

**Analyse der Funktion und Regulation des ECF-  
Sigmafaktors YlaC aus *Bacillus subtilis***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

— Dr. rer. nat. —

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Stephan Zellmeier**

aus Dorfen

Bayreuth 2005

Die vorliegende Arbeit wurde vom November 2001 bis August 2005 am Lehrstuhl für Genetik unter der Leitung von PD Dr. Thomas Wiegert angefertigt.

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

**Promotionsgesuch eingereicht am: 12. August 2005**

**Wissenschaftliches Kolloquium am: 10. Februar 2006**

1. Gutachter: PD Dr. Thomas Wiegert

2. Gutachter: Prof. Dr. F. X. Schmid

Dekan: Prof. Dr. Beierkuhnlein



*für meine familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>1</b>	<b>Summary</b>	3
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	5
	<b>2.1 Bakterien als Modellorganismen</b>	5
	<b>2.2 Bakterielle Genregulation</b>	5
	2.2.1 DNA-abhängige RNA-Polymerasen	6
	<b>2.3 Bakterielle Sigmafaktoren</b>	7
	2.3.1 Primäre und alternative Sigmafaktoren	7
	2.3.2 Sigmafaktoren mit extracytoplasmatischer Funktion (ECF- Sigmafaktoren)	9
	<b>2.4 Anti-Sigmafaktoren</b>	10
	<b>2.5 Regulation von ECF-Sigmafaktoren</b>	12
	<b>2.6 ECF-Sigmafaktoren aus <i>E. coli</i></b>	14
	<b>2.7 Der ECF-Sigmafaktor SigR aus <i>S. coelicolor</i></b>	17
	<b>2.8 Der ECF-Sigmafaktor CarQ aus <i>M. xanthus</i></b>	17
	<b>2.9 ECF-Sigmafaktoren aus <i>B. subtilis</i></b>	18
	2.9.1 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^W$ aus <i>B. subtilis</i>	18
	2.9.2 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^X$ aus <i>B. subtilis</i>	20
	2.9.3 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^M$ aus <i>B. subtilis</i>	21
	2.9.4 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^Y$ aus <i>B. subtilis</i>	22
	2.9.5 Die ECF-Sigmafaktoren $\sigma^V$ und $\sigma^Z$	23
	2.9.6 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^{YlaC}$	23
	<b>2.10 Problemstellung</b>	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	27
	<b>3.1 Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper</b>	27
	3.1.1 Bakterienstämme	27
	3.1.2 Hefestämme	31

---

3.1.3	Plasmide	32
3.1.4	Oligonukleotide	36
3.1.5	Antikörper	40
<b>3.2</b>	<b>Nährmedien und Antibiotika</b>	<b>40</b>
3.2.1	Nährmedien	41
3.2.2	Antibiotikallösungen	43
<b>3.3</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>46</b>
3.4.1	Enzyme	46
3.4.2	Molekulargewichtsstandards	46
3.4.2.1	Proteinstandards	46
3.4.2.2	DNA- und RNA-Standards	46
3.4.3	Biochemikalien und Chemikalien	47
3.4.4	Verwendete Kits	47
3.4.5	Radiochemikalien	48
3.4.6	Geräte	48
3.4.7	Zentrifugen	49
3.4.8	Sonstiges	49
<b>3.5</b>	<b>Allgemeine Methoden</b>	<b>49</b>
3.5.1	Absorptionsmessung	49
3.5.2	Aufnehmen von Wachstumskurven	50
3.5.3	Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen	50
3.5.4	Autoradiographie	50
<b>3.6</b>	<b>Genetische und molekularbiologische Methoden</b>	<b>51</b>
3.6.1	Transformation von <i>E. coli</i>	51
3.6.1.1	Herstellung von RbCl-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.6.1.2	Transformation RbCl-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.6.2	Transformation von <i>B. subtilis</i>	52
3.6.3	Herstellung kompetenter <i>B. subtilis</i> -Zellen	52
3.6.4	Transformation von DNA	52
<b>3.7</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>52</b>
3.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (Boiling Prep.)	52
3.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midiprep)	53

---

3.7.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	53
3.7.4	Reinigung von DNA	53
3.7.5	Enzymatische Hydrolyse von DNA	53
3.7.6	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	53
3.7.7	Dephosphorylierung linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase	53
3.7.8	Ligation von DNA-Fragmenten	54
3.7.9	PCR-Reaktion mit der Deep-Vent®- bzw. Taq-DNA-Polymerase	54
3.7.10	Kolonie-PCR	54
3.7.11	Southern-Blot	54
3.7.11.1	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen und Transfer auf Nylonmembranen	54
3.7.11.2	Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden	54
3.7.11.3	Hybridisierung membrangebundener DNA mit DIG-markierten DNA-Sonden	55
3.7.11.4	Nachweis DIG-markierter DNA mittels Chemolumineszenz	55
3.7.12	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	55
3.7.12.1	Sequenzierreaktion	55
3.7.12.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
<b>3.8</b>	<b>Arbeiten mit RNA</b>	<b>56</b>
3.8.1	DEPC-Behandlung von Lösungen und Glasgeräten	56
3.8.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>B. subtilis</i>	56
3.8.3	Elektrophorese von RNA in Agarosegelen	58
3.8.4	Transfer von RNA auf Nylonmembranen	59
3.8.4.1	Northern-Blot	59
3.8.5	Herstellung DIG-markierter ssRNA-Sonden <i>in vitro</i>	60
3.8.5.1	Herstellung einer DNA-Matrize mittels PCR	60
3.8.5.2	<i>In-vitro</i> -Transkription	60
3.8.5.3	Reinigung DIG-markierter ssRNA-Sonde durch Präabsorption	61
3.8.6	Hybridisierung membrangebundener RNA mit Digoxigenin-markierten Einzelstrang RNA-Sonden	62
3.8.7	Nachweis Digoxigenin-markierter Nukleinsäuren mittels Chemolumineszenz	62
3.8.8	Kartierung des 5'-Endes von mRNAs mittels Primer-Extension	63

<b>3.9</b>	<b>DNA-Makroarrays</b>	64
3.9.1	Probenentnahme zur RNA-Präparation	64
3.9.2	Detektion der DNA-Makroarrays	64
3.9.3	Strippen der Macroarrays	65
<b>3.10</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen</b>	65
3.10.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	65
3.10.2	Bestimmung von LacZ-Aktivitäten in <i>B. subtilis</i> Zellextrakten	65
3.10.3	Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen	65
3.10.4	Isolierung von Membranfraktionen aus <i>B. subtilis</i>	66
3.10.5	Western-Blot und immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	66
3.10.6	Überexpression und Aufreinigung His <sub>6</sub> -getaggtter Proteine aus <i>E. coli</i>	67
3.10.7	Nachweis von Zn <sup>2+</sup> mittels Atomabsorptions-Spektroskopie	68
3.10.8	Nachweis von freien Zinkionen in Lösung mit [4-(2-Pyridylazo-)Resorcinol]	68
3.10.9	Pulse-Chase-Experimente	68
3.10.10	Nachweis einer direkten Interaktion zwischen cMYC-YlaB und FLAG <sub>3</sub> -YlaD	69
<b>3.11</b>	<b>Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i></b>	70
<b>3.12</b>	<b>Konstruktion von Plasmiden</b>	70
<b>3.13</b>	<b>Konstruktion von Bakterienstämmen</b>	73
3.13.1	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ70	73
3.13.2	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ71	73
3.13.3	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ72	74
3.13.4	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ73	74
3.13.5	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ74	74
3.13.6	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ75	75
3.13.7	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ76	75
3.13.8	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ77	75
3.13.9	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ78, SZ78A	75
3.13.10	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ79, SZ96A	76
3.13.11	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ80, SZ83, SZ85, SZ87, SZ89, SZ91, SZ104	76

3.13.12	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ81, SZ84, SZ86, SZ88, SZ90, SZ92, SZ107, SZ109, SZ111	76
3.13.13	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ93	76
3.13.14	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ94, SZ94A	77
3.13.15	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ95 bis SZ99	77
3.13.16	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ100, SZ100A SZ101, SZ102 und SZ103	77
3.13.17	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ104	77
3.13.18	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ105	77
3.13.19	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ106 bis SZ108	78
3.13.20	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ109, SZ111 und SZ113	78
3.13.21	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ110 und SZ112	78
3.13.22	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ114	78
3.13.23	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ115	78
3.13.24	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> SZ116	79
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Das <i>ylaA</i>-Operon aus <i>B. subtilis</i></b>	<b>80</b>
4.1.1	Aufbau des für den ECF- $\sigma$ -Faktor YlaC kodierenden <i>ylaA</i> -Operons	80
4.1.2	$\sigma^{\text{YlaC}}$ liegt in einem tetracistronischen, autoregulierten Operon	80
4.1.3	Kartierung des Transkriptions-Startpunkts des <i>ylaA</i> -Operons	82
4.1.4	YlaD wirkt als Anti-Sigmafaktor von $\sigma^{\text{YlaC}}$	84
<b>4.2</b>	<b>Induktion des <i>ylaA</i>-Operons durch Stressfaktoren</b>	<b>87</b>
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung von YlaC-regulierten Genen mittels DNA- Makroarray Analysen</b>	<b>89</b>
4.3.1	Identifizierung von YlaC-regulierten Genen im Northern-Blot	94
<b>4.4</b>	<b>Das YlaD-Protein aus <i>B. subtilis</i></b>	<b>94</b>
4.4.1	Eigenschaften des YlaD-Proteins	94
4.4.2	Die YluC-Protease aus <i>B. subtilis</i>	96
4.4.3	Untersuchungen zum Abbau von YlaD durch YluC	98
4.4.4	YluC beeinflusst auch die Stabilität der Anti-Sigmafaktoren RsiX und YhdL	101
4.4.5	Nachweis der Bindung von Zink an YlaD	104

4.4.5.1	Nachweis von Zinkionen mittels Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS)	104
4.4.5.2	Colorimetrischer Zinknachweis	106
<b>4.5</b>	<b>Nachweis einer direkten Interaktion zwischen YlaC und YlaD</b>	<b>108</b>
<b>4.6</b>	<b>Einfluss von YlaA und YlaB auf die Aktivität von YlaC bzw. YlaD</b>	<b>110</b>
4.6.1	Stabilisierung von YlaD durch Coexpression von <i>ylaABC</i>	111
4.6.2	Konstruktion einer <i>ylaA</i> -Knockout-Mutante	112
4.6.3	Konstruktion von Reporterstämmen, um den Einfluss von YlaA und YlaB auf die Aktivität von $\sigma^{YlaC}$ /YlaD zu messen	113
<b>4.7</b>	<b>Einfluss von YlaB auf die Stabilität von YlaD</b>	<b>117</b>
4.7.1	Wechselwirkung zwischen YlaB und YlaD	119
<b>4.8</b>	<b>Einfluss von YlaB auf die <math>\sigma^{YlaC}</math>-Aktivität</b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>124</b>
<b>5.1</b>	<b>Transkriptionelle Untersuchung des <i>ylaA</i>-Operons</b>	<b>125</b>
5.1.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des <i>ylaA</i> -Operons und Sequenzierung des <i>ylaA</i> -Promotors	126
<b>5.2</b>	<b>Untersuchung der Anti-Sigmafaktor-Aktivität von YlaD</b>	<b>128</b>
<b>5.3</b>	<b>Induktion von <math>\sigma^{YlaC}</math> durch Stressfaktoren</b>	<b>129</b>
<b>5.4</b>	<b>Identifizierung von <math>\sigma^{YlaC}</math>-regulierten Genen</b>	<b>130</b>
<b>5.5</b>	<b>Untersuchung der Aktivierung von <math>\sigma^{YlaC}</math> durch Proteolyse von YlaD</b>	<b>133</b>
5.5.1	Untersuchung der proteolytischen Aktivität von YluC am Modell von $\sigma^W$ /RsiW	133
5.5.2	Untersuchung der Proteolyse von YlaD durch YluC	134
5.5.3	Untersuchung der Proteolyse weiterer Anti-Sigmafaktoren aus <i>B. subtilis</i> durch YluC	136
<b>5.6</b>	<b>Analyse der Bindung von Zink an die cytoplasmatische Domäne von YlaD</b>	<b>138</b>
<b>5.7</b>	<b>Analyse einer direkten Interaktion zwischen YlaC und der cytoplasmatischen Domäne von YlaD</b>	<b>140</b>
<b>5.8</b>	<b>Untersuchung der Funktionen von YlaA und YlaB</b>	<b>142</b>
5.8.1	Nachweis einer direkten Interaktion zwischen YlaD und YlaB	143
<b>5.9</b>	<b>YlaB wirkt nicht als negativer Regulator von <math>\sigma^{YlaC}</math></b>	<b>145</b>

5.10	Ausblick	147
6	Abkürzungsverzeichnis und Glossar	149
7	Literaturverzeichnis	152

# 1 Zusammenfassung

Alternative Sigmafaktoren mit extracytoplasmatischer Funktion (ECF-Sigmafaktoren) repräsentieren eine sich kontinuierlich vergrößernde Gruppe an Regulatorproteinen, die an der differentiellen Genexpression in Bakterien beteiligt sind. Obwohl Gene, welche durch diese Regulatorproteine kontrolliert werden, ebenso wie die Regulationsmechanismen noch weitgehend unaufgeklärt sind, scheinen ECF-Sigmafaktoren in Bakterien eine Schlüsselrolle im Bereich der Stressantwort, der Differenzierung und der Pathogenese zu spielen.

In dem Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* konnten bislang sieben Gene mit Ähnlichkeiten zu ECF-Sigmafaktoren identifiziert werden (*sigX*, *sigW*, *sigM*, *sigY*, *sigV*, *sigZ* und *ylaC*), wobei hauptsächlich *sigX*, *sigW* und *sigM* im Zentrum durchgeführter Untersuchungen standen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der potentielle ECF-Sigmafaktor YlaC hinsichtlich seiner Funktion und Regulation untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass *ylaC* Teil eines tetracistronischen Operons ist und mit dem Gen seines möglichen Anti-Sigmafaktors kotranskribiert wird. Zusätzlich kodiert das Operon für zwei weitere Membranproteine mit bislang unbekannter Funktion.

Obgleich kein spezifischer Stressfaktor identifiziert werden konnte, wurde die positive Regulation des *ylaA*-Operons durch YlaC eindeutig gezeigt. Die Ergebnisse einer globalen Transkriptionsanalyse deuten darauf hin, dass YlaC ausschließlich sein eigenes Operon reguliert.

Durch Primer-Extension konnte der Transkriptionsstartpunkt des *ylaA*-Operons bestimmt werden. Die ermittelte Promotorsequenz ähnelt bereits identifizierten Promotorsequenzen von ECF-Sigmafaktoren aus *B. subtilis*. Die für den *ylaA*-Promotor ermittelte Sequenz konnte vor keinem anderen Ges des *B. subtilis*-Genoms gefunden werden.

Durch Northern-Blots und  $\beta$ -Galaktosidase-Tests mit einem  $\Delta ylaD$ -Stamm wurde gezeigt, dass YlaD als Anti-Sigmafaktor von YlaC wirkt. Gereinigtes YlaD bindet Zink in äquimolaren Mengen und wird deshalb einer neu-definierten Familie von Zink-bindenden Anti-Sigmafaktoren zugeordnet. YlaD ist ein Membranprotein, dessen C-terminus in der Cytoplasmamembran verankert ist.

Nach Überexpression konnte YlaD in Western-Blots nur dann nachgewiesen werden, wenn das *yluC*-Gen, welches für eine intramembrane Protease kodiert, deletiert war. Eine YluC-Variante mit einer Mutation im aktiven Zentrum war nicht mehr in der Lage, das  $\sigma^W$ -Regulon aus *B. subtilis* zu aktivieren. In einer  $\Delta yluC$ -Mutante reicherten sich auch verkürzte Formen

der SigX und SigM Anti-Sigmafaktoren an, was auf eine generelle Rolle von YluC bzw. von intramembraner Proteolyse bei der Regulation von ECF-Sigmafaktoren in *B. subtilis* hindeutet.

Eine mögliche Funktion der bislang uncharakterisierten Membranproteine YlaA und YlaB bei der Regulation der YlaC-Aktivität wurde durch die Konstruktion von Reporterstämmen, welche verschiedene Kombinationen aller vier Gene des *ylaA*-Operons enthielten, analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von YlaB einen Einfluss auf die Anti-Sigmafaktor-Aktivität von YlaD hat. Durch Western-Blots war ein stabilisierender Einfluss von YlaB auf YlaD nachweisbar. Eine direkte Interaktion zwischen YlaB und YlaD konnte durch *in vitro*-Experimente gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass YlaD, zusammen mit YlaB und eventuell auch mit YlaA, Teil eines membrangebundenen Proteinkomplexes ist, der YlaD vor dem Abbau durch YluC schützt.

# 1 Summary

Alternative sigma factors of the extracytoplasmic function (ECF) subfamily represent an increasing group of regulatory proteins involved in differential gene expression of bacteria. Although, genes controlled by these regulators and mechanisms of regulation are largely unknown, ECF sigma factors are reported to play key roles in stress responses, differentiation and pathogenesis of bacteria.

Seven genes with similarities to ECF sigma factors were identified in the Gram-positive model bacterium *B. subtilis* (*sigX*, *sigW*, *sigM*, *sigY*, *sigV*, *sigZ* and *ylaC*), and most studies concentrated on *sigX*, *sigW*, and *sigM*.

In the present study, the putative ECF sigma factor YlaC was analysed in detail with respect to its function and regulation.

It was shown that *ylaC* is part of a tetracistronic operon, cotranscribed with the gene of a proposed anti sigma factor (*ylaD*) and two genes encoding transmembrane proteins of unknown function (*ylaA* and *ylaB*).

Even though no specific stressor could be identified, positive regulation of the *ylaABCD* operon through YlaC was clearly demonstrated. Results of global transcriptional analyses using DNA-microarrays indicated that YlaC regulates exclusively its own operon.

The transcriptional start site of the *ylaABCD* operon was mapped by primer extension analysis. The promoter sequence displayed strong similarities to other ECF sigma factor promoter sites of *B. subtilis*. The exact sequence could not be found in a reasonable distance to any other gene of *B. subtilis*.

A reporter construct and Northern blot experiments performed with a knockout strain of *ylaD* revealed anti-sigma factor activity of YlaD. Purified YlaD contains zinc in equimolar amounts and, therefore, belongs to a new family of zinc-binding anti sigma factors. YlaD was proven to be anchored to the cytoplasmic membrane by a transmembrane domain at the direct C-terminal end.

When overexpressed in *B. subtilis*, YlaD could be detected in Western blots only when the *yluC* gene, encoding a putative intramembrane protease, was knocked out. An active site mutant of YluC was unable to induce the *B. subtilis* SigW regulon. In a *yluC*-knockout strain truncated forms of the SigX and SigM anti sigma factors were stabilized in the membrane as well, suggesting a general role for YluC and intramembrane proteolysis in the regulation of ECF sigma factor activity in *B. subtilis*.

To analyse a possible function of the so far uncharacterized proteins YlaA and YlaB in regulating YlaC activity, reporter strains with different combinations of the four genes in the *ylaABCD* operon were constructed. It was shown that mainly the presence of YlaB is of crucial importance for anti sigma factor activity of YlaD. An influence of YlaB on the stability of YlaD was seen in Western blots, and a direct interaction of YlaB and YlaD could be detected in *in vitro* experiments. These results point to YlaD being part of a membrane-embedded protein complex together with YlaB and possibly YlaA, where YlaD is protected against degradation by the YluC protease.

## 2 Einleitung

### 2.1 Bakterien als Modellorganismen

Bakterien sind bekannt für ihre Anpassungsfähigkeit und ihr nahezu ubiquitäres Vorkommen. Ihre leichte Verfügbarkeit, die auf breiter Basis etablierten Methoden zur Analyse von genetischen und biochemischen Fragestellungen und die stetig steigende Anzahl sequenzierter Genome machen Bakterien zu idealen Modellorganismen, um grundlegende Sachverhalte der Genregulation zu untersuchen, welche nicht zuletzt dann auch auf weitaus komplexere Organismen übertragen werden können.

Das erstmals 1835 von Christian Gottfried Ehrenberg als *Vibrio subtilis* erwähnte Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis* gehört, abgesehen von *Escherichia coli*, zu den am besten untersuchten Bakterienspezies und ist seit über vier Jahrzehnten ein nicht wegzudenkender Bestandteil bakterieller Grundlagenforschung. Die phylogenetische Nähe zu Pathogenen wie Staphylokokken, Listerien, Mykobakterien und Mykoplasmen macht *B. subtilis* besonders interessant für die molekularbiologische und medizinische Forschung. Das Ergebnis der Sequenzierung des gesamten *B. subtilis* Genoms wurde 1997 veröffentlicht und lieferte eine Anzahl von ca. 4100 offenen Leserahmen, darunter 18 Sigmafaktoren (Kunst *et al.*, 1997). Von industrieller Bedeutung ist *B. subtilis* als Produzent von Proteasen und Amylasen für die Waschmittel- und Brauindustrie und von Vitamin B2 (Riboflavin). Des weiteren wird *B. subtilis* zur industriellen Produktion von Enzymen wie  $\beta$ -Glucanase, Glutaminase und von Metalloproteasen verwandt (Priest, 1989). Die hitzeresistenten, stoffwechsellinaktiven *B. subtilis* Endosporen dienen unter anderem in der Medizin und Lebensmittelindustrie als Indikator für Sterilisationsprozesse. In der Landwirtschaft nutzt man das Bakterium als biologisches Fungizid für Samen von Baumwolle, Gemüse, Erdnüssen und Sojabohnen.

### 2.2 Bakterielle Genregulation

Von entscheidender Bedeutung für jede bekannte Lebensform ist die Anpassung an diejenigen Bedingungen, welche sie in ihrem aktuellen Lebensumfeld vorfindet. Diese Anpassung erfolgt vorwiegend durch kontrollierte Expression der genetischen Information (differentielle Genexpression) des jeweiligen Organismus. Dadurch kann auf Änderungen der physikalischen Umweltbedingungen, des Nahrungsangebots, aber auch auf ständig

wechselnde Anforderung im Organismus selbst, bedingt durch Zelldifferenzierungsprozesse, schnell und effektiv reagiert werden. Als Reaktion auf o.e. Einflüsse werden häufig viele Gene gleichzeitig angeschaltet. Derartige, funktionell zusammengehörende Gene können zum Teil weit verstreut auf dem Bakteriengenom liegen, obschon sie einer gemeinsamen Regulation unterworfen sind. Solche Gengruppen werden, falls ihre Expression durch einen gemeinsamen Regulator kontrolliert wird, als Regulon bezeichnet. Bakterielle Genregulation findet überwiegend auf der Ebene der Transkription, genauer gesagt, bei der Initiation der Transkription statt.

### 2.2.1 DNA-abhängige RNA-Polymerasen

Prinzipiell alle RNA-Formen der Zelle werden durch einen als Transkription bezeichneten Mechanismus, also durch Abschreiben der als Erbinformation gespeicherten Nukleotidfolge der DNA gebildet. Die dafür notwendige DNA-abhängige RNA-Polymerase kann in zwei unterschiedlichen Formen, nämlich als „Core“- oder „Holo“-Enzym, in der Zelle vorliegen. Sowohl das „Core-Enzym“ (Minimal-Enzym) als auch das „Holo-Enzym“ sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. Das Core-Enzym besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten,  $\alpha_2\beta\beta'\omega$  und bewerkstelligt effektive Transkriptions-Elongation und Transkriptions-Termination. Die dimeren  $\alpha$ -Untereinheiten sind hauptsächlich für die strukturelle Stabilität des Enzymkomplexes verantwortlich. Die  $\beta$ - und die  $\beta'$ -Untereinheiten bilden den eigentlichen katalytischen Kern des Enzyms, was auch durch die Tatsache deutlich wird, dass diese Untereinheiten das Ziel zweier Antibiotika, Rifampicin und Streptolydigin, sind. Die Aufgabe der  $\omega$ -Untereinheit besteht in der Katalyse des Zusammenbaus der verschiedenen Untereinheiten zu einem funktionsfähigen Enzym. Das Holo-Enzym enthält zusätzlich die  $\sigma$ -Untereinheit ( $\sigma$ -Faktor), welche für die Promotorspezifität der RNA-Polymerase und für die Ausbildung des geschlossenen Promotorkomplexes, gefolgt vom Aufschmelzen der DNA-Stränge, und der Ausbildung des offenen Promotorkomplexes, verantwortlich ist. (Fredrick and Helmann, 1997; Camacho and Salas, 1999). Somit kann das RNA-Holo-Enzym spezifisch bestimmte Erkennungs- und Bindestellen vor einem Gen-Anfang (Promotorsequenzen) erkennen, während das RNA-Core-Enzym eher unspezifisch an die DNA bindet (Dombroski *et al.* 1996). Bakterienzellen benutzen einen primären Sigmafaktor (housekeeping Sigmafaktor) für die Transkription aller notwendigen Gene während der exponentiellen Wachstumsphase. Zusätzlich enthalten alle Bakterienzellen weitere sekundäre bzw. alternative Sigmafaktoren zur Transkription diverser Regulons als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren oder Umwelteinflüsse.

## 2.3 Bakterielle Sigmafaktoren

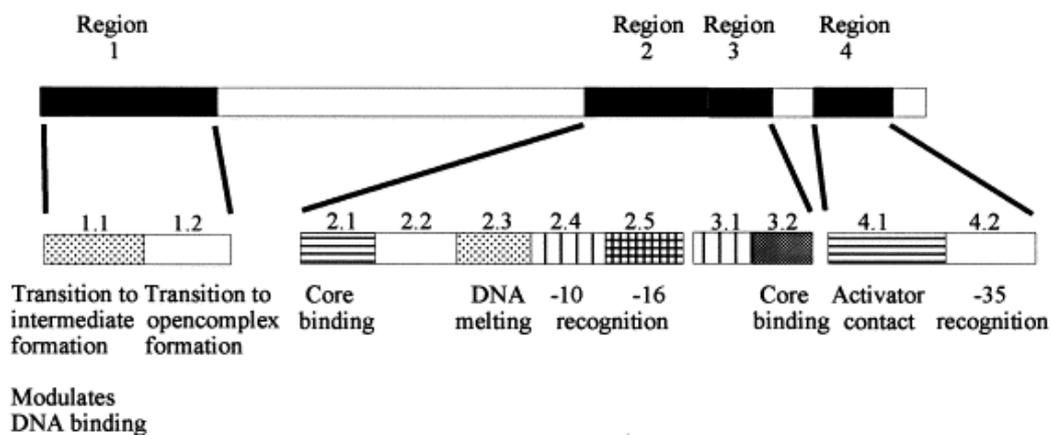
Das Vorhandensein einer Vielzahl verschiedener Sigmafaktoren in bakteriellen Zellen garantiert größtmögliche Variabilität der Genexpression, da jeder Sigmafaktor spezifisch bestimmte Promotoren erkennt. Als Vermittler der Promotorspezifität fungieren zwei, upstream vom Transkriptionsstartpunkt gelegene hexamere Nukleotidsequenzen, z. B. die -35 (TTGACA) und die -10 (TATAAT) Regionen im Falle von primären Sigmafaktoren. In seltenen Fällen ist eine erweiterte -10 Region („extended“ -10), welche aus dem -10 Hexamer und einem 5'-TG-3' Dinukleotid an Position -14/-15 (relativ zum Transkriptionsstart) besteht, als Promotor (TGnTATAAT) ausreichend (Mitchell *et al.*, 2003; Camacho and Salas, 1999; Wösten, 1998).

### 2.3.1 Primäre und alternative Sigmafaktoren

Jede Zelle enthält einen primären „housekeeping“ Sigmafaktor ( $\sigma^A$  bei *B. subtilis*), der für die Transkription essentieller Gene während der exponentiellen Wachstumsphase verantwortlich ist, und verschiedene alternative Sigmafaktoren, um auf sich ständig ändernde Umweltbedingungen flexibel reagieren zu können. Eine Vielzahl primärer und alternativer bakterieller Sigmafaktoren werden aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenz dem 70 kDa großen, primären Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  aus *E. coli* zugeordnet (Dombroski *et al.*, 1996). Ausgenommen hiervon sind Mitglieder der sogenannten  $\sigma^{54}$  Familie, die oft in die Regulation des Stickstoffmetabolismus involviert sind und, wenn auch funktionell ähnlich zur  $\sigma^{70}$  Familie, strukturelle Unterschiede aufweisen (Helmann, 1999; Paget and Helmann, 2003). Der erste alternative Sigmafaktor wurde in *B. subtilis* entdeckt und vermittelt die allgemeine Stressantwort (Haldenwang and Losick, 1980). Seit damals wurden eine Vielzahl alternativer Sigmafaktoren in fast allen Bakterienspezies beschrieben, wobei das Genom von *Streptomyces coelicolor* alleine für 63 verschiedene alternative Sigmafaktoren aus der  $\sigma^{70}$  Familie codiert (Bentley *et al.*, 2002). Auch in höheren Pflanzen wurden bereits  $\sigma^{70}$ -verwandte Sigmafaktoren gefunden, die dort mit einer RNA-Polymerase, ähnlich der in Bakterien, die Transkription im Plastid regulieren (Isono *et al.*, 1997). Basierend auf Struktur und Funktion der jeweiligen Gene lassen sich  $\sigma^{70}$ -verwandte Sigmafaktoren grob in fünf phylogenetische Gruppen einteilen. Die erste Gruppe beinhaltet essentielle, primäre Sigmafaktoren mit enger Verwandtschaft zu  $\sigma^{70}$  aus *E. coli* und man findet nur in dieser Gruppe die Region 1.1 (Abbildung 1). Primäre Sigmafaktoren sind für die Aufrechterhaltung essentieller biosynthetischer Stoffwechselwege in der Zelle verantwortlich. Dies beinhaltet unter anderem die Biosynthese von Aminosäuren, Nukleotiden, Cofaktoren, Komponenten

der Zellwand sowie Zellmembran und Gene für die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen, durch Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Zitronensäurezyklus (Gross *et al.*, 1992; Helmann and Chamberlin, 1988; Hughes and Mathee, 1998). Mitglieder der zweiten Gruppe unterscheiden sich von denen aus Gruppe eins nur dadurch, dass sie für das bakterielle Wachstum nicht notwendig sind. Sigmafaktoren aus der dritten Gruppe weisen nur noch eine geringe Verwandtschaft zu denen aus Gruppe eins und zwei auf und aktivieren gewöhnlich Regulons als Antwort auf spezifische Signale, z. B. nach einem Hitzeschock. Gruppe vier beinhaltet die am wenigsten einheitliche Unterfamilie, die Sigmafaktoren mit extracytoplasmatischen Funktionen (ECF-Sigmafaktoren). Soweit bisher untersucht, reagieren die meisten Mitglieder aus dieser Unterfamilie auf Signale, welche von außerhalb des Cytoplasmas kommen. Eine weitere Gruppe alternativer Sigmafaktoren (TcdR-Unterfamilie) wurde von Helmann (2002) postuliert. TcdR reguliert die Toxin-Gen-Expression in *Clostridium difficile* (Mani and Dupuy, 2001) und zeigt nur geringe Ähnlichkeiten zu bisher beschriebenen  $\sigma$ -Faktoren der  $\sigma^{70}$ -Familie. Weitere Aktivatoren der Toxin- bzw. Bacteriocinproduktion, wie beispielsweise TetR aus *Clostridium tetanii*, BotR aus *Clostridium botulinum* und UviA aus *Clostridium perfringens*, zeigen wiederum Ähnlichkeiten zu TcdR (Moncrief *et al.*, 1997; Marvaud *et al.*, 1998; Dineen *et al.*, 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TetR und BotR als Sigmafaktoren fungieren und für die Transkription der Neurotoxin-Gene in *C. tetanii* bzw. *C. botulinum* benötigt werden (Raffestin *et al.*, 2004). Die Funktion der Sigmafaktoren aus den Gruppen zwei bis vier kann in drei äußerst weit gefasste Kategorien unterteilt werden: Stressantwort, Entwicklung, Stoffwechsel. Die große Bandbreite verschiedener Stressantworten umfasst die generelle Stressantwort (*B. subtilis*  $\sigma^B$ ), die Stressantwort während der stationären Phase, Stressantwort bei intra- und extrazellulär falsch-gefalteten bzw. partiell entfalteten Proteinen (*E. coli*  $\sigma^E$  und  $\sigma^{32}$ ), Antwort bei osmotischem Stress (*B. subtilis*  $\sigma^M$ ), oxidativem Stress (*S. coelicolor*  $\sigma^R$ ) oder Zellwand-Stress (*S. coelicolor*  $\sigma^E$ , *B. subtilis*  $\sigma^W$ ). Ebenso werden zahlreiche Entwicklungsprogramme von alternativen Sigmafaktoren gesteuert. Dazu gehören die Flagellen-Biosynthese bei *B. subtilis* ( $\sigma^D$ ) und *Salmonella typhimurium* ( $\sigma^F$ ), die Ausbildung von Endosporen bei *B. subtilis* ( $\sigma^E$ ,  $\sigma^K$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ) und die Ausbildung von Exosporen bei *S. coelicolor* ( $\sigma^{\text{Whig}}$ ). Als Beispiele für eine Beteiligung alternativer Sigmafaktoren an Stoffwechselwegen sei hier die Aufnahme von Eisen in *E. coli* ( $\sigma^{\text{FecI}}$ ) und in Pseudomonaden ( $\sigma^{\text{PvdS}}$ ) genannt. Abbildung 1 zeigt vier konservierte Bereiche der  $\sigma^{70}$ -verwandten Sigmafaktoren, welche aufgrund von Sequenzvergleichen ermittelt werden konnten. Besonders die Regionen 2 und 4 sind am höchsten konserviert und beinhalten Bereiche, die

für die Bindung des RNA-Polymerase-Core-Enzyms (2.1), für das Aufschmelzen der DNA (2.3) sowie für die Erkennung der  $-10$  und  $-35$  Promotorregionen verantwortlich sind (2.5 und 4.2). Während ein Großteil von Region 1 nur unter den Sigmafaktoren der Gruppe eins und zwei konserviert ist, fehlt Region 3 bei den ECF-Sigmafaktoren (Wösten, 1998; Paget and Helmann, 2003). Eine detaillierte, funktionelle Zuordnung der verschiedenen Unterregionen, die aufgrund von Mutationsanalysen und Strukturaufklärungen ermittelt werden konnten, sind ebenfalls Abbildung 1 zu entnehmen (Helmann and Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992).



**Abb. 1:** Funktionelle Zuordnung verschiedener Bereiche aus den vier stark konservierten Aminosäure-Regionen bakterieller,  $\sigma^{70}$ -ähnlicher Sigmafaktoren (aus Wösten, 1998).

### 2.3.2 Sigmafaktoren mit extracytoplasmatischer Funktion (ECF-Sigmafaktoren)

Die nicht sehr homogene Familie der ECF-Sigmafaktoren wurde erstmals vor über zehn Jahren bei der Untersuchung von  $\sigma^E$  aus *S. coelicolor* beschrieben. Die Namensgebung für diese uneinheitliche Gruppe von Regulatorproteinen rührte von der einzig erkennbaren Gemeinsamkeit her, nämlich dass hauptsächlich physiologische Prozesse, wie Transport, Sekretion und extracytoplasmatische Stressantwort, durch diese Proteine reguliert werden (Lonetto *et al.*, 1994). Durch Sequenzvergleiche konnten neben *S. coelicolor*  $\sigma^E$  insgesamt acht Sigmafaktoren dieser neuen Unterfamilie zugeordnet werden. Dazu zählen FecI aus *E. coli* (Eisentransport), SigE aus *E. coli* (periplasmatische Stressantwort), AlgU aus *Pseudomonas aeruginosa* (Sekretion von Alginat), HrpL aus *Pseudomonas syringae* (Sekretion eines Virulenzfaktors), CnrH aus *Alcaligenes eutrophus* (Efflux von Metallionen), CarQ aus *Myxococcus xanthus* (Synthese membrangebundener Karotinoide) und SigX aus *B. subtilis* (Modifikation der Zellhülle). Betrachtet man die konservierten Aminosäurebereiche der  $\sigma^{70}$ -Sigmafaktor-Familie, so unterscheidet sich die ECF-Unterfamilie davon am

deutlichsten in den Bereichen 2.4 und 3 (Abbildung 1). Die Region 2.4 enthält eine amphipatische  $\alpha$ -Helix, von der man annimmt, dass sie die Erkennungsdeterminanten für das  $-10$  Hexamer des Promotorbereichs enthält. Ein derartiger Satz hydrophober Aminosäurereste im richtigen Abstand voneinander konnte in der ECF-Unterfamilie nicht gefunden werden. Auffällig ist des Weiteren, dass ECF-Sigmafaktoren, bezogen auf ihre Aminosäuresequenz, kürzer sind als alle anderen Sigmafaktoren. Dies liegt daran, dass ihnen ein großer Teil des konservierten Bereiches 3 fehlt, dessen Funktion bei der Promotorerkennung möglicherweise, kompensiert durch eine geänderte Struktur in Region 2, durch die Regionen 2 und 4 bewerkstelligt wird. Die größten Ähnlichkeiten zwischen ECF-Sigmafaktoren und anderen Mitgliedern der  $\sigma^{70}$  Familie zeigten sich in Region 4 inklusive der amphipatischen Helix im Bereich 4.1 und des Helix-Turn-Helix DNA-Bindemotivs im Bereich 4.2 (Lonetto *et al.*, 1994). Innerhalb der Gruppe der von ECF-Sigmafaktoren erkannten Promotoren findet sich sehr oft ein charakteristisches, stark konserviertes Motiv, nämlich die Nukleotidfolge „AAC“ innerhalb der  $-35$  Region, wieder. Dieses stark konservierte Trinukleotid-Motiv schränkt verständlicherweise die Promotorspezifität innerhalb der Familie der ECF-Sigmafaktoren ein, wodurch der  $-10$  Region eine größere Rolle bei der Vermittlung der Promotorspezifität zukommt (Qiu and Helmann, 2001). Eine weitere Gemeinsamkeit der ECF-Sigmafaktoren besteht darin, dass sie in vielen Fällen mit dem Gen eines membrangebundenen Anti- $\sigma$  Faktors, der häufig aus einer extracytoplasmatischen Sensordomäne und einer intrazellulären inhibitorischen Domäne besteht, kotranskribiert werden. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass ein als ECF  $\sigma$ -Faktor beschriebenes Regulatorprotein,  $\sigma^R$  aus *S. coelicolor* eine cytoplasmatische Stressantwort reguliert (Paget *et al.*, 2001). Seit kurzem rückt auch die mögliche Beteiligung von ECF-Sigmafaktoren bei der bakteriellen Pathogenese in den Fokus aktueller Untersuchungen. Eine Beteiligung von ECF-Sigmafaktoren wurde unter anderem bereits an der Alginat-Biosynthese in *P. aeruginosa* und an der Fähigkeit von *S. typhimurium*, sich in Makrophagen und Epithelzellen zu vermehren, beschrieben (Bashyam and Hasnain, 2004).

## 2.4 Anti-Sigmafaktoren

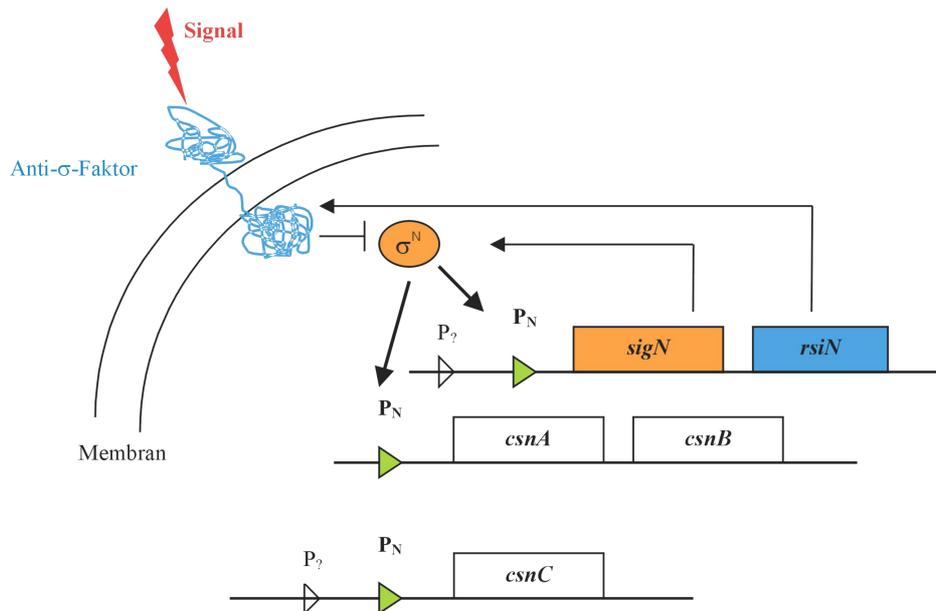
Ein möglicher Mechanismus, um die Genexpression auf Transkriptionsebene zu regulieren, ist die Verwendung eines Antagonisten der  $\sigma$ -Untereinheit der RNA-Polymerase. Derartige Gegenspieler der  $\sigma$ -Untereinheit werden als Anti-Sigmafaktor bezeichnet. Die Gruppe der cytoplasmatischen Anti-Sigmafaktoren ist gut untersucht und beinhaltet unter anderem das AsiA-Protein des Bacteriophagen T4 und das FlagM-Protein, welches sowohl in Gram-

positiven als auch in Gram-negativen Bakterienspezies verbreitet ist. In *B. subtilis* sind die Anti-Sigmafaktoren SpoIIAB und RsbW bereits gut charakterisiert. Das AsiA-Protein bindet und inhibiert  $\sigma^{70}$  aus *E. coli* und sorgt somit dafür, dass die Gene des Bakteriophagen T4 während der Infektion von *E. coli* entsprechend ihres Bedarfs in der frühen, mittleren und späten Infektiosphase exprimiert werden (Hinton *et al.*, 1996). FlgM bindet an  $\sigma^{28}$  in *S. typhimurium* und inhibiert somit die Expression von Genen, die in der letzten Phase der Flagellen-Biosynthese für den Zusammenbau der Flagellen notwendig sind. Durch Quervernetzungs-Experimente konnte *in vitro* eine direkte Bindung von FlgM an  $\sigma^{28}$  nachgewiesen werden, wobei die Interaktion von FlgM mit  $\sigma^{28}$  im Bereich der Region 4 stattfindet (siehe Abbildung 1) (Kutsukake and Iino, 1994). FlgM-ähnliche Anti-Sigmafaktoren spielen auch eine Rolle im Sporulationsprozess von Streptomycceten (Hughes and Mathee, 1998). In *B. subtilis* wird während der Sporulation die Aktivität der beiden Sigmafaktoren  $\sigma^F$  und  $\sigma^G$  durch SpoIIAB mittels direkter Wechselwirkungen inhibiert (Duncan and Losick, 1996; Kellner *et al.*, 1996). Die Aktivität dieser beiden Sigmafaktoren wird nur in der Vorspore benötigt, was bedingt, dass sie in der Mutterzelle durch SpoIIAB inhibiert wird. SpoIIAB selbst wird durch einen Anti-Anti-Sigmafaktor, dem SpoIIAA reguliert. SpoIIAA bindet an die SpoIIAB- $\sigma^F$ - bzw. SpoIIAB- $\sigma^G$ -Komplexe, um die entsprechenden Sigmafaktoren  $\sigma^F$  und  $\sigma^G$  in der Vorspore freizusetzen (Stragier and Losick, 1996). Die generelle Stress-Antwort in *B. subtilis* wird durch den Sigmafaktor  $\sigma^B$  gesteuert, dessen Aktivität wiederum durch den Anti-Sigmafaktor RsbW bzw. den Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV reguliert wird (Kang *et al.*, 1996). Aufgrund der Ähnlichkeiten sowohl zwischen  $\sigma^F$  und  $\sigma^B$  als auch zwischen SpoIIAB und RsbW sind auch die Regulationsmechanismen ähnlich. Genauer gesagt, wird die Aktivität von  $\sigma^B$  durch zwei „partner switching modules“ reguliert. Das erste Modul, bestehend aus RsbU (Phosphatase)-RsbV (Anti-Anti-Sigmafaktor)-RsbW (Anti-Sigmafaktor; Kinase), reagiert auf sich ändernde ATP-Konzentrationen, während das zweite Modul, bestehend aus RsbX (Phosphatase)-RsbS (Anti-Anti-Sigmafaktor)-RsbT, auf umweltbedingten Stress reagiert (Yang *et al.*, 1996). Zusätzlich zu der bereits gut charakterisierten Klasse cytoplasmatischer Anti-Sigmafaktoren wurde in den letzten Jahren eine neue Klasse, in der inneren Membran verankerter, Anti-Sigmafaktoren entdeckt. Diese neue Klasse von Anti-Sigmafaktoren reguliert die Aktivität von ECF-Sigmafaktoren (Hughes and Mathee, 1998).

## 2.5 Regulation von ECF-Sigmafaktoren

Die Aktivität sekundärer Sigmafaktoren kann auf vielerlei Arten reguliert werden. Zum einen wird ihre Syntheserate kontrolliert, zum anderen werden sie bei Bedarf durch proteolytische Prozessierung aus inaktiven Vorläufern gebildet. Zusätzlich tragen der gezielte Abbau durch Proteolyse sowie reversible Interaktionen von Sigmafaktoren mit sogenannten Anti-Sigmafaktoren zur Modulation der Aktivität von  $\sigma$ -Faktoren bei (Haldenwang, 1995; Hughes und Mathee, 1998; Helmann, 1999; Kroos *et al.*, 1999).

In zahlreichen Fällen hat es sich als charakteristisches Regulationsschema erwiesen, dass ein typischer bakterieller ECF-Sigmafaktor mit einem stromabwärts-gelegenen regulatorischen Gen, welches für einen Anti-Sigmafaktor kodiert, kotranskribiert wird. In einigen Fällen sind beide Gene sogar translational gekoppelt. In den meisten Fällen wird das den Sigmafaktor und eventuell auch das den Anti-Sigmafaktor enthaltende Operon durch den Sigmafaktor selbst reguliert, unterliegt also einer Autoregulation (Hughes und Mathee, 1998; Ravio und Silhavy, 2001). Im einfachsten Fall, aus regulatorischer Sicht betrachtet, bildet der Anti-Sigmafaktor einen inaktiven Komplex mit seinem zugehörigen ECF-Sigmafaktor, wobei es sich bei dem Anti-Sigmafaktor in vielen Fällen um ein Membranprotein handelt. Die in der Regel in der Cytoplasmamembran lokalisierten Anti- $\sigma$ -Faktoren enthalten neben der bzw. den Transmembrandomänen eine extracytoplasmatische Sensordomäne und eine intrazelluläre Regulatoromäne (Lonetto *et al.*, 1994). Bei einem von der Sensordomäne des Anti-Sigmafaktors registrierten extracytoplasmatischen Signal wird der Sigmafaktor aus dem Komplex mit seinem Anti-Sigmafaktor entlassen und kann nun mit dem Core-Enzym der RNA-Polymerase wechselwirken und dadurch die Transkription derjenigen Gene aktivieren, welche für das Überleben in der momentanen Stresssituation notwendig sind (Lonetto *et al.*, 1994). Abbildung 2 zeigt schematisch dieses Regulationsschema von ECF-Sigmafaktoren.



**Abb. 2:** Regulation von ECF- $\sigma$ -Faktoren (nach Helmann, 2002). Der hier willkürlich mit  $\sigma^N$  bezeichnete  $\sigma$ -Faktor wird zusammen mit einem stromabwärts-gelegenen regulatorischen Gen *rsiN* (regulator of *sigN*) kotranskribiert, dessen Genprodukt in den meisten Fällen als membranlokalisierter Anti- $\sigma$ -Faktor vorliegt und  $\sigma^N$  durch Komplexbildung inaktiviert. Auf ein extracytoplasmatisches Signal hin wird  $\sigma^N$  freigesetzt, bindet an die Core-Form der RNA-Polymerase und leitet die Transkription seiner Zielgene ein. Das *sigN*-Operon ist im Allgemeinen autoreguliert; vom Promotor  $P_N$  aus initiiert  $\sigma^N$  seine eigene Transkription. Die weiteren Zielgene von  $\sigma^N$  (*csn*-Gene, controlled by *sigN*) sind auf dem gesamten Chromosom verteilt, ihre Promotorelemente ( $P_?$ ) werden unter Umständen von weiteren  $\sigma$ -Faktoren erkannt.  $\sigma^N$ -regulierte Gene können also Bestandteile weiterer Regulons sein.

Das mit Abbildung 2 bezeichnete Regulationsschema stellt den einfachsten Fall einer Regulation eines ECF-Sigmafaktors durch seinen membran-gebundenen Anti-Sigmafaktor dar. Dieser einfachste Fall konnte bisher für  $\sigma^{22}$ , dem Regulator der Alginsynthese in *P. aeruginosa*, für  $\sigma^E$  aus *E. coli* (Ades, 2004) und für  $\sigma^X$  (Helmann, 2002) und  $\sigma^W$  aus *B. subtilis* (Schöbel *et al.*, 2004) gezeigt werden. Für andere ECF-Sigmafaktoren zeichnete sich jedoch ein komplexeres Regulationsschema ab. Der ECF-Anti-Sigmafaktor RsrA in *S. coelicolor* ist beispielsweise ein cytosolisches Protein (Kang *et al.*, 1999). In die Regulation des ECF-Sigmafaktors CarQ in *M. xanthus* ist neben dem Anti-Sigmafaktor CarR ein weiteres Protein, CarF (Photorezeptor), involviert. Für die Regulation des ECF-Sigmafaktors  $\sigma^M$  aus *B. subtilis* sind zwei Membranproteine, die jeweils mehrere Transmembrandomänen enthalten, notwendig. Ebenfalls zwei Membranproteine regulieren die Aktivität von  $\sigma^Y$  in *B. subtilis*. Beide Membranproteine zeigen jedoch keinerlei Ähnlichkeiten zu bisher identifizierten ECF-Anti-Sigmafaktoren. An der Regulation des ECF-Sigmafaktors FecI (Eisentransport) aus *E. coli* ist neben dem Anti-Sigmafaktor FecR ein in der äußeren Membran lokalisierter Rezeptor (FecA) beteiligt, der das Signal über die äußere und die cytoplasmatische Membran ins

Cytoplasma weiterleitet (Braun *et al.*, 2003). Ein ähnliches System wurde auch für den Pseudobactin-Transport in *Pseudomonas putida* beschrieben (Hughes and Mathee, 1998).

