NaOH einstellen

sterilfiltrieren, lagern bei -20 °C

Northern Blot:

„Killing-Puffer“:

20 mM Tris/HCl, pH 7,5

5 mM MgCl₂

20 mM NaN₃

Lysislösung I:

25 % Saccharose

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

0,25 mM EDTA

Lysozylösung:

20 mg Lysozym/ml bidest. H₂O

Lysislösung II:

3 mM EDTA

200 mM NaCl

Saures Phenol:

Aqua-Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (v/v/v; 25:24:1), zweimal ausgeschüttelt
mit bidest. H₂O

Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform, Isoamylalkohol (v/v; 24:1), mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert

Natriumacetat 3M

RNA-Probenpuffer (2x):

6,5 ml Formamid
1,2 ml Formaldehyd
2,0 ml 10x MOPS-Puffer
0,4 ml 50 % Saccharose
20 mg Bromphenolblau
20 mg Xylencyanol

MOPS-Puffer (10x):

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH mit NaOH auf 7,0 einstellen, ad 1 l bidest. H₂O, autoklavieren

Denaturierungslösung:

50 mM NaOH
10 mM NaCl

Neutralisierungslösung:

100 mM Tris/HCl, pH 7,4

SSC-Puffer (20x):

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH auf 7,0 einstellen, bei RT lagern

Blocking Reagenz (10 %):

10 % Blocking Reagenz in Puffer P1
in Mikrowelle aufkochen lassen, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

DEPC-H₂O:

1 ml DEPC in 1 l bidest. H₂O lösen (0,1 %), gut schütteln, ÜN bei RT lagern, am nächsten Tag autoklavieren

Prähybridisierungslösung:

50 % (v/v) Formamid

5x SSC

2 % (w/v) Blocking Reagenz

0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin

0,02 % (w/v) SDS

unmittelbar vor Gebrauch ansetzen, 30 min bei 37 °C vorinkubieren

Waschlösung I:

2x SSC

0,1 % SDS

bei RT lagern

Waschlösung II:

0,1x SSC

0,1 % SDS

auf 68 °C vortemperieren

Puffer P1:

100 mM Maleinsäure, pH 7,5

150 mM NaCl

Puffer P2:

1 % (w/v) Blocking Reagenz in Puffer P1

unmittelbar vor Gebrauch ansetzen, 30 min bei 37 °C vorinkubieren

Detektionslösung:

0,1 M Diethanolamin

1 mM MgCl₂

pH auf 9,5 einstellen, bei RT lagern

Waschpuffer:

0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer P1

Southern Blot:

Depurinierungslösung:

0,25 M HCl

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:

1,5 M NaCl

0,5 M Tris/HCl, pH 7,4

SSC-Puffer (20x):

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

pH auf 7,0 einstellen, bei RT lagern

Blocking Reagenz (10 %):

10 % Blocking Reagenz in Puffer P1

in Mikrowelle aufkochen lassen, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

Prähybridisierungslösung:

5x SSC

1 % (w/v) Blocking Reagenz

0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin

0,02 % (w/v) SDS

unmittelbar vor Gebrauch ansetzen, 30 min bei 37 °C vorinkubieren

Waschlösung I:

2x SSC

0,1 % SDS

bei RT lagern

Waschlösung II:

0,1x SSC

0,1 % SDS

auf 68 °C vortemperieren

Puffer P1:

100 mM Maleinsäure, pH 7,5

150 mM NaCl

Puffer P2:

1 % (w/v) Blocking Reagenz in Puffer P1

unmittelbar vor Gebrauch ansetzen, 30 min bei 37 °C vorinkubieren

Detektionslösung:

0,1 M Diethanolamin

1 mM MgCl₂

pH auf 9,5 einstellen, bei RT lagern

Waschpuffer:

0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer P1

Western Blot:

Aufschlusspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

100 mM NaCl

autoklavieren

Auftragspuffer (3x Lämmli):

3 ml Glycerin
0,3 ml β -Mercaptoethanol
3 ml 20 % SDS
0,3 mg Bromphenolblau (oder 60 μ l einer 0,5%igen Lösung in bidest. H₂O)
1,825 ml bidest. H₂O (oder 1,765 ml bei Verwendung einer 0,5%igen Lösung
Bromphenolblau)
1,875 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
lagern bei -20 °C

Elektrophoresepuffer (10x):

30 g Tris
140 g Glycin
10 g SDS
bidest. H₂O ad 1 l, lagern bei RT

AP-Puffer (10x):

1 M Tris/HCl pH 7,4
1 M NaCl
2,5 mM MgCl₂
bidest. H₂O ad 1 l, lagern bei RT

AP-T-Puffer:

100 ml AP-Puffer (10x)
0,05 % v/v Tween 20 (500 μ l)
ad 1 l bidest. H₂O, lagern bei RT

Blotting-Puffer:

3 g Tris
14 g Glycin
1 g SDS
200 ml Methanol
bidest. H₂O ad 1 l, lagern bei RT

2.3 Antibiotika-Lösungen

Alle verwendeten Antibiotika-Lösungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Wasserlösliche Antibiotika wurden steril filtriert. Alle Lösungen wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 5: Zusammenfassung der verwendeten Antibiotika-Lösungen

Angegeben sind jeweils Name, Konzentration der Stammlösung, Lösungsmittel sowie Endkonzentration des Antibiotikums in dem jeweils verwendeten Medium.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin (Amp)	100	70 % (v/v) EtOH	100
Bicyclomycin (BCM)	100	bidest. H ₂ O	100
Chloramphenicol (Cm)	20	EtOH abs.	10
Erythromycin (Em)	1 bzw. 50	EtOH abs.	1 bzw. 100
Neomycin (Neo)	10	bidest. H ₂ O	10
Bleomycin (Bleo)	1	bidest. H ₂ O	1
Spectinomycin (Spec)	100	bidest. H ₂ O	100
Tetracyclin (Tet)	2	50 % (v/v) EtOH	10

2.4 Antikörper

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsexperimente sind die in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelisteten primären und sekundären Antikörper verwendet worden.

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper mit Verdünnung und Referenz auf.

Name	Verdünnung	Referenz
Anti-FLAG	1 : 1000	Sigma, F7425
Anti-GFP	1 : 5000	S. Heidmann, unveröffentlicht
<i>B. subtilis</i> Anti-HtpG	1 : 10000	Zellmeier <i>et al.</i> 2003
<i>B. subtilis</i> Anti-FtsH	1 : 10000	Zellmeier <i>et al.</i> 2003

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper mit Verdünnung und Referenz auf.

Name	Verdünnung	Referenz
ECL™ Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase Conjugate	1 : 5000	GE Healthcare, NA934V
Anti-Digoxygenin-AP, Fab fragments	1 : 10000	Roche, 11 093 274 910

2.5 Längenstandards

Die für Agarose-Gelelektrophoresen benutzten Längenstandards sowie der Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGEs, welche für Western Blot Analysen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Längenstandards für Agarose-Gelelektrophoresen und Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGEs

Angegeben sind zum einen der Name der Längenstandards für Agarose-Gelelektrophoresen mit Referenz sowie Größe der DNA- bzw. RNA-Fragmente in bp bzw. Basen. Zum anderen ist der Name des Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGEs mit Referenz und den Größen der Proteine in kDa angegeben.

Standard für DNA-Agarosegele	Referenz	Fragmentgrößen in bp
Spp1	Roche	8576, 7425, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492, 359
O'RangeRuler™ 200 bp DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas	3000, 2800, 2600, 2400, 2200, 2000, 1800, 1600, 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200
O'RangeRuler™ 100+500 bp DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas	6000, 5500, 5000, 4500, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
Standard für RNA-Agarosegele	Referenz	Fragmentgrößen in Basen
RiboRuler™ RNA Ladder, High Range	Fermentas	6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200
Standard für SDS-PAGEs	Referenz	Molekulargewichte in kDa
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden wie bei Sambrook beschrieben hergestellt (Sambrook & Russell 2001). Die nachfolgend beschriebenen Zusammensetzungen der einzelnen Medien beziehen sich auf Flüssigkeiten. Wurde das LB-Medium als festes Nährmedium verwendet, wurden diesem 15 g/l Agar-Agar bzw. 7 g/l Agar-Agar für Weichagar vor dem Autoklavieren zugefügt. Für Selektionen nötige Antibiotika-Lösungen (Tabelle 5) wurden stets nach dem Autoklavieren zugegeben. Das LB-Medium diente zur Kultivierung von *B. subtilis*- bzw. *E. coli*-Zellen, dagegen wurde das HS- und LS-Medium zur Herstellung kompetenter *B. subtilis*-Zellen und der folgenden Transformation von DNA benötigt (2.6.4.2).

LB-Medium

- 10 g Caseinhydrolysat (Trypton oder Pepton)
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- bidest. H₂O ad 1000 ml, autoklavieren

LS-Medium

- 81,2 ml bidest. H₂O
 - 10 ml 10x S-Base mit Mg²⁺
 - 2,5 ml 20 % Glucose
 - 0,5 ml 1 mg/ml (0,1%) DL-Tryptophan
 - 0,5 ml 2 % Caseinhydrolysat
 - 5 ml 2 % Hefeextrakt (Difco!)
 - 0,25 ml 1 M MgCl₂
 - 0,05 ml 1 M CaCl₂
- Alle Komponenten werden nach dem Autoklavieren steril zusammengegeben. Die Tryptophanlösung wurde nur sterilfiltriert.

HS-Medium

10 ml 10x S-Base mit Mg²⁺

2,5 ml 20 % Glucose

5 ml 1 mg/ml (0,1%) DL-Tryptophan

1 ml 2 % Casein

5 ml 10 % Hefeextrakt

10 ml 8 % Arginin, 0,4 % Histidin

66,5 ml bidest. H₂O

Alle Komponenten werden nach dem Autoklavieren steril zusammengegeben. Die Tryptophanlösung wurde nur sterilfiltriert.

2.6.2 Kulturverfahren

Um die Bakterienkulturen in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurden diese in flüssigem LB-Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 37 °C und 200 rpm unter ausreichender Luftzufuhr inkubiert.

Bei der Verwendung von festem Medium wurden die Bakterienkulturen mithilfe eines Drygalski-Spatels oder einer Impföse auf LB-Platten (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank angezogen.

2.6.2.1 Aufnehmen von Wachstumskurven

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wurden 50 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft. Die Kolben wurden im Wasserbad unter Schütteln und ausreichender Luftzufuhr bei 37 °C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der OD₅₇₈ in definierten Zeitabständen verfolgt. Bei Bedarf wurden Proben der Bakteriensuspension entnommen.

2.6.2.2 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden zu 300 µl autoklavierter 100%iger Glycerinlösung 1,5 ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nachdem durch Mischen und ggf. durch Vortexen eine homogene Suspension entstanden ist, wurde das Reaktionsgefäß für etwa 30 min auf Eis inkubiert, damit die Bakterien das Glycerin aufnehmen konnten. Danach wurde die Bakterienkultur bei -20 °C eingefroren.

B. subtilis-Stämme, welche einen Knockout des *rasP*-Gens enthalten, wurden nach dem Mischen mit Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Zum Anlegen der Dauerkulturen wurde Glycerin benutzt, weil dieses als eine Art Frostschutz wirkt und das Aufplatzen der Zellen verhindert.

2.6.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.6.3.1 Fluoreszenzmikroskopie und -quantifizierung von GFP-Fusionen

Die Bakterienstämme mit GFP-Fusionen (Einzelkolonien auf Agarplatten) wurden mit dem GFP-Scope (Leica MZ FLIII) nach Anregung mit blauem Licht (480 nm) mikroskopiert. Zur Dokumentation wurden die Kolonien fotografiert.

Zur genaueren Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten wurden ÜN-Kulturen der entsprechenden Stämme mit dem LAS4000 (Fuji Film; Methode: GFP 0,85; Licht: Blau; Filter: Y515Di; Iris: F=0,85) analysiert. Dazu wurden die jeweiligen ÜN-Kulturen auf eine OD₅₇₈ von 1 eingestellt. Davon wurde wiederum 1 ml zentrifugiert, um anschließend das Zellpellet in 25 µl LB-Medium zu resuspendieren. 15 µl dieser konzentrierten Zellsuspension wurden zur Analyse in einer Mikrotiterplatte eingesetzt.

2.6.3.2 Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Zellmorphologie

Die Bestimmung der Morphologie von *B. subtilis*-Zellen erfolgte neben der Phasenkontrastmikroskopie (Leitz, Laborlux K) auch durch die Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür wurde der Farbstoff FM4-64 zum Anfärben der Zellmembranen verwendet. Es wurde wie bei Chen *et al.* beschrieben verfahren (Chen *et al.* 2009). Mikroskopiert wurde mit einem Mikroskop der Firma Leica (Leica DMI 6000B; Filter cube: N3, Excitation range: green, Excitation filter: BP546/12, Dichromatic mirror: 565, Suppression filter: BP600/40) und dazugehöriger Software (LAS AF). Die Zellen wurden mit Agarose auf dem Objektträger fixiert (5 µl Kultur mit 10 µl 0,8 % Agarose mischen).

2.6.4 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

2.6.4.1 Genetische Manipulation von *E. coli*-Zellen

2.6.4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Gewinnung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Mehr-Ionen-Methode verwendet. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Von der jeweiligen *E. coli*-Kultur wurde eine 5 ml Übernachtskultur angesetzt (LB, 37 °C, 200 rpm). Am folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ dieser Kultur bestimmt und 100 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,05 angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 bei 37 °C und 200 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt und in sterile Zentrifugenbecher abgefüllt. Nun wurde 10 min bei 4 °C und 7000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml eiskaltem Puffer TfB I resuspendiert. Dann erfolgte eine Inkubation von 30-60 min auf Eis. Danach wurde wiederum 10 min zentrifugiert (4 °C, 7000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 9 ml eiskaltem Puffer TfB II resuspendiert sowie 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zügig zu 100 µl aliquotiert (1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäße) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

2.6.4.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen (2.6.4.1.1) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl dieser kompetenten Zellen wurden 1 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes gegeben. Die Zellen wurden dann 1 Stunde auf Eis und anschließend für 2 min bei 42 °C inkubiert, bevor sie für 5 min erneut auf Eis inkubiert wurden. Danach wurden 800 µl LB-Medium zugegeben, und die Zellsuspension wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 100 µl der Zellsuspension auf eine LB-Platte (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und der Rest der Suspension bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine zweite LB-Platte (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transformation wurden untransformierte Bakterien oder Bakterien, in die ein leerer Vektor transformiert wurde, ausplattiert.

2.6.4.1.3 Herstellung von elektrokompenten *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

Bei der Elektroporation kommt es durch einen kurzzeitigen Stromfluss zur Bildung von Poren in der *E. coli* Membran, durch welche die zu transformierende DNA aufgenommen werden kann. Für die erfolgreiche Elektroporation von *E. coli*-Zellen muss die zu elektroporierende Zellsuspension möglichst ionenfrei gemacht werden, was wie folgt geschah:

200 ml LB-Medium wurden mit der entsprechenden Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,0 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis gekühlt und in sterile Zentrifugenbecher abgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 8000 rpm. Der Überstand wurde danach verworfen und das Pellet wurde in 200 ml eiskaltem sterilem bidest. H₂O resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 8000 rpm. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet danach in 4 ml eiskaltem sterilem Glycerin (10 % in bidest. H₂O) suspendiert. Dann folgte eine letzte Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 8000 rpm, wobei der Überstand wieder verworfen wurde. Das Pellet wurde danach in 400 µl eiskaltem sterilem Glycerin (10 % in bidest. H₂O) suspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen zügig zu je 25 µl in 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.6.4.1.4 Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von DNA in *E. coli*-Zellen durch Elektroporation wurde eine möglichst ionenfreie Zellsuspension verwendet (Kapitel 2.6.4.1.3). Zusätzlich konnte eine Mikrodialyse mit dem Ligationsansatz durchgeführt werden. Dazu wurden 30 ml steriles bidest. H₂O in eine sterile leere Petrischale gegeben. Auf dem bidest. H₂O wurde vorsichtig ein Filterblättchen für die Mikrodialyse platziert und mit Tropfen zu je 10 µl des Ligationsansatzes versetzt. Dieser Ansatz wurde in der verschlossenen Petrischale für etwa 3 Stunden bei RT belassen und im Anschluss für die Elektroporation verwendet. Bei der Elektroporation ging man wie folgt vor:

Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je nach DNA-Konzentration 0,25 – 1 µl der zu transformierenden DNA zugeben und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die speziellen Elektroporationsküvetten wurden ebenfalls auf Eis gestellt. Dann wurden die Transformationsansätze in diese Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation wurde danach mit dem „GenePulser“/„GenePulseController“ (BioRad) mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω. Nach dem Puls wurde zügig 1 ml LB zu den Ansätzen gegeben und diese in sterile 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäße überführt. Danach erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 37 °C bei leichtem Schütteln, damit sich die Zellen erholen und Resistenzgene exprimieren konnten. Im Anschluss wurden die Zellen 5 min bei 8000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet hat man in 100 µl LB resuspendiert und auf einer LB-Platte (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank.

Als negative Kontrollen können untransformierte Zellen oder Zellen, die mit leerem Vektor transformiert wurden, verwendet werden.

2.6.4.2 Genetische Manipulation von *B. subtilis*-Zellen

2.6.4.2.1 Herstellung kompetenter *B. subtilis*-Zellen

Beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase entwickelt *B. subtilis* eine natürliche Kompetenz. Um kompetente Zellen von *B. subtilis* zu erhalten, ging

man nach der von Anagnostopoulos und Spizizen (Anagnostopoulos & Spizizen 1961) beschriebenen Methode vor:

Von der *B. subtilis*-Kultur wurde eine 5 ml Übernachtskultur (30 °C) in LB-Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) angefertigt, um damit 40 ml High-Salt-Medium (HS-Medium) auf eine OD₅₇₈ von 0,05 anzuimpfen. Diese Kultur wurde bei 37 °C wachsen gelassen bis die Zellen in die stationäre Phase übergangen. Dabei wurde die OD₅₇₈ alle 30 min gemessen, um den Verlauf des Wachstums zu verfolgen. Nach etwa 4 Stunden war die stationäre Phase erreicht. Beim Erreichen dieser Phase wurden Proben genommen: 4,5 bzw. 9 ml Kultur wurden in 0,5 bzw. 1 ml 100%igem Glycerin gelöst und auf Eis gestellt. 15 min und 30 min nach dem ersten Probenahmezeitpunkt wurde jeweils eine weitere Probe genommen, so dass das Übergehen in die stationäre Phase sicher abgepasst wurde. Anschließend wurden die einzelnen Proben in 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäßen zu je 1 ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.6.4.2.2 Transformation von Plasmid- oder chromosomaler DNA in kompetente *B. subtilis*-Zellen

Ein Aliquot eingefrorene kompetente *B. subtilis*-Zellen wurde bei 37 °C aufgetaut. Mit diesen Zellen wurde das Low-Salt-Medium (LS-Medium) angeimpft. Dabei wurden 1/10 des Volumens von dem LS-Medium an kompetenten Zellen verwendet (z.B. 5 ml LS-Medium und 500 µl kompetente Zellen). Das angeimpfte Medium wurde für 2 Stunden bei 30 °C langsam geschüttelt. Anschließend wurden 1 ml kompetente Zellen entnommen und mit 10 µl 0,1 M EGTA versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20 µl Plasmid-DNA (ca. 6 µg) oder 2 µl chromosomale DNA dazu gegeben und für weitere 2 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension bei 12000 rpm für 2 min zentrifugiert und 900 µl des Überstandes wurden verworfen. In den restlichen 100 µl wurde das Bakterienpellet resuspendiert und anschließend wurden diese 100 µl auf der entsprechenden LB-Platte ausplattiert. Bei Transformation von chromosomaler DNA war es ausreichend, 200 µl des Ansatzes ohne Zentrifugation auszuplattieren. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Für jede Transformation wurde auch eine Kontrolle durchgeführt, d. h. es wurde mit einem Ansatz kompetenter Zellen genauso verfahren, jedoch ohne die Zugabe von DNA.

2.6.4.2.3 SPP1-Phagen Transduktion in *B. subtilis*

Der wildtypische *B. subtilis*-Stamm NCIB 3610 bildet keine natürliche Kompetenz aus. Daher wurden die betreffenden *B. subtilis*-Stämme wie bei Kearns und Losick beschrieben durch SPP1-Phagen Transduktion konstruiert (Kearns & Losick 2003).

2.6.4.2.4 Transposonmutagenese

Die in dieser Arbeit durchgeführte Transposonmutagenese erfolgte in Anlehnung an Steinmetz & Richter (1994) wie bei Heinrich & Wiegert (2006) beschrieben. Das verwendete Plasmid pIC333 enthält das Transposon mini-Tn10.

2.7 Molekularbiologische und genetische Methoden

Die Benutzung von molekularbiologischen und genetischen Methoden in dieser Arbeit erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden gegebenenfalls selbst hergestellt (2.2) oder von kommerziellen Firmen erworben. Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Roche, Fluka, Difco, MBI-Fermentas, Qiagen, Roth, Merck, Sigma. Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, MBI-Fermentas bzw. BIOzym erstanden.

2.7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.7.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *B. subtilis*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis* wurde die CTAB-Methode nach Smith benutzt (Smith *et al.* 1989). Es wurde dabei wie folgt verfahren:

Eine Übernachtskultur von 5 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde angelegt und bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde auf zwei 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 8000 rpm und 4 °C wurden die Bakterien pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in je 270 µl TE-Puffer resuspendiert. Danach konnten die Reaktionsgefäße gleicher Klone wieder vereinigt werden.

Es wurden 25 µl Lysozym-Lösung zugegeben. Anschließend wurde gründlich gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 30 µl SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K zugefügt und es wurde gründlich gemischt. Für 1 Stunde wurde nun bei 37 °C inkubiert. Als nächstes wurden 100 µl 5 M NaCl (nach Zugabe wurde gründlich gemischt) und 80 µl CTAB/NaCl zugegeben und durchmischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C. Im Anschluss erfolgte die Extraktion mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und eine Zentrifugation für 5 min bei 12000 rpm. Es kam zur Phasentrennung. Für die folgende Phenolisierung wurde jeweils der wässrige, nukleinsäurehaltige viskose Überstand inklusive der weißlichen Interphase in ein neues 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß überführt. Bei der Phenolisierung wurde mit je 600 µl der folgenden Reagenzien extrahiert: 1x Phenol, 1x Phenol/Chloroform (1:1) und am Ende 2x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach jeder Extraktion wurde für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach der letzten Extraktion wurde nur der Überstand ohne die Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl RNase versetzt. Es wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 0,6 Volumina Isopropanol, es wurde durchmischt und für ca. 2 Stunden bei -20 °C (oder über Nacht bei 4 °C) die DNA gefällt. Nun wurde für 15 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde bei Raumtemperatur ca. 15 min getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und zum Lösen ca. 1 Stunde bei 65 °C inkubiert. Danach wurde die DNA-Konzentration bestimmt (2.7.2).

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

2.7.1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch Mini-Präparation (Boiling Präparation)

Mit der Mini-Plasmid-Präparation nach der Boiling-Präp-Methode (Holmes & Quigley 1981) wurden geringe Mengen an Plasmid-DNA erhalten, wie sie z. B. für Kontrollverdaus nach einer Ligation benötigt wurden. Dabei ging man wie folgt vor:

Es wurde eine Übernachtskultur aus 2 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum angelegt und bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß überführt. Bei der anschließenden Zentrifugation (12000 rpm, 3 min) wurden die Bakterien pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 110 µl STETL-Lösung

resuspendiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 30 sec bei 100 °C im Heizblock inkubiert und danach für 15 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Das schleimige Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und zu dem Überstand wurden 110 µl Isopropanol gegeben. Es wurde kurz und gründlich per Hand gemischt und erneut für 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und eine Zentrifugation für 10 min und 12000 rpm folgte. Das Pellet wurde für ca. 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl TE-Puffer (enthält 1 µl RNase) resuspendiert. Von dieser isolierten DNA wurden Testverdaus (2.7.4.1) durchgeführt.

2.7.1.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Midi-Präparation

Die Midi-Plasmid-Präparation wurde verwendet, um größere Mengen an Plasmid-DNA von hoher Reinheit zu gewinnen. Dabei wurde zur Präparation der QIAGEN Plasmid Midi Kit 100 (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll vorgegangen.

2.7.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *B. subtilis*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *B. subtilis* wurde die saure Phenol-Methode von Völker (Völker *et al.* 1994) in einer leicht modifizierten Weise (Homuth *et al.* 1997) angewandt. Es wurde dabei wie folgt verfahren:

10 ml der relevanten Bakterienkultur wurden sofort nach der Probenahme auf 5 ml gefrorenen zerstoßenen Killing-Puffer in Zentrifugenröhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 3700 rpm für 30 min. Im Anschluss wurde das Pellet in 1 ml Killing-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (4 °C, 8800 rpm, 5 min). Das erhaltene Pellet konnte ggf. bei -20 °C gelagert werden oder es wurde sofort weiter verwendet und in 1 ml Lysislösung I auf Eis resuspendiert. Es wurde anschließend mit 50 µl Lysozymbelösung versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert, damit sich Protoplasten ausbilden konnten. Gleichzeitig wurde die Lysislösung II vorbereitet: pro RNA-Probe wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß 270 µl Lysislösung II und 30 µl 10 % SDS gegeben. Nach dem Mischen wurde die Lösung bei 95 °C im Heizblock vorgewärmt. Die Suspension mit den Protoplasten wurde zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 5 min). Das resultierende Pellet wurde in

300 µl Lysislösung II resuspendiert und zu der vorgewärmten Lysislösung II/SDS-Mischung gegeben. Zusammen wurde alles für 5 min bei 95 °C inkubiert. Dabei wurden die Protoplasten lysiert. Danach wurden zu dieser Lösung 600 µl saure Phenol-Lösung gegeben. Es wurde für 5 min bei RT geschüttelt und danach 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. 500 µl der Oberphase wurden erneut mit saurem Phenol (500 µl) versetzt und das Schütteln bei RT sowie die Zentrifugation wurden wiederholt. Danach wurden 400 µl der Oberphase abgenommen, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (1:1) versetzt, für 5 min bei RT geschüttelt und 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die gesamte wässrige Oberphase wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurde für 30 min bei RT inkubiert. Zur RNA-Fällung wurden zuerst 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und danach 1 ml 96%iger Ethanol zugefügt. Die Fällung erfolgte ÜN bei -20 °C. Anschließend wurde zentrifugiert (4 °C, 12000 rpm, 15 min), mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 12000 rpm, 15 min). Das erhaltene Pellet wurde 30 min an der Brennerflamme getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst (3 Stunden auf Eis und 30 min bei RT oder ÜN auf Eis).

Mit dieser Methode waren Ausbeuten von 1-3 µg RNA/µl möglich (2.7.2). Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -20 °C.

2.7.2 Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration von isolierter chromosomaler oder Plasmid-DNA sowie von RNA wurde mit dem Spektralphotometer (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000) in 1 ml Quarzküvetten bei entsprechender Verdünnung bestimmt. Es wurde folgende Definition zugrunde gelegt:

$$1 A_{260} = 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$$

$$1 A_{260} = 40 \mu\text{g ssRNA/ml}$$

Das Verhältnis A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit der DNA im Verhältnis zu Proteinverunreinigungen an. Von reiner DNA kann bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 gesprochen werden.

2.7.3 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode bei der bestimmte Bereiche einer Template DNA vervielfältigt werden können. Dazu werden spezifische Primer (Oligonukleotide), Desoxynukleosidtriphosphate, thermostabile Polymerasen sowie die Template DNA benötigt. Die Kettenreaktion beginnt mit der Erhöhung der Temperatur, so dass es zum Aufschmelzen der DNA kommt. Im Anschluss wird die Temperatur bis einige Grad Celsius (ca. 10 °C) unterhalb der Schmelztemperatur der Primer abgesenkt (Annealingtemperatur), so dass die Primer an das Template hybridisieren können. Danach wird die Temperatur wieder erhöht und zwar bis zu der Temperatur, bei welcher die verwendete Polymerase ihre höchste Aktivität besitzt, um einen neuen DNA-Strang zu synthetisieren. Wird dieser Zyklus mehrfach wiederholt, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Menge des gewünschten DNA-Fragments.

Die PCR-Reaktionen für diese Arbeit wurden mit dem Thermal Cycler der Firma Bio-Rad (MyCycler™) durchgeführt.

2.7.3.1 Standard-PCR

Bei der für diese Arbeit durchgeführten Standard-PCR wurde die *Taq*-Polymerase (5 U/μl) verwendet. Wurden die amplifizierten Fragmente für eine Klonierung benötigt, wurde mit der *Pfu*-Polymerase (2,5 U/μl) gearbeitet, da diese im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine proof reading-Funktion besitzt. Die benutzten Primer (2.1, Tabelle 3) besitzen meist zusätzlich zu den komplementären Sequenzen zu der Template-DNA noch Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. Auf diese Art wurden in das zu amplifizierende DNA-Fragment noch Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt. Außerdem befinden sich jenseits der Schnittstellen in der Sequenz der Primer meist noch so genannte GC-Klammern. Diese sind sechs Basen lange Sequenzen, so dass das DNA-Fragment jenseits der Schnittstelle verlängert wird, was die spätere Bindung der Restriktionsenzyme erleichtert.

Reaktionsansatz (100 µl) für die Standard-PCR: ad 100 µl bidest. H₂O
4 x 2 µl 10 mM dNTPs
10 µl 10x Thermo Pol Puffer (mit MgCl₂)
5 µl Template DNA (30-100 ng)
1 µl Forward-Primer (100 pmol)
1 µl Reversed-Primer (100 pmol)
1 µl *Taq*-Polymerase bzw.
2 µl *Pfu*-Polymerase

Reaktionsbedingungen der Standard-PCR: 8' bei 95 °C
30 Zyklen: 1' bei 95 °C
1' bei Annealingtemperatur
1'-4' bei 72 °C
10' bei 72 °C
Endtemperatur 18 °C

Ein Aliquot (5 µl) des PCR-Produktes wurde zur Kontrolle auf Nebenprodukte und zur Ausbeuteabschätzung auf ein Agarosegel (2.7.6) aufgetragen. Falls erforderlich wurde nach der PCR die DNA mit den entsprechenden Enzymen verdaut (2.7.4.1) und gereinigt (2.7.5). Die amplifizierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.7.3.2 Kolonie-PCR

Alternativ zur Mini-Plasmid-Präparation (2.7.1.2.1) konnte auch eine Kolonie-PCR durchgeführt werden. In diesem Fall wurde die Plasmid-DNA nicht direkt in den PCR-Ansatz gegeben, sondern es wurden mit sterilen Zahnstochern Zellen von Einzelkolonien auf Agarplatten direkt zum PCR-Ansatz gegeben. Durch die hohen Temperaturen bei der PCR wurden die Zellen lysiert und die DNA lag folglich als Template vor. Diese Methode brachte eine erhebliche Zeitersparnis. Die geringe Reinheit der gewonnenen Amplifikate reichte dabei aus, um Aussagen zu treffen, ob es sich bei dem jeweiligen Plasmid um das gewünschte Produkt handelte.

Für die Durchführung wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mastermix-Ansatz für 48 Klone: 812 µl bidest. H₂O
4 x 21 µl 10 mM dNTPs
104 µl 10x Puffer (mit MgCl₂)
10 µl Forward-Primer (100 pmol)
10 µl Reversed-Primer (100 pmol)
20 µl *Taq*-Polymerase

Für eine Kolonie/ein Klon wurden 20 µl Mastermix verwendet.

PCR-Programm: 8' bei 95 °C
30 Zyklen: 1' bei 95 °C
1' bei Annealingtemperatur
1'-4' bei 72 °C
10' bei 72 °C
Endtemperatur 18 °C

Eine sich anschließende Agarose-Gelelektrophorese (2.7.6) diente der Analyse der PCR-Produkte und dem Screening nach positiven Klonen.

2.7.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.7.4.1 Enzymatische Hydrolyse von Nukleinsäuren

Für die spezifische enzymatische Hydrolyse der DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet (Arber 1978; Arber 1993). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie spezifische Nukleotidsequenzen (kurze palindromische Sequenzen [4-8 bp] (Pingoud 2004)) erkennen und innerhalb oder in unmittelbarer Nähe dieser Sequenzen die DNA spalten können.

Die Restriktionsenzyme wurden dem Hydrolyseansatz im Überschuss zugegeben. Außerdem wurden Restriktionspuffer benötigt. Je nach verwendetem Enzym wurden allgemeine Puffer oder enzymespezifische Puffer verwendet. Aus diesem Grund wurde die Hydrolyse von DNA mit mehreren Enzymen mitunter nicht gleichzeitig durchgeführt. In diesem Fall wurde die

DNA schrittweise mit jedem Enzym einzeln verdaut und zwischen den einzelnen Reaktionen gereinigt (2.7.5).

Für das Verdauen großer Mengen an DNA (präparativer Verdau) wurden zum Hydrolyseansatz 10-15 µg dieser DNA zugegeben. Diente die Hydrolyse nur der Überprüfung der gewonnenen DNA (Testverdau), reichte eine DNA-Menge von 200-500 ng aus.

Die Hydrolyseansätze wurden für einen Testverdau ca. 2 Stunden, für einen präparativen Verdau ca. 4 Stunden beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms, meist 37 °C, inkubiert. Nach erfolgter Hydrolyse wurde das Enzym durch starke Temperaturerhöhung (laut Herstellerangabe) inaktiviert. Präparative Verdau wurden nach dem Reaktionsende gereinigt (2.7.5). Im Anschluss wurden die erhaltenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und identifiziert (2.7.6). Sollten die Hydrolyseansätze aufbewahrt werden, wurden sie bei -20 °C gelagert.

Hydrolyseansätze für	<u>Testverdau</u>	<u>präparativer Verdau</u>
	1,5 µl 10x Puffer	10 µl 10x Puffer
	0,5 µl Restriktionsenzym	4 µl Restriktionsenzym
	200-500 ng DNA	10-15 µg DNA
	bidest. H ₂ O ad 15 µl	bidest. H ₂ O ad 100 µl

2.7.4.2 Ligation von Nukleinsäuren

Zur Verknüpfung von DNA mit kompatiblen Schnittstellen wurde diese enzymatisch ligiert. Dazu wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas) verwendet. Dabei verknüpft das Enzym unter Verbrauch von ATP das freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Ende der DNA-Fragmente zu einer Phosphodiesterbindung.

Für die Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 1 µl 10x Ligationspuffer mit ATP
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- DNA-Fragmente im Verhältnis Vektor:Insert = 1:1 bis 1:5
- HPLC-H₂O ad 10 µl

Die Abschätzung der Menge an Insert und Vektor erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (2.7.6), bei der jeweils die gleichen Volumina an Vektor und Insert aufgetragen wurden.

Der Ligationsansatz wurde 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Zur Kontrolle wurde zu jedem Ligationsansatz auch eine Ligation ohne Insert durchgeführt.

Die ligierte DNA wurde im Anschluss in *E. coli*-Zellen transformiert (2.6.4.1.2) oder bei Bedarf bei -20 °C gelagert.

2.7.5 Reinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR bzw. nach anderen enzymatischen Reaktionen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte nach dem QIAquick PCR Purification Kit Protokoll (bei Benutzung einer Mikrozentrifuge) der Firma Qiagen GmbH (Cat. No. 28106). Nach dieser Methode konnten Fragmente von 100 bp bis zu 10 kb von Primern, Nukleotiden, Enzymen und Salzen gereinigt werden.

Bei dieser Methode wurden alle Zentrifugationsschritte mit der Tischzentrifuge Mikro 12-24 der Firma Hettich bei 13000 rpm durchgeführt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Zu 1 Teil Probe wurden 5 Teile Bindungspuffer PB gegeben, und die Probe wurde gemischt. Danach wurde der gesamte Ansatz auf eine QIAquick spin Säule, welche sich auf einem 2 ml Sammelgefäß befand, aufgetragen und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde dann zweimal (1. 700 µl, 2. 500 µl) mit dem Puffer PE gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde zusätzlich noch einmal 1 min zentrifugiert, um das gesamte Ethanol aus dem Puffer PE zu entfernen. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß gesetzt und in die Mitte der Membran der Säule wurden 50 µl Elutionspuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gegeben. Es wurde für 1 min zentrifugiert, um alle DNA zu eluieren. Dabei wurden durchschnittlich 46 µl DNA eluiert.

2.7.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.7.6.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden 0,7%ige und 2,0%ige Agarosegele aus 0,7 % bzw. 2,0 % (w/v) Agarose in 1x TBE verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen Flachbettapparaturen durchgeführt (Hayward & Smith 1972). Dafür wurde das Gel mit 1x TBE überschichtet und anschließend mit einem Längenstandard und den DNA-Proben, welche zuvor mit 6x Loading Dye vermischt wurden, beladen. Die Elektrophorese wurde bei RT mit einer Spannung von 120 V durchgeführt. Die DNA ist aufgrund des Pentose-Phosphat-Rückgrades negativ geladen und wandert daher während der Elektrophorese zum Pluspol (Anode). Um die einzelnen DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid-Lösung für ca. 10 min gefärbt und danach für ca. 10 min in bidest. H₂O entfärbt. Dabei interkaliert EtBr zwischen die Basenpaare der DNA. Auf einer UV-Durchlichtbank konnten so die DNA-Moleküle sichtbar gemacht und fotografiert werden. Das Anregungsmaximum von DNA-gebundenem EtBr liegt bei 366 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 605 nm (Carl Roth GmbH & Co. KG). Zur Abschätzung der Größe von DNA-Molekülen sowie der DNA-Menge wurden verschiedene Längenstandards (Tabelle 8) herangezogen.

2.7.6.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

RNA-Moleküle wurden ähnlich wie DNA-Moleküle durch eine Gelelektrophorese in horizontalen Flachbettapparaturen nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden jedoch 1,2%ige denaturierende Agarosegele verwendet. Dazu wurden für die Herstellung von einem Gel 0,6 g Agarose in 37 ml DEPC-H₂O sowie 5 ml 10x MOPS durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst und danach für 30 min bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 4,25 ml Formaldehyd zugefügt und erneut für 30 min bei 65 °C inkubiert. 40 ml dieses Ansatzes wurden zum Gießen eines Gels verwendet, welches eine Stunde zum Erstarren bei RT belassen wurde. Danach erfolgte die Elektrophorese mit vorgekühltem 1x MOPS als Laufpuffer (siehe auch 2.7.13.2).

2.7.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen (Gelextraktion)

Wurden DNA-Moleküle nach ihrer Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese (2.7.6.1) weiter verwendet (z. B. nach einem präparativen Restriktionsverdau (2.7.4.1) oder einer PCR (2.7.3.1)), mussten die entsprechenden DNA-Moleküle aus dem Gel isoliert werden. Dazu wurde die jeweilige Bande des DNA-Moleküls mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Der Agarose-Block wurde im Anschluss entweder mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit oder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (jeweils von QIAGEN) nach den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet.

2.7.8 Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Zu 0,6 µg Plasmid-DNA wurden 2 µl 10 pmol/µl Sequenzierprimer (Tabelle 4) zugegeben und auf ein Gesamtvolumen von 7 µl mit bidest. H₂O aufgefüllt.

2.7.9 Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde

Die mit Digoxigenin markierte DNA wurde in den Hybridisierungsexperimenten (Southern Blot; 2.7.11) verwendet, um spezifisch DNA nachzuweisen. Die Markierung der Sonde erfolgte mit DIG-dUTP während einer PCR. Dafür wurde der PCR DIG Labeling Mix (Roche) benutzt. Es wurde laut Vorschrift des Herstellers verfahren. Im Anschluss wurde die DIG-markierte DNA-Sonde gereinigt (2.7.10).

2.7.10 Reinigung von DNA-/RNA-Sonden durch Präadsorption

Bevor die hergestellten DIG-markierten DNA-/RNA-Sonden in den Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden konnten, wurden diese gereinigt. Dadurch wurden unspezifische Hintergrundsignale bei der Detektion entfernt (Sprenger *et al.* 1995). Für die Präadsorption wurde das Protokoll von Homuth (Homuth *et al.* 1997) angewandt.

2.7.11 Southern Blot

Die Methode des Southern Blots wurde entwickelt, um ganz spezifisch DNA-Moleküle mit Hilfe von markierten DNA-Sonden nachzuweisen (Southern 1992). Man ging dabei wie folgt vor:

Es wurden 5 µg chromosomale DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym (Ansatz: 5 µl 10x Puffer, 5 µg DNA, 2 µl Enzym, ad 50 µl bidest. H₂O) bei 37 °C für 2 Stunden hydrolysiert. Nach dieser Zeit wurden noch einmal 2 µl Enzym zugefügt und es wurde für weitere 2 Stunden hydrolysiert. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt (unter Verwendung eines DIG-markierten Spp1-Längenstandards). Dann erfolgte der Transfer der DNA-Moleküle auf eine Nylonmembran (QiaBrane) nach der Methode des Vakuum Blotting mit der Vakuum-Blot-Anlage der Firma Pharmacia (VacuGene™ X1). Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und ein Vakuum von 50 mm Hg verwendet. Das Agarosegel wurde nacheinander mit den folgenden Lösungen für die angegebene Zeit überschichtet:

- 15 min Depurinierungslösung
- 15 min Denaturierungslösung
- 15 min Neutralisierungslösung
- 2 Stunden 20x SSC

Nach dem Transfer wurde die DNA durch Inkubation für 1 Stunde bei 120 °C auf der Nylonmembran fixiert. Es wurde wie unter 2.7.12 beschrieben weiter verfahren.

2.7.12 Hybridisierung und Nachweis DIG-markierter Nukleinsäure-Sonden durch Chemolumineszenz

Die Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-/RNA-Sonden erfolgte nach dem Protokoll von Homuth (Homuth *et al.* 1997): Die Membranen wurden zunächst bei 68 °C für 1 Stunde mit Prähybridisierungslösung vorinkubiert. Dann wurden die Membranen mit der gereinigten und denaturierten Sonde ÜN bei 68 °C inkubiert.

Der Nachweis der DIG-markierten DNA-/RNA-Sonden erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde ein Konjugat aus dem Fab-Fragment eines hochaffinen Anti-Digoxygenin-Antikörpers und dem Enzym Alkalische Phosphatase verwendet, um spezifisch an die DIG-markierte Sonde zu binden. Danach wurde das Substrat CDP-Star (Roche) zugegeben und von dem Enzym Alkalische Phosphatase unter Lichtemission umgesetzt. Die Chemolumineszenz wurde mit dem Imager LAS4000 (Fuji Film) detektiert.

Für die Detektion wurden die Herstellerangaben für CDP-Star sowie das Protokoll von Homuth (Homuth *et al.* 1997) befolgt.

2.7.13 RNA-Analytik

RNasen sind ubiquitär vorhanden und sehr stabil. Daher sind RNAs deutlich sensibler gegenüber Hydrolyse im Vergleich zu DNAs. Es ist deshalb zwingend notwendig, für Experimente mit RNA alle Geräte und Chemikalien entsprechend zu behandeln, um sie von potentiellen RNasen zu befreien. Das erreicht man z. B. durch die Verwendung von DEPC behandeltem bidest. H₂O, dem Zusatz von RNase-Inhibitoren und dem steten Tragen von Handschuhen.

Um die Gesamt-RNA des gewünschten *B. subtilis*-Stammes zu isolieren, wurden zunächst 50 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Übernachtskultur dieses Stammes auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln und ausreichender Luftzufuhr inkubiert. Je nach Experiment wurde die Kultur durch einen Induktor, z. B. IPTG, induziert. Bei einer OD₅₇₈ von etwa 1 (und in Abhängigkeit vom Experiment auch zu späteren Zeitpunkten) wurden 10 ml der Bakteriensuspension sofort nach Probenahme auf 5 ml gefrorenen zerstoßenen Killing-Puffer gegeben. Für die Präparation der Gesamt-RNA wurde weiter wie unter 2.7.1.3 beschrieben verfahren.

2.7.13.1 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde durchgeführt, um DIG-markierte ssRNA-Sonden für die Northern Blot Analyse zu erhalten. Dazu wurde eine DNA-Matrize benötigt, welche mittels PCR erhalten wurde. Dabei wurden die Primer entsprechend des jeweiligen Genes in

B. subtilis ausgewählt. Der 3' Primer enthielt zusätzlich noch die Sequenz für den Promotor der T7-RNA-Polymerase. Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt (2.7.5) und durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2.7.6.1) überprüft.

Zur Herstellung einer DIG-markierten ssRNA-Sonde mit Hilfe der DNA-Matrize (PCR-Produkt) wurde das DIG RNA Labeling Kit (Roche) benutzt. Es wurde laut Vorschrift des Herstellers verfahren. Im Anschluss wurde die DIG-markierte ssRNA-Sonde gereinigt (2.7.10).

2.7.13.2 Northern Blot

Mit der Northern Blot Analyse war es möglich, RNA-Moleküle ganz spezifisch mit Hilfe von markierten RNA-Sonden nachzuweisen. Dabei ging man wie folgt vor:

2 µg der isolierten Gesamt-RNA (gelöst in 5 µl DEPC-H₂O und mit 5 µl 2x RNA-Probenpuffer gemischt) wurden nach Auflösen der Sekundärstrukturen (10 min bei 65 °C) in einem 1,2%igen denaturierenden Agarosegel (2.7.6.2) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte nach einem 10-minütigen Vorlauf bei 100 V (ohne die RNA-Proben) bei RT und 80 V für zweimal 110 min, wobei nach den ersten 110 min der Laufpuffer gut gemischt, das Gel umgedreht, und auch die Polung an der Spannungsquelle vertauscht wurde. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel 5 min mit EtBr angefärbt (Entfärbung: 3x für 20 min in bidest. H₂O, danach noch einmal ÜN bei 4 °C in DEPC-H₂O) und dokumentiert. Im Anschluss wurden die RNAs auf eine positiv geladene Nylonmembran (Pall) übertragen. Es wurde die Methode des Vakuum Blotting mit der Vakuum-Blot-Anlage der Firma Pharmacia (VacuGene™ X1) angewandt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und ein Vakuum von 50 mm Hg verwendet. Das Agarosegel wurde nacheinander mit den folgenden Lösungen für die angegebene Zeit überschichtet:

5 min Denaturierungslösung

5 min Neutralisierungslösung

6 Stunden 20x SSC

Nach dem Blot wurde die RNA durch Inkubation für 1 Stunde bei 120 °C auf der Nylonmembran fixiert. Die Hybridisierung und der Nachweis DIG-markierter RNA-Sonden erfolgten wie unter 2.7.12 beschrieben analog zum Southern Blot.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Gewinnung und Aufreinigung verschiedener Fraktionen aus

B. subtilis

Um die verschiedenen Fraktionen (Gesamtzellextrakt, cytoplasmatische Fraktion, Membranfraktion) von *B. subtilis*-Zellen zu erhalten, wurde das Protokoll von Schöbel benutzt (Schöbel *et al.* 2004). Dafür wurden je 50 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum und ggf. mit einem Induktor) mit einer ÜN-Kultur auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,7 wurden die Zellen gegebenenfalls geschockt und noch eine Stunde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die gesamte Zellsuspension bei 8000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet mit 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen (Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für 10 min). Das erhaltene Pellet konnte nun bei -20 °C gelagert werden oder es wurde in 1 ml kalten Aufschlusspuffer mit Proteaseinhibitor (1 Tablette Proteaseinhibitor (Roche) auf 50 ml Aufschlusspuffer) resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden zum Schutz vor proteolytischem Abbau der Proteine auf Eis durchgeführt.

Es folgte der Zellaufschluss mit dem Branson Sonifier Cell Disruptor B15 (output ~ 3,5 / 6 x je 15 sec pro min pulsen / 50 % duty cycle). Von den aufgeschlossenen Zellen wurden 200 µl als Gesamtzellextrakt abgenommen und auf Eis gelagert. Die verbleibenden 800 µl Suspension wurden bei 5000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 600 µl ohne Reste von Zelltrümmern in ein 1,5 ml Microfuge® Tube, Polyallomer (Beckman Coulter GmbH) abgenommen und für die Ultrazentrifugation in der Optima™ TL (Beckman Coulter GmbH) Ultrazentrifuge (Rotor TLA45; 45000 rpm, 60 min, 4 °C) eingesetzt. Der erhaltene Überstand bildet die cytoplasmatische Fraktion, von welcher 400 µl abgenommen und auf Eis gelagert wurden. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Membranpellet wurde in 1 ml kalten Aufschlusspuffer mit Proteaseinhibitor gewaschen (Ultrazentrifugation: 45000 rpm, 30 min, 4 °C). Das gewonnene Pellet bildet die Membranfraktion.

Um die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen zu berechnen, wurde mit dem Gesamtzellextrakt sowie der cytoplasmatischen Fraktion der Bradford-Assay (2.8.4.1) durchgeführt. Von der Membranfraktion (in den 600 µl vor der Ultrazentrifugation) wurde die

gleiche Konzentration wie von der jeweils entsprechenden cytoplasmatischen Fraktion angenommen. Die Membranfraktion wurde in heißem 1x Lämmli-Puffer gelöst, so dass eine Protein-Endkonzentration von 10 µg/µl vorlag. Die Fraktion Gesamtzellextrakt sowie die cytoplasmatische Fraktion wurden jeweils so mit Lämmli-Puffer verdünnt, dass sich Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 1 µg/µl ergaben. Alle Fraktionen wurden vor der SDS-PAGE (2.8.2) für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert und nochmals für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Bei der folgenden SDS-PAGE (2.8.2) wurde das Gel in der Regel mit 10 µg Protein je Tasche beladen. Bei Beladung des Gels als Ladungskontrolle wurden nur 2 µg Protein verwendet.

2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Dafür wurden SDS-Polyacrylamidgele (Zusammensetzung: siehe Tabelle 9) verwendet. Die Elektrophorese wurde in der Mighty-Small-Elektrophorese-Einheit der Firma Pharmacia für 1 bis 2 Stunden bei 100-140 V durchgeführt (sobald die Proben in das Trenngel eintraten, konnte die Spannung auf 140 V erhöht werden). Für Gele zum Zwecke einer Western Blot Analyse wurden 5 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder als Molekulargewichtsstandard (Tabelle 8) aufgetragen. Die Elektrophorese war beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande die untere Gelkante erreicht hatte.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei einer SDS-PAGE

Die Chemikalie APS wurde erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben.

	4,5 % Sammelgel	10 % Trenngel	12 % Trenngel	15 % Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	2 ml	10 ml	12 ml	15 ml
Trenngel- (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8) bzw. Sammelgelpuffer (1 M Tris/HCl, pH 6,8)	1,625 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
bidest. H ₂ O	10,775 ml	12 ml	10 ml	7 ml
SDS 10 %	150 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
APS 10 %	75 µl	150 µl	150 µl	150 µl

2.8.3 Western Blot

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE (2.8.2) aufgetrennt (Laemmli 1970) und im Anschluss durch Elektroblothing vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Burnette 1981; Towbin *et al.* 1992). Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mittels „Semi-Dry-Blotting“ in der Bio-RAD Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell nach den Angaben des Herstellers. Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurde eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm; Carl Roth GmbH & Co. KG) verwendet.

2.8.3.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Nachweis von auf Nitrocellulosemembranen immobilisierten Proteinen (2.8.3) erfolgte ganz spezifisch durch Antikörper (Haas *et al.* 1986). Durch die Bindung eines sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörpers an den spezifischen Antigen-Antikörper-Komplex wurden die Proteine nachgewiesen. Dabei wurde ein zugegebenes Substrat durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzt und es kam zur Chemolumineszenz.

Die Durchführung des immunologischen Nachweises der Proteine erfolgte wie bei Homuth beschrieben (Homuth *et al.* 1996).

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgeführt.

Für die Nachweisreaktion durch die Meerrettich-Peroxidase wurde das SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate der Firma Pierce oder das ECL Advance Western Blotting Detection Kit der Firma GE Healthcare nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Chemolumineszenz wurde mit dem Imager LAS4000 (Fuji Film) detektiert.

2.8.4 Aktivitätstests

2.8.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford Assay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) verwendet.

2.8.4.2 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Um β -Galaktosidase-Aktivitäten zu messen, wurden von der entsprechenden Kultur 50 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD_{578} von 0,05 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase wurden 2 ml der Zellsuspension bei 12000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und die OD_{578} der Kultur zum Zeitpunkt der Probenahme bestimmt. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte dann wie bei Wiegert *et al.* beschrieben (Wiegert *et al.* 2001).

Das Prinzip der Aktivitätsmessung beruhte auf dem Zellaufschluss durch Lysozym und dem anschließenden Umsatz des farblosen Substratanalogons ONPG zu dem gelblichen ortho-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase. Dieser Umsatz wurde photometrisch bei 405 nm und 28 °C im VERSAmax™ (Molecular Devices, tunable microplate reader) verfolgt. Dabei wurde eine Einheit der β -Galaktosidase-Aktivität definiert als $\Delta E_{405} \cdot \text{min}^{-1} \cdot OD_{578}^{-1} \cdot 10^{-3}$ (Wiegert *et al.* 2001). ΔE_{405} bezeichnet die Änderung der Extinktion bei 405 nm. Die OD_{578} ist die optische Dichte der Kultur zum Zeitpunkt der Probenahme.

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde auch grob direkt auf der Agar-Platte bestimmt. Dazu wurde das LB-Medium mit dem Substratanalogon X-Gal versetzt und die Bakterienkultur ÜN auf dieser Platte inkubiert. Durch Auftreten von blauen Kolonien wurde die β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen. Die Methode beruhte auf der Umsetzung des farblosen X-Gal zu dem blauen 5-Brom-4-chlor-indigo durch die β -Galaktosidase.

2.9 Konstruktion von Plasmiden

Die DNA-Fragmente, die in ein Plasmid kloniert werden sollten, wurden zunächst mittels PCR (Kapitel 2.7.3; die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt) amplifiziert, durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.7.6.1) überprüft und anschließend aufgereinigt (Kapitel 2.7.5). Es folgte ein präparativer Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Kapitel 2.7.4.1) und eine erneute Aufreinigung sowie gegebenenfalls eine präparative Agarose-Gelelektrophorese.

Das Plasmid, in welches das DNA-Fragment kloniert werden sollte, wurde durch eine Midi-Präparation aus *E. coli* isoliert (Kapitel 2.7.1.2.2) und durch geeignete Restriktionsenzyme mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf seine Richtigkeit überprüft. Danach erfolgte auch für das Plasmid ein präparativer Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen sowie eine Aufreinigung.

Anschließend wurden der geschnittene Vektor und das Insert, wie unter Kapitel 2.7.4.2 beschrieben, ligiert und in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.6.4.1). Zur Selektion konnten die erhaltenen Transformanten zusätzlich auf LB-Selektiv-Platten überpickt werden. Um die konstruierten Plasmide auf ihre Richtigkeit zu kontrollieren, folgte von einigen Transformanten entweder eine Mini-Plasmid-Präparation (Kapitel 2.7.1.2.1) mit anschließendem Restriktionsverdau oder alternativ eine Kolonie-PCR und jeweils eine Agarose-Gelelektrophorese. Von ein bis zwei Klonen mit richtigem Plasmid wurde dieses im Midi-Maßstab isoliert. Um zu gewährleisten, dass ein richtig konstruiertes Plasmid isoliert wurde, verdaute man dieses noch einmal mit mehreren verschiedenen Restriktionsenzymen mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Die konstruierten Plasmide konnten zusätzlich durch eine Sequenzierung (Kapitel 2.7.8) überprüft werden.

In folgender Tabelle 10 sind die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide zusammengefasst.

Tabelle 10: Konstruktion der Plasmide

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Es sind auch die verwendeten Ausgangsplasmide und die Enzyme, mit denen diese verdaut wurden, angegeben. Außerdem sind die für die Konstruktion des Inserts nötigen Primer sowie die Restriktionsenzyme, mit denen das PCR-Produkt geschnitten wurde, aufgelistet. Nachdem Insert und Vektor präparativ verdaut wurden, folgten eine Ligation und die Transformation in *E. coli*. Die Zellen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert. Es wurde auch jeweils eine Negativkontrolle, bei welcher nur der geschnittene Vektor ohne Insert zur Ligation benutzt und danach transformiert wurde, durchgeführt.

konstruiertes Plasmid	Ausgangsplasmid	Restriktionsenzyme für Hydrolyse des Ausgangsplasmids	Primer für PCR-Amplifikation des Inserts	Restriktionsenzyme für Hydrolyse des Inserts
pHT <i>gfp-rsiX</i>	pHT <i>gfp</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Sma</i> I	rsiX5' FLAG / rsiX 3' <i>Sma</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Sma</i> I
pBR <i>gfp-bleo-rsiX</i>	pBR <i>gfp-bleo</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX5' FLAG / rsiX3' FLAG	<i>Bam</i> HI / <i>Pae</i> I
pBR <i>sigXrsiX::spec</i>	pBR322 <i>rsiX::spec</i>	<i>Eco</i> RI / <i>Eco</i> 8II	sigX5K- <i>Eco</i> RI / sigX3K- <i>Eco</i> 8II	<i>Eco</i> RI / <i>Eco</i> 8II
pALF <i>sigX-rsiX</i>	pAL-FLAG <i>rsiW</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Pae</i> I	sigX5' - <i>Bam</i> HI / sigX3' - <i>Pae</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pae</i> I
pALF <i>sigX_stop-rsiX</i>	pAL-FLAG <i>rsiW</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Pae</i> I	sigX5' - <i>Bam</i> HI - Stop / sigX3' - <i>Pae</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i>	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX 5' <i>Bgl</i> III / rsiX3' FLAG	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ71-368	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX 5' <i>Bgl</i> III / rsiX70_3	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ146-368	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX 5' <i>Bgl</i> III / rsiX 145	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-21	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX-C1 / rsiX3' FLAG	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-43	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX-C2 / rsiX3' FLAG	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-70	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX 5' Δ70 <i>Bgl</i> III / rsiX3' FLAG	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ1-99	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX 5' Δ99 <i>Bgl</i> III / rsiX3' FLAG	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I
pBR <i>gfp_Stop-rsiX</i>	pBR <i>gfp_amyE</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I	rsiX 5' <i>Bgl</i> III Stop / rsiX3' FLAG	<i>Bgl</i> III / <i>Pae</i> I

2.10 Konstruktion von *B. subtilis* Stämmen

Die konstruierten *B. subtilis* Stämme wurden durch Transformation von Plasmid- oder chromosomaler DNA in kompetente Zellen, wie unter Kapitel 2.6.4.2 beschrieben, erhalten. Die Stämme wurden im Anschluss durch Überpicken von Transformanten auf Platten mit Selektivmedium überprüft. Des Weiteren wurde auch eine geeignete PCR (Kapitel 2.7.3) als Prüfung der Richtigkeit durchgeführt. Wurden Knockout-Stämme konstruiert, ist zudem eine Southern Blot Analyse (Kapitel 2.7.11) durchgeführt wurden.

Von allen konstruierten Stämmen wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt.

In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit konstruierten *B. subtilis* Stämme mit dem jeweiligen Ursprungsstamm sowie der transformierten DNA zusammengefasst.

Tabelle 11: Konstruktion von *B. subtilis* Stämmen

Angegeben sind jeweils der Name des konstruierten Stammes, der Ausgangsstamm sowie die in ihn transformierte Plasmid-DNA bzw. die transformierte chromosomale DNA.

konstruierter <i>B. subtilis</i> Stamm	<i>B. subtilis</i> Ausgangsstamm	transformierte Plasmid- bzw. chromosomale DNA
KS82	1012	pHT <i>gfp-rsiX</i>
KS83	KS82	<i>rasP::tet</i>
KS94	KS82	<i>prsW::bleo</i>
KS115	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-bleo-rsiX</i>
KS119	KS115	pIC333
KS123	KS115	KS119
KS123a	KS4	KS119
KS149	1012 <i>lacA::spec</i>	pALF <i>sigX-rsiX</i>
KS155	KS149	<i>rho::bleo</i>
1012 <i>sigXrsiX::spec</i>	1012	pBR <i>sigXrsiX::spec</i>
KS162	KS149	<i>sigXrsiX::spec</i>
KS166	KS155	<i>sigXrsiX::spec</i>
KS148	1012 <i>lacA::spec</i>	pALF <i>sigX_stop-rsiX</i>
KS154	KS148	<i>rho::bleo</i>
KS161	KS148	<i>sigXrsiX::spec</i>
KS165	KS154	<i>sigXrsiX::spec</i>
1012 Δ <i>rasP</i> Δ <i>rho</i>	1012 <i>rho::bleo</i>	<i>rasP::tet</i>
1012- <i>gfp</i> Δ <i>rho</i>	1012- <i>gfp</i>	<i>rho::bleo</i>

konstruierter <i>B. subtilis</i> Stamm	<i>B. subtilis</i> Ausgangsstamm	transformierte Plasmid- bzw. chromosomale DNA
1012- <i>gfp</i> Δ <i>rasP</i>	1012- <i>gfp</i>	<i>rasP::tet</i>
1012- <i>gfp</i> Δ <i>rasP</i> Δ <i>rho</i>	1012- <i>gfp</i> Δ <i>rho</i>	<i>rasP::tet</i>
KS187	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i>
KS188	KS187	<i>rasP::tet</i>
KS189	KS187	<i>rho::bleo</i>
KS190	KS187	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS191	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ 71-368
KS192	KS191	<i>rasP::tet</i>
KS193	KS191	<i>rho::bleo</i>
KS194	KS191	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS195	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ 146-368
KS196	KS195	<i>rasP::tet</i>
KS197	KS195	<i>rho::bleo</i>
KS198	KS195	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS201	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ 1-21
KS203	KS201	<i>rho::bleo</i>
KS231	KS201	<i>rasP::tet</i>
KS232	KS201	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS202	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ 1-43
KS204	KS202	<i>rho::bleo</i>
KS233	KS202	<i>rasP::tet</i>
KS234	KS202	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS207	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ 1-70
KS209	KS207	<i>rho::bleo</i>
KS227	KS207	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS228	KS207	<i>rasP::tet</i>
KS208	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp-rsiX</i> Δ 1-99
KS210	KS208	<i>rho::bleo</i>
KS229	KS208	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS230	KS208	<i>rasP::tet</i>
KS235	1012 <i>gfp</i> -RBS_ <i>rsiX</i>	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS236	1012 <i>gfp</i> -RBSmut_ <i>rsiX</i>	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS157	1012- <i>gfp</i>	pBR <i>gfp_Stop-rsiX</i>
KS172	KS157	<i>rho::bleo</i>
KS173	KS157	<i>rasP::tet</i>
KS174	KS157	<i>rho::bleo rasP::tet</i>
KS242	KS245	<i>rasP::tet</i>

konstruierter <i>B. subtilis</i> Stamm	<i>B. subtilis</i> Ausgangsstamm	transformierte Plasmid- bzw. chromosomale DNA
KS249	KS245	<i>clpX::cat</i>
KS253	KS245	<i>prsW::bleo</i>
KS257	KS245	WB800
KS243	KS246	<i>rasP::tet</i>
KS250	KS246	<i>clpX::cat</i>
KS254	KS246	<i>prsW::bleo</i>
KS258	KS246	WB800
KS267	3610 <i>rho::bleo</i>	<i>amyE::P_{hyspank}-lytF</i>

3 Ergebnisse

3.1 Das *sigX-rsiX*-Operon

Das Gen des ECF-Sigmafaktors σ^X , *sigX*, befindet sich zusammen mit dem Gen des entsprechenden Anti-Sigmafaktors RsiX, *rsiX*, in einem bicistronischen Operon (Huang *et al.* 1997; Brutsche & Braun 1997). Dabei kommt es zur Überlappung des 3'-Endes von *sigX* mit dem 5'-Ende von *rsiX*. Dieser Bereich hat eine Größe von 62 bp. Abbildung 3 zeigt schematisch die Situation im *B. subtilis* Chromosom.

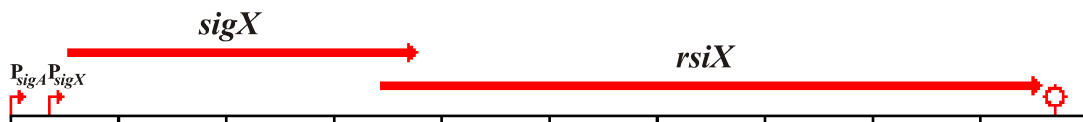


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *sigX-rsiX*-Operons aus *B. subtilis*. Es handelt sich hierbei um ein bicistronisches Operon, in dem beide Gene von zwei möglichen Promotoren aus exprimiert werden können ($\uparrow P_{sigA}$, P_{sigX}). Am Ende des Operons befindet sich ein intrinsischer Transkriptionsterminator (\odot). Nach: <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/> und Helmann (2002).

3.2 RsiX fungiert als negativer Regulator von SigX

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass RsiX als negativer Regulator von σ^X fungiert (Brutsche & Braun 1997). Um dies durch Messungen der β -Galaktosidase-Aktivität darzustellen, wurden geeignete Reporterstämme benötigt. Es wurde das gleiche Reportersystem verwendet, welches bereits während einer Diplomarbeit (Schäfer 2007) zur Anwendung kam.

Dieses System beinhaltet eine *dltA-lacZ*-Fusion (Abbildung 4, oben). Der ECF-Sigmafaktor σ^X kontrolliert die Transkription des *dlt*-Operons (Cao & Helmann 2004), daher erfolgt auch die Expression des *lacZ*-Gens, welches für die β -Galaktosidase kodiert, sobald die Transkription durch σ^X initiiert wird. Daneben ist eine Deletion des Anti-Sigmafaktor kodierenden Gens *rsiX* erforderlich (Abbildung 4, Mitte), so dass man unterschiedliche β -Galaktosidase-Aktivitäten, in Abhängigkeit des Vorhandenseins der Deletion von *rsiX*, erwarten kann. Weiter war es nötig, eine regulierte Expression von *rsiX* zu ermöglichen. Dazu wurde eine Transkriptionsfusion aus dem IPTG-regulierbaren Promotor P_{spac} und *rsiX*

konstruiert (Abbildung 4, unten), so dass eine gezielte Expression von *rsiX* realisierbar sein sollte.

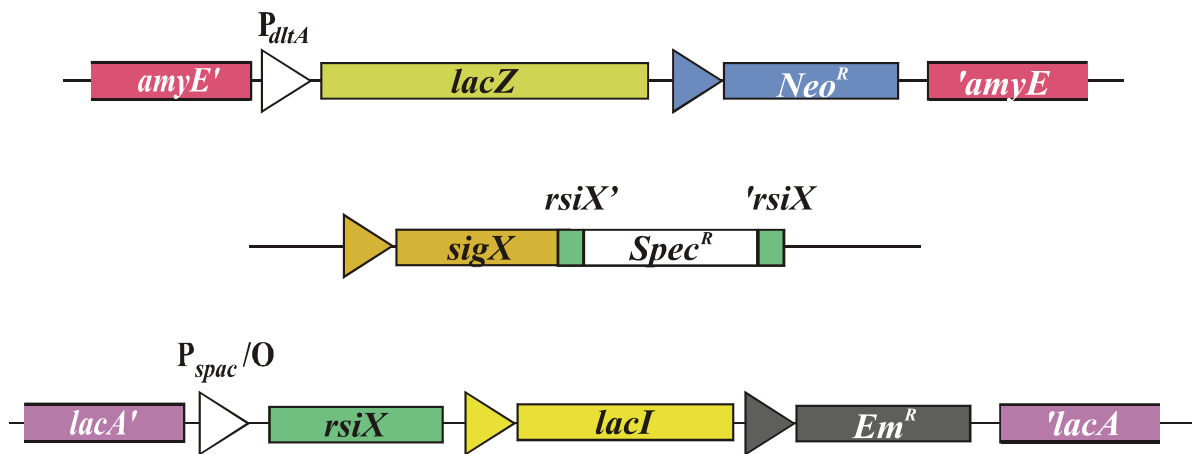


Abbildung 4: Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation im verwendeten Reportersystem zum Nachweis, dass RsiX als negativer Regulator von σ^X auftritt. Im *amyE*-Locus befindet sich die Transkriptionsfusion aus dem σ^X -kontrollierten *dltA*-Promotor und *lacZ* (oben). *rsiX* ist durch eine *spec*-Kassette deletiert (Mitte). Im *lacA*-Locus befindet sich das Gen *rsiX*, welches unter der Kontrolle des IPTG-regulierbaren Promotors P_{spac} steht (unten).

Mit diesem Reportersystem wurden nun Messungen der β -Galaktosidase-Aktivitäten vorgenommen. Zuerst wurden dabei die Stämme KS4 (*rsiX* wt; vgl. Abbildung 5, Mitte) und KS18 (Δ *rsiX*; vgl. Abbildung 5, unten) betrachtet.

Aufgrund der Deletion von *rsiX* wurde erwartet, dass die β -Galaktosidase-Aktivität für den Stamm KS18 (Δ *rsiX*) deutlich höher ausfällt. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 5 aufgezeigt. Wie zu erwarten, wurde für den wildtypischen Hintergrund eine sehr geringe β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Im Gegensatz dazu steht das etwa 10fach höhere Messergebnis für den Stamm mit dem Knockout von *rsiX*, welches so erwartet wurde. Aufgrund der *rsiX*-Deletion liegt der Sigmafaktor σ^X in freier ungebundener Form vor und kann die Transkription der *dltA-lacZ*-Fusion einleiten. Dieses resultiert in einer hohen β -Galaktosidase-Aktivität. Es konnte mit diesem Reportersystem das Ergebnis von Brutsche und Braun (Brutsche & Braun 1997) bestätigt werden. RsiX tritt als Anti-Sigmafaktor von σ^X auf.

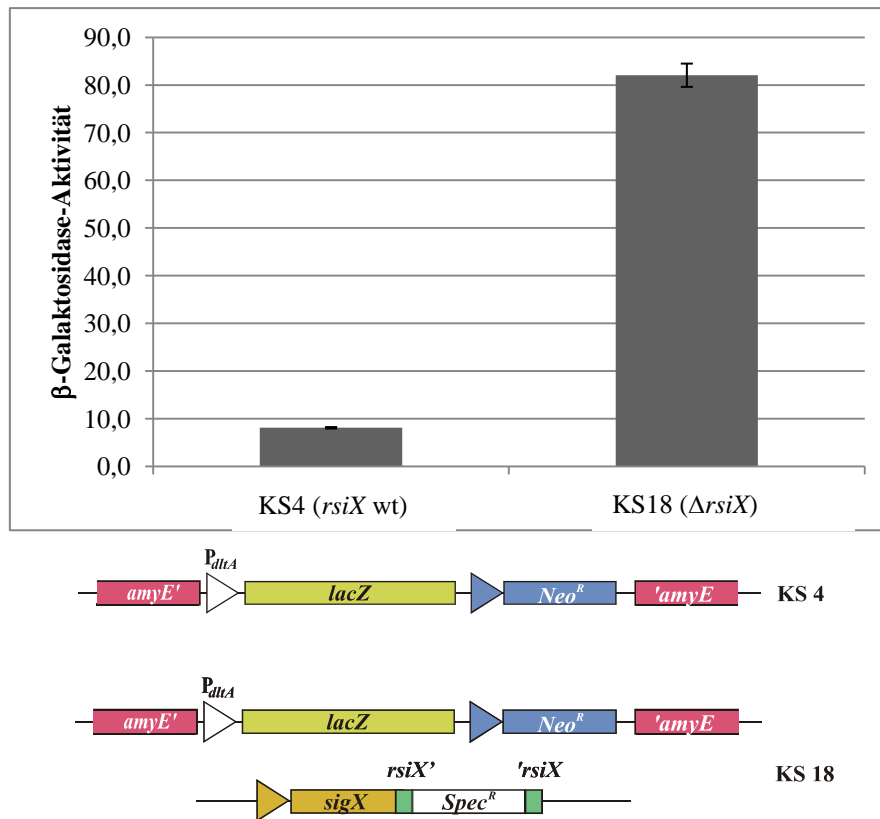


Abbildung 5: Ergebnis des β -Galaktosidase-Aktivitätstests für die Stämme *B. subtilis* KS4 (*rsiX* wt) und KS18 (Δ *rsiX*). Die Probenahme für die Messung der Aktivitäten erfolgte beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase. Die Aktivitäten beziehen sich jeweils auf 1 OD₅₇₈ zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie bei Wiegert *et al.* (2001) beschrieben. Die Fehlerbalken geben die berechneten Werte der Standardabweichung an (oben). **Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in den Stämmen *B. subtilis* KS4 (Mitte) und *B. subtilis* KS18 (unten).**

In den folgenden β -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen wurde der Einfluss der IPTG-regulierbaren Transkriptionsfusion von *rsiX* (vgl. Abbildung 4, unten) in dem beschriebenen Reportersystem näher betrachtet. Durch Zugabe von IPTG sollte der Knockout von *rsiX* komplementiert werden. Es wurde erwartet, dass nach IPTG-Zugabe die β -Galaktosidase-Aktivität im Gegensatz zur Kultur ohne IPTG ähnlich niedrig ausfällt wie im wildtypischen Hintergrund. Entsprechend sollte die Enzymaktivität der Kultur ohne IPTG analog wie für die *rsiX*-Deletion relativ hoch ausfallen. Für die Aktivitätsmessungen wurden die Stämme KS11 (*rsiX* Δ 71-368) und KS12 (Vollängen *rsiX*) betrachtet. Bei dem Stamm KS11 handelt es sich um ein artifizielles Konstrukt, bei dem der Teil des *rsiX*-Genes deletiert wurde, welcher für die extracytoplasmatische Region kodiert. Es werden nur die Aminosäuren 1 bis 70 exprimiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Freisetzung des Sigmafaktors σ^W durch proteolytischen Abbau des Anti-Sigmafaktors RsiW erfolgt (Heinrich *et al.* 2009). Dabei entsteht eine intermediäre Form des Anti-Sigmafaktors, bei welcher RsiW keine

extracytoplasmatische Domäne mehr besitzt. Die hier verwendete verkürzte Form des *rsiX* wurde in Anlehnung an die intermediäre Form des RsiW gewählt, um mögliche Rückschlüsse auf einen ähnlichen proteolytischen Abbau von RsiX zu ziehen.

Das Ergebnis für die Messungen dieser β -Galaktosidase-Aktivitäten ist in Abbildung 6 dargestellt. Wie bereits oben erwähnt, wurden unterschiedliche Aktivitäten in Abhängigkeit

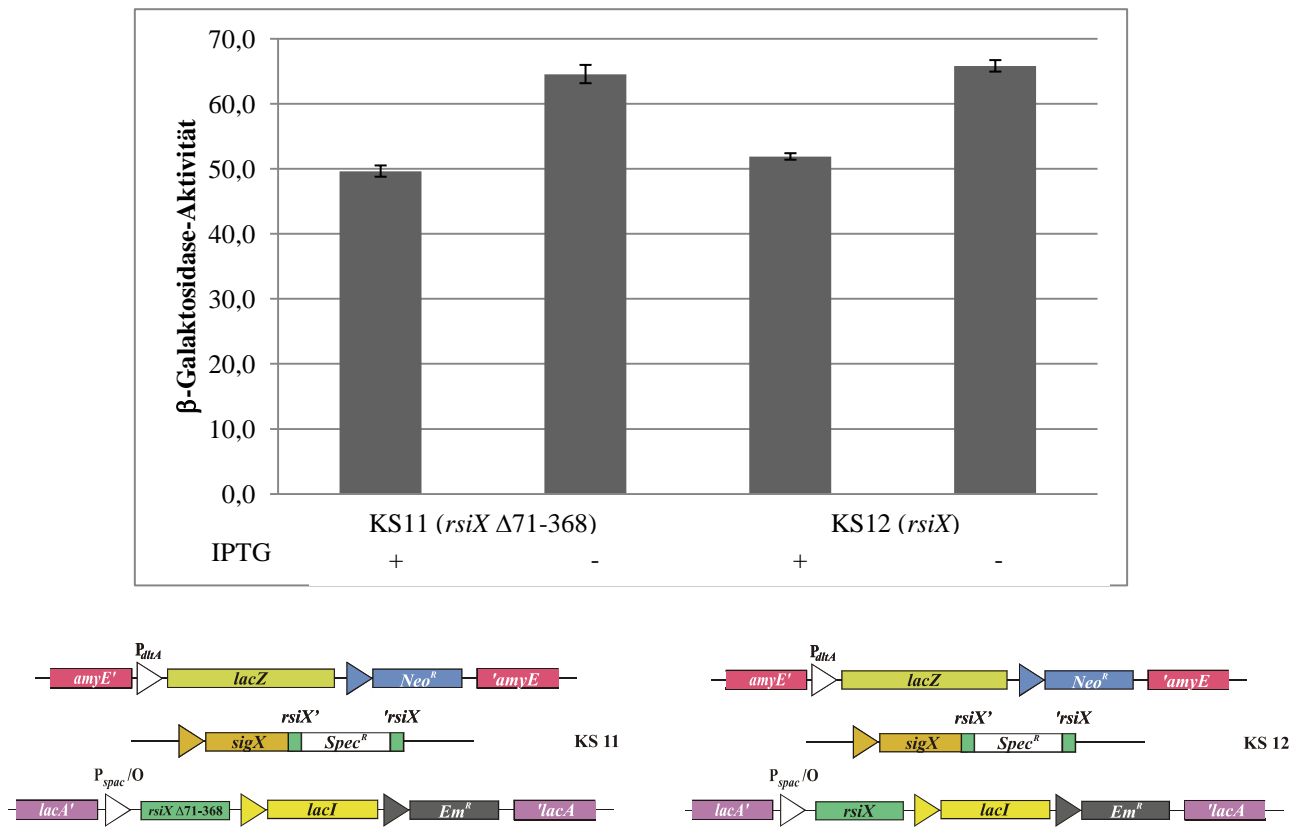


Abbildung 6: Ergebnis des β -Galaktosidase-Aktivitätstests für die Stämme *B. subtilis* KS11 (*rsiX* Δ 71-368) und *B. subtilis* KS12 (Vollängen *rsiX*) nach Inkubation bei 37 °C mit (+ IPTG; Endkonzentration: 1 mM) bzw. ohne IPTG (- IPTG). Die Probenahme für die Messung der Aktivitäten erfolgte beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase. Die Aktivitäten beziehen sich jeweils auf 1 OD₅₇₈ zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie bei Wiegert *et al.* (2001) beschrieben. Die Fehlerbalken geben die berechneten Werte der Standardabweichung an (oben). Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in den Stämmen *B. subtilis* KS11 (unten links) und *B. subtilis* KS12 (unten rechts).

des Vorhandenseins von IPTG erwartet. Aber wie in Abbildung 6 zu erkennen, gibt es nur geringe Unterschiede bei den Aktivitätsmessungen nach Inkubation mit bzw. ohne IPTG. Ferner sind keine Unterschiede zwischen dem Vollängen *rsiX* und seiner verkürzten Form feststellbar. Alle Messwerte liegen etwa in der Größenordnung für die Deletion von *rsiX* (vgl. Abbildung 5). Der *rsiX*-Knockout ist in diesen Reporterstämmen also nicht vollständig

komplementierbar, sodass die β -Galaktosidase-Aktivitäten der Reporterstämme nach IPTG-Zugabe nur wenig abnehmen.