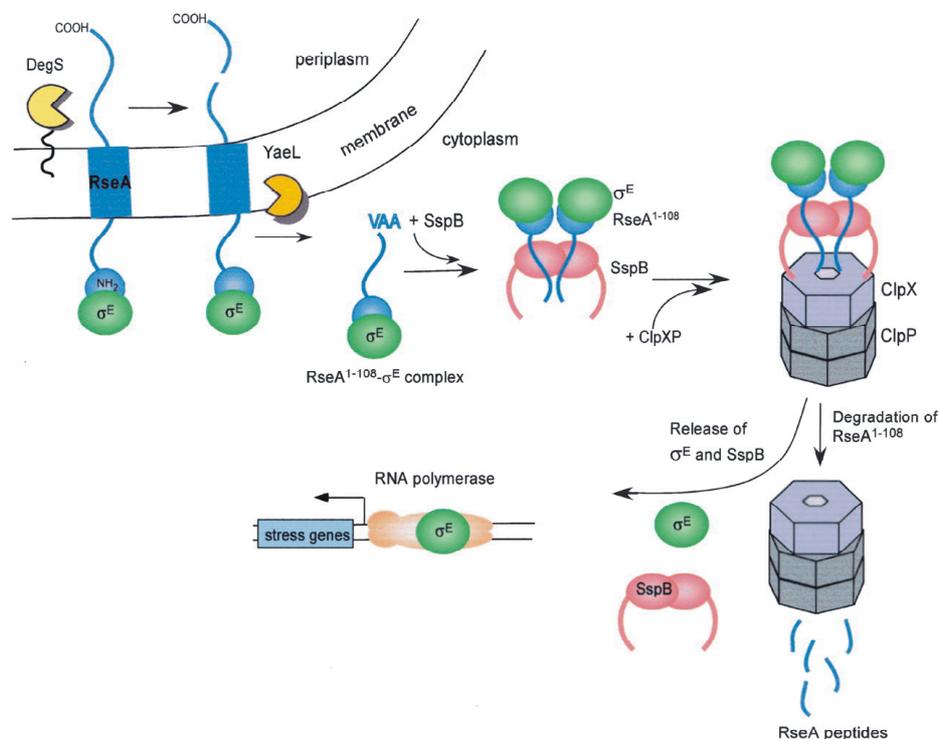
## 2.6 ECF-Sigmafaktoren aus *E. coli*

Durch die stetig steigende Anzahl sequenzierter bakterieller Genome konnte sowohl in Gram-negativen, wie auch in Gram-positiven Bakterienspezies eine hohe Anzahl von ECF-Sigmafaktoren identifiziert werden. Dabei reicht die Anzahl an ECF-Sigmafaktoren pro Genom von keinem (beispielsweise bei *Borrelia burgdorferi* B31) bis zu über 50 bei *S. coelicolor* A3. Für *E. coli* wurden zwei ECF-Sigmafaktoren identifiziert, wovon der erste ( $\sigma^{\text{FecI}}$ ) die Aufnahme von Eisencitrat aus dem Periplasma reguliert, während der zweite ( $\sigma^{\text{E}}$ ) für die Regulation der Stressantwort bei „periplasmatischem Stress“ zuständig ist. Bindet Eisencitrat an das in der äußeren Membran lokalisierte FecA-Protein (Mahren *et al.*, 2002), verursacht dies substantielle Strukturänderungen von FecA, durch die eine Signalkaskade eingeleitet wird. Dabei interagiert das N-terminale Ende von FecA mit dem C-terminalen Ende von FecR im Periplasma. FecR ist ein Anti-Sigmafaktor, der in der Cytoplasmamembran verankert ist. Durch FecR wird das Signal über die Cytoplasmamembran hinweg weiter ins Cytoplasma geleitet. Dort wird der ECF-Sigmafaktor FecI aktiviert, der daraufhin an das RNA-Polymerase-Core-Enzym bindet und die RNA-Polymerase zum Promotor des *fecABCDE*-Operons dirigiert. Dabei kodiert das *fecABCDE*-Operon für Transport-Proteine, die das benötigte Eisen in die Zelle transportieren (Braun *et al.*, 2003).

In *E. coli* kontrolliert  $\sigma^{\text{E}}$  Gene, die nahezu alle Aspekte im Bereich der Zellhülle beeinflussen und somit für das Überleben des Bakteriums essentiell sind. Nach der Aktivierung von  $\sigma^{\text{E}}$  werden Gene transkribiert, die unter anderem für Chaperone und Proteasen kodieren, welche an ihrem Wirkungsort, der Zellhülle, entfaltete Proteine rückfalten oder abbauen (Ades, 2004). Da es sich im Falle von  $\sigma^{\text{E}}$  um den am besten untersuchten Signaltransduktionsweg von der Zellhülle über eine Membran hinweg zu einem Protein im Cytoplasma handelt, möchte ich hier etwas näher darauf eingehen. Beteiligt an der Regulation von  $\sigma^{\text{E}}$  sind die Membran-gebundenen Proteasen DegS, RseP (regulator of sigmaE proteolysis), die cytoplasmatische Protease ClpXP, der Anti-Sigmafaktor RseA und das periplasmatische Protein RseB. Die DegS Protease gehört zur Familie der HtrA/DegP Proteasen und besitzt eine Protein-Interaktionsdomäne (PDZ), welche spezifisch konservierte Aminosäuresequenzen am C-Terminus von Porinen in der äußeren Membran erkennt. PDZ-Domänen sind an Protein-Protein-Interaktionen, wie beispielsweise an der Bindung von

Signalproteinen oder Multimerisation, beteiligt und bestehen aus konservierten Strukturelementen mit ca. 90 Aminosäuren (Ponting, 1997; Ponting *et al.*, 1997). Die Protease RseP enthält ebenfalls eine PDZ-Domäne und gehört zur Gruppe membrangebundener I-CLiPs (intramembrane-cleaving proteases). In „ungestressten“ Zellen bindet der in der Membran verankerte Anti-Sigmafaktor RseA an  $\sigma^E$ , wodurch die Transkription von  $\sigma^E$ -kontrollierten Genen blockiert ist. DegS ist durch Wechselwirkung mit der eigenen PDZ-Domäne inaktiv. Dabei wird die proteolytische Aktivität von DegS inaktiviert, indem die PDZ-Domäne vermutlich direkt das aktive Zentrum blockiert, wie es bereits für die Proteasen DegP und HtrA2 gezeigt werden konnte (Walsh *et al.*, 2003; Krojer *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Die Aktivität von RseP wird, ähnlich wie bereits für DegS beschrieben, durch die eigene PDZ-Domäne inhibiert. Diese Inhibition kann jedoch nicht auf eine direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der RseP-Protease zurückgeführt werden, da sich die PDZ-Domäne im Periplasma befindet, während das aktive Zentrum selbst auf der anderen Seite der Cytoplasmamembran liegt. Man nimmt deshalb an, dass die PDZ-Domäne von RseP mit der Glutamin-reichen, extracytoplasmatischen Domäne von RseA selbst interagiert. Dabei könnte diese Wechselwirkung direkt stattfinden oder über ein drittes Protein vermittelt werden. In beiden Fällen würde RseP dadurch in einer inaktiven Konformation gehalten werden (Kanehara *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003). Für das periplasmatische RseB-Protein wird eine stabilisierende Wirkung auf den RseA/ $\sigma^E$ -Komplex postuliert (Ades *et al.*, 1999; Collinet *et al.*, 2000). Tritt nun ein extracytoplasmatisches Stresssignal, beispielsweise in Form von nicht korrekt gefalteten Proteinen auf, erfolgt zuerst die Aktivierung der DegS-Protease. Die PDZ-Domäne von DegS erkennt spezifisch konservierte Aminosäuresequenzen am C-Terminus von Porinen in der äußeren Membran. Liegen die C-Termini dieser Porine nicht wie gewöhnlich im Inneren eines Porin-Trimers, sondern sind exponiert im Periplasma, so können sie an die PDZ-Domäne von DegS binden. Die Bindung dieser nicht korrekt gefalteten Proteine an die PDZ-Domäne von DegS verhindert, dass sie die proteolytische Aktivität von DegS inhibiert, und DegS schneidet den Anti-Sigmafaktor RseA in seinem extracytoplasmatischen Bereich (nach der Aminosäure 148). Zusätzlich wird RseB durch falsch gefaltete periplasmatische Proteine titriert, wodurch seine stabilisierende Wirkung auf den RseA/ $\sigma^E$ -Komplex entfällt (Ravio und Silhavy, 2001). Dadurch wird eine Glutamin-reiche Domäne von RseA, die durch Interaktion mit RseP die Proteaseaktivität inhibiert, abgetrennt, wodurch nun RseA zu einem guten Substrat für RseP wird. Nach der Prozessierung von RseA im Transmembranbereich durch RseP wird das RseA-Fragment ins Cytoplasma entlassen. Das cytoplasmatische Fragment von RseA ist dabei immer noch in der

Lage,  $\sigma^E$  zu binden und damit seine Interaktion mit der Core-RNA-Polymerase zu verhindern (Missiakas *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2003). Das ins Cytoplasma entlassene N-terminale Fragment von RseA weist ein nun nicht mehr in der Membran verborgenes Erkennungssignal für die cytoplasmatische Protease ClpXP auf. Dieses Erkennungssignal zeigt Ähnlichkeiten zu einem Signal, welches bereits als durch ClpXP erkannt, charakterisiert wurde. Es ähnelt dem SsrA-Tag, einem proteolytischen Signal, welches kotranslational an unvollständig synthetisierte Proteine angehängt wird, um deren raschen Abbau durch ClpXP zu gewährleisten (Keiler *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 2003). Mit Hilfe des Adapter-Proteins SspB wird das N-terminale Fragment von RseA<sup>108</sup> (108 Aminosäuren) in Kontakt mit der ClpXP Protease gebracht, welche dann selektiv den verbliebenen Rest von RseA abbaut, während der noch gebundene Sigmafaktor unberührt bleibt. Dabei bindet SspB spezifisch an den C-terminalen Bereich des freigesetzten Anti-Sigmafaktors RseA<sup>108</sup>. Erst nach diesem dritten proteolytischen Schritt wird  $\sigma^E$  freigesetzt und kann die Transkription der von ihm kontrollierten Gene aktivieren (Flynn *et al.*, 2004). Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf der proteolytischen Kaskade, die im Periplasma beginnt und letztendlich mit der Freisetzung eines aktiven Transkriptionsfaktors im Cytoplasma endet.



**Abb. 3:** Sequentieller Ablauf der proteolytischen Kaskade zur Aktivierung von  $\sigma^E$  in *E. coli* unter Beteiligung der Proteasen DegS, YaeL (RseP) und ClpXP (nach Flynn *et al.*, 2004).

Dieser Signaltransduktionsweg ähnelt einem durchaus weit verbreiteten und unter Eukaryonten konservierten Signalweg, der als „regulierte intramembrane Proteolyse“ (RIP) bezeichnet wird. Im Falle der Eukaryonten wird durch RIP häufig ein Membran-gebundener, inaktiver Transkriptionsfaktor nachfolgend von zwei membranständigen Proteasen prozessiert (Brown *et al.*, 2000), die allgemein als Site-1- und Site-2-Proteasen bezeichnet werden. Im Falle des *E. coli*  $\sigma^E$  sind das die Proteasen DegS und RseP. Diese Prozessierung setzt den verkürzten Transkriptionsfaktor von der Membran frei, sodass er nun in den Kern diffundieren und die Transkription spezifischer Gene induzieren kann (Lemberg und Martoglio, 2004). Als Beispiel für den Einfluss von RIP auf zelluläre Prozesse bei höheren Eukaryonten kann die Aktivierung von ATF6 als kontrollierte Reaktion auf entfaltete Proteine genannt werden. Im Falle unseres Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* wurde die Beteiligung von RIP während des komplizierten und auf präzise Regulation angewiesenen Vorgangs der Sporulation nachgewiesen (Wolfe and Kopan, 2004).

## 2.7 Der ECF-Sigmafaktor SigR aus *S. coelicolor*

Der ECF-Sigmafaktor SigR induziert das Thioredoxin-System in *S. coelicolor* als Reaktion auf oxidativen Stress. Reguliert wird SigR durch den redox-sensitiven Anti-Sigmafaktor RsrA. Dabei ist RsrA im Unterschied zu vielen bereits bekannten ECF-Anti-Sigmafaktoren ein lösliches, cytoplasmatisches Protein und kein Membranprotein. Unter reduzierenden Bedingungen bindet RsrA an  $\sigma^R$  und verhindert somit die Anschaltung  $\sigma^R$ -kontrollierter Gene. Oxidativer Stress, verursacht beispielsweise durch  $H_2O_2$  oder durch das Thiol-spezifische Oxidationsmittel Diamid, bewirkt die Dissoziation des RsrA- $\sigma^R$ -Komplexes und aktiviert somit die Transkription  $\sigma^R$ -kontrollierter Gene. RsrA ist ein Zink-bindendes Protein, in welchem das Zinkion über konservierte Cysteine gebunden wird. Eine Oxidation der Cysteine führt zu einer Freisetzung des gebundenen Zinkions und zur Inaktivierung von RsrA. Oxidiertes RsrA kann durch Thioredoxin wieder in seinen reduzierten und damit aktiven Zustand versetzt werden. Deshalb vermutet man, dass  $\sigma^R$ , RsrA und das Thioredoxin-System ein neuartiges „Homeostase-Feedback-System“ bilden, durch das auf Änderungen des intrazellulären Gleichgewichts zwischen Thiolen und Disulfidbrücken reagiert werden kann (Kang *et al.*, 1999; Paget *et al.*, 2001).

## 2.8 Der ECF-Sigmafaktor CarQ aus *M. xanthus*

In *M. xanthus* werden photoprotektive Karotinoide gebildet, wenn die Bakterien plötzlich mit

blauem Licht konfrontiert werden. Dabei steht der Licht-induzierbare Promotor  $P_{\text{carQRS}}$  im Mittelpunkt der Regulation der Karotenoid-Synthese. Das erste Gen dieses *carQRS*-Operons kodiert für einen ECF-Sigmafaktor, der die Transkription seines eigenen Operons aktiviert. Das zweite Gen dieses Operons kodiert für einen Membran-gebundenen Anti-Sigmafaktor (CarR), welcher im Dunkeln an seinen Sigmafaktor bindet und ihn dadurch inaktiviert. Werden die Zellen mit blauem Licht bestrahlt, so wird der Anti-Sigmafaktor CarR unter Beteiligung von CarF, einem konstitutiv exprimierten Photorezeptor, inaktiviert. Dadurch wird CarQ freigesetzt und aktiviert unter anderem die Transkription des *carQRS*-Operons. Das dadurch gebildete CarS reagiert mit dem Repressor CarA, wodurch die Synthese bestimmter Karotenoide dereprimiert wird (Browning *et al.*, 2003). In einer neueren Arbeit konnte, neben blauem Licht, auch Kupfer als *carQRS*-induzierender Stressfaktor identifiziert werden (Moraleta-Munoz *et al.*, 2005).

## 2.9 ECF-Sigmafaktoren aus *B. subtilis*

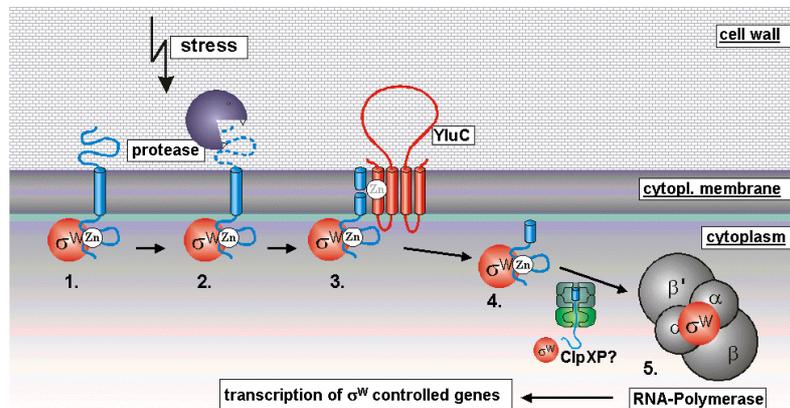
Sieben der siebzehn  $\sigma$ -Faktoren in *B. subtilis* wurden im Rahmen des internationalen Genomsequenzierungsprojekts als ECF- $\sigma$ -Faktoren identifiziert (Kunst *et al.*, 1997) und mit  $\sigma^{\text{M}}$ ,  $\sigma^{\text{V}}$ ,  $\sigma^{\text{W}}$ ,  $\sigma^{\text{X}}$ ,  $\sigma^{\text{Y}}$ ,  $\sigma^{\text{YlaC}}$  sowie  $\sigma^{\text{Z}}$  bezeichnet. Deletierte man die Gene dieser sieben ECF- $\sigma$ -Faktoren, so zeigte sich, dass keines dieser Gene essentiell war. Zudem konnte auch kein charakteristischer Phänotyp einer dieser ECF-Sigmafaktoren nachgewiesen werden, wodurch ein Rückschluss auf die eventuelle Funktion des jeweiligen Sigmafaktors unmöglich blieb. Jedoch konnte eine Beteiligung der ECF-Sigmafaktoren an mittlerweile sehr detailliert untersuchten Prozessen wie Sporenbildung, Hitzeschockantwort sowie der allgemeinen Stress-Antwort als eher unwahrscheinlich angesehen werden (Helmann, 2002). Bisherige Funktionsanalysen beschränkten sich vor allem auf die ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^{\text{M}}$ ,  $\sigma^{\text{W}}$ ,  $\sigma^{\text{X}}$  und  $\sigma^{\text{Y}}$ .

### 2.9.1 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^{\text{W}}$ aus *B. subtilis*

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist in *B. subtilis* der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^{\text{W}}$  am besten untersucht. Fasst man die bisherigen Arbeiten zusammen, so kennt man mittlerweile mehr als 60 Gene in 31 Transkriptionseinheiten, welche durch  $\sigma^{\text{W}}$  kontrolliert und unter dem Begriff eines sogenannten „Antibiosis-Regulons“ zusammengefasst werden. Als prominentes Beispiel hierfür ist unter anderem die Regulation von FosB, einem Fosfomycin-Resistenz-Protein, welches durch  $\sigma^{\text{W}}$  reguliert wird, zu nennen (Cao *et al.*, 2001). In unterschiedlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass  $\sigma^{\text{W}}$  durch unterschiedliche Stressoren aktiviert wird.

Zellwandspezifische Antibiotika wie Vancomycin und Cephalosporin (Cao *et al.*, 2002) induzieren  $\sigma^W$  genauso wie beispielsweise Salzschock (Petersohn *et al.*, 2001), Alkali-Stress und Phageninfektion mit dem *B. subtilis*-Phagen SPP1 (Wiegert *et al.*, 2001). In einer bisher unveröffentlichten Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass  $\sigma^W$  Resistenz gegenüber kationischen Peptiden vermittelt. Dies wurde für Sublancin und für SdpC\*, eine antimikrobiell aktive Substanz, die den Start der Sporulation verzögert, gezeigt (J. Helmann, persönliche Mitteilung). Für die kationischen, antimikrobiellen Peptide LL-37 und PG-1 konnte kürzlich eine schwache Induktion des  $\sigma^W$ -Regulons, für das synthetische poly-L-Lysin sogar eine starke Induktion des  $\sigma^W$ -Regulons gezeigt werden (Pietiainen *et al.*, 2005). Für die pH-abhängige Induktion von  $\sigma^W$  wurde eine mögliche Inhibition von an der Zellwandsynthese beteiligten Enzymen und damit Zellwandstress als Ursache vorgeschlagen, da bemerkenswerterweise *sigW*-Mutanten keine erhöhte Sensitivität gegenüber Alkali aufweisen und keines der bisher beschriebenen und durch  $\sigma^W$ -regulierten Gene für die Aufrechterhaltung der pH-Homöostase eine Rolle spielt (Wiegert *et al.*, 2001). Zu Beginn der stationären Phase beobachtet man eine verstärkte Expression  $\sigma^W$ -kontrollierter Gene. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Regulation von  $\sigma^W$  über den proteolytischen Abbau und damit über die Stabilität seines Anti-Sigmafaktors RsiW (regulator of *sigW*) erfolgt. Sowohl der Sigmafaktor als auch sein Anti-Sigmafaktor liegen in einem durch  $\sigma^W$ -kontrollierten Operon (autoreguliert) und werden kotranskribiert. Eine *rsiW*-Nullmutante zeigte eine erhöhte Expression  $\sigma^W$ -kontrollierter Gene, was die Funktionalität von RsiW als Anti-Sigmafaktor bestätigte. Des Weiteren konnten wir zudem eine direkte Interaktion zwischen  $\sigma^W$  und der cytoplasmatischen Domäne von RsiW unter Zuhilfenahme des Hefe-Two-Hybrid Systems nachweisen. Unsere Experimente zeigten, dass die Regulation Ähnlichkeiten zu der Regulation von  $\sigma^E$  aus *E. coli* aufweist (siehe 2.5). Im Falle des  $\sigma^W$  wird das als Anti-Sigmafaktor wirkende Membranprotein RsiW ebenfalls durch eine RIP-Protease im Bereich seiner Transmembrandomäne geschnitten. Dies bewerkstelligt in *B. subtilis* die YluC-Protease, welche Ähnlichkeiten zu der RseP-Protease aus *E. coli* aufweist. Nach einer Erhöhung des pH-Wertes im Medium wird RsiW im Bereich seiner extracytoplasmatischen Domäne von einer bislang noch nicht identifizierten Endo-Protease geschnitten (Site-1-Protease), wobei das Signal auf molekularer Ebene noch unbekannt ist. In einem zweiten Schritt wird der bereits verkürzte Anti-Sigmafaktor durch die YluC-Protease (Site-2-Protease) im Bereich seiner Transmembrandomäne ein weiteres Mal geschnitten und ins Cytoplasma entlassen (Schöbel *et al.*, 2004). Dort wird der verbliebene und noch immer an  $\sigma^W$  gebundene

cytoplasmatische Anteil von RsiW, vermutlich unter anderem durch die ClpXP Protease abgebaut, was letztendlich zu einer Transkription von  $\sigma^W$ -regulierten Genen führt, da der Sigmafaktor nun mit der RNA-Polymerase wechselwirken kann (Abbildung 4, unveröffentlichte Daten).



**Abb. 4:** Induktion des  $\sigma^W$ -Regulons aus *B. subtilis* durch stufenweisen, proteolytischen Abbau des Anti-Sigmafaktors RsiW.

Dabei werden durch  $\sigma^W$  die Promotoren erkannt, deren  $-35$ -Region die Basen TGAAAC und deren  $-10$ -Region die Basen CGTA enthalten. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein T-reiches Motiv im Bereich der  $-35$ -Region und ein upstream-Promotorelement die Spezifität der Erkennung durch  $\sigma^W$  positiv beeinflussen. Dennoch erkennt  $\sigma^W$  beispielsweise auch einige Promotoren, die eigentlich dem  $\sigma^X$ -Regulon zuzuordnen sind, wodurch sich beide Regulons in einigen Bereichen zu überlappen scheinen. Insbesondere die  $-10$ -Region spielt eine wichtige Rolle im Bezug auf die Promotorspezifität einzelner ECF-Sigmafaktoren (Huang *et al.*, 1999; Qiu and Helmann, 2001).

### 2.9.2 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^X$ aus *B. subtilis*

Ebenso wie  $\sigma^W$  wird auch  $\sigma^X$  durch ein unmittelbar downstream von seinem eigenen Gen gelegenen negativen Regulator (RsiX: regulator of *sigX*) reguliert. Eine Überproduktion von  $\sigma^X$  resultierte in einer verstärkten Expression seines eigenen Promotors, was eine Autoregulation nahelegt. Exprimiert man  $\sigma^X$  und RsiX gemeinsam, so war der Komplex aus  $\sigma^X$ /RsiX inaktiv. Trotz einer evolutionären Verwandtschaft von  $\sigma^X$  zu  $\sigma^{\text{FecI}}$  aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine nicht ortholog sind, da *B. subtilis* Eisencitrat nicht als Eisenquelle verwenden kann. Erstaunlicherweise konnte die Überexpression von SigX in *E. coli* eine *fecI*-Mutation teilweise komplementieren (Brutsche and Braun, 1997). Nach Identifikation des  $\sigma^X$ -Promotors wurden durch Promotor-Konsensus-Suchen mehr als ein Dutzend Kandidaten für eine mögliche Regulation durch  $\sigma^X$  gefunden. In dieser Gruppe

waren unter anderem mehrere Gene, welche die Zusammensetzung und den Stoffwechsel der Zellhülle beeinflussen. Besonders hervorzuheben ist dabei das *dlt*-Operon, welches die D-Alanylierung von Teichonsäuren steuert, und das *pssA*-Operon, welches die Synthese von Phosphatidyl-Ethanolaminen kontrolliert. Nicht nur aufgrund der Beteiligung dieser beiden Operons wurde für  $\sigma^X$  die Möglichkeit einer Regulation des Ladungszustandes der Zellwand und der Zellmembran propagiert (Helmann, 2002). Durch die Veresterung von Teichonsäuren mit D-Alanin werden freie Aminogruppen und damit positive Ladungen in die ansonsten vorwiegend negativ geladene Zellwand eingeführt (Perego *et al.*, 1995). Die Verringerung der negativen Gesamtladung der bakteriellen Zellwand durch das Einführen positiv-geladener Komponenten könnte die Durchdringbarkeit der Zellwand für kationische, antimikrobielle Peptide herabsetzen und der daraus resultierenden Permeabilisierung der Cytoplasmamembran entgegenwirken. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass das  $\sigma^X$ -Regulon durch Inhibitoren der Peptidoglykan-Synthese und durch das Zellwand-spezifische Antibiotikum Tunicamycin aktiviert wird (Helmann, 2002). In einer neueren Arbeit konnten vier weitere Mitglieder des  $\sigma^X$ -Regulons identifiziert werden, deren Funktionen vermutlich darin bestehen, die Eigenschaften der Zellhülle bzw. Zelloberfläche zu verändern, um die Zelle vor dem Eindringen antimikrobieller Peptide zu schützen (Cao and Helmann, 2004).

### 2.9.3 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^M$ aus *B. subtilis*

Der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^M$  wird während der frühen exponentiellen Wachstumsphase maximal exprimiert und zwar von zwei verschiedenen Promotoren aus. Davon wird ein Promotor durch den „housekeeping“-Sigmafaktor  $\sigma^A$  kontrolliert, während der zweite im Zuge einer Autoregulation unter der Kontrolle von  $\sigma^M$  steht. Nach Deletion von *sigM* kann man einen Defekt beim Auskeimen der *B. subtilis*-Endosporen feststellen. Das Fehlen von *sigM* wirkt sich auch negativ auf das Wachstum der Zellen in Medien mit hoher Salzkonzentration aus (Horsburgh and Moir, 1999). Wie für die vorangegangenen ECF-Sigmafaktoren bereits beschrieben, wird auch  $\sigma^M$  negativ durch downstream gelegene Gene reguliert. In diesem Fall sind zwei Gene an der Repression von SigM beteiligt, *yhdL* und *yhdK*. Beide Gene können nicht deletiert werden, was vermutlich darauf beruht, dass die daraus resultierende Überexpression von  $\sigma^M$  tödlich für die Zellen ist (Helmann, 2002). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass  $\sigma^M$  durch Ethanol, Hitze, Säure, Superoxid-Stress und durch Zellwand-Antibiotika aktiviert wird. Da das Expressionsniveau von  $\sigma^M$  als Reaktion auf die unterschiedlichen Stressoren stark schwankte und auch die Expression von

$\sigma^M$ -regulierten Genen nicht immer mit der Menge an vorhandenem  $\sigma^M$  korrelierte, wird vermutet, dass zumindest ein zusätzlicher Regulationsmechanismus in Kombination mit  $\sigma^M$  involviert ist. Unter den durch  $\sigma^M$  kontrollierten Genen befinden sich auch mehrere Vertreter, die bereits als durch  $\sigma^W$ - und  $\sigma^X$ -reguliert beschrieben wurden. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$  und  $\sigma^M$  zwar auf ein unterschiedliches, sich teilweise jedoch auch überlappendes Spektrum an Stressfaktoren reagieren, welche an unterschiedlichen Positionen der Zellhülle angreifen. Da die beschriebenen Sigmafaktoren alle in unterschiedlichen Wachstumsphasen aktiviert werden, gewährleistet die Überlappung der Induktionsfaktoren den Schutz der Zellen, egal in welcher Wachstumsphase sie sich gerade befinden (Thackray and Moir, 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *sigM*-Mutanten erhöhte Sensitivität gegenüber der Superoxid-bildenden Substanz Paraquat aufwiesen, jedoch nicht gegenüber Verbindungen, die Redox-Stress vermittelten. Erstaunlicherweise zeigten *sigM*-Mutanten diese erhöhte Sensitivität nur gegenüber Superoxid-bildenden Substanzen, welche in ihrer Struktur einen Dipyridyl-Ring aufwiesen. Durch Überexpression einer potentiellen Hydrolase (YgjL) konnte der *sigM*-Phänotyp bezüglich Paraquat komplementiert werden (Cao *et al.*, 2005).

#### 2.9.4 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^Y$ aus *B. subtilis*

Der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^Y$  ist das erste Gen in einem aus sechs Genen bestehenden Operon. Kürzlich konnte in zwei unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden, dass dieses Operon autoreguliert ist und aufgrund von Stickstoff-Mangel angeschaltet wird. Dabei wurden zwei Gene identifiziert, welche  $\sigma^Y$  negativ regulieren. Diese beiden Proteine zeigten keinerlei Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Anti-Sigmafaktoren, obwohl sie sich der Vorhersage gemäß, auch in der Membran befinden sollen, was die Vermutung nahe legt, dass sich der Signalübertragungsweg zur Aktivierung von  $\sigma^Y$  ebenfalls an der Membran abspielt. Der identifizierte  $\sigma^Y$ -Promotor zeigt im Bereich seiner  $-10$ -Region Ähnlichkeiten zu den  $-10$ -Regionen der ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$  und  $\sigma^M$ . Die  $-35$ -Region von  $\sigma^Y$  unterscheidet sich jedoch deutlich von denen, die für die Sigmafaktoren  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$  und  $\sigma^M$  beschrieben wurden (Abbildung 5). Eine Überexpression von  $\sigma^Y$  aktivierte jedoch keinen der anderen ECF-Sigmafaktoren. Durch Transkriptomanalysen konnte ein weiteres, durch  $\sigma^Y$  reguliertes Gen, *ybgB*, mit bislang noch nicht identifizierter Funktion entdeckt werden (Tojo *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2003).

	-35-Region	-10-Region
$P_w$	aaaat <b>TGA</b> AACcttttgaaa-cgaagct <b>CGT</b> Aacata	
$P_x$	tgtaa <b>TGT</b> AACttttcaagctattcata <b>CGAC</b> aaaaaa	
$P_M$	taatg <b>TGC</b> AACtttaaaccctttccttatg <b>CGT</b> Gtataac	
$P_y$	aaaaga <b>TGA</b> ACGcttttgaaatccgggtg <b>CGT</b> Ctcataa	

**Abb. 5:** Alignment der Promotoreregionen von  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$ ,  $\sigma^M$  und  $\sigma^Y$ .

### 2.9.5 Die ECF-Sigmafaktoren $\sigma^V$ und $\sigma^Z$

Die drei verbliebenen ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^V$ ,  $\sigma^Z$  und  $\sigma^{YlaC}$  wurden, berücksichtigt man die veröffentlichte Literatur, bis dato noch nicht genauer untersucht. Für alle drei konnte eine erhöhte Aktivität in der frühen Phase des Auskeimens der *B. subtilis*-Endospore detektiert werden (Horsburgh *et al.*, 2001). Dies trifft jedoch auch für die ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$ ,  $\sigma^M$  und  $\sigma^V$ , also für praktisch alle ECF-Sigmafaktoren zu. Aufgrund der Annahme von autoregulatorischen Promotorsequenzen vor den jeweiligen Sigmafaktoren wurden mögliche Promotor-Konsensus-Motive abgeleitet, die jedoch noch bestätigt werden müssen. Im Falle von  $\sigma^V$  konnten wir eine Autoregulation nachweisen und durch DNA-Makroarrays einige Gene identifizieren, die möglicherweise durch  $\sigma^V$ , aber auch durch andere ECF-Sigmafaktoren aus *B. subtilis* reguliert werden (Zellmeier *et al.*, 2005). Die  $\sigma$ -Faktoren  $\sigma^V$  und  $\sigma^Z$  weisen größere Homologien zu den  $\sigma$ -Faktoren  $\sigma^{CarQ}$  in *M. xanthus* bzw.  $\sigma^X$  in *B. subtilis* auf. Im Falle von  $\sigma^Z$  liegt zwischen dem Sigmafaktor selber und dem stromabwärts gelegenen Gen *yprE* ein Terminator. Daraus wurde abgeleitet, dass nicht das stromabwärts von  $\sigma^Z$  gelegene Gen, sondern das divergent kotranskribierte Gen *yprG* für den Anti-Sigmafaktor codiert und dass *sigZ* und *yprG* ein so genanntes Divergon bilden (Sorokin *et al.*, 1997).

### 2.9.6 Der ECF-Sigmafaktor $\sigma^{YlaC}$

$\sigma^{YlaC}$  wird vom dritten Gen eines tetracistronischen Operons kodiert. Der ECF-Sigmafaktor YlaC zeigt Sequenzähnlichkeiten zu der hochkonservierten Region 2 des Sigmafaktors  $\sigma^{70}$ . Diese Region enthält die -10-Promotor-Erkennungshelix und die Helix zur Bindung an die RNA-Polymerase. Diese „core-binding“-Helix interagiert mit der „Klammer“-Domäne der größten Untereinheit der RNA-Polymerase  $\beta'$ . Ebenso weist YlaC Homologien zur Region 4 von  $\sigma^{70}$  auf, einem Bereich der mittels eines Helix-Turn-Helix-Motivs an die -35-Region des erkannten Promotors bindet. Ein Alignment zwischen YlaC und diesen beiden für Sigmafaktoren charakteristischen Region ist in Abbildung 6 gezeigt.

YlaC	MKHRDSIEDYRQYQETLNLYLFRRTHHLETAKDLAQDTFVKAINGLASERG
$\sigma^{70}$ -r2	-----VERLPLVRSLLARRYLGDGADVEDLVQEGFLGLRAVEREDP
$\sigma^{70}$ -r4	-----
YlaC	--HSSIRFWLYTIAHHTFINWYRRDVKYQFTEISKNEGLTQTTYDQPEQYLS
$\sigma^{70}$ -r2	ERGVSEFSFWLYTIRNA-----
$\sigma^{70}$ -r4	-----
YlaC	RTVKSETLRQELTKKDKHQSVLILREFQELSYEETAEILGWLSKNTTLH
$\sigma^{70}$ -r2	-----
$\sigma^{70}$ -r4	-----DSPEREREVLVLRVYGGILTLEETAERLGIERRERQIEK
YlaC	RARLELKKNMTKSREEERI
$\sigma^{70}$ -r2	-----
$\sigma^{70}$ -r4	RALRKLRLK-----

**Abb. 6:** Alignment der Aminosäuresequenz des ECF-Sigmafaktors YlaC aus *B. subtilis* mit konservierten Bereichen der Region 2 ( $\sigma^{70}$ -r2) und Region 4 ( $\sigma^{70}$ -r4) des Sigmafaktors  $\sigma^{70}$ . Identische Aminosäuren sind rot unterlegt, ähnliche gelb.

Der postulierte  $\sigma^{YlaC}$ - Anti-Sigmafaktor, YlaD, wird vom vierten und letzten Gen des *ylaA*-Operons kodiert und weist Sequenzähnlichkeiten zur cytoplasmatischen Domäne von RsiW auf. Des Weiteren gibt es Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu dem Anti-Sigmafaktor RsrA aus *S. coelicolor*. Zusätzlich enthält YlaD ein Zink-Bindemotiv (HxxxCxxC) mit zwei konservierten Cysteinen, wodurch YlaD einer neu definierten Familie von Zink-bindenden Anti-Sigmafaktoren (ZAS) zugeordnet wird (Paget *et al.*, 2001). Abbildung 7 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz von YlaD mit Sequenzen einiger anderer Mitglieder der ZAS-Familie, die alle das charakteristische Hx<sub>3</sub>Cx<sub>2</sub>C-Motiv enthalten.

ScoRsrA	MSCGEPHETDC-SEILDHLYEFLDKEMPDSDCVKFEHHFECSPCLE	46
MtuRshA	MGC-AEVIAEVWTLLDGECTPETRERLRRHLEACPGLR	38
MxaOrfE	MNC-QDLERLLYPYLDGEFQPEERVDLETHLSGCADCR	38
BsuYlaD	MTC-FLVRDLLPLYLEGDCCKRETEHVIEEHLKMCSSCR	38
BsuYbbM	MSCPEQIVQLMHMHLGDGILPKDEHVLNEHLETCCKRK	40
ScoRstA	MTSSTTDMTGHPDVAEIAAD-LAEGLLPTRTTEVRQHLESCELCAD	45
MtuRslA	MTMPLRGLGPPDDTGVRVSTGDDHHYAMWDAAYVLGALSAADRREFAHLAGCPECRG	49
MtuRseA	MADPGSVGHVFRRAFSWLPFAQFASQSDAPVGAPRQRSTEHLSIEAIAAFVDGELRMNAHLRAHHLSLCAQCAA	75
	:.. : * : *	
ScoRsrA	KYGLEQAVKLVKRCGQDDVPGDLRAKVMGRDLIRSGQSVPEHDVAAAPSSAPQES	105/105
MtuRshA	HYGLEERIKALIGTKCRGDRAPEGLRERLRLEIRRTTIIRGGP	81/ 81
MxaOrfE	RAEEKQMQLARRAARHSVSGMRAPASLRAGIQVGLKQEQRRVQFGVWLRAGAMALVVVTVGGGWAAFH	96/302
BsuYlaD	MYDTMAEPFELESEQAVEEAYLPEEELRFKQRYGLLIMKAACWFGAAVAPVIAMMLIIKLLI	97/ 97
BsuYbbM	HFYEMEKSIALVRSVSHVEAPADFTANVMAKLPKEKKRASVKRFRTHAAAVFIILMGGGFFNSWHNDHN	108/208
ScoRstA	VYASLTEIQGLLGTLPAPAPMPDDVAARIDAALAAEPPGLIADGTRVSRSTPADRPAGHARPSSTGPG	109/289
MtuRslA	AVTELCGPALLSQLDRDEVAASESAPTVAASGLSPELLPSLLAAVHRRRRRRLITWVASSAAAAVLA	114/250
MtuRseA	EVDDQSRARAALRDSHPIRIPSTLLGLLSEIPRCPPPEGPSKSSGGSSQGGPPDGAAGFGDRFADGDGGN	146/154
	:..	

**Abb. 7:** Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Mitgliedern einer neu definierten Familie von Anti-Sigmafaktoren mit konserviertem Zink-Bindungsmotiv HxxxCxxC (ZAS). Sco, *Streptomyces coelicolor*; Mtu, *Mycobacterium tuberculosis*; Mxa, *Myxococcus xanthus*; Bacillus *subtilis* (nach Kang *et al.*, 1999).