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte keine Erklärung gefunden werden, warum der Knockout des *rsiX*-Gens in den Stämmen KS11 (*rsiX* Δ 71-368) und KS12 (Volllänge *rsiX*) nicht vollständig komplementierbar ist.

3.3 Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX

Damit die Rolle des Anti-Sigmafaktors RsiX bei der Aktivierung des Sigmafaktors σ^X näher untersucht werden konnte, wurden in einem nächsten Schritt Untersuchungen zur zellulären Konzentration von RsiX vorgenommen. Dafür wurde eine Reporterfusion aus dem Protein GFP und RsiX konstruiert. GFP fand bereits erfolgreich als Fluoreszenz-tag zur Analyse der Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiW Anwendung (Heinrich & Wiegert 2006). In dieser Arbeit wurde GFP als N-terminaler tag an RsiX angefügt (Abbildung 8, links). Man erwartete, dass die Zellen der entsprechenden *B. subtilis* Stämme bei Vorhandensein einer

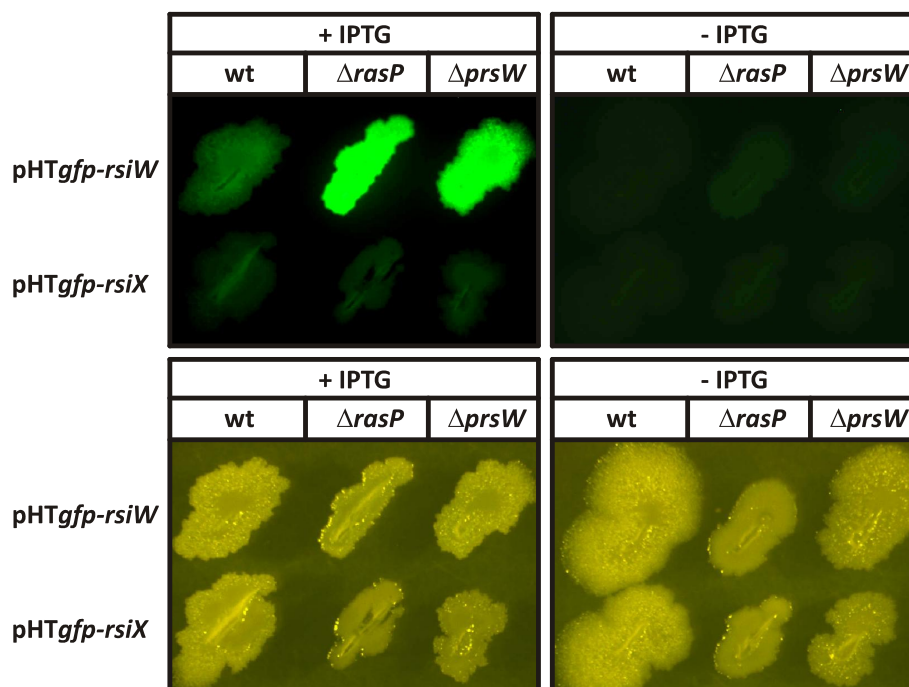


Abbildung 7: Fotografien von *B. subtilis* Kolonien, welche GFP-RsiW (jeweils oberer Teil des Bildes) bzw. GFP-RsiX (jeweils unterer Teil des Bildes) nach IPTG-Zugabe (Endkonzentration: 1 mM; linker Teil der Abbildung) exprimieren. Die Reporterfusion ist auf dem Plasmid pHTgfp-*rsiW* bzw. pHTgfp-*rsiX* kodiert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte im Wildtyphintergrund (wt), *rasP*- (Δ *rasP*) und *prsW*- (Δ *prsW*) Knockout. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Kolonien ohne IPTG-Zugabe. Dargestellt sind die Kolonien unter normalem weißem Licht (unterer Teil der Abbildung) und bei Anregung der GFP-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 480 nm (oberer Teil der Abbildung). Es wurden gleiche Auflösungen und Vergrößerungen verwendet.

großen Menge der GFP-Fusion eine deutliche Fluoreszenz aufzeigen. Ist die zelluläre Konzentration der GFP-Fusion gering, sollten die jeweiligen Stämme keine Fluoreszenz aufweisen. Als Referenz wurden GFP-RsiW-Fusionen in verschiedenen genetischen Hintergründen in *B. subtilis* verwendet (Heinrich & Wiegert 2006).

Für diese Untersuchungen wurde der Stamm *B. subtilis* 1012 pHT*gfp-rsiX* zum einen im wildtypischen Hintergrund und zum anderen im Δ *rasP*- bzw. Δ *prsW*-Hintergrund betrachtet. Dieser Stamm enthält das autonom replizierende Plasmid pHT*gfp-rsiX*, welches den IPTG-induzierbaren Promotor P_{grac} besitzt. Dadurch war eine gezielte Überexpression der GFP-RsiX-Fusion möglich. Die verschiedenen genetischen Hintergründe wurden gewählt, weil bereits eine Beteiligung der Site-1 Protease PrsW und der Site-2 Protease RasP an der Proteolyse des Anti-Sigmafaktors RsiW nachgewiesen werden konnte (Schöbel *et al.* 2004; Heinrich & Wiegert 2006). Dadurch sollten auch Aussagen über die Beteiligung dieser beiden Proteasen an einer möglichen Proteolyse von RsiX getroffen werden.

In Abbildung 7 sind Bilder von Kolonien der verwendeten *B. subtilis* Stämme bei Betrachtung mit dem GFP-Scope dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei keinem Stamm, der die GFP-RsiX-Fusion nach IPTG-Zugabe exprimieren sollte, eine eindeutige Fluoreszenz der Kolonien auftritt. Zum Vergleich stellt man eine intensive Fluoreszenz bei der Referenzfusion GFP-RsiW im Δ *rasP*- und Δ *prsW*-Hintergrund fest. Die Akkumulation von GFP-RsiW in den Deletionsstämmen resultiert in dieser sehr großen Fluoreszenz im Unterschied zum Wildtyphintergrund, hervorgerufen durch eine Beteiligung dieser Proteasen an der RsiW-Proteolyse (Schöbel *et al.* 2004; Heinrich & Wiegert 2006).

Die geringe Konzentration von GFP-RsiX in der Zelle könnte ein Hinweis auf eine mögliche Prozessierung von RsiX durch Proteasen sein. Allerdings scheint RsiX anders als RsiW nicht unter Beteiligung von PrsW und RasP prozessiert zu werden. Daher wurde zusätzlich eine Western Blot Analyse durchgeführt, um die Menge von GFP-RsiX in der Zelle zu beurteilen. Dafür wurde der *B. subtilis* Stamm 1012 *gfp-rsiX* im wildtypischen Hintergrund (KS41) und im *rasP*-Knockout (KS42) betrachtet.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Western Blot Analyse. Im Luminogramm sind keine signifikanten Signale für das Fusionsprotein erkennbar. GFP-RsiX hat eine Größe von 68 kDa. Aber weder für den Wildtyphintergrund (Spur 1) noch für den *rasP*-Knockout (Spur 2) konnten eindeutige Signale detektiert werden. Lediglich die Ladungskontrolle lieferte klare Signale bei 70 kDa für die Metalloprotease FtsH, was so zu erwarten war.

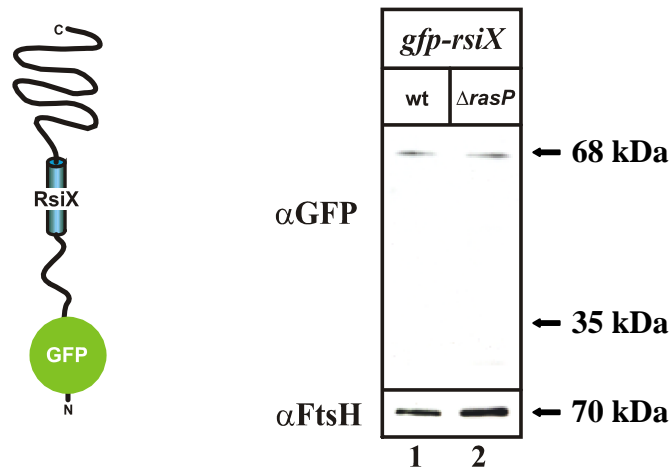


Abbildung 8: Links: Schematische Darstellung der GFP-RsiX-Fusion. Das Reporterprotein GFP wurde als N-terminaler Fluoreszenz-tag an RsiX angefügt. **Rechts: Luminogramm der Western Blot Analyse des Stammes *B. subtilis* 1012 *gfp-rsiX* im Wildtyphintergrund (wt; KS41) und *rasP*-Knockout ($\Delta rasP$; KS42) zur Untersuchung der Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX.** Die Proteine der Membranfraktionen (10 μg /Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis der GFP-RsiX-Fusion erfolgte mit Antikörpern gegen GFP. Mit der Ladungskontrolle (2 μg /Spur) wurde in gleicher Art verfahren, aber die Entwicklung des Blots erfolgte mit Antikörpern gegen die membrangebundene Protease FtsH.

Es scheint, als ob RsiX ein sehr instabiles Protein ist, welches auf eine andere Weise prozessiert wird als RsiW. Auch Deletionen anderer Proteine wie z. B. EcsA (ein ABC Transporter), YhfC (ein Membranprotein), HtrA und HtrB (Serinproteasen), ClpP (proteolytische Untereinheit der Clp-Protease), FtsH (eine Zinkprotease) sowie ein achtfacher Knockout verschiedener Proteasen (*B. subtilis* WB800N (Nguyen 2006)) hatten keinen Einfluss auf die detektierbare Menge an RsiX (Daten nicht gezeigt). Ebenso verhielt es sich mit dem Nachweis von RsiX als Fusion mit dem Epitop-tag FLAG (Schäfer 2007). Dabei spielte es auch keine Rolle, ob die RsiX-Fusion auf einem autonom replizierenden Plasmid wie z. B. pHT*gfp-rsiX* kodiert ist oder ob das Plasmid (z. B. pDG*gfp-rsiX*) ins Chromosom von *B. subtilis* integrierte. Hinsichtlich der Menge von RsiX in der Zelle kann somit lediglich festgestellt werden, dass RsiX nur in geringer zellulärer Konzentration vorliegt, da der Anti-Sigmafaktor durch die oben erwähnten Methoden nicht nachweisbar war.

3.4 Screening nach Genen mit Einfluss auf die zelluläre Konzentration von RsiX

3.4.1 Transposonmutagenese mit dem Plasmid pIC333

Abbildung 7 und Abbildung 8 (rechts) zeigen, dass die Reporterfusion GFP-RsiX in *B. subtilis* im Wildtyphintergrund in so geringen Mengen vorkommen muss, dass sie weder nach Anregung mit blauem Licht noch immunologisch nachweisbar waren. Es wurde deshalb hier ein Verfahren angewandt, um nach Genen zu screenen, welche einen Einfluss auf RsiX haben. Dabei handelt es sich um die Methode der Transposonmutagenese mit dem Plasmid pIC333 (Steinmetz & Richter 1994). Das Ziel dieser Methode war es, Gene durch Integration eines Transposons zu deletieren, um dadurch den Anti-Sigmafaktor und damit auch die Reporterfusion zu stabilisieren.

Der verwendete Reporterstamm KS115 exprimiert eine GFP-BRP-RsiX-Fusion (Abbildung 9). Bei BRP handelt es sich um ein Bleomycin-Resistenz-Protein, welches das Antibiotikum Bleomycin bindet und somit DNA-Strangbrüche verhindert, was in der Resistenz gegenüber dem Antibiotikum resultiert. Es wurde die Reporterfusion mit BRP benutzt, da man so in der



Abbildung 9: Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation im verwendeten Reporterstamm KS115 mit welchem die Transposonmutagenese durchgeführt wurde. Im *amyE*-Locus befindet sich die Translationsfusion aus *gfp*, *bleo* (kodiert BRP - Bleomycin-Resistenz-Protein) und *rsiX* sowie eine *cat^R*-Kassette.

Lage war, zuerst die *B. subtilis* Kolonien durch Bleomycin-Resistenz zu selektionieren und dann nach intensiver Fluoreszenz zu screenen. Dies birgt einen erheblichen Vorteil gegenüber der zuvor für die Transposonmutagenese verwendeten Reporterfusion GFP-RsiX, mit welcher auch nach wiederholter Durchführung der Mutagenese kein Ergebnis erzielt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Funktionalität des GFP-BRP-Reporters wurde zuvor als Fusion mit einem proteolytischen *tag* (*SsrA-tag*) überprüft. Im Wildtyphintergrund wurde die GFP-BRP-SsrA-Fusion abgebaut, was in Bleomycin-sensitiven, nicht fluoreszierenden Kolonien resultierte. Zellmeier *et al.* verwendeten den *SsrA-tag* bereits und konnten den *tag* als Substrat für die cytoplasmatische

Protease ClpP identifizieren (Zellmeier *et al.* 2006). Bei Expression dieser Fusion im $\Delta clpP$ -Hintergrund waren demnach die Kolonien Bleomycin-resistent und zeigten eine intensive Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

Ein stabiler GFP-BRP-RsiX-Reporter sollte an einer intensiven Fluoreszenz der entsprechenden *B. subtilis* Kolonien, ähnlich wie bei GFP-RsiW im $\Delta rasP$ - und $\Delta prsW$ -Hintergrund in Abbildung 7, erkennbar sein. Durch Analysen des Integrationsortes des verwendeten Transposons können dann die Proteine identifiziert werden, welche die zelluläre Konzentration von RsiX beeinflussen.

Das für die Mutagenese verwendete Plasmid pIC333 (Abbildung 10; insgesamt ca. 7 kb) kodiert das Transposon mini-Tn10, welches eine *spec*^r-Kassette sowie den *ori* pUC für die Replikation in *E. coli* besitzt.

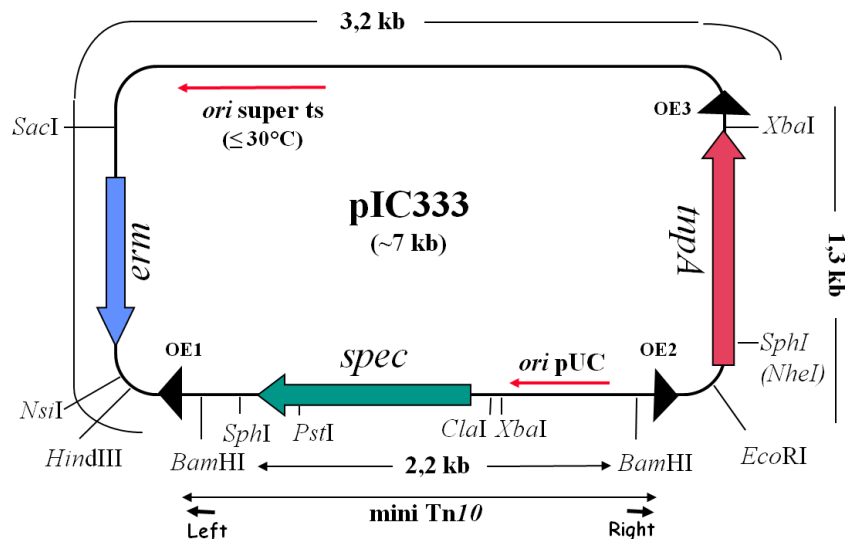


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Plasmides pIC333. In dem Plasmid sind enthalten eine *em*^r-Kassette, das Gen *tnpA* (kodiert für die Transposase), ein *ori* super ts für die temperaturabhängige Replikation in *B. subtilis* und das Transposon mini-Tn10, welches wiederum eine *spec*^r-Kassette sowie den *ori* pUC für die Replikation in *E. coli* besitzt. Der rechte (right) bzw. linke (left) Primer kann zur Sequenzierung der umgebenden Genregion nach erfolgter Integration ins *B. subtilis* Chromosom benutzt werden. Von Stephane Aymerich, nach Steinmetz & Richter (1994).

Nach erfolgreicher Transformation des Plasmides pIC333 in den Reporterstamm KS115 wurde mit dem dabei erhaltenen Stamm *B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* pIC333 (KS 119) die Mutagenese, wie bei Heinrich und Wiegert beschrieben, durchgeführt (Heinrich & Wiegert 2006). Nach erfolgtem Temperatur-*shift* auf 37 °C für 5 Stunden wurde die gesamte Kultur abzentrifugiert, in 1,3 ml LB-Medium resuspendiert und als Glycerin-Dauerkultur aufbewahrt. Diese Glycerin-Dauerkultur wurde anschließend verwendet, um die Transpositionsrate zu bestimmen. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser Kultur von

10^{-3} - 10^{-7} angefertigt und je 100 μl davon auf LB und $\text{LB}^{\text{Spec100}}$ ausplattiert. Es folgte eine Auszählung aller gewachsenen Kolonien. Die Transpositionsrate ist definiert als das Verhältnis der cfu auf $\text{LB}^{\text{Spec100}}$ zu den cfu auf LB, d. h. es wird der relative Anteil transfizierter Zellen zur Anzahl ausplattierter Zellen bestimmt. Auf diese Weise wurde eine Transpositionsrate von 1,70 % berechnet. Damit liegt die Rate über dem erwarteten Wert, welcher mit 0,1 % – 1 % von Maguin angegeben wurde (Maguin *et al.* 1992). Es wurde dennoch diese Kultur verwendet, um nach stark fluoreszierenden Kolonien zu screenen.

3.4.2 Screening nach fluoreszierenden Klonen

Für den folgenden Screen nach fluoreszierenden Kolonien wurden 100 μl einer 100fachen Verdünnung der Glycerin-Dauerkultur des Stammes *B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* pIC333 (KS 119) auf $\text{LB}^{\text{Bleo20Spec100}}$ -Platten ausplattiert, so dass man genügend viele Einzelkolonien nach Inkubation ÜN bei 37 °C erhielt. Die Spectinomycin-Resistenz geht zurück auf die Integration des Transposons mini-Tn10 ins Chromosom, die Bleomycin-Resistenz besteht aufgrund eines stabilen GFP-BRP-RsiX-Reporterproteins. Im Anschluss folgte der Screen mit dem GFP-Scope nach erhöhter Fluoreszenz. Neben zahlreichen Klonen, welche nur eine geringe bzw. gar keine Fluoreszenz zeigten, konnten einige Klone identifiziert werden, welche eine stark erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zum Reporterstamm KS115 aufwiesen (Abbildung 11). Bei diesen Klonen erfolgte vermutlich eine Integration des Transposons mini-Tn10 in Gene, welche einen Einfluss auf die Stabilität von RsiX haben.

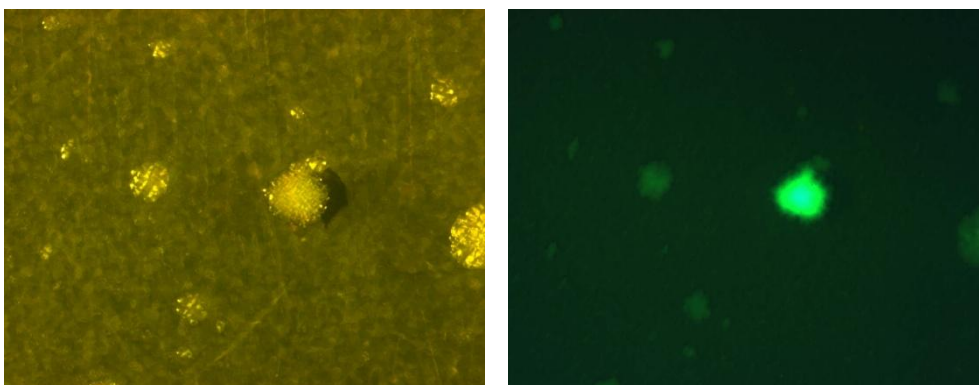


Abbildung 11: Einzelkolonien des Stammes *B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* pIC333 (KS 119) nach Integration des Transposons mini-Tn10 in dessen Chromosom. Links: Fotografie bei Betrachtung unter weißem Licht. Rechts: Fotografie des gleichen Ausschnittes der Platte jedoch bei Betrachtung unter blauem Licht (480 nm). Die starke Fluoreszenz in der Bildmitte (rechts) beruht auf der Integration des Transposons in ein Gen mit Einfluss auf die Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX. Der Stamm wurde auf $\text{LB}^{\text{Bleo20Spec100}}$ plattiert.

Alle Klone, die eine starke Fluoreszenz aufwiesen, wurden im Anschluss auf die Resistenz gegenüber bestimmter Antibiotika getestet. Jene Klone sollten sensitiv gegenüber Erythromycin sein. Eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum würde die Integration des gesamten Plasmides ins Chromosom bedeuten (vgl. Abbildung 10; die Erythromycin-Resistenz wird außerhalb des Transposons im Plasmid pIC333 kodiert). Dies war nicht erwünscht. Auf der anderen Seite müssen all diese Klone resistent gegenüber Bleomycin (aufgrund der Selektion auf Vorhandensein der Reporterfusion, vgl. Abbildung 9), Spectinomycin (da das Transposon diese Resistenz kodiert, vgl. Abbildung 10) und auch Chloramphenicol (weil der verwendete Reporterstamm dies kodiert, vgl. Abbildung 9) sein. Nur von Klonen, welche Em^s , $Bleo^r$, $Spec^r$, Cm^r waren und zudem noch eine starke Fluoreszenz zeigten, wurde die chromosomale DNA für weitere Analysen isoliert. Dieser Phänotyp konnte bei insgesamt 11 Klonen nachgewiesen werden (mit KS119 Klon 9, 13, 14, 18, 19, 22, 24, 25, 29, 39 bzw. 43 bezeichnet).

3.4.3 Retransformation der chromosomalen DNA von scheinbar positiven Klonen nach der Transposonmutagenese

Die isolierte chromosomale DNA von Klonen, welche Em^s , $Bleo^r$, $Spec^r$, Cm^r waren und eine starke Fluoreszenz zeigten, wurde im Anschluss in je zwei verschiedene Reporterstämme transformiert. Auf diese Art sollten falsch positive Klone identifiziert werden, um diese bereits vor den folgenden Analysen zu separieren und zu verwerfen.

Zum einen war dies der Reporterstamm KS4, welcher für die Transkriptionsfusion aus dem σ^X -kontrollierten *dltA*-Promotor und dem Gen *lacZ* kodiert (Abbildung 4, oben). Nach Retransformation der chromosomalen DNA eines Klons, bei welchem der Anti-Sigmafaktor RsiX durch die Integration des Transposons an einer beliebigen Stelle ins Chromosom stabilisiert wurde, erwartete man, dass der Reporter eine sehr geringe bis gar keine β -Galaktosidase-Aktivität zeigt. Dies sollte durch weiße Kolonien auf einer LB-Platte, welcher X-Gal zugesetzt war, erkennbar sein. Wie bereits unter 3.2 erläutert, kontrolliert σ^X die Transkription des *dlt*-Operons (Cao & Helmann 2004). Daher führt bei diesem Reporterstamm ein stabilisierter Anti-Sigmafaktor durch die anhaltende Inhibierung des Sigmafaktors nicht zur Expression des *lacZ*-Gens und somit zu keinem Umsatz des Substrates X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff durch die β -Galaktosidase. In der Tat konnten so drei Klone identifiziert werden, welche nach Transformation ihrer chromosomalen DNA in den

Reporter KS4 weiße Kolonien bildeten sowie Spec^r (durch Transposon kodiert) und Neo^r (kodiert von Reporterfusion) zeigten. Die verbleibenden acht Klone wurden aufgrund ihrer blauen Koloniefarbe auf X-Gal-Platten als falsch positiv identifiziert.

Zum anderen erfolgte die Retransformation der isolierten chromosomalen DNA in den Ausgangsstamm für die Transposonmutagenese KS115 (Abbildung 9). Dieser Stamm wies vor der Mutagenese keine Fluoreszenz auf. Die Transformation diente dem Nachweis, dass das Transposon auch tatsächlich in einen für die Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX relevanten Abschnitt des Genoms integrierte. Somit sollten die Kolonien nach der Retransformation im Gegensatz zum Ausgangsstamm KS115 eine intensive Fluoreszenz besitzen. Es wurden hier drei Klone gefunden, welche eine starke Fluoreszenz zeigten und welche eine Spec^r (durch Transposon kodiert), Cm^r sowie Bleo^r (kodiert vom Reporterstamm KS115) vorwiesen. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass jene drei Klone im Unterschied zum Ausgangsstamm KS115 sowohl durch die Resistenz gegen Spectinomycin als auch durch eine ausgeprägte Fluoreszenz gekennzeichnet sind. Dabei handelte es sich um die gleichen Klone, welche auch schon nach Retransformation ihrer chromosomalen DNA in den Reporter KS4 weiße Kolonien bildeten.

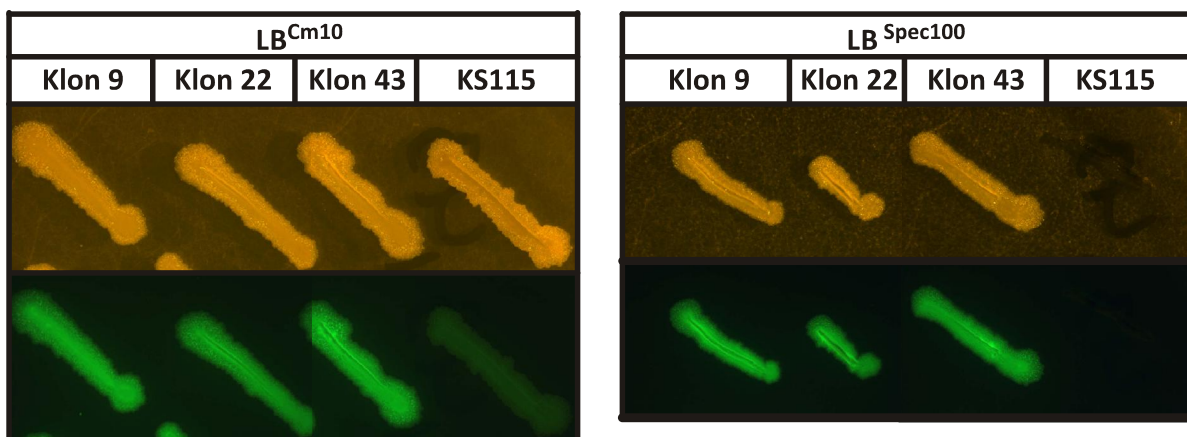


Abbildung 12: Fotografien von *B. subtilis* Kolonien des Stammes 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* pIC333 (KS 123). Dargestellt sind Kolonien der Klone 9, 22 und 43 auf $\text{LB}^{\text{Cm}10}$ -Platten (linke Grafik) bzw. $\text{LB}^{\text{Spec}100}$ -Platten (rechte Grafik) nach Integration des Transposons *mini-Tn10* in deren Chromosom. Die starke Fluoreszenz dieser drei Klone beruht auf der Integration des Transposons in ein Gen mit Einfluss auf die zelluläre Konzentration des Anti-Sigmafaktors RsiX. Im Vergleich dazu zeigt KS 115 (Reporterstamm vor der Transposonmutagenese) keine Fluoreszenz. Die Kolonien wurden unter normalem weißem Licht (oberer Teil der Grafiken) und bei Anregung der GFP-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 480 nm (unterer Teil der Grafiken) fotografiert. Es wurden gleiche Auflösungen und Vergrößerungen verwendet.

Von den anfänglich 11 Klonen, welche ein scheinbar positives Ergebnis nach der Transposonmutagenese zeigten, d. h. bei welchen das Transposon sehr wahrscheinlich in ein

Gen integrierte, das für einen destabilisierenden Faktor hinsichtlich des Anti-Sigmafaktors RsiX kodiert, wurden acht Klone als falsch positiv aufgrund der Ergebnisse der Retransformationen ausgeschlossen. Sehr wahrscheinlich wurde die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen großen Kolonien als ähnlich intensiv eingeschätzt, was dann zu einem falsch positiven Ergebnis führte. Lediglich für drei Klone zeigten die Ergebnisse eindeutige Hinweise, dass es zur Stabilisierung von RsiX kam, da mögliche destabilisierende Faktoren durch das Transposon deletiert wurden. Die entsprechenden drei Stämme wurden mit KS123 Klon 9, 22 bzw. 43 (*B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* mini-Tn10) bezeichnet. Die isolierte chromosomale DNA dieser drei Klone wurde im Weiteren verwendet, um einen Plasmid-*rescue* durchzuführen. Dieser Schritt wird im folgenden (3.4.4) erörtert.

3.4.4 Plasmid-*rescue*

Die chromosomale DNA der drei Klone 9, 22 und 43 des Stammes KS123 (*B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* mini-Tn10) wurde in nachfolgenden Schritten verwendet, um die Genregion zu identifizieren, in welche das Transposon mini-Tn10 integriert hat. Dazu erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau dieser DNA mit *Hind*III, da für dieses Enzym innerhalb der Sequenz des Transposons keine Schnittstelle vorliegt (Abbildung 10). Somit wurden durch den Verdau Fragmente erhalten, welche zum einen das Transposon enthielten und zum anderen auch Teilsequenzen (bis zu einer *Hind*III-Schnittstelle) des stromaufwärts und stromabwärts liegenden Genes, in welches das Transposon integrierte.

Im Anschluss erfolgte eine Ligation der erhaltenen Fragmente der chromosomalen DNA, welche infolge der kompatiblen Enden der DNA nach dem *Hind*III-Verdau zu zirkulärer (Plasmid-) DNA führte. Durch die anschließende Transformation mittels Elektroporation in *E. coli* DH10B-Zellen und der Selektion bei 37 °C für 48 Stunden auf LB^{Spec100}-Platten, konnten nur diejenigen Zellen wachsen, welche die Plasmid-DNA mit dem Transposon, welches für die Spectinomycin-Resistenz kodiert sowie den *ori* pUC für die Replikation in *E. coli* besitzt (Abbildung 10), enthielten.

Für den Erhalt dieser Plasmid-DNA erfolgte nach der Transformation zunächst eine Mini-Präparation. Zur Identifikation der Plasmide, welche das Transposon enthielten, wurde im Anschluss eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Pst*I und *Bam*HI durchgeführt. Beide Enzyme haben innerhalb des Transposons Schnittstellen (Abbildung 10). Durch den *Bam*HI-Verdau sollte für jedes Plasmid ein 2,2 kb großes Fragment entstehen, welches fast

ausschließlich das Transposon kodiert (Abbildung 10). Im Anschluss wurde von eindeutig identifizierter Mini-Plasmid-DNA mit Transposon eine Midi-Präparation durchgeführt. Die erhaltene Midi-Plasmid-DNA wurde erneut einer Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Pst*I und *Bam*HI unterzogen. Die zu Beginn des Kapitels erwähnten Klone 9, 22 und 43 des Stammes KS123, von welchen der Plasmid-*rescue* durchgeführt wurde, zeigten dabei

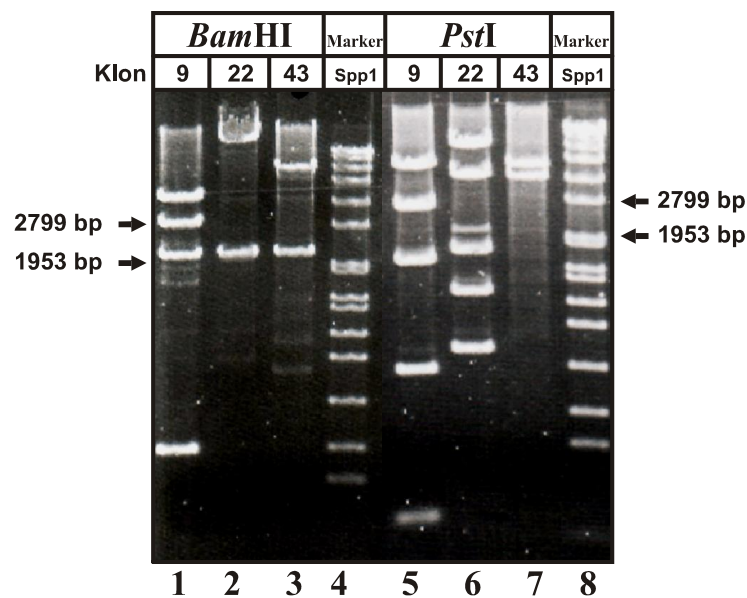


Abbildung 13: Fotografie eines EtBr-gefärbten Agarosegels zur Dokumentation der Restriktionsanalyse von Midi-Plasmid-DNA nach dem Plasmid-*rescue* der Klone 9, 22 und 43 des Stammes KS123 (*B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsIX mini-Tn10*). Es wurde eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (Spuren 1-3) und *Pst*I (Spuren 5-7) durchgeführt. Als Längenstandard wurde der Marker Spp1 verwendet (Spuren 4 und 8). Die angegebenen Größen (links bzw. rechts neben der Fotografie) beziehen sich auf die entsprechenden Fragmente des Markers. Die Spuren 1-3 zeigen alle ein 2,2 kb großes Fragment, welches das Transposon *mini-Tn10* enthält.

verschiedene Restriktionsmuster beim Verdau mit dem gleichen Enzym (Abbildung 13). Das deutet auf unterschiedliche Transpositionereignisse hin. Von diesen Klonen wurde jeweils die Midi-Plasmid-DNA für eine erneute Retransformation sowie eine Sequenzanalyse verwendet.

3.4.5 Retransformation von Plasmid-DNA nach Plasmid-*rescue*

Die nach dem Plasmid-*rescue* erhaltene Midi-Plasmid-DNA der entsprechenden Klone 9, 22 und 43 des Stammes KS123 wurde für eine erneute Retransformation in den Ausgangsstamm für die Transposonmutagenese KS115 (Abbildung 9) verwendet. Im Anschluss wurde wieder

die Fluoreszenz der Transformanten überprüft. Man erhielt das gleiche Ergebnis, welches man auch schon für die Retransformation von chromosomaler DNA (vgl. Kapitel 3.4.3) erhielt. Durch die Integration des Transposons in ein Gen mit Einfluss auf die Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX konnte im Vergleich zum Reporterstamm KS115 eine intensive Fluoreszenz festgestellt werden. Das GFP-BRP-RsiX-Fusionsprotein lag in der Zelle stabil vor. Ebenso waren alle relevanten Antibiotika-Resistenzen vorhanden: eine Spec^r (durch das Transposon kodiert), eine Cm^r sowie eine Bleo^r (kodiert vom Reporterstamm KS115).

Durch die Retransformationen sowohl der Plasmid-DNA nach dem Plasmid-*rescue* als auch der chromosomalen DNA in die verschiedenen Reporterstämme und durch die Überprüfung aller relevanten Antibiotika-Resistenzen konnte das Vorliegen falsch positiver Klone nach der Transposonmutagenese ausgeschlossen werden. Es wurde davon ausgegangen, dass bei allen drei Klonen eine Integration des Transposons in Gene stattfand, welche eine Rolle bei der Destabilisierung des Anti-Sigmafaktors RsiX spielen. Daraufhin wurden genau diese drei Klone sequenziert.

3.4.6 Sequenzierung der Integrationsstelle des Transposons mini-Tn10

Zur genauen Identifizierung der Integrationsstelle des Transposons ins Chromosom des Stammes KS123 (*B. subtilis* 1012 *amyE::gfp-bleo-rsiX* mini-Tn10) erfolgte eine Sequenzierung der Midi-Plasmid-DNA der entsprechenden Klone 9, 22 und 43 (vgl. Kapitel 3.4.4). Diese wurde von der Firma SeqLab durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurde der Sequenzierprimer pIC5 (Tabelle 4, Nummer 5) eingesetzt. Dieser Primer entspricht dem rechten Primer in Abbildung 10, d. h. es wurde die Genregion stromabwärts vom Transposon sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Zuhilfenahme von Datenbanken aus dem Internet (BSORF - *Bacillus subtilis* Genome Database; SubtiList - the GenoList World Wide Web Server; BLASTN-Programm des NCBI) analysiert und identifiziert.

Die Auswertung der Sequenziererergebnisse zeigt für alle drei Klone ein eindeutiges Ergebnis. Das Transposon integrierte in allen drei Fällen in das Gen *rho*, welches für den Transkriptionsterminator Rho kodiert. Dabei fand das Transpositionereignis für die drei Klone jeweils an verschiedenen Stellen in der Sequenz von *rho* statt (Abbildung 14).

```

ATGAAAGACGTATCTATTTCTCTTTGGAAAATATGAAATTGAAAGAGCTTTATGAACTTGCAAGA
CATTATAAAATCTCCTATTACAGCAAACCTGACAAAAAAGAACTCATTTTCGCCATTCTGAAAGCG
AATGCAGAACAGGAAGATCTGCTGTTTATGGAAGGCGTTCTCGAGATCATCCAGTCTGAAGGTTTC
GGATTCCTGAGACCGATCAACTACTCTCCAAGCTCAGAAAGACATTTACATCTCAGCTTCACAATC
CGCCGTTTCGATTTGCGGAACGGA ↓ GACAAAATGATCTGGCAAGGTTGCCCCGCCAAAGAAAAT
GAGCGTTACTATGGACTTTTGACGTTGAAGCAGTAAATGGGGATGATCCCGAATCTGCAAAAGAG
CGTGTGCATTTCCCGGCTCTTACGCCACTTTATCCGGATCGTCAAATGGTGCTTGAAACAAGCCGA
ACTTCTTGTCTACAAGAATTATGGACATGATGGCGCCGGTTGGATTTGGGCAGCGCGGATTGATTG
TTGCGCCGCCGAAAGCCGGA AAAACGATGTTGCTGAAGGAAATGCCAACAGCATTACAGCGAAC
CAGCCTGAAGCAGAGCTGATCGTGCTTTTAAATGACGAAGACCTGAGGAAGTAACCGATATCGA
GCGCTCTGTAGCTGGGGATGTCGTCAGTCAACGTTTGATGAAAGTGCCGGA AAACCATATCAAAGT
GGCCGAGCTTGTGCTTGAACGTGCGATGCGTCTCGTGGAACACAAA AAATACGTCATTATCCTGAT
GGACAGCATCACAGTCTTGCCCGCGCCTACAACCTTAGTGATTCCGCCAAGTGG AAGAACGCTTTC
CGGGGGGATTGACCCAGCGGCGTTCACCGTCCGAAA CGCTTCTTTGGGGCTGCGAGAAATATCGA
AGAGGGCGGCAGCTTAACCATCCTTGCTACGGCTCTGGTCGATACAGGTTACAGTATGGATGATGT
CATTATGAAGAATTCAAGGGAACAGGCAACATGG ↓ AGCTCCATCTTGACCGCTCTCTGCCGA
GCGCCGCA TCTTCCCTGCCATCGATATCCGCCGTTTCAGGAACGCGCAAAGAAGAGC ↓ TGCTTGT
GCCTAAAGAGCATCTTGATCGTTTATGGTCTATCCGCAAAACGATGTCTGATTACCTGATTTCGCA
GAAAAGTTCATGAGAAAATGAAA AAAACCAAACAAACCAGGAATTTTTCGATATTCTCAATCA
AGAATGGA AACAGGCAAATCTATCATCTGCAAGAAGGTAA

```

Abbildung 14: Vollständige Sequenz des Gens *rho* aus *B. subtilis*, welches für den Transkriptionsterminator Rho kodiert. Die roten Pfeile symbolisieren die Stellen im Chromosom, in welche das Transposon mini-Tn10 bei drei unterschiedlichen Klonen nach einer Transposonmutagenese mit dem Plasmid pIC333 integrierte.