Laut Computervorhersage enthält YlaD eine Transmembran-Domäne an seinem C-terminalen Ende. Dabei ragen höchstens ein bis drei Aminosäuren in den extracytoplasmatischen Bereich hinein. Dies unterscheidet YlaD von RsiW, zu dem es in den Bereichen der cytoplasmatischen Domäne große Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz aufweist (Abbildung 8).

```

B. subtilis_RsiW  MSCPEQIVQLMHMLDGDILPKDEHVLNEHLETCEKCRKHFYEMEKSIALVRSTSHVEAP 60
B. subtilis_YlaD  MTC-FLVRDLLPLYLEGDCRRETEHVIEEHLKMCSSCRDMYDTMAEPFELE---SEQAVE 56
      *:*.  :  *:  ::*:**  :  ***:***: *..**..  :  *  :.: *  :*: .

B. subtilis_RsiW  ADFTANVMAKLPKEKKRASVKR--WFRTHPVIAAAAVFIILMGGGFFN...106
B. subtilis_YlaD  EAYLPEEELRFKQRYYGLLIMKAACWFG--AAVAMMLIIKLLI----- 97
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```

**Abb. 8:** Sequenzvergleich der cytoplasmatischen und der Transmembran-Domänen von YlaD und RsiW.

Im Gegensatz zu RsiW enthält YlaD laut Vorhersage keine extracytoplasmatische Domäne, wodurch sich die Frage stellt, wie ein mögliches Stress-Signal aufgenommen und weitergeleitet werden kann. Über die Funktionen der von den beiden ersten Genen des *ylaA*-Operons kodierten Proteine YlaA und YlaB kann bestenfalls spekuliert werden, da durch Sequenzvergleiche bisher keine homologen Proteine mit bekannter Funktion gefunden werden konnten. Laut Vorhersage handelt es sich sowohl bei YlaA als auch bei YlaB um Membranproteine. Für das YlaA-Protein werden acht Transmembran-Segmente vorhergesagt, für YlaB eines, am C-terminalen Ende, ähnlich wie bei YlaD.

## 2.10 Problemstellung

Alternative Sigmafaktoren der ECF-Familie besitzen eine zentrale Rolle in der Regulation der extracytoplasmatischen Stressantwort bei Bakterien, mit Auswirkungen auf deren Pathogenität und Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen. Trotz dieser wichtigen Eigenschaften ist die genaue zelluläre Funktion und die Regulation der Aktivität einer Vielzahl von Sigmafaktoren dieser Gruppe unbekannt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der detaillierten Analyse des potentiellen ECF-Sigmafaktors YlaC aus *B. subtilis*. Das besondere Interesse an YlaC begründet sich in der Tatsache, dass dessen Funktion als ECF Sigmafaktor bislang nur aus der Aminosäuresequenz abgeleitet worden war. Da YlaD als putativer YlaC Antisigmafaktor Sequenzähnlichkeiten zum  $\sigma^W$  Antisigmafaktor RsiW aufweist, eine extracytoplasmatische Domäne aber fehlt, sollten zudem grundlegende Unterschiede im Mechanismus der Regulation der YlaC Aktivität vorliegen. Um Aussagen über die Funktion von YlaC zu erhalten, sollten YlaC kontrollierte Gene identifiziert werden. Dazu sollte zunächst eine

Induktion des *ylaA*-Operons durch verschiedenste Stressoren mittels einer LacZ-Reporterfusion und durch Northern-Blot-Analysen untersucht werden. Darauf folgend sollten DNA-Makroarray-Experimente durchgeführt werden. Im Rahmen der Untersuchung der Regulation von YlaC sollte mittels LacZ-Aktivitätstest mit geeigneten Reportersystemen ermittelt werden, ob YlaC autoreguliert ist, wie es bereits für eine Vielzahl von ECF-Sigmafaktoren beschrieben wurde. Ferner sollte die transkriptionelle Organisation durch Northern-Blots und der Transkriptionsstartpunkt durch Primer-Extension bestimmt werden. Eine direkte Interaktion zwischen YlaC und YlaD sollte untersucht werden. YlaD zeigt genau wie RsiW Ähnlichkeiten zu einer neu-definierten Familie von Zink-bindenden Anti-Sigmafaktoren. Deshalb sollte ermittelt werden, ob und wieviel Zink tatsächlich an YlaD bindet. Arbeiten zu *E. coli*  $\sigma^E$  und *B. subtilis*  $\sigma^W$  deuten auf einen generellen Regulationsmechanismus von ECF-Sigmafaktoren durch Proteolyse des Antisigmafaktors hin. Es sollte daher anhand von Western Blots und Pulse-Chase-Experimenten analysiert werden, ob die Aktivität von YlaC ebenfalls durch den regulierten Abbau von YlaD moduliert wird. Es sollte untersucht werden, ob YlaD und andere *B. subtilis* ECF-Antisigmafaktoren Substrate der RIP-Protease YluC darstellen. Im Unterschied zum *sigW*-Operon, welches nur aus *sigW* und *rsiW* besteht, liegt *ylaC* in einem postulierten tetracistronischen Operon, welches zusätzlich für die Membranproteine YlaA und YlaB kodiert. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass YlaA und YlaB an der Regulation von YlaC beteiligt sein könnten. Daher sollten Deletionsmutanten für *ylaA* und *ylaB* konstruiert und deren Phänotyp hinsichtlich der YlaC Aktivität analysiert werden.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper

##### 3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 1:** Zusammenfassung der verwendeten Bakterienstämme. Angegeben sind der Name, der Genotyp und die Referenz für jeden Stamm. Die mit (\*) gekennzeichneten Stämme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Bakterientyp/ Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz/ Literaturangabe
<i>E. coli</i> DH10B	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr</i> , <i>hsdRMS</i> , <i>mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>d</i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD</i> 139, $\Delta$ ( <i>ara</i> , <i>leu</i> ) 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Bethesda-Research Laboratories
<i>E. coli</i> JM 109	<i>recA1</i> , <i>supF</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR</i> , <i>relA</i> , <i>thi</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [ <i>F</i> <sup>'</sup> <i>traD36 proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> JM110	<i>rpsL</i> ( <i>Str</i> <sup>r</sup> ), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi-I</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> $\Delta$ <i>lac-proAB</i> ) [ <i>F</i> <sup>'</sup> <i>traD36 proAB lacI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-I hsdR17 sup44 relA1 lac</i> [ <i>F</i> <sup>'</sup> <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15Tn10( <i>Tet</i> <sup>r</sup> )]	Stratagene
<i>B. subtilis</i> 1012	<i>leuA8</i> , <i>metB5</i> , <i>trpC2</i> , <i>hsrM1</i>	Saito <i>et al.</i> , 1979
<i>B. subtilis amyE::cat</i>	<i>B. subtilis</i> 1012 mit <i>cat</i> -Insertion in <i>amyE</i> ; Cm <sup>r</sup>	Mogk <i>et al.</i> , 1996
<i>B. subtilis amyE::neo</i>	<i>B. subtilis</i> 1012 mit <i>neo</i> -Insertion in <i>amyE</i> ; Neo <sup>r</sup>	Wiegert, 2000
<i>B. subtilis lacA::spec</i>	<i>B. subtilis</i> 1012 mit <i>spec</i> -Insertion in <i>lacA</i> ; Spec <sup>r</sup>	Härtl <i>et al.</i> , 2001
<i>B. subtilis amyE::cat lacA::spec</i>	<i>B. subtilis</i> 1012 mit <i>cat</i> -Insertion in <i>amyE</i> und <i>spec</i> -Insertion in <i>lacA</i> ; Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup>	*

<b>Bakterientyp/ Stammbezeichnung</b>	<b>relevanter Genotyp</b>	<b>Referenz/ Literaturangabe</b>
<i>B. subtilis yluC::tet</i>	<i>B. subtilis</i> 1012 mit <i>tet</i> -Insertion in <i>yluC</i> ; Tet <sup>r</sup>	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis clpP::spec</i>	<i>B. subtilis</i> mit <i>spec</i> -Insertion in <i>clpP</i> ; Spec <sup>r</sup>	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> BFS233	pMutin-Stamm mit Transkriptionsfusion P <sub>yuaf</sub> - <i>lacZ</i>	Schumann <i>et al.</i> , 2001
<i>B. subtilis</i> BFS233 <i>rsiW::spec</i>	BFS233 mit Spectinomycin-Resistenzcassette im <i>rsiW</i> -Gen	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> BFS233 <i>sigW::spec</i>	BFS233 mit Spectinomycin-Resistenzcassette im <i>sigW</i> -Gen	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> BFS233 <i>yluC::tet</i>	BFS233 mit Tetracyclin-Resistenzcassette im <i>yluC</i> - Gen	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> BFS233 <i>yluC::tet</i> <i>amyE::pXyluC</i>	BFS233 mit Tetracyclin-Resistenzcassette im <i>yluC</i> - Gen und pXyluC im <i>amyE</i> -Lokus	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> BFS233 <i>yluC::tet</i> <i>amyE::pXyluCE21A</i>	BFS233 mit Tetracyclin-Resistenzcassette im <i>yluC</i> - Gen und pXyluCE21A im <i>amyE</i> -Lokus	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> SZ70	<i>B. subtilis</i> 1012 <i>amyE::ylaA-lacZ lacA::spec</i> ; Neo <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ71	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pA-spac- <i>ylaD</i> im <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ72	<i>B. subtilis</i> 1012 <i>amyE::ylaA-lacZ</i> ; Neo <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ73	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pX2 <i>ylaA</i> ; Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ74	<i>B. subtilis</i> 1012 mit pASpac- <i>ylaD</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ75	<i>B. subtilis</i> 1012 <i>ylaD::spec</i> ; Spec <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ76	<i>B. subtilis</i> SZ72 mit Insertion von pX2 <i>ylaA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ77	<i>B. subtilis</i> SZ76 mit Insertion von <i>ylaD::spec</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup>	*

<b>Bakterientyp/ Stammbezeichnung</b>	<b>relevanter Genotyp</b>	<b>Referenz/ Literaturangabe</b>
<i>B. subtilis</i> SZ78	<i>B. subtilis</i> SZ77 mit Insertion von pASpac- <i>ylaD</i> in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ78A	<i>B. subtilis</i> SZ77 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>ylaD</i> in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ79	<i>B. subtilis</i> SZ77 <i>yluC::tet</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ80	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>ylaD</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ81	<i>B. subtilis</i> SZ80 <i>yluC::tet</i> ; Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ82	<i>B. subtilis</i> SZ80 <i>clpP::spect</i> ; Em <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ83	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>rsiX</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ84	<i>B. subtilis</i> SZ83 <i>yluC::tet</i> ; Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ85	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>rsiX70</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ86	<i>B. subtilis</i> SZ85 <i>yluC::tet</i> ; Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ87	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>yrhM62</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ88	<i>B. subtilis</i> SZ87 <i>yluC::tet</i> ; Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ89	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>yhdL96</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ90	<i>B. subtilis</i> SZ89 <i>yluC::tet</i> ; Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ91	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>secE</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ92	<i>B. subtilis</i> SZ91 <i>yluC::tet</i> ; Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ93	<i>B. subtilis</i> 1012 $\Delta$ <i>ylaA</i> ; Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ94	<i>B. subtilis</i> SZ72 $\Delta$ <i>ylaA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	*

<b>Bakterientyp/ Stammbezeichnung</b>	<b>relevanter Genotyp</b>	<b>Referenz/ Literaturangabe</b>
<i>B. subtilis</i> SZ94A	<i>B. subtilis</i> SZ94 <i>lacA::spec</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ95	<i>B. subtilis</i> SZ94 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aC in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ96	<i>B. subtilis</i> SZ94 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aCD in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ96A	<i>B. subtilis</i> SZ96 <i>yluC::tet</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ97	<i>B. subtilis</i> SZ94 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aBCD in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ98	<i>B. subtilis</i> SZ94 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aABCD in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ99	<i>B. subtilis</i> SZ94 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aBC in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ100	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aC in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ100A	<i>B. subtilis</i> SZ94 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aC in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ101	<i>B. subtilis</i> SZ70 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aCD in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ102	<i>B. subtilis</i> SZ70 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aBCD in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ103	<i>B. subtilis</i> SZ70 mit Insertion von pALy <sub>l</sub> aBC in <i>lacA</i> ; Neo <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ104	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> -y <sub>l</sub> aB in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ105	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pXGFP-y <sub>l</sub> aD in <i>amyE</i> ; Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ106	<i>B. subtilis</i> SZ105 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> -y <sub>l</sub> aB in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	*

<b>Bakterientyp/ Stammbezeichnung</b>	<b>relevanter Genotyp</b>	<b>Referenz/ Literaturangabe</b>
<i>B. subtilis</i> SZ107	<i>B. subtilis</i> SZ105 <i>yluC::tet</i> ; Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ108	<i>B. subtilis</i> SZ105 <i>clpP::spec</i> ; Cm <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ109	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pXcMyc- <i>ylaBC-F<sub>3</sub>ylaD</i> in <i>amyE</i> ; Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ110	<i>B. subtilis</i> SZ109 <i>yluC::tet</i> ; Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ111	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pXcMyc- <i>ylaBC</i> in <i>amyE</i> ; Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ112	<i>B. subtilis</i> SZ111 <i>yluC::tet</i> ; Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ113	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pX-cMyc- <i>ylaBC-GFPylaD</i> in <i>amyE</i> ; Cm <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ114	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>ylaC</i> in <i>lacA</i> ; Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ115	<i>B. subtilis</i> SZ111 mit Insertion von pALF <sub>3</sub> - <i>ylaC</i> in <i>lacA</i> ; Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	*
<i>B. subtilis</i> SZ116	<i>B. subtilis</i> SZ70 mit Insertion von pAL <sub>3</sub> - <i>ylaC</i> in <i>lacA</i> und pX <sub>3</sub> - <i>ylaB</i> in <i>amyE</i> ; Em <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	*

### 3.1.2 Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2:** Aufführung der verwendeten Hefestämme. Angegeben ist der Name, der Genotyp sowie die dem Stamm zugehörige Referenz. Die mit (\*) gekennzeichneten Stämme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Hefetyp/ Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz/ Literaturangabe
<i>S. cerevisiae</i> AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-</i> <i>HIS3</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-</i> <i>MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
<i>S. cerevisiae</i> SZ01	<i>S. cerevisiae</i> AH109 mit Plasmid pGBKT7-53 und pGADT7-T	*
<i>S. cerevisiae</i> SZ02	<i>S. cerevisiae</i> AH109 mit Plasmid pGBKT7spe- <i>ylaD'</i> und pGADT7- <i>ylaC</i>	*
<i>S. cerevisiae</i> SZ03	<i>S. cerevisiae</i> AH109 mit Plasmid pGBKT7spe- <i>ylaD'</i> und pGADT7	*
<i>S. cerevisiae</i> SZ04	<i>S. cerevisiae</i> AH109 mit Plasmid pGBKT7spe und pGADT7- <i>ylaC</i>	*
<i>S. cerevisiae</i> SZ05	<i>S. cerevisiae</i> AH109 mit Plasmid pGBKT7spe und pGADT7	*

### 3.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 3:** Zusammenstellung der verwendeten Plasmide. Angegeben sind der Name, die Größe, ausgewählte Eigenschaften sowie die dazugehörige Referenz für das jeweilige Plasmid. Die mit (\*) gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Plasmid	Größe (bp)	Bemerkung	Referenz
pLacZ	9936	Vektor für <i>B. subtilis</i> , der eine Transkriptions- fusion mit <i>lacZ</i> erlaubt; Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	T. Wiegert
pX	7510	Integrationsvektor für <i>B. subtilis amyE</i> Lokus mit Xylose-regulierbarem Promotor; Cm <sup>r</sup>	Kim <i>et al.</i> , 1996
pAX01	7781	Integrationsvektor für <i>B. subtilis lacA</i> Lokus mit Xylose-regulierbarem Promotor; Em <sup>r</sup>	Härtl <i>et al.</i> , 2001

Plasmid	Größe (bp)	Bemerkung	Referenz
pA-spac	8025	Integrationsvektor für <i>B. subtilis lacA</i> Lokus mit IPTG-regulierbarem Promotor; Em <sup>r</sup>	Härtl <i>et al.</i> , 2001
pBR322	4363	Standard-Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pQE30	3500	Überexpressionsvektor, codierend für Fusionsproteine mit 6 N-terminalen Histidinresten als Affinitätstag; Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	Firma <u>QIAGEN</u>
pAL01	8025	pA-spac mit geänderten cloning sites; Em <sup>r</sup>	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
pALF01	8097	pAL01 mit N-terminalem 3x FLAG; Em <sup>r</sup>	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
pGADT7	7988	Fusionsvektor, GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne verwendeter Vektor des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems, Ap <sup>r</sup> , <i>LEU2</i>	<u>Clontech</u>
pGBKT7spe	7304	Fusionsvektor; pGBKT7 mit eingebauter <i>SpeI</i> -Schnittstelle; GAL4-DNA-Bindungsdomäne, verwendeter Vektor des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems, Kan <sup>r</sup> , <i>TRP1</i>	S. Heidmann, unveröffentlicht
pGADT7-T	8696	Fusionsvektor, codiert eine Fusion zwischen der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne und SV40 T-Antigen; Ap <sup>r</sup> , <i>LEU2</i>	Li & Fields, 1993; Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993
pGBKT7-53	8835	Fusionsvektor, codiert eine Fusion zwischen der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und p53; Kan <sup>r</sup> , <i>TRP1</i> ; dient zusammen mit pGADT7-T als Positivkontrolle im Hefe Two-Hybrid-System	Li & Fields, 1993; Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993
pXyluC	8821	pX mit kloniertem <i>yluC</i> -Gen	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
pXyluC E21A	8821	pXyluC mit active-site Mutation in <i>yluC</i>	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
pDG-gfp	4777	Integrationsvektor mit eingebautem <i>gfp</i> -Gen	T. Wiegert
pGBKT7spe- <i>ylaD'</i>	7541	pGBKT7spe mit N-terminalem, cytoplasmatischem Anteil des <i>ylaD</i> -Genproduktes (75 AS) aus <i>B. subtilis</i> 1012	*

Plasmid	Größe (bp)	Bemerkung	Referenz
<b>pGADT7-<i>ylaC</i></b>	8383	pGADT7 mit <i>ylaC</i> -Gen aus <i>B. subtilis</i> 1012	*
<b>pPylaA</b>	10221	pLacZ mit Promotorregion und dem Anfang (100 Basen) des <i>ylaA</i> -Operons vor dem <i>lacZ</i> -Gen	*
<b>pX2<i>ylaA</i></b>	7306	pX2 mit den ersten 409 Basenpaaren des <i>ylaA</i> -Operons	*
<b>pBR<i>ylaDdel</i></b>	5044	pBR322 mit 504 bp upstream und 523 bp downstream des <i>ylaD</i> -Gens mit <i>EcoRV</i> – Schnittstelle zwischen den beiden Fragmenten	*
<b>pBR<i>ylaD::spec</i></b>	6183	pBR <i>ylaDdel</i> mit Spectinomycin-Resistenzkassette	*
<b>pA-spac-<i>ylaD</i></b>	8343	pA-spac mit <i>ylaD</i> -Gen inklusive Ribosomenbindestelle hinter dem P <sub>spac</sub> -Promotor	*
<b>pALF<sub>3</sub><i>ylaD</i></b>	8379	pALFLAG <sub>3</sub> mit <i>ylaD</i> -Gen aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pALF<sub>3</sub><i>rsiX</i></b>	9195	pALFLAG <sub>3</sub> mit <i>rsiX</i> -Gen aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pALF<sub>3</sub><i>rsiX70</i></b>	8301	pALFLAG <sub>3</sub> mit N-terminalem Bereich (70 AS) des <i>rsiX</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pALF<sub>3</sub><i>yrhM62</i></b>	8277	pALFLAG <sub>3</sub> mit N-terminalem Bereich (62 AS) des <i>yrhM</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pALF<sub>3</sub><i>yhdL96</i></b>	8379	pALFLAG <sub>3</sub> mit N-terminalem Bereich (96 AS) des <i>yhdL</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pQE<i>ylaDΔTM</i></b>	3668	pQE30 mit cytoplasmatischem Anteil des <i>ylaD</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pQE<i>ylaD-CAΔTM</i></b>	3668	pQE30 mit cytoplasmatischem Anteil des <i>ylaD</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i> (Cysteine 33 und 36 mutiert zu Alanin)	*
<b>pQE<i>ylaD-CSΔTM</i></b>	3668	pQE30 mit cytoplasmatischem Anteil des <i>ylaD</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i> (Cysteine 33 und 36 mutiert zu Serin)	*

Plasmid	Größe (bp)	Bemerkung	Referenz
<b>pOPER<sub>ylaA</sub></b>	5962	pBR322 mit <i>ylaA</i> -Operon aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pOPER<sub>ylaAdel</sub></b>	4372	pOPER <sub>ylaA</sub> mit Chloramphenicol-Resistenzkassette integriert im <i>ylaA</i> -Operon über <i>Pst</i> I, <i>Afl</i> III	*
<b>pAL<sub>ylaABCD1</sub></b>	9860	pAL01 mit N-terminalem Teil (1844 bp) des <i>ylaA</i> -Operons aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pAL<sub>ylaABCD</sub></b>	11024	pAL <sub>ylaABCD1</sub> mit vollständigem (3006 bp) <i>ylaA</i> -Operon aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pAL<sub>ylaBCD</sub></b>	9094	pAL01 mit <i>ylaBCD</i> -Genen aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pAL<sub>ylaBC</sub></b>	8804	pAL01 mit <i>ylaBC</i> -Genen aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pAL<sub>ylaCD</sub></b>	8825	pAL01 mit <i>ylaCD</i> -Genen aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pAL<sub>ylaC</sub></b>	8535	pAL01 mit <i>ylaC</i> -Gen aus <i>B. subtilis</i>	*
<b>pDG-gfp<sub>ylaD</sub></b>	5083	pDG-gfp mit inseriertem <i>ylaD</i>	*
<b>pXGFP<sub>ylaD</sub></b>	8542	pX mit GFP- <i>ylaD</i> unter Xylose-Kontrolle	*
<b>pX-cMyc-<i>ylaBC</i></b>	8349	pX mit N-terminalem cMyc-Affinitätstag an <i>ylaBC</i>	*
<b>pX-cMyc-<i>ylaBC</i>-F<sub>3</sub>-<i>ylaD</i></b>	8739	pX mit N-terminalem cMyc-Affinitätstag am <i>ylaBC</i> und FLAG <sub>3</sub> -Tag am <i>ylaD</i>	*
<b>pX-cMyc-<i>ylaBC</i>-GFP<sub>ylaD</sub></b>	9392	pX mit N-terminalem cMyc-Affinitätstag am <i>ylaBC</i> und GFP- <i>ylaD</i>	*
<b>pUC<sub>ylaABC</sub></b>	3538	pUC18 mit <i>ylaABC</i>	*
<b>pUC<sub>delylaB</sub></b>	4755	pUC <sub>ylaABC</sub> mit Tet-Kassette ohne Promotor und Terminator in <i>ylaB</i>	*
<b>pX<sub>ylaB</sub></b>	7792	pX mit <i>ylaB</i> unter Xylose-Kontrolle	*
<b>pBR<sub>ylaBdel</sub></b>	5818	pBR322 mit <i>delylaB</i> aus pUC <sub>delylaB</sub> einkloniert über <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	*

### 3.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Sie wurden von der Firmen MWG bzw. Metabion bezogen.

**Tab. 4: Zusammenstellung der verwendeten Desoxyribonukleotide.** Angegeben sind Name, Länge, Sequenz sowie Verwendungszweck des jeweiligen Oligonukleotids.

Nr.	Länge (b)	Bezeichnung	Anwendung	Sequenz in 5'→3'Richtung
1	24	amyEback3'_sz	PCR, Sequenzierung	TCCCTCAGGTCTGGAAAAGAAAAG
2	24	amyEfront5'_sz	PCR, Sequenzierung	TACAGCACCGTCGATCAAAAGCGG
3	36	cat-3'-EcoRI	PCR	GGCCATGAATTCCTTCAACTAACGGGGCAGGTTAG TG
4	33	cat5_speI	PCR	GGCCATACTAGTGGATTTTTTCGCTACGCTCAAA
5	36	cat-5'-ecori	PCR	GGCCATGAATTCGGATTTTTTCGCTACGCTCAAATC C
6	20	pAspac_seq	PCR, Sequenzierung	CAACCTCTGCTAAAATTCCT
7	46	paxylad3	PCR	GGCCATGGATCCGTCGACTTATTATATCAGCAGTT TGATGATCAGC
8	36	paxylad5	PCR	GGCCATGGATCCATGACCTGCTTTCTAGTAAGAG AC
9	27	px2ylaA_seq	PCR, Sequenzierung	TTTGAAGCTTGAATTAGATATTTAAAA
10	48	Sonde_ylaC3	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATATCCGCTCCT CCTCTCTACTTTT
11	24	Sonde_ylaC5	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	GGGATTCCATTGAGGACTTGTATC
12	33	pUCylaD_EcoRV3'	PCR	GGCCATGATATCTCATATCCGCTCCTCCTCTCT
13	33	pUCylaD_EcoRV5'	PCR	GGCCATGATATCAAAAAGCGCTTGCCGATTCC
14	33	pUCylaD_HindIII3'	PCR	GGCCATAAGCTTCAATACATTGATATATT
15	33	pUC_ylaD_korr .BamHI	PCR	GGCCATGGATCCAAGCATAGGGATTCCATTGAG
16	36	spec_EcoRV3'	PCR	GGCCATGATATCATCGATCAATAGTTACAAATTGT T
17	36	spec_EcoRV5'	PCR	GGCCATGATATCATCGATTTGACATTTTTCTGTG G
18	36	spec3'hind	PCR	GGCCATAAGCTTATCGATCAATAGTTACAAATTGT T
19	36	tet3_kpnI	PCR	GGCCATGGTACCTTAGAAATCCCTTTGAGAATGTT T

Nr.	Länge (b)	Bezeichnung	Anwendung	Sequenz in 5'→3'Richtung
20	37	tet5_speI	PCR	GGCCATA <u>CTAGT</u> TATTGTTGTATAAGTGATGAAAT AC
21	33	ylaA_placZ5'	PCR	GGCCAT <u>GGATCC</u> CAAATGATAGTATTGTCCT
22	42	ylaA_pX23'	PCR	GGCCAT <u>GGATCCCTGCAGG</u> CAAACGAC AAGGTCGA
23	39	ylaa_px25'	PCR	GGCCATGGATCCATGTTGTTTCGTGTTGGAGTTATT CAGT
24	36	ylaA-pLacZ3'	PCR	GGCCATGAATTCGAACAACAATTGACCATTGAAT CA
25	35	ylad_3'rbs	PCR	GGCCATGCATGCTTATATCAGCAGTTTGATGATCA
26	33	ylad_5'rbs	PCR	GGCCATGTCGACCATGACGAAAAGTAGAGAGGA
27	44	yluCE21A-3	PCR	GGCCAT <u>GCTAGCAATAAA</u> TGGCCCAGTGCATGGA AGAAAACGAG
28	42	yluCE21A-5	PCR	GGCCATA <u>CTAGTGAGCTCT</u> AAAAATCAAAGGGGG AAATGGGA
29	36	spec5'SpeI	PCR	GGCCATA <u>CTAGTATCGAT</u> TTGACATTTTTCTTGTG G
30	36	spec3'Hind	PCR	GGCCATA <u>AAGCTTATCGAT</u> CAATAGTTACAAATTGT T
31	36	ylaD300_5	PCR	GGCCAT <u>GTCGACAAGGG</u> ATGTCAAATACCAATTT AC
32	36	ylaD300_3	PCR	GGCCAT <u>TCTAGAACAGAAA</u> AGCAGTTGAACTTG GC
33	36	spec5'pstI	PCR	GGCCAT <u>CTGCAGATCGAT</u> TTGACATTTTTCTTGTG G
34	36	spec3'pstI	PCR	GGCCAT <u>CTGCAGATCGAT</u> CAATAGTTACAAATTG TT
35	33	ylaD_pQE30_5	PCR	GGCCATGGATCCACCTGCTTTCTAGTAAGAGAC
36	39	ylaD_pQE30_3	PCR	GGCCAT <u>GTCGACTTATT</u> ACAGTAATCCATAGTACC TCTG
37	48	mega3ALA	PCR- Mutagenese	CGTGTCATACATGTCTCTGGCGCTGCTGGCCATTT TTAAATGCTCTTC
38	48	mega3SER	PCR- Mutagenese	CGTGTCATACATGTCTCTGCTGCTGCTGCTCATT TTAAATGCTCTTC
39	48	RNA-Sonde ylaD	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGATATCAGCAGT</u> TTGATGATCAGCAT
40	23	seq_ylaD_fwd	PCR, Sequenzierung	GAAGAGCATTTAAAAATGTGCAG
41	20	seq_ylaD_rev	PCR, Sequenzierung	AACGACTGCCGCAATGACCT
42	41	yluCE21A-5'	PCR	GGCCATA <u>CTAGTGAGCTCT</u> AAAAATCAAAGGGGG AAATGGGA
43	44	yluCE21A-3'	PCR	GGCCAT <u>GCTAGCAATAAA</u> TGGCCCAGTGCATGGA AGAAAACGAG
44	27	pX2	Sequenzierung	TTTGAAGCTTGAATTAGATATTTAAAA

	Länge (b)	Bezeichnung	Anwendung	Sequenz in 5'→3'Richtung
45	35	rsiX5'FLAG	PCR	GGCCATGGATCCATGATGAAGTCAGAATGGAACG A
46	36	rsiX3'FLAG	PCR	GGCCATGCATGCTTAGTTTAAGGAAATCGGATTT GG
47	41	rsiX70_3	PCR	GGCCATGCATGCTTAATCAAAGAAATGAGGAGAA ATAATGA
48	38	yhdL96_5	PCR	GGCCATGGATCCATGATGAATGAAGAATTTAAAA AGCG
49	36	yhdL96_3	PCR	GGCCATGCATGCTTAATAGAGGTAGCTTCCCAGC GT
50	37	yrhM62_5	PCR	GGCCATGGATCCATGGATAAGAGATTACAGCAAT TAA
51	37	yrhM62_3	PCR	GGCCATGCATGCTTAGTCCGGGTTGATATTAACA AGC
52	34	Y2H_ylaD5	PCR	GGCCATACTAGTATGACCTGCTTCTAGTAAGAG
53	39	Y2H_ylaD3	PCR	GGCCATACTAGTGGATCCCAGTAATCCATAGTAC CTCTG
54	34	Y2H_ylaC5	PCR	GGCCATAGATCTTGAAGCATAGGGATTCCATTGA
55	33	Y2H_ylaC3	PCR	GGCCATCTCGAGTTATATCCGCTCCTCCTCTCT
56	36	ylaA_oper5	PCR	GGCCATAAGCTTCAAATGATAGTATTGTCCTGT G
57	33	ylaA_oper3	PCR	GGCCATGGATCCTGCCCTGTCACAAGAACAGCT
58	36	CAT5_BspTI	PCR	GGCCATCTTAAGGGATTTTCGCTACGCTCAAATC C
59	36	CAT3_PstI	PCR	GGCCATCTGCAGTTCAACTAACGGGGCAGGTTAG TG
60	35	pALylaCD5	PCR	GGCCATGGATCCATGAAGCATAGGGATTCCATTG A
61	35	pALylaCD3	PCR	GGCCATGCATGCACAGAAAAGCAGTTGAACTTG G
62	39	secE5	PCR	GGCCATGGATCCATGCGTATTATGAAATTCTTTAA AGAT
63	42	secE3	PCR	GGCCATGCATGCTTATTCAACTATTAAACGAATTA ATTGAGA
64	36	pALylaC3	PCR	GGCCATGCATGCTTATATCCGCTCCTCCTCTCTAC T
65	41	rsiX70_3	PCR	GGCCATGCATGCTTAATCAAAGAAATGAGGAGAA ATAATGA
66	38	yhdL96_5	PCR	GGCCATGGATCCATGATGAATGAAGAATTTAAAA AGCG
67	36	ylaABCD5	PCR	GGCCATGGATCCATGTTGTTTCGTGTTGGAGTTATT C
68	37	ylaBCD5	PCR	GGCCATGGATCCATGAATCATAAAGAAAAAGAGT CTG
69	36	F3ylaD75_3	PCR	GGCCATGCATGCTTACAGTAATCCATAGTACCTCT G
70	41	ABCD1_3	PCR	GGCCATGCATGCTATGCATAATGCCGTTTCATCCCC TCTTTG

Nr.	Länge (b)	Bezeichnung	Anwendung	Sequenz in 5'→3'Richtung
71	33	ABCD2_5	PCR	GGCCATATGCATGGCTGATCATTATTCAGCCGT
72	48	T7ylaA3	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGCATCAG CATATAGTGAAAAG
73	49	T7ylaB3	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAATAAAAC CACACCGTCATCCAA
74	39	F3ylaB3	PCR	GGCCATGCATGCTTAAAAATAAAACCACACCGTC ATCCA
75	21	yqiW5	PCR	GATATTGTCCGCCAAGCGAGA
76	47	yqiW3T7	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCAATTTCA TGACGCTCTACC
77	21	yybS5	PCR	ACTGCCGCTGCCAATGATCTT
78	47	yybS3T7	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATGCTTCGCTA CAGTTTCTACAAT
79	22	ywqE5	PCR	CCTCATCATAACAACGGTGTGT
80	44	ywqE3T7	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTGCGTTCA GGATGGGCGA
81	21	yoaH5	PCR	AGCCTTGACCGGGTTAATGAC
82	45	yoaH3T7	PCR, <i>in vitro</i> Transkription	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCTGTGACA ATGATAATGAGC
83	36	ylaABCD5	PCR	GGCCATGGATCCATGTTGTTCTGTTGGAGTTATT C
84	43	gfpylaD3	PCR	GGCCATAGATCTGATATCTTATATCAGCAGTTTGA TGATCAGC
85	42	gfpylaDTM3	PCR	GGCCATAGATCTGATATCTTACAGTAATCCATAGT ACCTCTG
86	23	PEXylaA	Primer Extension	AAATAACGTTTCGAAATGCAATAC
87	71	cMycylaBC5	PCR	GGCCATTGATCAATGGAACAAAACTTATTAGCG AAGAAGATCTTATGAATCATAAAGAAAAAGAGTC TGT
88	46	cMycylaBC3	PCR	GGCCATGGATCCCGGCCGGCTAGCTATCCGCTCCT CCTCTCTACTT
89	42	F3ylaDRBS5	PCR	GGCCATAGATCTGCTAGCTAACAATTAAGCTTAA GGAGGTGA
90	39	F3ylaDBgIII3	PCR	GGCCATAGATCTTTATATCAGCAGTTTGATGATCA GCAT
91	43	gfpylaD3	PCR	GGCCATAGATCTGATATCTTATATCAGCAGTTTGA TGATCAGC
92	50	RBS_GFPylaD5	PCR	GGCCATAGATCTTAAGGAGGTGAGGATCAATGAG CGCTAGCAAAGGAGAA
93	23	PEXylaA	Primer Extension	AAATAACGTTTCGAAATGCAATAC
94	33	del_ylaB5_Sal	PCR	GGCCATGTCGACAGCGATACACCTGATCAGTCA
95	33	del_ylaB5	PCR	GGCCATCTGCAGAGCGATACACCTGATCAGTCA
96	36	del_ylaB3	PCR	GGCCATGAATTCCTTAAAAATCAAACGGATTGA TG
97	36	tet_acc5	PCR	GGCCATGTAGACATGTGAATACATCCTATTCA AT

Nr.	Länge (b)	Bezeichnung	Anwendung	Sequenz in 5'→3'Richtung
98	36	tet_acc3	PCR	GGCCATGTATACTTAGAAATCCCTTTGAGAATGTT T
99	43	pX_ylaB3'	PCR	GGCCATGGATCCCTGCAGTTAAAAATAAAAC CACACCGTCATC

### 3.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabellen 5.1 und 5.2 aufgelistet.

**Tab. 5.1:** Verwendete primäre Antikörper. Angegeben sind Name, Verdünnung sowie Referenz.

Name	Verdünnung	Referenz
<i>B. subtilis</i> Anti-DnaK	1 : 10 000	Schulz <i>et al.</i> , 1995
<i>B. subtilis</i> Anti-HtpG	1 : 10 000	Zellmeier <i>et al.</i> , 2003
Anti-FLAG	1 : 10 000	Schöbel <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> Anti-FtsH	1 : 10 000	Zellmeier <i>et al.</i> , 2003
Anti-GFP	1 : 3 000	S. Heidmann, unveröffentlicht
Anti-cMyc	1 : 5 000	Kaltwasser <i>et al.</i> , 2001

**Tab. 5.2:** Verwendete sekundäre Antikörper. Angegeben sind Name, Verdünnung sowie Referenz.

Name	Verdünnung	Referenz
Anti-Dioxygenin-AP, F <sub>ab</sub> -Fragment	1 : 10 000	Schulz <i>et al.</i> , 1995
Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate	1 : 5 000	Amersham NA 934
Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase Conjugate	1 : 5 000	Amersham NA 931

## 3.2 Nährmedien und Antibiotika

Wachstumsmedien wurden bei 121 °C und 1,2 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlen der Medien auf ca. 45 °C in Form von Stammlösungen steril zugegeben (Tabelle 5). Glasgeräte wurden je nach Größe 30 min bis 3 h bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert.

### 3.2.1 Nährmedien

Nährmedien wurden, wie in Sambrook und Russel (2001) beschrieben, verwendet.

<b>LB-Medium:</b>	10,0 g Trypton (Caseinhydrolysat)
	5,0 g Hefeextrakt
	5,0 g NaCl
	ad 1 l H <sub>2</sub> O dest.
Zusatz für Festmedien:	15,0 g Agar/Liter
<b>HS-Medium:</b>	66,5 ml H <sub>2</sub> O bidest.
	10 ml 10x S-Base + Mg <sup>2+</sup>
	2,5 ml 20 % (w/v) Glucose
	5 ml 0,1 % (w/v) L-Tryptophan
	1 ml 2 % (w/v) Casein-Säurehydrolysat
	5 ml 10 % (w/v) Hefeextrakt (Difco)
	10 ml 8 % (w/v) Arginin, 0,4 % (w/v) Histidin
	alle Komponenten getrennt autoklavieren, Tryptophanlösung sterilfiltrieren
<b>LS-Medium:</b>	80 ml H <sub>2</sub> O bidest.
	10 ml 10x S-Base + Mg <sup>2+</sup>
	2,5 ml 20 % (w/v) Glucose
	0,5 ml 0,1 % (w/v) L-Tryptophan
	0,5 ml 2 % (w/v) Casein (Säurehydrolysat)
	5 ml 2 % (w/v) Hefeextrakt (Difco)
	0,25 ml 1 M MgCl <sub>2</sub>
	0,05 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>
<b>YPD-Medium:</b>	10,0 g Bacto Yeast Extract
	20,0 g Bacto Peptone
	20,0 g Glucose (Monohydrat)
	40 mg Adeninsulfat
	ad 1l Aqua demin.
Zusatz für Festmedien:	20,0 g Agar/Liter

<b>SD-Selektivmedium:</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 5,0 g Ammoniumsulfat 100 ml Aminosäuremix 10x (-Trp-Leu-His-Ade) ad 950 ml Aqua demin. ⇒ pH-Wert mit NaOH auf 5,9 einstellen
Zusatz für Festmedien:	20,0 g Agar/Liter Nach dem Autoklavieren auf 50 °C temperieren und 50 ml einer 40 %igen (w/v) sterilfiltrierten Glucose- lösung zugeben.
<b>SD-Leu-Trp-Medium:</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 5,0 g Ammoniumsulfat 100 ml Aminosäuremix 10x (-Trp-Leu-His-Ade) ad 950 ml Aqua demin. ⇒ pH-Wert mit NaOH auf 5,9 einstellen
Zusatz für Festmedien:	20,0 g Agar/Liter Nach dem Autoklavieren auf 50 °C temperieren und 50 ml einer 40%igen (w/v) sterilfiltrierten Glucose- lösung und 10 ml (His 100x) und 10 ml (Ade 100x) zugeben.
<b>SD-Leu-Trp-Ade-Medium:</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 5,0 g Ammoniumsulfat 100 ml Aminosäuremix 10x (-Trp-Leu-His-Ade) ad 950 ml Aqua demin. ⇒ pH-Wert mit NaOH auf 5,9 einstellen
Zusatz für Festmedien:	20,0 g Agar/Liter Nach dem Autoklavieren auf 50 °C temperieren und 50 ml einer 40%igen (w/v) sterilfiltrierten Glucose- lösung und 10 ml (His 100x) zugeben.
<b>SD-Leu-Trp-His-Medium:</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 5,0 g Ammoniumsulfat

	100 ml Aminosäuremix 10x (-Trp-Leu-His-Ade) ad 950 ml Aqua demin. ⇒ pH-Wert mit NaOH auf 5,9 einstellen
Zusatz für Festmedien:	20,0 g Agar/Liter Nach dem Autoklavieren auf 50 °C temperieren und 50 ml einer 40%igen (w/v) sterilfiltrierten Glucose- lösung, 10 ml (Ade 100x) und 25 mM (Endkonzent- ration im Medium) 3-Aminotriazol zugeben.
<b>Aminosäure-Mix (10x):</b>	2,0 g L-Threonin 1,5 g L-Valin 1,0 g L-D-Phenylalanin 0,3 g L-Lysin x HCl 0,3 g L-Isoleucin 0,2 g L-Methionin 0,2 g L-Arginin 0,3 g L-Tyrosin 0,2 g Uracil ad 1l Aqua bidest. sterilfiltrieren und bei 4 °C aufbewahren

### 3.2.2 Antibiotikallösungen

Tabelle 6 ist eine Übersicht der verwendeten Antibiotika sowie ihrer Anwendungskonzentrationen. Wasserlösliche Antibiotika wurden sterilfiltriert. Alle Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt. Bakterien wurden immer in Nährmedien bzw. auf Platten unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika angezogen.

**Tab. 6:** Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika. Angegeben sind Name, Lösungsmittel, Konzentration der Stammlösung sowie die für den jeweiligen Bakterienstamm eingesetzte Endkonzentration (EK). Die Zusätze (c) bzw. (p) in der Spalte „Stamm“ bezeichnen chromosomal bzw. plasmidale Resistenzen.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [ $\mu$ g/ml]	Stamm
Ampicillin	EtOH 70 %	100	100	<i>E. coli</i> / p
Chloramphenicol	EtOH abs.	20	5	<i>E. coli</i> / p <i>B. subtilis</i> / c
Spectinomycin	H <sub>2</sub> O bidest.	100	100	<i>E. coli</i> / p <i>B. subtilis</i> / c
Tetracyclin	EtOH 50 %	10	10	<i>E. coli</i> / p <i>B. subtilis</i> / c
Erythromycin	EtOH abs.	1 bzw. 100	1 bzw. 100	<i>B. subtilis</i> / c
Neomycin	H <sub>2</sub> O bidest.	10	10	<i>B. subtilis</i> / c
Kanamycin	H <sub>2</sub> O bidest.	100	100	<i>B. subtilis</i> / c
Vancomycin	H <sub>2</sub> O bidest.	1	1 bzw. 2	<i>B. subtilis</i> / c
Fosfomycin	H <sub>2</sub> O bidest.	50	100	<i>B. subtilis</i> / c
Bacitracin	H <sub>2</sub> O bidest. *	14,3 (1 000 U/ml)	14,3 (1 U/ml) bzw. 71,5 (5 U/ml)	<i>B. subtilis</i> / c

\* Zur vollständigen Lösung wurden pro ml 5 – 10  $\mu$ l 1 M HCl zugegeben.

### 3.3 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind ausschließlich selbst hergestellte Puffer und Lösungen aufgeführt.

<b>10x S-Base (Spizizens Salz)</b>	2 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 14 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g Natriumcitrat (ad 100 ml H <sub>2</sub> O bidest.), nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,1 ml sterilem 1 M MgSO <sub>4</sub>
<b>20x SSC-Puffer</b>	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
<b>Bindesilan-Lösung</b>	50 ml abs. Ethanol, 150 $\mu$ l Bindesilane, 150 $\mu$ l Eisessig, 1 350 $\mu$ l Aqua demin.
<b>CTAB/NaCl-Lösung</b>	10 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl
<b>Chloroform /Isoamylalkohol</b>	96 % Chloroform, 4 % Isoamylalkohol
<b>Ethidiumbromid-Stammlösung</b>	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.

<b>Farbmarker für Agarosegele</b>	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin, 1 mM EDTA
<b>Isopropyl-<math>\alpha</math> -D- Thiogalactopyranosid (IPTG)</b>	1 M IPTG in H <sub>2</sub> O bidest.
<b>Lysozym</b>	5 mg/ml bzw. 20 mg/ml in H <sub>2</sub> O bidest.
<b>Lysispuffer</b>	Z-Puffer + 1 mM DTT + 10 $\mu$ g/ml DNase + 100 $\mu$ g/ml Lysozym
<b>ONPG-Lösung</b>	0,4 % (w/v) ONPG in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2
<b>3 <math>\times</math> Probenpuffer für SDS-PAGE</b>	150 mM Tris/HCl pH 6,8, 6 mM EDTA, 3 % SDS, 3 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 30 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau
<b>Proteinase K-Lösung</b>	20 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 7,9, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS
<b>RF<sub>1</sub>-Lösung</b>	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 30 mM Kac, 15 % Glycerin, pH 5,8 (mit 0,2 M HAC einstellen), sterilfiltrieren
<b>RF<sub>2</sub>-Lösung</b>	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O, 15% Glycerin, pH 7,0 (mit 1N NaOH einstellen), sterilfiltrieren
<b>RNA Probenpuffer (2x)</b>	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
<b>RNase A</b>	20 mg/ml in 0,1 M NaOAc/AcOH pH 4,8, 10 min auf 100 °C erhitzen, langsam auf RT abkühlen
<b>TBE-Puffer (10<math>\times</math>)</b>	890 mM Tris, 890 mM Borsäure pH 8,0, 20 mM EDTA
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
<b>X-Gal</b>	4 % (w/v) in Dimethylformamid, Endkonzentration in Platten war 0,008 %
<b>Z-Puffer</b>	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM KCl, 1 mM MgSO <sub>4</sub>

## 3.4 Materialien und Geräte

### 3.4.1 Enzyme

<u>Roche:</u>	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, RNase Inhibitor, T7-RNA-Polymerase, DNaseI
<u>Merck:</u>	Proteinase K
<u>Sigma:</u>	RNaseA, Lysozym
<u>BIOzym:</u>	Fast-Link-DNA-Ligase
<u>Invitrogen life technologies:</u>	SuperScript II+ RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transkriptase
<u>New England Biolabs:</u>	Taq-DNA-Polymerase, DeepVent <sup>®</sup> -DNA-Polymerase
<u>MBI-Fermentas:</u>	Taq-DNA-Polymerase, T4-Polynukleotidkinase

Die Restriktionsenzyme stammen von den Firmen Gibco-BRL, MBI-Fermentas, New England Biolabs, Roche und Stratagene.

### 3.4.2 Molekulargewichtsstandards

#### 3.4.2.1 Proteinstandards

Zur Bestimmung von Molekulargewichten in SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde der „LMW Electrophoresis calibration Kit“ von Biorad verwendet, der aus folgenden Proteinen besteht: Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin Inhibitor (20,1 kDa) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa). Außerdem wurde der „Prestained SDS Molecular Weight“ Standard von Sigma benutzt, der folgende Proteine enthält:  $\beta$ -Galaktosidase (116 kDa), Fruktose-6-Phosphat-Kinase (84 kDa), Pyruvat-Kinase (58 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat-Dehydrogenase (36,5 kDa) und Triosephosphat-Isomerase (26,6 kDa). Zusätzlich kam auch die PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder von MBI-Fermentas zum Einsatz (180 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa).

#### 3.4.2.2 DNA- und RNA-Standards

Die Bestimmung von Fragmentlängen in Agarosegelen erfolgte für DNA mit der *EcoRI* hydrolisierten DNA des *B. subtilis* Phagen SPP1 (Roche), die einen Längenstandard mit folgenden Fragmentgrößen ergibt: [bp] 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492 und 359.

Zur Bestimmung von DNA-Fragmentlängen kleiner 1 kb wurde die 100 bp-Leiter der Firma MBI-Fermentas mit folgenden Fragmentgrößen verwendet: [bp] 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80.

Zur Bestimmung von RNA-Fragmentgrößen in Agarosegelen wurde die RNA-Leiter (High Range) der Firma MBI-Fermentas mit Fragmentgrößen von 6,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 und 0,2 kb verwendet.

### 3.4.3 Biochemikalien und Chemikalien

<u>Calbiochem:</u>	Pansorbinzellen
<u>ICN:</u>	Xylose
<u>LKB Bromma:</u>	Bindesilan
<u>MBI-Fermentas:</u>	Nukleotide
<u>Merck:</u>	Formaldehydlösung 37 %, Dichlormethylsilan, Essigsäure p. a., Formamid
<u>NEN:</u>	En <sub>3</sub> hance
<u>Pierce:</u>	SuperSignal <sup>®</sup> -West-Pico
<u>Qiagen:</u>	Ni-NTA-Agarose
<u>Roche:</u>	Blocking Reagenz, CDP-Star (Tropix)
<u>Roth:</u>	Diethylpyrocarbonat (DEPC), Agar, Caseinhydrolysat, Typton/ Pepton (pankreatisch verdaut), Hefeextrakt, Ethidiumbromid, Chloroform, saures Phenol (Aqua-Phenol), Phenol/TE (Roti-Phenol), Kaliumacetat, Saccharose, MOPS, Tris, Harnstoff, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Agarose, Rotiphorese <sup>®</sup> Gel30, Rotiphorese <sup>®</sup> Gel40, Temed
<u>Sigma:</u>	Ammoniumperoxodisulfat (APS), ONPG, EGTA, CTAB, Brj <sup>®</sup>

Alle weiteren, nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden ebenfalls in den Reinheitsgraden „reinst“ oder „zur Analyse (p. a.)“ von den Firmen Merck, Sigma, Roth und Serva bezogen.

### 3.4.4 Verwendete Kits

<u>BIOzym:</u>	Fast Link-DNA-Ligation Kit
<u>Gibco-BRL:</u>	CONCERT High-Purity-Midi Kit, CONCERT Rapid-PCR Purification-System, CONCERT Rapid-Gel-Extraction Kit

<u>Qiagen:</u>	Qiagen Plasmid Midi Kit, QIAquik PCR Purification Kit, QIAquik Nucleotide Removal Kit, QIAex II Gel Extraction Kit
<u>Usb Corporation:</u>	T7 Sequencing Kit
<u>Clontech:</u>	Matchmaker 3

### 3.4.5 Radiochemikalien

<u>Amersham Biosciences:</u>	$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-dCTP 370 MBq/ml (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) $\gamma$ -[ <sup>33</sup> P]-ATP 370 MBq/ml (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) $\alpha$ -[ <sup>35</sup> S]-dATP 370 MBq/ml (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin 370 MBq/ml (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)
------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.4.6 Geräte

<u>Amersham, Pharmacia,</u>	
<u>Biotech:</u>	Elektrophoresis Power Supply EPS 301, Photometer Ultrospec2100pro, Elektrophorese-Kammern Mighty Small II,
<u>Beckman:</u>	LS6500 Multi-purpose scintillation counter
<u>BioRad:</u>	Slab Dryer Model R483
<u>Biostep:</u>	Bioview Transilluminator USDT-20SM-8E
<u>Branson:</u>	Sonifier-Cell-Disrupter-B15
<u>Eppendorf:</u>	Thermal Cycler (Master Cycler Personal)
<u>Grant Boekel:</u>	Heizblock BBD
<u>Heraeus:</u>	Brutschränke B5042, Vakuumofen VTR 5036
<u>Herolab:</u>	Image Documentation System (ICU-1 / E.A.S.Y. 429 K)
<u>Hybaid:</u>	MINI Oven
<u>IKA:</u>	VIBRAXX VXR basic, RCT basic
<u>Konika:</u>	Röntgenfilm-Entwicklermaschine SRX-101
<u>KSG:</u>	Hochdruckdampf-Sterilisator KSG 112-2
<u>LKB Bromma:</u>	2010 MACROPHOR Electrophoresis Unit, 2297 MACRODRIVE 5 Constant Power Supply
<u>Memmert:</u>	Wasserbad
<u>Molecular Devices:</u>	VersaMax Microplate-Reader
<u>Molecular Dynamics:</u>	PhosphorimagerSI
<u>New Brunswick Co:</u>	Schüttelwasserbäder Gyrotory C76, Schüttelinkubator G25

<u>Pharmacia, Biotech:</u>	Vakuum-Blot-Anlage VacuGeneTMX1
<u>Scotsman:</u>	Eismaschine AF-30
<u>Tuttnauer Systec:</u>	Tischautoklav 2540 EL

### 3.4.7 Zentrifugen

Standardzentrifugationen wurden in Abhängigkeit der Volumina in folgenden Zentrifugen durchgeführt:

<u>Eppendorf:</u>	Centrifuge 5415 D, 5804 R, Optima TL Ultracentrifuge
<u>Heraeus:</u>	Variofuge 3.0R
<u>Hettich:</u>	Zentrifuge EBA 12, Kühlzentrifuge Mikrorapid/K
<u>Sorvall Du Pont:</u>	Kühlzentrifuge RC 5 plus,
<u>UniEquip:</u>	Vakuumzentrifuge Univapo 150 H

### 3.4.8 Sonstiges

<u>Amersham, Biosciences:</u>	Hyperfilm ECL
<u>Beckmann:</u>	Centrifuge Tubes Polyallomer
<u>Millipore:</u>	Centrifugal Filter Devices (Amicon & Amicon Ultra)
<u>Molecular Dynamics:</u>	Storage Phosphor Screen
<u>Pall:</u>	Nylonmembranen (positiv geladen)
<u>Qiagen:</u>	Nylonmembranen (ungeladen), Polypropylene Columns
<u>Sarstedt:</u>	Einmal-Küvetten (halbmikro)
<u>Schleicher &amp; Schuell:</u>	Nitrocellulose-Membran (für Western Blot), Blotting-Papier (GB002, GB003)
<u>Suprasil Hellma:</u>	Quarz-Küvetten
<u>Whatman:</u>	Chromatographiepapier 3MM

## 3.5 Allgemeine Methoden

Allgemeine, molekulargenetische und biochemische Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook und Russel, 2001).

### 3.5.1 Absorptionsmessung

Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe des Pharmacia-Spektralphotometers Modell Ultrospec 2100pro durchgeführt. Für Messungen im Bereich des sichtbaren Lichts wurden Kunst-

stoffküvetten benutzt. Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde bei 578 nm gemessen. Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten bestimmt. Dabei gilt, dass 1  $A_{260}$  einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g ds-DNA/ml}$ , bzw. 33  $\mu\text{g ss-DNA/ml}$  Lösung entspricht (Sambrook *et al.*, 2001). Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt den Reinheitsgrad der DNA an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.5.2 Aufnahmen von Wachstumskurven

Zur Erstellung der Wachstumskurven wurde jeweils eine geeignete Menge LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) mit einer ÜNK des entsprechenden Bakterienstammes auf eine  $OD_{578}$  von ca. 0,05 inokuliert und bei 30 °C bzw. 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Das Wachstum wurde durch Messen der  $OD_{578}$  in allen Wachstumsphasen verfolgt und dokumentiert. Bei spezifischen Fragestellungen wurde in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase ein Induktor bzw. Stressor zugegeben und gegebenenfalls Aliquots zu adäquaten Zeitpunkten entnommen, abzentrifugiert und bei -20 °C aufbewahrt bzw. sogleich weiter prozessiert. Als Kontrolle blieb stets eine Kultur jedes zu untersuchenden Stammes unbehandelt.

### 3.5.3 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen

Von dem zu konservierenden Bakterienstamm wurde eine 5-ml-ÜNK angelegt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, 1x mit LB (gegebenenfalls mit Antibiotikum) gewaschen, in 1,5 ml LB aufgenommen und mit 300  $\mu\text{l}$  sterilem Glycerin versetzt und gründlich gemischt. Die Suspension wurde 1 h auf Eis belassen, in regelmäßigen Abständen durchmischt, abschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.5.4 Autoradiographie

Radioaktive Isotope in Polyacrylamid-Gelen wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Dabei wird ein aufgelegter Röntgenfilm nur an den Stellen geschwärzt, an denen sich radioaktiv markierte Proben im Gel befinden. Dazu wurde ein Röntgenfilm direkt auf das getrocknete Gel gelegt und für 1 – 10 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln exponiert. Gele, die  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierte Proben enthielten, wurden bei -80 °C exponiert. Danach wurde der Film mit der Entwicklermaschine SRX-101 der Firma Konika entwickelt. Bei DNA-Makroarray-Experimenten erfolgte der Nachweis in Storage Phosphor Screens, welche mit Hilfe des Phosphoimagers SI (Molecular Dynamics) ausgelesen und mit der Software ArrayVision 6.0 ausgewertet wurden.

## 3.6 Genetische und molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 Transformation von *E. coli*

Transformation ist definiert als die Aufnahme freier, gelöster DNA durch eine Empfängerzelle.

#### 3.6.1.1 Herstellung von RbCl-kompetenten *E. coli*-Zellen

Diese Methode stellt eine leichte Abwandlung der Standardmethode nach Cohen *et al.* 1972 dar. Vom gewünschten, zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine 10 ml ÜNK erstellt. Mit 3 ml dieser ÜNK wurden 300 ml LB-Medium (evtl. mit Antibiotikum) in einem Erlenmeyer-kolben inokuliert und bis zu einer OD<sub>578</sub> von etwa 0,45 bei 37 °C geschüttelt (ca. 3 h) und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann 10 min bei 7 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 90 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation der resultierenden Zellsuspension auf Eis, dann erneute Zentrifugation für 10 min bei 7 000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 9 ml eiskalter RF2-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15 min auf Eis gestellt, à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

#### 3.6.1.2 Transformation RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurde die benötigte Anzahl an Aliquots kompetenter Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe der zu transformierenden Plasmid-DNA (20 – 200 ng). Die Transformationsansätze wurden für mindestens 1 h auf Eis gestellt und danach für 2 min in ein 42°C-Wasserbad überführt. Pro Ansatz wurden nun je 800 µl LB-Medium zugegeben, dann für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser sogenannten Genexpressionsphase erfolgt die Ausbildung plasmidaler Resistenzen; sofortiges Ausplattieren auf antibiotikahaltigen Platten würde alle Transformanten abtöten, da die Antibiotika-inaktivierenden Enzyme erst synthetisiert werden müssen. Schließlich wurden die Bakterien für 3 min bei 8 000 rpm abzentrifugiert. Bei Antibiotika-Resistenzen, die durch periplasmatische Enzyme vermittelt werden, wie z. B. die Ampicillinresistenz durch  $\beta$ -Lactamase, wurden die Zellen zwecks Vermeidung von Mikrokolonien aufgrund spontaner Zellyse noch zweimal mit antibiotikahaltigem Medium gewaschen. Dann wurde der größte Teil des Überstandes verworfen, das Zellpellet im Restvolumen resuspendiert und vollständig oder in Form verschiedener Verdünnungen auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert.

### **3.6.2 Transformation von *B. subtilis***

*B. subtilis*-Zellen erlangen beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Phase natürliche Kompetenz. Kompetente Zellen wurden in einem zweistufigen Verfahren in HS-Medium bzw. LS-Medium hergestellt (Anagostopoulos und Spizizen, 1961).

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

Eine ÜNK des zu transformierenden Stammes wurde in 5 ml HS-Medium angelegt und bei 30 °C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml HS-Medium in einem Schüttelkolben mit 0,5 ml der ÜNK inokuliert und anschließend bei 37 °C im Wasserbad unter starkem Schütteln inkubiert. Durch Messung der OD<sub>578</sub> wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Beim Übergang der Kultur in die stationäre Phase wurden im Abstand von 15 min je 10 ml der Kultur mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt, gemischt und für 15 min auf Eis gestellt. Fraktionen zu je 1 ml wurden in Eppendorfgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

### **3.6.4 Transformation von DNA**

Zur Transformation wurde ein Zellaliquot in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Damit wurden anschließend 10 ml LS-Medium inokuliert. Die Zellen wurden bei 30 °C im Wasserbad bis zum Erreichen der maximalen Kompetenz langsam geschüttelt (ca. 2 h). Dann wurden 1-ml-Aliquots der Kultur entnommen, in Wassermann-Röhrchen überführt und mit je 10 µl 0,1 M EGTA versetzt, anschließend 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die gewünschten Mengen an DNA zugegeben und die Ansätze für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Zellsuspensionen in Eppendorfgefäße überführt, abzentrifugiert, nach Verwerfen des größten Teils des Überstandes im Restvolumen resuspendiert und auf geeignete Selektivmedien ausplattiert.

## **3.7 Biochemische Methoden**

### **3.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (Boiling Prep.)**

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab erfolgte nach der Boiling-Methode von Holmes und Quigley (1981).

### **3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midiprep)**

Zur schnellen Isolierung größerer Mengen DNA in reiner Form wurden der CONCERT-High-Purity-Midi-Kit der Firma Gibco-BRL und das QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller.

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

Chromosomale DNA aus *B. subtilis* wurde mit Hilfe der von Smith (1989) beschriebenen Methode isoliert.

### **3.7.4 Reinigung von DNA**

Die (Auf-)Reinigung von DNA erfolgte je nach Anwendung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit, dem Nucleotide Removal Kit bzw. dem QiaEx II Gel Extraction Kit jeweils nach Angaben des Herstellers.

### **3.7.5 Enzymatische Hydrolyse von DNA**

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II (Arber, 1978) verwendet, welche die DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen hydrolysieren. Alle Reaktionen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

### **3.7.6 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen**

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8 % – 2,0 % in TBE-Puffer suspendiert, im Mikrowellenherd aufgelöst und in Flachbettapparaturen gegossen. Die Proben wurden mit  $\frac{1}{6}$  Vol. Farbmaler versetzt, in die Geltaschen pipettiert und mit einer Spannung von 0,5 – 1 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Nach beendetem Lauf wurden die Gele ca. 10 min in 10 µg/ml EtBr-Lösung gefärbt und im Anschluss daran für ca. 10 min in VE-Wasser entfärbt. Auf der UV-Durchlichtbank Bioview USDT-20SM-8E von Biostep bei 312 nm wurden die Gele betrachtet und mit dem Image Documentation System ICU-1 von Herolab visualisiert.

### **3.7.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase**

Die Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente erfolgte mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) nach den Angaben des Herstellers (Roche).

### 3.7.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit dem „Fast Link-Ligation-Kit“ der Firma BIOzym durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei die Ligationszeiten variabel an jede Ligation angepasst wurden.

### 3.7.9 PCR-Reaktion mit der Deep-Vent®- bzw. Taq-DNA-Polymerase

Die PCR-Reaktion wurde mit den PCR-Kits der Firmen New England Biolabs (Deep-Vent®) und MBI-Fermentas (Taq-DNA-Polymerase) durchgeführt. Die Deep-Vent®-DNA-Polymerase verfügt im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase über eine Proofreading-Aktivität. Sie wurde deshalb bei Klonierungen eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten nach den Angaben der Hersteller bzw. nach Sambrook und Russel (2001).

### 3.7.10 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle, ob ein bestimmtes Plasmid (aus einer Ligation) in einem *E. coli*-Klon enthalten ist, wurde die Methode der Kolonie-PCR angewendet. Dazu wurde eine Bakterienkolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers direkt von der LB-Platte in einen PCR-Reaktionsansatz überführt. Durch den ersten Denaturierungszyklus der PCR-Reaktion werden die *E. coli*-Zellen bei 94 °C lysiert und die DNA freigesetzt. Mit der freigesetzten DNA erfolgte dann die Amplifikation eines DNA-Fragments über PCR, falls das korrekte Plasmid integriert war. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug pro Klon 20 µl und die PCR wurde mit der Taq-DNA-Polymerase von New England Biolabs nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.7.11 Southern-Blot

#### 3.7.11.1 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen und Transfer auf Nylonmembranen

Die Elektrophorese von DNA in 0,8%igen Agarosegelen und der anschließende Transfer auf Nylonmembranen (Firma Qiagen) mit Hilfe eines Vakuum-Blot-Systems (VacuGene™X1) der Firma Pharmacia wurden nach einem von Homuth (1997) abgewandelten Protokoll von Southern (1975) durchgeführt.

#### 3.7.11.2 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

DIG-markierte DNA-Sonden wurden mittels PCR unter Verwendung eines DIG-dNTP-Markierungsgemisches der Firma Roche erstellt. Die PCR wurde mit geeigneten Primern und der Deep-Vent®-DNA-Polymerase durchgeführt.

### 3.7.11.3 Hybridisierung membrangebundener DNA mit DIG-markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung membrangebundener DNA mit DIG-markierten DNA-Sonden wurde nach Homuth (1997) durchgeführt.

### 3.7.11.4 Nachweis DIG-markierter DNA mittels Chemolumineszenz

Der Nachweis Digoxygenin-markierter Nukleinsäuren erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet ein Konjugat aus  $F_{ab}$ -Fragment eines hochaffinen Anti-Digoxygenin-Antikörpers und alkalischer Phosphatase spezifisch an die DIG-markierte Sonde. In einem zweiten Schritt erfolgt durch Katalyse der alkalischen Phosphatase die Spaltung des Chemolumineszenz-Substrats CDP-Star<sup>®</sup> (Firma TROPIX), die eine Lichtemission bei 461 nm bewirkt. Diese bis zu 24 h anhaltende Lichtemission wird durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms detektiert. Hierbei wurde nach Herstellerangaben bzw. nach Homuth *et al.* (1997) verfahren.

### 3.7.12 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung des T7 Sequencing Kits der Firma usb Corporation durchgeführt.

#### 3.7.12.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung wurde nach den Angaben des Herstellers ausgeführt. Zur Denaturierung des Plasmid-Templates und zum Annealen der Sequenzierprimer wurde nach dem Standardprotokoll (procedure C) vorgegangen. Die eigentliche Sequenzierung wurde als „read short“ mit [ $\alpha^{35}\text{S}$ ]dATP und dem dATP Labeling Mix durchgeführt. Nach Inkubation für 2 min bei 85 °C zur Denaturierung der Proben wurden je 2  $\mu\text{l}$  zur Trennung der Banden auf ein 6%iges Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenziergel aufgetragen.

#### 3.7.12.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Sequenzierproben erfolgte in 6%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen in einer Elektrophoreseapparatur der Firma LKB. Zur Herstellung des Gels wurden 36 g Harnstoff in 27,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 7,5 ml 10x TBE-Puffer und 11,25 ml 40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19 : 1) durch langsames Rühren auf dem Magnetrührer in Lösung gebracht und nach Filtration über ein Faltenfilter für 5 min am Wasserstrahl-Vakuum entgast. Direkt vor dem Gießen des Gels wurden 30  $\mu\text{l}$  TEMED und 300  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat zugegeben. Bevor das Gel gegossen werden konnte, mussten eine Thermoplatte und eine Gel-Trägerplatte vorbereitet werden. Beide wurden gründlich mit Wasser und Detergens

gereinigt und mit Ethanol abgerieben, um sie zu entfetten. Die Thermoplatte wurde mit 5 ml Repelsilane behandelt, um ein späteres Ablösen des Gels zu ermöglichen. Die Gel-Trägerplatte wurde mit 5 ml Bindsilane eingerieben, damit das Gel an diese Platte binden konnte. Nach Gießen des 0,2 mm dicken Gels und Polymerisation für ca. 90 min wurde es in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, die Taschen gründlich mit Laufpuffer (1x TBE) gespült und ein Vorlauf für 30 min bei 1 600 V gestartet, wobei die Thermoplatte mit Hilfe eines Wasserkreislaufs auf 60 °C temperiert wurde. Im Anschluss daran wurden die Proben für 3 min bei 85 °C denaturiert, danach sofort in Eis gestellt und nach erneutem Spülen der Taschen wurden 2 – 3 µl der Proben aufgetragen. Die freien Bahnen wurden mit Stop-Mix (Sequencing Kit) beladen und die Elektrophorese für 2 h bei 2 100 V und 60 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Thermoplatte abgelöst und die Trägerplatte mit dem daran anhaftenden Gel für 30 min in 10 % (v/v) Essigsäure gelegt, unter fließendem Wasser gründlich abgespült, um den Harnstoff zu entfernen und für 30 min auf der 65 °C warmen Heizplatte getrocknet. Danach wurden Filme aufgelegt und für 3 – 7 Tagen exponiert und anschließend mit der Entwicklermaschine SRX-101 der Firma Konika entwickelt.

### **3.8 Arbeiten mit RNA**

#### **3.8.1 DEPC-Behandlung von Lösungen und Glasgeräten**

Zur Inaktivierung potentiell vorhandener RNAsen wurden einige Lösungen und Glasgeräte mit DEPC behandelt. Hierzu wurden die Lösungen mit 0,1 % DEPC (v/v) versetzt, 2 min kräftig geschüttelt, ÜN bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Glasgefäße wurden mit Wasser gefüllt und wie oben beschrieben mit DEPC behandelt. Nach dem Autoklavieren wurde das Wasser abgossen. Hybridisierungsröhren wurden zusätzlich nach der DEPC-Behandlung für 1 h bei 120 °C getrocknet.

#### **3.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *B. subtilis***

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe der von Völker *et al.* 1994 beschriebenen „Sauren-Phenol“-Methode, wobei das Basisprotokoll leicht modifiziert wurde. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Protoplastenbildung der Bakterienzellen durch Lysozym, die durch Überführung in die Lysislösung mit SDS lysiert werden. Nach der Behandlung mit saurem Phenol liegt die DNA in der organischen Phase vor, während die RNA in der wässrigen Phase bleibt.

Sofort nach der Probenentnahme wurden 10 ml Bakteriensuspension auf 5 ml „Killing-Eis“ (gefrorener, zerstoßener Killing-Puffer) in Zentrifugenröhrchen gegeben und zentrifugiert

(8 000 rpm, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde in 1 ml „Killing-Puffer“ resuspendiert und zentrifugiert (8 800 rpm, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde das Pellet auf Eis in 1 ml Lysislösung I resuspendiert, 50 µl Lysozymlösung zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeitspanne wurden Eppendorfgläser für den eigentlichen Zellaufschluss vorbereitet: pro RNA-Probe wurde ein Reaktionsgefäß mit 270 µl Lysislösung II und 30 µl 10 % SDS bei 95 °C im Heizblock vorgewärmt. Die durch Lysozymbehandlung in hyperosmotischem Medium erzeugten Protoplasten wurden abzentrifugiert (4 000 rpm, 4 °C, 5 min), das Pellet in 300 µl Lysislösung II resuspendiert und mit den vorbereiteten 300 µl Lysislösung II/SDS vereinigt. Das Gemisch wurde 5 min bei 95 °C inkubiert. In diesem Zeitraum wurden durch das kombinierte Einwirken von SDS und der hohen Temperatur die Protoplasten lysiert und ihr Inhalt freigesetzt. Unmittelbar nach Beendigung des Aufschlusses wurden 600 µl saure Phenol-Lösung vorsichtig zugegeben. Anschließend wurde 5 min bei RT geschüttelt, 5 min bei 12 000 U/min zentrifugiert, 500 µl der Oberphase entnommen und die Phenolbehandlung (500 µl) wiederholt. Dann wurden 400 µl der wässrigen Phase mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (v/v; 1 : 1) versetzt, 5 min bei RT geschüttelt und anschließend 5 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die gesamte wässrige Oberphase (ca. 400 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Einstellung einheitlicher RNA-Sekundärstrukturanteile bei allen Proben einer RNA-Präparation wurde nun für 10 min bei 65 °C und dann 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina 96%iger Ethanol zugegeben. Die Fällung der RNA erfolgte für mindestens 1 h bei -80 °C.

Das RNA-Präzipitat wurde bei 12 000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 20 min unter Vakuum getrocknet und danach in 100 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O dest. gelöst (3 h auf Eis und 30 min bei RT). Die Nukleinsäurekonzentration wurde bei 260 nm gemessen. Zur Bestimmung wurden 5 µl der RNA-Lösung entnommen und mit 995 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O dest. verdünnt. Die beschriebene Methode lieferte Ausbeuten von 1 – 3 µg RNA/µl. Die RNA-Präparationen wurden bei -80 °C aufbewahrt und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.

„Killing-Puffer“:  
20 mM Tris/HCl, pH 7,5  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM NaN<sub>3</sub>

Lysislösung I:	25 % Saccharose 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,25 mM EDTA
Lysozymlösung:	20 mg Lysozym/ml H <sub>2</sub> O dest
Lysislösung II:	3 mM EDTA 200 mM NaCl
„Saures Phenol“:	Aqua-Phenol (Roth), Chloroform, Isoamylalkohol (v/v/v; 25 : 24 : 1), zweimal ausgeschüttelt mit H <sub>2</sub> O dest.
Chloroform/Isoamylalkohol:	Chloroform, Isoamylalkohol (v/v; 24 : 1), mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, äquilibriert

### 3.8.3 Elektrophorese von RNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte in denaturierenden 1,2%igen Agarosegelen. Dazu wurden zu 0,6 g Agarose 37 ml H<sub>2</sub>O demin./DEPC und 5 ml zehnfach MOPS gegeben und im Mikrowellenherd zur vollständigen Quellung gebracht. Die gelöste Agarose wurde für 30 min bei 65 °C temperiert, anschließend wurden 4,25 ml Formaldehyd zugegeben und der Ansatz erneut für 30 min bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 35 ml des Agaroseansatzes in eine vorbereitete Flachbettapparatur gegossen. Zum Erstarren wurde das Gel 1 h bei RT belassen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C mit MOPS-Puffer als Laufpuffer. Zuerst erfolgte ein Vorlauf von 10 min bei 100 V. In der Zwischenzeit wurden die RNA-Proben (je 2 µg in 7 µl H<sub>2</sub>O/DEPC) für die Elektrophorese präpariert. Dazu wurden die RNA-Lösungen mit jeweils einem Volumen Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 65 °C zum Auflösen von Sekundärstrukturen inkubiert und dann sofort in Eis gestellt. Das Gel wurde mit den RNA-Proben und RNA-Molekulargewichtsstandard (MBI), 1,5 µl plus 1,5 µl RNA-Probenpuffer beschickt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V (entspricht 4 V/cm Elektrodenabstand) für zweimal 90 min, wobei nach den ersten 90 min der Laufpuffer gut gemischt, das Gel umgedreht und die Polung an der Spannungsquelle vertauscht wurde. Nach der Elektrophorese wurde das Gel angefärbt (5 min mit 5 µg/ml Ethidiumbromid in MOPS-Puffer), dreimal für 20 min mit

H<sub>2</sub>O/DEPC entfärbt und fotografiert. Über Nacht wurde das Gel bei 4 °C und mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O dest. überschichtet aufbewahrt.

10x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen
	autoklavieren

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

### **3.8.4 Transfer von RNA auf Nylonmembranen**

Zum Nachweis bestimmter mRNA-Sequenzen durch Hybridisierungsexperimente mussten die RNA-Proben auf eine Nylonmembran übertragen werden. Hierfür wurde die Northern-Transfer-Methode angewandt.

#### **3.8.4.1 Northern-Blot**

Die Northern-Blot-Technik erlaubt eine qualitative und quantitative Bestimmung spezifischer RNA-Moleküle in RNA-Gemischen. Hierzu werden nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung die RNA-Moleküle auf eine Nylonmembran übertragen und dort immobilisiert. Die Identifikation erfolgt durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde.

Der Vakuum-Transfer wurde mit einer Vakuum-Blot-Anlage (VacuGene<sup>TM</sup>X1) der Firma Pharmacia durchgeführt. Dazu wurde eine positiv geladene Nylonmembranen (Pall) mit einer Größe von 8 x 11 cm zunächst für 15 min in 20x SSC eingelegt und danach auf die gut mit H<sub>2</sub>O demin. durchfeuchtete, poröse Trägerplatte gelegt. Mit einer Plastikmaske wurde die Membran abgedichtet und abschließend luftdicht das Agarosegel auf die Membran und Plastikmaske aufgelegt. Dann wurde ein Vakuum von 50 mm Hg an die Vakuum-Kammer angelegt und das Gel mit den folgenden Lösungen überschichtet:

- |                           |       |
|---------------------------|-------|
| 1. Denaturierungslösung   | 5 min |
| 2. Neutralisierungslösung | 5 min |
| 3. 20x SSC                | 6 h   |

Die Inkubation mit Denaturierungslösung bewirkte dabei die partielle alkalische Hydrolyse der RNA. Folglich wurden die hochmolekularen RNA-Moleküle im Gel zu kleineren Molekülen fragmentiert, was die Transfereffizienz auf die Nylonmembranen erhöhte. Nach dem Blotten wurden die Filter 2 min mit 20x SSC gespült, um noch anhaftende Agarosereste zu entfernen. Durch einstündiges Erhitzen auf 120 °C wurde restliches Formaldehyd entfernt. Auf der UV-Durchlichtbank wurde der RNA-Längenstandard auf der Nylonmembran markiert. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und bei 4 °C bis zur Hybridisierung gelagert.

Denaturierungslösung:                   50 mM NaOH  
                                                  10 mM NaCl

Neutralisierungspuffer:               100 mM Tris/HCl, pH 7,4

### **3.8.5 Herstellung DIG-markierter ssRNA-Sonden *in vitro***

#### **3.8.5.1 Herstellung einer DNA-Matrize mittels PCR**

Für die *in-vitro*-Transkription wurde zunächst mit Hilfe einer PCR eine DNA-Matrize hergestellt. Dazu wurden ausgehend von einem 3'-Primer, der neben der komplementären Sequenz weiterhin einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase enthielt, die gewünschten Bereiche von chromosomaler *B. subtilis*-DNA bzw. DNA eines Plasmids amplifiziert. Das erzeugte Produkt enthielt also ebenfalls eine T7-Promotorregion, von der aus ein anti-sense-Transkript hergestellt werden konnte. Nach Aufreinigung des Produkts mit QIAquick PCR Purification Kit wurde die DNA auf einem Agarosegel auf Reinheit und Integrität geprüft.

#### **3.8.5.2 *In-vitro*-Transkription**

Zur Herstellung der DIG-markierten ssRNA-Sonden wurden *in-vitro*-Transkriptionen durchgeführt. Dazu wurden folgende Ansätze vorbereitet:

- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 9,5 µl Aqua dest. DEPC-behandelt

2 µl NTP-Markierungsgemisch (mit Digoxigenin)  
 1 µg DNA-Matrize  
 2 µl RNA-Polymerase T7  
 0,5 µl RNase-Inhibitor

Der Transkriptionsansatz wurde zunächst für 3 h bei 37 °C inkubiert, und die DNA-Matrize anschließend durch Zugabe von 2 µl DNaseI und Inkubation für 15 min bei 37 °C abgebaut. Danach wurden 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0 zugegeben und die RNA-Sonde nach Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol abs. über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde das Präzipitat durch 15-minütige Zentrifugation bei 12 000 rpm und 4 °C pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut bei 12 000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet nach Abnahme des Überstands 20 min unter Vakuum getrocknet. Aufgenommen wurde das Pellet abschließend in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser. Zusätzlich wurden 0,5 µl RNase-Inhibitor zugegeben. Die fertigen Sonden wurden bei -20 °C gelagert. Die im Rahmen der Arbeit erstellten und verwendeten Sonden sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tab. 7:** Auflistung der erstellten Dig-markierten mRNA-Riboprobe-Sonden.

detektierte mRNA	verwendete Primer für die DNA-Matrize	RNA-Polymerase
<i>ylaA</i>	PCR mit <i>ylaa_px25'</i> und <i>T7ylaA3</i>	T7
<i>ylaB</i>	PCR mit <i>ylaBCD5</i> und <i>T7ylaB3</i>	T7
<i>ylaC</i>	PCR mit <i>Sonde_ylaC5</i> und <i>Sonde_ylaC3</i>	T7
<i>ylaD</i>	PCR mit <i>paxylad5</i> und <i>RNA-Sonde ylaD</i>	T7
<i>groE</i>	Sonde erstellt von T. Wiegert	T7
<i>yqiW</i>	PCR mit <i>yqiW5</i> und <i>yqiW3T7</i>	T7
<i>yybS</i>	PCR mit <i>yybS5</i> und <i>yybS3T7</i>	T7
<i>ywqE</i>	PCR mit <i>ywqE5</i> und <i>ywqE3T7</i>	T7
<i>yoaH</i>	PCR mit <i>yoaH5</i> und <i>yoaH3T7</i>	T7
<i>lacZ</i>	Sonde erstellt von T. Wiegert	T7

### 3.8.5.3 Reinigung DIG-markierter ssRNA-Sonde durch Präabsorption

Vor ihrer erstmaligen Verwendung wurden die ssRNA-Sonden gereinigt, um bei der Detektion der membrangebundenen RNA starke Hintergrundsignale auf den Röntgenfilmen zu vermeiden (Sprenger *et al.*, 1995). Daher wurden die RNA-Sonden vor ihrer erstmaligen Verwendung zweimal durch Präabsorption gereinigt, woraufhin sich der beschriebene Hinter-

grund nicht mehr einstellte. Die Reinigung erfolgte nach dem von Homuth (1997) beschriebenen Protokoll. Am nächsten Morgen wurde die gereinigte Sonde entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.8.6 Hybridisierung membrangebundener RNA mit Digoxigenin-markierten Einzelstrang RNA-Sonden**

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf Membrangrößen von maximal 8 x 11 cm. Die Hybridisierung membrangebundener RNA erfolgte mit Digoxigenin-markierten Einzelstrang-RNA-Sonden (Riboprobes) in DEPC-behandelten Hybridisierungsröhren. Die Nylonmembran mit der hitzefixierten RNA wurde mit 20 ml Prähybridisierungslösung in eine Hybridisierungsröhre transferiert und mindestens 1 h bei 68 °C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Währenddessen erfolgte zur Auflösung potentieller Sekundärstrukturen eine Inkubation der Einzelstrang-RNA-Sonde, die sich aus 3 ml Prähybridisierungslösung mit 1 µg Digoxigenin-markierter RNA zusammensetzte, bei 65 °C für 15 min, anschließend wurde sie 15 min auf Eis inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und durch die Hybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68 °C. Am nächsten Morgen wurde die Sonde entfernt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Nylonmembran wurde zur Entfernung unspezifisch gebundener RNA zuerst zweimal einem niedrigstringenten Waschschritt unterzogen (5 min bei RT in 50 ml 2x SSC, 0,1 % SDS) und danach dreimal einem hochstringenten (15 min bei 68 °C in 50 ml prätemperiertem 0,1x SSC, 0,1 % SDS). Danach wurden Digoxigenin-markierte RNA-RNA-Hybride nachgewiesen.

Prähybridisierungslösung:	50 % (v/v) Formamid
	5x SSC
	2 % (w/v) Blocking Reagenz/DEPC
	0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin
	0,02 % (w/v) SDS

Alle Komponenten wurden unmittelbar vor Gebrauch aus Stammlösungen zusammenpipetiert, das Gesamtvolumen mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O demin. ergänzt und die Lösung vor Gebrauch 30 min bei 37 °C präinkubiert.

### **3.8.7 Nachweis Digoxigenin-markierter Nukleinsäuren mittels Chemolumineszenz**

Der Nachweis Digoxigenin-markierter Nukleinsäuren erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet ein Konjugat aus dem F<sub>ab</sub>-Fragment eines hochaffinen Anti-Digoxigenin-Antikörpers



der zu kartierenden mRNA hybridisiert und dient als Primer für eine reverse Transkription, wodurch einzelsträngige DNA bis zum 5'-Ende der mRNA gewonnen wird. Die Länge des entstandenen DNA-Stranges wird in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel durch den Vergleich mit einer Sequenzierreaktion (s. 3.7.12.1) bestimmt und gibt somit Aufschluss über das 5'-Ende der mRNA. Zunächst erfolgte die Endmarkierung der Primer. Dazu wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 5 µl [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]ATP (3 000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 2,5 µl 10x Kinasepuffer A und 1 µl T4-Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms durch 10-minütige Inkubation bei 68 °C. Nach Reinigung des markierten Primers mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits wurde die Markierung durch Szintillationsmessung einer 2 000-fachen Verdünnung überprüft.

In einem zweiten Schritt wurden 2 µg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 5,0 µl markiertem Oligonukleotid und 3,0 µl 10x Hybridisierungspuffer für 10 min zur Denaturierung bei 95 °C inkubiert, dann zur Hybridisierung für 60 min bei der Annealing-Temperatur der Primer. Währenddessen wurde die reverse Transkription durchgeführt wie bei Wiegert *et al.* (2001) beschrieben.

### 3.9 DNA-Makroarrays

Die DNA-Makroarrayanalyse wurde mit Panorama *B. subtilis* gene arrays und cDNA labeling primers der Firma Sigma Genosys unter Verwendung des von Wiegert *et al.* (2001) beschriebene Protokolls durchgeführt.

#### 3.9.1 Probenentnahme zur RNA-Präparation

Zur Präparation qualitativ hochwertiger RNA wurde ein modifiziertes Protokoll, das ursprünglich für die Extaktion von RNA aus *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt wurde, verwendet (Wiegert *et al.*, 2001).

#### 3.9.2 Detektion der DNA-Makroarrays

Nach Beendigung des letzten Waschschrattes wurden die Arrays mit der Flachpinzette vorsichtig aus den Hybridisierungsröhren entnommen, ausgerollt und in Folie eingeschweißt. Mit dem Geiger-Müller-Zähler wurde überprüft, ob sich radioaktiv markierte cDNA auf den Macroarrays befand. Dann wurden die eingeschweißten Arrays mittels Klebeband faltenfrei in einer Phosphoimager-Box fixiert und mit der entsprechenden, vorher gelöschten Platte bedeckt. Die Exposition dauerte je nach Einbaurate und Strahlung der Arrays 1 – 5 Tage.

Die exponierten Phosphoimager-Platten wurden mit dem Phosphoimager eingelesen (Auflösung 50 Micron) und mit der Software ArrayVision 6.0 ausgewertet.

### **3.9.3 Strippen der Macroarrays**

Je ein Array wurde hierfür in eine Plastikschiessel gelegt und mit 250 ml in der Mikrowelle aufgekochter Stripping Solution übergossen. Nach dem Verschließen der Plastikschiessel wurde diese in einem 85 °C Wasserbad für 15 min inkubiert und in regelmäßigen Abständen etwas geschwenkt. Nach Ablauf der 15 min wurde der gesamte Vorgang mit frischer Stripping Solution wiederholt.

Im Anschluss daran wurde das Macroarray in Folie eingeschweißt, um ein Austrocknen zu verhindern, und bei 4 °C bis zur nächsten Hybridisierung gelagert.

## **3.10 Arbeiten mit Proteinen**

### **3.10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

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

### **3.10.2 Bestimmung von LacZ-Aktivitäten in *B. subtilis* Zellextrakten**

Die Bestimmung der LacZ-Aktivität wurde nach der von Wiegert *et al.* (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden die Bakterienzellen mittels Lysozym aufgeschlossen und die LacZ-Aktivitäten photometrisch durch Spaltung des farblosen Substratanalogons ONPG in ortho-Nitrophenol (gelb) bestimmt. Die Auswertung der Tests erfolgte im Versa<sub>Max</sub> (Molecular Devices tunable microplate reader) bei 405 nm und 28 °C.

### **3.10.3 Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden diskontinuierliche 12- und 15%ige SDS-Polyacrylamid-gele benutzt. Die Elektrophorese erfolgte in Mighty Small II Elektrophorese-Kammern der Firma Amersham Pharmacia bei 100 – 120 V.

#### 3.10.4 Isolierung von Membranfraktionen aus *B. subtilis*

Die Isolierung von Membranfraktionen aus *B. subtilis* erfolgte wie in Schöbel *et. al* (2004) beschrieben. Nach dem Ultraschall-Aufschluss wurde ein Aliquot entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Diese Fraktion wurde als „ganze Zellen (WC)“ bezeichnet. Nach der ersten Ultrazentrifugation wurde ebenfalls ein Aliquot mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und im Folgenden als „Überstand“ bezeichnet. Die isolierten Membranen wurden in 150 µl SDS-Probenpuffer durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert und bei 95 °C ebenfalls 5 min inkubiert. Bis zur Verwendung der einzelnen Fraktionen wurden diese auf Eis bzw. bei -20 °C gelagert.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
100 mM NaCl  
1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche)/10 ml

#### 3.10.5 Western-Blot und immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970) und anschließend mittels Elektroblothing (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981) aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte mittels „Semi-Dry-Blotting“ zwischen Elektrodenplatten in der Fast-Blot-Apparatur der Firma Biorad nach Anweisungen des Herstellers. Nach Immobilisierung von Proteinen an Nitrocellulosemembranen können diese mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Haas *et al.*, 1986). Der Nachweis der spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt durch die Bindung eines sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörpers. Durch Zugabe eines Substrat-Chromogen-Gemisches kommt es zu Chemolumineszenz (Leary *et al.*, 1983).

Die praktische Durchführung des immunologischen Nachweises membrangebundener Proteine wurde, wie unter Homuth *et al.* (1997) beschrieben, durchgeführt. In dieser Arbeit wurden dazu die in den Tabellen 5.1 und 5.2 aufgeführten primären und sekundären Antikörper verwendet. Die Nachweisreaktion durch Meerrettich-Peroxidase erfolgte mit Hilfe des SuperSignal<sup>®</sup>-West-Pico Detektionssystems der Firma Pierce. Der Nachweis der Chemolumineszenz erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL) für bis zu 15 min.

### 3.10.6 Überexpression und Aufreinigung His<sub>6</sub>-getaggtter Proteine aus *E. coli*

Die Überexpression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>-YlaDΔTM und His<sub>6</sub>-YlaDΔTM C33/36A bzw. His<sub>6</sub>-YlaDΔTM C33/36S aus *E. coli* XL1-Blue mit dem pQE30-Expressionssystem erfolgte nach Angaben des Hersteller Qiagen (The Expressionist 6). Während der Expressionsphase wurde 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> zugesetzt. Die Induktion mit 1mM IPTG erfolgte in einem Zeitrahmen von 4 h. Danach wurden die Zellen geerntet, gewaschen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte sowohl nativ als auch denaturierend.

### 3.10.7 Nachweis von Zn<sup>2+</sup> mittels Atomabsorptions-Spektroskopie

Grundlage der Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS) ist die Resonanzabsorption in Gasen. Wird ein polychromatischer Lichtstrahl durch ein atomares Gas geschickt, so wird die Strahlung einer bestimmten Wellenlänge absorbiert, d. h. ein von einem angeregten Atom emittiertes Lichtquant kann von einem nicht angeregten Atom des gleichen Elements absorbiert werden. Als Lichtquelle verwendet man eine Hohlkathodenlampe, die das Spektrum des zu bestimmenden Elements aussendet (hier: Zink). Das so erzeugte Emissionsspektrum wird durch eine Absorptionszone geschickt, in welcher die durch thermische Dissoziation in einer Flamme gebildeten Atome einen Teil des Lichts absorbieren. Zur Atomisierung in der Flamme, die in der Regel aus einem Luft-Acetylen-Gemisch besteht, wird die Probe in Form einer Lösung mit Hilfe eines pneumatischen Zerstäubers versprüht. Das so gebildete Aerosol wird dann mit den Brenngasen vermischt und gelangt in die Flamme, wo die Probe atomisiert wird. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann dann die Konzentration des Elements in der Probe berechnet werden (Wilson, 1991).

In dieser Arbeit wurde das „Atomic Absorption Spectrophotometer 1100B“ der Firma Perkin Elmer verwendet. Der Nachweis von Zinkionen erfolgte mittels einer Zink-spezifischen Hohlkathodenlampe (Lampenstrom 10 mA) bei 213,8 nm. Die verwendete Wellenlänge ist spezifisch für den Nachweis von Zinkionen und interferiert nicht mit Spektren anderer Metallionen. Als Brenngas diente Acetylen mit einer Brenngasrate von 2,5 l/min, Luft wurde als Oxidans verwendet (8,0 l/min). Jede Probe wurde 5-fach gemessen, die Messzeit betrug 0,5 sec. Die zu untersuchenden, nativ aufgereinigten Proteine His<sub>6</sub>-YlaDΔTM und His<sub>6</sub>-YlaDΔTM C33/36A wurden durch Ultrafiltration (Microcon YM<sup>3</sup>, Millipore) auf ein 100 µl-Volumen konzentriert, mit 1 ml Elutionspuffer gewaschen und erneut auf ein 100 µl-Volumen eingengt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Das so gereinigte, konzentrierte Protein wurde nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung

geeignet verdünnt und einer AAS unterzogen. Als Referenz diente in diesem Fall Elutionspuffer ohne Protein. Von sämtlichen Proben wurde vor der eigentlichen Messung die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Der dafür benötigte Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  wurde anhand eines Computerprogramms (PC/GENE) ermittelt und beträgt  $7330 \text{ (} 1000 \text{ cm}^2\text{mol}^{-1}\text{)}$ .

### 3.10.8 Nachweis von freien Zinkionen in Lösung mit [4-(2-Pyridylazo-)Resorcinol]

Da die rekombinanten Proteine mit mutierten Cysteinresten zur Aggregation neigten, wurde ihre Fähigkeit, Zinkionen zu binden, mit einem kolorimetrischen Versuchsansatz mit dem Zink-sensitiven Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)Resorcinol (PAR) getestet. Sowohl das wildtypische Protein His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM als auch die mutanten Proteine His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36A und His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36S wurden unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff) aufgereinigt. Unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Proteine wurden in einem 100-fachen Überschuss an ZnCl<sub>2</sub>-haltigem (2  $\mu$ M) Versuchspuffer (25 mM Hepes, 300 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7,6) rückgefaltet. Dann wurde der Gehalt an ungebundenem Zink in der Lösung unter Zuhilfenahme von PAR ermittelt (Newman *et al.*, 2001). PAR kann nicht an bereits durch Proteine gebundenes Zink binden und reagiert daher nur mit freiem Zink in Lösung. Die Konzentrationen an Protein-gebundenem Zink wurde durch folgende Gleichung berechnet:  $[(E_{490}P_0) - (E_{490}P_x)] \times F$ .

$(E_{490}P_0)$  = Extinktion bei 490 nm ohne Protein

$(E_{490}P_x)$  = Extinktion bei 490 nm mit Protein der Konzentration x

F = Umrechnungsfaktor aus einer Eichgerade mit unterschiedlichen ZnCl<sub>2</sub>-Konzentrationen

### 3.10.9 Pulse-Chase-Experimente

Die "pulse-chase"-Markierung und die nachfolgende Immunopräzipitation wurden im Wesentlichen durchgeführt wie bei Schöbel *et. al* (2004) beschrieben. Jedoch wurden nur 1 ml Gesamtzellen mit 100  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-L-Methionin markiert. Nach 1-minütiger Markierungszeit wurden die Zellen mit einem Überschuss an „kaltem“ L-Methionin (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt. Je 500  $\mu$ l Zellen wurden nach 20 sec, 2, 5 und 20 min entnommen und mit 180  $\mu$ l eiskalter Trichloessigsäure (TCA) vermischt. Das Gemisch aus Zellen und TCA wurde 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (12 000 rpm, 15 min, 4 °C) der Zellen wurden diese mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet in 50  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert und die Zellen durch Einwirkung von Lysozym und SDS aufgeschlossen. Nach erfolgter Zugabe von 950  $\mu$ l IP-Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1

mM DTT, 0,1 % Polydocanol Brj<sup>®</sup> und eine Tablette Complete Protease Inhibitor/10 ml) wurde unlösliches Zellmaterial durch Zentrifugation (12 000 rpm, 15 min, 4 °C) entfernt. Zur Immunopräzipitation wurden zu jedem Ansatz 5 µl polyklonale anti-FLAG Antikörper (Sigma) zugegeben und der Ansatz für 2 h auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 100 µl Pansorbinzellen zugegeben und die Ansätze für 1 h bei RT geschüttelt, um ein Absetzen der Pansorbinzellen zu verhindern. Danach wurden die Pansorbinzellen dreimal mit je 500 µl IP-Puffer gewaschen und in 30 µl SDS-Probenpuffer gelöst und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (s. o.) wurden 10 µl des Überstandes auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach beendeter elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel in 10%iger Essigsäure für 30 min fixiert und im Anschluss daran 1 h in En<sub>3</sub>hance-Lösung von NEN<sup>TM</sup> geschüttelt. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser wurde das Gel 45 min auf einem Slab Dryer der Firma Bio-Rad getrocknet und ein Röntgenfilm wurde für 1 – 7 Tage aufgelegt.

### **3.10.10 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen cMYC-YlaB und FLAG<sub>3</sub>-YlaD**

Um das Protein FLAG<sub>3</sub>-YlaD anzureichern, wurden jeweils 30 ml LB-Medium mit Chloramphenicol mit einer Einzelkolonie der Stämme SZ107, 108, 109, 110 angeimpft und bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Hatten diese Kulturen eine OD<sub>578</sub> von 0,7 erreicht, wurden 2 % Xylose zugegeben. Nach 1 h wurden die Zellen abzentrifugiert und in eiskaltem Aufschlusspuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5 und 1 Tablette Complete-Protease-Inhibitor (Roche) auf 10 ml) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall (6 x 15 Pulse mit je 45 sec Pause zwischen den Serien) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation (5 000 g, 15 min, 4 °C) abgetrennt. Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Überstand der aufgeschlossenen Zellen wurden gleiche Proteinmengen einer Ultrazentrifugation (45 000 rpm, 60 min, 4 °C) unterzogen. Das daraufhin erhaltene Membranpellet wurde mit 500 µl Aufschlusspuffer gewaschen und erneut 30 min ultrazentrifugiert. Das nun gewaschene Membranpellet wurde in IP-Puffer (Aufschlusspuffer mit 0,1 % Brij) 15 min auf Eis solubilisiert und anschließend erneut für 1 h ultrazentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 Affinity Gel (3x in IP-Puffer gewaschen) wurde der Überstand nach der Ultrazentrifugation für 60 min bei 4 °C auf einem Rotationschüttler (200 rpm) inkubiert, um eine Bindung der FLAG-Agarose an FLAG-getaggte Proteine zu ermöglichen. Danach wurde die FLAG-Agarose abzentrifugiert und wiederum 3x mit IP-Puffer gewaschen. Dann wurde die FLAG-Agarose in 100 µl IP-Puffer + 2 % SDS resuspendiert und für 5 min bei 95 °C

inkubiert. Nach Abkühlung wurde die FLAG-Agarose abzentrifugiert, der Überstand entnommen, mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt und erneut 5 min bei 95 °C inkubiert. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden auf eine 15%iges SDS-Gel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben einem Western-Blot unterzogen. Die Western-Blots wurden im weiteren Verlauf mit Antikörpern gegen den FLAG-Epitoptag und gegen den Myc-Epitoptag inkubiert.

### 3.11 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

Um mögliche direkte Wechselwirkungen zwischen dem ECF-Sigmafaktor YlaC und seinem zugehörigen Anti-Sigmafaktor YlaD nachzuweisen, wurde das „Matchmaker GAL4 Two-Hybrid system 3“ der Firma Clontech verwendet. Die Vorgehensweise entsprach dabei genau den Angaben des Herstellers mit der Ausnahme, dass ein Derivat des Plasmids pGBKT7 verwendet wurde. Dieses Derivat (pGBKT7-Spe) enthält eine singuläre *SpeI*-Schnittstelle direkt vor dem ATG Startcodon der GAL4 DNA-Bindungsdomäne (GAL4 DB), wodurch die Konstruktion eines Fusionsproteins aus dem cytoplasmatischen Teil von YlaD und GAL4 DB ermöglicht wurde.

### 3.12 Konstruktion von Plasmiden

Der folgende Abschnitt enthält die Konstruktionsbeschreibung sämtlicher in dieser Arbeit erstellten Plasmide. Der Ausgangsvektor und die DNA-Fragmente, die alle mit ausgewählten Oligonukleotiden sowie geeigneten Matrizen amplifiziert worden sind, wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Beim Ausgangsplasmid wurden nach der Hydrolyse gegebenenfalls die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, falls es sich bei der nachfolgenden Ligation um einen ungerichteten Einbau des Fragments handelte. Alle DNA-Fragmente wurden mit dem QiaQuick PCR-Purification Kit bzw. mit dem QiaexII Gel Extraction-Kit der Firma Qiagen gereinigt. Nach der Ligation mit dem „Fast Link DNA Ligation Kit“ (BIOzym) erfolgte die Transformation der ligierten DNA in *E. coli*. Dafür wurden die *E. coli* Stämme JM109, JM110, DH10B und XL1-Blue verwendet. Als Negativkontrolle diente ein hydrolysiertes Vektor ohne DNA-Fragment. Die Transformanten wurden zur Selektion auf entsprechende antibiotikahaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab bzw. über Kolonie-PCR konnte die Aufnahme des Plasmids überprüft werden. Von positiven Klonen wurde anschließend DNA im mittleren Maßstab (Midiprep) isoliert und das neukonstruierte

Plasmid nochmals über Hydrolyse mit mindesten 6 geeigneten Restriktionsendonukleasen, welche Schnittstellen sowohl im Vektor als auch im integrierten Fragment erkannten, überprüft. Zusätzlich wurden alle Plasmide durch DNA-Sequenzierungen, welche von der Firma Seqlab (Hot Shot, Extended Hot Shot) durchgeführt wurden, verifiziert. Die Klonierung aller während dieser Arbeit erstellten Plasmide zeigt Tabelle 8.

**Tab. 8:** Tabellarisches Klonierungsschema für während dieser Arbeit konstruierter Plasmide.

<b>konstruiertes Plasmid</b>	<b>Ausgangsvektor (verdaut mit)</b>	<b>Matrize für Insert</b>	<b>Primer für PCR-Amplifikation des Inserts</b>	<b>Größe des Fragments (bp)</b>
<b>pX2<math>ylaA</math></b>	pX2 ( <i>Bam</i> HI)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaA_pX25' ylaA_pX23'	427
<b>pP<math>ylaA</math></b>	pLacZ ( <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaA_placZ5' ylaA-pLacZ3'	310
<b>pBR<math>ylaDdel</math></b>	pBR322 ( <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	pUC $ylaD\_EcoRV$ 5' pUC $ylaD\_HindIII$ 3'	508
			pUC $ylaD\_EcoRV$ 3' pUC_ylaD_korr. <i>Bam</i> HI	531
<b>pBR<math>ylaD::spec</math></b>	pBR $ylaDdel$ ( <i>EcoRV</i> ; CIP)	chromosomale DNA <i>B. subtilis clpP::spec</i>	spec_ <i>EcoRV</i> 5' spec_ <i>EcoRV</i> 3'	1154
<b>pA-spac-<math>ylaD</math></b>	pA-spac ( <i>Sal</i> I, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylad_5'rbs ylad_3'rbs	334
<b>pALF<math>_3ylaD</math></b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	paxylad5 ylad_3'rbs	301
<b>pALF<math>_3ylaC</math></b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	pAL $ylaCD$ 5 pAL $ylaC$ 3	538
<b>pALF<math>_3ylaB</math></b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaBCD5 F3 $ylaB$ 3	282
<b>pALF<math>_3rsiX</math></b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	rsiX5'FLAG rsiX3'FLAG	1117
<b>pALF<math>_3rsiX70</math></b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	rsiX5'FLAG rsiX70_3	223
<b>pALF<math>_3yrhM62</math></b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	yrhM62_5 yrhM62_3	199

<b>konstruiertes Plasmid</b>	<b>Ausgangsvektor (verdaut mit)</b>	<b>Matrize für Insert</b>	<b>Primer für PCR-Amplifikation des Inserts</b>	<b>Größe des Fragments (bp)</b>
<b>pALF<sub>3</sub>yhdL96</b>	pALF01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	yhdL96_5 yhdL96_3	301
<b>pQEylaD<math>\Delta</math>TM</b>	pQE30 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaD_pQE30_5 ylaD_pQE30_3	234
<b>pQEylaD-CA<math>\Delta</math>TM</b>	pQE30 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaD_pQE30_5 mega3ALA ylaD_pQE30_3	234
<b>pQEylaD-CS<math>\Delta</math>TM</b>	pQE30 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaD_pQE30_5 mega3SER ylaD_pQE30_3	234
<b>pOPERylaA</b>	pBR322 ( <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaA_oper5 ylaA_oper3	3306
<b>pOPERylaAdel</b>	pOPERylaA ( <i>Bsp</i> TI, <i>Pst</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> <i>ftsH::cat</i>	CAT5_BspTI CAT3_PstI	970
<b>pALylaABCD1</b>	pAL01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaABCD5 ABCD1_3	1857
<b>pALylaABCD</b>	pALylaABCD1 ( <i>Nsi</i> I, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ABCD2_5 ylad_3'rbs	1171
<b>pALylaBCD</b>	pAL01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaBCD5 ylad_3'rbs	1091
<b>pALylaBC</b>	pAL01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaBCD5 pALylaC3	801
<b>pALylaCD</b>	pAL01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	pALylaCD5 ylad_3'rbs	822
<b>pALylaC</b>	pAL01 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	pALylaCD5 pALylaC3	532
<b>pDGgfpylaD</b>	pDGgfp ( <i>Bgl</i> II; CIP)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	paxylad5 gfpylaD3	333
<b>pXGFPylaD</b>	pX ( <i>Bam</i> HI; CIP)	Plasmid-DNA pDGgfpylaD	gfp_BglII_5 F3ylaDBglII3	1043

konstruiertes Plasmid	Ausgangsvektor (verdaut mit)	Matrize für Insert	Primer für PCR-Amplifikation des Inserts	Größe des Fragments (bp)
pXcMycylaBC	pX ( <i>Bam</i> HI; CIP)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	cMycylaBC5 cMycylaBC3	818
pXcMycylaBC- F <sub>3</sub> ylaD	pXcMycylaBC ( <i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI)	pALF <sub>3</sub> ylaD	F3ylaDRBS5 F3ylaDBgIII3	363
pXcMcyylaBC- GFPylaD	pXcMycylaBC ( <i>Bam</i> HI; CIP)	pXGFPylaD	RBS_GFPylaD5 F3ylaDBgIII3	1048
pGBKT7spe- ylaD'	pGBKT7spe ( <i>Spe</i> I; CIP)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	Y2H_ylaD5 Y2H_ylaD3	237
pGADT7-ylaC	pGADT7 ( <i>Bg</i> III, <i>Xho</i> I)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	Y2H_ylaC5 Y2H_ylaC3	527
pXylaB	pX ( <i>Bam</i> HI; CIP)	chromosomale DNA <i>B. subtilis</i> 1012	ylaBCD5 pX_ylaB3'	288

### 3.13 Konstruktion von Bakterienstämmen

#### 3.13.1 Konstruktion von *B. subtilis* SZ70

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* Zellen *amyE::cat lacA::spec* mit *pylaA-lacZ* Plasmid-DNA transformiert. Da dieses Plasmid in *B. subtilis* nicht stabil repliziert wird, wird das gewünschte DNA-Fragment über homologe Rekombination in den *amyE*-Lokus von *B. subtilis* integriert, wodurch das vorhandene Chloramphenicol-Resistenzgen verloren geht und zusammen mit dem gewünschten Fragment ein Neomycin-Resistenzgen eingefügt wird. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Neomycin. Positive Transformanten wurden nochmals auf Neomycin- und Chloramphenicol- und Spectinomycin-Selektivmedium getüpfelt, um einen Verlust des Chloramphenicol-Resistenzgens zweifelsfrei festzustellen und somit ein Single-Crossover-Ereignis auszuschließen. Chromosomale DNA des Stammes wurde isoliert und durch PCR mit geeigneten Primern überprüft.

#### 3.13.2 Konstruktion von *B. subtilis* SZ71

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis lacA::spec* Zellen mit pA-spac-*ylaD* Plasmid-DNA transformiert. Da dieses Plasmid in *B. subtilis* nicht stabil repliziert

wird, wird das gewünschte DNA-Fragment über homologe Rekombination in den *lacA*-Lokus von *B. subtilis* integriert, wodurch das vorhandene Spectinomycin-Resistenzgen verloren geht und zusammen mit dem gewünschten Fragment ein Erythromycin-Resistenzgen eingefügt wird. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Erythromycin. Positive Transformanten wurden nochmals auf Erythromycin- und Spectinomycin-Selektivmedium getüpfelt, um einen Verlust des Spectinomycin-Resistenzgens zweifelsfrei festzustellen und somit ein Single-Crossover-Ereignis auszuschließen. Chromosomale DNA des Stammes wurde isoliert und durch PCR mit geeigneten Primern auf Integrität überprüft.

### **3.13.3 Konstruktion von *B. subtilis* SZ72**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis amyE::cat* Zellen mit *pylaA-lacZ* Plasmid-DNA transformiert. Da dieses Plasmid in *B. subtilis* nicht stabil repliziert wird, wird das gewünschte DNA-Fragment über homologe Rekombination in den *amyE*-Lokus von *B. subtilis* integriert, wodurch das vorhandene Chloramphenicol-Resistenzgen verloren geht und zusammen mit dem gewünschten Fragment ein Neomycin-Resistenzgen eingefügt wird. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Neomycin. Positive Transformanten wurden nochmals auf Neomycin- und Chloramphenicol-Selektivmedium getüpfelt, um einen Verlust des Chloramphenicol-Resistenzgens zweifelsfrei festzustellen und somit ein Single-Crossover-Ereignis auszuschließen. Chromosomale DNA des Stammes wurde isoliert und durch PCR mit geeigneten Primern und mittels Southern-Blot auf Integrität überprüft.

### **3.13.4 Konstruktion von *B. subtilis* SZ73**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* 1012 Zellen mit *pX2ylaA* Plasmid-DNA transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Chloramphenicol. Chromosomale DNA des Stammes wurde isoliert und durch PCR mit geeigneten Primern und mittels Southern-Blot auf Integrität überprüft. Zusätzlich wurde die Induzierbarkeit des *ylaA*-Operons durch Xylose in einem Northern-Blot überprüft.

### **3.13.5 Konstruktion von *B. subtilis* SZ74**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis lacA::spec* Zellen mit *pA-spac-ylaD* Plasmid-DNA transformiert. Da dieses Plasmid in *B. subtilis* nicht stabil repliziert wird, wird das gewünschte DNA-Fragment über homologe Rekombination in den *lacA*-Lokus von *B. subtilis* integriert, wodurch das vorhandene Spectinomycin-Resistenzgen verloren geht

und zusammen mit dem gewünschten Fragment ein Erythromycin-Resistenzgen eingefügt wird. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Erythromycin. Positive Transformanten wurden nochmals auf Erythromycin- und Spectinomycin-Selektivmedium getüpfelt, um einen Verlust des Spectinomycin-Resistenzgens zweifelsfrei festzustellen und somit ein Single-Crossover-Ereignis auszuschließen. Chromosomale DNA des Stammes wurde isoliert und durch PCR mit geeigneten Primern und mittels Southern-Integrität überprüft. Zusätzlich wurde die Induzierbarkeit des *ylaD*-gens durch IPTG in einem Northern-Blot überprüft.

#### **3.13.6 Konstruktion von *B. subtilis* SZ75**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* 1012 Zellen mit einem PCR-amplifizierten Fragment transformiert. Als Matrize diente das Plasmid pBR*ylaD::spec* von dem mit den Primern pUC*ylaD\_HindIII3'* und pUC\_*ylaD\_korr*.BamHI ein 2172 bp langes PCR-Fragment amplifiziert wurde. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Spectinomycin. Chromosomale DNA positiver Klone wurde mittels PCR und Southern-Blot auf Integrität überprüft.

#### **3.13.7 Konstruktion von *B. subtilis* SZ76**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* SZ72 Zellen mit chromosomaler DNA von *B. subtilis* SZ73 transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Neomycin und Chloramphenicol. Chromosomale DNA dieses Stammes wurde im Southern-Blot überprüft.

#### **3.13.8 Konstruktion von *B. subtilis* SZ77**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* SZ76 Zellen mit chromosomaler DNA des Stammes *B. subtilis* SZ75 transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Neomycin, Chloramphenicol und Spectinomycin. Chromosomale DNA dieses Stammes wurde durch PCR mit geeigneten Primern und mittels Southern-Blot-Analyse überprüft.

#### **3.13.9 Konstruktion von *B. subtilis* SZ78, SZ78A**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* SZ77 Zellen mit chromosomaler DNA des Stammes *B. subtilis* SZ71 bzw. SZ80 transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Neomycin, Chloramphenicol, Spectinomycin

und Erythromycin. Chromosomale DNA dieses Stammes wurde durch Southern-Blot überprüft.

#### **3.13.10 Konstruktion von *B. subtilis* SZ79, SZ96A**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* SZ77 bzw. SZ96 Zellen mit chromosomaler DNA des Stammes *B. subtilis yluC::tet* transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Neomycin, Chloramphenicol, Spectinomycin und Tetracyclin. Chromosomale DNA dieses Stammes wurde durch Southern-Blot und PCR überprüft.

#### **3.13.11 Konstruktion von *B. subtilis* SZ80, SZ83, SZ85, SZ87, SZ89, SZ91, SZ104**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente *B. subtilis lacA::spec* Zellen mit den entsprechenden Plasmid-DNAs transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Erythromycin. Positive Transformanten wurden nochmals auf Erythromycin- und Spectinomycin-Selektivmedium getüpfelt, um einen Verlust des Spectinomycin-Resistenzgens zweifelsfrei festzustellen und somit ein Single-Crossover-Ereignis auszuschließen.

#### **3.13.12 Konstruktion von *B. subtilis* SZ81, SZ84, SZ86, SZ88, SZ90, SZ92, SZ107, SZ109, SZ111**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente *B. subtilis*-Zellen der jeweiligen Stämme, SZ80, SZ83, SZ85, SZ87, SZ89, SZ91, SZ105, SZ108, SZ110 mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis yluC::tet* transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Tetracyclin. Die weiteren Resistenzen der Stämme wurden durch Tüpfeln auf die entsprechenden Selektivmedien überprüft.

#### **3.13.13 Konstruktion von *B. subtilis* SZ93**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis* 1012 Zellen mit einem PCR-amplifizierten Fragment transformiert. Als Matrize für die PCR diente das Plasmid pOPERylAAdel mit den Primern Nr. 56 und 57. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Chloramphenicol. Chromosomale DNA positiver Klone wurde im Southern-Blot überprüft.

**3.13.14 Konstruktion von *B. subtilis* SZ94, SZ94A**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis*-Zellen SZ72 und SZ70 mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis* SZ93 transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Chloramphenicol und Neomycin und Spectinomycin.

**3.13.15 Konstruktion von *B. subtilis* SZ95, SZ96, SZ97, SZ98 und SZ99**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente Zellen *B. subtilis* SZ70 mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis* SZ93 transformiert. Positive Transformanten wurden auf Selektivmedien mit Chloramphenicol, Neomycin und Spectinomycin überprüft. Von diesem Stamm wurden dann kompetente Zellen hergestellt und mit Plasmid-DNA (pALy $laC$  / SZ95), (pALy $laCD$  / SZ96), (pALy $laBCD$  / SZ97), (pALy $laABCD$  / SZ98) und (pALy $laBC$  / SZ99) transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Erythromycin, Chloramphenicol und Neomycin. Zusätzlich wurde auch der Verlust der Spectinomycin-Resistenz überprüft. Positive Transformanten wurden mittels Southern-Blot verifiziert.

**3.13.16 Konstruktion von *B. subtilis* SZ100, SZ100A, SZ101, SZ102 und SZ103**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente Zellen *B. subtilis lacA::spec* (für SZ100) und *B. subtilis* SZ70 mit Plasmid-DNA (pALy $laC$  / SZ100), (pALy $laCD$  / SZ101), (pALy $laBCD$  / SZ102) und (pALy $laBC$  / SZ103) transformiert. Positive Transformanten wurden auf Selektivmedien mit Erythromycin und Neomycin überprüft. Zusätzlich wurde auch der Verlust der Spectinomycin-Resistenz verifiziert.

**3.13.17 Konstruktion von *B. subtilis* SZ104**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente Zellen *B. subtilis lacA::spec* mit Plasmid-DNA pALF $_3$ -y $laB$  (SZ104) bzw. pALF $_3$ -y $laC$  transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf Selektivmedium mit Erythromycin. Durch Tüpfeln der Transformanten auf Medium mit Erythromycin und Spectinomycin wurde der Verlust der Spectinomycin-Resistenz überprüft.

**3.13.18 Konstruktion von *B. subtilis* SZ105**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente *B. subtilis amyE::neo* mit Plasmid-DNA pXGFP-y $laD$  transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedium mit Erythromycin und Neomycin.

tivmedien mit Chloramphenicol. Zusätzlich wurde der Verlust der Neomycin-Resistenz überprüft. Die Xylose-regulierte Expression von GFP-YlaD wurde im Western-Blot überprüft.

### **3.13.19 Konstruktion von *B. subtilis* SZ106, SZ107 und SZ108**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente Zellen *B. subtilis* SZ105 mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis* SZ104 (SZ106), *yluC::tet* (SZ107) und *clpP::spec* (SZ108) transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Erythromycin, Tetracyclin und Spectinomycin. Die als positiv identifizierten Transformanten wurden auf Selektivmedien mit Chloramphenicol und respektive Erythromycin, Tetracyclin oder Spectinomycin getüpfelt.

### **3.13.20 Konstruktion von *B. subtilis* SZ109, SZ111 und SZ113**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente Zellen *B. subtilis amyE::neo* mit Plasmid-DNA pXcMyc-*ylaBC-F<sub>3</sub>ylaD* (SZ109), pXcMyc-*ylaBC* (SZ111) und pX-cMyc-*ylaBC-GFPylaD* (SZ113) transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Chloramphenicol. Ebenso wurde der Verlust der Neomycin-Resistenz überprüft. Die Xylose-regulierte Expression von Myc-YlaB bzw. Flag<sub>3</sub>-YlaD wurde im Western-Blot überprüft.

### **3.13.21 Konstruktion von *B. subtilis* SZ110 und SZ112**

Zur Konstruktion dieser Stämme wurden kompetente Zellen *B. subtilis* SZ109 und SZ111 mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis yluC::tet* transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Selektivmedien mit Tetracyclin und Chloramphenicol. Die Xylose-regulierte Expression von Myc-YlaB bzw. Flag<sub>3</sub>-YlaD wurde im Western-Blot überprüft.

### **3.13.22 Konstruktion von *B. subtilis* SZ114**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente Zellen *B. subtilis lacA::spec* mit Plasmid-DNA pALF3-*ylaC* transformiert. Positive Transformanten wurden auf Selektivmedium mit Erythromycin selektiert und auf den Verlust der Spectinomycin-Resistenz überprüft.

### **3.13.23 Konstruktion von *B. subtilis* SZ115**

Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente Zellen *B. subtilis* SZ111 mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis* SZ114 transformiert. Positive Transformanten wurden auf Selektivmedien mit Erythromycin und Chloramphenicol überprüft.

**3.13.24 Konstruktion von *B. subtilis* SZ116**

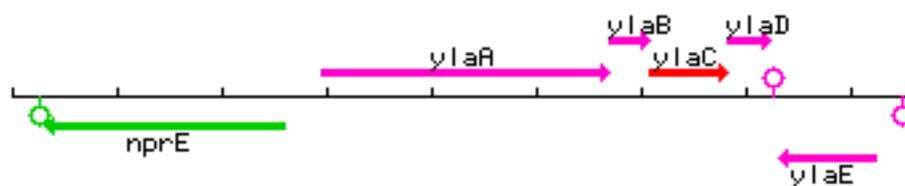
Zur Konstruktion dieses Stammes wurden kompetente Zellen *B. subtilis* SZ70 gleichzeitig mit Plasmid-DNA pALy $laC$  und pXy $laB$  transformiert. Positive Transformanten wurden auf Selektivmedien mit Erythromycin und Chloramphenicol überprüft. Auf den Verlust der Neomycin- und Spectinomycin-Resistenz wurde ebenfalls getestet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das *ylaA*-Operon aus *B. subtilis*

#### 4.1.1 Aufbau des für den ECF- $\sigma$ -Faktor YlaC kodierenden *ylaA*-Operons

Im Rahmen des internationalen Genomsequenzierungsprojekts wurden sieben der siebzehn  $\sigma$ -Faktoren in *B. subtilis* als ECF- $\sigma$ -Faktoren identifiziert (Kunst *et al.*, 1997). Die Konstruktion von Null-Mutanten dieser sieben ECF-Sigmafaktoren lieferte nur wenige Erkenntnisse, welche Rückschlüsse bezüglich ihrer Funktion zuließen, da die Mutanten keinen charakteristischen Phänotyp aufwiesen. Aufgrund dessen konnte eine Beteiligung an mittlerweile detailliert untersuchten Prozessen wie Sporenbildung, Hitzeschockantwort und der allgemeinen Stressantwort nahezu ausgeschlossen werden (Helmann, 2002). Durch Sequenzanalysen wurde dem, auf das Gen des potentiellen ECF- $\sigma$ -Faktors YlaC folgenden Gen (*ylaD*), die Funktion eines möglichen Anti-Sigmafaktors zugeordnet. Ähnlich wie bei dem ECF- $\sigma$ -Faktor SigW und seinem Anti-Sigmafaktor RsiW aus *B. subtilis* sind auch hier die beiden Gene *ylaC* und *ylaD* translational gekoppelt. Über die Regulation und Funktion des *ylaA*-Operons ist bislang nichts bekannt. In Abbildung 9 ist ein schematischer Aufbau der chromosomalen Region aus *B. subtilis* gezeigt, in der  $\sigma^{\text{YlaC}}$  liegt.

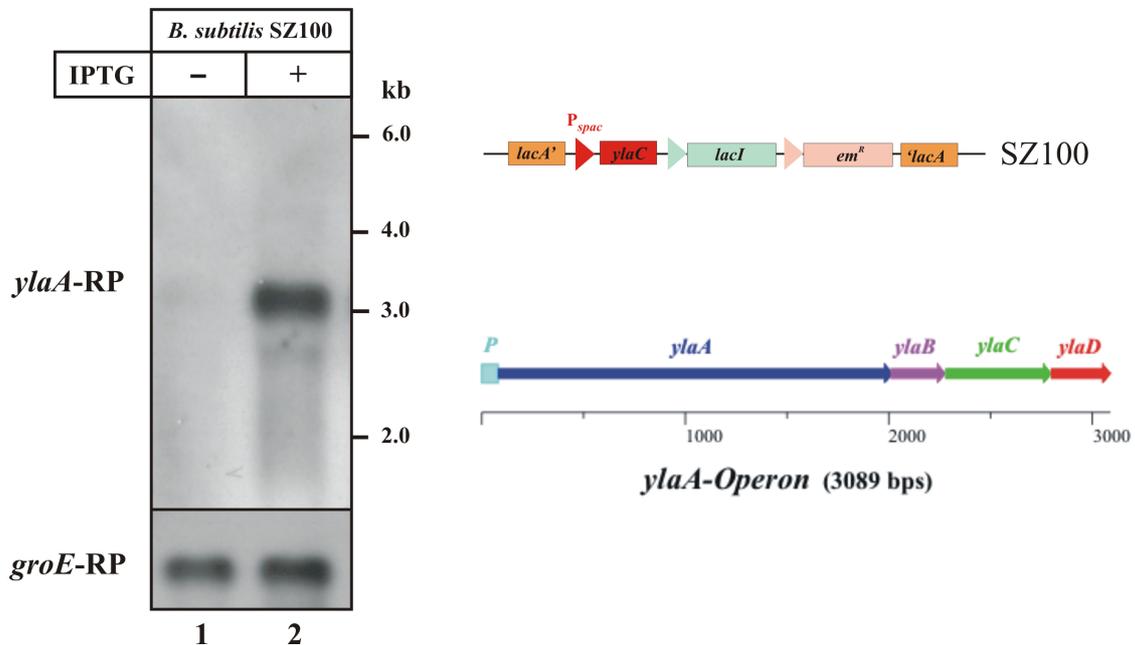


**Abb. 9:** Schematischer Aufbau der chromosomalen Region aus *B. subtilis*, welche das Gen für den ECF-Sigmafaktor *ylaC* enthält. Transkriptions-Terminatoren sind durch  $\text{⊡}$ -Symbole dargestellt.

#### 4.1.2 $\sigma^{\text{YlaC}}$ liegt in einem tetracistronischen, autoregulierten Operon

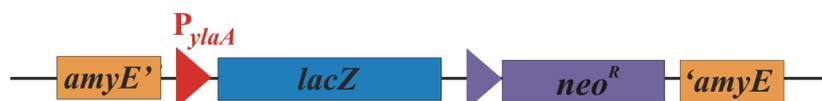
Aufgrund obiger Abbildung könnte der ECF- $\sigma$ -Faktor YlaC in einem tetracistronischen Operon liegen. Um dies zu überprüfen, wurde Gesamt-mRNA während verschiedener Wachstumsphasen aus *B. subtilis* 1012 isoliert, im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, geblottet und mit einer DIG-markierten mRNA-Riboprobe-Sonde gegen das *ylaC*-Gen hybridisiert. In keiner Wachstumsphase konnte ein Signal eines *ylaC*-Transkriptes detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde ein *B. subtilis*-Stamm konstruiert, der ektopisch im *lacA*-Lokus eine IPTG-regulierte Kopie des *ylaC*-Gens enthielt (*B. subtilis* SZ100). Auch von diesem *B. subtilis*-Stamm wurde Gesamt-mRNA sowohl in An- als auch in Abwesenheit von IPTG isoliert. Nach Auftrennung im denaturierenden Agarosegel und dem