Die bereits oben beschriebenen Retransformationen von chromosomaler bzw. Plasmid-DNA der entsprechenden Klone 9, 22 und 43 zeigten eine stark erhöhte Fluoreszenz (vgl. Kapitel 3.4.3 und 3.4.5) bzw. weiße Kolonien (vgl. Kapitel 3.4.3), hervorgerufen durch das Vorhandensein des Anti-Sigmafaktors RsiX aufgrund des Funktionsverlustes von *rho*. In den folgenden Betrachtungen soll daher der mögliche direkte oder indirekte Einfluss von Rho auf RsiX näher geprüft werden.

3.5 Analyse des Einflusses von Rho bei der *rsiX*-Expression

3.5.1 Konstruktion eines *rho*-Deletionsstammes

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Sequenzanalyse nach der Transposonmutagenese musste als ein erster Schritt der Knockout von *rho* konstruiert werden. Das war möglich, weil *rho* in *B. subtilis* nicht essentiell ist (Quirk *et al.* 1993). Der Knockout erfolgte durch die Insertion einer Bleomycin-Resistenz-Kassette in die Sequenz von *rho* (Abbildung 15, rechts). Der resultierende Stamm wurde mit *B. subtilis* 1012 *rho::bleo* bezeichnet.

Zur Überprüfung des Knockouts wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Dabei sollte nach der Restriktion der chromosomalen DNA von 1012 *rho::bleo* mit dem

Restriktionsenzym *EcoRV* und der Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen *rho* in dem Luminogramm ein Fragment mit einer Größe von 1848 bp zu sehen sein. Als Kontrolle wurde mit der DNA des Ausgangsstammes *B. subtilis* 1012 genauso verfahren. Allerdings wurden für diesen Stamm Fragmente der Größen 1414 bp sowie 424 bp erwartet. Das Ergebnis der Southern Blot Analyse ist in Abbildung 15 (links) dargestellt. Man kann deutlich den Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm und dem *rho*-Knockout erkennen. In beiden Fällen wurden die erwarteten Fragmentgrößen erhalten. Es kann daher von einem korrekt klonierten Knockout von *rho* ausgegangen werden.

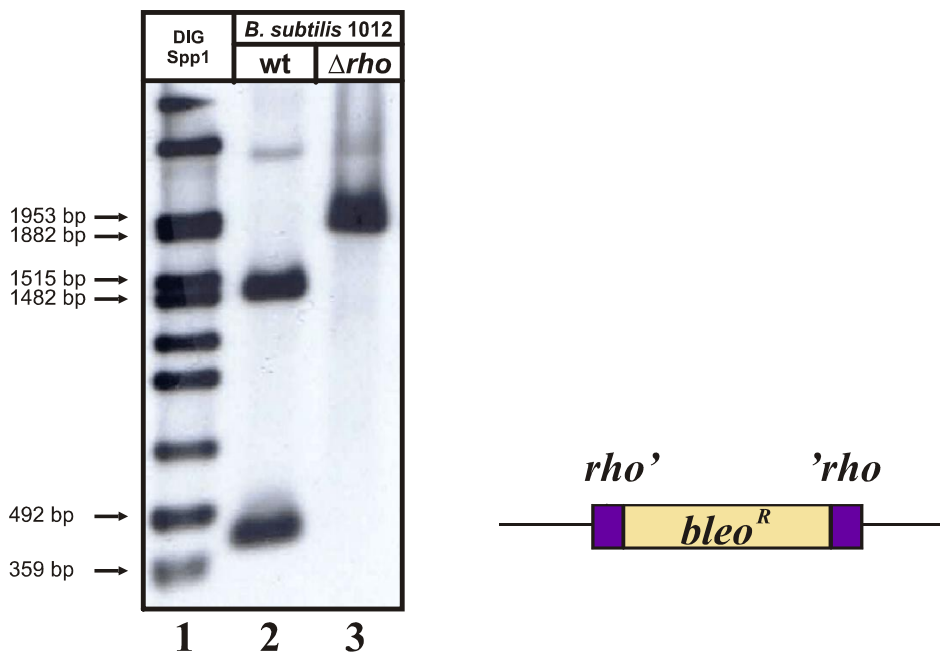


Abbildung 15: Links: Luminogramm der Southern Blot Analyse zur Überprüfung des korrekten *rho*-Knockouts im Stamm *B. subtilis* 1012 *rho::bleo* (Spur 3). Als Referenz wurde der Ausgangsstamm *B. subtilis* 1012 verwendet (Spur 2). Die Restriktion der jeweiligen chromosomalen DNA erfolgte mit *EcoRV*. Für die Hybridisierung wurde eine DIG-markierte DNA-Sonde gegen *rho* verwendet. Als Marker wurde DIG-markierter Spp1-Marker verwendet (Spur 1). Die Fragmentgrößen sind in bp angegeben (links neben dem Luminogramm). Rechts: Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation im Stamm *B. subtilis* 1012 *rho::bleo*. *rho* wurde durch eine Bleomycin-Resistenz-Kassette deletiert.

3.5.2 Einfluss von $\Delta\rho$ auf die Konzentration des Anti-Sigmafaktors RsiX

Der nächste Schritt in der Überprüfung des Ergebnisses der Sequenzanalyse nach der Transposonmutagenese war, die chromosomale DNA von 1012 *rho::bleo* in Stämme zu transformieren, welche GFP-RsiX-Fusionen exprimieren. Hierfür wurden Stämme

ausgewählt, welche die GFP-RsiX-Fusionen durch den Promotor P_{groE} konstitutiv exprimieren sollten. Neben der Volllängenform von RsiX wurde auch wieder eine verkürzte Form von RsiX betrachtet. Diese verkürzte Form sollte nur die ersten 70 Aminosäuren, d. h. keine extracytoplasmatische Domäne, exprimieren (*rsiX* $\Delta 71-368$). Sowohl die Volllängenform als auch die verkürzte Form von RsiX als GFP-Fusion wurde neben dem Wildtyphintergrund (wt) und dem Δrho -Hintergrund auch für die Deletion der Site-2 Protease RasP ($\Delta rasP$) und für den Doppelknockout $\Delta rho \Delta rasP$ betrachtet.

Zuerst erfolgte die Überprüfung der Fluoreszenzintensitäten dieser Stämme mit dem GFP-Scope. Eine Fotografie der jeweiligen Kolonien ist in Abbildung 16 zu sehen. Hierbei ist erkennbar, dass man für die Volllängenform von RsiX (Spur 1) im Δrho -Hintergrund im Vergleich zum wt eine erhöhte Fluoreszenz feststellen kann. Wie auch schon in Abbildung 7 gezeigt, verhält sich der Stamm im $\Delta rasP$ -Hintergrund wie im wt. Es ist keine Fluoreszenz der Kolonien sichtbar. Nur im Doppelknockout der Gene für den Transkriptionsterminator Rho und der Site-2 Protease RasP ist wieder eine Fluoreszenz nachweisbar. Die Ergebnisse für die verkürzte Form von RsiX ist in der zweiten Spur der Abbildung 16 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass lediglich im $\Delta rasP$ -Hintergrund sowie im Doppelknockout von *rho* und *rasP* eine Fluoreszenz vorhanden ist. Für den wt und den Knockout von *rho* lässt sich keine Fluoreszenz nachweisen.

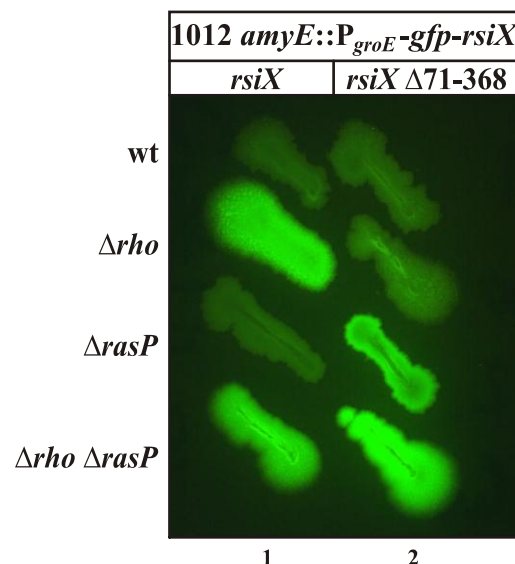


Abbildung 16: Fotografien von *B. subtilis* Kolonien, welche GFP-RsiX exprimieren. Spur 1 zeigt die Ergebnisse für die Volllängenform von RsiX (*rsiX*) und Spur 2 die für die verkürzte Form von RsiX ohne die extracytoplasmatische Domäne (*rsiX* $\Delta 71-368$). Die Expression der Fusionsproteine erfolgte im Wildtyphintergrund (wt), *rho*- (Δrho) und *rasP*- ($\Delta rasP$) Knockout sowie im Doppelknockout von *rho* und *rasP* ($\Delta rho \Delta rasP$). Durch den Promotor P_{groE} war eine konstitutive Expression der Fusionsproteine möglich. Dargestellt sind die Kolonien bei Anregung der GFP-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 480 nm.

Danach wurden die gleichen Stämme Western Blot Analysen unterzogen. Das entsprechende Luminogramm zeigt Abbildung 17. In den Spuren 1 - 4 sollten die GFP-RsiX-Fusionen in den verschiedenen genetischen Hintergründen detektiert werden. Das Fusionsprotein hat eine erwartete Größe von 68 kDa. Das Resultat ist identisch mit Abbildung 16. Der Anti-Sigmafaktor RsiX ist weder im wt noch im $\Delta rasP$ -Hintergrund detektierbar. Sowohl im Δrho -Hintergrund als auch im Doppelknockout von rho und $rasP$ konnte jedoch RsiX als Fusion mit GFP in der Membranfraktion mit der erwarteten Größe detektiert werden. Das Ergebnis der Western Blot Analyse für die verkürzte Form von RsiX ist in Abbildung 17 in den Spuren 5 – 6 dargestellt. Wie bereits für die Betrachtung der gleichen Stämme unter dem GFP-Scope (Abbildung 16) erläutert, kann nur im $\Delta rasP$ -Hintergrund sowie im Doppelknockout von rho und $rasP$ ein Signal für das Fusionsprotein mit GFP detektiert werden.

Die Ladungskontrolle lieferte wie zu erwarten in allen 8 Spuren klare Signale bei 70 kDa für die Metalloprotease FtsH.

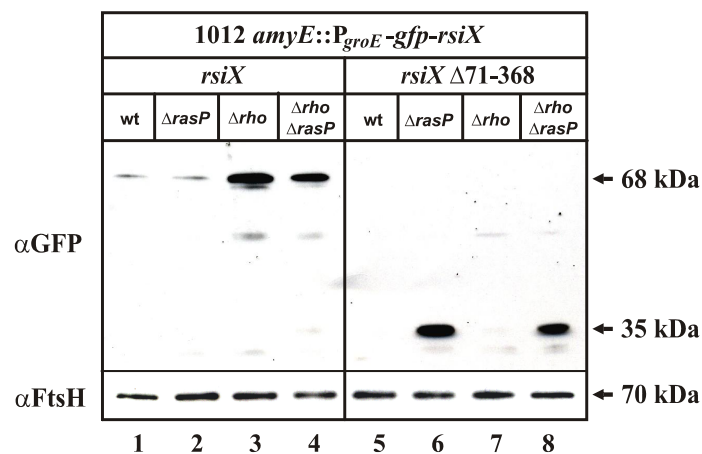


Abbildung 17: Luminogramm der Western Blot Analyse von *B. subtilis* Stämmen, welche GFP-RsiX zur Untersuchung der Konzentration des Anti-Sigmafaktors RsiX exprimieren. Die Spuren 1-4 zeigen die Ergebnisse für die Volllängenform von RsiX (*rsiX*) und die Spuren 5-8 die für die verkürzte Form von RsiX ohne die extracytoplasmatische Domäne (*rsiX* Δ71-368). Die Expression der Fusionsproteine erfolgte jeweils im Wildtyphintergrund (wt), *rasP*- ($\Delta rasP$) und *rho*- (Δrho) Knockout sowie im Doppelknockout von *rho* und *rasP* ($\Delta rho \Delta rasP$). Durch den Promotor P_{groE} erfolgte eine konstitutive Expression der Fusionsproteine. Die Proteine der Membranfraktionen (10 µg/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis der GFP-RsiX-Fusionen erfolgte mit Antikörpern gegen GFP. Mit der Ladungskontrolle (2 µg/Spur) wurde in gleicher Art verfahren, aber die Entwicklung des Blots erfolgte mit Antikörpern gegen die membrangebundene Protease FtsH. Die Größen der detektierten Proteine sind rechts neben dem Luminogramm aufgezeigt.

Betrachtet man die Ergebnisse der Abbildung 16 und Abbildung 17 zusammen, kann eindeutig festgestellt werden, dass der Transkriptionsterminator Rho einen Einfluss auf die detektierbare Menge des Anti-Sigmafaktors RsiX hat. Sobald der Faktor Rho durch Deletion des entsprechenden Gens seine Funktion verloren hat, kann RsiX als Fusion mit GFP sowohl

im Immunoblot als auch anhand von starker Fluoreszenz unter dem GFP-Scope detektiert werden. Dagegen scheint die Site-2 Protease RasP ohne einen Einfluss auf die Menge von RsiX zu sein. Der Knockout von *rasP* führt zu keiner Detektion von RsiX. Der detektierbare Anti-Sigmafaktor im Doppelknockout von *rho* und *rasP* ist lediglich die Folge durch den Funktionsverlust von Rho.

Anders verhält es sich bei der Analyse der Ergebnisse für die verkürzte Form von RsiX in Abbildung 16 und Abbildung 17. Hier scheint Rho ohne einen Einfluss auf die Konzentration des Anti-Sigmafaktors zu sein, denn weder mit dem Immunoblot noch durch die Fluoreszenz-Analyse konnte der Anti-Sigmafaktor detektiert werden. Allerdings führt hier der Funktionsverlust von RasP zu einer Detektion von RsiX, sowohl im $\Delta rasP$ -Hintergrund als auch im Doppelknockout von *rho* und *rasP*. Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich hier um eine artifizielle Form des Anti-Sigmafaktors handelt, welche keine extracytoplasmatische Domäne exprimiert. Für den Anti-Sigmafaktor RsiW wurde bereits gezeigt, dass RasP an seiner Proteolyse beteiligt ist (Schöbel *et al.* 2004). Dabei ist das Substrat für RasP eine verkürzte Form von RsiW ohne die entsprechende extracytoplasmatische Domäne. Es wird daher vermutet, dass RsiX $\Delta 71-368$ nur aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit der verkürzten Form von RsiW zum Substrat von RasP geworden ist. Warum Rho für die zelluläre Konzentration von RsiX $\Delta 71-368$ keine Rolle zu spielen scheint, kann an dieser Stelle noch nicht genau begründet werden. Sehr wahrscheinlich aber ist das im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus von Rho zu begründen (Morgan *et al.* 1985; Bear *et al.* 1988; Alifano *et al.* 1991). Möglich wäre, dass die für die Termination durch Rho notwendige rut-site in der Region von *rsiX* lokalisiert ist, welche die extracytoplasmatische Domäne kodiert. Da diese Region für *rsiX* $\Delta 71-368$ deletiert ist, könnte Rho aufgrund einer fehlenden rut-site die Transkription nicht terminieren. Im Kapitel 3.8 wird daher die Lage der rut-site im Gen *rsiX* bestimmt.

3.6 Das *sigX-rsiX*-Operon – reguliert durch Translationskopplung?

Im Kapitel 3.1 wurde erwähnt, dass sich *sigX* und *rsiX* in einem bicistronischen Operon befinden und sich ihre Sequenzen zum Teil überlagern. Es liegen damit ähnliche Bedingungen wie für das *trpEDCFBA*-Operon in *B. subtilis* vor, in welchem sich die Sequenzen für *trpE* und *trpD* mit 29 Nukleotiden ebenfalls überlagern. Im *trp*-Operon erfolgt genauso wie für *rsiX* die Termination der Transkription durch den Faktor Rho. Außerdem konnte gezeigt

werden, dass *trpE* und *trpD* translational gekoppelt sind (Yakhnin *et al.* 2001). Daraus ergibt sich die Frage, ob auch *sigX* und *rsiX* durch Translationskopplung (Oppenheim & Yanofsky 1980; McCarthy & Gualerzi 1990) reguliert werden. Für das *sigX-rsiX*-Operon würde das bedeuten, dass *rsiX* nur translatiert wird, wenn auch *sigX* translatiert wird. Wie die Translationskopplung im Detail erfolgt, wurde u. a. am Lysis-Gen des Bakteriophagen MS2

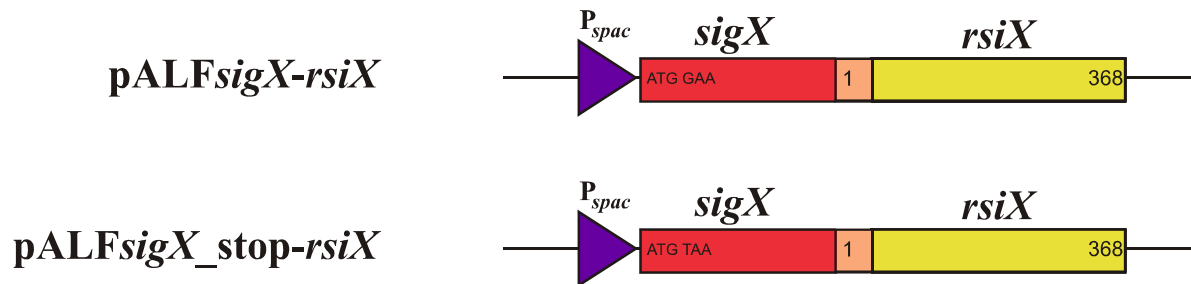


Abbildung 18: Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in den verwendeten Reporterstämmen zur Klärung der Frage, ob Translationskopplung im *sigX-rsiX*-Operon vorliegt. Oben: *sigX* wird nach IPTG-Zugabe transkribiert und translatiert. **Unten:** *sigX* wird trotz IPTG-Zugabe aufgrund des Stopp-Codons direkt nach dem Start-Codon nicht translatiert. Die Ziffern 1 und 368 bezeichnen die erste und die letzte Aminosäure von *rsiX*. Der überlappende Bereich von *sigX* und *rsiX* ist schwach orange gekennzeichnet. P_{spac} ist ein IPTG-regulierbarer Promotor.

zeigt, welches überlappende Bereiche zu dem stromaufwärts liegenden Coat-Gen besitzt. Die Translation des Lysis-Gens kann nur erfolgen, wenn eine Sekundärstruktur, welche die Ribosomenbindestelle des Gens enthält, durch Ribosomen, welche das Coat-Gen translatieren, destabilisiert wird. Dadurch können Ribosomen an die Ribosomenbindestelle des Lysis-Gens binden und die Translation initiieren (Berkhout *et al.* 1987).

Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Reportersystem konstruiert, in welchem das *sigX-rsiX*-Operon unter der Kontrolle des IPTG-regulierbaren Promotors P_{spac} steht. Damit kann die Transkription des Operons gezielt reguliert werden. Zudem wurde an das 5'-Ende des Operons die Sequenz für einen FLAG-tag fusioniert, so dass auch immunologische Nachweise möglich waren. Als zweites Konstrukt wurde ein ähnliches System gewählt, aber mit dem Unterschied, dass direkt nach dem Start-Codon von *sigX* ein Stopp-Codon eingeführt wurde. Auf diese Art sollte die Translation von *sigX* trotz IPTG-Zugabe unterbunden werden. In beiden Systemen wurde zudem das gesamte wildtypische *sigX-rsiX*-Operon durch eine Spectinomycin-Resistenz-Kassette deletiert. Eine schematische Darstellung dieser beiden Reportersysteme ist in Abbildung 18 zu sehen.

Als erstes wurden mit diesen Reporterstämmen Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Stämme pALFsigX-rsiX und pALFsigX_stop-rsiX sowohl mit als auch ohne die

Zugabe von IPTG im Wildtyphintergrund und im Δrho -Hintergrund untersucht. Das entsprechende Luminogramm ist in Abbildung 19 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Translation von *sigX* nach IPTG-Zugabe sowohl im Wildtyphintergrund (Spur 2) als auch im Δrho -Hintergrund (Spur 4) stattfand. Wie zu erwarten war, erhielt man ein klares Signal für FLAG-SigX bei 26 kDa. Der Knockout von *rho* scheint aber ohne Einfluss auf die Translation von *sigX* zu sein. Die Signale für FLAG-SigX in den Spuren 2 und 4 sind annähernd gleich stark. Eine mögliche Erklärung, warum die Menge an FLAG-SigX im Wildtyphintergrund (Spur 2) als auch im Δrho -Hintergrund (Spur 4) in etwa gleich ist, obwohl man einen klaren Unterschied in der Transkriptmenge (Abbildung 20) sieht, wird in Kapitel 4.3 diskutiert. In den Spuren 1 und 3 sind für FLAG-SigX keine Signale zu finden, da der Kultur kein IPTG zugefügt wurde. Die erkennbaren schwachen Signale sind unspezifische Reaktionen des FLAG-Antikörpers.

Weiter ist in Abbildung 19 zu erkennen, dass man in den Spuren 6 und 8 trotz IPTG-Zugabe keine Signale für FLAG-SigX erhielt. Unabhängig davon, ob es sich um den Wildtyphintergrund (Spur 6) oder den Δrho -Hintergrund (Spur 8) handelte, fand aufgrund des Stopp-Codons zu Beginn der Sequenz von *sigX* (Abbildung 18, unten) wie erwartet keine Translation statt. Die Spuren 5 und 7 zeigen auch keine Signale für FLAG-SigX, da die Kulturen ohne IPTG inkubiert wurden und somit keine Transkription des *sigX_stop-rsiX*-Operons stattfinden konnte.

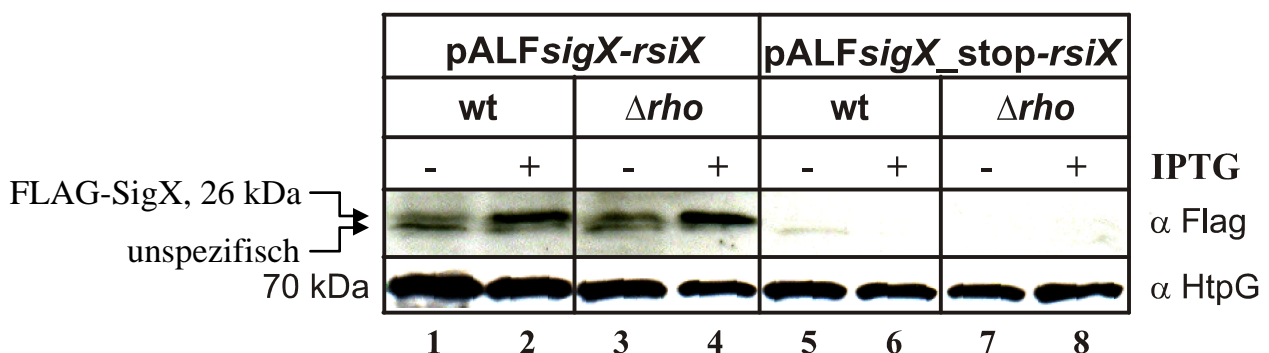


Abbildung 19: Luminogramm der Western Blot Analyse des *B. subtilis* Stammes pALFsigX-rsiX im Wildtyphintergrund (wt; KS162) sowie im Δrho -Hintergrund (KS166) und des Stammes pALFsigX_stop-rsiX ebenso im Wildtyphintergrund (wt; KS161) und im Δrho -Hintergrund (KS165). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse mit IPTG (+; Endkonzentration: 1 mM) und ohne IPTG (-) -Zugabe. Der Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die Proteine des Gesamtzellextraktes (5 μ g/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis von FLAG-SigX erfolgte mit Antikörpern gegen FLAG. Mit der Ladungskontrolle (2 μ g/Spur) wurde in gleicher Art verfahren, aber die Entwicklung des Blots erfolgte mit Antikörpern gegen das cytoplasmatische Protein HtpG. Die Größen der detektierten Proteine sind links neben dem Luminogramm aufgezeigt.

Die Ladungskontrolle lieferte dagegen in allen 8 Spuren klare Signale bei 70 kDa für das cytoplasmatische Protein HtpG.

In einem nächsten Schritt wurden dieselben Stämme verwendet, mit denen auch die Western Blot Analyse durchgeführt wurde (Abbildung 19), um einen genaueren Blick auf die Ebene der RNA zu werfen. In Northern Blot Experimenten wurde das *sigX-rsiX*-Transkript durch Verwendung einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *rsiX* detektiert. Die zu erwartende Transkriptlänge für das gesamte *sigX-rsiX*-Operon beträgt ca. 1600 Basen. Im Vergleich dazu hat *rsiX* eine Größe von 1104 Basen. Das Luminogramm dieser Analyse ist in Abbildung 20 dargestellt.

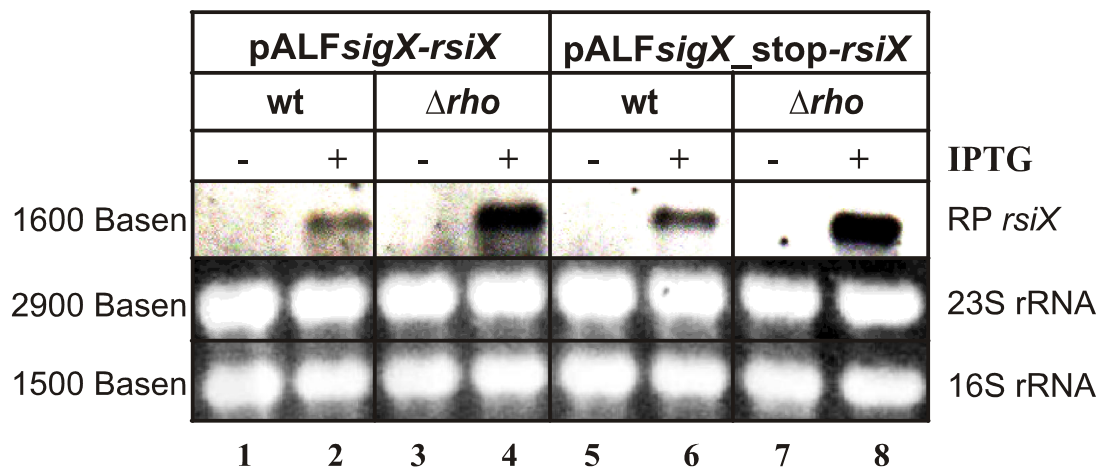


Abbildung 20: Luminogramm der Northern Blot Analyse des *B. subtilis* Stammes pALF*sigX-rsiX* im Wildtyphintergrund (wt; KS162) sowie im Δ *rho*-Hintergrund (KS166) und des Stammes pALF*sigX_stop-rsiX* ebenso im Wildtyphintergrund (wt; KS161) und im Δ *rho*-Hintergrund (KS165). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse mit IPTG (+; Endkonzentration: 1 mM) und ohne IPTG (-) -Zugabe. Der Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte im 1,2%igen denaturierenden Agarosegel bei 80 V. Danach wurden die Ribonukleinsäuren auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *rsiX* (RP *rsiX*). Eine Fotografie des EtBr-gefärbten Agarosegels diente als Ladungskontrolle (gezeigt sind die EtBr-gefärbten Banden der 23S rRNA und der 16S rRNA). Die Größen der detektierten RNA-Moleküle sind links neben dem Luminogramm aufgezeigt.

Wenn eine Translation vorzeitig beendet wird, kommt es zum Abbau der entsprechenden mRNA. Für das *sigX-rsiX*-Operon würde dies bei Vorliegen einer Translationskopplung folgendes bedeuten: Die Signale für das *sigX-rsiX*-Transkript in den Spuren 5 bis 8 müssten deutlich schwächer sein als die entsprechenden Signale in den Spuren 1 bis 4, d. h. die Transkription des *sigX_stop-rsiX*-Operons sollte sowohl im Wildtyphintergrund (Spur 6) als auch im Δ *rho*-Hintergrund (Spur 8) im Vergleich zum *sigX-rsiX*-Operon in den gleichen genetischen Hintergründen (Spur 2 bzw. 4) weniger stark sein.

Das Ergebnis der Northern Blot Analyse in Abbildung 20 entspricht aber nicht diesen Erwartungen. Für das wildtypische *sigX-rsiX*-Operon sieht man nach IPTG-Zugabe wie erwartet im Δrho -Hintergrund (Spur 4) aufgrund der fehlenden Termination durch Rho ein stärkeres Signal als im Wildtyphintergrund (Spur 2). Unerwartet ist aber das Resultat für das *sigX_stop-rsiX*-Operon. Obwohl *sigX* nicht translatiert wird (Abbildung 19), erhielt man nach IPTG-Zugabe sowohl im Δrho -Hintergrund (Spur 8) als auch im Wildtyphintergrund (Spur 6) etwas stärkere Signale als im wildtypischen *sigX-rsiX*-Operon. Das bedeutet, dass unabhängig von der *sigX* Translation eine Transkription von *rsiX* stattfindet, welche sogar stärker zu sein scheint als im wildtypischen *sigX-rsiX*-Operon. Die Termination durch Rho erfolgt auch ohne die *sigX* Translation für das *sigX_stop-rsiX*-Operon, denn das Signal in Spur 8 ist eindeutig stärker als in Spur 6. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das *sigX-rsiX*-Operon nicht durch Translationskopplung reguliert wird.

In Abbildung 20 wurde nicht das *rsiX*-Transkript, sondern immer das gesamte *sigX-rsiX*-Transkript mit einer Größe von ungefähr 1600 Basen detektiert.

Als Ladungskontrolle für die Northern Blot Analyse in Abbildung 20 wurden EtBr gefärbte Agarosegele benutzt. Die Kontrolle lieferte für alle 8 Spuren klare Signale für die 23S rRNA bei 2900 Basen sowie für die 16S rRNA bei 1500 Basen.

3.7 Die Transkriptionstermination durch Rho nach Bicyclomycin-Zugabe

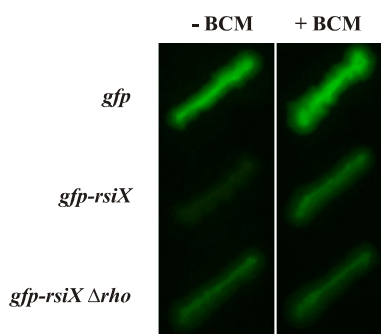
Bicyclomycin (BCM) ist ein Antibiotikum (Nishida *et al.* 1972), welches bei Analysen im Zusammenhang mit dem Transkriptionsterminator Rho häufig verwendet wird. Genetische und biochemische Untersuchungen zeigten, dass es zu direkten Wechselwirkungen zwischen dem Antibiotikum und dem Transkriptionsterminator Rho (Zwiefka *et al.* 1993) kommt. Bicyclomycin beeinträchtigt dabei direkt die ATPase-Aktivität von Rho (Carrano *et al.* 1998), was zu einem Funktionsverlust des Transkriptionsterminators führt.

Durch die Verwendung von BCM bei den folgenden Experimenten soll nachgewiesen werden, dass die Expression von *rsiX* direkt durch die Aktivität des Faktors Rho beeinflusst wird.

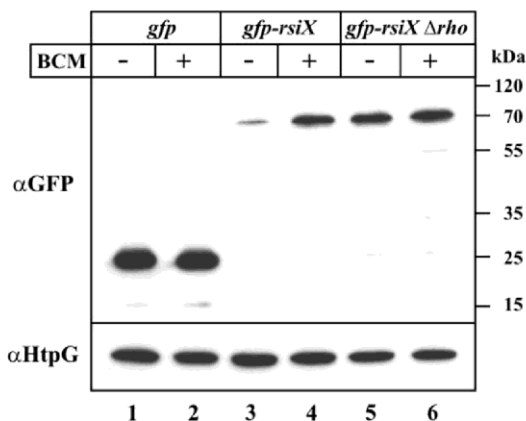
Dazu wurden zunächst wieder die Fluoreszenzintensitäten verschiedener Stämme unter dem GFP-Scope analysiert. Im Anschluss wurden dieselben Stämme in Western und Northern Blot Analysen betrachtet. Der immunologische Nachweis von GFP-RsiX erfolgte mit Antikörpern

gegen GFP. In den Northern Blot Experimenten wurde das *gfp-rsiX*-Transkript durch Verwendung einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *gfp* detektiert. Es wurden, wie bereits in Kapitel 3.5.2 erläutert, *B. subtilis* Stämme benutzt, welche das Fusionsprotein GFP-RsiX aufgrund des Promotors P_{groE} konstitutiv exprimieren sollten. Dabei handelt es sich um die Stämme 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-rsiX* (KS187) und 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-rsiX* im $\Delta\rho$ -Hintergrund (KS189). Der Stamm 1012 *amyE::P_{groE}-gfp* (Zellmeier *et al.* 2006) wurde als Positiv-Kontrolle für die Fluoreszenz verwendet. Alle diese Kulturen wurden einmal mit und einmal ohne BCM inkubiert.

A



B



C

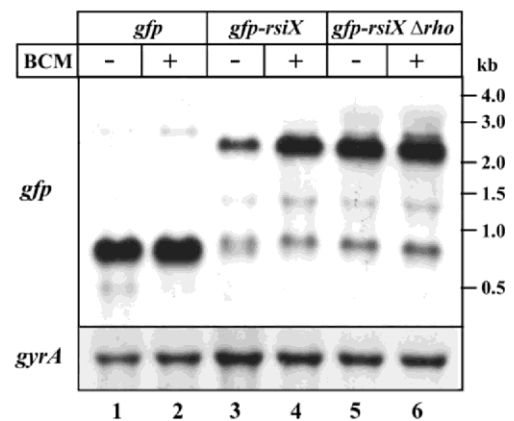


Abbildung 21: Einfluss des Antibiotikums Bicyclomycin (BCM) auf die Transkriptionstermination durch den Faktor Rho in den *B. subtilis* Stämmen 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-rsiX* (*gfp-rsiX*) und 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-rsiX* im $\Delta\rho$ -Hintergrund (*gfp-rsiX* $\Delta\rho$) sowie 1012 *amyE::P_{groE}-gfp* (*gfp*). Die Kulturen wurden mit (+) bzw. ohne (-) BCM inkubiert. **A: Fotografien von diesen *B. subtilis* Kolonien.** Dargestellt sind die Kolonien bei Anregung der GFP-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 480 nm. **B: Luminogramm der Western Blot Analyse dieser *B. subtilis* Stämme.** Die Proteine des Gesamtzellextraktes (10 μ g/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis von GFP-RsiX erfolgte mit Antikörpern gegen GFP. Mit der Ladungskontrolle (2 μ g/Spur) wurde in gleicher Art verfahren, jedoch erfolgte die Entwicklung des Blots mit Antikörpern gegen das cytoplasmatische Protein HtpG. Die Größen der detektierten Proteine sind rechts neben dem Luminogramm aufgezeigt. **C: Luminogramm der Northern Blot Analyse der beschriebenen *B. subtilis* Stämme.** Die elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte im 1,2%igen denaturierenden Agarosegel bei 80 V. Danach wurden die Ribonukleinsäuren auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *gfp*. Mit der Ladungskontrolle wurde in gleicher Art verfahren. Die Entwicklung dieses Blots erfolgte jedoch mit einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *gyrA*. Die Größen der detektierten RNA-Moleküle sind rechts neben dem Luminogramm aufgezeigt.

Bei Betrachtung der Fluoreszenz unter dem GFP-Scope (Abbildung 21A), stellt man fest, dass der Kontroll-Stamm für die Fluoreszenz wie erwartet sowohl ohne als auch mit BCM eine gleich starke intensive Fluoreszenz zeigt, denn der Transkriptionsterminator Rho beeinflusst die Transkription von *gfp* in keiner Weise. Das Protein wird konstitutiv exprimiert. Die Ergebnisse der Western und Northern Blot Analyse bestätigen diese Beobachtung. Abbildung 21B zeigt in den Spuren 1 und 2 bei ca. 27 kDa ähnlich starke Signale für GFP. Das Transkript von *gfp* ist mit gleicher Intensität in den Spuren 1 und 2 bei einer Länge von ca. 700 Basen in Abbildung 21C zu sehen.

Bei der Beurteilung der Resultate für den Stamm 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-rsiX* zeigt sich ein anderes Ergebnis. Unter dem GFP-Scope (Abbildung 21A) sieht man nur für die Inkubation der Kultur mit BCM eine Fluoreszenz, welche jedoch nicht so intensiv ist wie für das nicht fusionierte GFP. Bei Inkubation der Kultur ohne BCM erhielt man keine Fluoreszenz. BCM interagiert in *B. subtilis* mit dem Faktor Rho wie in *E. coli*. Da aber *rho* in *B. subtilis* nicht essentiell ist (Quirk *et al.* 1993), ist die BCM-Zugabe nicht letal. Lediglich die Funktionalität von Rho geht verloren, d. h. die Transkription von *gfp-rsiX* wird bei Inkubation mit BCM nicht terminiert und es kommt zur *gfp-rsiX*-Expression. Ohne BCM wird die Transkription von *gfp-rsiX* weiterhin terminiert. Die Western und Northern Blot Analysen bestätigen dieses Ergebnis. In Abbildung 21B erkennt man in Spur 4 ein klares Signal für GFP-RsiX bei etwa 68 kDa. Hier verhindert BCM die Transkriptionstermination, im Gegensatz zur Spur 3, da man dort ein schwächeres Signal für GFP-RsiX erhielt. Das *gfp-rsiX*-Transkript mit einer Länge von ca. 2200 Basen war nur in Spur 4 der Northern Blot Analyse nachweisbar (Abbildung 21C), da auch hier durch BCM die Termination im Gegensatz zu Spur 3 unterbunden wurde. Das deutlich schwächere Signal für *gfp-rsiX* in Spur 3 zeigt, dass hier eine Transkriptionstermination stattgefunden hat.

Abschließend sollte der Einfluss von BCM auf die Transkriptionstermination im $\Delta\rho$ -Hintergrund untersucht werden. Bei Betrachtung der Kolonien dieser Stämme unter dem GFP-Scope erkennt man unabhängig von der BCM-Zugabe fluoreszierende Kolonien (Abbildung 21A). Bei der Western Blot Analyse konnten ebenso in den Spuren 5 und 6 deutliche Signale für das Fusionsprotein GFP-RsiX (68 kDa) detektiert werden (Abbildung 21B) und das *gfp-rsiX*-Transkript (Abbildung 21C, Spuren 5 und 6) wurde auch nachgewiesen. Das Transkript hatte auch hier eine Länge von ca. 2200 Basen. Damit konnte gezeigt werden, dass BCM in *rho* Deletionsstämmen keine Auswirkung auf die Termination durch Rho hat, denn in jedem Fall findet aufgrund der Deletion von *rho* keine

Transkriptionstermination statt und GFP-RsiX wird exprimiert. Zusätzlich zeigt dieses Ergebnis, dass tatsächlich Rho der Angriffspunkt von BCM ist.

Die Ladungskontrolle der Western Blot Experimente lieferte in allen 6 Spuren klare Signale bei 70 kDa für das cytoplasmatische Protein HtpG (Abbildung 21B). Als Ladungskontrolle für die Northern Blot Analyse in Abbildung 21C erfolgte die Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *gyrA*. Die Kontrolle lieferte für alle 6 Spuren klare Signale bei 2500 Basen.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung der *rsiX*-Expression direkt auf die Aktivität des Transkriptionsterminators Rho zurückzuführen ist. Es kam durch die Zugabe von BCM zu keiner Transkriptionstermination durch Rho und somit stieg die Menge an *rsiX*-Transkript.

3.8 Kartierung der *rut*-site im Gen *rsiX*

Die vorhergehenden Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von *rsiX* durch den Transkriptionsterminator Rho negativ beeinflusst wird. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, war es wichtig die Bindestelle von Rho im *sigX-rsiX*-Transkript zu kartieren. Die Rho-Bindestelle wird als *rut*-site (Rho utⁱlization) bezeichnet und ist für die faktorabhängige Termination essentiell. Rho bindet dabei an diese spezifischen Sequenzen auf der mRNA und leitet so die Termination der Transkription ein. Es ist bereits bekannt, dass es sich dabei um etwa 70 bis 90 Basen lange Sequenzen mit einem relativ hohen Anteil an dem Nukleotid Cytidin handelt (Morgan *et al.* 1985; Bear *et al.* 1988; Alifano *et al.* 1991).

Um die Region der *rut*-site für *rsiX* Schritt für Schritt einzugrenzen, wurden zahlreiche GFP-RsiX-Reporterfusionen konstruiert, bei welchen entweder N-terminal oder C-terminal Deletionen in der Aminosäuresequenz von RsiX eingeführt wurden. Diese Reporterfusionen standen alle unter der Kontrolle des Promotors P_{groE} , so dass eine konstitutive Expression möglich war. Die Zahlen in der Bezeichnung der GFP-RsiX-Reporterfusionen bezeichnen die Aminosäuren, welche deletiert wurden. Zusätzlich wurden die folgenden drei Reporterstämme untersucht: 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-RBS_{rsiX}* (eine Ribosomenbindestelle wurde zwischen das Reportergen *gfp* und *rsiX* eingefügt), 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-RBSmut_{rsiX}* (eine mutierte

Ribosomenbindestelle wurde zwischen das Reporter-gen *gfp* und *rsiX* eingefügt) und 1012 *amyE::P_{groE}-gfp_Stop-rsiX* (durch ein eingefügtes Stopp-Codon nach der Sequenz des Reporter-gens *gfp* ist dieses nicht mehr translationell mit *rsiX* fusioniert).

3.8.1 Fluoreszenzmessungen der GFP-Reporterstämme

Zuerst wurden die im Kapitel 3.8 beschriebenen Reportersysteme hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert. Neben dem Wildtyphintergrund wurde die Fluoreszenz für alle Fusionen auch im Δrho - und im $\Delta rasP$ -Hintergrund sowie im Doppelknockout von *rho* und *rasP* geprüft. Als Referenz für die Fluoreszenz wurde der Stamm 1012 *amyE::P_{groE}-gfp* (Zellmeier *et al.* 2006) verwendet, bei welchem der Reporter *gfp* nicht mit einem anderen Gen translationell fusioniert wurde.

Das Ziel bei diesen Experimenten war es, solche Stämme zu identifizieren, welche bereits im Wildtyphintergrund eine starke Fluoreszenz zeigen. Daraus kann man auf das Vorhandensein großer Mengen des Anti-Sigmafaktors RsiX in Fusion mit GFP schließen, ohne dass das Gen des Transkriptionsterminators Rho deletiert wurde. Nur die fehlende *rut*-site wäre in diesem Fall für die hohe Konzentration des Fusionsproteins verantwortlich. Die Fluoreszenzintensitäten wurden, wie im Kapitel 2.6.3.1 beschrieben, mit dem LAS4000 bestimmt. Die relativen Intensitäten aller Reporterfusionen im Vergleich zum nicht fusionierten GFP (Zeile 11) sind im Diagramm in Abbildung 22 veranschaulicht. Die Fluoreszenz für den Referenzstamm in Zeile 11, welcher nur GFP exprimiert, wurde in den verschiedenen genetischen Hintergründen als 100 % festgesetzt. Dagegen wurde die Fluoreszenz für den Wildtypstamm 1012, in welchem keine *gfp-rsiX*-Fusion kodiert wird (Zeile 12), in den entsprechenden genetischen Hintergründen als 0 % definiert. Für alle anderen Reporterstämme (Zeilen 1 bis 10) wurden die Fluoreszenzintensitäten relativ zu GFP (Zeile 11) angegeben.

In Abbildung 22 wird deutlich, dass für die meisten Stämme (Zeilen 3 bis 10) keine starke Fluoreszenz im Wildtyphintergrund und auch nicht in den anderen drei genetischen Hintergründen zu erkennen ist. Die meisten Messwerte liegen etwa im Bereich von 30 - 40 %. Die zusätzliche Ribosomenbindestelle in der Reporterfusion in Zeile 4 und auch die Einführung einer mutierten Ribosomenbindestelle in der Fusion in Zeile 3 führten zu keiner detektierbaren Menge des Anti-Sigmafaktors RsiX. Die negativen Fluoreszenzintensitäten kommen durch die Art der Berechnung der Werte zu Stande. Die Eigenfluoreszenz des

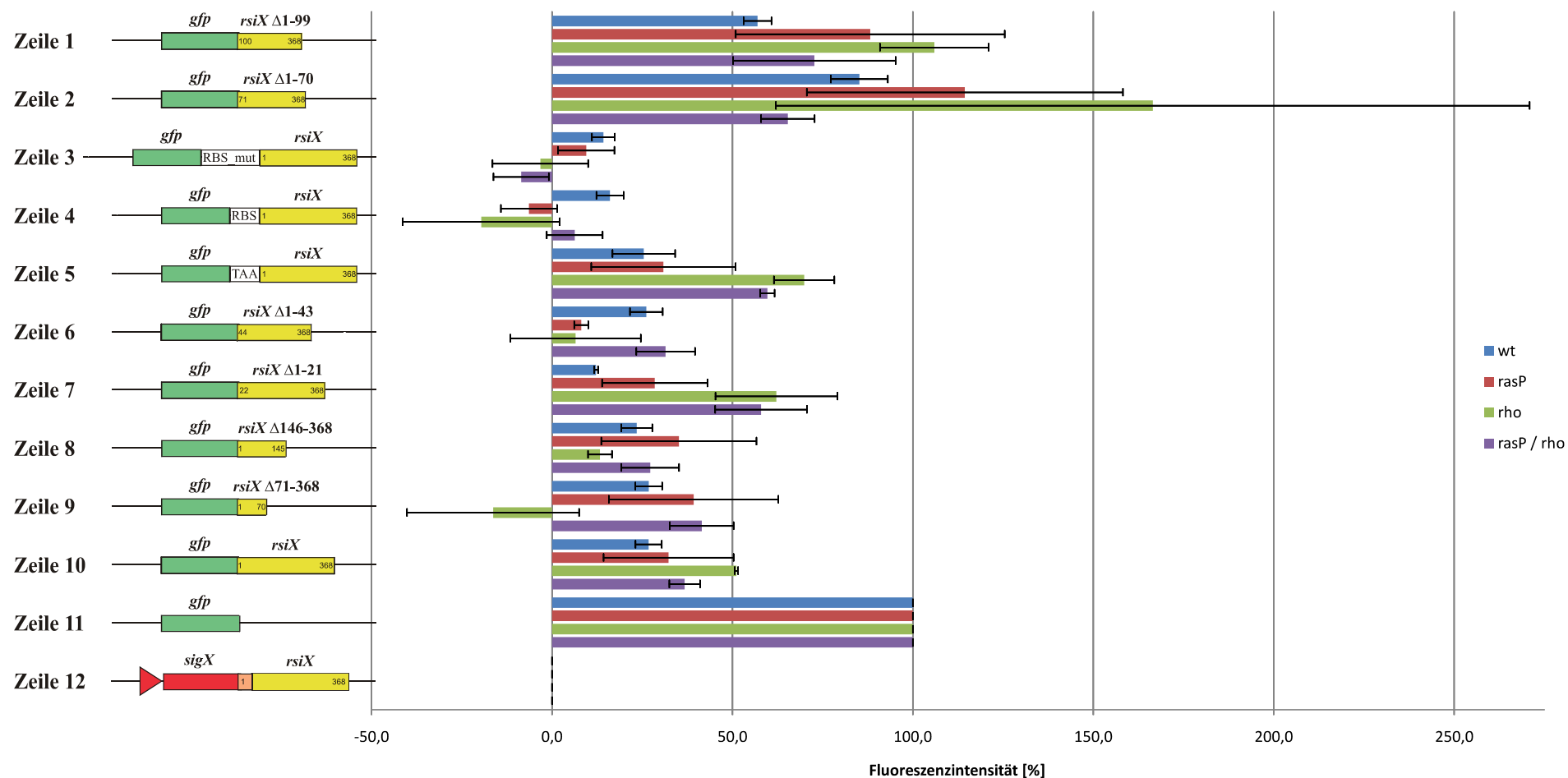


Abbildung 22: Grafische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten verschiedener *B. subtilis* Stämme, welche GFP-RsiX in unterschiedlichen Varianten exprimieren, um die rut-site von *rsiX* zu kartieren. Die vertikale Achse gibt die relevanten chromosomalen Situationen der einzelnen Reporterstämme wieder. Auf der horizontalen Achse wurden die Fluoreszenzintensitäten in % abgebildet. Jede Zeile zeigt die Fluoreszenzintensität eines Reporters in den folgenden vier genetischen Hintergründen: Wildtypintergrund (wt, blau), $\Delta rasP$ -Hintergrund (rasP, rot), Δrho -Hintergrund (rho, grün) sowie Doppelknockout von *rasP* und *rho* (rasP / rho, violett). Die Fluoreszenzintensitäten des Wildtypoperons (Zeile 12) wurden als 0% gewertet und die Intensitäten für den Reporter, welcher nur GFP exprimiert (Zeile 11) wurde als 100% angenommen und für die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensitäten aller anderen Stämme herangezogen. Die Fehlerbalken geben die berechneten Werte der Standardabweichung an.

Wildtypstammes 1012 (Zeile 12) wurde vor der Berechnung der relativen Fluoreszenz von den Messwerten abgezogen. Das zusätzliche Stopp-Codon der Fusion in Zeile 5 macht lediglich deutlich, dass Rho sogar die Expression eines Gens beeinflusst, welches stromaufwärts von dem Gen mit einer *rut*-site liegt. In diesem Fall liegt keine translationelle Fusion vor und *gfp* sollte unabhängig von *rsiX* translatiert werden, was eine starke Fluoreszenz zur Folge hätte. Jedoch lässt nur die Deletion von *rho* bzw. von *rho* und *rasP* die Fluoreszenz dieses Reporters auf etwa den doppelten Wert ansteigen. Die N-terminale Deletion von 43 Aminosäuren (Zeile 6) sowie die C-terminalen Deletionen von 223 (Zeile 8) bzw. 298 Aminosäuren (Zeile 9) zeigen sogar, dass Rho hier offenbar keinen Einfluss hat. Beim Vergleich der wildtypischen Fluoreszenz mit der für den Knockout von *rho* ist die Fluoreszenz im Knockout sogar deutlich geringer. Die GFP-Fusion mit der Volllängenform von RsiX (Zeile 10) und die Fusion mit einer N-terminal verkürzten Form um 21 Aminosäuren (Zeile 7) zeigen ein ähnliches Ergebnis. Es ist im Wildtyphintergrund eine sehr geringe Fluoreszenz zu erkennen, welche im $\Delta\rho$ -Hintergrund deutlich höher ist. In Bezug auf die Lokalisation der *rut*-site hat dies aber nur insoweit eine Bedeutung, dass sie nicht in der Sequenz der ersten 21 Aminosäuren zu finden ist.

Einen deutlichen Hinweis auf die Lokalisation der *rut*-site geben dagegen die Reporterfusionen in den Zeilen 1 und 2. Es ist ersichtlich, dass bei Deletion der ersten 70 (Zeile 2) bzw. 99 Aminosäuren (Zeile 1) die Werte für die Fluoreszenz im Wildtyphintergrund bereits höher sind als bei einigen anderen Reportern im $\Delta\rho$ -Hintergrund. Die Intensitäten der Fluoreszenz dieser beiden Stämme im $\Delta\rho$ -Hintergrund übersteigt sogar die des Referenzstammes in Zeile 11.

Die Analyse der Fluoreszenz dieser Reporterstämme zeigte, dass die *rut*-site für *rsiX* in der Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 44 bis 70 liegen muss. Die Deletion der ersten 43 Aminosäuren (Zeile 6) zeigte noch keine erhöhte Fluoreszenz im Wildtyphintergrund. Diese wurde erst mit der Deletion der ersten 70 Aminosäuren beobachtet. Damit konnte die *rut*-site einer bestimmten Region in der Sequenz von *rsiX* zugeordnet werden. Sie befindet sich ungefähr in dem Bereich, welcher für die Transmembrandomäne kodiert. Die Transmembrandomäne von RsiX wird von den Aminosäuren 48 bis 64 gebildet (Abbildung 23).

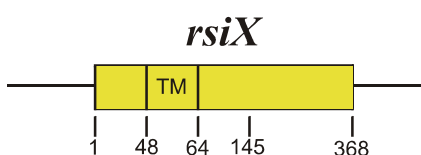


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Gens *rsiX* aus *B. subtilis*. Die Nummern im unteren Teil der Abbildung bezeichnen die entsprechenden Aminosäuren. Von den Aminosäuren 48 bis 64 wird die Transmembrandomäne (TM) gebildet.

3.8.2 Western Blot Analysen zur Lokalisation der *rut*-site

Im Folgenden wurden mit den Stämmen aus Abbildung 22 (Zeilen 1 – 2 und 6 – 10) Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei wurden lediglich der Wildtyphintergrund und der $\Delta\rho$ -Hintergrund betrachtet. Das entsprechende Luminogramm ist in Abbildung 24 dargestellt. Der immunologische Nachweis der GFP-RsiX-Fusionen erfolgte mit Antikörpern gegen GFP. Dabei wurde zur Analyse stets das gesamte Zellextrakt verwendet. Für die Volllängenform von RsiX in Fusion mit GFP wurde eine Proteingröße von 68 kDa erwartet. Die durch N- oder C-terminale Deletionen entstandenen verkürzten Formen des Anti-Sigmafaktors in Fusion mit GFP besitzen eine entsprechend geringere Proteingröße.

Das Ergebnis der Western Blot Analyse sollte identisch mit den Messungen der Fluoreszenzintensitäten in Kapitel 3.8.1 sein. Es wird erwartet, dass für die Stämme *gfp-rsiX* Δ 1-70 sowie *gfp-rsiX* Δ 1-99 das Fusionsprotein aus GFP und dem Anti-Sigmafaktor sowohl im Wildtyphintergrund als im $\Delta\rho$ -Hintergrund nachweisbar ist. Betrachtet man die Spuren 11 und 12 sowie 13 und 14 in Abbildung 24 ist dies auch erkennbar. Das Fusionsprotein gibt in beiden Fällen ein klares Signal bei etwa 60 kDa. Dies bedeutet, dass durch die N-terminalen Deletionen die *rut*-site entfernt wurde und somit Rho keinen Einfluss mehr hat. Das wiederum führte zum Vorhandensein des Anti-Sigmafaktors RsiX in Fusion

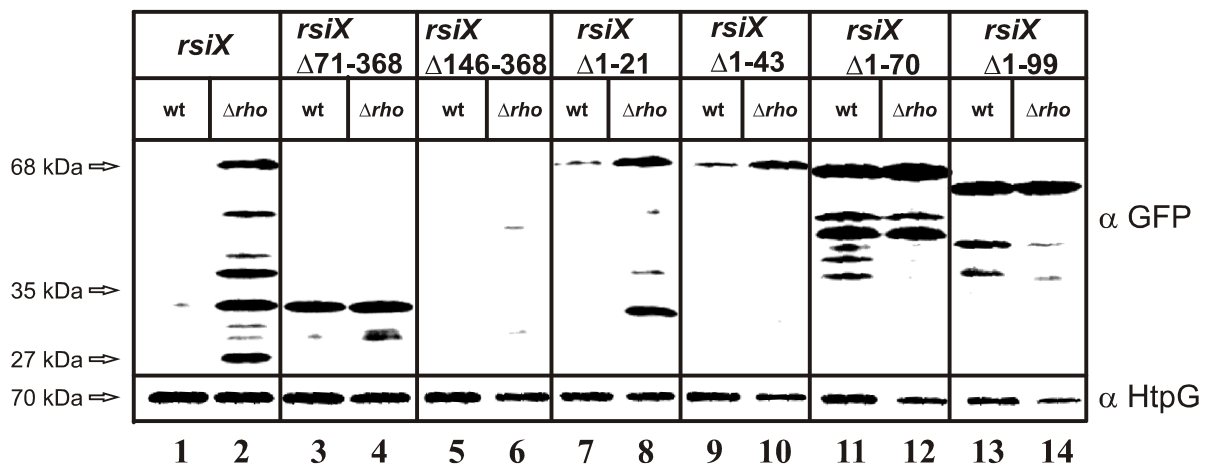


Abbildung 24: Luminogramm der Western Blot Analyse verschiedener *B. subtilis* Stämme zur Kartierung der *rut*-site in *rsiX*. Die Menge des Anti-Sigmafaktors RsiX in Fusion mit GFP wurde im Wildtyphintergrund (wt) und im $\Delta\rho$ -Hintergrund betrachtet. Es wurden sowohl die Volllängenform von RsiX (*rsiX*) als auch verschiedene Deletionen (Δ) analysiert. Die Zahlen bezeichnen dabei jeweils die deletierten Aminosäuren. Die Proteine des Gesamtzellextraktes (10 μ g/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis von GFP-RsiX erfolgte mit Antikörpern gegen GFP. Mit der Ladungskontrolle (2 μ g/Spur) wurde in gleicher Art verfahren, aber die Entwicklung des Blots erfolgte mit Antikörpern gegen das cytoplasmatische Protein HtpG. Die Größen der detektierten Proteine sind links neben dem Luminogramm aufgezeigt.

mit GFP. Bei den Signalen für die Proteine, deren ungefähre Größe zwischen 35 und 50 kDa liegt, handelt es sich um Proteolyseprodukte, welche beim Abbau der Reporterfusion entstehen. Das Ergebnis für die Volllängenform von RsiX (Spuren 1 und 2) in Abbildung 24 zeigt das bereits bekannte Ergebnis. Der Anti-Sigmafaktor ist im Wildtyphintergrund nicht nachweisbar. Man erhält kein Signal für das Protein. Nur im Δrho -Hintergrund konnte RsiX mit der erwarteten Größe von 68 kDa detektiert werden. Zusätzlich sind auch hier Proteolyseprodukte verschiedener Größen nachweisbar. Für die N-terminalen Deletionen von 21 (Spuren 7 und 8) bzw. 43 Aminosäuren (Spuren 9 und 10) erhielt man im Wildtyphintergrund ein nur sehr schwaches Signal für das Fusionsprotein. Doch auch hier zeigen deutliche Signale im Δrho -Hintergrund das Fusionsprotein an, ähnlich wie es auch schon für die Volllängenform von RsiX zu beobachten war (Spuren 1 und 2). Das Signal bei ca. 33 kDa in Spur 8 zeigt wieder ein Proteolyseprodukt an. Die rut-site ist also nicht in der Sequenz der ersten 43 Aminosäuren lokalisiert.

Für die C-terminale Deletion ab Aminosäure 146 (Spuren 5 und 6) konnte weder im Wildtyphintergrund noch im Δrho -Hintergrund ein Signal detektiert werden. Dies deutet daraufhin, dass der Anti-Sigmafaktor unabhängig von Rho kein detektierbares Fusionsprotein bildet. Obwohl der Transmembrandomäne-kodierende Bereich (und damit vermutlich auch die rut-site) noch vorhanden ist (vgl. Abbildung 23), scheinen die noch folgenden etwa 225 Nukleotide nicht auszureichen, um die Transkription durch die Aktivität von Rho zu terminieren. Das bestätigen auch die Ergebnisse der Northern Blot Experimente in Abbildung 25. Die verkürzte Form des Anti-Sigmafaktors unterliegt wahrscheinlich sowohl im Wildtyphintergrund als auch im Δrho -Hintergrund einer Proteolyse, denn kein Fusionsprotein ist nachweisbar. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen in Abbildung 22 weisen ebenfalls darauf hin.

Bei Betrachtung der Resultate für die C-terminale Deletion ab Aminosäure 71 (Spuren 3 und 4) erkennt man erneut keinen Einfluss von Rho, denn im Wildtyphintergrund und auch im Δrho -Hintergrund konnte das Fusionsprotein aus GFP und RsiX detektiert werden. Allerdings steht dies im Widerspruch zu den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen in Abbildung 22. Hier wurde zwar auch kein Einfluss von Rho festgestellt, aber das Fusionsprotein war aufgrund der fehlenden Fluoreszenz nicht nachweisbar. Da aber auch in Kapitel 3.5.2 kein Anti-Sigmafaktor als verkürzte Form in den gleichen genetischen Hintergründen bestimmbar war, muss man in Abbildung 24 in den Spuren 3 und 4 von einem Fehler (z. B. einer zu langen Belichtungszeit) ausgehen. Der fehlende Einfluss von Rho wird auch in den folgenden Northern Blot Analysen bestätigt (Abbildung 25).

Fasst man die Ergebnisse aus Abbildung 24 zusammen, erhält man das gleiche Ergebnis, welches schon die Messungen der Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 22 zeigten. Die *rut*-site von *rsiX* muss sich innerhalb der Nukleotidsequenz befinden, welche für die Aminosäuren 44 bis 70 kodiert, also in der Region, welche für die Transmembrandomäne kodiert.

Die Ladungskontrolle dieser Western Blot Experimente lieferte in allen 14 Spuren eindeutige Signale bei 70 kDa für das cytoplasmatische Protein HtpG.

3.8.3 Northern Blot Analysen und die Einführung von Punktmutationen zur genauen Bestimmung der *rut*-site in *rsiX*

Im Anschluss sollten die bisherigen Ergebnisse zur Lokalisation der *rut*-site zusätzlich in Northern Blot Analysen bestätigt werden. Dazu wurden zunächst die gleichen Stämme untersucht, welche auch schon für die Western Blot Experimente in Abbildung 24 verwendet wurden. Das *gfp-rsiX*-Transkript wurde durch Verwendung einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *gfp* detektiert. Für diese Experimente sollten die *gfp-rsiX*-Transkripte wiederum im Wildtyphintergrund und auch im $\Delta\rho$ -Hintergrund betrachtet werden. Das Luminogramm dieser Analyse ist in Abbildung 25 zu sehen. Dabei wurde für die Vollformen von *rsiX* in Fusion mit *gfp* eine Transkriptgröße von ca. 2200 Basen wie erwartet erhalten. Die durch Deletionen am 5'- bzw. 3'-Ende verkürzten Formen von *rsiX* (Abbildung 25, Spuren 3 bis 14 sowie 17 und 18) zeigten ein entsprechend kürzeres Transkript auf.

Das Resultat dieser Untersuchung stimmt sowohl mit den Ergebnissen für die Western Blot Experimente als auch für die Messungen der Fluoreszenzintensitäten überein. Die Detektion des *gfp-rsiX*-Transkriptes im Wildtyphintergrund und im $\Delta\rho$ -Hintergrund für die beiden N-terminalen Deletionen von 70 bzw. 99 Aminosäuren (Abbildung 25, Spuren 11 bis 14) bestätigt das zuvor erhaltene Ergebnis, dass sich die *rut*-site im Bereich der Transmembrandomäne-kodierenden Sequenz befindet. Wäre das nicht der Fall, würde man im Wildtyphintergrund in beiden Fällen keine Signale erhalten. Nur durch das Fehlen der *rut*-site konnte in den Spuren 11 und 13 trotz des Vorhandenseins von Rho nicht terminiert werden.

Das Ergebnis für die N-terminalen Deletionen von 21 bzw. 43 Aminosäuren in den Spuren 7 bis 10 zeigt hingegen, dass in diesen Fällen die *rut*-site noch vorhanden ist. Im Wildtyphintergrund konnte Rho die Transkription noch terminieren, was im Fall des Knockouts von *rho* nicht mehr erfolgte, weshalb die Transkripte detektiert werden konnten.

So kann auch anhand der Ergebnisse der Northern Blot Experimente der Bereich der *rut*-site auf die Nukleotidsequenz festgelegt werden, welche für die Aminosäuren 44 bis 70 kodiert.

Für die Volllängenform von *rsiX* (Spuren 1 und 2 sowie 15 und 16 in Abbildung 25) wurde das bekannte Ergebnis erhalten. Da die *rut*-site vorhanden ist, erfolgte die Transkriptionstermination durch Rho im Wildtyphintergrund und kein Transkript war nachweisbar. Sobald Rho nicht mehr funktionell war, fand auch keine Termination statt und das Transkript wurde im $\Delta\rho$ -Hintergrund detektiert.

Für die C-terminalen Deletionen ab der 71. bzw. 146. Aminosäure in den Spuren 3 bis 6 fällt das Ergebnis wie erwartet aus. Obwohl hier die *rut*-site den vorgenannten Ergebnissen entsprechend noch in der Sequenz von *rsiX* vorhanden ist, kann kein Einfluss des Transkriptionsterminators Rho festgestellt werden. Für den $\Delta\rho$ -Hintergrund und auch für den Wildtyphintergrund, obgleich etwas schwächer, konnte das *gfp-rsiX*-Transkript detektiert werden. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, scheint die Transkription der verkürzten Formen von *rsiX*, auch wenn die *rut*-site nicht deletiert wurde, nicht durch Rho

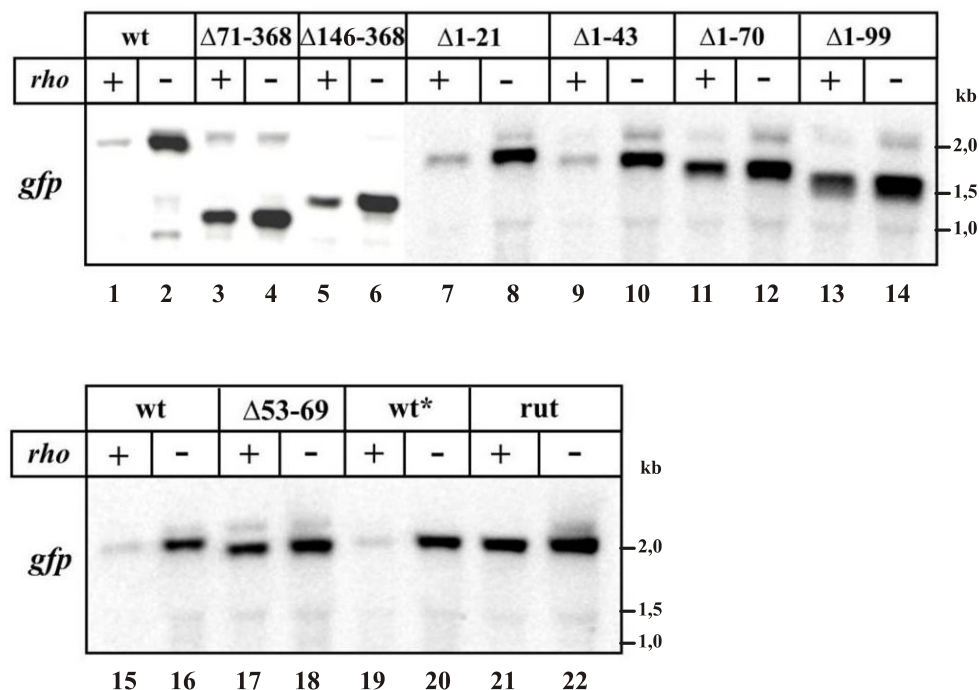


Abbildung 25: Luminogramm der Northern Blot Analyse verschiedener *B. subtilis* Stämme zur Kartierung der *rut*-site in *rsiX*. Die Stämme wurden im Wildtyphintergrund (*rho*+) und im $\Delta\rho$ -Hintergrund (*rho*-) betrachtet. Es wurden sowohl die Volllängenform von *rsiX* (wt) als auch verschiedene Deletionen (Δ) analysiert. Die Zahlen bezeichnen dabei jeweils die deletierten Aminosäuren. wt* bezeichnet eine restaurierte Form von *rsiX* mit zwei stillen Mutationen. Mit der Bezeichnung *rut* wurde der Stamm benannt, bei welchem durch Punktmutationen die *rut*-site zerstört wurde. Die elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte im 1,2%igen denaturierenden Agarosegel bei 80 V. Danach wurden die Ribonukleinsäuren auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten RNA-Sonde gegen *gfp*. Die Größen der detektierten RNA-Moleküle sind rechts neben dem Luminogramm aufgezeigt.

terminiert zu werden. Die verbleibenden wenigen Nukleotide nach der *rut*-site in der Sequenz des am 3'-Ende verkürzten *rsiX* scheinen dafür nicht auszureichen. Der Faktor Rho benötigt für seine Aktivität als Transkriptionsterminator demnach noch weitere Sequenzen von *rsiX*.

Die *rut*-site ist eine Region, welche reich an Cytidin und arm an Guanosin ist (Bear *et al.* 1988; Alifano *et al.* 1991). Innerhalb der Nukleotidsequenz, welche für die Aminosäuren 44 bis 70 kodiert und wo die *rut*-site für *rsiX* lokalisiert ist, gibt es eine Region, auf die diese Eigenschaften zutrifft. In der Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 53 bis 69 existiert eine 26 bp lange Sequenz, die gar kein Guanosin enthält, dafür aber acht Cytidin (Abbildung 26, gelber Rahmen). In nachfolgenden Analysen wurde diese Sequenz genauer untersucht.

Die Spuren 17 und 18 der Abbildung 25 zeigen das Resultat der Northern Blot Experimente für einen Reporterstamm, in welchem Teile der Transmembrandomäne von RsiX (die Aminosäuren 53 bis 69) deletiert wurden. Es ist zu erkennen, dass man sowohl im Wildtyphintergrund als auch für den Knockout von *rho* ein klares Signal für das *gfp-rsiX*-Transkript in der erwarteten Größe erhielt. Dies bestätigt die vorherigen Erkenntnisse, dass sich die *rut*-site innerhalb der Sequenz für die Aminosäuren 44 bis 70 befindet. Das Fehlen der *rut*-site führt hier dazu, dass der Faktor Rho im Wildtyphintergrund nicht terminieren kann und somit das Transkript detektierbar ist.

In den Spuren 19 und 20 der Abbildung 25 ist das Ergebnis der Northern Blot Analyse für eine Vollängenform von *rsiX* zu sehen. Sie unterscheidet sich vom wildtypischen *rsiX* lediglich in zwei Basen, welche durch Klonierungsschritte ausgetauscht wurden und dann als stille Mutationen auftraten. Bei diesem restaurierten Wildtyp (wt*) wurde die wildtypische Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 53 bis 69 wieder in den Reporterstamm *gfp-rsiX* Δ 53-69 (Spuren 17 und 18) eingefügt. Diese zwei stillen Mutationen wirkten sich allerdings auf den Einfluss der Aktivität des Transkriptionsterminators Rho nicht aus. Es ist zu erkennen, dass das Transkript wie für den Wildtyp (Spuren 1 und 2 sowie 15 und 16) nur bei einem Knockout von *rho* nachweisbar ist.

Aus diesem Grund konnte der Reporterstamm *gfp-rsiX* Δ 53-69 (Spuren 17 und 18) auch verwendet werden, um eine durch Punktmutationen leicht veränderte Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 53 bis 69 einzufügen. Die Sequenz wurde so geändert, dass im Bereich der Aminosäuren 61 bis 68 fünf Nukleotide ausgetauscht wurden ohne die Aminosäuresequenz zu ändern (Abbildung 26). Durch diese stillen Mutationen wurden drei Guanosin eingeführt und die markierten Cytidin in Abbildung 26 sind verloren gegangen. Auf diese Art wurden die Merkmale einer *rut*-site zerstört. Für diesen Bereich der *rut*-site von *rsiX* hat man so einen

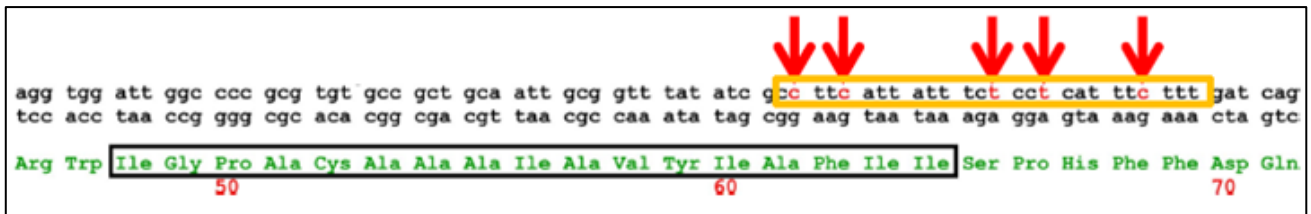


Abbildung 26: Auszug aus der Sequenz für das wildtypische Gen *rsiX* aus *B. subtilis*. Oben: **Nukleotidsequenz der dsDNA.** Der gelbe Rahmen kennzeichnet den Bereich der *rut*-site, bei welchem in dem Reporterstamm 1012 *amyE::P_{groE}-gfp-rsiX* *rut* durch fünf Punktmutationen (rote Pfeile) stille Mutationen als Nachweis der *rut*-site eingefügt wurden. Unten: **Die entsprechende Aminosäuresequenz des Anti-Sigmafaktors RsiX.** Der schwarze Rahmen kennzeichnet den Bereich der Transmembrandomäne von RsiX, die Zahlen bezeichnen die Position der jeweiligen Aminosäure in der Proteinsequenz.

Überschuss an Guanosin erzeugt. Die Sequenz mit dieser mutierten *rut*-site wurde anschließend in den Reporterstamm *gfp-rsiX* Δ 53-69 eingeführt. Der resultierende Stamm *gfp-rsiX_{rut}* (Abbildung 25, Spuren 21 und 22) zeigt in den Northern Blot Experimenten das erwartete Ergebnis. Die durch stille Mutationen leicht veränderte Sequenz der *rut*-site führte zu einer ähnlich starken Detektion des *gfp-rsiX*-Transkriptes sowohl im Wildtyphintergrund als auch im Δ *rho*-Hintergrund. Die fünf Punktmutationen zerstörten die Funktionalität der *rut*-site.

Es kann daher festgelegt werden, dass sich ein funktioneller Teil der *rut*-site innerhalb der Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 44 bis 70 befindet. Dabei scheint insbesondere die Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 61 bis 69 eine wichtige Funktion einzunehmen, da die Einführung von stillen Mutationen in diese Sequenz die Wirkungsweise der *rut*-site zerstörte. Zudem findet man in dieser Sequenz fast kein Guanosin, aber dafür vermehrt Cytidin, womit die Erkenntnisse von Bear *et al.* sowie Alifano *et al.* bestätigt werden können.

3.9 Proteolyse von RsiX

Für den Anti-Sigmafaktor RsiW aus *B. subtilis* konnte bereits gezeigt werden, dass RIP, die regulierte intramembrane Proteolyse, stattfindet, um RsiW bei bestimmten Stressbedingungen abzubauen, damit der Sigmafaktor σ^W nicht länger inhibiert wird (Heinrich & Wiegert 2009). Bei diesem Prozess sind mehrere Proteasen beteiligt, u. a. PrsW (Heinrich & Wiegert 2006), RasP (Schöbel *et al.* 2004) und auch die cytoplasmatische Protease ClpXP (Heinrich *et al.* 2009). In Kapitel 3.3 wurde zuvor gezeigt, dass die beiden Proteasen PrsW und RasP im Wildtyphintergrund auf die Konzentration von RsiX keinen Einfluss haben. Mit den neu

gewonnenen Erkenntnissen, dass der Transkriptionsterminator Rho die *rsiX*-Expression beeinflusst, wird in diesem Kapitel erneut untersucht, ob die genannten Proteasen an einer möglichen Proteolyse von RsiX beteiligt sind. Für diese Betrachtungen wurde allerdings die *rut*-site von *rsiX* so mutiert, dass Rho die *rsiX*-Transkription nicht mehr terminieren kann und so das *rsiX*-Transkript translatiert werden kann.

Zur Untersuchung des Einflusses der oben genannten Proteasen wurden zwei verschiedene Formen von *rsiX* analysiert. Es handelt sich dabei um die im Kapitel 3.8.3 beschriebenen Varianten von *rsiX*, bei welchen durch stille Mutationen zum einen der Wildtyp restauriert (wt*) und zum anderen die *rut*-site (*rut*) zerstört wurde. Für beide Fälle wurde *rsiX* unter die Kontrolle des IPTG-regulierbaren Promotors P_{spac} gestellt, damit die Transkription von *rsiX* gezielt reguliert werden konnte. Zudem wurde an das N-terminale Ende von RsiX ein FLAG-tag fusioniert, so dass immunologische Nachweise möglich waren. Zusätzlich verfügten die verwendeten Reporterstämme noch über eine *dltA-lacZ*-Fusion (Abbildung 4, oben) wie sie in Kapitel 3.2 beschrieben wurde, damit Messungen der β -Galaktosidase-Aktivitäten möglich wurden.