Transfer der RNA mittels Vakuum auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer DIG-markierten Riboprobe-Sonde gegen das *ylaA*-Gen hybridisiert. Das Ergebnis dieses Northern-Blots zeigt Abbildung 10. Als Ladungskontrolle wurde ein gleichermaßen durchgeführter Northern-Blot mit einer DIG-markierten RP-Sonde gegen *groE* hybridisiert.



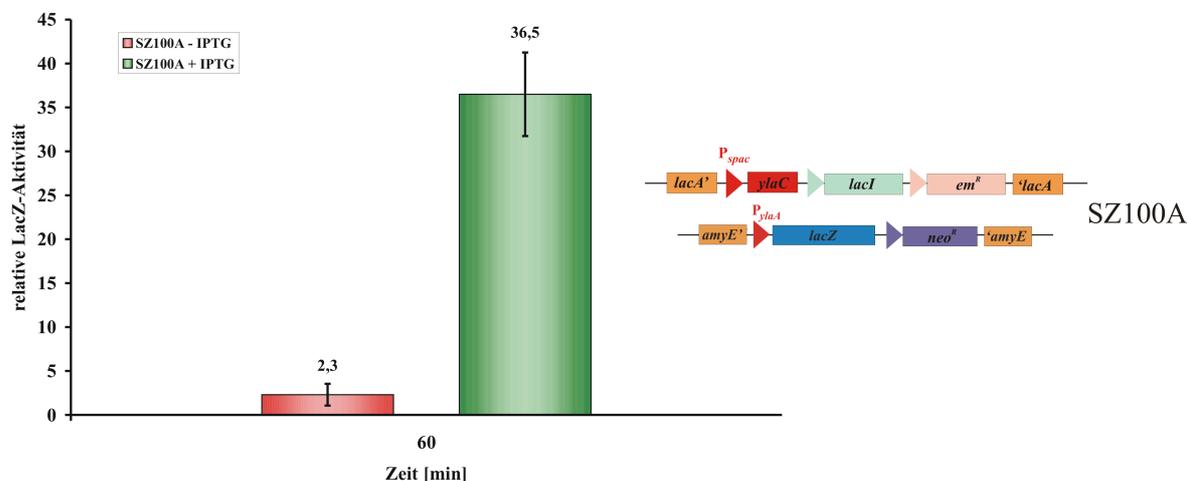
**Abb. 10:** Luminogramm des Northern-Blots mit *B. subtilis* SZ100. Aufgetragen wurden je 2 µg Gesamt-mRNA pro Spur. Von *B. subtilis* SZ100 wurde mRNA aus einer Kultur ohne (Spur 1) und mit 1 mM IPTG (Spur 2) aufgetragen. Zwei identische Blots wurden je mit einer RP-mRNA-Sonde gegen *ylaA* (oben) und gegen *groE* (unten) hybridisiert. Rechts oben: Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ100. Rechts unten: Schematischer Aufbau des *ylaA*-Operons, wobei das „P“ den Promotor symbolisiert. Das gesamte Operon hat eine Größe von ca. 3100 Basenpaaren.

Abbildung 10 zeigt deutlich, dass ohne IPTG-Zugabe kein Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons detektiert werden kann (Spur 1). Nach der Zugabe von IPTG wird ein Transkript von ca. 3,1 kb sichtbar (Spur 2). Damit konnte einerseits gezeigt werden, dass *ylaC* tatsächlich in einem tetracistronischen Operon liegt, da die Transkriptgröße von 3,1 kb die Größe der Gene *ylaA*, *ylaB*, *ylaC* und *ylaD* widerspiegelt. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass das *ylaA*-Operon autoreguliert ist, da erst durch Überexpression des ECF-Sigmafaktors YlaC (IPTG-reguliert) ein Transkript des *ylaA*-Operons detektiert werden kann. Zur weiteren Untersuchung der Stressinduktion bzw. der Regulation des *ylaA*-Operons wurde eine Reporterfusion konstruiert, in welcher der *ylaA*-Promotor ( $P_{ylaA}$ ) an das *lacZ*-Gen fusioniert wurde (Abbildung 11a).



**Abb. 11a:** Reporterfusion zwischen dem *ylaA*-Promotor und dem *lacZ*-Gen, integrierbar ins *B. subtilis*-Chromosom.

*B. subtilis* SZ100A enthält neben der IPTG-regulierbaren Kopie von *ylaC* die o. e. Reporterfusion, wodurch der Einfluss der IPTG-kontrollierten Expression von *ylaC* durch die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ermittelt werden konnte (Abbildung 11b).

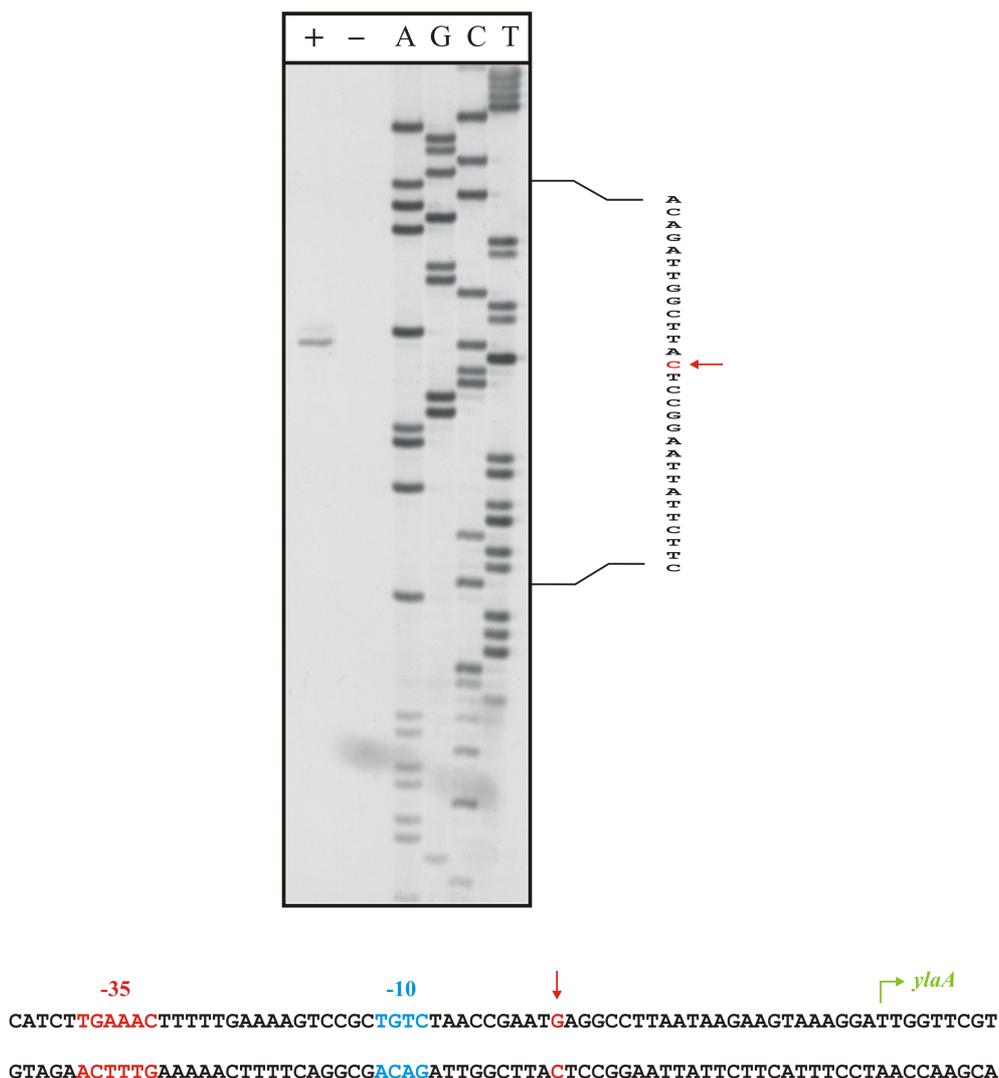


**Abb. 11b:** LacZ-Aktivitätstest mit *B. subtilis* SZ100A. Die LacZ-Aktivität wurde 60 min nach IPTG-Zugabe [1 mM] bestimmt (+IPTG). Eine Kultur blieb als Kontrolle unbehandelt (-IPTG). Fehlerbalken entsprechen den ermittelten Werten der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler (links). Schematische Darstellung der ausschlaggebenden chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ100A (rechts).

Die LacZ-Aktivitätsmessungen mit *B. subtilis* SZ100A bestätigten die Autoregulation. Wird nach IPTG-Zugabe der ECF-Sigmafaktor YlaC gebildet, so kann 60 min nach Induktion der *ylaC*-Transkription eine um den Faktor 16 erhöhte LacZ-Aktivität, ausgehend von einer *ylaA-lacZ*-Transkriptionsfusion, gemessen werden.

#### 4.1.3 Kartierung des Transkriptions-Startpunkts des *ylaA*-Operons

Durch Primer-Extension-Analyse sollten der Transkriptions-Startpunkt und die Sequenz des bis dato noch nicht identifizierten *ylaA*-Promotors ermittelt werden. Zur Durchführung dieses Experiments wurde der *B. subtilis*-Stamm SZ100 verwendet. Dieser Stamm enthält, wie bereits unter 4.1.2 erwähnt, eine durch IPTG-Zugabe induzierbare Kopie des *ylaC*-Gens im *lacA*-Lokus (Abbildung 10 rechts oben). Für die Primer-Extension-Analyse wurde Gesamt-mRNA aus *B. subtilis* SZ100 isoliert, mit und ohne Zugabe von 1mM IPTG. Für die zugehörige Sequenzierreaktion wurde pP<sub>ylaA</sub>-Plasmid-DNA verwendet. Dieses Plasmid enthält ein DNA-Fragment, welches den Promotor des *ylaA*-Operons beinhaltet. Zusätzlich sind auch noch 100 Basen vom Beginn des *ylaA*-Gens enthalten. Das Ergebnis der Bestimmung des Transkriptions-Startpunkts des *ylaA*-Operons wird in Abbildung 12 gezeigt.

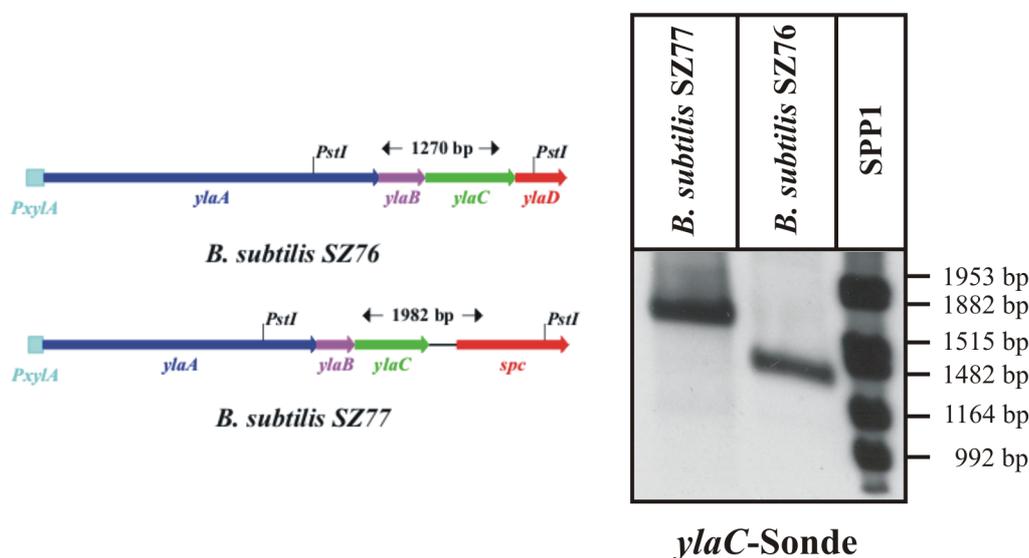


**Abb. 12:** Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des Transkriptions-Startpunkts des *ylaA*-Operons. Mit je 2 µg Gesamt-RNA aus *B. subtilis* SZ100, 60 min nach Induktion der *ylaC*-Transkription durch IPTG (+) bzw. ohne IPTG-Induktion (-) wurde eine Primer-Extension-Analyse ausgehend vom Primer PEXylaA durchgeführt. Der ermittelte Transkriptions-Startpunkt ist mit einem Pfeil markiert. Unter A, G, C und T sind die Dideoxy-Sequenzierungsreaktionen für die jeweiligen Basen ausgehend vom Plasmid pPylaA und dem Primer PEXylaA gezeigt. Unter den experimentellen Daten ist zunächst der ermittelte Transkriptions-Startpunkt sowie die potentielle -10- und -35-Region des Promotors und das Startcodon des *ylaA*-Operons (TTG) in der Sequenz dargestellt.

Durch die Primer-Extension-Analyse konnte der Transkriptions-Startpunkts des *ylaA*-Operons bestimmt werden, der 24 Basen stromaufwärts des Translationsstarts TTG liegt. Zudem konnte die bislang noch nicht experimentell bestimmte Sequenz des *ylaA*-Promotors ermittelt werden.

#### 4.1.4 YlaD wirkt als Anti-Sigmafaktor von $\sigma^{YlaC}$

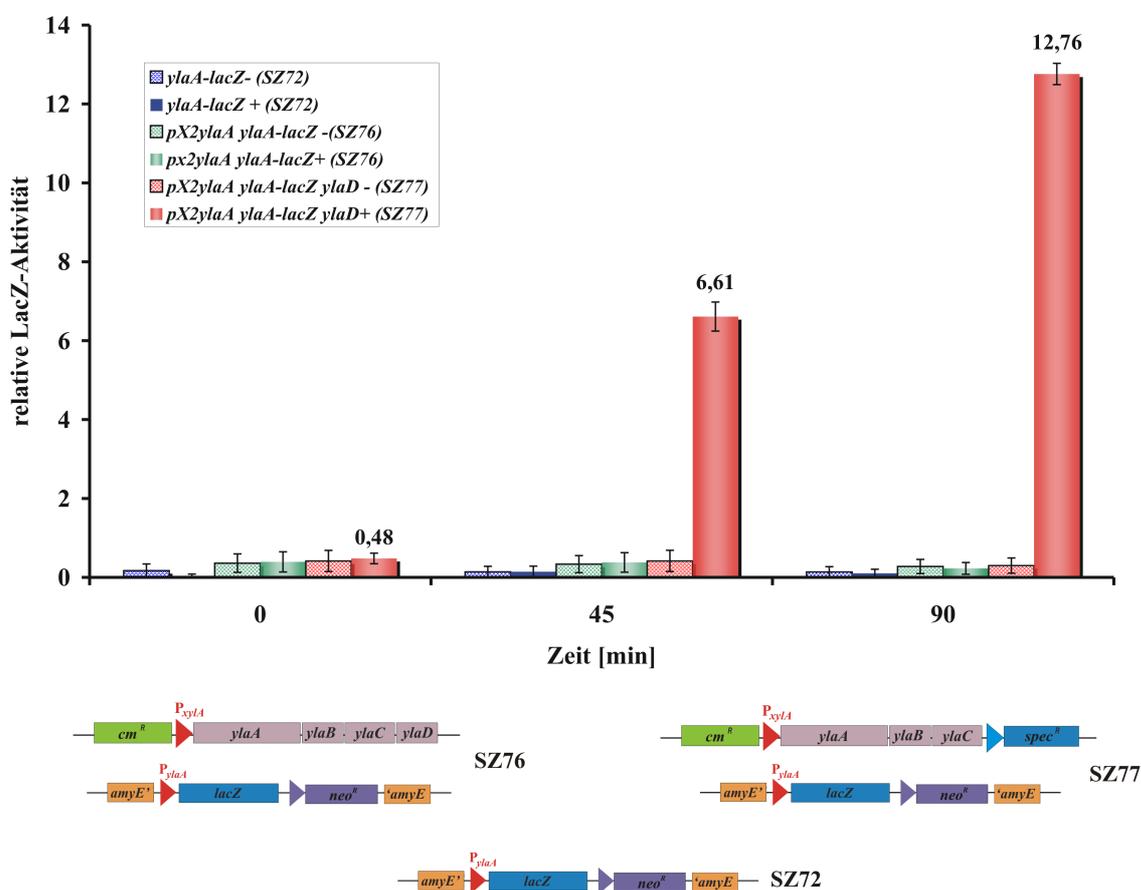
Um die Funktion des downstream von *ylaC* gelegenen Gens, *ylaD*, zu untersuchen, wurde ein Reportersystem konstruiert, mit dem der Einfluss von *ylaD* auf die Expression von *ylaC* durch LacZ-Aktivitätstests ermittelt werden konnte. Dies war notwendig, da unter Standardbedingungen kein Transkript des *ylaA*-Operons detektiert werden konnte. In einem ersten Schritt wurde ein Stamm (*B. subtilis* SZ76) konstruiert, in dem der Promotor des *ylaA*-Operons durch einen Xylose-regulierbaren Promotor ersetzt wird, und der die bereits unter 4.1.2 beschriebene *ylaA-lacZ* Transkriptionsfusion enthielt. Zusätzlich wurde in einem weiteren Stamm (*B. subtilis* SZ77) das als Anti-Sigmafaktor postulierte *ylaD*-Gen durch ein Spectinomycin-Resistenzgen ersetzt. Chromosomale DNA beider Stämme wurde im Southern-Blot überprüft (Abbildung 13).



**Abb. 13:** Abbildung der chromosomalen Organisation der Stämme SZ76 und SZ77 mit Fragmentgrößen nach Verdau mit *PstI* (links). Luminogramm des Southern-Blots der Stämme SZ76 und SZ77 detektiert mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das *ylaC*-Gen.

Wird die chromosomale DNA aus beiden Stämmen mit dem Restriktionsenzym *PstI* verdaut, so ergibt sich aufgrund der größeren Spectinomycin-Resistenzkassette in *B. subtilis* SZ77 ein größeres Fragment als in *B. subtilis* SZ76, wenn man das Fragmentmuster im Southern-Blot mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das *ylaC*-Gen hybridisiert und anschließend detektiert. Deutlich sichtbar ist, dass das detektierte Fragment aus *B. subtilis* SZ76 kleiner als das aus *B. subtilis* SZ77 ist. Dabei entsprechen beide Fragmente in ihrer Größe den Erwartungen (siehe Abbildung 13, links).

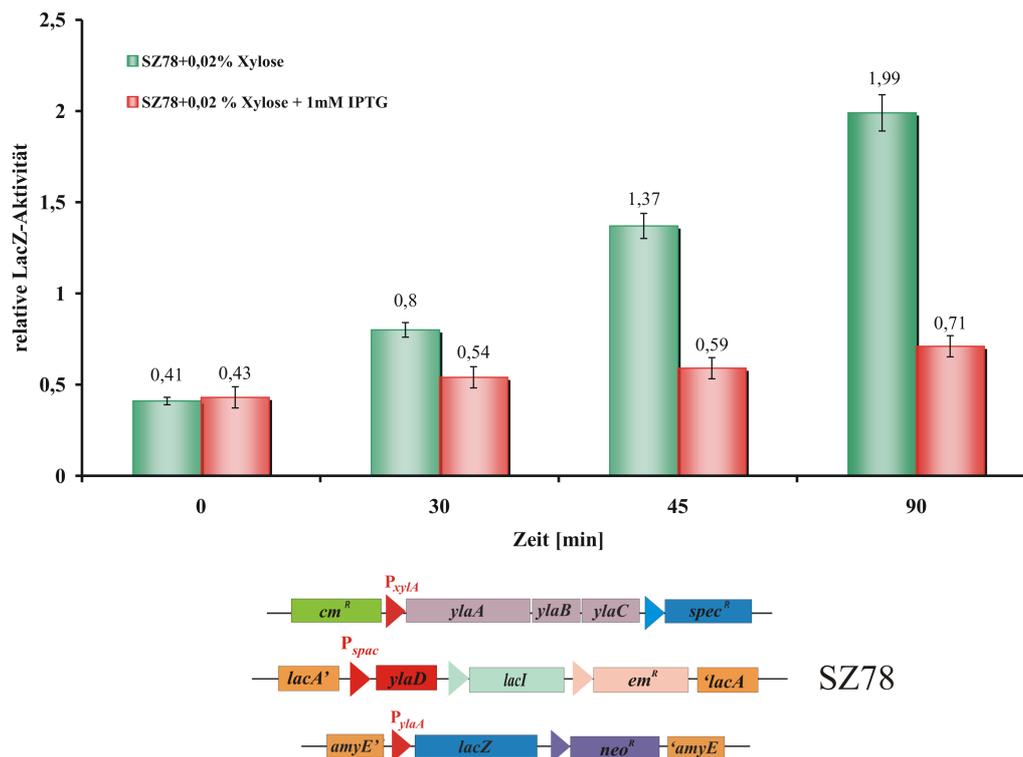
Zur Untersuchung des Einflusses von *ylaD* auf die Expression von *ylaC* wurden die Stämme *B. subtilis* SZ72, SZ76 und SZ77 von einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{578}$  von 0,05 in LB-Medium inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer  $OD_{578}$  von 0,5 wurde den Kulturen 2 % Xylose zugesetzt und Proben zur Ermittlung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach 45 und 90 min entnommen. Als Kontrolle blieb je eine Kultur jedes Stammes unbehandelt. Durch Zugabe der Xylose wurde die Transkription des *ylaA*-Operons induziert. Mit der im *amyE*-Lokus integrierten  $P_{ylaA}$ -*lacZ* Transkriptionsfusion sollte die Reaktion auf die Zugabe des Induktors Xylose detektiert werden. Um einen Einfluss der Xylose auf die Transkriptionsfusion selbst auszuschließen, wurde der Stamm SZ72 als Kontrolle analog zu den Stämmen SZ76 und SZ77 getestet.



**Abb. 14:** Diagramm der LacZ-Aktivitäten der *B. subtilis*-Stämme SZ72, SZ76 und SZ77 zum Zeitpunkt der Xylosezugabe bzw. zum Zeitpunkt der Probennahme analog zur Xylosezugabe bei den unbehandelten Kulturen. Die Symbole „-“ und „+“ stehen für das Fehlen bzw. die Zugabe von 2 % Xylose zum Medium. Fehlerbalken entsprechen den ermittelten Werten der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler (oben). Schematische Darstellung der ausschlaggebenden chromosomalen Situation in den Reporterstämmen *B. subtilis* SZ72, SZ76 und SZ77. In *B. subtilis* SZ76 befindet sich das *ylaA*-Operon unter der Kontrolle des Xylose-regulierbaren Promotors  $P_{ylaA}$ . Zudem befindet sich im *amyE*-Lokus eine Transkriptionsfusion zwischen dem originären *ylaA*-Promotor und *lacZ*. *B. subtilis* SZ77 unterscheidet sich von *B. subtilis* SZ76 nur dadurch, dass der gesamte kodierende Bereich des *ylaD*-Gens durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt ist.

Aus Abbildung 14 geht deutlich hervor, dass lediglich der *B. subtilis* Stamm SZ77 auf die Xylosezugabe anspricht. In diesem Stamm wird durch Xylosezugabe die Transkription des *ylaA*-Operons induziert. Im Unterschied zu *B. subtilis* SZ76 ist hier jedoch der potentielle Anti-Sigmafaktor YlaD nicht vorhanden. Somit wird nur der ECF-Sigmafaktor YlaC produziert und kann die Transkription seines eigenen Operons stimulieren (Autoregulation), was durch das Ansteigen der LacZ-Aktivität auf den 13,7fachen Wert 45 min nach Xylosezugabe belegt wird. Die Xylosezugabe an sich hat keinen Effekt auf das Reportersystem, wie durch die gleichbleibend niedrigen LacZ-Aktivitäten des Stammes SZ72 erkennbar ist.

Um den regulatorischen Einfluss von YlaD auf das Reportersystem genauer untersuchen zu können, wurde das im *B. subtilis*-Stamm SZ77 durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette deletierte *ylaD*-Gen wieder ektopisch in den *lacA*-Lokus integriert (*B. subtilis* SZ78). Die Transkription der ektopisch integrierten Kopie des *ylaD*-Gens konnte durch IPTG-Zugabe angeschaltet werden, da das Gen unter der Kontrolle des Promotors  $P_{spac}$  steht. Analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden auch mit *B. subtilis* SZ78 LacZ-Tests durchgeführt. Zusätzlich zu der Xylosezugabe erfolgte auch die Zugabe von IPTG. Die Menge der zur Induktion verwendeten Xylose musste aufgrund bereits bekannter unterschiedlicher Promotorstärken an das Experiment angepasst werden. Jochen Hecht konnte in seiner Diplomarbeit (2001) zeigen, dass die Zugabe von 0,02 % Xylose der Zugabe von 1 mM IPTG bezüglich der Menge an gebildetem Transkript entspricht. Die Ergebnisse der Bestimmung der LacZ-Aktivitäten bei gemeinsamer Induktion von YlaC und YlaD sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Abb. 15:** Diagramm der LacZ-Aktivität des *B. subtilis* Stammes SZ78. Zum Zeitpunkt „0“ erfolgte die Zugabe von 0,02 % Xylose bzw. 0,02 % Xylose und 1 mM IPTG. Nach jeweils 30, 45 und 90 min wurden Proben entnommen und die LacZ-Aktivität bestimmt. Fehlerbalken entsprechen den ermittelten Werten der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler (oben). Schematische Darstellung der ausschlaggebenden chromosomalen Situation im *B. subtilis*-Stamm SZ78 (unten).

Wie in Abbildung 15 deutlich zu sehen ist, steigt die LacZ-Aktivität 90 min nach Zugabe von 0,02 % Xylose um den Faktor 5 an. Wird zusätzlich zur Xylose auch noch IPTG zu den Zellen gegeben (Endkonzentration 1 mM), so erhöht sich die LacZ-Aktivität nur um den Faktor 1,7. Durch die IPTG-Zugabe wird die Transkription des ektopisch integrierten *YlaD* induziert, was auch im Northern-Blot mit einer DIG-markierten Riboprobe-Sonde gegen das *ylaD*-Gen nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Durch die Produktion des Anti-Sigmafaktors *YlaD* kann also verhindert werden, dass der ECF-Sigmafaktor *YlaC* die Transkription seines eigenen Operons in dem Maße stimuliert, wie es in völliger Abwesenheit von *YlaD* der Fall ist.

## 4.2 Induktion des *ylaA*-Operons durch Stressfaktoren

Nur in den wenigsten Fällen sind die genauen Stimuli identifiziert, auf die *B. subtilis* mit einer Induktion von ECF- $\sigma$ -Faktoren und damit auch mit einer Anschaltung von Genen zur Überwindung dieser aktuellen Stresssituation reagiert. Um mögliche Stressfaktoren, welche zu einer Induktion von *ylaC* führen, identifizieren zu können, wurde die unter 4.1.2 bereits be-

schriebene Transkriptionsfusion verwendet (Abbildung 16).



**Abb. 16:** *B. subtilis* SZ 72. Schematische Darstellung von *B. subtilis* SZ72 mit der Transkriptionsfusion zwischen dem durch  $\sigma^{YlaC}$ -kontrollierten *ylaA*-Promoter und *lacZ* im *ylaA*-Wildtyp-Hintergrund. Die Integration ins *B. subtilis*-Chromosom erfolgte über den *amyE*-Lokus. Promotoren sind als Dreiecke dargestellt.

Der *B. subtilis* Stamm SZ72 (Abbildung 16) wurde verschiedenen in der Literatur bereits beschriebenen Stressfaktoren ausgesetzt. Angeimpft bei 37 °C auf eine OD<sub>578</sub> von 0,05 wurden die Kulturen beim Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5 dem entsprechenden Stressimpuls ausgesetzt. Jeweils 30, 60, 90, 150 und 210 min nach Setzen des Stresses wurden Aliquots zur Bestimmung der LacZ-Aktivität entnommen. Als Kontrolle blieb stets eine Kultur ungeschockt. Nachfolgende Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der getesteten Stressfaktoren unter Angabe der entsprechenden Literaturstellen.

**Tab. 9:** Übersicht der mit dem Stamm *B. subtilis* SZ72 getesteten Stressfaktoren.

Stressfaktor	Ausführung des Stresses	Referenz
Alkali-Stress	24 mM NaOH	Wiegert <i>et al.</i> , 2001
Ethanol-Stress	4% (v/v) EtOH	Engelmann <i>et al.</i> , 1995
Salz-Stress	1,2 M NaCl	Deuerling <i>et al.</i> , 1997
Säure-Stress	pH 4,9 durch HCl	Thackray and Moir, 2003
Peroxid-Stress	0,0002 % und 0,001 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Engelmann <i>et al.</i> , 1995
Nährstofflimitation	Stationäre Phase	Völker <i>et al.</i> , 1995
Alternative C-Quellen	Xylose, Glycerin, Citrat	Schultz and Matin, 1991
Diamid-Stress	1 mM	Leichert <i>et al.</i> , 2003
Vancomycin	1 µg/ml und 2 µg/ml	Cao <i>et al.</i> , 2002
Fosfomycin	100 µg/ml	Cao <i>et al.</i> , 2002
Kanamycin	100 µg/ml	Cao <i>et al.</i> , 2002
Triton-X-100	0,05 % (v/v)	Cao <i>et al.</i> , 2002
Bacitracin	1 U/ml und 5 U/ml	Cao <i>et al.</i> , 2002
Sauerstofflimitation	Reduktion der Schüttelfrequenz von 150 rpm auf 50 rpm	Völker <i>et al.</i> , 1995
Tellurit-Stress	0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml	Thomas, 2003

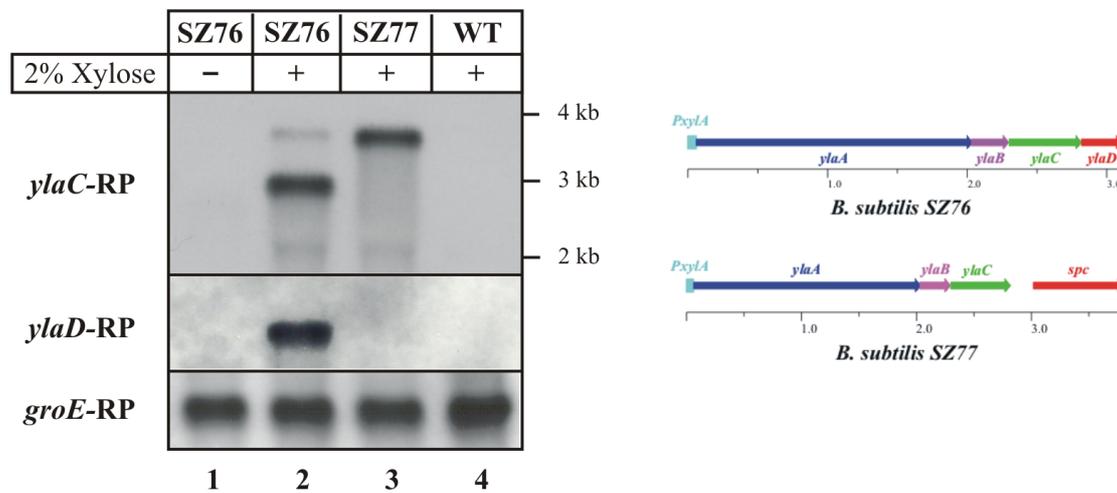
Für sämtliche mit dem *B. subtilis* Stamm SZ72 durchgeführten Stressbedingungen konnten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen werden, die in etwa denen der „unbehandelten“ Kultur entsprachen. Dabei sei erwähnt, dass die Expression von  $\sigma^{YlaC}$  in allen getesteten Wachstumsphasen sehr gering war. Eine Anschaltung der *ylaA-lacZ*-Transkriptionsfusion konnte somit für keine der applizierten Stressbedingungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da es aus der Literatur Hinweise gab, dass der Nachweis der Induktion von Genen mittels *lacZ*-Transkriptionsfusionen beim Testen von Stressfaktoren in flüssigem Medium oft nicht möglich war (Turner and Helmann, 2000), wurden die Auswirkungen der Stressoren auf Ebene der mRNA überprüft. Dazu wurde Gesamt-mRNA 30 min nach Setzen des jeweiligen Stresses (Tabelle 9) isoliert, in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und einem Northern-Blot unterzogen. Die Hybridisierung der auf der Nylonmembran fixierten mRNA erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten Antisense-RNA-Sonde gegen das *ylaC*-Gen. Auch mit den Northern-Blots konnte für keinen der getesteten Stressfaktoren ein Signal für das *ylaC*-Gen erhalten werden, was die Daten der  $\beta$ -Galaktosidase-Tests bestätigt (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Identifizierung von YlaC-regulierten Genen mittels DNA-Makroarray Analysen

Durch den Einsatz von DNA-Makroarrays sollten potentielle, durch  $\sigma^{YlaC}$ -regulierte Gene identifiziert werden. Die eingesetzten Macroarrays (Panorama *B. subtilis* gene arrays) der Firma Sigma Genosys beinhalteten 4107 offene Leseraster aus *B. subtilis*. Da bisher kein Stressfaktor gefunden werden konnte, der zu einer Induktion von  $\sigma^{YlaC}$  führte, wurde Gesamt-RNA aus den unter 4.1.3.1 beschriebenen *B. subtilis*-Stämmen SZ76 und SZ77 isoliert, in denen *ylaABCD* (SZ76) bzw. *ylaABC* (SZ77) unter der Kontrolle eines Xylose-regulierbaren Promotors standen. Diese Stämme wurden dem *B. subtilis*-Stamm SZ100 vorgezogen, da man durch den stärkeren Promotor  $P_{xyIA}$  und durch das Fehlen des Anti-Sigmafaktors von einer stärkeren Induktion *ylaC*-regulierter Gene ausgehen konnte. Aus ÜNKs angeimpft, wurden die Kulturen beim Erreichen einer  $OD_{578}$  von 0,5 mit jeweils 2 % Xylose versetzt. Zwanzig min nach der Xylose-Zugabe wurden Proben entnommen und Gesamt-mRNA isoliert. Die Qualität der isolierten mRNA wurde im Northern-Blot überprüft. Dabei wurde die auf eine Nylonmembran geblottete mRNA mit einer DIG-markierte RNA-Sonde gegen das *ylaC*-und

das *ylaD*-Gen hybridisiert. Als Kontrolle wurde der gleiche Blot mit einer DIG-Riboprobe-Sonde gegen *groE* hybridisiert. Das Ergebnis des Northern-Blots ist in Abbildung 17 gezeigt.

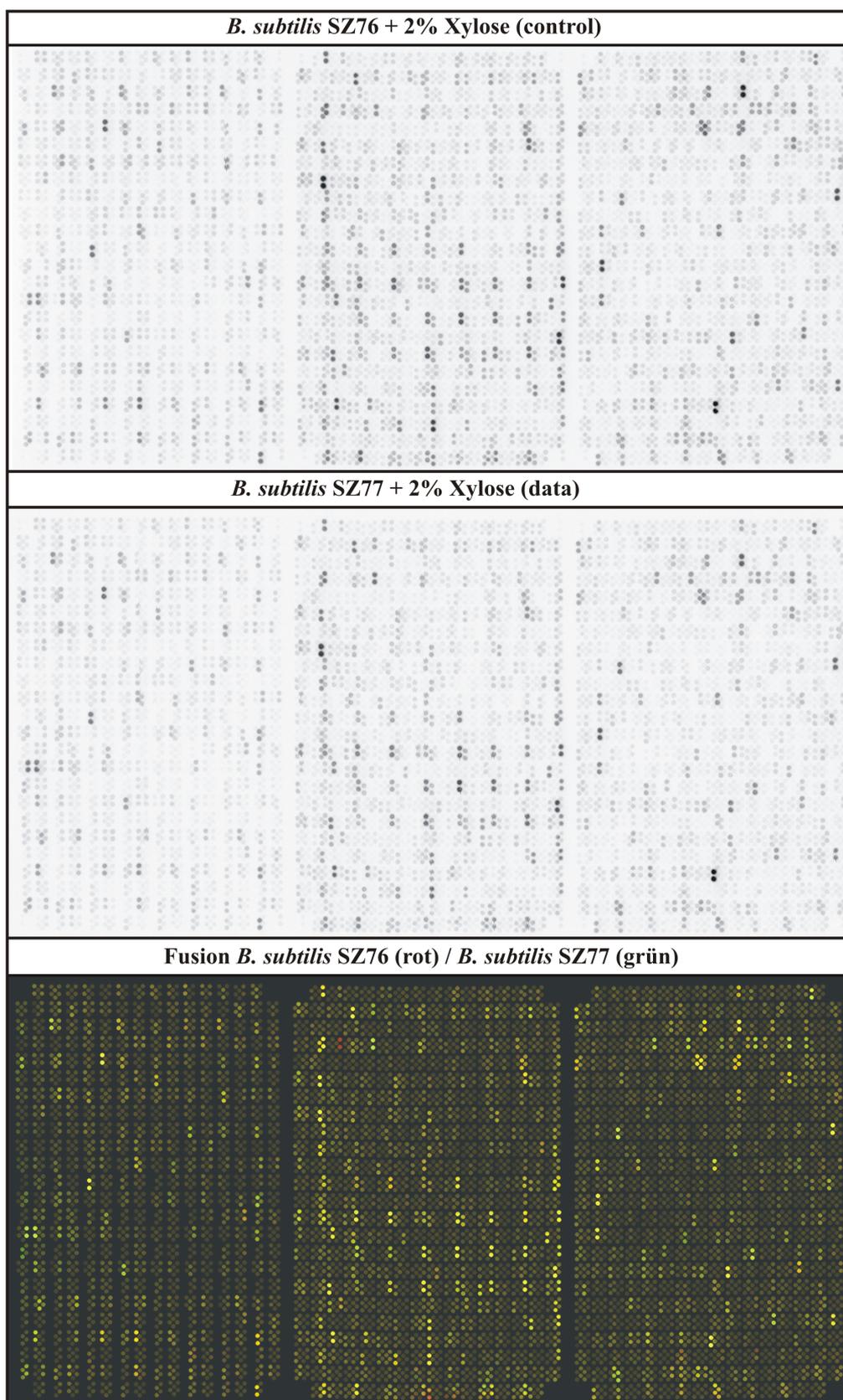


**Abb. 17:** Luminogramm des Northern-Blots der *B. subtilis* Stämme 1012 (WT), SZ76 und SZ77. Pro Spur wurden jeweils 2 µg Gesamt-mRNA aufgetragen. Von *B. subtilis* SZ76 wurde mRNA aus einer Kultur ohne (Spur 1) und mit 2 % Xylose (Spur 2) aufgetragen. Von *B. subtilis* SZ77 (Spur 3) und 1012 (Spur 4) wurde mRNA aus Kulturen mit 2 % Xylose aufgetragen. Zwei identische Blots wurden je mit einer RP-mRNA-Sonde gegen *ylaC* (oben), *ylaD* (Mitte) und gegen *groE* (unten) hybridisiert. Rechts: Schematische Darstellung der Transkripte für die Stämme SZ76 und SZ77.

Man kann in Abbildung 17 deutlich erkennen, dass ohne Xylose-Zugabe keine Transkripte der Gene *ylaC* und *ylaD* detektiert werden können (Spur 1). Nach Zugabe von Xylose kann ein Transkript des *ylaC*-Gens in SZ76 (Spur 2) und SZ77 (Spur 3) nachgewiesen werden. Ein Transkript für das *ylaD*-Gen kann nur in SZ76 nachgewiesen werden (Spur 2), da SZ77 kein *ylaD*-Gen enthält (Abbildung 17 rechts). Auf den Wildtyp (Spur 4) kann die Xylosezugabe keinen Einfluss haben, da hier das *ylaA*-Operon nicht unter der Kontrolle des Xylose-regulierbaren Promotors  $P_{xylA}$  steht, wie es bei den Stämmen SZ76 und SZ77 ja der Fall ist. Die Länge der detektierten Transkripte entspricht in beiden Fällen der des gesamten *ylaA*-Operons. Für SZ76 beträgt die Länge des Transkripts ca. 3 kb. Aufgrund der inserierten Spectinomycin-Resistenzkassette in SZ77 ist das Transkript länger als in SZ76 und beträgt ca. 3,8 kb. Der als Kontrolle durchgeführte Northern-Blot mit anschließender Hybridisierung gegen eine *groE*-RP-Sonde ergab, dass in alle Spuren gleiche Mengen an mRNA aufgetragen wurden.

Mit der isolierten und überprüften mRNA aus den beiden Stämmen SZ76 und SZ77 wurde ein Makroarray-Experiment durchgeführt. Dazu wurde die mRNA durch reverse Transkription mit radioaktivem dCTP in cDNA umgeschrieben (*B. subtilis*-spezifischer Primer-Mix von

SIGMA Genosys). Der Gesamtpool an radioaktiv-markierten cDNAs wurde als Sonde gegen die Panorama *B. subtilis* gene arrays der Firma SIGMA Genosys hybridisiert. Dabei wurde das Makroarray, welches mit cDNA aus *B. subtilis* SZ76 hybridisiert wurde, als Kontrollexperiment (control) betrachtet, da hier sowohl der Sigmafaktor YlaC als auch der Antisigmafaktor YlaD gebildet werden konnten. Jenes Makroarray, welches mit cDNA aus *B. subtilis* SZ77 hybridisiert wurde, galt als eigentliches Experiment (data), da nur hier aktives YlaC gebildet werden konnte. Die Auswertung der Makroarrays erfolgte mit der Software ArrayVision 6.0 der Firma Imaging Research. Die im Phosphoimager eingescannten Arrays „control“ und „data“ sowie ein artifizielles Überlagerungsbild aus beiden Experimenten sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abb. 18:** Scans der mit den Makroarrays exponierten Phosphoimager-Screens von *B. subtilis*-Stämmen SZ76 (oben) und SZ77 (Mitte). Für die untere Abbildung wurde eine Fusion der beiden oberen Abbildungen vorgenommen. Dabei wurde dem Kontrollexperiment (oben) der rote Farbkanal, dem Experiment (Mitte) der grüne Farbkanal zugewiesen. Somit erscheinen Gene, welche hochreguliert werden, grün, und Gene, welche herunterreguliert werden, rot. Gene mit unverändertem Expressionsmuster erscheinen gelblich.

In nachfolgender Tabelle 10 wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, deren Signale im eigentlichen Experiment (data) ein Signal-/Rauschverhältnis  $> 3$  aufwiesen (Wiegert *et al.*, 2001). Ein weiteres Kriterium war, dass von den über 4 000 als PCR-Produkte aufgespotteten ORFs aus *B. subtilis* diejenigen Gene, welche als positiv reguliert durch YlaC gelten sollten, eine Signal-Intensitätsverhältnis data/control von über 2 ergeben sollten. Zur Kontrolle sind auch die Werte der Gene des *ylaA*-Operons angeführt. Es fällt deutlich ins Auge, dass die Signalintensität für *ylaD* sehr gering ist, was bestätigt, dass in *B. subtilis* SZ77 (data) keine *ylaD*-mRNA gebildet wird, da das Gen deletiert wurde.

**Tab. 10:** Auswertung des Makroarray-Experiments mit den Stämmen *B. subtilis* SZ76 und SZ77.

Spot labels/ Gene	Signal-/Rausch- verhältnis (control)	Signal-/Rausch- verhältnis (data)	Signalintensität data/control
<i>ask</i>	15	33,36	2,34
<i>csbA</i>	11,99	22,29	1,97
<i>csgA</i>	3	6,23	2,18
<i>gerAC</i>	8,73	19,69	2,37
<i>infC</i>	111,6	227,37	2,13
<i>leuC</i>	2,52	8,05	3,36
<i>lytA</i>	2,25	7,22	3,37
<i>murA</i>	6,87	19,38	3,04
<i>qcrC</i>	4,51	9,11	2,12
<i>rocA</i>	2,49	7,23	3,05
<i>ybbK</i>	4,34	8,48	2,06
<i>yjbG</i>	9,2	19,48	2,23
<i>yoaH</i>	5,48	11,97	2,31
<i>ypiP</i>	2,21	5,1	2,43
<i>ypzC</i>	2,38	5,33	2,38
<i>yqfG</i>	3,96	9,86	2,63
<i>yqhT</i>	9,55	23,03	2,54
<i>yqiW</i>	17,19	51,85	3,18
<i>ythQ</i>	4,36	9,53	2,3
<i>yvcJ</i>	4,67	9,43	2,13
<i>yvpA</i>	3,3	7,33	2,33
<i>ywjH</i>	5,21	12,92	2,61
<i>ywqE</i>	3,4	9,92	3,07
<i>ywqM</i>	2,34	5,23	2,38
<i>yxaJ</i>	2,14	7,12	3,51
<i>yxdL</i>	5,62	13,74	2,57
<i>yybS</i>	2,87	8,43	3,09
<i>ylaA</i>	27,53	26,82	1,03
<i>ylaB</i>	16,97	13,61	0,84
<i>ylaC</i>	131,41	260,41	2,08
<i>ylaD</i>	70,72	3,55	0,05

Die in Tabelle 10 aufgeführten, als mögliche durch YlaC kontrollierte Zielgene wurden bezüglich ihrer Promotorelemente untersucht, und mit der unter 4.1.3 ermittelten Sequenz des

*ylaA*-Promotors verglichen. Gene, welche eine zum *ylaA*-Promotor vergleichbare Sequenz aufwiesen, sollten dann im Northern-Blot als tatsächlich durch YlaC-regulierte Gene bestätigt werden. Durch diesen Vergleich wurden vier Gene identifiziert, welche Ähnlichkeiten in ihrem Promotorenbereich zum Promotor von *ylaA* aufwiesen. Ein Vergleich der Nukleotid-Sequenzen wird in Abbildung 19 gezeigt.

<i>ylaA</i>	CATCT <b>TGAAAC</b> TTTTTGA---AAAGTCCGCT <b>TGTC</b> TAA
<i>ywqE(ywqC)</i>	AAAGTACT <b>AAC</b> ATAACGCATTGTAAAAAA <b>TGTC</b> GAA
<i>yqiW</i>	ATCATAAG <b>AAC</b> AGATGATGAAAAAGG-AGAG <b>TGTC</b> TTC
<i>yoaH</i>	TGGAT <b>TCAAAC</b> GCGCTTGAACATA-TTTTAT <b>TTTC</b> AGC
<i>yybS</i>	GATATAA <b>AAAC</b> ATTCGGTGCAAAGCA--- <b>TGT</b> TGCA

**Abb. 19:** Alignment möglicher Promotoren der durch die Makroarray-Analyse identifizierten Gene, welche positiv durch YlaC reguliert werden.

#### 4.3.1 Identifizierung von YlaC-regulierten Genen im Northern-Blot

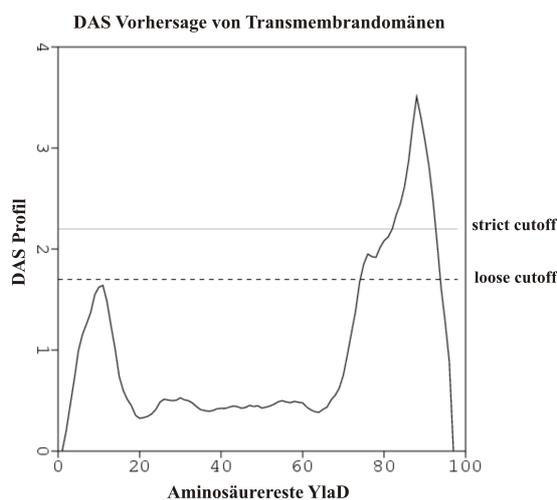
Nach Kenntniss des Transkriptions-Startpunkts des *ylaA*-Operons und Sequenzierung der Promotorregion sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Makroarray-Experimenten wurde die Expression der Gene aus Abbildung 19 mit spezifischen DIG-markierten Riboprobe-Sonden im Northern-Blot untersucht. Dazu wurden jeweils 2 µg Gesamt-mRNA der Stämme *B. subtilis* SZ76 und SZ77 mit Sonden gegen *ywqE*, *yqiW*, *yoaH* und *yybS* untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Makroarray-Experimenten konnte in den Northern-Blot-Experimenten keine geänderte Expression der o. e. Gene festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), unabhängig davon, ob nun der Anti-Sigmafaktor gebildet wird (*B. subtilis* SZ76) oder deletiert ist (*B. subtilis* SZ77). Somit konnten die Ergebnisse aus der globalen Transkriptionsanalyse der Makroarrays mit spezifischen Sonden für die in Frage kommenden Gene (mit zum *ylaA*-Promotor ähnlichen Sequenzen) im Northern-Blot nicht bestätigt werden.

## 4.4 Das YlaD-Protein aus *B. subtilis*

### 4.4.1 Eigenschaften des YlaD-Proteins

Im Rahmen des Genom-Sequenzierungsprojektes von *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) wurde das *ylaD*-Genprodukt als potentieller Anti-Sigmafaktor zu YlaC prognostiziert. Das *ylaD*-Gen ist das vierte und letzte Gen des *ylaA*-Operons und codiert, laut Computer-gestützter Vorhersage, für ein Membranprotein bestehend aus 97 Aminosäuren, welches eine Transmembrandomäne am C-terminalen Ende des Proteins enthält. Zudem wurde das YlaD-

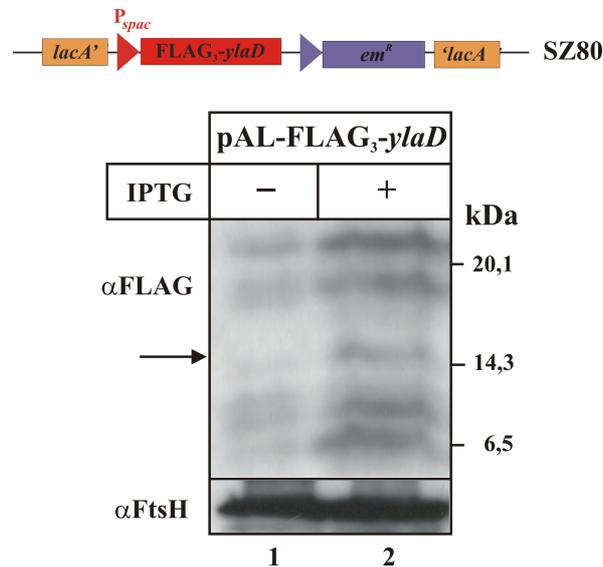
Protein, wie bereits einleitend erwähnt, einer neu-definierten Familie von Zink-bindenden Anti-Sigmafaktoren, zu der auch das RsiW-Protein aus *B. subtilis* gehört, zugeordnet (Kang *et al.*, 1999). Außerdem besteht eine große Ähnlichkeit (54 %) zum RsiW-Protein. Verschiedene Computervorhersagen ergaben, dass sich die Transmembrandomäne sehr nahe am C-terminalen Ende des Proteins befindet und nur wenige Aminosäuren außerhalb des Cytoplasmas liegen (Abbildung 20).



**Abb. 20:** Vorhersage von Transmembrandomänen durch das „Dense Alignment Surface (DAS)“-Programm (Cserzo *et al.*, 1997). Aminosäurereste des YlaD-Proteins sind vom N- zum C-terminus numerisch auf der X-Achse aufgelistet. Zusätzlich sind die vom Programm festgelegten Schwellenwerte für einen „loose cutoff“ und einen „strict cutoff“ gezeigt.

Diese wenigen Aminosäuren könnten kaum ausreichen, um als Sensordomäne für einen möglichen Stressfaktor zu fungieren, wie es möglicherweise bei RsiW, dem Anti-Sigmafaktor von  $\sigma^W$  der Fall ist. Um auszuschließen, dass die vorliegende Sequenz des *ylaD*-Gens aufgrund eines Sequenzierfehlers möglicherweise zu kurz ist, wurde ausgehend von chromosomaler DNA der *B. subtilis* Wildtyp-Stämme 168 und 1012 das *ylaD*-Gen über das beschriebene 3'-Ende des Gens hinaus mittels PCR amplifiziert. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Primern Nr. 40 und 41 sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die bisher vorliegende DNA-Sequenz des *ylaD*-Gens. Um nachzuweisen, dass es sich bei YlaD tatsächlich um ein Membranprotein handelt, wurden Membranfraktionen eines *B. subtilis*-Stammes isoliert, der im *lacA*-Lokus eine IPTG-regulierbare Kopie des *ylaD*-Gens mit einem N-terminalen FLAG<sub>3</sub>-Epitoptag enthielt (*B. subtilis* SZ80). In Ermangelung spezifischer Antikörper gegen YlaD war die Verwendung eines Epitop-Tags unumgänglich, sofern ein Nachweis des YlaD-Proteins erfolgen sollte. Die Probe für die Isolierung von Membranfraktionen wurde 60 min nach Induktion mit IPTG gezogen. Als Kontrolle blieb eine Kultur unbehandelt. Abbildung 21a zeigt einen Western-Blot, durchgeführt mit Membranfraktionen aus *B. subtilis* SZ80 mit und ohne IPTG-Zugabe, entwickelt mit

polyklonalen Antikörpern (Sigma) gegen den FLAG-Epitop-Tag. Als Ladungskontrolle wurde ein zweiter Western-Blot mit Antikörpern gegen die Membran-gebundene Metalloprotease FtsH durchgeführt.



**Abb. 21a:** Immunoblot zum Nachweis von FLAG<sub>3</sub>-YlaD. Eine Flüssigkultur von *B. subtilis* SZ80 wurde bei einer OD<sub>578</sub> von 0,7 mit 1 mM IPTG versetzt. Eine weitere Kultur blieb unbehandelt. 1 h nach IPTG-Zugabe wurden die Zellen geerntet und Membranfraktionen isoliert. Von jeder Probe wurden entsprechend der OD gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen. Als Ladungskontrolle diente ein Blot mit denselben Proben, entwickelt mit Antikörpern gegen die membrangebundene Metalloprotease FtsH. Der Pfeil deutet auf die Bande von Flag<sub>3</sub>-YlaD.

In obiger Abbildung sieht man nach IPTG-Induktion nur eine sehr schwache Bande im Bereich von FLAG<sub>3</sub>-YlaD (Spur 2). Ohne IPTG-Zugabe ist diese Bande nicht vorhanden (Spur 1). Die Größe der Bande entspricht ungefähr dem vorausgerechneten Molekulargewicht von 14,3 kDa. Verwendet man statt der oben eingesetzten Membranfraktionen die Überstände, so kann kein Signal für Flag<sub>3</sub>-YlaD detektiert werden. Erst nach Deletion der Transmembrandomäne von YlaD kann ein GFP-YlaD-Fusionsprotein im Überstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass YlaD ein Membranprotein ist. Die auch in Membranfraktionen sehr geringe, detektierbare Menge an Flag<sub>3</sub>-YlaD verwundert etwas, da auf mRNA-Ebene nach Induktion mit IPTG ein deutliches Signal eines *ylaD*-Transkriptes sichtbar war (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf einen proteolytischen Abbau von Flag<sub>3</sub>-YlaD hindeuten.

#### 4.4.2 Die YluC-Protease aus *B. subtilis*

In unserer Arbeitsgruppe konnte zur selben Zeit als die Arbeiten über das *ylaA*-Operon aus *B. subtilis* durchgeführt wurden, ein *B. subtilis*-Stamm konstruiert werden, in dem das Gen einer potentiellen RIP-Protease (YluC) deletiert worden war. In diesem Stamm fand keine Anschaltung des  $\sigma^W$ -Regulons mehr statt und eine verkürzte Form von RsiW akkumulierte in

der Cytoplasmamembran. RsiW ist ein membrangebundenes Protein mit einer Transmembrandomäne und fungiert als Anti-Sigmafaktor zu  $\sigma^W$ , indem es an seinen Sigmafaktor bindet und somit eine Interaktion mit der RNA-Polymerase verhindert. Zusätzlich zur Transmembrandomäne verfügt es über eine cytoplasmatische Domäne, welche mit dem ECF-Sigmafaktor  $\sigma^W$  interagiert, sowie über eine extracytoplasmatische „Sensor“-Domäne. Nach einem Alkali-Schock wird der Anti-Sigmafaktor sukzessive abgebaut, was schließlich zur Anschaltung des  $\sigma^W$ -Regulons führt, wobei das Signal auf molekularer Ebene noch unbekannt ist. In einer *yluC*-Nullmutante konnte das  $\sigma^W$ -Regulon nach einem Alkali-Schock nicht mehr angeschaltet werden. Zusätzlich reicherte sich ein verkürztes RsiW-Fragment in der Cytoplasmamembran an, was darauf hindeutete, dass die YluC-Protease am proteolytischen Abbau von RsiW beteiligt ist. Im Hinblick auf die anstehende Untersuchung eines möglichen proteolytischen Abbaus von YlaD (siehe 4.4.1) musste zunächst anhand des  $\sigma^W$ /RsiW-Modells gezeigt werden, dass tatsächlich die proteolytische Aktivität von YluC für den Abbau von RsiW, und damit auch für die Anschaltung des  $\sigma^W$ -Regulons, notwendig ist. Dazu wurde die Deletion von YluC durch eine ektopisch integrierte, Xylose-regulierbare Kopie von YluC komplementiert. Dabei wurde sowohl eine wildtypische Kopie des *yluC*-Gens als auch eine *yluC*-Variante mit einer Mutation im aktiven Zentrum jeweils in den *amyE*-Lokus integriert. Die Sequenz des aktiven Zentrums konnte durch einen Vergleich mit dem bereits identifizierten aktiven Zentrum der RseP-Protease aus *E. coli* abgeleitet werden. Durch das Austauschen eines Glutamat-Restes im aktiven Zentrum gegen einen Alanin-Rest konnte die RseP-Protease inaktiviert werden (Alba *et al.*, 2002). Zur Konstruktion der mutierten Variante von YluC wurde durch PCR mit den Primern *yluCE21A-5'* und *yluCE21A-3'* und Plasmid-DNA *pXyluC* als Matrize ein 134 bp großes Fragment amplifiziert. Dieses Fragment, welches die gewünschte Mutation trug, wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SpeI* geschnitten und dann mit dem dephosphorylierten und genauso geschnittenen Vector *pXyluC* ligiert. Das resultierende Plasmid *pXyluCE21A* wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Das verifizierte Plasmid wurde in einen Reporterstamm (BFS233) transformiert, der eine Transkriptionsfusion zwischen einem starken, durch  $\sigma^W$ -kontrollierten Promotor (*yuaF*) und *lacZ* enthielt. Zusätzlich wurde in einem Fall das chromosomal codierte *yluC*-Gen deletiert. Mit Hilfe der diversen Reporterkonstrukte wird die LacZ-Aktivität vor und nach einem Alkali-Schock gemessen. Im Falle des chromosomal deletierten *yluC*-Gens kann durch Xylose-Zugabe plasmidal-codiertes *yluC* (wildtypisch und mit Mutation im aktiven Zentrum) exprimiert werden. Die Resultate sind Tabelle 11 zusammengestellt.

**Tab. 11:** LacZ-Aktivitäten des Reporterstammes BFS233 mit verschiedenen genetischen Hintergründen mit und ohne Alkali-Schock. BFS233 enthält eine  $P_{yuaF}$ -lacZ Fusion, um  $\sigma^W$ -Aktivität messen zu können ( $P_{yuaF}$  ist ein durch  $\sigma^W$  kontrollierter, starker Promotor). Die Kulturen wurden bei einer  $OD_{578}$  mit NaOH behandelt (EK: 24 mM), woraufhin der pH-Wert der Kulturen auf pH 8,9 anstieg. Proben für die LacZ-Messung wurden 1 h nach Zugabe der NaOH entnommen (auch bei unbehandelten Kulturen).

Stamm	LacZ-Aktivität	
	- NaOH	+NaOH
BFS233	0.3	13.9
BFS233 <i>rsiW::spec</i>	17.8	10.7
BFS233 <i>sigW::spec</i>	0.0	0.0
BFS233 <i>yluC::tet</i>	0.0	0.0
BFS233 <i>yluC::tet amyE::P<sub>x</sub>yluC</i>	0.3	5.8
BFS233 <i>yluC::tet amyE::P<sub>x</sub>yluC</i> <sup>1</sup>	0.8	11.6
BFS233 <i>yluC::tet amyE::P<sub>x</sub>yluC-E21A</i>	0.0	0.0
BFS233 <i>yluC::tet amyE::P<sub>x</sub>yluC-E21A</i> <sup>1</sup>	0.0	0.0

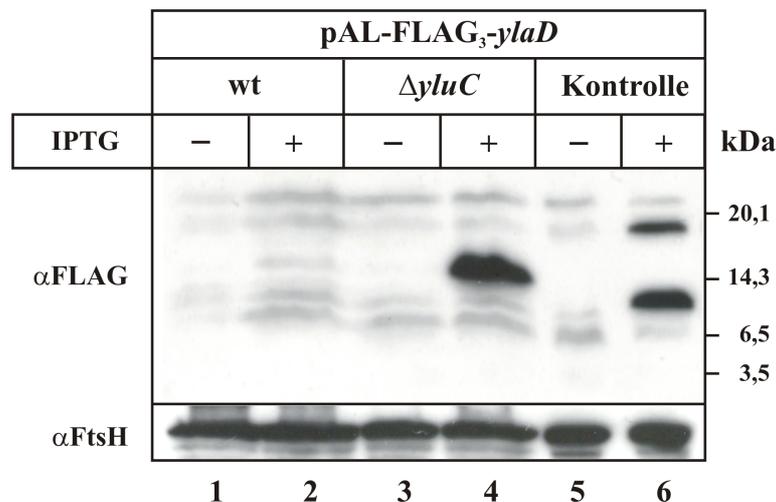
<sup>1</sup>Zugabe von 2 % Xylose zu den Kulturen

Aus Tabelle 11 kann man deutlich erkennen, dass der Stamm BFS233 nach Alkali-Schock eine über 40fach erhöhte LacZ-Aktivität aufweist. Ein Kontrollstamm mit deletiertem Anti-Sigmafaktor RsiW (BFS233 *rsiW::spec*) zeigt eine hohe, von der NaOH-Zugabe unabhängige, LacZ-Aktivität, da  $\sigma^W$ -kontrollierte Gene kontinuierlich exprimiert werden. Fehlen im Reporterstamm das Gen für den ECF-Sigmafaktor (*sigW*) oder das Gen für die RIP-Protease (*yluC*), so kann keine LacZ-Aktivität gemessen werden, egal ob ein Alkali-Schock durchgeführt wurde oder nicht. Wird das chromosomal deletierte *yluC*-Gen *in trans* durch eine ektopisch im *amyE*-Lokus integrierte Version von *yluC* komplementiert, so wird bereits ohne Xylose-Zugabe der Phänotyp des wildtypischen Reporterstammes fast wieder hergestellt. Die *yluC*-Version mit der Mutation im aktiven Zentrum vermag diese Komplementation nicht zu bewerkstelligen. Damit konnte gezeigt werden, dass in der Tat die proteolytische Aktivität der YluC-Protease entscheidend für die Aktivierung des  $\sigma^W$ -Regulons ist.

#### 4.4.3 Untersuchungen zum Abbau von YlaD durch YluC

Wie bereits erwähnt, ragen laut Strukturvorhersage nur wenige Aminosäuren des YlaD aus der Cytoplasmamembran in den extrazellulären Bereich. Im Vergleich zu RsiW fehlt also annähernd der komplette extracytoplasmatische Anteil, welcher in RsiW und in anderen Anti-

Sigmafaktoren als „Sensor“-Domäne fungiert. YlaD wäre somit aufgrund des Fehlens einer extracytoplasmatischen Domäne vergleichbar zu der, von einer noch unbekannt Protease, verkürzten Form von RsiW, welche erst ein Substrat für die YluC-Protease ist (Schöbel *et al.*, 2004). Somit könnte auch YlaD ein Substrat für die YluC-Protease sein, wodurch auch die nur sehr geringe Menge an detektierbaren FLAG<sub>3</sub>-YlaD (F<sub>3</sub>-YlaD) in der Membranfraktion von *B. subtilis* SZ80 erklärbar wäre (siehe Abbildung 21a). Um dies genauer zu untersuchen, wurde ausgehend von *B. subtilis* SZ80 ein Stamm konstruiert, in dem das *yluC*-Gen durch eine Tetracyclin-Resistenkassette ersetzt war (*B. subtilis* SZ81). Abbildung 21b zeigt einen Immunoblot, entwickelt mit polyklonalen Antikörpern gegen den FLAG-Epitoptag. Aufgetragen sind nur Membranfraktionen, in denen die Expression von F<sub>3</sub>-YlaD durch Zugabe von IPTG induziert wurde (+) bzw. kein Fusionsprotein aufgrund fehlender IPTG-Zugabe (-) gebildet wurde. Als Kontrolle der erfolgreichen Isolation von Membranfraktionen wurde der gleiche Blot mit Antikörpern gegen die membrangebundene FtsH-Metalloprotease entwickelt. Computergestützte Berechnungen für das 121 Aminosäuren lange F<sub>3</sub>-YlaD ergaben ein theoretisches Molekulargewicht von 14,3 kDa.

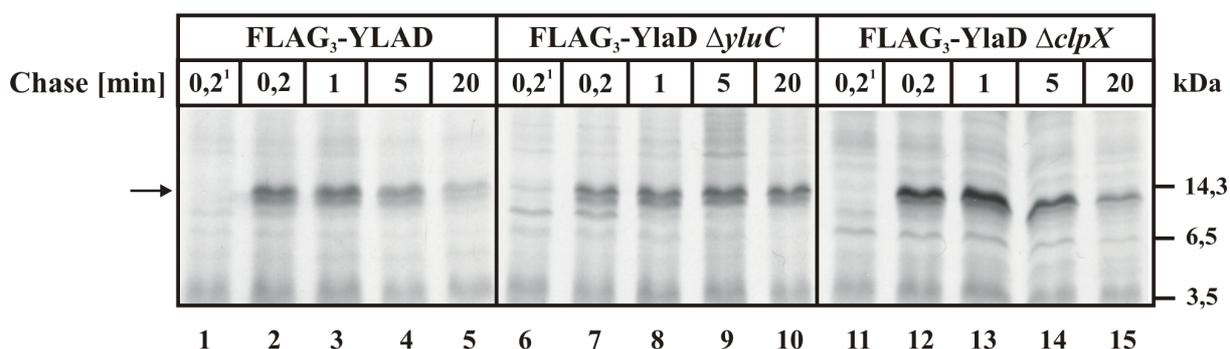