3.9.1 Intramembrane Proteolyse von RsiX durch RasP

Zunächst wurden Western Blot Analysen von den Membranfraktionen der beschriebenen *B. subtilis* Stämme mit verschiedenen genetischen Hintergründen durchgeführt. Das resultierende Luminogramm ist in Abbildung 27 dargestellt. Es zeigt in den Spuren 1 bis 4 das Ergebnis für den restaurierten Wildtyp von *rsiX* im Wildtyphintergrund (Spuren 1 und 2; KS245) und im Knockout von *rasP* (Spuren 3 und 4; KS242). Es ist wie erwartet zu erkennen, dass man unabhängig von der IPTG-Zugabe kein Signal für den FLAG-getaggen Anti-Sigmafaktor RsiX detektieren konnte. Lediglich schwache unspezifische Hintergrundsignale bei 40 kDa wurden registriert. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 3.3, dass das *rsiX*-Transkript in Gegenwart des Faktors Rho und einer intakten *rut*-site aufgrund der Termination abgebaut wird und daher nicht translatiert werden kann. Im rechten Teil der Abbildung 27 (Spuren 5 bis 8) ist das Ergebnis gezeigt, wenn die *rut*-site von *rsiX* durch stille Mutationen zerstört wurde (KS246 bzw. KS243). Für diesen Fall konnte FLAG-RsiX detektiert werden. Man erkennt in Spur 6 nach IPTG-Zugabe das Signal für die Vollformenform von RsiX im Wildtyphintergrund bei ca. 60 kDa. In Spur 8 erkennt man

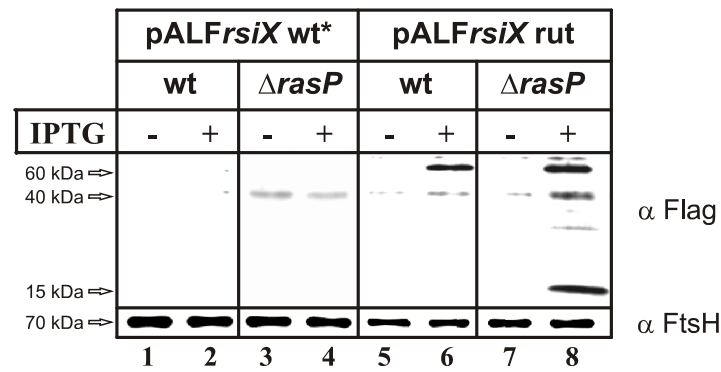


Abbildung 27: Luminogramm der Western Blot Analyse von *B. subtilis* Stämmen hinsichtlich einer Proteolyse von RsiX mit RasP Beteiligung. Die Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX wurde im Wildtyphintergrund (wt) und im $\Delta rasP$ -Hintergrund betrachtet. Durch Verwendung des Plasmides pAL-FLAG konnte RsiX N-terminal mit einem FLAG-tag fusioniert werden (pALFrsiX). wt* bezeichnet eine restaurierte Form von *rsiX* mit zwei stillen Mutationen. Mit der Bezeichnung rut wurde der Stamm benannt, bei welchem durch Punktmutationen die rut-site von *rsiX* zerstört wurde. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse mit IPTG (+; Endkonzentration: 1 mM) und ohne IPTG (-) -Zugabe. Der verwendete Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die Proteine der Membranfraktion (20 μ g/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis von FLAG-RsiX erfolgte mit Antikörpern gegen FLAG. Mit der Ladungskontrolle (2 μ g/Spur) wurde in gleicher Art verfahren, aber die Entwicklung des Blots erfolgte mit Antikörpern gegen das membrangebundene Protein FtsH. Die Größen der detektierten Proteine sind links neben dem Luminogramm aufgezeigt.

neben der Volllängenform von RsiX bei ca. 60 kDa und unspezifischen Hintergrundsignalen auch noch ein starkes Signal bei etwa 15 kDa. Bei diesem Signal handelt es sich um eine proteolytisch bedingte verkürzte Form von RsiX, welche sich durch den Knockout von *rasP* in der Membranfraktion angereichert hat. Dies zeigt, dass zum einen der Anti-Sigmafaktor RsiX durch Proteolyse prozessiert wird und zum anderen, dass die Site-2 Protease RasP durchaus daran beteiligt ist.

Die Ladungskontrolle für diese Western Blot Analyse lieferte, wie zu erwarten, in allen 8 Spuren klare Signale bei 70 kDa für die membrangebundene Metalloprotease FtsH.

Zusätzlich konnte eine Beteiligung von RasP an der Proteolyse von RsiX durch Messungen der β -Galaktosidase-Aktivitäten gezeigt werden. Dafür wurden die gleichen Stämme wie für den Western Blot betrachtet. In Abbildung 28 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Man erhielt das bereits bekannte Ergebnis. Für den restaurierten Wildtyp von *rsiX* konnte sowohl im Wildtyphintergrund als auch im Knockout von *rasP* die Deletion von *rsiX* durch IPTG-Zugabe nicht komplementiert werden (vgl. Abbildung 6). Die zu erkennende Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität nach der Zugabe von IPTG ist nicht signifikant. Anders das Ergebnis für den Stamm, bei welchem die rut-site von *rsiX* durch stille Mutationen zerstört wurde. Es ist ein deutlicher Rückgang der β -Galaktosidase-Aktivität nach IPTG-Zugabe zu erkennen. Dies zeigt erneut, dass die Möglichkeit, die Deletion von *rsiX* zu komplementieren

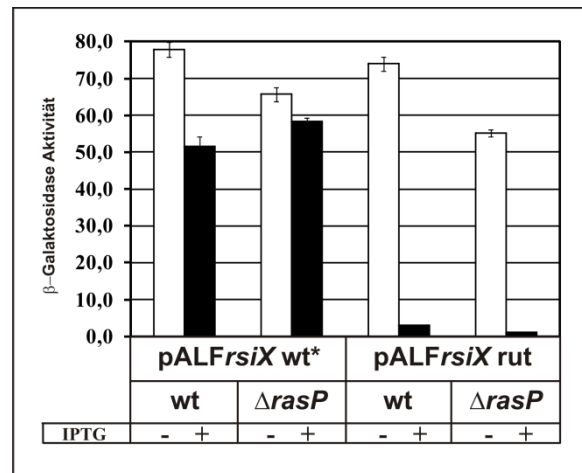


Abbildung 28: Ergebnisse der β -Galaktosidase-Aktivitätstests von *B. subtilis* Stämmen hinsichtlich einer Proteolyse von RsiX mit RasP Beteiligung. Die Aktivitäten wurden im Wildtyphintergrund (wt) und im $\Delta rasP$ -Hintergrund betrachtet. Durch Verwendung des Plasmides pAL-FLAG konnte die Transkription von *rsiX* mit IPTG induziert werden (pALFrsiX). wt* bezeichnet eine restaurierte Form von *rsiX* mit zwei stillen Mutationen. Mit der Bezeichnung rut wurde der Stamm benannt, bei welchem durch Punktmutationen die rut-site von *rsiX* zerstört wurde. Die *dltA-lacZ*-Reporterfusion wird durch σ^X -Aktivität induziert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse mit IPTG (+; Endkonzentration: 1 mM) und ohne IPTG (-) -Zugabe. Der verwendete Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die Probenahme für die Messung der Aktivitäten erfolgte beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase. Die Aktivitäten beziehen sich jeweils auf 1 OD₅₇₈ zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie bei Wiegert *et al.* (2001) beschrieben. Die Fehlerbalken geben die berechneten Werte der Standardabweichung an.

nur besteht, wenn die rut-site zerstört ist und somit Rho die Transkription nicht mehr terminieren kann. Der Anti-Sigmafaktor konnte translatiert werden, wodurch die σ^X -Aktivität aber inhibiert und damit auch die *lacZ*-Reporterfusion nicht transkribiert werden konnte. Für einen Beweis der Beteiligung von RasP an der Proteolyse von RsiX sollte die β -Galaktosidase-Aktivität im Knockout von *rasP* signifikant kleiner sein als im Wildtyp. Dies ist aber in Abbildung 28 nicht zu erkennen.

Um dies weiter zu untersuchen, wurden im Gegensatz zur vorherigen Messung nun über einen Zeitraum von 5 Stunden kontinuierlich Proben genommen und analysiert. In anderen Arbeiten wurde schon gezeigt, dass die Induktion des σ^X -Regulons von der Wachstumsphase abhängt. Es wurde gefunden, dass das Maximum der σ^X -Aktivität in der späten logarithmischen Wachstumsphase vorliegt (Huang *et al.* 1997). Zusätzlich wurde hier auch noch die Konzentration an IPTG in der Kultur von bisher 1 mM auf jetzt 250 μ M verringert. Die Ergebnisse der erneuten Aktivitätsmessung für den Stamm mit der mutierten rut-site sind in Abbildung 29 zu sehen. Betrachtet man zunächst das Resultat ohne eine durch IPTG induzierte *rsiX*-Transkription, erkennt man deutlich, dass, wie auch in Abbildung 28, die Aktivitäten während des Wachstums sowohl für den Wildtyp als auch für den $\Delta rasP$ -Hintergrund relativ hoch und zudem auch relativ ähnlich zueinander sind. Durch den

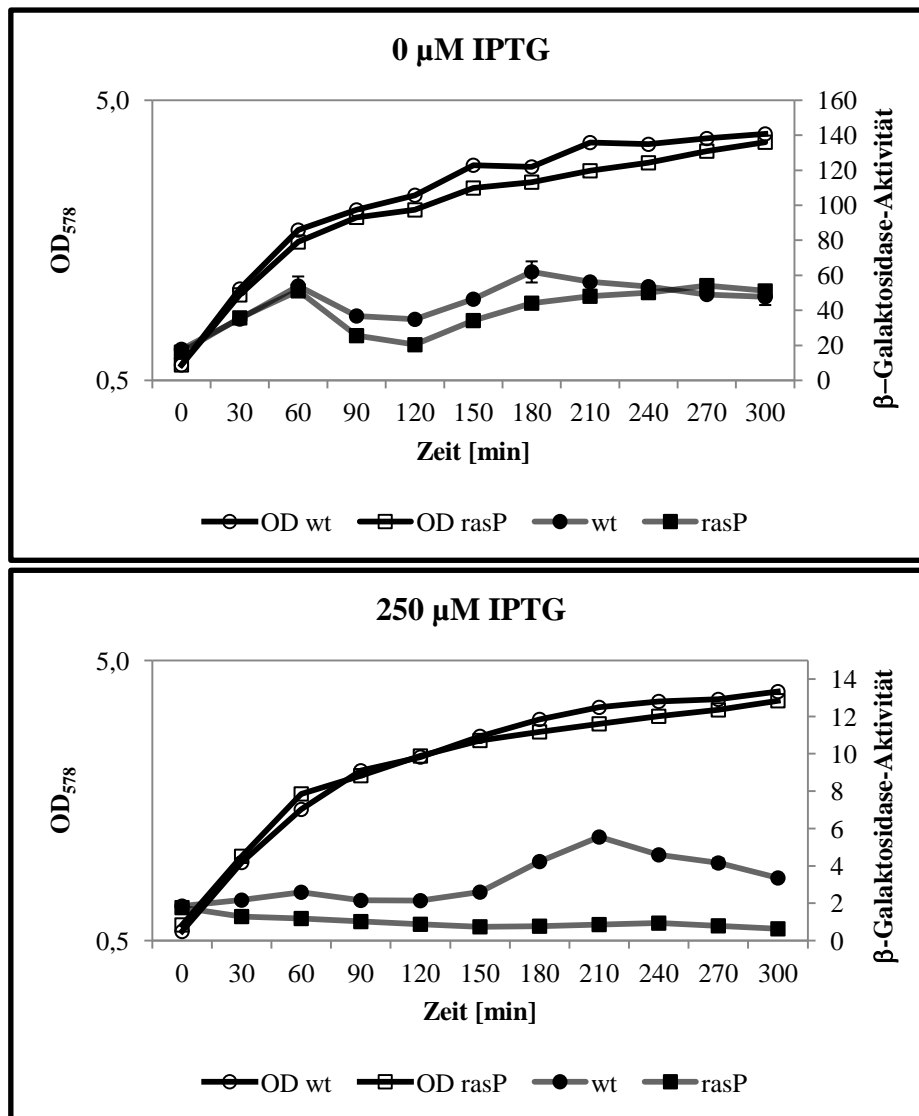


Abbildung 29: Ergebnisse der β -Galaktosidase-Aktivitätstests der *B. subtilis* Stämme KS246 (pALFrsiX rut) und KS243 (pALFrsiX rut Δ rasP) hinsichtlich einer Proteolyse von RsiX mit RasP Beteiligung. Die Bezeichnung rut wurde gewählt, weil durch Punktmutationen die rut-site von rsiX zerstört wurde. **Sekundärachse:** Die β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden im Wildtyphintergrund (wt) und im Δ rasP-Hintergrund betrachtet. Durch Verwendung des Plasmides pAL-FLAG konnte die Transkription von rsiX mit IPTG induziert werden (pALFrsiX). Die *dltA-lacZ*-Reporterfusion wird durch σ^X -Aktivität induziert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse ohne IPTG (0 μ M; oben) und mit IPTG (250 μ M; unten) -Zugabe. Der verwendete Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die Probenahme für die Messung der Aktivitäten erfolgte kontinuierlich alle 30 min. Die Aktivitäten beziehen sich jeweils auf 1 OD₅₇₈ zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie bei Wiegert *et al.* (2001) beschrieben. Die Fehlerbalken geben die berechneten Werte der Standardabweichung an. **Primärachse: Wachstumskurve der entsprechenden Stämme.** Die OD₅₇₈ wurde alle 30 min gemessen.

Knockout des Anti-Sigmafaktors in den verwendeten Reporterstämmen ist der Sigmafaktor σ^X nicht inhibiert, wodurch die Reporterfusion transkribiert werden kann, was wiederum zu den hohen Werten für die β -Galaktosidase-Aktivität führt. Man erkennt, dass mit Beginn des exponentiellen Wachstums von beiden Stämmen auch die σ^X -induzierte Expression der Reporterfusion für beide Stämme steigt. Nach einem leichten Rückgang der β -Galaktosidase-

Aktivität beim Übergang zur stationären Phase, erreicht diese dann zu Beginn der stationären Phase in beiden Fällen etwa den gleichen Wert. Im Gegensatz dazu stehen die deutlich geringeren Aktivitäten nach der Zugabe von IPTG. Es ist zu erkennen, dass im Verlauf des Wachstums die Unterschiede zwischen den Aktivitäten für den Wildtypstamm und für den $\Delta rasP$ -Stamm größer werden. Zu Beginn der stationären Phase ist der Unterschied am größten. Der Wildtypstamm zeigt eine ca. sechsfach höhere Aktivität wie der $\Delta rasP$ -Stamm.

Dieses Ergebnis zeigt auf der einen Seite eine klare Beteiligung der Site-2 Protease RasP an der Proteolyse von RsiX. Auf der anderen Seite kann man aber auch erkennen, dass die Induktion von σ^X in Abhängigkeit von der Wachstumsphase erfolgt. Allerdings wurde hier, anders als bei Huang *et al.* (1997), erst mit Beginn der stationären Phase das Maximum der Aktivierung von σ^X registriert. Diese Aktivierung resultiert aus der Proteolyse des Anti-Sigmafaktors RsiX, welcher u. a. intramembran von RasP prozessiert wird.

3.9.2 Untersuchung zur Beteiligung weiterer Proteasen an der RsiX-Proteolyse

Die site-1 Protease PrsW ist an dem Prozess der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP) von RsiW zur Aktivierung von σ^W beteiligt (Heinrich & Wiegert 2006). Im vorangegangenen Kapitel wurde die Beteiligung von RasP, der site-2 Protease, welche auch bei der Proteolyse von RsiW eine Rolle spielt (Schöbel *et al.* 2004), an der RsiX Proteolyse bereits nachgewiesen. In diesem Kapitel wird der Einfluss der site-1 Protease PrsW und der cytoplasmatischen Protease ClpX auf die Proteolyse von RsiX analysiert. Außerdem soll untersucht werden, ob Proteasen, welche im Stamm *B. subtilis* WB800 (Wu *et al.* 2002) deletiert wurden, an der Proteolyse von RsiX beteiligt sind.

Dafür wurden erneut die Reporterstämme wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 3.9) verwendet. Es wurde neben dem Wildtyp- und $\Delta rasP$ -Hintergrund nun auch der $\Delta prsW$ - sowie der $\Delta clpX$ -Hintergrund betrachtet und der Knockout von 8 Proteasen des Stammes *B. subtilis* WB800 (KS257 bzw. KS258).

Die Ergebnisse der Western Blot Analysen für den restaurierten Wildtyp (Abbildung 30, Spuren 11-20) zeigen erneut, dass eine Komplementation des *rsiX*-Knockouts in Gegenwart des Faktors Rho und der *rut*-site nicht möglich ist. Für jeden dargestellten genetischen

Hintergrund wurden lediglich unspezifische Signale einer Größe von 27 bzw. 40 kDa erhalten, welche auch schon in Abbildung 27 zu sehen waren.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für *rsiX* mit mutierter *rut*-site (Abbildung 30, Spuren 1-10) erkennt man zunächst auch wieder unspezifische Signale bei 27 bzw. 40 kDa. Des Weiteren sind für den Wildtyphintergrund und den $\Delta rasP$ -Hintergrund die bereits bekannten Resultate (vgl. Abbildung 27) zu beobachten. Der Einfluss der Protease RasP ist durch das Vorhandensein der Signale bei ca. 30 bzw. 15 kDa belegt (Spur 4). Die Signale repräsentieren verkürzte Formen des Anti-Sigmafaktors RsiX. Wie auch schon in Abbildung 27 zeigt die 15 kDa Bande das Substrat für die site-2 Protease RasP. Die deutliche Bande bei 30 kDa für eine verkürzte Form von RsiX (diese Bande ist in Abbildung 27 nur sehr schwach zu erkennen) deutet daraufhin, dass RsiX wahrscheinlich ähnlich wie RsiW (Heinrich *et al.* 2009) nicht nur von einer site-1- und einer site-2 Protease prozessiert wird. Das Signal bei 30 kDa lässt auch für RsiX auf eine Zwischenstufe schließen, so dass das Produkt der site-1 Protease nicht gleich das Substrat für RasP darstellt. Es scheint auch in diesem Fall eine weitere Protease aktiv werden zu müssen, bevor das Substrat für RasP entsteht.

Bezüglich der Proteasen ClpX (Spuren 5 und 6) und PrsW (Spuren 7 und 8) sowie der 8 Proteasen, welche im Stamm *B. subtilis* WB800 deletiert sind (Spuren 9 und 10), konnte mit

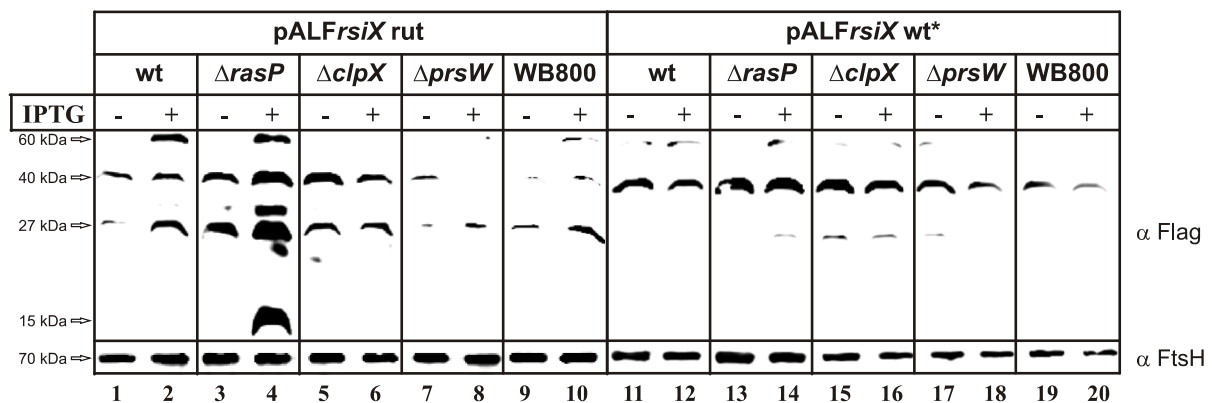


Abbildung 30: Luminogramm der Western Blot Analyse von *B. subtilis* Stämmen zur Untersuchung der Proteolyse von RsiX. Die Stabilität des Anti-Sigmafaktors RsiX wurde im Wildtyphintergrund (wt), im $\Delta rasP$ -, $\Delta prsW$ - und $\Delta clpX$ -Hintergrund betrachtet sowie für den achtfach Proteasen-Knockout, welcher im Stamm *B. subtilis* WB800 (Wu *et al.* 2002) vorliegt (WB800). Durch Verwendung des Plasmides pAL-FLAG konnte RsiX N-terminal mit einem FLAG-tag fusioniert werden (pALFrsiX). wt* bezeichnet eine restaurierte Form von *rsiX* mit zwei stillen Mutationen. Mit der Bezeichnung rut wurde der Stamm benannt, bei welchem durch Punktmutationen die *rut*-site von *rsiX* zerstört wurde. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse mit IPTG (+; Endkonzentration: 1 mM) und ohne IPTG (-) -Zugabe. Der verwendete Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die Proteine der Membranfraktion (25 μ g/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis von FLAG-RsiX erfolgte mit Antikörpern gegen FLAG. Mit der Ladungskontrolle (2 μ g/Spur) wurde in gleicher Art verfahren, aber die Entwicklung des Blots erfolgte mit Antikörpern gegen das membrangebundene Protein FtsH. Die Größen der detektierten Proteine sind links neben dem Luminogramm aufgezeigt.

dem Ergebnis der Western Blots keine Beteiligung an der Proteolyse von RsiX nachgewiesen werden. In dem Luminogramm von Abbildung 30 sind für diese Fälle keine Signale für Proteolyseprodukte von RsiX zu erkennen. Die fehlenden Signale für die Vollformen von RsiX bei 60 kDa im $\Delta clpX$ - und $\Delta prsW$ -Hintergrund nach IPTG-Zugabe sind vermutlich die Folge eines Fehlers beim Übertragen der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran. Vermutlich war an dieser Stelle das Blotting nicht effizient genug. Die Ladungskontrolle für diese Western Blot Analyse lieferte wie zu erwarten in allen 20 Spuren klare Signale bei 70 kDa für die membranassoziierte Metalloprotease FtsH.

Neben den Western Blot Analysen wurden für die oben beschriebenen Stämme, bei welchen die *rut*-site von *rsiX* mutiert wurde, auch Messungen der β -Galaktosidase-Aktivitäten vorgenommen. Wie im Kapitel 3.9.1 bereits angewandt, wurden an dieser Stelle die Aktivitäten auch über einen Zeitraum von 5 Stunden bei einer IPTG-Konzentration von 250 μ M gemessen. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis dieser Aktivitätsmessungen. Die Werte für die β -Galaktosidase-Aktivitäten ohne Induktion von *rsiX* durch IPTG verhalten sich genauso wie es schon für Abbildung 29 (oben) beschrieben wurde - sie sind alle relativ hoch. Nur die Aktivitäten für den Knockout von *clpX* weichen mit Beginn der stationären Phase von den anderen Aktivitäten ab. Sie sind geringer als für die anderen vier Stämme ermittelt, aber immer noch deutlich höher als die entsprechenden Aktivitäten nach Induktion mit IPTG.

Sobald die Transkription von *rsiX* mit IPTG induziert wurde, verhalten sich der Wildtypstamm und der $\Delta rasP$ -Stamm wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 3.9.1). Abbildung 31 (unten) zeigt, dass sich der Stamm mit dem Knockout für *prsW* und auch der Stamm mit dem achtfach Proteasen-Knockout (WB800) ähnlich dem Wildtyp verhalten. Dieses Ergebnis bedeutet, dass diese Proteasen nicht an der Proteolyse von RsiX beteiligt sind. Das entspricht dem Ergebnis der Western Blot Analysen in Abbildung 30. An dieser Stelle kann man außerdem wieder die verstärkte Aktivierung von σ^X mit Beginn der stationären Phase erkennen. Allerdings zeigt der $\Delta clpX$ -Stamm genauso geringe Messwerte für die β -Galaktosidase-Aktivität wie der $\Delta rasP$ -Stamm und die Messwerte sind deutlich geringer als die Werte, die für den Wildtypstamm ermittelt wurden. Dieser Umstand ist nur durch eine Stabilisierung des Anti-Sigmafaktors aufgrund des Knockouts von *clpX* und der damit verbundenen Inhibierung von σ^X zu erklären. Dieses Ergebnis lässt auf eine Beteiligung von ClpX an der RsiX Proteolyse schließen, obwohl die Resultate der Western Blot Analysen in Abbildung 30 einen anderen Schluss zuließen. Eindeutige Aussagen bzgl. der Beteiligung

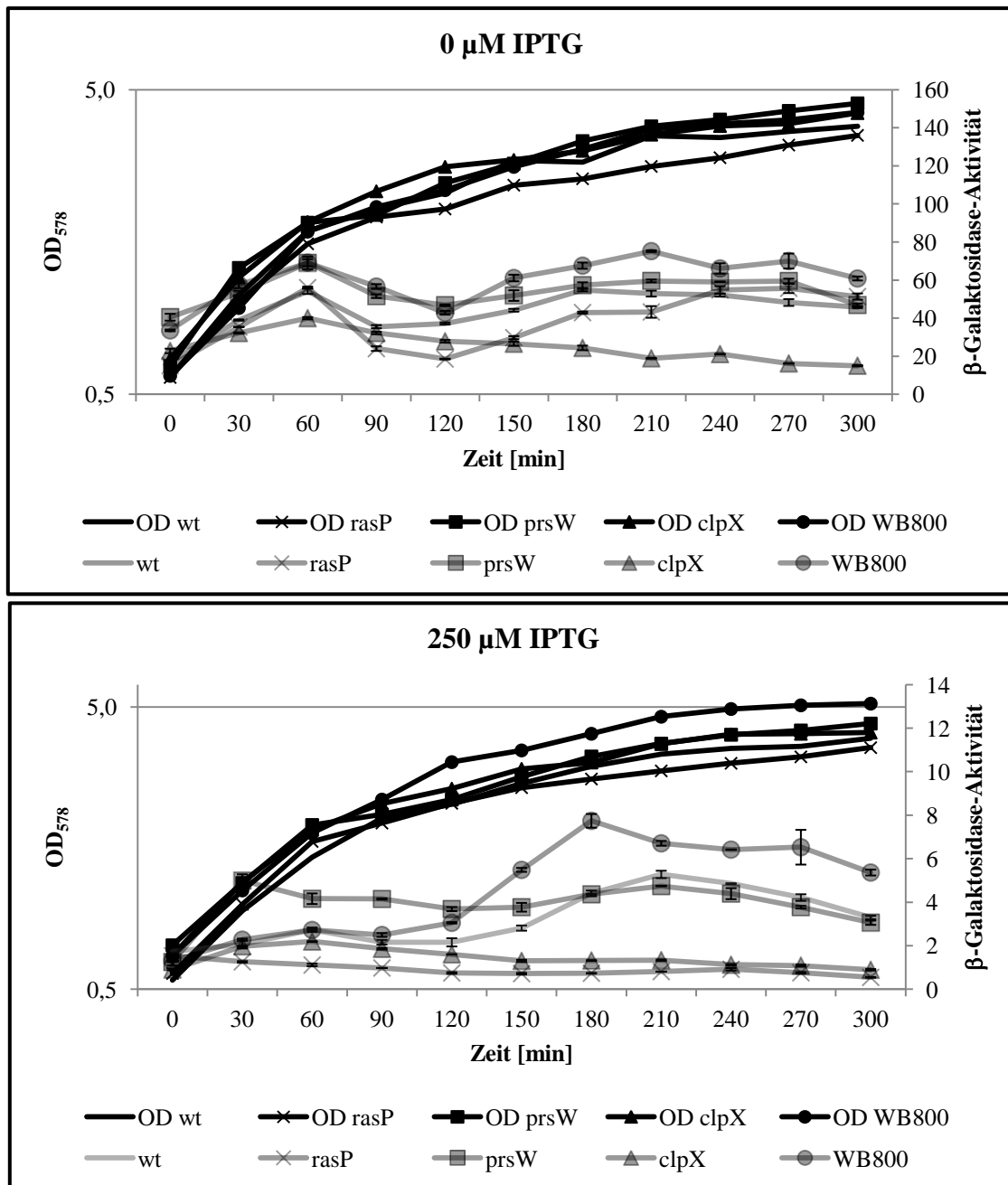


Abbildung 31: β -Galaktosidase-Aktivitäten der *B. subtilis* Stämme KS246 (pAL*FrslX* *rut*; wt), KS243 (rasP), KS254 (prsW), KS250 (clpX) und KS258 (WB800) zur Untersuchung der Proteolyse von RsiX. Sekundärachse: Die β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden im Wildtyphintergrund (wt), im Δ rasP-, Δ prsW- und Δ clpX-Hintergrund betrachtet sowie für den achtfach Proteasen-Knockout, welcher im Stamm *B. subtilis* WB800 (Wu *et al.* 2002) vorliegt (WB800). Durch Verwendung des Plasmides pAL-FLAG konnte die Transkription von *rsiX* mit IPTG induziert werden (pAL*FrslX*). Die Bezeichnung *rut* wurde gewählt, weil durch Punktmutationen die *rut*-site von *rsiX* zerstört wurde. Die *dltA-lacZ*-Reporterfusion wird durch σ^X -Aktivität induziert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse ohne IPTG (0 μM ; oben) und mit IPTG (250 μM ; unten) -Zugabe. Der verwendete Promotor P_{spac} ist durch IPTG regulierbar. Die Probenahme für die Messung der Aktivitäten erfolgte kontinuierlich alle 30 min. Die Aktivitäten beziehen sich jeweils auf 1 OD₅₇₈ zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie bei Wiegert *et al.* (2001) beschrieben. Die Fehlerbalken geben die berechneten Werte der Standardabweichung an. **Primärachse: Wachstumskurve der entsprechenden Stämme. Die OD₅₇₈ wurde alle 30 min gemessen.**

von ClpX an der RsiX Proteolyse können an dieser Stelle daher nicht getroffen werden. Es

müssten zusätzliche Western Blot Analysen mit der cytoplasmatischen Fraktion sowie ggf. der Gesamtzellfraktion durchgeführt werden. Bei einer Beteiligung von ClpX an der RsiX Proteolyse sollten die sehr kleinen Abbauprodukte von RsiX im Cytoplasma detektiert werden.

Betrachtet man die Ergebnisse zur Analyse der Proteolyse des Anti-Sigmafaktors RsiX zusammen, ist festzustellen, dass die site-2 Protease RasP an der Proteolyse von RsiX beteiligt ist. Des Weiteren ist sehr wahrscheinlich auch die cytoplasmatische Protease ClpX involviert. Da aber die site-1 Protease PrsW nicht an der Prozessierung beteiligt ist, muss man davon ausgehen, dass die Proteolyse von RsiX anders als für RsiW bereits bekannt (Heinrich *et al.* 2009) verläuft.

3.10 Der Einfluss von Δrho *in vivo*

Das Gen für den Transkriptionsterminator Rho ist in *B. subtilis* nicht essentiell (Quirk *et al.* 1993). Wurde das Wachstum einer *B. subtilis rho⁻* Kultur durch Messung der OD₅₇₈ verfolgt, konnte festgestellt werden, dass das Wachstum ähnlich dem für eine *rho⁺* Kultur verlief. Zwischen beiden Kulturen waren keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten erkennbar. Bei näherer Betrachtung einzelner Zellen unter dem Mikroskop wurden jedoch Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt. Der wildtypische Stamm besitzt Zellen in Stäbchenform (Abbildung 32, Bilder 1 bis 3). Dagegen wachsen die Zellen in der *rho⁻* Kultur in langen Ketten (Abbildung 32, Bilder 4 bis 6). Diese Beobachtung wurde als Anlass für weitere Untersuchungen genommen.

In einer ausführlichen Transkriptom-Analyse wurde das Transkriptom von *B. subtilis* 1012 mit dem Transkriptom von *B. subtilis* 1012 Δrho verglichen (U. Mäder, G. Homuth, unveröffentlicht). Dabei wurde ein großer Unterschied zwischen beiden Transkriptomen festgestellt. Eine Vielzahl verschiedener Gene wurde im *rho*-Knockout entweder hoch- oder herunterreguliert. An dieser Stelle soll ein Beispiel kurz erwähnt werden. Es wurde gefunden, dass Gene, welche durch den alternativen Sigmafaktor σ^D reguliert werden, im Δrho -Hintergrund eine deutlich geringere Expression erfahren als im Wildtyphintergrund. Außerdem ist bereits bekannt, dass *B. subtilis* $\Delta sigD$ Zellen ähnlich wie *B. subtilis* Δrho Zellen auch in langen, unbeweglichen Ketten wachsen (Marquez *et al.* 1990). Chen *et al.* zeigten zudem, dass das Autolysin LytF, welches durch das Gen *lytF* kodiert wird und auch

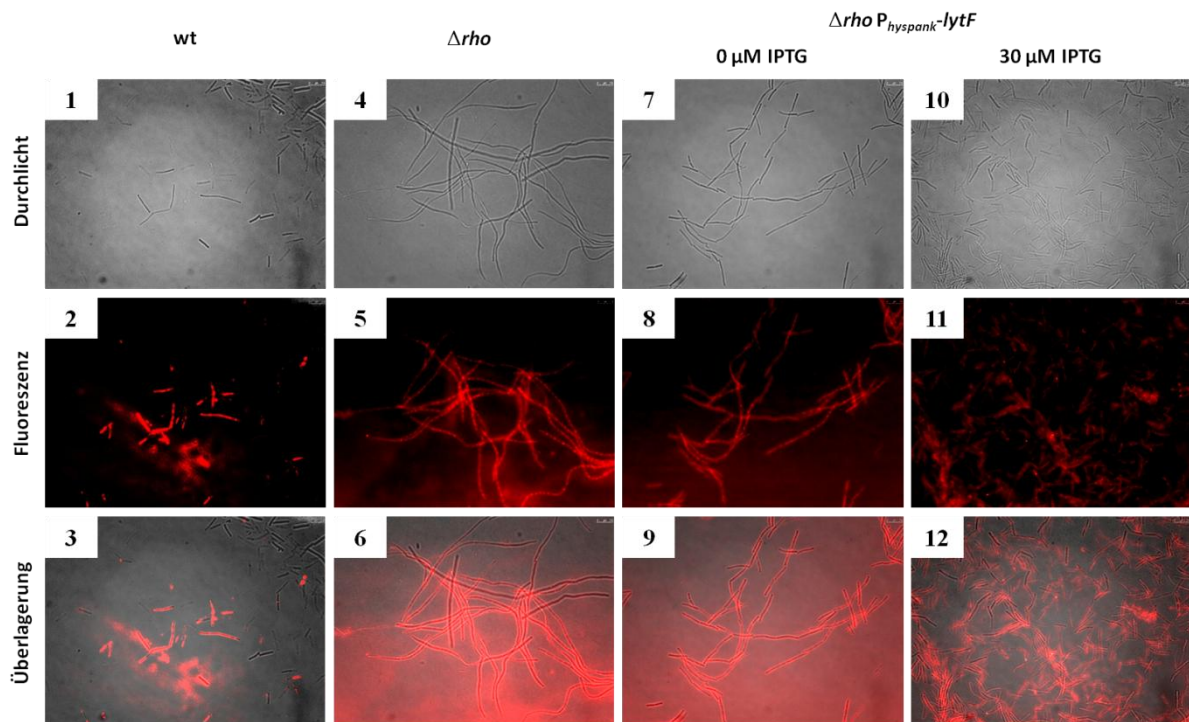


Abbildung 32: Mikroskopie von *B. subtilis* 3610 Zellen zur Beurteilung der Zellmorphologie im Wildtyphintergrund (wt), im Δrho -Hintergrund (Δrho) bzw. im Δrho -Hintergrund mit IPTG-induzierbarem *lytF* ($\Delta rho P_{hyspank-lytF}$). Die Analyse erfolgte anhand Durchlichtmikroskopie (oben) und Fluoreszenzmikroskopie (Mitte). Die Überlagerung der entsprechenden Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen ist unten dargestellt. Die Zellen wurden für diese Aufnahmen bei Erreichen einer OD_{578} von 0,5 mittels Agarose fixiert. Das Anfärben der Membranen erfolgte mit FM4-64 (Molecular Probes).

σ^D -reguliert ist, für die Trennung der Zellen im Wesentlichen verantwortlich ist (Chen *et al.* 2009). Die Ursache, dass Zellen im *rho*-Knockout in Ketten wachsen, liegt also vermutlich darin, dass der Sigmafaktor σ^D und damit auch die Gene des σ^D -Regulons stark vermindert exprimiert werden. Daher wurde in dieser Arbeit *lytF* im Stamm *B. subtilis* 3610 Δrho ektopisch unter IPTG-Kontrolle gestellt und erneut die Morphologie der Zellen untersucht. Zur genaueren Beurteilung wurden außerdem die Zellmembranen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 angefärbt. Mittels Durchlichtmikroskopie und zusätzlich durch Fluoreszenzmikroskopie konnte die Wirkung von LytF auf die Zellmorphologie bestätigt werden. In Abbildung 32, Bilder 7 bis 12, sieht man eindeutig, dass die Zellen im *rho*-Knockout nur durch Inkubation mit lediglich 30 μM IPTG ihre Fähigkeit, sich in einzelne bewegliche Zellen zu teilen, zurückerlangten.

Der Transkriptionsterminator Rho hat also nicht nur Auswirkung auf das *sigX-rsiX*-Operon. Auch der alternative Sigmafaktor σ^D und sein Regulon werden durch den Faktor Rho in der Art beeinflusst, dass sich bei Deletion des Faktors Rho sogar die Zellmorphologie verändert.

4 Diskussion

Die Expression von Genen in Prokaryoten ist streng reguliert. Besonders unter Stressbedingungen muss eine solche Regulation stattfinden. Für eine geregelte Genexpression bei bestimmten Stressfaktoren sorgen die sogenannten alternativen Sigmafaktoren. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem ECF-Sigmafaktor σ^X aus *B. subtilis* sowie seinem entsprechenden Anti-Sigmafaktor RsiX (Huang *et al.* 1997; Brutsche & Braun 1997; Helmann 2002). Die Anti-Sigmafaktoren RsiX und RsiW sind beides Transmembranproteine, die strukturelle Ähnlichkeiten erkennen lassen (Yoshimura *et al.* 2004). Daher wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob auch RsiX durch eine regulierte intramembrane Proteolyse prozessiert werden muss, damit σ^X die Transkription seines Regulons initiieren kann.

4.1 RsiX ist der negative Regulator von σ^X

Um die σ^X -Aktivität in verschiedenen Reporterstämmen zu veranschaulichen, wurde eine Reporterfusion verwendet, bei welcher der Promotor von *dltA* mit *lacZ* fusioniert ist (Abbildung 4, oben). Sobald der Sigmafaktor aktiviert wird, sollte es zur Transkription der Reporterfusion kommen und dies kann durch Messung einer entsprechenden β -Galaktosidase-Aktivität gezeigt werden.

Die hier durchgeführten Messungen der β -Galaktosidase-Aktivität für den wildtypischen Hintergrund und für den Knockout von *rsiX* zeigen deutlich, dass RsiX als Anti-Sigmafaktor fungiert, so dass in dessen Gegenwart σ^X zu keiner Interaktion mit der RNA-Polymerase fähig ist. Erst die Deletion von RsiX führt zur Aktivierung von σ^X . Die Ergebnisse von Brutsche und Braun sowie von Huang *et al.* sind reproduzierbar. Dementsprechend müsste eine ektopische Insertion eines IPTG-induzierbaren *rsiX* zur Komplementation des Knockouts von *rsiX* führen. Ein ähnliches Reportersystem wurde bereits mit Erfolg verwendet, um den Einfluss von RsiW auf die σ^W -Aktivität zu untersuchen (Schöbel *et al.* 2004). Das Reportersystem bei Schöbel *et al.* bestand aus dem *rsiW*-Knockout und einem IPTG-induzierbaren *rsiW* sowie aus einer Fusion zwischen dem Promotor des σ^W -regulierten *yuaF* und *lacZ*. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine Komplementation des *rsiX*-Knockouts nicht erreicht werden. In einer früheren Arbeit wurde bereits die korrekte

Konstruktion der Reporterstämme festgestellt (Schäfer 2007), so dass Klonierungsfehler als mögliche Fehlerquelle für die fehlende Komplementation ausgeschlossen werden konnten.