**Abb. 21b:** Immunoblot zum Nachweis von F<sub>3</sub>-YlaD. Kulturen der *B. subtilis*-Stämme SZ80 und SZ81 wurden bei einer OD<sub>578</sub> von 0,7 mit 1 mM IPTG versetzt. 1 h nach IPTG-Zugabe wurden die Zellen geerntet und Membranfraktionen isoliert. Von jeder Probe wurden entsprechend der OD gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen. Als Kontrolle diente in den Spuren 5 und 6 FLAG-getaggtetes RsiW. Als Ladungskontrolle diente ein Blot mit den selben Proben, entwickelt mit Antikörpern gegen die membrangebundene Metalloprotease FtsH.

Man erkennt deutlich, dass in Anwesenheit von YluC nur ein schwaches Signal für das F<sub>3</sub>-YlaD Fusionsprotein detektiert werden kann (Spur 2), wohingegen bei Abwesenheit der YluC-Protease ein starkes Signal für das Fusionsprotein konstatiert werden kann (Spur 4). In den Spuren 5 und 6 wurden als Kontrolle Proben aus Membranfraktionen mit FLAG-getaggtetem RsiW aufgetragen. In der cytoplasmatischen Fraktion der Stämme SZ80 und SZ81 konnte kein Signal für das F<sub>3</sub>-YlaD Fusionsprotein detektiert werden (Daten nicht gezeigt),

wodurch die Vorhersage von YlaD als Membranprotein nochmals bestätigt werden konnte (siehe auch Abbildung 20).

Um sicherzugehen, dass unter Abwesenheit der YluC-Protease das FLAG-getaggte YlaD tatsächlich stabilisiert ist, wurde ein „pulse-chase“-Experiment durchgeführt. Zusätzlich zu den bereits oben beschriebenen Stämmen SZ80 und SZ81 wurde ein weiterer Stamm untersucht, bei dem die ClpXP Protease durch Deletion von ClpX inaktiviert wurde. Dieser Stamm (*B. subtilis* SZ82) wurde konstruiert, da wie bereits in der Einleitung beschrieben, die ClpXP Protease bei *E. coli* am sequentiellen Abbau des Anti-Sigmafaktors RseA beteiligt ist. Somit konnte mit diesem experimentellen Ansatz ein möglicher Einfluss der ClpXP Protease auf den Abbau von YlaD untersucht werden. Für das „pulse-chase“-Experiment wurden Kulturen aller drei Stämme in S7-Medium mit Methionin bis zum Erreichen einer  $OD_{578}$  von 0,5 kultiviert. Nach zweimaligem Auswaschen des Methionins wurden die Zellen in Methionin-freiem S7-Medium resuspendiert. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression von F<sub>3</sub>-YlaD induziert. Die Zellen wurden für weitere 20 min bei 37 °C geschüttelt. Nach Ablauf der 20 min wurden die Kulturen mit radioaktivem Methionin für 1 min markiert. Dann wurde ein Überschuss an „kaltem“ Methionin zugegeben. Nach Zeitintervallen von 12 sec, 1, 5 und 20 min wurden Zellen entnommen und mit eiskalter TCA versetzt. Nach 1 h auf Eis wurden die Zellen pelletiert und aufgeschlossen. Die nach Zentrifugation erhaltenen Zellextrakte wurden mit FLAG-Antikörpern immungefällt. Die Auftrennung erfolgte im 15%igem SDS-Polyacrylamidgel. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse des Pulsmarkierungs-Experiments.



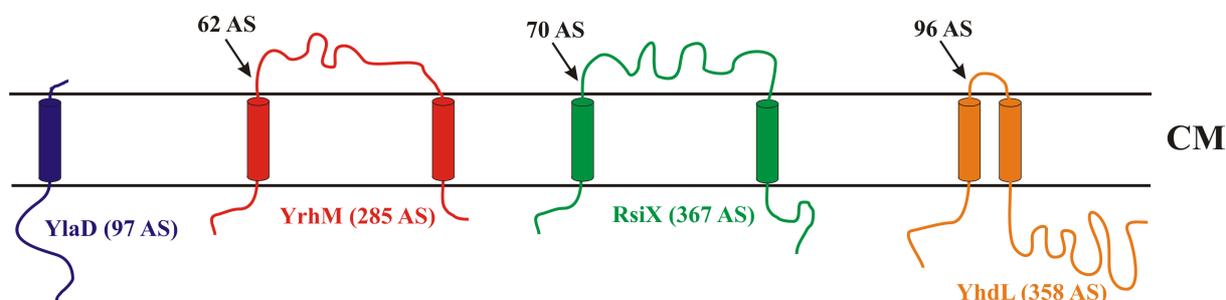
**Abb. 22:** Luminogramm des „pulse-chase“-Experiments mit den *B. subtilis* Stämmen SZ80, SZ81 und SZ82. FLAG<sub>3</sub>-YlaD ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. <sup>1</sup>Von jedem Stamm wurde ein Ansatz ohne IPTG kultiviert, um eine Unterscheidung des FLAG<sub>3</sub>-YlaDs von eventuellen kreuz-reagierenden Proteinen mit den polykolonialen FLAG-Antikörpern zu ermöglichen.

Die erhöhte Stabilität des F<sub>3</sub>-YlaD in einer *yluC* knockout-Mutante ist deutlich sichtbar (Spur 10). Während im wildtypischen Hintergrund das Signal für F<sub>3</sub>-YlaD in den Spuren 2-5 kontinuierlich schwächer wird, bleibt es im Falle der Deletion von YluC (Spuren 7-10), über

einen Zeitraum von 20 min annähernd unverändert. Die Abwesenheit der ATPase-Komponente der ClpXP-Protease scheint keinen Einfluss auf die Stabilität von F<sub>3</sub>-YlaD zu haben (Spuren 12-15), da man ansonsten ein sich anreicherndes Fragment unterhalb der Bande für F<sub>3</sub>-YlaD erwarten könnte.

#### 4.4.4 YluC beeinflusst auch die Stabilität der Anti-Sigmafaktoren RsiX und YhdL

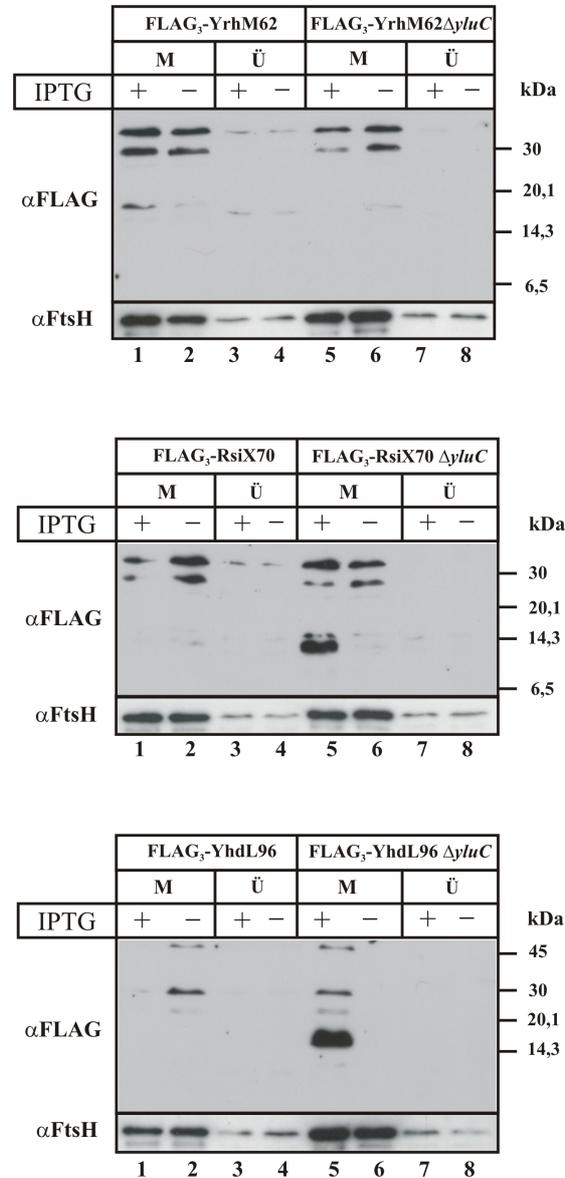
Da bisher gezeigt werden konnte, dass YluC sowohl RsiW als auch YlaD abbauen kann, sollte im Folgenden untersucht werden, ob YluC auch einen destabilisierenden Einfluss auf andere Anti-Sigmafaktoren aus *B. subtilis* hat. Für die ECF-Sigmafaktoren SigM, SigV und SigX wurden Anti-Sigmafaktoren beschrieben (YhdL, YrhM, RsiX), welche ebenfalls Membranproteine sind (Helmann, 2002). Im Unterschied zu YlaD und RsiW haben sie jedoch laut Computervorhersage mehr als eine Transmembrandomäne. Da, wie bereits erwähnt, RsiW erst durch YluC prozessiert werden kann, wenn ein erster, bislang noch unbekannter proteolytischer Schnitt im extracytoplasmatischen Bereich stattgefunden hat, musste dieser erste proteolytische Schnitt bei den Anti-Sigmafaktoren YrhM, RsiX und YhdL simuliert werden. Dazu wurden verkürzte Versionen dieser Membranproteine mit einem N-terminalen FLAG<sub>3</sub>-Tag versehen. Abbildung 23 zeigt schematisch die Anti-Sigmafaktoren YlaD, YrhM, RsiX und YhdL.



**Abb. 23:** Schematische Darstellung der membrangebundenen Anti-Sigmafaktoren YlaD ( $\sigma^{\text{YlaC}}$ ), YrhM ( $\sigma^{\text{V}}$ ), RsiX ( $\sigma^{\text{X}}$ ) und YhdL ( $\sigma^{\text{M}}$ ) anhand der Topologievorhersage des „DAS“-Programmes. Die Pfeile symbolisieren die Stellen, bis zu denen die jeweiligen Proteine verkürzt wurden, um eine ähnliche Struktur wie YlaD zu erreichen. AS = Aminosäuren, CM= Cytoplasmamembran.

Die Proteine wurden derart verkürzt, dass sie nur bis zu ihrer ersten Transmembrandomäne exprimiert wurden. Um einen Einfluss dieses simulierten ersten proteolytischen Schrittes nachzuweisen, wurde von einem zu untersuchenden Anti-Sigmafaktor (RsiX) das Volllängen-Protein ebenfalls mit einem N-terminalen FLAG<sub>3</sub>-Tag versehen. Alle zu untersuchenden Konstrukte wurden in den *lacA*-Lokus von *B. subtilis* integriert und im wildtypischen bzw.  $\Delta yluC$  Hintergrund im Western-Blot analysiert. Die Proben wurden wie unter 4.4.2 beschrieben aufbereitet und Membranfraktionen wurden isoliert. Aufgetragen wurden jeweils

die Membranfraktion und die cytoplasmatische Fraktion. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran und die Entwicklung mit Antikörpern gegen den FLAG-Tag. Jeweils ein zweiter Blot wurde mit Antikörpern gegen FtsH als Ladungskontrolle durchgeführt (Abbildung 24).

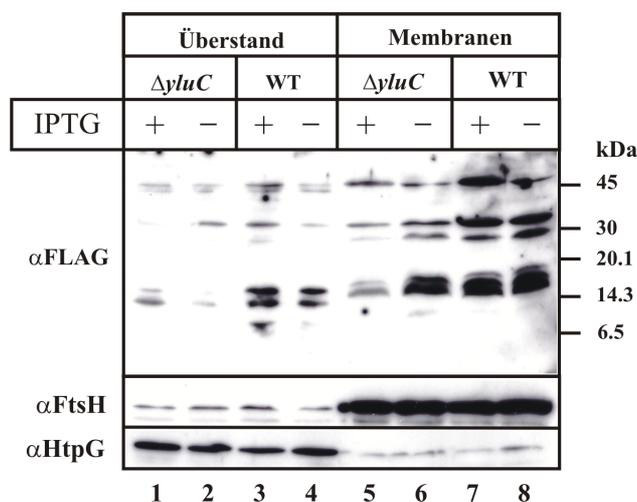


**Abb. 24:** Luminogramm der Immunoblots mit den *B. subtilis*-Stämmen SZ87 (F<sub>3</sub>-YrhM62), SZ88 (F<sub>3</sub>-YrhM62 ΔylyC), SZ85 (F<sub>3</sub>-RsiX70), SZ86 (F<sub>3</sub>-RsiX70 ΔylyC), SZ89 (F<sub>3</sub>-YhdL96) und SZ90 (F<sub>3</sub>-YhdL96 ΔylyC). Die Zahl hinter dem entsprechenden Protein entspricht der Anzahl der exprimierten Aminosäuren des ursprünglichen Proteins. Aufgetragen wurden jeweils Proben des Überstandes (Ü) und der Membranfraktion (M). Alle Proben wurden 60 min nach Induktion mit IPTG (+) gezogen. Zur Unterscheidung von möglichen Kreuzreaktionen wurden auch Proben ohne Induktor (-) aufgetragen. Als Ladungskontrolle diente jeweils ein gleichermaßen durchgeführt Western-Blot, entwickelt mit Antikörpern gegen die membrangebundene Metalloprotease FtsH (70 kDa).

In obiger Abbildung sind Signale für die jeweiligen FLAG-getaggten Proteine nur in Membranfraktionen der ΔylyC-Mutante nachweisbar (Spur 5). Ein Signal für F<sub>3</sub>-YrhM62 (oben) konnte nicht detektiert werden. Für die beiden anderen Anti-Sigmafaktoren waren jedoch jeweils starke Signale sichtbar (Mitte, unten). Dabei lag die Größe der detektierten

Signale im Bereich der berechneten Werte für F<sub>3</sub>-RsiX70 (11,1 kDa) und F<sub>3</sub>-YhdL96 (14,3 kDa).

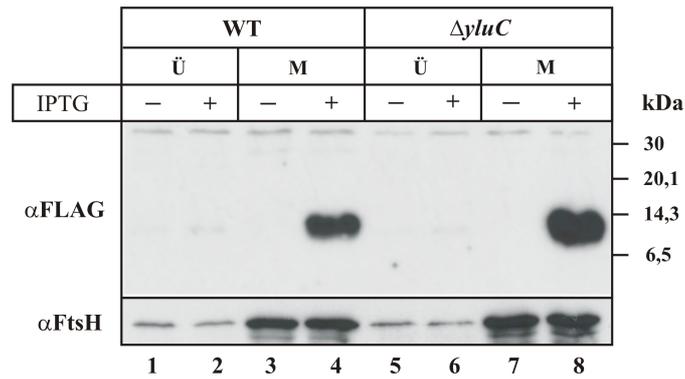
Um festzustellen, ob die Verkürzung der untersuchten Proteine tatsächlich zu einem Abbau durch YluC führt, wurden zwei *B. subtilis*-Stämme konstruiert, die eine FLAG-getaggte Version des vollständigen RsiX-Proteins unter IPTG-Kontrolle exprimierten. Es wäre zu erwarten, dass man dieses Protein, unabhängig von der YluC-Protease, nachweisen könnte. Wie bereits oben beschrieben, wurde das Konstrukt im wildtypischen (*B. subtilis* SZ83) und im  $\Delta yluC$  Hintergrund (*B. subtilis* SZ84) untersucht (Abbildung 25).



**Abb. 25:** Luminogramm des Immunoblots mit den Stämmen *B. subtilis* SZ83 und SZ84. Aufgetragen wurden jeweils Proben des Überstandes und der Membranfraktion. Alle Proben wurden 60 min nach Induktion mit IPTG (+) gezogen. Zur Unterscheidung von möglichen Kreuzreaktionen wurden auch Proben ohne Induktor (-) aufgetragen. Als Ladungskontrollen dienten jeweils gleichermaßen durchgeführte Western-Blots, entwickelt mit Antikörpern gegen die membrangebundene Metalloprotease FtsH (70 kDa) und gegen das cytoplasmatische Protein HtpG (70 kDa).

Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 24 und 25, so kann für das Vollängen-F<sub>3</sub>-RsiX weder im Überstand noch in den Membranen ein Signal detektiert werden (erwartete Größe 44,3 kDa). Auch die Abwesenheit der YluC-Protease scheint keinen Einfluss zu haben, wenn das RsiX in ganzer, wildtypischer Länge vorhanden ist.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde SecE als ein von Natur aus kurzes Membranprotein, dessen N-terminus im Cytoplasma liegt, ebenfalls mit einem FLAG<sub>3</sub>-Tag versehen und jeweils im Wildtyp (*B. subtilis* SZ91) und im  $\Delta yluC$ -Knockout (*B. subtilis* SZ92) untersucht. SecE ist ein Teil des Sekretionskomplexes aus SecY, SecE sowie SecG und hat keinen Bezug zu ECF-Sigmafaktoren. Es besitzt in *B. subtilis* eine Transmembrandomäne und, ähnlich wie bei YlaD, ragen nur wenige Aminosäuren des C-terminalen Endes in den extracytoplasmatischen Bereich (Jeong *et al.*, 1993).



**Abb. 26:** Luminogramm des Immunoblots mit den Stämmen *B. subtilis* SZ91 und SZ92. Aufgetragen wurden jeweils Proben des Überstandes (Ü) und der Membranfraktion (M). Alle Proben wurden 60 min nach Induktion mit IPTG (+) gezogen. Zur Unterscheidung von möglichen Kreuzreaktionen wurden auch Proben ohne Induktor (-) aufgetragen. Als Ladungskontrollen diente ein jeweils gleichermaßen durchgeführt Western-Blot entwickelt mit Antikörpern gegen die membrangebundene Metalloprotease FtsH (70 kDa).

Obige Abbildung zeigt deutlich, dass sowohl in An- als auch in Abwesenheit von YluC ein starkes Signal für F<sub>3</sub>-SecE nur in den Membranfraktionen detektiert werden kann (Spur 4 und 8). Das Signal entspricht in seiner Größe ungefähr dem vorher berechneten Wert von 10 kDa.

#### 4.4.5 Nachweis der Bindung von Zink an YlaD

Wie bereits erwähnt gehört YlaD zu einer neu definierten Familie von Anti-Sigmafaktoren mit einem cytoplasmatischen Hx<sub>3</sub>Cx<sub>2</sub>C-Motiv, welches charakteristisch für die Bindung von Zink ist. Der überexprimierte und sowohl nativ als auch denaturierend aufgereinigte cytoplasmatische Anteil von YlaD wurde auf seine Fähigkeit hin Zink zu binden untersucht. Zusätzlich wurden die beiden Cystein-Reste im H<sub>29</sub>X<sub>3</sub>C<sub>33</sub>X<sub>2</sub>C<sub>36</sub>-Motiv jeweils zu Alanin und Serin mutiert.

##### 4.4.5.1 Nachweis von Zinkionen mittels Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS)

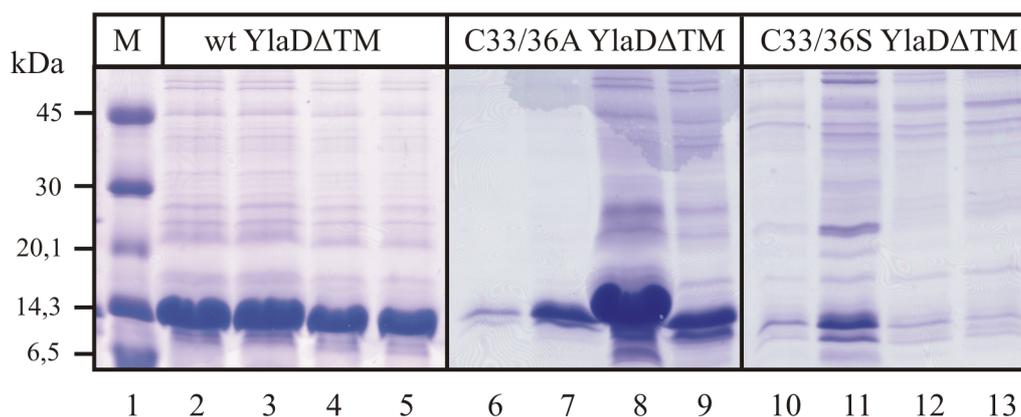
Zur Überexpression und nativen Aufreinigung der cytoplasmatischen Domäne von YlaD wurde das Plasmid pQE30 der Firma Qiagen verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Während der Proteinexpression wurde dem Medium 1 mM ZnSO<sub>4</sub> zugesetzt. Die Konstruktion der Cystein-Austauschmutanten von YlaD erfolgte in einer zweistufigen PCR-Reaktion mit pALF<sub>3</sub>ylaD als Matrize. In der ersten PCR-Reaktion wurde ein Megaprimer mit den notwendigen Basenaustauschen generiert. Dazu wurde ein Primer komplementär zum 5'-Ende des YlaD mit entsprechender Klonierungsschnittstelle und ein Primer, welcher die entsprechenden Basenaustausche enthielt, verwendet. In einer zweiten PCR wurde das Produkt der ersten Reaktion als 5'-Primer und ein Primer komplementär zum 3'-Ende des YlaD mit entsprechender Klonierungsschnittstelle verwendet. In Abbildung 27 sind die

Aminosäuresequenz und die Basenabfolge des wildtypischen YlaD und der Cystein-Mutanten dargestellt.

	<b>HxxxCxxC</b>																	
Glu	His	Leu	Lys	Met	Cys	Ser	Ser	Cys	Arg	Asp	Met	Tyr	Asp	Thr	Met	Ala	Glu	
GAG	CAT	TTA	AAA	ATG	TGC	AGC	AGC	TGC	AGA	GAC	ATG	TAT	GAC	ACG	ATG	GCT	GAG	<b>YlaD<math>\Delta</math>TM WT</b>
GAG	CAT	TTA	AAA	ATG	GCC	AGC	AGC	GCC	AGA	GAC	ATG	TAT	GAC	ACG	ATG	GCT	GAG	<b>YlaD<math>\Delta</math>TM C33/36A</b>
GAG	CAT	TTA	AAA	ATG	AGC	AGC	AGC	AGC	AGA	GAC	ATG	TAT	GAC	ACG	ATG	GCT	GAG	<b>YlaD<math>\Delta</math>TM C33/36S</b>

**Abb. 27:** Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz und der Basenabfolge von YlaD $\Delta$ TM, YlaD $\Delta$ TM C33/36A, YlaD $\Delta$ TM C33/36S. Veränderte Codons sind grau unterlegt; ausgetauschte Basen sind rot bzw. grün markiert. Zinkbindungsmotiv ist rot eingerahmt (oben).

Alle drei klonierten cytoplasmatischen Fragmente wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Nach Überproduktion der drei YlaD-Varianten in *E. coli* als His<sub>6</sub>-getaggte Proteine wurden alle drei Varianten nativ über eine Ni-NTA-Säure nach Angaben des Herstellers Qiagen aufgereinigt (Abbildung 28).



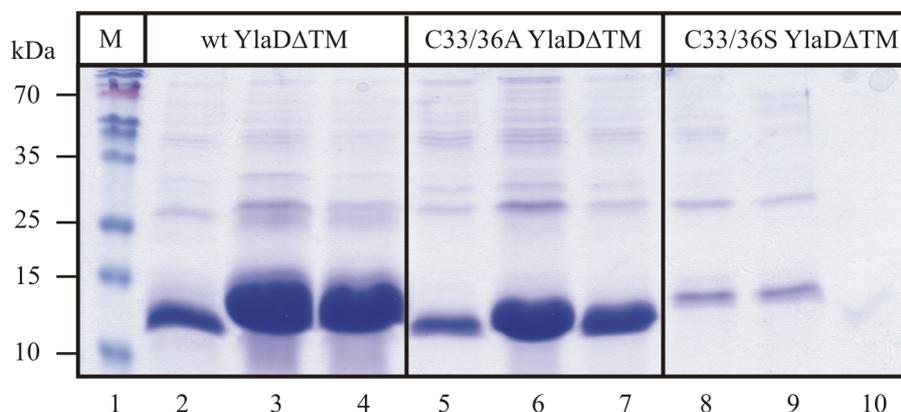
**Abb. 28:** SDS-Gelelektrophorese der nativen Aufreinigung aller drei klonierter YlaD-Mutanten. Aufgetragen sind die Elutionsfraktionen 1-4 der jeweiligen Aufreinigung. Verwendet wurde ein 15%iges Polyacrylamidgel.

Um sämtliche Spuren an Nickel in den Elutionsfraktionen zu entfernen, wurden je 500  $\mu$ l der Eluate durch zweimaliges Waschen mit Elutionspuffer in YM3 Ultrafiltrations-Säulchen der Firma Milipore auf ein Endvolumen von 50  $\mu$ l aufkonzentriert. Dabei konnte für das YlaD $\Delta$ TM C33/36S wegen starker Aggregation nicht genügend Protein isoliert werden (Spuren 10 – 13), um die Messung der Atomabsorption durchzuführen. Der Proteingehalt der aufkonzentrierten Proteinlösungen wurde mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten für His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM von 6640 ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) und His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36A von 6520 ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) bestimmt und für die spektroskopische Bestimmung des Zinkgehalts auf 8  $\mu$ M eingestellt. Der Zinkgehalt beider Proteine wurde in einem Atomabsorptions-Spektroskop (Perkin Elmer 1100B) mit einer Zink-spezifischen Lampe bei 213,8 nm bestimmt. Das Gerät wurde im

Vorfeld der Messung mit verschiedenen  $\text{ZnSO}_4$ -Eichlösungen kalibriert. Als Kontrolle wurde auch der zur Elution und zum Aufkonzentrieren verwendete Puffer auf seinen Zinkgehalt hin überprüft und die gemessenen Werte von denen der Proteinlösungen subtrahiert. Für das wildtypische cytoplasmatische His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM wurde ein Wert von 1,13 Mol Zink pro Mol Protein ermittelt. Für das cytoplasmatische His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36A Fragment konnte kein gebundenes Zink gemessen werden.

#### 4.4.5.2 Colorimetrischer Zinknachweis

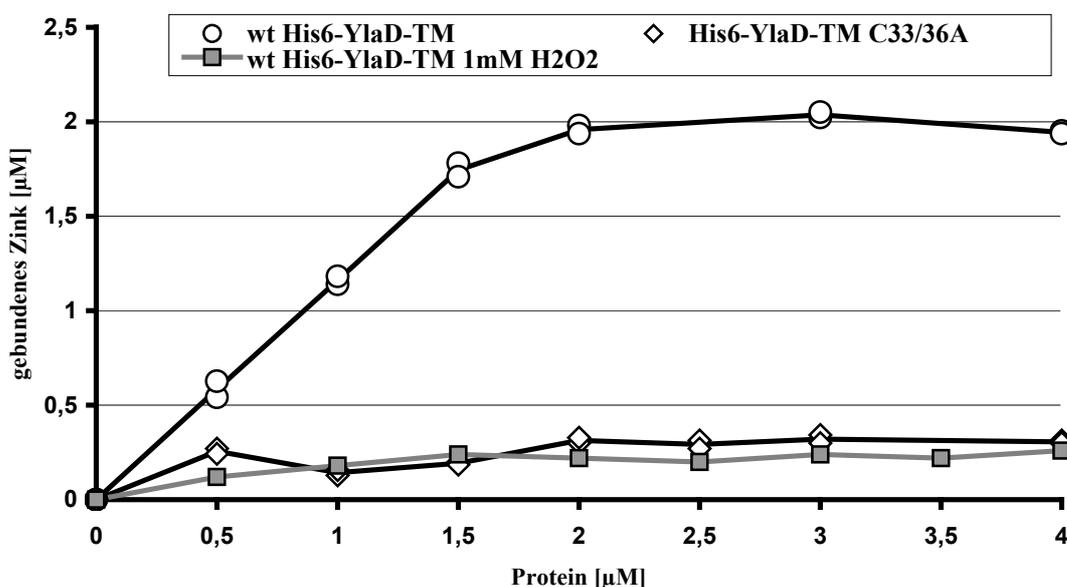
Da durch native Aufreinigung aufgrund der starker Aggregation kein His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36 isoliert werden konnte (Abbildung 28) und um das Ergebnis der spektroskopischen Zinkbestimmung zu bestätigen, wurden alle drei Proteinvarianten denaturierend (8 M Harnstoff) aufgereinigt. Mit den derart aufgereinigten, denaturierten und dann rückgefalteten Proteinen wurde ein colorimetrischer Zinknachweis durchgeführt. Dieser auf einer Farbreaktion mit 4-(2-Pyridylazo)Resorcinol (PAR) basierender Nachweis macht sich den Vorteil zunutze, dass PAR nur mit ungebundenen Zinkionen in Lösung reagiert, während Zink, welches in einem Proteinkomplex gebunden ist, für PAR unzugänglich bleibt.



**Abb. 29:** SDS-Gelelektrophorese der denaturierenden Aufreinigung aller drei klonierten YlaD-Mutanten. Aufgetragen sind die Elutionsfraktionen 1-3 der jeweiligen Aufreinigung. Verwendete wurde ein 15%iges Polyacrylamidgel.

Ähnlich wie in Abbildung 28 konnte auch mit der denaturierenden Aufreinigung (Abbildung 29) keine ausreichende Proteinmenge an His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36S isoliert werden (Spur 8 – 10), da diese Proteinvariante stark aggregierte. Die beiden anderen Proteinvarianten aus der denaturierenden Aufreinigung wurden, wie bereits oben beschrieben, mit Elutionspuffer gewaschen und aufkonzentriert, um alle Spuren von Nickel aus der Lösung zu entfernen. Im Anschluss daran wurden Verdünnungen der jeweiligen Proteinlösungen im Bereich zwischen 50 und 400  $\mu\text{M}$  hergestellt und durch Zugabe von 100fachem Überschuss an

Rückfaltungspuffer (25 mM Hepes, 300 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7,6) mit 2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  rückgefaltet. Danach wurde der Gehalt an freiem Zink in den Proteinlösungen (0,5 bis 4  $\mu\text{M}$ ) durch Reaktion mit PAR nach der Formel  $[(E_{490P_0}) - (E_{490P_x})] \cdot F$  bestimmt. Dabei bezeichnet  $(E_{490P_0})$  die Extinktion bei 490 nm ohne Protein, während  $(E_{490P_x})$  für die Extinktion bei 490 nm mit der entsprechenden Proteinkonzentration x steht. F (14,25) bezeichnet einen aus einer Eichkurve mit verschiedenen  $\text{ZnCl}_2$ -Konzentrationen abgeleiteten Umrechnungsfaktor (Daten nicht gezeigt).



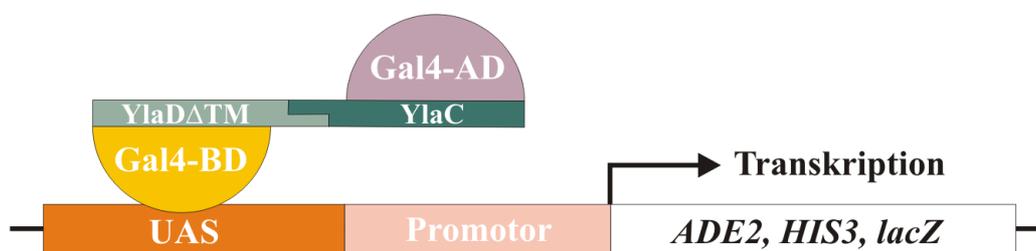
**Abb. 30:** Verschiedene Proteinmengen von His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM und His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36A gelöst in 8 M Harnstoff-Puffer wurden mit einem 100fachen Überschuss an Puffer (25 mM Hepes, 300 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7,6) mit 2  $\mu\text{M}$  und 1 mM DTT verdünnt, um die denaturierten Proteine rückzufalten. Um das Zink im Puffer auszutitrieren, wurden die Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,5 bis 4  $\mu\text{M}$  variiert. Freies, nicht gebundenes Zink in Lösung wurde kolorimetrisch mit dem Farbstoff PAR bestimmt und die Menge an Protein-gebundenem Zink nach o. g. Gleichung berechnet. Als Kontrolle wurde wt His<sub>6</sub>-YlaD in obigem Puffer anstatt mit 1 mM DTT mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt.

Die obige Graphik (Abbildung 30) zeigt, dass wt His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM (○) in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Atom-Absorptionsspektroskopie, Zink in nahezu äquimolaren Mengen bindet, da oberhalb einer Proteinkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  kein freies Zink mehr detektiert werden konnte. Gegensätzlich dazu bindet die Variante mit mutiertem Zink-Bindungsmotiv (His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36S) nur geringe Mengen an Zink (◇). Ein ebenfalls aufgereinigtes Protein ohne Zink-Bindungsmotiv (Pbp4\*) ergab im selben Experiment annähernd die gleichen Werte für die Zink-Bindung wie His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM C33/36S. Zu Gunsten der Übersichtlichkeit sind diese Daten in obiger Abbildung nicht aufgeführt. Behandelt man das wt His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM im Rückfaltungspuffer mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

anstatt mit 1 mM DTT, so erhält man ebenfalls nur eine geringe Zink-Bindung (□), wodurch die Wichtigkeit von reduzierten Cysteinen für die Komplexierung von Zink betont wird.

#### 4.5 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen YlaC und YlaD

Um herauszufinden, ob es *in vivo* eine direkte Interaktion zwischen dem ECF-Sigmafaktor YlaC und der cytoplasmatischen Domäne seines Anti-Sigmafaktors YlaD gibt, wurde ein Hefe-Two-Hybrid Experiment durchgeführt. Diese Technik bedient sich des modularen Aufbaus von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren, deren DNA-Bindungsdomäne von ihrer Aktivierungsdomäne physikalisch getrennt werden kann. Zwei potentielle Interaktionspartner werden an die DNA-Bindungsdomäne bzw. an die Transaktivierungsdomäne, in unserem Fall von Gal4, fusioniert. Um einen funktionsfähigen Transkriptionsaktivator Gal4 zu bekommen, müssen die beiden, voneinander getrennten Domänen über die Wechselwirkung der mit ihnen fusionierten, zu untersuchenden Proteine in physikalischen Kontakt kommen. Falls es eine Wechselwirkung zwischen den zu untersuchenden Proteinen gibt, wird ein funktionsfähiger Gal4-Transkriptionsaktivator gebildet, der daraufhin die Transkription von Reportergenen aktivieren kann. Als Reporter verwendet man u. a. Gene, die nach Aktivierung bestimmte Auxotrophien des verwendeten Hefestammes komplementieren können (Abbildung 31).

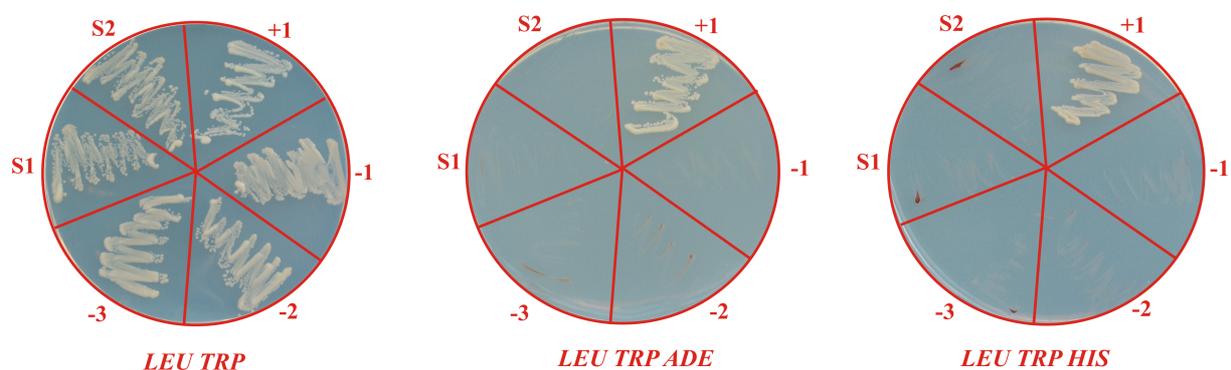


#### Two-Hybrid Wechselwirkung

**Abb. 31:** Schematischer Aufbau des mit YlaD und YlaC durchgeführten Hefe-Two-Hybrid Experiments. Die N-terminale cytoplasmatische Domäne von YlaD wurde an die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 fusioniert. Der cytoplasmatische ECF-Sigmafaktor YlaC wurde an die Transaktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert. Als Reportergene wurden *ADE2* und *HIS3* verwendet.

Um eine direkte Wechselwirkung zwischen YlaC und dem cytoplasmatischen Anteil von YlaD nachzuweisen, wurde das „Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3“ der Firma Clontech verwendet. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde ein Derivat von pGBKT7 benutzt, welches eine singuläre *SpeI*-Schnittstelle vor dem Startcodon der Gal4-DNA-Bindungsdomäne besitzt (S. Heidmann, unveröffentlicht). Somit konnte ein Fusionsprotein kloniert werden, in dem die cytoplasmatische Domäne von YlaD den N-

Terminus und die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 den C-Terminus bildet (pGBKT7spe-*ylaD*). Das Fusionsprotein aus YlaC und der Aktivierungsdomäne von Gal4 wurde nach Angaben des Herstellers kloniert (pGADT7-*ylaC*). Die durch DNA-Sequenzierung und Restriktionsanalyse überprüften Plasmide wurden in den Hefestamm *S. cerevisiae* AH109 transformiert. Zur Selektion auf eine erfolgreiche Transformation der Plasmide enthielten diese die Selektionsmarker *TRP1* und *LEU2*, um die entsprechenden Auxotrophien des Hefestammes *S. cerevisiae* AH109 für die Biosynthese der Aminosäuren Tryptophan und Leucin zu komplementieren. Als Kontrolle wurden die Plasmide in verschiedenen Kombinationen, jeweils zusammen mit leeren Klonierungsvektoren, in *S. cerevisiae* AH109 transformiert (Abbildung 32). Als Positivkontrolle dienten vom Hersteller bereitgestellte Plasmide, die das Protein p53, fusioniert an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne, und ein Tumor-Antigen, fusioniert an die Gal4-Aktivierungsdomäne, enthielten. Da das Tumor-Antigen eine starke Wechselwirkung mit p53 eingeht, werden die Reportergene des Two-Hybrid Systems aktiviert. Abbildung 32 zeigt die Ausstriche der konstruierten Hefestämme auf Selektivmedien ohne *LEU*, *TRP* (links), ohne *LEU*, *TRP* und *ADE* (Mitte) und ohne *LEU*, *TRP* und *HIS* (rechts).



Nr.	BD	AD
+1	<i>pGBKT7-53</i>	<i>pGADT7-T</i>
-1	<i>pGBKT7spe-ylaD</i>	<i>pGADT7-T</i>
-2	<i>pGBKT7spe</i>	<i>pGADT7-ylaC</i>
-3	<i>pGBKT7spe</i>	<i>pGADT7-T</i>
S1	<i>pGBKT7spe-ylaD</i>	<i>pGADT7-ylaC</i>
S2	<i>pGBKT7spe-ylaD</i>	<i>pGADT7-ylaC</i>

**Abb. 32:** Ausstriche verschiedener Hefe-Transformationen auf Selektivmedien zur Selektion auf erfolgreiche Transformation (*LEU*, *TRP*) und zur Aktivierung der Reportersysteme für den Nachweis einer Interaktion zwischen YlaC und YlaD (*ADE* und *HIS*). Die Platten sind in 6 Sektoren unterteilt, in denen die Hefe-Stämme mit der Kombination an Plasmiden aus der unteren Tabelle ausgestrichen sind (unten). Die Abkürzungen „BD“ und „AD“ stehen für DNA-Bindungs-Domäne und Trans-Aktivierungs-Domäne (jeweils bezogen auf Gal4).

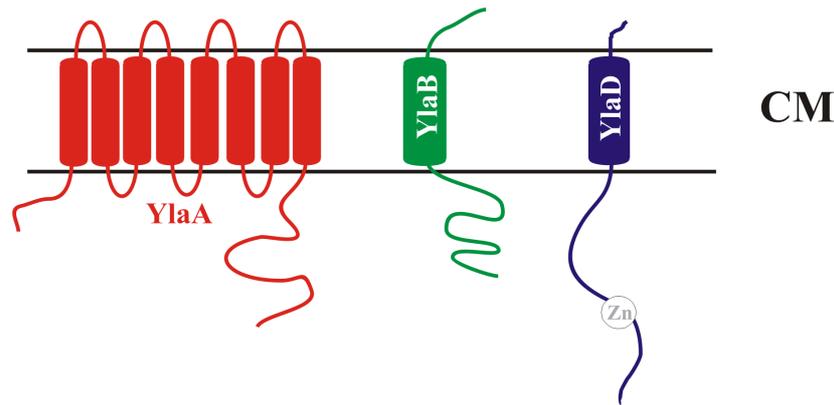
Es ist ganz klar zu sehen, dass alle Stämme die transformierten Plasmide aufgenommen und exprimiert haben, sonst wäre ein Wachstum auf Selektivmedium ohne Leucin und Tryptophan

(links) nicht möglich. Lediglich die als Positivkontrolle eingesetzte Kombination der Plasmide pGBKT7-53 und pGADT7-T (+1) war in der Lage, sowohl das *ADE*- als auch das *HIS*-Reportersystem zu aktivieren. Weder die als Negativkontrollen eingesetzten Kombinationen an Plasmiden (-1, -2, -3) noch die eigentlichen Versuchsansätze aus pGBKT7*spe-ylaD* und pGADT7-*ylaC* (S1 und S2) waren in der Lage, eines der Reportersysteme zu aktivieren. Somit konnte *in vivo* keine Interaktion zwischen der cytoplasmatischen Domäne von YlaD und dem ECF-Sigmafaktor YlaC nachgewiesen werden.

Zu dem gleichen Resultat führte ein *in vitro* Experiment, in dem His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM, gebunden an eine Ni-NTA-Säule, mit Extrakt aus *B. subtilis* Zellen (SZ115) inkubiert wurde. In diesem *B. subtilis* Stamm wurde F<sub>3</sub>-YlaC unter der Kontrolle des IPTG-regulierten Promotors *P<sub>spac</sub>* überproduziert. Nach Elution des YlaD von der Säule konnte im Western-Blot mit FLAG-Antikörpern kein Signal detektiert werden, während die Signalstärke für F<sub>3</sub>-YlaC im Extrakt vor und nach der Inkubation mit an die Ni-NTA gebundenem His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM unverändert blieb (Daten nicht gezeigt).

#### 4.6 Einfluss von YlaA und YlaB auf die Aktivität von YlaC bzw. YlaD

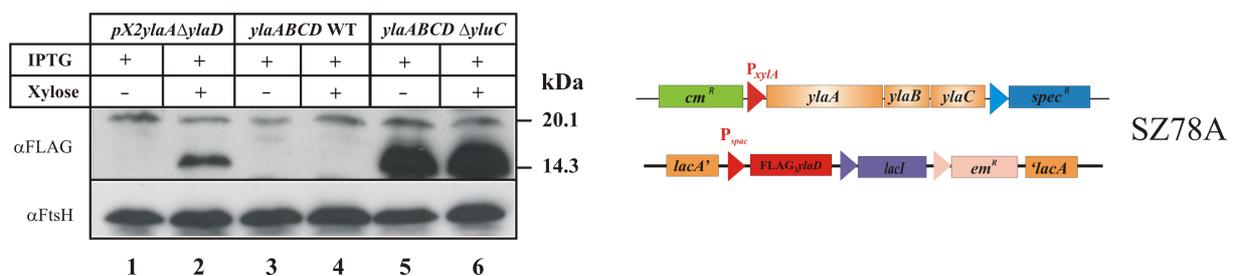
Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass YlaD als Anti-Sigmafaktor zu YlaC wirkt, aber nicht direkt mit YlaC interagiert und offensichtlich permanent durch die Protease YluC abgebaut wird. Da *ylaD* in einem Operon kodiert ist, in dem neben *ylaC* zwei weitere Gene (*ylaA* und *ylaB*) liegen, lag es nahe, einen Einfluss dieser Gene auf die Stabilität bzw. Anti-Sigmafaktor- Aktivität von YlaD zu untersuchen. Dabei kodiert das *ylaA*-Gen laut Vorhersage entsprechender Computerprogramme für ein Membranprotein mit acht Transmembran-Segmenten und einer Länge von 646 Aminosäuren. Vergleicht man die DNA-Sequenz des *ylaA*-Gens mit Sequenzen aus online-Datenbanken, so erhält man nur wenige Treffer. Am interessantesten war eine vorhandene Ähnlichkeit zu einem bereits bekannten Protein aus *E. coli*, welches durch Kohlenstoffmangel induziert wird (Schultz und Matin, 1991). Wie jedoch die Versuche mit der Reporterfusion aus *lacZ* und dem *ylaA*-Promotor (4.2) zeigten, hatte der Einsatz alternativer Kohlenstoffquellen keinen Einfluss auf die LacZ-Aktivität des Reporterkonstruktes. Das zweite Gen des *ylaA*-Operons, *ylaB*, kodiert für ein nur 89 Aminosäuren-langes Membranprotein mit einer vorhergesagten Transmembrandomäne am C-terminalen Ende des Proteins, ähnlich wie es bei YlaD der Fall ist (siehe Abbildung 33).



**Abb. 33:** Schematische Darstellung der Membranproteine YlaA, YlaB und YlaD in der cytoplasmatischen Membran (CM).

#### 4.6.1 Stabilisierung von YlaD durch Coexpression von *ylaABC*

Um einen Einfluss von YlaA und/oder YlaB auf die Stabilität von YlaD zu untersuchen, wurde ein Western-Blot-Experiment mit einem *B.subtilis*-Stamm, in dem das *ylaA*-Operon unter der Kontrolle eines Xylose-regulierbaren Promotors steht, und das *ylaD*-Gen deletiert ist, durchgeführt. Zusätzlich wurde ektopisch eine FLAG-getaggte Version von YlaD unter IPTG-Kontrolle exprimiert (SZ78A). Als Kontrollen wurden *B. subtilis*-Stämme verwendet, die im Gegensatz zu SZ78A ein wildtypisches *ylaA*-Operon enthielten (SZ80) bzw. in denen die YluC-Protease deletiert war (SZ81). Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse des Western-Blots mit Membranfraktionen der *B. subtilis*-Stämme SZ78A, SZ80 und SZ81).



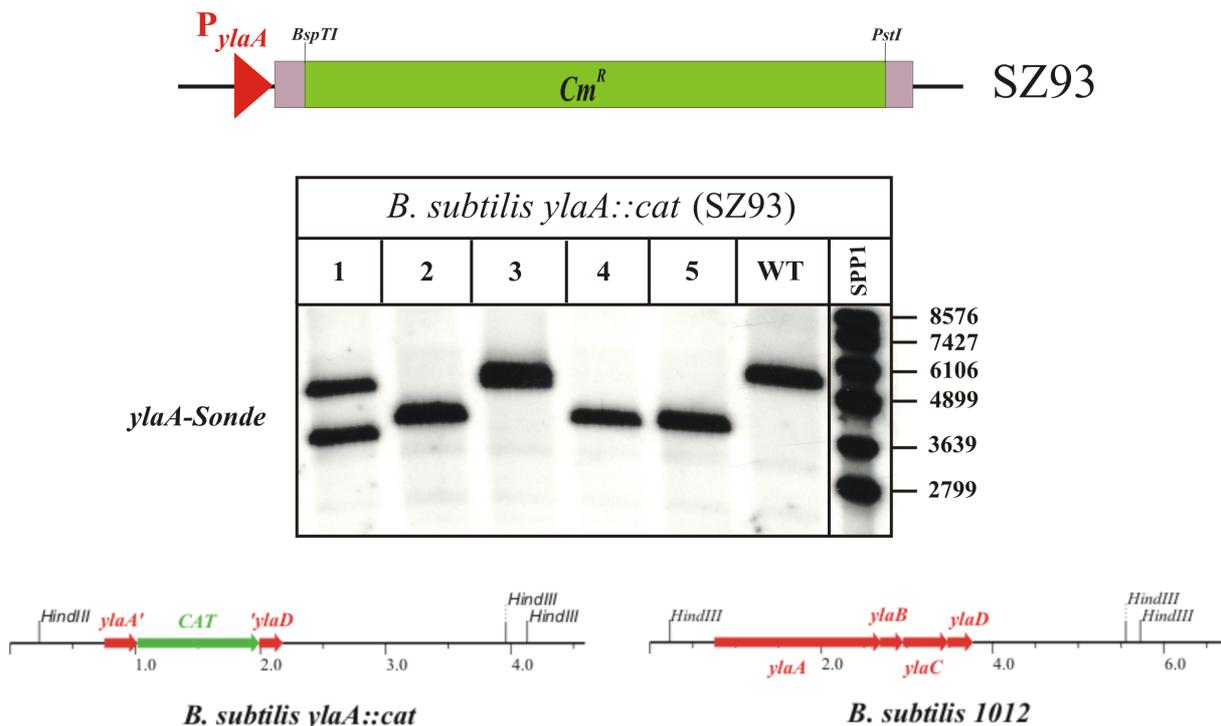
**Abb. 34:** Luminogramm des Western-Blots mit den Stämmen *B. subtilis* SZ78, SZ80 und SZ81. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen an Proben der Membranfraktionen. Alle Proben wurden 60 min nach Induktion mit IPTG (1 mM)/Xylose (2 %) gezogen (+). Als Kontrolle wurden ebenfalls Proben von nicht induzierten Kulturen entnommen (-). Entwickelt wurde der Western-Blot mit Antikörpern gegen den FLAG-Epitop-Tag. Als Ladungskontrolle diente ein gleichermaßen durchgeführt Western-Blot entwickelt mit Antikörpern gegen die membrangebundene Metalloprotease FtsH (70 kDa) (links). Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ78A (rechts).

In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass man ein Signal für das Flag<sub>3</sub>-YlaD nur detektieren kann, wenn zusätzlich die Komponenten YlaA, YlaB und YlaC, kontrolliert über einen Xylose-regulierbaren Promotor, produziert werden (Spur 2). Ohne Zugabe von Xylose fehlt das Signal für F<sub>3</sub>-YlaD (Spur 1). In *B. subtilis* SZ80, der das wildtypische *ylaA*-Operon enthält, ist unabhängig von Xylose-Zugabe kein Signal für F<sub>3</sub>-YlaD detektierbar (Spuren 3

und 4). Fehlt jedoch zusätzlich die YluC-Protease (*B. subtilis* SZ81), so detektiert man starke Signale für F<sub>3</sub>-YlaD, unabhängig von der Zugabe von Xylose (Spuren 5 und 6).

#### 4.6.2 Konstruktion einer *ylaA*-Knockout-Mutante

Um den Einfluss der beiden ersten Gene des *ylaA*-Operons auf die Aktivität von YlaC genauer zu untersuchen, sollte ein Reportersystem konstruiert werden. Dazu musste zunächst das wildtypische *ylaA*-Operon durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette inaktiviert werden. Das gesamte *ylaA*-Operon flankiert von einer *HindIII*- und einer *BamHI*-Schnittstellen wurde PCR-amplifiziert und in den Vektor pBR322 kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pOPER<sub>*ylaA*</sub> wurde mit den Restriktionsenzymen *BspTI* und *PstI* geschnitten, wodurch ein Großteil des *ylaA*-Operons entfernt wurde. In das derart verdaute Plasmid pOPER<sub>*ylaA*</sub> wurde ein Chloramphenicol-Resistenzgen kloniert, das mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde. Somit erhielt man das Plasmid pOPER<sub>*ylaA*</sub>::*cat*, welches dann in kompetente *B. subtilis* 1012 Zellen transformiert wurde. Von positiven Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert und mittels Southern-Blot überprüft (Abbildung 35).



**Abb. 35:** Schematisch Darstellung des *B. subtilis* Stammes SZ93 (oben). Southern-Blot von 5 Transformanten im Vergleich mit chromosomaler DNA aus *B. subtilis* 1012. Verwendet wurde eine Sonde gegen *ylaA*. Verdaut wurde die chromosomale DNA mit *HindIII* (Mitte). Chromosomale Situation in *B. subtilis* 1012 und SZ93 mit den für den Southern Blot relevanten *HindIII*-Schnittstellen (unten).

Nach Verdau mit *HindIII* würde man mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das *ylaA*-Gen im Falle des ausgeknockten *ylaA*-Operons ein Fragment von 3725 bp erwarten. Dies trifft

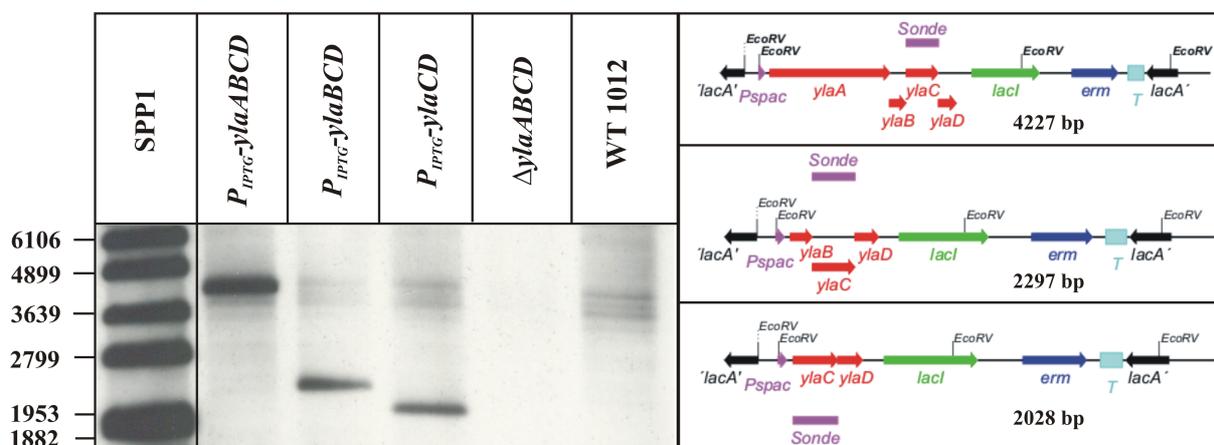
für die Klone in den Spuren 2, 4 und 5 zu. Der Verdau der Klone 1 und 3 ergab ein Fragment der Größe 5315 bp, was der chromosomalen Situation des Wildtyps entsprach.

#### 4.6.3 Konstruktion von Reporterstämmen, um den Einfluss von YlaA und YlaB auf die Aktivität von $\sigma^{YlaC}/YlaD$ zu messen

Chromosomale DNA des *ylaA::cat*-Stammes wurde zur Konstruktion der Reporterstämmen in kompetente *B. subtilis*-Zellen des Stammes SZ70 transformiert. Somit erhält man einen Stamm, der im *amyE*-Lokus die Transkriptionsfusion *ylaA-lacZ*, eine Spectinomycin-Resistenzkassette im *lacA*-Lokus und ein inaktiviertes *ylaA*-Operon enthält. Die Spectinomycin-Resistenzkassette kann dann durch Konstrukte ersetzt werden, die verschiedene Komponenten des *ylaA*-Operons exprimieren. Durch die *ylaA-lacZ*-Fusion können die Auswirkungen der Expression unterschiedlicher Komponenten des *ylaA*-Operons indirekt über die LacZ-Aktivität gemessen werden. In das Reporterkonstrukt wurden verschiedene Gene des *ylaA*-Operons unter Kontrolle eines IPTG-regulierbaren Promotors eingekreuzt:

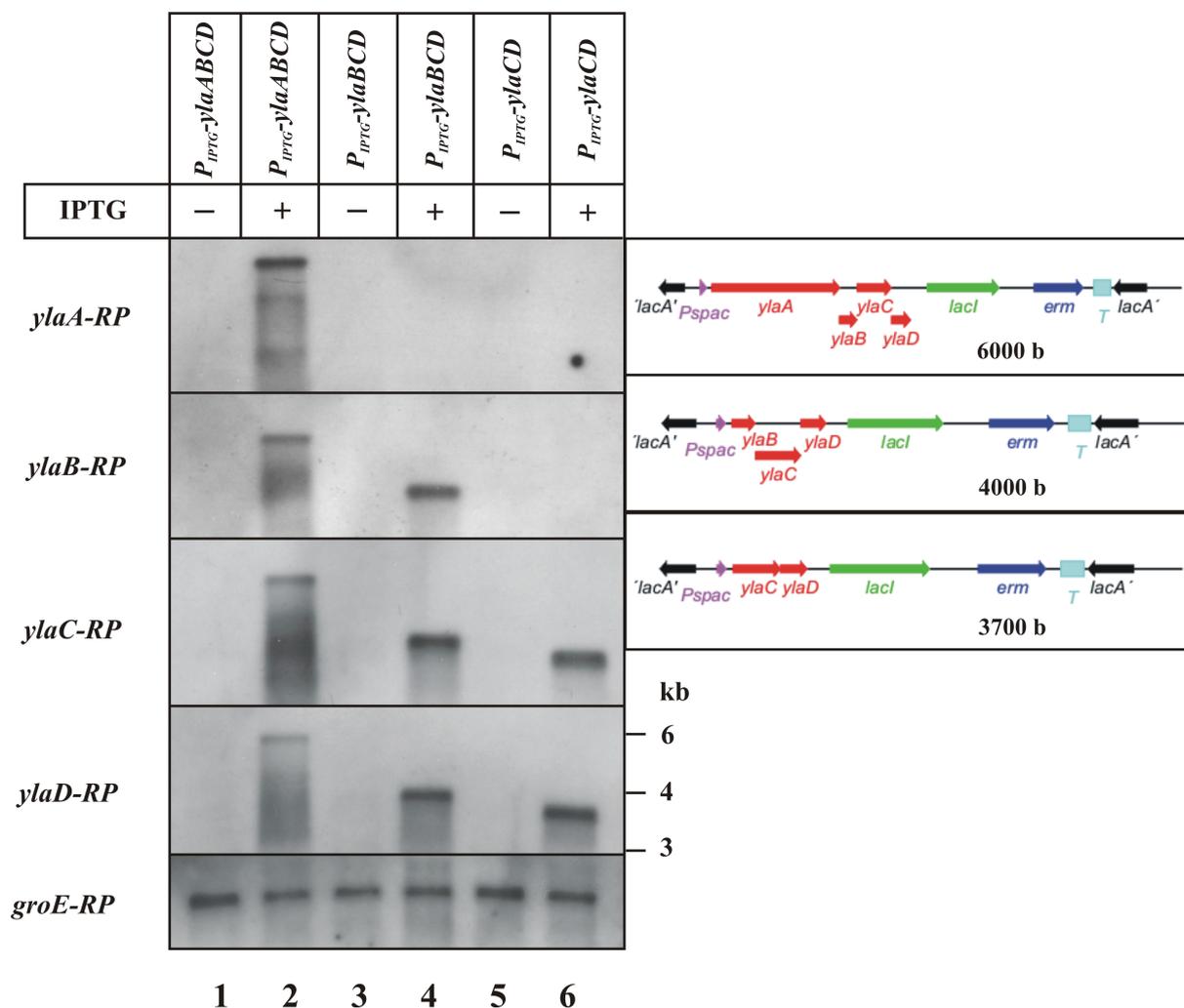
- das komplette *ylaA*-Operon (SZ98)
- *ylaBCD* (SZ97)
- *ylaCD* (SZ96)

Die daraus resultierenden *B. subtilis*-Stämme SZ96, SZ97 und S98 wurden durch Southern-Blot- und Northern-Blot-Analysen auf die korrekte Insertion der Konstrukte und auf die tatsächliche Expression der einzelnen Komponenten des *ylaA*-Operons überprüft (Abbildungen 36 und 37).



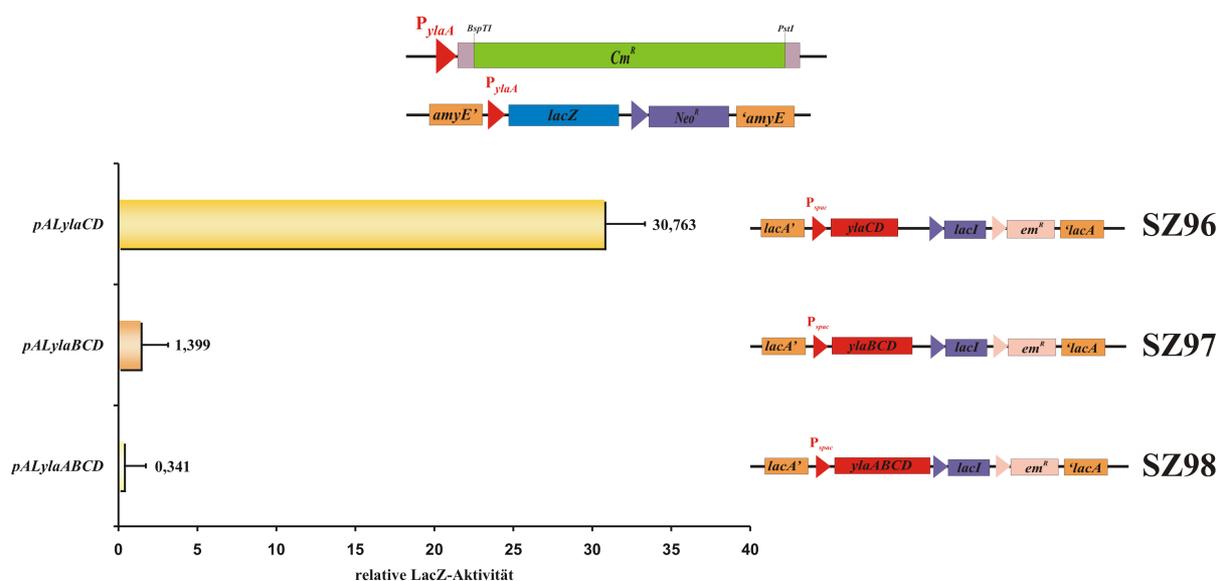
**Abb. 36:** Luminogramm des Southern-Blots der *B. subtilis*-Stämme SZ96, SZ97, SZ98, SZ93 und WT1012. Chromosomale DNA aus allen 5 Stämmen wurden mit *EcoRV* geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebロットet. Der Blot wurde mit einer DIG-markierten Sonde gegen *ylaC* hybridisiert (links). Die ausschlaggebende chromosomale Organisation der Stämme SZ98, SZ97, SZ96 und die Größe der erwarteten Fragmente (rechts).

Die Richtigkeit der konstruierten Stämme SZ96, SZ97 und SZ98 wird durch die korrekten Fragmentgrößen (Abbildung 36) bestätigt. Ob die eingekreuzten Konstrukte nach IPTG-Zugabe wirklich exprimiert wurden, sollte im Northern-Blot getestet werden. Dazu wurde Gesamt-mRNA aller drei Stämme mit und ohne IPTG-Induktion isoliert. Jeweils 2 µg der isolierten mRNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und durch Anlegen eines Vakuums auf eine ungeladene Nylonmembran übertragen. Die Membranen wurden dann mit DIG-markierten mRNA-Sonden hybridisiert. Die Visualisierung schließlich erfolgte durch einen an Alkalische-Phosphatase gekoppelten, sekundären Antikörper (Abbildung 37).



**Abb. 37:** Luminogramm der Northern-Blot-Analyse mit den *B. subtilis*-Stämmen SZ96, SZ97 und SZ98. Gesamt-mRNA aus allen drei Stämmen wurde jeweils 20 min nach IPTG-Zugabe isoliert. Als Kontrolle wurde ebenfalls mRNA aus den Stämmen ohne IPTG-Zugabe isoliert. Nachdem je 2 µg mRNA pro Spur im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembrane geblottet wurde, wurden die Membranen mit DIG-markierten mRNA-Sonden gegen die Gene *ylaA*, *ylaB*, *ylaC* und *ylaD* hybridisiert. Als Ladungskontrolle wurde ein Blot mit einer Sonde gegen *groE* hybridisiert (links). Ein schematischer Aufbau der relevanten chromosomalen Situation in den jeweiligen Stämmen, inklusive der zu erwartenden Transkriptlängen, sind rechts gezeigt.

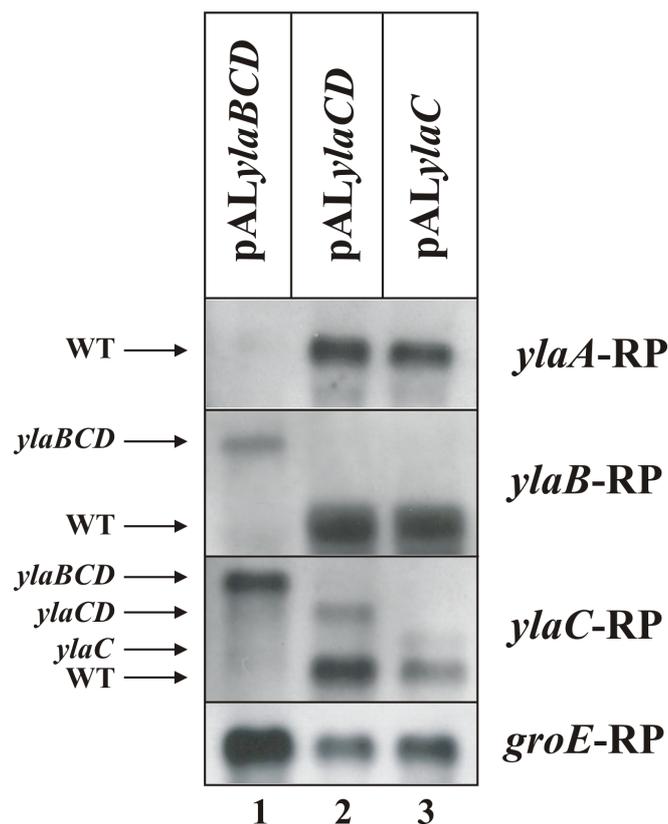
Abbildung 37 zeigt deutlich, dass in allen Stämmen die korrekten Transkripte präsent sind, sofern man IPTG zum Medium gibt, und auch mit den entsprechenden DIG-markierten RNA-Sonden nachgewiesen werden können. Auch die Ladungskontrolle belegt die ungefähr gleichmäßige Beladung aller Spuren. Mit den soweit im Northern-Blot und Southern-Blot überprüften Stämmen wurden letztendlich LacZ-Tests durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der unterschiedlich exprimierten Komponenten des *ylaA*-Operons auf die *ylaA-lacZ* Transkriptionsfusion zu ermitteln. Dazu wurden die Stämme *B. subtilis* SZ96, SZ97 und SZ98 ausgehend von einer Vorkultur auf eine OD<sub>578</sub> von 0,05 inokuliert und unter kräftigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5 wurde den jeweiligen Kulturen 1 mM IPTG zugesetzt. Aliquots von je 2 ml wurden nach 60 min entnommen, aufgeschlossen und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Abbildung 38.



**Abb. 38:** Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation der *B. subtilis*-Stämme SZ96, SZ97 und SZ98 und der gemessenen LacZ-Aktivitäten nach 60-minütiger Induktion mit 1 mM IPTG. Fehlerbalken entsprechen den ermittelten Werten der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler.

Wird das gesamte *ylaA*-Operon (*ylaABCD*) nach IPTG-Zugabe induziert, so kann man nur eine sehr geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messen (*B. subtilis* SZ98). Diese Aktivität steigt um das vierfache an, wenn man nur die Gene *ylaBCD* exprimiert (*B. subtilis* SZ97). Lässt man bei der Expression ein weiteres Gen, das *ylaB*, weg und exprimiert nur *ylaCD*, so steigt die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität sogar um den Faktor 22 (*B. subtilis* SZ96). Die hier untersuchten Konstrukte wurden alle im genetischen Hintergrund des deletierten wildtypischen *ylaA*-Operons untersucht. Um den bisher gezeigten Einfluss der verschiedenen Komponenten des *ylaA*-Operons auf die Aktivität von YlaC/YlaD zu erhärten, wurden die

unter der Kontrolle des IPTG-regulierbaren Promotors stehenden Konstrukte aus den Stämmen *B. subtilis* SZ96, SZ97 und SZ98 in den wildtypischen Hintergrund transformiert. Diese Stämme enthielten also ein intaktes wildtypisches *ylaA*-Operon und die unterschiedlichen Konstrukte im *lacA*-Lokus. Induziert man diese Stämme nun durch Zugabe von IPTG, so würde man auf mRNA-Ebene ein Transkript für das exprimierte Konstrukt erwarten (siehe Abbildung 37). Aufgrund der bereits gezeigten Autoregulation des *ylaA*-Operons würde man, bedingt durch unterschiedliche Aktivität von YlaC bzw. einer geänderten Stabilität von YlaD, zusätzlich ein Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons erwarten. Von den *B. subtilis* Stämmen SZ100 (*lacA*::pAL*ylaC*), SZ101 (*lacA*::pAL*ylaCD*) und SZ102 (*lacA*::pAL*ylaBCD*) wurden Kulturen beim Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5 für 90 min mit 1 mM IPTG induziert. Diese verlängerte Induktion ist notwendig, um die Auswirkungen der durch die IPTG-Zugabe induzierten, ektopisch integrierten Komponenten des *ylaA*-Operons auf die Transkription des wildtypischen *ylaA*-Operons detektieren zu können (Abbildung 39).