Neben der Vollängenform für *rsiX* wurde auch versucht, mit einer verkürzten Form von *rsiX* eine Komplementation des *rsiX*-Knockouts zu erreichen. Doch auch für dieses Konstrukt konnte die Komplementation nicht erzielt werden. Die Ursache dafür liegt aber wahrscheinlich genau in dieser verkürzten Form von *rsiX*, denn *rsiX* Δ 71-368 exprimiert den Anti-Sigmafaktor ohne die extracytoplasmatische Domäne. Schöbel *et al.* haben eine ähnlich verkürzte Form für RsiW (RsiW Δ 1) bereits verwendet (Schöbel *et al.* 2004). Dabei wurde festgestellt, dass diese verkürzte Form von RsiW immer ein Substrat für die Protease RasP darstellt. Es liegt daher nahe, dass auch hier RsiX Δ 71-368 durch RasP prozessiert wird, was die Transkription des σ^X -Regulons zur Folge hätte. Bestätigt wird dieser Zusammenhang durch die Betrachtung von GFP-RsiX Δ 71-368 im Δ *rasP*-Hintergrund (Abbildung 16).

Der in dieser Arbeit gefundene Einfluss des Transkriptionsterminators Rho auf die *rsiX*-Transkription kann jedoch die fehlende Komplementation des *rsiX*-Knockouts erklären. Die ektopische *rsiX*-Transkription wird demnach initiiert, führt aber durch die vorzeitige Termination nur zu einer unzureichenden Translation von *rsiX*. Damit kann der Knockout nicht komplementiert werden und es wurde weiterhin das σ^X -Regulon transkribiert. Sobald aber die für die Termination wichtige *rut*-site von *rsiX* durch Mutationen zerstört wurde, konnte *rsiX* auch translatiert und somit der Knockout komplementiert werden (Abbildung 28).

4.2 Der Transkriptionsterminator Rho beeinflusst die Transkription des *sigX-rsiX*-Operons

Für den genomweiten Screen nach Faktoren, welche den Anti-Sigmafaktor RsiX in irgendeiner Weise beeinflussen, wurde die Methode der Transposonmutagenese mit dem Plasmid pIC333 verwendet (Steinmetz & Richter 1994). Das Ergebnis der Transposonmutagenese zeigte, dass der Transkriptionsterminator Rho die zelluläre Konzentration des *rsiX*-Transkriptes bestimmt. Der Umstand, dass die unterschiedlichen Transpositionereignisse in allen drei Fällen zum gleichen Ergebnis führten, sprach für einen sicheren Einfluss des Faktors Rho auf das *rsiX*-Transkript. Dieses Resultat war aber sehr unerwartet, denn man hatte mit der Identifizierung einer oder mehrerer Proteasen gerechnet. Genauso wie es für RsiW bekannt ist (Heinrich *et al.* 2009), wurde für RsiX angenommen, dass eine regulierte Proteolyse stattfindet, um die σ^X -regulierte Transkription zu aktivieren.

Ein sehr ähnlicher Screen mit dem Plasmid pIC333 wurde verwendet, um nach Faktoren zu suchen, die den Anti-Sigmafaktor RsiW regulieren (Heinrich & Wiegert 2006). Allerdings wurden bei diesem Screen deutlich mehr Transpositionereignisse mit Einfluss auf den dort verwendeten GFP-RsiW-Reporter gefunden als in der hier vorliegenden Arbeit. Die Effizienz des gewählten Mutageneseverfahrens ist also in Abhängigkeit des Reporters sehr unterschiedlich.

Als Konsequenz des Ergebnisses der Transposonmutagenese wurde der Deletionsstamm für *rho* konstruiert. Das war nur möglich, weil *rho* in *B. subtilis*, im Gegensatz zu *E. coli*, nicht essentiell ist (Quirk *et al.* 1993). Die Konstruktion des *rho*-Knockouts erfolgte durch Insertion einer Bleomycin-Resistenz-Kassette in die Sequenz für *rho*. Auf ähnliche Weise wurden auch schon Knockouts für die Proteasen RasP (Schöbel *et al.* 2004) oder PrsW (Heinrich & Wiegert 2006) erhalten.

Den Einfluss des Transkriptionsterminators Rho auf die Transkription und damit auch auf die Translation von *rsiX* zeigten die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 16) und auch der Western Blot Analysen (Abbildung 17) mit einem GFP-RsiX-Reporter. Sobald die translationelle Fusion von *gfp* und *rsiX* transkribiert wurde, terminierte Rho im Wildtyphintergrund, anders als im *rho*-Knockout, die Transkription. Die Folge war, dass die Kolonien keine Fluoreszenz zeigten und auch in Western Blot Analysen konnte das Fusionsprotein nicht detektiert werden.

Die in dieser Arbeit gefundene Termination der *sigX-rsiX*-Transkription durch den Faktor Rho wurde nicht erwartet. Zum einen, weil, wie in Abbildung 3 zu sehen, das *sigX-rsiX*-Operon zusätzlich am Ende des Operons einen intrinsischen Terminator für eine Faktor-unabhängige Termination der *sigX-rsiX*-Transkription besitzt (Huang *et al.* 1997). Zum anderen, weil die Regulation der Transkription durch den Terminator Rho in *B. subtilis* an sich ungewöhnlich ist. Das *sigX-rsiX*-Operon ist erst das dritte bekannte Beispiel in *B. subtilis* für die Termination durch den Faktor Rho. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass das Gen des Transkriptionsterminators Rho selbst einer Autoregulation durch Rho unterliegt (Ingham *et al.* 1999). Weiter ist bekannt, dass auch das *trp*-Operon vom Transkriptionsterminator Rho beeinflusst wird (Yakhnin *et al.* 2001). Ähnlich wie im *sigX-rsiX*-Operon gibt es im *trpEDCFBA*-Operon auch überlappende Bereiche in der Nukleotidsequenz. Yakhnin *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass im $\Delta\rho$ -Hintergrund mehr Transkript für *trpE* und *trpD* vorhanden war als im Wildtyphintergrund.

Die Rho-abhängige Termination scheint aufgrund der Tatsache, dass bisher nur diese drei Beispiele für eine Faktor-abhängige Termination gefunden wurden, in *B. subtilis* nicht weit verbreitet zu sein. Dieser Umstand passt auch zu den Resultaten von Ingham *et al.*, die weniger als 5 % der Menge des Proteins Rho, im Vergleich zu *E. coli*, in *B. subtilis* gefunden haben.

Der Grund für eine derartige Regulation für einen Sigmafaktor und seinen entsprechenden Anti-Sigmafaktor bleibt aber mit den Ergebnissen dieser Arbeit ungeklärt. Es können daher hier nur Hypothesen aufgestellt werden. Ein mutmaßlicher Grund für diese Art der Regulation könnte die stöchiometrische Proteinexpression sein, damit der Sigmafaktor σ^X und sein entsprechender Anti-Sigmafaktor RsiX immer in gleichen Mengen vorliegen. Oppenheim & Yanofsky postulierten schon, dass die Translationskopplung im *trp*-Operon aus *E. coli* auch nur der Sicherstellung einer äquimolaren Produktion von Polypeptiden dient (Oppenheim & Yanofsky 1980). Allerdings wirft das eine andere Frage auf: Wann wird die Transkription des Operons terminiert? Wenn man von einer permanenten Termination ausgeht, würde das bedeuten, dass σ^X und RsiX nie translatiert würden. Es muss also auch Bedingungen geben, bei denen Rho nicht terminiert. Möglich wären dabei ähnliche Bedingungen wie sie für das *trp*-Operon aus *B. subtilis* gefunden wurden. Hier reguliert ein weiteres Protein, TRAP (Babitzke & Yanofsky 1993), in Abhängigkeit von der Tryptophan-Konzentration in der Zelle sowohl die Translation als auch die Transkription des *trp*-Operons (Merino *et al.* 1995). Dabei bindet Tryptophan bei einer hohen intrazellulären Konzentration an das Protein TRAP, welches wiederum an das *trp*-Transkript bindet, was zur Bildung von Sekundärstrukturen führt, die schließlich dem Faktor Rho die Transkriptionstermination ermöglichen (Yakhnin *et al.* 2001). Bei Übertragung dieses Szenarios auf das *sigX-rsiX*-Operon könnte nachfolgend beschriebene Regulation möglich sein. Durch die schon bekannte Autoregulation von *sigX* (Brutsche & Braun 1997) könnte erst bei einer zu hohen intrazellulären σ^X -Konzentration der Zugang für Rho zum *sigX-rsiX*-Transkript für die faktorabhängige Termination ermöglicht werden. Aber an dieser Stelle sind noch sehr viel weitere Analysen nötig.

Das Antibiotikum Bicyclomycin (BCM) (Nishida *et al.* 1972) ist ein spezifischer Inhibitor des Transkriptionsterminators Rho (Zwiefka *et al.* 1993). Biochemische Analysen und auch Untersuchungen der Struktur des Faktors Rho im Zusammenspiel mit BCM haben gezeigt, dass BCM direkt die ATPase-Aktivität von Rho beeinflusst, indem die ATP-Hydrolyse unterbunden wird, sodass Rho nicht mehr terminieren kann (Park *et al.* 1995; Magyar *et al.*

1996; Carrano *et al.* 1998; Skordalakes *et al.* 2005). Damit ist die Zugabe von BCM in ein Medium eine effektive Maßnahme, um den Einfluss von Rho zu untersuchen, ohne eine Deletion des Faktors Rho zu benötigen. Dies setzt aber voraus, dass *rho* in dem jeweiligen Organismus nicht essentiell ist. Für Analysen in *E. coli* kann diese Methode daher nicht verwendet werden, denn für dieses Bakterium ist *rho* essentiell (Das *et al.* 1976; Bubunenکو *et al.* 2007). Allerdings wurden schon subletale Konzentrationen von 20 µg/ml BCM benutzt, um Experimente mit BCM in *E. coli* erfolgreich durchzuführen (Peters *et al.* 2009).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls BCM verwendet, um die Funktion des Transkriptionsterminators Rho zu inhibieren, ohne dass ein *rho*-Knockout nötig war, denn in *B. subtilis* ist *rho* nicht essentiell (Quirk *et al.* 1993). Die hier durchgeführten Analysen dienten lediglich dazu, den direkten Einfluss von Rho auf das *rsiX*-Transkript noch einmal darzulegen. Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, wie schon an anderer Stelle beschrieben (Zwiefka *et al.* 1993; Ingham *et al.* 1999), dass die Verwendung von BCM auch in *B. subtilis* eine effektive Methode darstellt, um den Einfluss des Faktors Rho zu analysieren, ohne Rho zu deletieren.

4.3 Mögliche Translationskopplung im *sigX-rsiX*-Operon

Das Phänomen der Translationskopplung und ihre Bedeutung für die stöchiometrische Produktion von Enzymen für die Biosynthesen sind schon seit langem bekannt (Oppenheim & Yanofsky 1980; McCarthy & Gualerzi 1990). Schon 1980 wurde für das *trp*-Operon aus *E. coli* nachgewiesen, dass das Stopp-Codon von *trpE* und das Start-Codon von *trpD* überlappen und die Translation von *trpD* direkt von der *trpE*-Translation abhängt. Damit wurde der Begriff der Translationskopplung geprägt (Oppenheim & Yanofsky 1980).

Es wurde bereits erwähnt, dass es im *trp*-Operon von *B. subtilis* auch zu Überlagerungen der Nukleotidsequenzen für die einzelnen Gene kommt und dass dieses Operon ebenfalls durch den Faktor Rho reguliert wird (Yakhnin *et al.* 2001). Es stellt sich daher die Frage, ob auch das *sigX-rsiX*-Operon aufgrund seiner Regulation durch Rho und der überlappenden Bereiche wie das *trp*-Operon aus *B. subtilis* (Yakhnin *et al.* 2001) durch Translationskopplung reguliert wird.

Wenn im *sigX-rsiX*-Operon Translationskopplung vorliegt, hätte man im Northern Blot (Abbildung 20) für das mutierte Operon schwächere Signale erhalten müssen als für das wildtypische Operon, denn im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass bei Inhibierung

der Translation die mRNA an Stabilität verliert (Kushner 1996). Allerdings zeigen die Ergebnisse der Northern Blot Analyse (Abbildung 20), dass die Menge an *sigX-rsiX*-Transkript nicht reduziert wurde. Im Gegenteil, es scheint, als ob die Menge an Transkript sogar etwas angestiegen ist. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse für das *trp*-Operon wurde festgestellt, dass sich hier trotz Vorliegen einer Translationskopplung die Stabilität der mRNA nicht verändert hat, wenn die Translation inhibiert war (Yakhnin *et al.* 2001). Dieser Umstand lässt daher Zweifel aufkommen, ob tatsächlich keine Translationskopplung zwischen *sigX* und *rsiX* herrscht. Aber auch Kushner räumte ein, dass es manchmal bei einer gestörten Translation zu keiner Veränderung der mRNA Halbwertszeit kommt und die Stabilität der mRNA sogar zunehmen kann (Kushner 1996).

Für eindeutige Aussagen bzgl. der Translationskopplung im *sigX-rsiX*-Operon müssen noch weitere Analysen folgen. Hilfreich wäre an dieser Stelle das Vorhandensein von Antikörpern gegen den Anti-Sigmafaktor RsiX. Damit wären mit dem bereits verwendeten Reporter in weiteren Western Blot Analysen schnelle Aussagen zur Translation von *rsiX* bei nicht stattfindender Translation von *sigX* möglich. Auch Fusionen mit dem *lacZ*-Gen als Reporter, wie sie bei Yakhnin *et al.* verwendet wurden, wären möglich. Zusätzlich könnten auch noch Rifampicin-Experimente durchgeführt werden, um die Stabilität der entsprechenden mRNA besser zu beurteilen, da Rifampicin die Transkription schon auf der Ebene der Initiation blockiert (Hartmann *et al.* 1967; Campbell *et al.* 2001).

Eine Sache, die aber eindeutig festgestellt werden konnte, ist, dass trotz der fehlenden *sigX*-Translation weiterhin eine Termination der Transkription durch den Faktor Rho stattfindet. Das ist an deutlich stärkeren Signalen für das *sigX-rsiX*-Transkript im Δrho -Hintergrund für die mutierte Form des Operons in Abbildung 20 zu erkennen.

Ein anderes Phänomen, das noch nicht geklärt werden konnte, ist, warum man im Western Blot in Abbildung 19 für FLAG-SigX ungefähr gleich viel Protein im Wildtyp- und Δrho -Hintergrund ausmachen kann. Wohingegen man im Northern Blot in Abbildung 20 einen klaren Unterschied in der Transkriptmenge sieht. Es stellt sich daher die Frage, ob immer nur eine bestimmte Menge an *sigX* translatiert wird, obwohl es klare Unterschiede in der Transkriptmenge gibt. Sollte tatsächlich keine effiziente Translation von *sigX* erfolgen, würde die Termination durch Rho einen Weg darstellen, damit in der Zelle stets äquimolare Mengen an σ^X und RsiX vorliegen. Durch den polaren Effekt der Termination würde folglich die untranslatierte naszierende *sigX-rsiX*-mRNA terminiert und abgebaut werden, damit nicht mehr *rsiX* als *sigX* translatiert werden kann. Das würde aber auch bedeuten, dass man im Knockout von *rho* mehr RsiX als σ^X detektieren müsste, was dann zu keiner bzw. einer

wesentlich geringeren Aktivierung des σ^X -Regulons führen müsste. Erste Analysen mit dem in dieser Arbeit verwendeten *lacZ*-Reporter zeigten in der Tat eine ca. 50%ige geringere β -Galaktosidase-Aktivität für den *rho*-Knockout im Vergleich zum Wildtyphintergrund (Daten nicht gezeigt).

4.4 Die *rut*-site im Gen *rsiX*

Die faktorabhängige Termination der Transkription in Prokaryoten wird durch den Faktor Rho bedingt (Richardson 1993; Uptain *et al.* 1997). Diese Art der Termination wird von zwei entscheidenden Elementen geprägt: zum einen von der Rho-Bindestelle und zum anderen von einer stromabwärts davon gelegenen Terminationszone (Lau *et al.* 1982; Morgan *et al.* 1983b; Banerjee *et al.* 2006). Die Rho-Bindestelle in der naszierenden mRNA wird als *rut*-site (Rho ut^{il}ization) bezeichnet (Salstrom *et al.* 1979). Die Terminationszone enthält viele Stellen, an denen die RNA-Polymerase kurz pausiert (*pause site*). Die meisten Rho-Terminationsstellen stimmen mit einer *pause site* überein, wobei nicht jede *pause site* mit einer Rho-Terminationsstelle gleichzusetzen ist (Kassavetis & Chamberlin 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals auch die *rut*-site für ein Rho-reguliertes Gen in *B. subtilis* bestimmt. Die Lage der *rut*-site für *rsiX* konnte auf den kodierenden Bereich der Aminosäuren 44 bis 70 eingegrenzt werden. Von dieser Sequenz wird auch die Transmembrandomäne (Abbildung 23) kodiert. Es wurde die *rut*-site von *rsiX* mit einer Länge von 81 Nukleotiden bestimmt. Damit liegt die Größe genau in dem von Morgan *et al.* angegebenen Bereich für eine *rut*-site in *E. coli* (Morgan *et al.* 1983a). Der für eine *rut*-site postulierte Überschuss an Cytidin im Vergleich zu Guanosin (Bear *et al.* 1988; Alifano *et al.* 1991) konnte somit auch für eine *rut*-site aus *B. subtilis* bestätigt werden. Der besonders hohe Anteil an Cytidin ist für die Nukleotidsequenz des Genes *rsiX*, welche für die Aminosäuren 60 bis 68 kodiert, gegeben.

Die bislang identifizierten Rho-abhängigen Terminatoren wurden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt (Ciampi 2006). Zu der ersten Gruppe zählen die konstitutiven Rho-abhängigen Terminatoren, welche am Ende eines Genes oder eines Operons lokalisiert sind. Als Beispiel dafür können der Terminator *trp t'* des *trp*-Operons aus *E. coli* (Platt 1981) oder der Terminator des *tyrT*-Operons aus *E. coli* (Küpper *et al.* 1978; Rossi *et al.* 1981)

genannt werden. In die zweite Gruppe werden die regulierten Rho-abhängigen Terminatoren eingeordnet, welche man noch einmal in konventionell-regulierte bzw. intragenisch-regulierte unterteilt. Konventionell-regulierte Rho-abhängige Terminatoren befinden sich zumeist zwischen zwei Genen bzw. in der nicht-translatierten Sequenz am 5'-Ende der mRNA. Ein Beispiel dafür ist der Terminator des *rho*-Genes aus *B. subtilis* (Ingham *et al.* 1999). Intragenisch-regulierte Rho-abhängige Terminatoren sind innerhalb der kodierenden Sequenz für ein Gen angeordnet. Dazu zählt u. a. der Terminator des *trp*-Operons aus *B. subtilis* (Yakhnin *et al.* 2001). Unter welchen Bedingungen die Termination im *trp*-Operon erfolgt, wurde bereits im Kapitel 4.2 erläutert. Dieses Beispiel zeigt, dass als Folge der intragenischen Rho-abhängigen Termination die Transkriptionspolarität auftritt. Der polare Effekt wirkt sich, wie für das Beispiel des *trp*-Operons aus *B. subtilis*, auf die stromabwärts liegenden Gene aus, sodass auch deren Expression durch die vorzeitige Termination der Transkription unterbunden wird. Durch den polaren Effekt kann die unnötige Synthese von nicht benötigtem Transkript, z. B. bei vorzeitiger Translationstermination oder ineffizienter Translationsinitiation, verhindert werden und sorgt so u. a. für die Einsparung von Energie (Richardson 1991; Ciampi 2006).

Die in dieser Arbeit identifizierte *rut*-site für *rsiX* kann demnach auch in die Gruppe der intragenisch-regulierten Rho-abhängigen Terminatoren eingeordnet werden, da sie sich innerhalb der kodierenden Sequenz für *rsiX* befindet. Man kann daher von einer intragenischen Termination im *sigX-rsiX*-Operon sprechen. Die selbige findet man auch im *nifLA*-Operon aus *Klebsiella pneumoniae*. Hier führt eine veränderte Translation von *nifL* zur Rho-abhängigen Termination im stromabwärts gelegenen *nifA*, denn eine ausgeglichene Translation beider Gene ist für die Regulation der Stickstoff-fixierenden Gene in *K. pneumoniae* essentiell (Govantes & Santero 1996; Govantes *et al.* 1996). Im *nifLA*-Operon findet man den Rho-abhängigen Terminator also genauso wie für das *sigX-rsiX*-Operon auch erst im zweiten Gen des jeweiligen Operons. Allerdings bedingt im *nifLA*-Operon die veränderte Translation des ersten Gens (*nifL*) die Termination im zweiten Gen (*nifA*). Im *sigX-rsiX*-Operon jedoch wirkt sich die Transkriptionstermination in *rsiX* auf die Expression des stromaufwärts liegenden *sigX* aus. Das kann auch mit dem Experiment verdeutlicht werden, in welchem *gfp* und *rsiX* nicht mehr translationell fusioniert sind. Auch in diesem Fall konnte kein GFP im Wildtyphintergrund detektiert werden. Dies wurde erst möglich, als zusätzlich *rho* deletiert wurde. Das bedeutet, dass *gfp* durch die transkriptionelle Fusion mit

rsiX und dessen faktorabhängiger intragenischer Termination auch im Wildtyphintergrund keine detektierbare Expression erfährt.

Dieses Ergebnis verdeutlicht noch einmal den Effekt der Transkriptions-Polarität, der im Zusammenhang mit der intragenisch-regulierten Rho-abhängigen Termination auftaucht. Im Allgemeinen beeinflusst aber der polare Effekt die Expression stromabwärts liegender Gene in einem Operon. Dies ist möglich, weil aufgrund der vorzeitigen Terminierung der Translation des stromaufwärts liegenden Genes die mRNA nicht mehr von Ribosomen besetzt ist. Dadurch hat der Faktor Rho die Möglichkeit, an die *rut*-site zu binden und kann die Termination der Transkription einleiten (Nudler & Gottesman 2002).

Im *sigX-rsiX*-Operon konnte man aber die gegenteilige Richtung der Polarität sehen, nämlich dass die Transkriptionstermination eines Genes auch die Expression des stromaufwärts liegenden Genes des gleichen Operons bestimmt. Nach den Beschreibungen von Nudler & Gottesman (2002) erfolgt die Termination durch Rho, sobald die *rut*-site frei liegt und die mRNA nicht mehr von Ribosomen besetzt ist. Für das *sigX-rsiX*-Operon könnte das heißen, dass das erste Ribosom auf der naszierenden mRNA durch ein bestimmtes Signal möglicherweise pausiert bzw. langsamer in der Proteinbiosynthese wird oder sich die RNA-Polymerase schneller bewegt, so dass zwischen Transkriptions- und Translationskomplex ein genügend großer Abstand entsteht, damit Rho ungehindert an die *rut*-site binden kann.

Bei der Termination der Transkription im *sigX-rsiX*-Operon spielt aber nicht nur die oben beschriebene intercistronische Polarität eine Rolle. In diesem Fall trägt auch die intracistronische Polarität zur Regulation bei. Intracistronische Polarität bedeutet, dass selbst die Expression des Genes, in welchem die Termination stattfindet, hier *rsiX*, durch diese Polarität negativ beeinflusst wird. Die Bedeutung der intracistronischen Polarität wurde anhand von quantitativen Analysen eines Systems ermittelt, in welchem das Reportergen *lacZ* mit unterschiedlich mutierten Ribosomenbindestellen fusioniert wurde. In diesen Analysen wurde deutlich, dass die intracistronische Polarität zur Verstärkung der Repression der Translation führt. In diesem Zusammenhang wird vorgeschlagen, dass der Grund der Existenz der Polarität sein könnte, dass z. B. auf diese Art keine anderen Repressor-Proteine mehr benötigt würden (de Smit *et al.* 2008). Bezogen auf das *sigX-rsiX*-Operon würde das die Sicherstellung einer äquimolaren Expression von *rsiX* und *sigX* bedeuten - eine Möglichkeit, die schon im Kapitel 4.3 diskutiert wurde.

Die Informationen, die man bereits über die Rho-abhängige Termination in *E. coli* besitzt, zeigen, dass neben der *rut*-site für diese Art der Termination zusätzlich eine weitere Sequenz stromabwärts von der *rut*-site nötig ist. Morgan *et al.* sprechen von einem Zwei-Komponenten-Modell für die Rho-abhängige Termination, bei dem neben der *rut*-site auch noch Sequenzen für Pausen in der Transkriptionselongation nötig sind (Morgan *et al.* 1983a; Morgan *et al.* 1983b). Es wird hierbei von der so genannten Terminationszone gesprochen (Lau *et al.* 1982; Morgan *et al.* 1983b; Banerjee *et al.* 2006).

Bei den hier analysierten C-terminal verkürzten Formen von RsiX scheinen die Rho-Terminationsstellen in der entsprechenden Nukleotidsequenz für diese verkürzten Formen von RsiX nicht mehr vorhanden zu sein, weshalb die faktorabhängige Termination nicht greifen kann, obwohl laut den hier erhaltenen Ergebnissen die Sequenz für die *rut*-site noch vorhanden ist. Das spricht für die Existenz einer Terminationszone nicht nur in *E. coli*, sondern auch in *B. subtilis*.

Zusammenfassend kann für das *sigX-rsiX*-Operon festgehalten werden, dass die intragenisch-regulierte Rho-abhängige Termination in *rsiX* durch den Effekt der intra- und intercistronischen Polarität sowohl die *rsiX*- als auch die *sigX*-Expression beeinflusst, was dann vermutlich zu äquimolaren Mengen von RsiX und σ^X in der Zelle führt.

4.5 Die Proteolyse von RsiX mit RasP-Beteiligung

Der Anti-Sigmafaktor RsiW wird nach einem spezifischen extrazellulären Stimulus proteolytisch abgebaut, damit der Sigmafaktor σ^W die Transkription spezifischer Gene starten kann (Heinrich *et al.* 2009). Dabei ist u. a. die site-2 Protease RasP involviert (Schöbel *et al.* 2004). Zwischen dem Anti-Sigmafaktor RsiX und dem Anti-Sigmafaktor RsiW wurden strukturelle Ähnlichkeiten gezeigt (Yoshimura *et al.* 2004). Es war daher sehr wahrscheinlich, dass RsiX genauso wie RsiW durch die site-2 Protease RasP prozessiert wird.

Eine Reporterfusion aus GFP und RsiX machte deutlich, dass dieses Fusionsprotein in der Zelle nicht zu detektieren war. Auch mit einem Knockout der Protease RasP war das Reporterprotein in der Zelle nicht nachzuweisen. Wenn angenommen wird, dass RsiX einer ähnlichen Proteolyse wie RsiW unterliegt, hätte die Deletion von *rasP* zu fluoreszierenden Kolonien führen müssen. Heinrich & Wiegert konnten zeigen, dass für Reporterfusionen aus GFP und RsiW die *B. subtilis* Kolonien durchaus in den verschiedenen Knockouts von

Proteasen, welche an der RsiW Proteolyse beteiligt sind, eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem Wildtyp hatten (Heinrich & Wiegert 2006). Der GFP-Reporter ist somit geeignet, um derartige Analysen durchzuführen.

Ein Nachweis über die Beteiligung der Protease RasP nicht nur an der RsiW-Proteolyse (Schöbel *et al.* 2004) sondern auch an der RsiX-Proteolyse war in dieser Arbeit möglich, allerdings nur, wenn sichergestellt werden konnte, dass ausreichend *rsiX* translatiert wird. Dies wurde aber erst durch die Mutation der *rut*-site von *rsiX* erreicht (Abbildung 27). Ohne das Wissen, dass die Transkription von *rsiX* durch den Faktor Rho terminiert wird, war es nicht möglich, den Anti-Sigmafaktor RsiX zu detektieren.

Die Protease RasP ist eine Metalloprotease der site-2 Protease-Familie der iClips (Weihofen & Martoglio 2003). Bestehende Homologien zu menschlichen site-2 Proteasen und eine mögliche Rolle bei der regulierten intramembranen Proteolyse wurden für RasP schon vor längerer Zeit erkannt (Brown *et al.* 2000). Neben RsiW stellt auch FtsL, ein an der Zellteilung beteiligtes Protein aus *B. subtilis*, ein Substrat für RasP dar (Schöbel *et al.* 2004; Bramkamp *et al.* 2006). Für RsiW konnte gezeigt werden, dass RasP neben konservierten Alanin-Resten innerhalb der Membran proteolytisch aktiv wird (Zellmeier *et al.* 2006). Eine Analyse der Aminosäuresequenz von FtsL zeigte innerhalb der Transmembrandomäne auch drei Alanin-Reste (Bramkamp *et al.* 2006). Ebenso befinden sich drei Alanin-Reste in der Transmembrandomäne von RsiX. Es wird daher vermutet, dass diese Alanin-Reste auch bei der Proteolyse von RsiX durch RasP eine entscheidende Rolle spielen. Ferner konnte dargelegt werden, dass eine verkürzte Form von RsiW (ohne die extracytoplasmatische Domäne) immer ein Substrat für RasP bildet (Schöbel *et al.* 2004). Die Ähnlichkeit dieser Form von RsiW und der hier verwendeten verkürzten Form von RsiX, RsiX Δ 71-368, ist vermutlich der Grund, weshalb diese Variante von RsiX auch durch RasP prozessiert wird. Eine genaue Aussage über das Erkennungsmotif von RasP in RsiX ist hier aber nicht möglich.

Abbildung 30 zeigt außerdem, dass es im *rasP*-Knockout ferner zur Anreicherung einer zweiten verkürzten Form von RsiX kommt, welche in Abbildung 27 nur sehr schwer erkennbar war. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass RsiX erst durch die Aktivität mindestens einer weiteren Protease zum Substrat für RasP wird. Es scheint, als ob für die Prozessierung von RsiX durch RasP ähnliche Schritte nötig sind, wie sie schon für die Prozessierung von RsiW durch RasP gefunden wurden. RsiW wird erst zum Substrat für RasP, wenn es nach der site-1 Proteolyse durch PrsW noch von einer Tsp-ähnlichen extracytoplasmatischen Protease prozessiert wird (Silber *et al.* 1992; Heinrich *et al.* 2009).

Eine Prozessierung von RsiX durch die site-1 Protease PrsW kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit dagegen ausgeschlossen werden, obwohl es strukturelle Ähnlichkeiten zwischen RsiX und RsiW gibt (Yoshimura *et al.* 2004), PrsW bei der Proteolyse von RsiW eine entscheidende Rolle spielt (Heinrich & Wiegert 2006) und obwohl beide Anti-Sigmafaktoren, wie hier gezeigt, von der site-2 Protease RasP prozessiert werden. Für eine regulierte intramembrane Proteolyse von RsiX mit Beteiligung einer site-1 Protease können allerdings noch weitere Proteasen als site-1 Protease in Frage kommen. Für *E. coli* RseA wurde die Serin-Protease DegS als site-1 Protease gefunden (Walsh *et al.* 2003). DegS gehört zur Familie der HtrA-Serin-Proteasen, PrsW dagegen gehört nicht zu dieser Protease-Familie. Es ist daher auch möglich, dass eine der drei HtrA-Serin-Proteasen aus *B. subtilis* (HtrA, HtrB, HtrC) (Noone *et al.* 2000) für die site-1 Proteolyse von RsiX verantwortlich ist. Dies könnte man z. B. durch Knockouts der entsprechenden Gene untersuchen.

Die Analysen im Hinblick auf eine Beteiligung der cytoplasmatischen Protease ClpX an der RsiX-Proteolyse lassen keine eindeutige Aussage zu und müssen noch vertieft werden. ClpX ist die ATP-bindende Untereinheit der Clp-Protease aus *B. subtilis*. Die proteolytische Untereinheit dieser Protease ist ClpP (Gerth *et al.* 1998). Der Nachweis, dass ClpP an der RsiW Proteolyse beteiligt ist, wurde von Zellmeier *et al.* u. a. auch durch Western Blot Experimente erbracht, in denen die prozessierte Form von RsiW im *clpP*-Knockout sowohl in der Gesamtzellfraktion als auch in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnte (Zellmeier *et al.* 2006). Ein zusätzlicher Hinweis, dass neben RasP auch die Clp-Protease an der RsiX-Proteolyse beteiligt ist, wurde von Msadek *et al.* gegeben. Sie zeigten, dass ClpP für das Wachstum von *B. subtilis* bei hohen Temperaturen essentiell ist (Msadek *et al.* 1998). Daneben wurde gefunden, dass σ^X ebenfalls für das Überleben von *B. subtilis*-Zellen bei hohen Temperaturen nötig ist (Huang *et al.* 1997). Es kann also vermutet werden, dass ClpP für die Proteolyse von RsiX erforderlich ist, damit σ^X bei Hitzestress die Transkription des σ^X -Regulons initiieren kann. Die Analysen bzgl. einer Beteiligung der Clp-Protease bei der RsiW-Proteolyse geben noch einen anderen Hinweis auf die Beteiligung der Clp-Protease an der RsiX-Proteolyse. Aufgrund der Prozessierung von RsiW durch RasP wird ein verborgener proteolytischer *tag* freigesetzt, welcher die oben erwähnten konservierten Alanin-Reste der Transmembrandomäne enthält. Diese Alanin-Reste sind das entscheidende Signal für die Clp-Protease, RsiW vollständig abzubauen (Zellmeier *et al.* 2006). Für RsiX könnte das in ähnlicher Weise erfolgen.

Zudem erkennt man in Abbildung 29, dass die σ^X bedingte Induktion des *lacZ*-Reporters in Abhängigkeit von der Wachstumsphase erfolgte. Das Maximum der σ^X -Aktivität ist zu Beginn der stationären Phase registriert worden. Diese Erkenntnis deckt sich jedoch nicht mit den Ergebnissen von Huang *et al.*, die das Maximum der *sigX*-Expression sowie der Expression von σ^X -kontrollierten Genen in der späten logarithmischen Wachstumsphase beobachteten (Huang *et al.* 1997; Huang & Helmann 1998).

Abschließend kann trotz der Ähnlichkeiten in der Struktur der Anti-Sigmafaktoren RsiX und RsiW (Yoshimura *et al.* 2004) festgestellt werden, dass die regulierte intramembrane Proteolyse von RsiX einem etwas anderem Mechanismus, als dem für RsiW bekannten (Heinrich *et al.* 2009), folgt.

4.6 Der Einfluss von Rho auf die Zellmorphologie

Das Wachstum von Zellen im *rho*-Knockout in langen Ketten ähnelt dem bereits bekannten für Zellen im *clpP*-Knockout (Msadek *et al.* 1998) bzw. im *sigD*-Knockout (Marquez *et al.* 1990). In der Tat wurde in einer genomweiten Transkriptom-Analyse (U. Mäder, G. Homuth, unveröffentlicht) gefunden, dass im Knockout von *rho* die Transkription des σ^D -Regulons stark vermindert war. Das auch zum σ^D -Regulon gehörende *lytF* kodiert für das Autolysin LytF und ist auch für die Teilung der Zellen und damit für das Wachstum in Stäbchen verantwortlich (Margot *et al.* 1999). Sobald eine ektopische *lytF*-Expression in einer *rho*-Kultur erfolgte, konnte das Wachstum in Stäbchen wieder hergestellt werden (Abbildung 32), vergleichbar mit Chen *et al.* (2009), die zeigten, dass ein *sigD*-Knockout-Stamm nach ektopischer *lytF*-Expression seine Fähigkeit, in Stäbchen zu wachsen, zurückerlangte. Die Ursache für das filamentöse Wachstum der Zellen im *rho*-Knockout scheint also vielmehr an der verringerten *sigD*-Expression als am Knockout von *rho* selbst zu liegen. Das bestätigt noch einmal den Einfluss von Rho auch auf das σ^D -Regulon. Ob es sich dabei um einen direkten Einfluss von Rho auf das σ^D -Regulon handelt, müssen weitere Experimente zeigen. Abschließend kann festgehalten werden, dass der Transkriptionsterminator Rho in *B. subtilis* an zahlreichen Prozessen beteiligt zu sein scheint, obwohl mit den Erkenntnissen dieser Arbeit erst drei Fälle identifiziert werden konnten, bei welchen Rho direkt an der Transkriptionstermination beteiligt ist (Ingham *et al.* 1999; Yakhnin *et al.* 2001).

5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das *sigX-rsiX*-Operon, welches für den ECF-Sigmafaktor σ^X und seinen entsprechenden Anti-Sigmafaktor RsiX kodiert, durch den Transkriptionsterminator Rho bereits auf der Transkriptionsebene reguliert wird (Kapitel 3.5.2). Ein entscheidendes Element bei einer faktorabhängigen Termination ist dabei die *rut*-site, die Rho-Bindestelle in der naszierenden mRNA (Salstrom *et al.* 1979). Obwohl in dieser Arbeit die *rut*-site im Gen *rsiX* bereits auf die Größe von 81 Nukleotiden eingegrenzt werden konnte (Kapitel 3.8.3), könnte in weiterführenden Analysen versucht werden, die Bindestelle für den Faktor Rho auf das Nukleotid genau zu bestimmen. Des Weiteren haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sehr wahrscheinlich eine zweite Region in der Sequenz von *rsiX* entscheidend zu einer faktorabhängigen Termination beiträgt (Kapitel 4.4). In folgenden Experimenten sollte daher auch die These über das Vorhandensein einer Terminationszone (Lau *et al.* 1982; Morgan *et al.* 1983b; Banerjee *et al.* 2006) untersucht werden.

Bei dem Prozess der Transkriptionstermination spielen die Transkriptions-Elongations-Faktoren NusA und NusG in *E. coli* eine wichtige Rolle. Erste Analysen in *B. subtilis* bzgl. dieser beiden Faktoren und ihrer Rolle bei der Transkriptionstermination von *rho* und im *trp*-Operon haben aber gezeigt, dass NusA und NusG über unterschiedliche Eigenschaften in *E. coli* und *B. subtilis* verfügen (Ingham *et al.* 1999; Yakhnin *et al.* 2008). Eine interessante Fragestellung wäre daher, welchen Einfluss diese Faktoren auf die Rho-abhängige Termination von *rsiX* haben.

Im Kapitel 4.2 wurde bereits die Frage diskutiert, warum die Transkription des *sigX-rsiX*-Operons durch den Faktor Rho terminiert werden muss. Es wurde festgestellt, dass es zwingend Bedingungen geben muss, unter denen keine Termination stattfindet, damit *sigX* und *rsiX* auch exprimiert werden können. Daher müssen auch Analysen erfolgen, die der Frage nachgehen, unter welchen Voraussetzungen die Transkription faktorabhängig terminiert wird. Es muss untersucht werden, ob die Konzentration von σ^X in der Zelle, ähnlich wie es für das *trp*-Operon gefunden wurde (Merino *et al.* 1995; Yakhnin *et al.* 2001), dabei eine Rolle spielt. Ferner wurde festgestellt, dass es aufgrund der Termination durch Rho im *sigX-rsiX*-Operon zum Phänomen der Transkriptions-Polarität kommt (Kapitel 4.4). Das bedeutet, dass nicht nur die Transkription von *rsiX*, sondern auch die Expression des stromaufwärts liegenden *sigX* beeinflusst wird. Die bisher einzige Erklärung dafür ist die

äquimolare Expression beider Gene. Allerdings fehlen an dieser Stelle für diese Erklärung auch noch fundierte Nachweise.

Im Kapitel 3.9 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die site-2 Protease RasP an der Proteolyse von RsiX beteiligt ist. Es wurde aber auch deutlich, dass der Prozess der regulierten intramembranen Proteolyse, wie er für den Anti-Sigmafaktor RsiW nachgewiesen werden konnte (Heinrich *et al.* 2009), nicht so einfach auf den Anti-Sigmafaktor RsiX übertragen werden kann. Hinsichtlich der Proteolyse von RsiX sind noch viele Fragen ungeklärt, die in weiteren Experimenten beantwortet werden müssen. So fehlt z. B. ein Hinweis auf die site-1 Protease, und man kennt auch nicht die exakten Stellen in der Aminosäuresequenz, an denen z. B. RasP angreift. Der Einfluss der cytoplasmatischen Protease ClpX bei der RsiX-Proteolyse muss auch noch abschließend geklärt werden. Möglich wären an dieser Stelle auch Analysen mit dem GFP-RsiX-Reportersystem in *E. coli*, um z. B. einen möglichen Einfluss der Protease Tsp an dem Prozess der RsiX-Proteolyse zu untersuchen (Heinrich *et al.* 2009). Zudem hat man bisher auch keinen eindeutigen Stressfaktor gefunden, aufgrund dessen die Proteolyse von RsiX eingeleitet wird, damit der Sigmafaktor σ^X mit der RNA-Polymerase interagieren kann. Erste Untersuchungen dazu brachten keine eindeutigen Ergebnisse hervor (Schäfer 2007).

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion/Knockout eines Gens
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bidest. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>cat</i>	Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDP-Star	Dinatrium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3,7]decan]-4-yl)-1-phenylphosphat
cfu	colony forming unit (koloniebildende Einheit)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECF	extra-cytoplasmic function (extracytoplasmatische Funktion)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(b-amino-ethylether)-N, N, N, N-tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
GFP	green fluorescent protein (Grün-fluoreszierendes Protein)
ggf.	gegebenenfalls
H ₂ O	Wasser
Hg	Quecksilber
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	high salt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium oder Luria Broth
LB ^X	LB-Medium mit dem Antibiotikum X
LS	low salt
M	molar
min	Minute
mm	Millimeter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
OD _{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = \text{XXX nm}$
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Ribo probe (RNA-Sonde)
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
ssRNA	einzelsträngige RNA

TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Polyoxymethylenether
U	Units
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z. B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
X ^r	Resistenz gegen das Antibiotikum X
X ^s	Sensitivität gegen das Antibiotikum X
X ^y	Antibiotikum X mit der Konzentration von y μ g/ml
z. T.	zum Teil

Literaturverzeichnis

- Abe, H., T. Abo, and H. Aiba, 1999 Regulation of intrinsic terminator by translation in *Escherichia coli*: transcription termination at a distance downstream. *Genes Cells* **4**: 87-97.
- Akbar, S., and C. W. Price, 1996 Isolation and characterization of *csbB*, a gene controlled by *Bacillus subtilis* general stress transcription factor sigma B. *Gene* **177**: 123-128.
- Alba, B. M., J. A. Leeds, C. Onufryk, C. Z. Lu, and C. A. Gross, 2002 DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* **16**: 2156-2168.
- Alifano, P., F. Rivellini, D. Limauro, C. B. Bruni, and M. S. Carlomagno, 1991 A consensus motif common to all Rho-dependent prokaryotic transcription terminators. *Cell* **64**: 553-563.
- Altmann, C. R., D. E. Solow-Cordero, and M. J. Chamberlin, 1994 RNA cleavage and chain elongation by *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase in a binary enzyme.RNA complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 3784-3788.
- Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen, 1961 Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **81**: 741-746.
- Antelmann, H., H. Tjalsma, B. Voigt, S. Ohlmeier, S. Bron *et al.* 2001 A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* **11**: 1484-1502.
- Arber, W., 1978 Restriction endonucleases. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* **17**: 73-79.
- Arber, W., 1993 Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* **135**: 49-56.
- Artsimovitch, I., and R. Landick, 2000 Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 7090-7095.
- Babitzke, P., and C. Yanofsky, 1993 Reconstitution of *Bacillus subtilis* trp attenuation *in vitro* with TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 133-137.
- Banerjee, S., J. Chalissery, I. Bandey, and R. Sen, 2006 Rho-dependent transcription termination: more questions than answers. *J.Microbiol.* **44**: 11-22.
- Bashyam, M. D., and S. E. Hasnain, 2004 The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect.Genet.Evol.* **4**: 301-308.
- Bear, D. G., P. S. Hicks, K. W. Escudero, C. L. Andrews, J. A. McSwiggen *et al.* 1988 Interactions of *Escherichia coli* transcription termination factor rho with RNA. II. Electron microscopy and nuclease protection experiments. *J.Mol.Biol.* **199**: 623-635.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson *et al.* 2002 Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.

- Berg, D., K. Barrett, and M. Chamberlin, 1971 Purification of two forms of *Escherichia coli* RNA polymerase and of sigma component, pp. 506-519 in *Methods Enzymol., Nucleic Acids, Part D*, edited by L. Grossman and K. Moldave. Academic Press.
- Berkhout, B., B. F. Schmidt, A. van Strien, J. van Boom, J. van Westrenen, and J. van Duin, 1987 Lysis gene of bacteriophage MS2 is activated by translation termination at the overlapping coat gene. *J.Mol.Biol.* **195**: 517-524.
- Borukhov, S., and K. Severinov, 2002 Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res.Microbiol.* **153**: 557-562.
- Bradford, M. M., 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**: 248-254.
- Bramkamp, M., L. Weston, R. A. Daniel, and J. Errington, 2006 Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* **62**: 580-591.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, and R. Kolter, 2001 Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 11621-11626.
- Braun, V., 1997 Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. *Arch.Microbiol.* **167**: 325-331.
- Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson, 1961 An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190**: 576-581.
- Brown, K. L., and K. T. Hughes, 1995 The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol.Microbiol.* **16**: 397-404.
- Brown, M. S., J. Ye, R. B. Rawson, and J. L. Goldstein, 2000 Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391-398.
- Brutsche, S., and V. Braun, 1997 SigX of *Bacillus subtilis* replaces the ECF sigma factor fecI of *Escherichia coli* and is inhibited by RsiX. *Mol.Gen.Genet.* **256**: 416-425.
- Bubunenko, M., T. Baker, and Court DL, 2007 Essentiality of ribosomal and transcription antitermination proteins analyzed by systematic gene replacement in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **189**: 2844-2853.
- Burgess, B. R., and J. P. Richardson, 2001 RNA passes through the hole of the protein hexamer in the complex with the *Escherichia coli* Rho factor. *J.Biol.Chem.* **276**: 4182-4189.
- Burgess, R. R., and A. A. Travers, 1970 *Escherichia coli* RNA polymerase: purification, subunit structure, and factor requirements. *Fed.Proc.* **29**: 1164-1169.
- Burgess, R. R., A. A. Travers, J. J. Dunn, and E. K. Bautz, 1969 Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**: 43-46.

- Burmann, B. M., and P. Rösch, 2011 The role of *E. coli* Nus-factors in transcription regulation and transcription:translation coupling: From structure to mechanism. *Transcription*. **2**: 130-134.
- Burnette, W. N., 1981 "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem*. **112**: 195-203.
- Burns, C. M., W. L. Nowatzke, and J. P. Richardson, 1999 Activation of Rho-dependent transcription termination by NusG. Dependence on terminator location and acceleration of RNA release. *J.Biol.Chem*. **274**: 5245-5251.
- Burns, C. M., L. V. Richardson, and J. P. Richardson, 1998 Combinatorial effects of NusA and NusG on transcription elongation and Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol*. **278**: 307-316.
- Butcher, B. G., and J. D. Helmann, 2006 Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Mol.Microbiol*. **60**: 765-782.
- Campbell, E. A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair *et al.* 2001 Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* **104**: 901-912.
- Cao, M., B. A. Bernat, Z. Wang, R. N. Armstrong, and J. D. Helmann, 2001 FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol*. **183**: 2380-2383.
- Cao, M., and J. D. Helmann, 2004 The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigmaX factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J.Bacteriol*. **186**: 1136-1146.
- Cao, M., and J. D. Helmann, 2002 Regulation of the *Bacillus subtilis* bcrC bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. *J.Bacteriol*. **184**: 6123-6129.
- Cao, M., T. Wang, R. Ye, and J. D. Helmann, 2002 Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons. *Mol.Microbiol*. **45**: 1267-1276.
- Cardinale, C. J., R. S. Washburn, V. R. Tadigotla, L. M. Brown, M. E. Gottesman *et al.* 2008 Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* **320**: 935-938.
- Carrano, L., C. Bucci, P. R. De, A. Lavitola, F. Manna *et al.* 1998 Effects of bicyclomycin on RNA- and ATP-binding activities of transcription termination factor Rho. *Antimicrob.Agents Chemother*. **42**: 571-578.
- Chaba, R., I. L. Grigorova, J. M. Flynn, T. A. Baker, and C. A. Gross, 2007 Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev*. **21**: 124-136.

- Chadsey, M. S., J. E. Karlinsey, and K. T. Hughes, 1998 The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev.* **12**: 3123-3136.
- Chamberlin, M., and P. Berg, 1962 Deoxyribonucleic acid-directed synthesis of ribonucleic acid by an enzyme from *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **48**: 81-94.
- Chen, R., S. B. Guttenplan, K. M. Blair, and D. B. Kearns, 2009 Role of the sigmaD-dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J.Bacteriol.* **191**: 5775-5784.
- Ciampi, M. S., 2006 Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* **152**: 2515-2528.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher *et al.* 1998 Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- d'Aubenton, C. Y., E. Brody, and C. Thermes, 1990 Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J.Mol.Biol.* **216**: 835-858.
- Das, A., D. Court, and S. Adhya, 1976 Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Escherichia coli* defective in transcription termination factor rho. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**: 1959-1963.
- de Hoon, M. J., Y. Makita, K. Nakai, and S. Miyano, 2005 Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS.Comput.Biol.* **1**: e25.
- De Las Penas, A., L. Connolly, and C. A. Gross, 1997b The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol.Microbiol.* **24**: 373-385.
- De Las Penas, A., L. Connolly, and C. A. Gross, 1997a SigmaE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **179**: 6862-6864.
- de Smit, M. H., P. W. Verlaan, van Duin J., and C. W. Pleij, 2008 Intracistronic transcriptional polarity enhances translational repression: a new role for Rho. *Mol.Microbiol.* **69**: 1278-1289.
- Doi, R. H., and L. F. Wang, 1986 Multiple procaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. *Microbiol.Rev.* **50**: 227-243.
- Dolan, J. W., N. F. Marshall, and J. P. Richardson, 1990 Transcription termination factor rho has three distinct structural domains. *J.Biol.Chem.* **265**: 5747-5754.
- Dombroski, A. J., B. D. Johnson, M. Lonetto, and C. A. Gross, 1996 The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 8858-8862.
- Dombroski, A. J., and T. Platt, 1988 Structure of rho factor: an RNA-binding domain and a separate region with strong similarity to proven ATP-binding domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 2538-2542.

- Dombroski, A. J., W. A. Walter, M. T. Record, Jr., D. A. Siegele, and C. A. Gross, 1992 Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**: 501-512.
- Dufour, A., and W. G. Haldenwang, 1994 Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J.Bacteriol.* **176**: 1813-1820.
- Dunn, J. J., and E. K. Bautz, 1969 DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*: studies on the role of sigma in chain initiation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **36**: 925-930.
- Ellermeier, C. D., and R. Losick, 2006 Evidence for a novel protease governing regulated intramembrane proteolysis and resistance to antimicrobial peptides in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **20**: 1911-1922.
- Epshtein, V., D. Dutta, J. Wade, and E. Nudler, 2010 An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* **463**: 245-249.
- Erickson, J. W., and C. A. Gross, 1989 Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* **3**: 1462-1471.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness *et al.* 1995 Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Flynn, J. M., I. Levchenko, R. T. Sauer, and T. A. Baker, 2004 Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev.* **18**: 2292-2301.
- Fox, T. D., and J. Pero, 1974 New phage-SPO1-induced polypeptides associated with *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **71**: 2761-2765.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton *et al.* 1995 The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Galluppi, G. R., and J. P. Richardson, 1980 ATP-induced changes in the binding of RNA synthesis termination protein Rho to RNA. *J.Mol.Biol.* **138**: 513-539.
- Geiselmann, J., Y. Wang, S. E. Seifried, and P. H. von Hippel, 1993 A physical model for the translocation and helicase activities of *Escherichia coli* transcription termination protein Rho. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 7754-7758.
- Gerth, U., E. Kruger, I. Derre, T. Msadek, and M. Hecker, 1998 Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol.Microbiol.* **28**: 787-802.
- Goliger, J. A., X. J. Yang, H. C. Guo, and J. W. Roberts, 1989 Early transcribed sequences affect termination efficiency of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J.Mol.Biol.* **205**: 331-341.
- Gomelsky, M., and S. Kaplan, 1996 The *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 rho gene: expression and genetic analysis of structure and function. *J.Bacteriol.* **178**: 1946-1954.

- Govantes, F., J. A. Molina-Lopez, and E. Santero, 1996 Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. *J.Bacteriol.* **178**: 6817-6823.
- Govantes, F., and E. Santero, 1996 Transcription termination within the regulatory nifLA operon of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol.Gen.Genet.* **250**: 447-454.
- Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan, 1990 Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**: 4645-4649.
- Gross, C. A., M. Lonetto, and R. Losick, 1992 6 Bacterial Sigma Factors. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*; Volume 22A: *Transcriptional Regulation 1*.
- Gusarov, I., and E. Nudler, 1999 The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol.Cell* **3**: 495-504.
- Gussin, G. N., C. W. Ronson, and F. M. Ausubel, 1986 Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu.Rev.Genet.* **20**: 567-591.
- Haas, H., W. M. Becker, H. J. Maasch, and M. Schlaak, 1986 Analysis of allergen components in grass pollen extracts using immunoblotting. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **79**: 434-440.
- Haldenwang, W. G., 1995 The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **59**: 1-30.
- Haldenwang, W. G., and R. Losick, 1980 Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**: 7000-7004.
- Hart, C. M., and J. W. Roberts, 1991 Rho-dependent transcription termination. Characterization of the requirement for cytidine in the nascent transcript. *J.Biol.Chem.* **266**: 24140-24148.
- Härtl, B., W. Wehrl, T. Wiegert, G. Homuth, and W. Schumann, 2001 Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes. *J.Bacteriol.* **183**: 2696-2699.
- Hartmann, G., K. O. Honikel, F. Knusel, and J. Nuesch, 1967 The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim.Biophys.Acta* **145**: 843-844.
- Hayward, G. S., and M. G. Smith, 1972 The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **63**: 383-395.
- Hecker, M., and U. Volker, 2001 General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv.Microb.Physiol* **44**: 35-91.
- Heinrich, J., K. Hein, and T. Wiegert, 2009 Two proteolytic modules are involved in regulated intramembrane proteolysis of *Bacillus subtilis* RsiW. *Mol.Microbiol.* **74**: 1412-1426.

- Heinrich, J., and T. Wiegert, 2009 Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. *Res.Microbiol.* **160**: 696-703.
- Heinrich, J., and T. Wiegert, 2006 YpdC determines site-1 degradation in regulated intramembrane proteolysis of the RsiW anti-sigma factor of *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* **62**: 566-579.
- Helmann, J. D., 2006 Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* sigmaW protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Sci.Prog.* **89**: 243-266.
- Helmann, J. D., 2002 The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv.Microb.Physiol* **46**: 47-110.
- Hershberger, C. D., R. W. Ye, M. R. Parsek, Z. D. Xie, and A. M. Chakrabarty, 1995 The algT (algU) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative sigma factor (sigma E). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 7941-7945.
- Hoagland, M. B., 1960 The relationship of nucleic acid and protein synthesis as revealed by studies in cell-free systems, pp. 349-408 in *The Nucleic Acids*, edited by E.Chargaff, and J.N.Davidson. Academic Press, New York.
- Holmes, D. S., and M. Quigley, 1981 A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* **114**: 193-197.
- Homuth, G., M. Heinemann, U. Zuber, and W. Schumann, 1996 The genes of lepA and hemN form a bicistronic operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **142** (Pt 7): 1641-1649.
- Homuth, G., S. Masuda, A. Mogk, Y. Kobayashi, and W. Schumann, 1997 The dnaK operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J.Bacteriol.* **179**: 1153-1164.
- Huang, X., A. Decatur, A. Sorokin, and J. D. Helmann, 1997 The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature. *J.Bacteriol.* **179**: 2915-2921.
- Huang, X., K. L. Fredrick, and J. D. Helmann, 1998 Promoter recognition by *Bacillus subtilis* sigmaW: autoregulation and partial overlap with the sigmaX regulon. *J.Bacteriol.* **180**: 3765-3770.
- Huang, X., A. Gaballa, M. Cao, and J. D. Helmann, 1999 Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol.Microbiol.* **31**: 361-371.
- Huang, X., and J. D. Helmann, 1998 Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* sigma X factor using a consensus-directed search. *J.Mol.Biol.* **279**: 165-173.
- Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon, and J. E. Karlinsey, 1993 Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**: 1277-1280.
- Hughes, K. T., and K. Mathee, 1998 The anti-sigma factors. *Annu.Rev.Microbiol.* **52**: 231-286.

- Hurwitz, J., J. J. Furth, M. Anders, P. J. Ortiz, and J. T. August, 1961 The enzymatic incorporation of ribonucleotides into RNA and the role of DNA. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **26**: 91-100.
- Ingham, C. J., J. Dennis, and P. A. Furneaux, 1999 Autogenous regulation of transcription termination factor Rho and the requirement for Nus factors in *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* **31**: 651-663.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray, 1995 Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol.Rev.* **59**: 171-200.
- Jacob, F., and J. Monod, 1961 Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J.Mol.Biol.* **3**: 318-356.
- Jeong, Y. J., D. E. Kim, and S. S. Patel, 2004 Nucleotide binding induces conformational changes in *Escherichia coli* transcription termination factor Rho. *J.Biol.Chem.* **279**: 18370-18376.
- Kainz, M., and R. L. Gourse, 1998 The C-terminal domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is required for efficient rho-dependent transcription termination. *J.Mol.Biol.* **284**: 1379-1390.
- Kanehara, K., K. Ito, and Y. Akiyama, 2002 YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev.* **16**: 2147-2155.
- Kassavetis, G. A., and M. J. Chamberlin, 1981 Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA *in vitro*. *J.Biol.Chem.* **256**: 2777-2786.
- Kayser, O., 2002 in *Grundwissen pharmazeutische Biotechnologie*, Teubner Verlag.
- Kearns, D. B., and R. Losick, 2003 Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* **49**: 581-590.
- Kobayashi, K., 2007 *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *J.Bacteriol.* **189**: 4920-4931.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni *et al.* 1997 The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Küpper, H., T. Sekiya, M. Rosenberg, J. Egan, and A. Landy, 1978 A rho-dependent termination site in the gene coding for tyrosine tRNA su3 of *Escherichia coli*. *Nature* **272**: 423-428.
- Kushner, S. R., 1996 mRNA decay, pp. 849-860 in F.C. Neidhardt *et al.* (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ASM Press, Washington, D.C..
- Laemmli, U. K., 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lau, L. F., J. W. Roberts, and R. Wu, 1982 Transcription terminates at lambda tR1 in three clusters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**: 6171-6175.
- Lau, L. F., J. W. Roberts, and R. Wu, 1983 RNA polymerase pausing and transcript release at the lambda tR1 terminator *in vitro*. *J.Biol.Chem.* **258**: 9391-9397.
- Lawrence, J. S., and W. W. Ford, 1916 Spore-bearing Bacteria in Milk. *J.Bacteriol.* **1**: 277-320.
- Lazarevic, V., P. Margot, B. Soldo, and D. Karamata, 1992 Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* *lytRABC* divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J.Gen.Microbiol.* **138**: 1949-1961.
- Leibinger, W., B. Breuker, M. Hahn, and K. Mendgen, 1997 Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* **87**: 1103-1110.
- Lonetto, M., M. Gribskov, and C. A. Gross, 1992 The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J.Bacteriol.* **174**: 3843-3849.
- Lonetto, M. A., K. L. Brown, K. E. Rudd, and M. J. Buttner, 1994 Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 7573-7577.
- Luo, Y., and J. D. Helmann, 2009 Extracytoplasmic function sigma factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **191**: 4951-4958.
- MacLellan, S. R., T. Wecke, and J. D. Helmann, 2008 A previously unidentified sigma factor and two accessory proteins regulate oxalate decarboxylase expression in *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* **69**: 954-967.
- Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss, 1992 New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J.Bacteriol.* **174**: 5633-5638.
- Magyar, A., X. Zhang, H. Kohn, and W. R. Widger, 1996 The antibiotic bicyclomycin affects the secondary RNA binding site of *Escherichia coli* transcription termination factor Rho. *J.Biol.Chem.* **271**: 25369-25374.
- Makinoshima, H., and M. S. Glickman, 2005 Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* **436**: 406-409.
- Manganelli, R., M. I. Voskuil, G. K. Schoolnik, and I. Smith, 2001 The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol.Microbiol.* **41**: 423-437.
- Margot, P., M. Pagni, and D. Karamata, 1999 *Bacillus subtilis* 168 gene *lytF* encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, sigmaD. *Microbiology* **145** (Pt 1): 57-65.

- Marquez, L. M., J. D. Helmann, E. Ferrari, H. M. Parker, G. W. Ordal *et al.* 1990 Studies of sigma D-dependent functions in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **172**: 3435-3443.
- Mascher, T., A. B. Hachmann, and J. D. Helmann, 2007 Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factors. *J.Bacteriol.* **189**: 6919-6927.
- Mathew, R., and D. Chatterji, 2006 The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol.* **14**: 450-455.
- Matsumoto, K., M. Okada, Y. Horikoshi, H. Matsuzaki, T. Kishi *et al.* 1998 Cloning, sequencing, and disruption of the *Bacillus subtilis* *psd* gene coding for phosphatidylserine decarboxylase. *J.Bacteriol.* **180**: 100-106.
- McCarthy, J. E., and C. Gualerzi, 1990 Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* **6**: 78-85.
- McCarty, J. S., S. Rudiger, H. J. Schonfeld, J. Schneider-Mergener, K. Nakahigashi *et al.* 1996 Regulatory region C of the *E. coli* heat shock transcription factor, sigma32, constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J.Mol.Biol.* **256**: 829-837.
- Mecsas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross, 1993 The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**: 2618-2628.
- Merino, E., P. Babitzke, and C. Yanofsky, 1995 *trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP)-*trp* leader RNA interactions mediate translational as well as transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *trp* operon. *J.Bacteriol.* **177**: 6362-6370.
- Minnig, K., J. L. Barblan, S. Kehl, S. B. Moller, and C. Mauel, 2003 In *Bacillus subtilis* W23, the duet sigmaXsigmaM, two sigma factors of the extracytoplasmic function subfamily, are required for septum and wall synthesis under batch culture conditions. *Mol.Microbiol.* **49**: 1435-1447.
- Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos, and S. Raina, 1997 Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol.Microbiol.* **24**: 355-371.
- Mogk, A., R. Hayward, and W. Schumann, 1996 Integrative vectors for constructing single-copy transcriptional fusions between *Bacillus subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes. *Gene* **182**: 33-36.
- Morgan, W. D., D. G. Bear, B. L. Litchman, and P. H. von Hippel, 1985 RNA sequence and secondary structure requirements for rho-dependent transcription termination. *Nucleic Acids Res.* **13**: 3739-3754.
- Morgan, W. D., D. G. Bear, and P. H. von Hippel, 1983b Rho-dependent termination of transcription. I. Identification and characterization of termination sites for transcription from the bacteriophage lambda PR promoter. *J.Biol.Chem.* **258**: 9553-9564.

- Morgan, W. D., D. G. Bear, and P. H. von Hippel, 1983a Rho-dependent termination of transcription. II. Kinetics of mRNA elongation during transcription from the bacteriophage lambda PR promoter. *J.Biol.Chem.* **258**: 9565-9574.
- Msadek, T., V. Dartois, F. Kunst, M. L. Herbaud, F. Denizot *et al.* 1998 ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol.Microbiol.* **27**: 899-914.
- Murashima, K., C. L. Chen, A. Kosugi, Y. Tamaru, R. H. Doi *et al.* 2002 Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *J.Bacteriol.* **184**: 76-81.
- Murray, E. J., and N. R. Stanley-Wall, 2010 The sensitivity of *Bacillus subtilis* to diverse antimicrobial compounds is influenced by Abh. *Arch.Microbiol.* **192**: 1059-1067.
- Murray, E. J., M. A. Strauch, and N. R. Stanley-Wall, 2009 SigmaX is involved in controlling *Bacillus subtilis* biofilm architecture through the AbrB homologue Abh. *J.Bacteriol.* **191**: 6822-6832.
- Nguyen, H. D. 2006. Construction of plasmid-based expression and secretion vectors and study of the immobilization of proteins on the surface of *Bacillus subtilis* cells. Doktorarbeit, Universität Bayreuth.
- Nishida, M., Y. Mine, T. Matsubara, S. Goto, and S. Kuwahara, 1972 Bicyclomycin, a new antibiotic. 3. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity. *J.Antibiot.(Tokyo)* **25**: 582-593.
- Noone, D., A. Howell, and K. M. Devine, 2000 Expression of *ykdA*, encoding a *Bacillus subtilis* homologue of HtrA, is heat shock inducible and negatively autoregulated. *J.Bacteriol.* **182**: 1592-1599.
- Nudler, E., and M. E. Gottesman, 2002 Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* **7**: 755-768.
- Ohki, R., K. Tateno, Y. Okada, H. Okajima, K. Asai *et al.* 2003 A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J.Bacteriol.* **185**: 51-59.
- Okada, M., H. Matsuzaki, I. Shibuya, and K. Matsumoto, 1994 Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus subtilis* gene for phosphatidylserine synthase. *J.Bacteriol.* **176**: 7456-7461.
- Oppenheim, D. S., and C. Yanofsky, 1980 Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics* **95**: 785-795.
- Opperman, T., and J. P. Richardson, 1994 Phylogenetic analysis of sequences from diverse bacteria with homology to the *Escherichia coli* rho gene. *J.Bacteriol.* **176**: 5033-5043.
- Paget, M. S., and J. D. Helmann, 2003 The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**: 203.
- Paik, S. H., A. Chakicherla, and J. N. Hansen, 1998 Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of,

- sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J.Biol.Chem.* **273**: 23134-23142.
- Park, H. G., X. Zhang, H. S. Moon, A. Zwiefka, K. Cox *et al.* 1995 Bicyclomycin and dihydrobicyclomycin inhibition kinetics of *Escherichia coli* rho-dependent transcription termination factor ATPase activity. *Arch.Biochem.Biophys.* **323**: 447-454.
- Pasman, Z., and P. H. von Hippel, 2000 Regulation of rho-dependent transcription termination by NusG is specific to the *Escherichia coli* elongation complex. *Biochemistry* **39**: 5573-5585.
- Perego, M., P. Glaser, A. Minutello, M. A. Strauch, K. Leopold *et al.* 1995 Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J.Biol.Chem.* **270**: 15598-15606.
- Peters, J. M., R. A. Mooney, P. F. Kuan, J. L. Rowland, S. Keles *et al.* 2009 Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**: 15406-15411.
- Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Volker *et al.* 2001 Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **183**: 5617-5631.
- Pietiainen, M., M. Gardemeister, M. Mecklin, S. Leskela, M. Sarvas *et al.* 2005 Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* **151**: 1577-1592.
- Pingoud A., 2004 *Restriktionsenzyme: Struktur, Funktion und Evolution*. Schöningh Paderborn.
- Platt, T., 1981 Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of *E. coli*. *Cell* **24**: 10-23.
- Platt, T., 1985 Control of Gene Expression in Bacteria, pp. 255-278 in *Genetics of Bacteria*, edited by J. Scaife, D. Leach, and A. Galizzi. Academic Press.
- Pooley, H. M., and D. Karamata, 2000 Incorporation of [2-3H]glycerol into cell surface components of *Bacillus subtilis* 168 and thermosensitive mutants affected in wall teichoic acid synthesis: effect of tunicamycin. *Microbiology* **146 (Pt 4)**: 797-805.
- Price, C. W., 2000 Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. In: *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Price, C. W., M. A. Gitt, and R. H. Doi, 1983 Isolation and physical mapping of the gene encoding the major sigma factor of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**: 4074-4078.
- Qiu, J., and J. D. Helmann, 2001 The -10 region is a key promoter specificity determinant for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigma factors sigma(X) and sigma(W). *J.Bacteriol.* **183**: 1921-1927.

- Quirk, P. G., E. A. Dunkley, Jr., P. Lee, and T. A. Krulwich, 1993 Identification of a putative *Bacillus subtilis rho* gene. *J.Bacteriol.* **175**: 647-654.
- Reynolds, R., and M. J. Chamberlin, 1992 Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA. II. Construction and analysis of hybrid terminators. *J.Mol.Biol.* **224**: 53-63.
- Reznikoff, W. S., D. A. Siegele, D. W. Cowing, and C. A. Gross, 1985 The regulation of transcription initiation in bacteria. *Annu.Rev.Genet.* **19**: 355-387.
- Richardson, J. P., 1982 Activation of rho protein ATPase requires simultaneous interaction at two kinds of nucleic acid-binding sites. *J.Biol.Chem.* **257**: 5760-5766.
- Richardson, J. P., 1991 Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell* **64**: 1047-1049.
- Richardson, J. P., 1993 Transcription termination. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **28**: 1-30.
- Rietkotter, E., D. Hoyer, and T. Mascher, 2008 Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* **68**: 768-785.
- Roberts, J. W., 1969 Termination factor for RNA synthesis. *Nature* **224**: 1168-1174.
- Rossi, J., J. Egan, L. Hudson, and A. Landy, 1981 The *tyrT* locus: termination and processing of a complex transcript. *Cell* **26**: 305-314.
- Saito, H., T. Shibata, and T. Ando, 1979 Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol.Gen.Genet.* **170**: 117-122.
- Salstrom, J. S., M. Fiandt, and W. Szybalski, 1979 N-independent leftward transcription in coliphage lambda: deletions, insertions and new promoters bypassing termination functions. *Mol.Gen.Genet.* **168**: 211-230.
- Sambrook J., and D. W. Russell, 2001 Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , New York.
- Schäfer, K. 2007. Analyse der Aktivierung des ECF Sigmafaktors SigX aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Schlegel H. G., 1992 Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Schmidt, M. C., and M. J. Chamberlin, 1984 Binding of rho factor to *Escherichia coli* RNA polymerase mediated by nusA protein. *J.Biol.Chem.* **259**: 15000-15002.
- Schöbel, S., S. Zellmeier, W. Schumann, and T. Wiegert, 2004 The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol.Microbiol.* **52**: 1091-1105.
- Silber, K. R., K. C. Keiler, and R. T. Sauer, 1992 Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 295-299.

- Simonen, M., and I. Palva, 1993 Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol.Rev.* **57**: 109-137.
- Sklar, J. G., H. Makinoshima, J. S. Schneider, and M. S. Glickman, 2010 *M. tuberculosis* intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates. *Mol.Microbiol.* **77**: 605-617.
- Skordalakes, E., and J. M. Berger, 2003 Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell* **114**: 135-146.
- Skordalakes, E., A. P. Brogan, B. S. Park, H. Kohn, and J. M. Berger, 2005 Structural mechanism of inhibition of the Rho transcription termination factor by the antibiotic bicyclomycin. *Structure* **13**: 99-109.
- Smith, G. L., S. S. Socransky, and C. M. Smith, 1989 Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol.Immunol.* **4**: 47-51.
- Sohn, J., R. A. Grant, and R. T. Sauer, 2007 Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell* **131**: 572-583.
- Sohn, J., and R. T. Sauer, 2009 OMP peptides modulate the activity of DegS protease by differential binding to active and inactive conformations. *Mol.Cell* **33**: 64-74.
- Sorokin, A., E. Zumstein, V. Azevedo, S. D. Ehrlich, and P. Serror, 1993 The organization of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome region between the *spoVA* and *serA* genetic loci, based on sequence data. *Mol.Microbiol.* **10**: 385-395.
- Southern, E. M., 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Biotechnology* **24**: 122-139.
- Sprenger, H., L. Konrad, E. Rischkowsky, and D. Gemsa, 1995 Background reduction in northern analysis by preabsorption of digoxigenin-labeled riboprobes. *Biotechniques* **19**: 334-340.
- Staron, A., H. J. Sofia, S. Dietrich, L. E. Ulrich, H. Liesegang *et al.* 2009 The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol.Microbiol.* **74**: 557-581.
- Stefano, J. E., and J. D. Gralla, 1982 Spacer mutations in the lac ps promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**: 1069-1072.
- Steinmetz, E. J., and T. Platt, 1994 Evidence supporting a tethered tracking model for helicase activity of *Escherichia coli* Rho factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 1401-1405.
- Steinmetz, M., and R. Richter, 1994 Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J.Bacteriol.* **176**: 1761-1763.
- Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau, 2000 Two-component signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* **69**: 183-215.
- Strauch, M. A., B. G. Bobay, J. Cavanagh, F. Yao, A. Wilson *et al.* 2007 Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression. *J.Bacteriol.* **189**: 7720-7732.

- Sullivan, S. L., and M. E. Gottesman, 1992 Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. *Cell* **68**: 989-994.
- Telesnitsky, A., and M. J. Chamberlin, 1989a Terminator-distal sequences determine the *in vitro* efficiency of the early terminators of bacteriophages T3 and T7. *Biochemistry* **28**: 5210-5218.
- Telesnitsky, A. P., and M. J. Chamberlin, 1989b Sequences linked to prokaryotic promoters can affect the efficiency of downstream termination sites. *J.Mol.Biol.* **205**: 315-330.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1992 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-149.
- Travers, A. A., and R. R. Burgess, 1969 Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature* **222**: 537-540.
- Turner, M. S., and J. D. Helmann, 2000 Mutations in multidrug efflux homologs, sugar isomerases, and antimicrobial biosynthesis genes differentially elevate activity of the sigma(X) and sigma(W) factors in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **182**: 5202-5210.
- Uptain, S. M., C. M. Kane, and M. J. Chamberlin, 1997 Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu.Rev.Biochem.* **66**: 117-172.
- Urban, S., 2009 Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. *Nat.Rev.Microbiol.* **7**: 411-423.
- Van Hove, B., H. Staudenmaier, and V. Braun, 1990 Novel two-component transmembrane transcription control: regulation of iron dicitrate transport in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* **172**: 6749-6758.
- Völker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Volker *et al.* 1994 Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140 (Pt 4)**: 741-752.
- von Hippel, P. H., and T. D. Yager, 1991 Transcript elongation and termination are competitive kinetic processes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 2307-2311.
- Walsh, N. P., B. M. Alba, B. Bose, C. A. Gross, and R. T. Sauer, 2003 OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**: 61-71.
- Washburn, R. S., A. Marra, A. P. Bryant, M. Rosenberg, and D. R. Gentry, 2001 *rho* is not essential for viability or virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**: 1099-1103.
- Wecke, J., K. Madela, and W. Fischer, 1997 The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 2953-2960.
- Wei, R. R., and J. P. Richardson, 2001 Identification of a RNA-binding Site in the ATP binding domain of *Escherichia coli* Rho by H₂O₂/Fe-EDTA cleavage protection studies. *J.Biol.Chem.* **276**: 28380-28387.

- Weihofen, A., and B. Martoglio, 2003 Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol.* **13**: 71-78.
- Weiss, S. B., 1960 Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolynucleotide linkages of ribonucleic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **46**: 1020-1030.
- Wiegert, T., G. Homuth, S. Versteeg, and W. Schumann, 2001 Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon. *Mol.Microbiol.* **41**: 59-71.
- Wiegert, T., and W. Schumann, 2001 SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **183**: 3885-3889.
- Wong, S. L., C. W. Price, D. S. Goldfarb, and R. H. Doi, 1984 The subtilisin E gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from a sigma 37 promoter *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**: 1184-1188.
- Wu, S. C., J. C. Yeung, Y. Duan, R. Ye, S. J. Szarka *et al.* 2002 Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**: 3261-3269.
- Yakhnin, A. V., H. Yakhnin, and P. Babitzke, 2008 Function of the *Bacillus subtilis* transcription elongation factor NusG in hairpin-dependent RNA polymerase pausing in the *trp* leader. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**: 16131-16136.
- Yakhnin, H., J. E. Babiarz, A. V. Yakhnin, and P. Babitzke, 2001 Expression of the *Bacillus subtilis trpEDCFBA* operon is influenced by translational coupling and Rho termination factor. *J.Bacteriol.* **183**: 5918-5926.
- Yoshimura, M., K. Asai, Y. Sadaie, and H. Yoshikawa, 2004 Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* **150**: 591-599.
- Zellmeier, S., W. Schumann, and T. Wiegert, 2006 Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* sigmaW stress response. *Mol.Microbiol.* **61**: 1569-1582.
- Zellmeier, S., U. Zuber, W. Schumann, and T. Wiegert, 2003 The absence of FtsH metalloprotease activity causes overexpression of the sigmaW-controlled *pbpE* gene, resulting in filamentous growth of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **185**: 973-982.
- Zheng, C., and D. I. Friedman, 1994 Reduced Rho-dependent transcription termination permits NusA-independent growth of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 7543-7547.
- Zwiefka, A., H. Kohn, and W. R. Widger, 1993 Transcription termination factor rho: the site of bicyclomycin inhibition in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**: 3564-3570.

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit entsteht folgende Veröffentlichung:

Schäfer, K., Heinrich, J., Mäder, U., Homuth, G. and Wiegert, T.:

Activity of the *Bacillus subtilis* ECF sigma factor σ^X is influenced by intracistronic transcriptional termination and regulated intramembrane proteolysis of its anti sigma factor RsiX

Manuskript in Vorbereitung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet haben.

Prof. Thomas Wiegert möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Promotion bedanken. Am Fortgang dieser Arbeit war er stets interessiert und unterstützte mich mit zahlreichen Denkanstößen und Ratschlägen. Außerdem danke ich ihm für sein Verständnis und seine Geduld als es bei mir privat mal nicht so rund lief.

Prof. Wolfgang Schumann danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und dafür, dass seine Tür bei jeglicher Art von Problemen immer offen stand.

Allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schumann/Wiegert, die mich während meiner Promotion begleitet haben, danke ich für die gute Zusammenarbeit, die vielen kleinen Tipps, damit meine Experimente erfolgreich wurden und auch für die kleinen Späße, die immer Auflockerung ins Labor brachten. Karin und Petra, euch möchte ich besonders für die vielen Kleinigkeiten danken, die zum Laboralltag dazugehören und die ihr immer zuverlässig erledigt habt.

Prof. Olaf Stemmann und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme und die uneingeschränkte Mitbenutzung vieler Laborgeräte.

Bei Dr. Markus Helfrich, Berit Leo, Thomas Rasche und Dirk Scholz möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Für die Finanzierung meiner Promotion danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG: Schu 414/21-1, Juni 2007-Februar 2011) und auch dem Freistaat Bayern, zum einem für die Finanzierung durch den „Feuerwehrfonds“ bei der Doktorandenförderung an der Universität Bayreuth (Februar 2011-Juli 2011) und zum anderen für die Gewährung eines Stipendiums im Rahmen des „Programmes zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ (August 2011-Oktober 2011).

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich besonders für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf meinem bisherigen Weg danken. Danke dafür, dass ihr mir mit Rat und Tat auch in schweren Zeiten zur Seite standet.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Thomas Rasche, der immer ohne Wenn und Aber hinter mir steht, mich immer nach Kräften unterstützt und immer für mich da ist, ganz besonders in sehr schweren Lebenssituationen. Vielen, vielen Dank!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, November 2011

Katharina Schäfer