**Abb. 39:** Luminogramm der Northern-Blot-Experimente mit den *B. subtilis* Stämmen SZ100 (*lacA*::pAL*ylaC*), SZ101 (*lacA*::pAL*ylaCD*) und SZ102 (*lacA*::pAL*ylaBCD*). Diejenigen Transkripte, welche durch IPTG-Zugabe der im *lacA*-Lokus integrierten Konstrukte hervorgerufen wurden, sind mit den jeweiligen exprimierten Komponenten des *ylaA*-Operons (*ylaBCD*, *ylaCD*, *ylaC*) bezeichnet. Die Transkripte des wildtypischen *ylaA*-Operons sind mit der Bezeichnung „WT“ gekennzeichnet. Pro Spur wurden jeweils 2 µg Gesamt-mRNA aufgetragen. Als Sonden wurden, je nach Angabe, DIG-markierte RNA-Sonden gegen *ylaA*, *ylaB*, *ylaC* verwendet. Als Ladungskontrolle wurde eine Sonde gegen *groE* eingesetzt.

Verwendet man eine Sonde gegen *ylaA* (Abbildung 39, oberste Reihe), so kann man lediglich ein Signal für das Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons (3 kb) detektieren, da diese Komponente nicht ektopisch durch IPTG-Zugabe induzierbar ist. Dieses Signal wird nur detektiert, wenn ektopisch *ylaCD* und *ylaC* exprimiert werden. Durch Verwendung einer *ylaB*-Sonde kann das ektopisch induzierte *ylaBCD*-Transkript (4 kb) gezeigt werden. Das wildtypische Transkript ist jedoch nur nach Expression von *ylaCD* bzw. *ylaC* messbar (Abbildung 39, zweite Reihe). Ähnlich ist die Situation bei Verwendung einer *ylaC*-Sonde, durch die das Vorhandensein der korrekten, ektopisch induzierten *ylaCD*- und *ylaC*-Transkripte (3,7 kb und 3,4 kb) nachgewiesen werden konnte. Auch hier ist das wildtypische Transkript nur in den Spuren 2 und 3 nachweisbar. Da bei Expression von *ylaBCD* kein wildtypisches Transkript nachgewiesen werden konnte (Abbildung 39 oben), besteht die Möglichkeit, dass YlaB einerseits die Stabilität von YlaD, dem Anti-Sigmafaktor von  $\sigma^{YlaC}$ , beeinflusst, andererseits selbst als negativer Regulator von  $\sigma^{YlaC}$  wirken kann.

#### 4.7 Einfluss von YlaB auf die Stabilität von YlaD

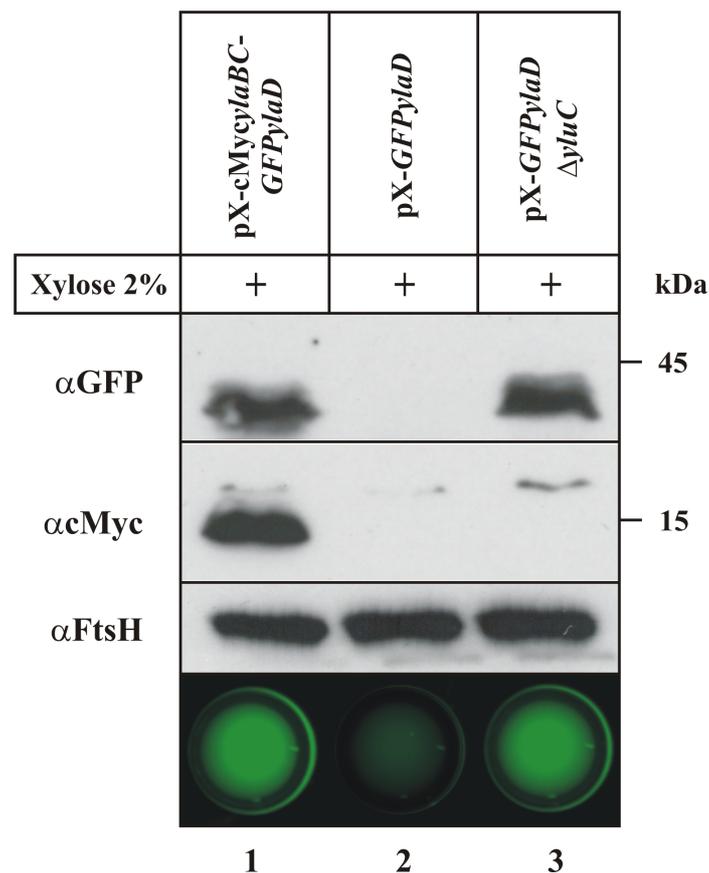
Um einen direkten Einfluss von YlaB auf die Stabilität von YlaD zu untersuchen, wurde ein Expressionsvektor konstruiert, mit dessen Hilfe man sowohl YlaB als auch YlaD als Fusionsproteine exprimieren kann. Dazu wurde an das N-terminale Ende von YlaB ein cMyc-Epitop-Tag fusioniert und das „Grün Fluoreszierende Protein“ (GFP) an das N-terminale Ende von YlaD. In Ermangelung von Antikörpern gegen YlaB und YlaD konnten diese Proteine nun mit kommerziellen Antikörpern gegen den cMyc-Tag und gegen GFP detektiert werden. Die Fusionsproteine stehen unter der Kontrolle eines starken, Xylose-induzierbaren Promotors. Das gesamte Konstrukt kann ins Chromosom von *B. subtilis*, genauer gesagt in den *amyE*-Lokus, integriert werden (Abbildung 40).



**Abb. 40:** Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ113.

Ebenso wurde ein weiterer *B. subtilis*-Stamm konstruiert, der nur das GFP-YlaD-Fusionsprotein exprimiert (SZ105). Als zusätzliche Kontrolle wurde in *B. subtilis* SZ105 das Gen für die Protease YluC deletiert (*B. subtilis* SZ107), da ja bereits gezeigt werden konnte, dass ein FLAG-getaggtetes YlaD in Abwesenheit von YluC, in großen Mengen, nachgewiesen werden kann (4.4.2). Die Expression der Fusionsproteine in allen drei Stämme während der

exponentiellen Wachstumsphase erfolgte durch Zugabe von 2 % Xylose zum Medium beim Erreichen einer  $OD_{578}$  von 0,5. Nach einer weiteren Stunde wurden Zellen aus allen drei Stämmen pelletiert, in eiskaltem Aufschlusspuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 7,5 und 1 Tablette Complete-Protease-Inhibitor (Roche) auf 10 ml) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Proteingehalt aller Proben wurde nach Bradford ermittelt und jeweils 10  $\mu$ g Gesamtprotein wurde pro Spur auf ein 12%iges SDS-Gel geladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer auf Nitrocellulosemembranen und im Anschluss daran der Nachweis der Fusionsproteine durch spezifische Antikörper gegen GFP bzw. den cMyc-Affinitätstag (Sigma). Zusätzlich wurden je 30  $\mu$ l der aufgeschlossenen Zellen gleichen Gesamtproteingehalts in einer Mikrotiterplatte mit fluoreszierendem Licht bestrahlt und mit Hilfe einer speziellen Kamera photographiert (Abbildung 41).



**Abb. 41:** Luminogramm der Western-Blots und Aufnahme der mit fluoreszierendem Licht bestrahlten Gesamt-Zellextrakte der *B. subtilis*-Stämme SZ113 (Spur 1), SZ105 (Spur 2) und SZ107 (Spur 3). Jede Spur wurde mit 10  $\mu$ g Gesamtprotein beladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Nitrocellulose-Membranen wurden diese Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen GFP und cMyc inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems.

Aus Abbildung 41 wird ersichtlich, dass man ein Signal für das GFP-YlaD Fusionsprotein im Western-Blot nur nachweisen kann, wenn die YluC Protease fehlt (Spur 3) oder zusätzlich

YlaB gebildet wird (Spur 1). Ist kein YlaB vorhanden (Spur 2), so kann auch kein Signal für GFP-YlaD detektiert werden. Dieser Befund aus den Western-Blots wird durch die Fluoreszenzaufnahmen der aufgeschlossenen Zellen bestätigt. Nur in den Spuren 1 und 3 ist eine Fluoreszenz deutlich nachweisbar, was auf das Vorhandensein des Fusionsproteins aus GFP-YlaD schließen lässt.

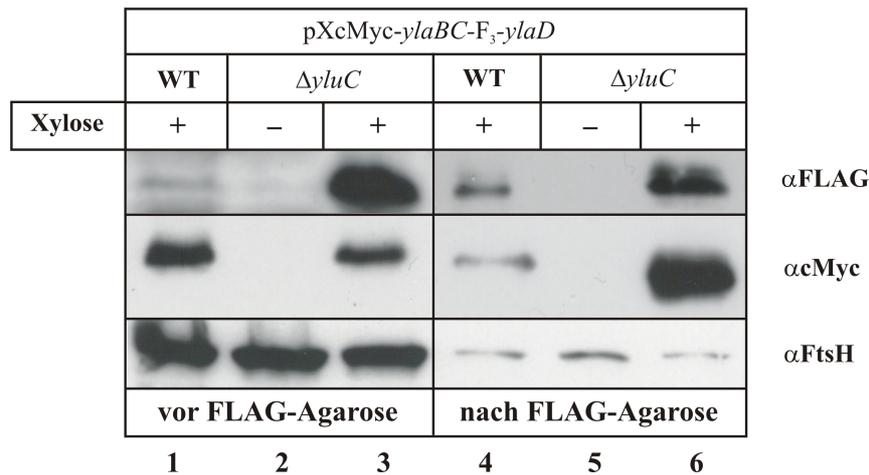
#### 4.7.1 Wechselwirkung zwischen YlaB und YlaD

Die bisherigen Ergebnisse legen die Möglichkeit nahe, dass YlaD, als Anti-Sigmafaktor von YlaC, eventuell durch eine direkte Wechselwirkung mit YlaB stabilisiert wird. Um eine mögliche direkte Wechselwirkung zwischen YlaD und YlaB zu untersuchen, wurde ein *B. subtilis* Stamm konstruiert, der ähnlich zu SZ113 (Abbildung 40) ist. In *B. subtilis* SZ109 wurde anstatt *gfp-ylaD* eine F<sub>3</sub>-getaggte Version von *ylaD* eingefügt (Abbildung 42).



**Abb. 42:** Schematische Darstellung der relevanten chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ109.

Von diesem Stamm wurden im Wildtyp- und im  $\Delta yluC$ -Hintergrund (SZ110) Membranfraktionen isoliert. Die Membranen wurden solubilisiert (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % Brij, pH 7,5 und 1 Tablette Complete-Protease-Inhibitor) und mit je 100  $\mu$ l FLAG-Agarose, welche nach den Angaben des Herstellers mit dem o. g. Puffer dreimal gewaschen wurde, 1 h bei 4 °C auf einem Rotations-Schüttler inkubiert. Danach wurde die FLAG-Agarose pelletiert und dreimal mit o.g. Puffer gewaschen. Die Ablösung, von an der FLAG-Agarose gebundenen Proteinen, erfolgte durch Inkubation im gleichen Puffer mit 2 % SDS bei 95 °C für 10 min. Der erhaltene Überstand wurde dann mit SDS-Probenpuffer versetzt, nochmals aufgeköcht und nach Abkühlen auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer auf Nitrocellulosemembranen und im Anschluss daran der Nachweis der Fusionsproteine durch spezifische Antikörper gegen den FLAG- bzw. den cMyc-Affinitätstag. Als Kontrolle wurde die Hälfte der solubilisierten Membranen vor Inkubation mit der FLAG-Agarose direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt, um eine Vergleichsmöglichkeit vor und nach Inkubation mit der FLAG-Agarose zu erhalten. Das Ergebnis der Immunoblots mit den den *B. subtilis*-Stämmen SZ109 und SZ110 zeigt Abbildung 43.



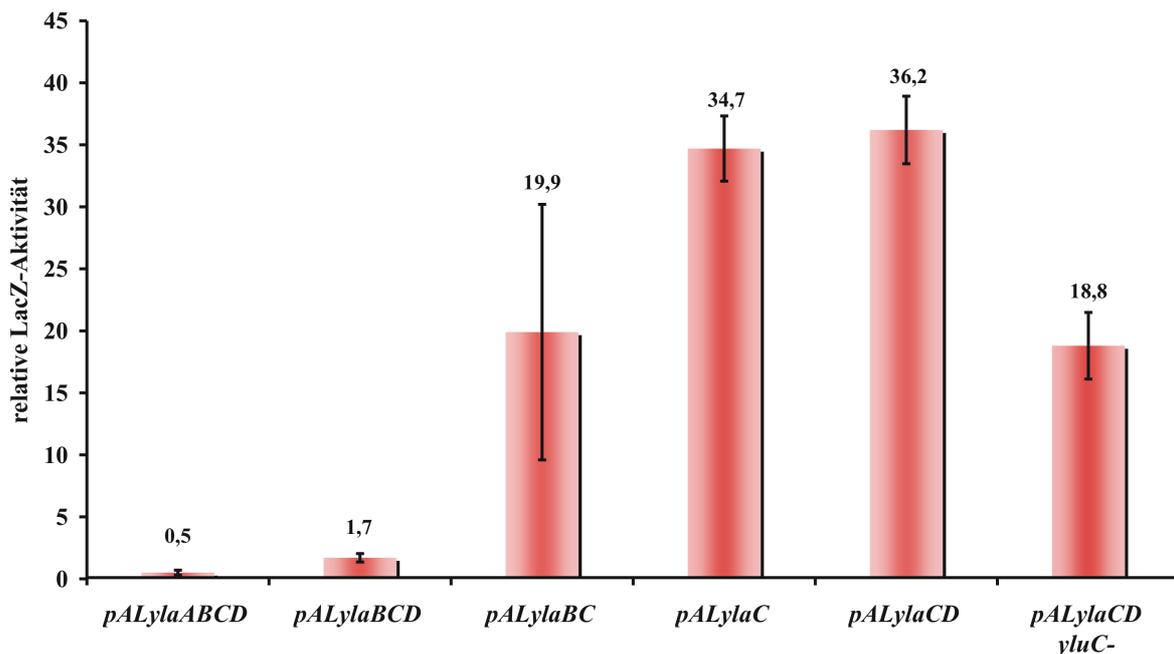
**Abb. 43:** Luminogramm des Immunblots mit solubilisierten Membranfraktionen der *B. subtilis*-Stämme SZ109 und SZ110. Gleiche Mengen an solubilisierten Membranen vor und nach der Inkubation mit FLAG-Agarose wurden in einem 15%igen SDS-Gel getrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die jeweiligen Immunoblots wurden mit Antikörpern gegen den FLAG- und den Myc-Epitoptag entwickelt. Als Ladungskontrolle und zum Nachweis einer spezifischen Bindung von Flag<sub>3</sub>-YlaD an die FLAG-Agarose wurden die Immunoblots mit Antikörpern gegen FtsH entwickelt.

Während man vor der Anwendung der FLAG-Agarose im WT (Spur 1, oben) nur eine schwache Bande für F<sub>3</sub>-YlaD detektieren kann, sieht man im Vergleich mit Spur 4 (oben) eine deutlich intensivere Bande. In der  $\Delta yluC$ -Mutante ist sowohl vor als auch nach Anwendung der FLAG-Agarose ein starkes Signal für das F<sub>3</sub>-YlaD sichtbar (Spuren 3 und 6, oben). Das Myc-YlaB Protein ist vor der Applikation der FLAG-Agarose sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta yluC$ -Mutante in vergleichbaren Mengen vorhanden (Spuren 1 und 3, Mitte). Nach Inkubation mit der FLAG-Agarose ist im WT, vergleicht man es mit der  $y luC$ -Mutante, nur ein schwaches Signal detektierbar (Spuren 4 und 6, Mitte). FtsH ist vor der Inkubation mit der FLAG-Agarose in großen Mengen vorhanden, während nach der Anwendung der FLAG-Agarose nur noch sehr schwache Signale sichtbar werden (Spuren 1 - 6 unten). Man kann somit klar feststellen, dass YlaD mit YlaB koeluiert, während dies für FtsH nicht zutrifft. Je mehr YlaD an die FLAG-Agarose gebunden war, desto mehr YlaB koeluierte mit YlaD. In einem anderen Experiment konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes Myc-YlaB ein Membranprotein ist und dass es alleine überproduziert nicht an die FLAG-Agarose bindet (Daten nicht gezeigt).

#### 4.8 Einfluss von YlaB auf die $\sigma^{YlaC}$ -Aktivität

Die bis jetzt erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass es eine Wechselwirkung zwischen YlaB und YlaD gibt, die zu einer Stabilisierung von YlaD führt. Sie schließen aber die Möglichkeit nicht aus, dass YlaB ebenfalls als negativer Regulator (Anti-Sigmafaktor) auf  $\sigma^{YlaC}$  wirken kann. In einer bereits publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass es keine Interaktion

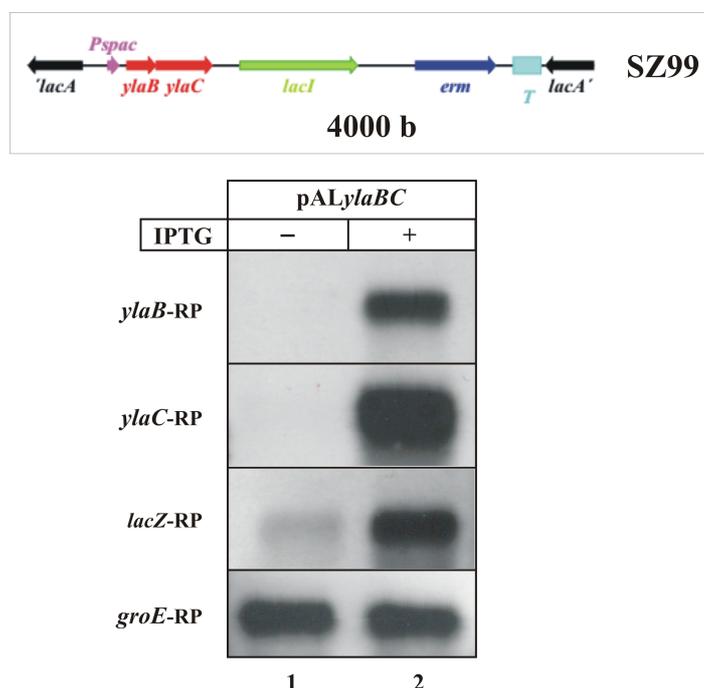
zwischen der N-terminalen Domäne von YlaB und YlaC gibt (Yoshimura *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob YlaB als Anti-Sigmafaktor wirken kann, wurden LacZ-Tests mit einem *B. subtilis*-Stamm durchgeführt, der im *ylaA*-Knockout Hintergrund unter IPTG-Kontrolle YlaB und YlaC exprimiert (*B. subtilis* SZ99). Als Reporter diente die bereits bekannte Fusion zwischen dem *ylaA*-Promotor und dem *lacZ*-Gen. Um die Ergebnisse vergleichen zu können wurden ebenfalls LacZ-Tests mit den bereits bekannten *B. subtilis* Stämmen aus 4.1.2 (Abbildung 12) und 4.6.2 (Abbildung 38) durchgeführt. So wurden jeweils verschiedene Gene des *ylaA*-Operons gemeinsam exprimiert und die Auswirkung auf die Reporterfusion gemessen. In dem Stamm *B. subtilis* SZ96, der YlaC und YlaD unter IPTG-Kontrolle exprimiert, wurde zusätzlich die YluC-Protease, welche für den Abbau von YlaD verantwortlich ist, deletiert. Mit dem daraus resultierenden Stamm *B. subtilis* SZ96A wurden ebenfalls LacZ-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse der LacZ-Tests mit allen oben beschriebenen Stämmen sind in Abbildung 44 gezeigt.



**Abb. 44:** LacZ-Aktivitäten der Stämme SZ98 (*pALylaABCD*), SZ97 (*pALylaBCD*), SZ99 (*pALylaBC*), SZ100A (*pALylaC*), SZ96 (*pALylaCD*) und SZ96A (*pALylaCD yluC*) nach 60-minütiger Induktion mit 1 mM IPTG. Fehlerbalken entsprechen den ermittelten Werten der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler.

Vergleicht man in Abbildung 44 die LacZ-Aktivitäten von *pALylaBC* und *pALylaC*, so erkennt man, dass die zusätzliche Expression von YlaB die LacZ-Aktivität der Reporterfusion im Mittel um den Faktor 2 reduziert. Exprimiert man YlaC und YlaD gemeinsam, so ist im Vergleich zu *pALylaC* keine Änderung der LacZ-Aktivität festzustellen, vermutlich, da YlaD von YluC abgebaut wird. Deletiert man zusätzlich die YluC-Protease (*pALylaCD ΔyluC*) so

reduziert sich die LacZ-Aktivität um die Hälfte, im Vergleich zur alleinigen Expression des Sigmafaktors YlaC (pALyIaC). Auffällig ist die große Streuung der ermittelten LacZ-Werte für *B. subtilis* SZ99 (pALyIaBC), repräsentiert durch den sehr großen Fehlerbalken. Um mögliche Fehler bei der Ermittlung der LacZ-Werte auszuschließen und um ganz deutlich zu zeigen, dass YlaB alleine nicht als negativer Regulator von YlaC wirken kann, wurden mit Gesamt-mRNA aus *B. subtilis* SZ99 (pALyIaBC) Northern-Blots durchgeführt. Die Northern-Blots wurden, wie unter 4.6.2 beschrieben, durchgeführt. Hybridisiert wurden die Northern-Blots mit DIG-markierten RP-Sonden gegen *ylaB*, *ylaC*, *lacZ* und *groE* (Abbildung 45).

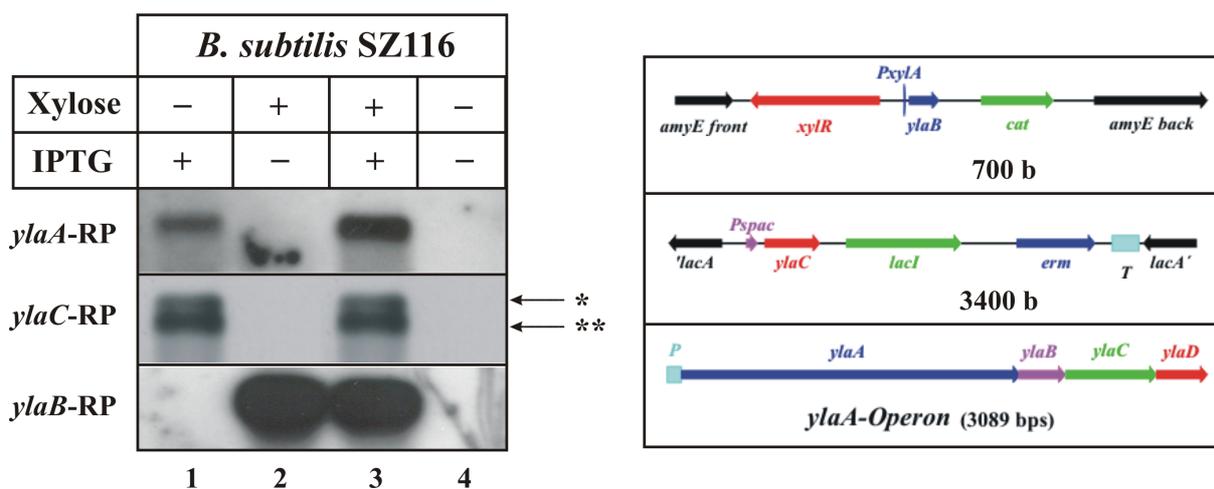


**Abb. 45:** Ein schematischer Aufbau der relevanten chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ99 inklusive der zu erwartenden Transkriptlänge (rechts). Luminogramm der Northern-Blot-Experimente mit *B. subtilis* SZ99 (pALyIaBC). Gesamt-mRNA wurde jeweils 20 min nach IPTG-Zugabe isoliert. Pro Spur wurden jeweils 2 µg Gesamt-mRNA aufgetragen. Als Sonden wurden, je nach Angabe, DIG-markierte RNA-Sonden gegen *ylaB*, *ylaC* und *lacZ* verwendet. Als Ladungskontrolle wurde eine Sonde gegen *groE* eingesetzt (links).

Obige Abbildung zeigt das Vorhandensein der mRNA-Transkripte für *ylaB*, *ylaC* und *lacZ* bei Zugabe von IPTG (Spur 2). Ohne IPTG können für *ylaB* und *ylaC* keine Signale detektiert werden (Spur 1). Für das *lacZ*-Transkript kann man ein sehr schwaches Signal bereits ohne IPTG-Zugabe nachweisen (Spur 1). Nach IPTG-Zugabe detektiert man ein sehr viel stärkeres Signal (Spur 2). Die Hybridisierung mit der *groE*-RP-Sonde belegt, dass gleiche Mengen an Gesamt-mRNA auf beide Spuren aufgetragen wurde (unten).

Um den Einfluss von YlaB auf die Aktivität von  $\sigma^{YlaC}$  noch genauer zu analysieren, wurde ein *B. subtilis*-Stamm konstruiert, in dem man im *ylaA*-Wildtyp-Hintergrund die Expression von *ylaB* durch Xylose und die Expression von *ylaC* durch IPTG regulieren kann. Durch den

starken  $P_{xyIA}$ -Promotor kann man sehr viel mehr *ylaB*-Transkript als *ylaC*-Transkript erhalten, da *ylaC* unter der Kontrolle des schwächeren  $P_{spac}$ -Promotor steht. Sollte YlaB tatsächlich als negativer Regulator wirken, so dürfte man bei gleichzeitiger Expression von YlaC und YlaB im Northern-Blot kein Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons erhalten. Gesamt-mRNA wurde aus *B. subtilis* SZ116 Kulturen jeweils nach Zugabe von Xylose, IPTG, Xylose und IPTG bzw. unbehandelten Kulturen isoliert und im Northern Blot mit DIG-markierten RP-Sonden gegen *ylaB*, *ylaC* und *ylaA* analysiert (Abbildung 46).



**Abb. 46:** Luminogramm der Northern-Blot-Analyse mit *B. subtilis* SZ116. Gesamt-mRNA wurde jeweils 90 min nach IPTG bzw. Xylose-Zugabe isoliert. Nachdem je 2  $\mu$ g mRNA pro Spur im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembrane geblottet wurde, erfolgte die Hybridisierung der Membranen mit DIG-markierten mRNA-Sonden gegen die Gene *ylaA*, *ylaB*, *ylaC*. Das Transkript des ektopisch integrierten *ylaC* ist mit einem Stern (\*) markiert, das Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons (welches auch *ylaC* enthält) ist mit zwei Sternen (\*\*) markiert. Durch Vergleich der Mengen an rRNA im Agarosegel wurde gewährleistet, dass gleiche Gesamt-mRNA-Mengen pro Spur aufgetragen wurden (Daten nicht gezeigt). Ein schematischer Aufbau der relevanten chromosomalen Situation in *B. subtilis* SZ116, inklusive der zu erwartenden Transkriptlängen, sind rechts gezeigt.

In Spur 1 aus Abbildung 46 erkennt man, dass nach IPTG-Zugabe *ylaC*-Transkript (Mitte) und Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons (oben und Mitte) nachgewiesen werden kann. Da das wildtypische *ylaA*-Operon autoreguliert ist und auch für *ylaC* kodiert, kann man es sowohl mit einer RP-Sonde gegen *ylaA* als auch mit einer RP-Sonde gegen *ylaC* detektieren. Nach Xylose-Zugabe ist nur das ektopisch integrierte *ylaB*-Transkript in großen Mengen, verglichen mit dem *ylaC*-Transkript, nachweisbar (Spur 2). Gibt man Xylose und IPTG zum Medium, so kann man ebenfalls Transkripte für das wildtypische *ylaA*-Operon (Spur 3, oben und Mitte), sowie die Transkripte der ektopisch integrierten Kopien von *ylaB* und *ylaC* nachweisen (Spur 3, Mitte und unten). Gibt man weder Xylose noch IPTG zum Medium, so kann man keinerlei Transkript mit den verwendeten Sonden nachweisen (Spur 4). Fasst man die Ergebnisse der Northern-Blot-Experimente mit den *B. subtilis*-Stämmen SZ99 und SZ116 zusammen, so scheint YlaB nicht als negativer Regulator der  $\sigma^{ylaC}$ -Aktivität zu wirken.

## 5 Diskussion

Zur Kontrolle der Genexpression unter Stressbedingungen nutzen Bakterien, aber auch andere Organismen, die Möglichkeit den „housekeeping“-Sigmafaktor durch alternative Sigmafaktoren zu ersetzen, wodurch die Promotor-Selektivität der RNA-Polymerase verändert wird. Dadurch kann die Transkription derjenigen Gene aktiviert werden, die für das Überleben der Bakterien in der momentanen Stresssituation erforderlich sind (Hecker und Völker, 2001). Dabei werden Stressfaktoren nicht ausschließlich im Cytoplasma wahrgenommen und weitergeleitet. Auch die Zellhülle muss aufgrund ihrer Funktion als nicht statische Abgrenzung zum extrazellulären Milieu hin in der Lage sein, trotz sich ändernder Umweltbedingungen, die strukturelle Integrität der Zelle aufrechtzuerhalten, um essentielle zelluläre Prozesse wie Nährstofftransport, Energieerzeugung und Biosynthese von Makromolekülen nicht zu gefährden (Ades, 2004). Somit ist es für das Überleben der Bakterienzelle wichtig, dass Informationen von der Zellhülle ins Cytoplasma weitergeleitet werden. Eine Möglichkeit diesen Informationsfluss zu bewerkstelligen ist die Einbindung von transmembranen Signalübertragungswegen. Über diese können Signale von der Zellhülle über die Cytoplasmamembran zu cytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, beispielsweise ECF-Sigmafaktoren, übertragen werden. Dort können sodann Gene, deren Funktion beispielsweise in der Aufrechterhaltung der Zellhüllen-Integrität liegt, aktiviert werden und somit das Überleben der Bakterienzelle gewährleisten. ECF-Sigmafaktoren stellen für Bakterien eine Möglichkeit dar, ein extracytoplasmatisches Signal durch einen transmembranen Anti-Sigmafaktor ins Cytoplasma weiterzuleiten und somit die Promotorselektivität der RNA-Polymerase durch Austausch des „housekeeping“-Sigmafaktors gegen einen ECF-Sigmafaktor zu beeinflussen (Helmann, 2002). In „ungestressten“ Zellen bindet ein Anti-Sigmafaktor den zugehörigen ECF-Sigmafaktor und verhindert damit dessen Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase. Dies inhibiert wiederum die Transkription derjenigen Gene, welche von diesem ECF-Sigmafaktor abhängig sind (Storz und Hengge-Aronis, 2000; Hughes and Mathee, 1998). Eine Möglichkeit diesen Komplex aus Anti-Sigmafaktor und Sigmafaktor aufzulösen und damit den Sigmafaktor freizusetzen, ist der regulierte, proteolytische Abbau des Anti-Sigmafaktors. Dieser Fall der regulierten Proteolyse, unter Beteiligung der iCLIP RseP, konnte anhand der proteolytischen Kaskade, welche zum Abbau von RseA und damit zur Aktivierung von  $\sigma^E$  in *E. coli* führt, erstmals in Bakterien nachgewiesen werden (Ades *et al.*, 1999; Kanehara *et al.*, 2002; Flynn *et al.*, 2004). Auch für *B. subtilis* konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe ein ähnlicher Mechanismus aufgedeckt werden, welcher letztendlich zum proteolytischen Abbau des Anti-Sigmafaktors RsiW und zur Transkription  $\sigma^W$ -

kontrollierter Gene führt (Schöbel *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte der bislang uncharakterisierte ECF-Sigmafaktor YlaC aus *B. subtilis* genauer untersucht werden, auch hinsichtlich der Möglichkeit, dass es sich bei der o. e. Regulation von ECF-Sigmafaktoren durch RIP, um einen allgemeingültigen Mechanismus zur Regulation von ECF-Sigmafaktoren in Bakterien handeln könnte. YlaC gehört ebenso wie SigZ und SigV zu den bislang am wenigsten untersuchten ECF-Sigmafaktoren in *B. subtilis*.

## 5.1 Transkriptionelle Untersuchung des *ylaA*-Operons

Für zahlreiche ECF-Sigmafaktoren wurde beschrieben, dass sie in einer Transkriptionseinheit organisiert sind, welche von einem Promotor kontrolliert wird, der wiederum selbst von diesem ECF-Sigmafaktor positiv reguliert wird. Gezeigt werden konnte dies unter anderem für die Sigmafaktoren  $\sigma^M$ ,  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$  und  $\sigma^Y$  aus *B. subtilis* (Horsburgh and Moir, 1999; Wiegert *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1999; Tojo *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *ylaA*-Operon, welches ja für  $\sigma^{YlaC}$  kodiert, ebenfalls positiv autoreguliert ist. Die Tatsache, dass bisher keine Stressfaktoren identifiziert werden konnten, die zu einer Anschaltung des *ylaA*-Operons führten (siehe 5.3), machte es notwendig, Reporterstämme zu konstruieren, mit denen man die Anschaltung entsprechend simulieren und detektieren konnte. Bei der Ermittlung der positiven Autoregulation von  $\sigma^Y$  in *B. subtilis* bediente man sich ebenfalls eines artifiziellen Systems, in dem durch polare Effekte einer Transposon-Insertion eine erhöhte Expression von  $\sigma^Y$  verursacht wurde (Cao *et al.*, 2003), eine Situation, die in unserem System durch die Zugabe von IPTG erreicht wird.

Die Autoregulation des *ylaA*-Operons konnte sehr anschaulich durch Northern-Blot-Analyse mit *B. subtilis* SZ100 belegt werden. Dieser *B. subtilis*-Stamm enthält, chromosomal integriert, eine IPTG-regulierbare Kopie des *ylaC*-Gens (Abbildung 10, rechts). Erst nach Zugabe von IPTG konnte im Northern-Blot ein Transkript für das gesamte *ylaA*-Operon detektiert werden (Abbildung 10, links). In *B. subtilis* SZ100A, der zusätzlich zur IPTG-regulierbaren Kopie von *ylaC* eine Transkriptionsfusion zwischen dem *ylaA*-Promotor und dem *lacZ*-Gen (Abbildung 11) enthielt, konnte die Autoregulation durch ein Ansteigen der LacZ-Aktivität um den Faktor 16 nach IPTG-Zugabe nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dies zeigt einerseits die positive Regulation des *ylaA*-Operons durch  $\sigma^{YlaC}$  und andererseits, dass *ylaC* gemeinsam in einem Operon mit den Genen *ylaA*, *ylaB* und *ylaD* liegt. Sowohl anhand der Größe des Transkriptes in Abbildung 10, detektiert mit einer RP-Sonde gegen *ylaA*, als auch an den später durchgeführten Untersuchungen mit RP-Sonden gegen alle Gene

des *ylaA*-Operons (Abbildung 37) konnte verdeutlicht werden, dass die vier Gene des *ylaA*-Operons tatsächlich eine Transkriptionseinheit bilden.

### 5.1.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *ylaA*-Operons und Sequenzierung des *ylaA*-Promotors

Durch Primer-Extension mit *B. subtilis* SZ100, in dem der ECF-Sigmafaktor ektopisch integriert und unter IPTG-Kontrolle überproduziert wurde, konnte der Transkriptionsstartpunkt des *ylaA*-Operons und die Sequenz des *ylaA*-Promotors bestimmt werden. Der Transkriptionsstartpunkt liegt 24 Basen stromaufwärts des Startcodons TTG (Abbildung 12, oben). Weitere Transkriptionsstartpunkte, wie sie beispielsweise für die ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^M$  und  $\sigma^X$  beschrieben wurden, konnten mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, da ja nur  $\sigma^{YlaC}$  überproduziert wurde. Die Transkription von  $\sigma^M$  und  $\sigma^X$  kann zusätzlich durch den „housekeeping“-Sigmafaktor  $\sigma^A$  initiiert werden (Horsburgh und Moir, 1999; Huang *et al.*, 1997). Man kann jedoch davon ausgehen, dass es zumindest keinen  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor vor dem *ylaA*-Operon gibt, da man ansonsten, aufgrund der konstitutiven Aktivität von  $\sigma^A$  sowohl mit als auch ohne IPTG-Zugabe, ein Signal in der Primer-Extension erhalten haben müsste. Der Abstand zwischen der -35- und -10-Region beträgt 16 Nukleotide. Im Bereich der -35-Region beinhaltet der *ylaA*-Promotor das für die Familie der ECF-Sigmafaktoren charakteristische „AAC“-Motiv gefolgt von zahlreichen A- und T-Nukleotiden (Abbildung 12, unten). Darüber hinaus scheint der Abstand der -35- von der -10-Region ebenfalls konserviert zu sein, und zwischen 16 - 17 Nukleotiden zu liegen. Neben den in Abbildung 47 gezeigten Sequenzen für die bereits untersuchten Promotoren der ECF-Sigmafaktoren in *B. subtilis* findet man bei ECF- $\sigma$ -Faktor-abhängigen Promotoren aus *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. coelicolor* und *M. xanthus* ebenfalls einen Abstand von 16 Nukleotiden zwischen dem -35- und -10-Bereich (Missiakas und Raina, 1998; Helmann, 2002). Auffällig ist die TG-Dinukleotidfolge in der -10-Region des Promotors von *ylaA*, wodurch er sich von allen anderen unterscheidet, was im Bereich der -35-Region nicht der Fall ist. Beispielsweise ist die Nukleotidfolge TGAAAC sowohl in der -35-Region von *ylaA* als auch von  $\sigma^W$  vorhanden (Abbildung 47).

	-35	-10	+1
P <sub>M</sub>	taatg <b>TGCAAC</b> tttaaacctttcttatg <b>CGTG</b> tataaca <b>TA</b> ga		
P <sub>V</sub>	tctgcGC <b>AAAC</b> tatcttttcagcctgccg <b>CGTC</b> tatcc <b>TA</b> ggta		
P <sub>W</sub>	aaaat <b>TGAAAC</b> cttttgaaacgaagct- <b>CGTA</b> tacataca <b>GA</b> c		
P <sub>X</sub>	tgtaa <b>TGTAAC</b> ttttcaagctattcata <b>CGAC</b> aaaaaag <b>TG</b> aa		
P <sub>Y</sub>	aaaaga <b>TGAAC</b> gcttttgaaatccggtgt <b>CGTC</b> tcataagg <b>C</b> ag		
P <sub>YlaA</sub>	catct <b>TGAAAC</b> tttttgaaaa-gtccgc <b>TGTC</b> taaccgaat <b>G</b> a		

**Abb. 47:** Bereits bekannte, autoregulierende Promotorsequenzen der ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^M$  (P<sub>M</sub>),  $\sigma^V$  (P<sub>V</sub>),  $\sigma^W$  (P<sub>W</sub>),  $\sigma^X$  (P<sub>X</sub>),  $\sigma^Y$  (P<sub>Y</sub>) verglichen mit  $\sigma^{YlaC}$  (P<sub>YlaC</sub>). Die -35- und -10-Regionen sind in Großbuchstaben dargestellt (gelb unterlegt), wobei konservierte Nukleotide fett gedruckt sind; das konservierte „AAC“-Motiv ist zusätzlich rot unterlegt. Bereits identifizierte Transkriptionsstartpunkte (+1) sind durch fett gedruckte, rote Großbuchstaben dargestellt.

Die Unterschiede im Bereich der -10-Region können durch die relativ geringen Ähnlichkeiten unter den ECF-Sigmafaktoren in der Region 2.4 erklärt werden. Die Region 2.4 enthält eine amphipatische  $\alpha$ -Helix, von der man annimmt, dass sie die Erkennungsdeterminanten für das -10 Hexamer des Promotorbereichs enthält. Diese Diversität im Bereich der -10-Regionen von ECF-Sigmafaktoren begünstigt möglicherweise die Koexistenz vieler verschiedener ECF-Sigmafaktoren in derselben Bakterienspezies, ohne dass sich die Promotor-Selektivität der einzelnen ECF-Sigmafaktoren überlappt. Dabei ist noch ungeklärt, wie die Aktivitäten der verschiedenen ECF-Sigmafaktoren in der Zelle koordiniert werden (Missiakas und Raina, 1998). Für einige Gene, die *in vivo* durch  $\sigma^X$  reguliert werden, konnte *in vitro* sowohl eine Abhängigkeit von  $\sigma^X$  als auch von  $\sigma^W$  festgestellt werden, während die Promotoren vor den Genen für  $\sigma^X$  und  $\sigma^W$  jeweils nur durch den eigenen ECF-Sigmafaktor erkannt wurden (Huang *et al.*, 1998). Änderte man jedoch beispielsweise die -10-Region des  $\sigma^X$ -Promotors von CGAC zu CGTA, so wurde dieser Promotor von  $\sigma^W$  erkannt. Umgekehrt galt dasselbe für eine Änderung der -10-Region von  $\sigma^W$  von CGTA zu CGAC bzw. CGTC, woraufhin dieser Promotor von  $\sigma^X$  erkannt wurde. Eine -10-Region mit der Sequenz CGTC wurde *in vitro*, wenn unterschiedlich effizient, sowohl von  $\sigma^X$  als auch von  $\sigma^W$  erkannt (Qiu and Helmann, 2001). Die unterschiedliche Effizienz mit der die mutierten Promotorregionen im *in vitro* und *in vivo* erkannt wurden, legt die Vermutung nahe, dass weitere Faktoren eine Rolle bei der Promotorerkennung spielen. Möglicherweise sind *in vivo* regulatorisch-wirkende Proteine vorhanden, welche *in vitro* fehlten (Qiu and Helmann, 2001). Die DNA-Region zwischen den Nukleotiden -65 und -40 in bakteriellen Promotoren scheint ebenfalls wichtig für die Promotorerkennung durch die RNA-Polymerase zu sein. Durch einen Sequenzvergleich von  $\sigma^A$ -abhängigen Promotoren konnte gezeigt werden, dass die -65 bis -40-Region in bakteriellen Promotoren ein alternierendes Muster an A- und T-reichen

Sequenzen enthält. Diese Sequenzen haben Ähnlichkeit zu Promotor-UP-Elementen, welche mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase interagieren können. Zusätzlich scheinen diese UP-Elemente die Windung der Promotorregion um die RNA-Polymerase zu erleichtern. Derartige Sequenzen, die möglicherweise die Funktion von UP-Elementen wahrnehmen, wurden vor mehreren  $\sigma^W$ -kontrollierten Genen gefunden (Huang *et al.*, 1999).

Die Identifizierung des autoregulatorischen *ylaA*-Promotors ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Suche nach weiteren Promotoren, welche ebenfalls von  $\sigma^{YlaC}$  erkannt werden können (siehe 5.4).

## 5.2 Untersuchung der Anti-Sigmafaktor-Aktivität von YlaD

Aufgrund seiner Sequenzhomologien zu RsiW aus *B. subtilis* und RsrA aus *S. coelicolor* (siehe Abbildung 7 und 8) wurde YlaD als potentieller Anti-Sigmafaktor von  $\sigma^{YlaC}$  postuliert (Kang *et al.*, 1999). Um den Einfluss von YlaD auf die Aktivierung des autoregulierten *ylaA*-Promotors zu untersuchen, wurde ein Reportersystem konstruiert, in dem das wildtypische *ylaA*-Operon unter der Kontrolle eines Xylose-regulierbaren Promotors ( $P_{xyIA}$ ) stand, während ektopisch im *amyE*-Lokus eine Transkriptionsfusion zwischen dem Promotor des *ylaA*-Operons und dem *lacZ*-Gen integriert war (*B. subtilis* SZ76) bzw. zusätzlich das Gen des potentiellen Anti-Sigmafaktors YlaD durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt worden war (*B. subtilis* SZ77). Durch Zugabe von Xylose zu Kulturen beider Stämme wurde die Expression der Gene *ylaABCD* (*B. subtilis* SZ76) und *ylaABC* (*B. subtilis* SZ77) induziert. Die durchgeführten LacZ-Tests mit den beiden Stämmen und mit einem Kontrollstamm, welcher nur die Transkriptionsfusion im *amyE*-Lokus enthielt, zeigten, dass eine um Faktor 27 erhöhte LacZ-Aktivität 90 min nach Zugabe von Xylose in *B. subtilis* SZ77 gemessen werden konnte. Wird kein YlaD exprimiert, steigt die Aktivität der Reporterfusion also deutlich an, verglichen mit der Situation, wenn YlaC und YlaD gemeinsam exprimiert werden (Abbildung 14). Somit konnte nochmals die Autoregulation des *ylaA*-Operons gezeigt werden, da bei verstärkter Expression des Sigmafaktors die Aktivität der  $P_{ylaA-lacZ}$ -Reporterfusion stark anstieg. Dieser Anstieg war jedoch nur messbar, wenn zusätzlich das downstream von *ylaC* gelegene *ylaD*-Gen inaktiviert wurde. YlaD wirkt somit als Anti-Sigmafaktor von  $\sigma^{YlaC}$ . Um dies zu bestätigen, wurde in den Stamm mit dem deletierten *ylaD* ektopisch eine IPTG-regulierbare Kopie von *ylaD* im *lacA*-Lokus integriert (*B. subtilis* SZ78, Abbildung 15). Problematisch bei der Expression von *ylaABC* vom Promotor  $P_{xyIA}$  und von *ylaD* vom Promotor  $P_{spac}$  ist die unterschiedliche Promotorstärke von  $P_{xyIA}$  und  $P_{spac}$ , wobei  $P_{xyIA}$  der weitaus stärkerer Promotor ist (Hecht, 2001). Um dem Rechnung zu tragen, wurden

verschiedene Xylose-Konzentrationen getestet, mit dem Ziel eine annähernd gleiche Expression von *ylaC* und *ylaD* zu erreichen. Als Ergebniss wurde eine Endkonzentration von 0,02 % Xylose im Medium verwendet. Induziert man nun einerseits die Expression von *ylaABC* durch Xylose und andererseits die Expression von *ylaD* durch IPTG, so konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Expression von *ylaABC* und *ylaD* die LacZ-Aktivität kaum anstieg. Nach 90 min wurde eine um den Faktor 3 geringere LacZ-Aktivität gemessen als im Vergleich zur alleinigen Expression von *ylaABC* (Abbildung 14). Somit konnte bestätigt werden, dass YlaD die Aktivität von  $\sigma^{YlaC}$  negativ beeinflusst und als Anti-Sigmafaktor wirken kann. Aufgrund dieser Feststellung würde man erwarten, dass bei deletiertem *ylaD*, im wildtypischen *ylaA*-Operon, die LacZ-Aktivität der  $P_{ylaA}$ -Reporterfusion steigen würde, wie dies am Beispiel von RsiW gezeigt werden konnte (Schöbel *et al.*, 2004). Aus bisher ungeklärten Gründen konnte dieses Ansteigen der LacZ-Aktivität nicht gemessen werden. Möglicherweise ist die durch die Deletion von *ylaD* verursachte Steigerung der LacZ-Aktivität zu gering, um sie mit den von uns angewendeten Methoden zu detektieren, da offensichtlich die Expression des *ylaA*-Operons unter nicht-artifiziellen Bedingungen kaum messbar ist (siehe 5.3).

### 5.3 Induktion von $\sigma^{YlaC}$ durch Stressfaktoren

Der ECF-Sigmafaktor YlaC steht als drittes Gen eines tetracistronischen Operons unter der Kontrolle des *ylaA*-Promotors (Abbildung 10, rechts). Unter Standard-Laborbedingungen wurde YlaC, gemessen durch eine Transkriptionsfusion des *ylaA*-Promotors mit *lacZ* (Abbildung 16), nur auf äußerst niedrigem Niveau exprimiert. Unter der Annahme, dass die Transkriptionsrate erst aufgrund des Vorhandenseins eines spezifischen Stressfaktors ansteigt – wie bereits für die ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^M$ ,  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$  und  $\sigma^Y$  gezeigt (Horsburgh and Moir, 1999; Wiegert *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1997; Tojo *et al.*, 2003) – wurde die Rate der Expression von  $\sigma^{YlaC}$  unter Anwendung verschiedener Stressfaktoren mit Hilfe der  $P_{ylaA}$ -*lacZ*-Transkriptionsfusion gemessen. Bei keinem der getesteten Stressfaktoren (Tabelle 9) konnte eine als signifikant gesteigert zu bezeichnende LacZ-Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Dabei muss jedoch die Tatsache berücksichtigt werden, dass es zuweilen mittels LacZ-Aktivitätstests nicht immer möglich war, die Induktion von ECF-Sigmafaktoren als Antwort auf bestimmte Stressfaktoren zu messen (Turner and Helmann, 2000). Einige Stressfaktoren könnten durch Oxidation der für die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase notwendigen SH-Gruppen (Snyder *et al.*, 1995) zu falschen Ergebnissen führen. Für Tellurit beispielsweise wurde die Inhibierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

bereits gezeigt (Toptchieva *et al.*, 2003). Mit Hilfe von DNA-Makroarray-Experimenten wurde für  $\sigma^W$  eine Answitchung durch Salz-Schock beschrieben (Petersohn *et al.*, 2001). Diese Induktion konnte jedoch im LacZ-Test mit einer Reporterfusion eines durch  $\sigma^W$ -kontrollierten Promotors an *lacZ* nicht nachgewiesen werden (Wiegert *et al.*, 2001).

Um dem Rechnung zu tragen wurden die Auswirkungen aller getesteten Stressfaktoren auf die Transkription des *ylaA*-Operons, auch auf mRNA-Ebene, mit einer spezifischen DIG-markierten *ylaC*-Sonde überprüft. Die erhaltenen Resultate bestätigten dabei die Ergebnisse aus den LacZ-Aktivitätstests. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ECF-Sigmafaktoren eine Rolle bei der Abwehr antimikrobieller, kationischer Peptide spielen (Cao and Helmann, 2004; Pietiainen *et al.*, 2005). Deshalb würde es sich sicherlich lohnen, mit der *ylaA*-Reporterfusion zu testen, ob eines dieser antimikrobiellen Peptide in der Lage ist, das *ylaA*-Operon zu induzieren. Bereits durchgeführte Untersuchungen zur Identifizierung der Site-1-Protease im Regulationsschema von  $\sigma^W$ /RsiW lieferten erste Hinweise, dass Surfactin möglicherweise das  $\sigma^W$ -Regulon induzieren könnte. Deshalb wurden *B. subtilis*-Zellen, mit der *ylaA*-Reporterfusion integriert im Chromosom (*B. subtilis* SZ72), mittels Weichagar auf eine LB-Platte aufgebracht und mit Surfactin-Lösung getränkten Filterplättchen belegt. Es konnte jedoch, im Gegensatz zu einer Reporterfusion eines  $\sigma^W$ -kontrollierten Promotors mit *lacZ*, keine Answitchung der LacZ-Reporterfusion beobachtet werden.

#### 5.4 Identifizierung von $\sigma^{YlaC}$ -regulierten Genen

Unter Verwendung der unter 5.2 beschriebenen Stämme SZ76 und SZ77 wurde eine globale Transkriptom-Analyse mittels DNA-Makroarrays durchgeführt. In *B. subtilis* SZ76 wird nach Xylose-Zugabe die Expression des ECF-Sigmafaktors YlaC zusammen mit seinem Anti-Sigmafaktor YlaD induziert, wodurch YlaC inaktiv vorliegt. In *B. subtilis* SZ77 ist YlaD deletiert, wodurch nach Xylose-Zugabe lediglich die Expression von *ylaA*, *ylaB* und *ylaC* induziert wird und YlaC aktiv ist (Abbildung 14, unten). Für Gene, die potentiell positiv durch  $\sigma^{YlaC}$  reguliert werden könnten, wurden folgende Kriterien festgelegt:

- Induktionsfaktor > 2
- Signal/Rauschverhältnis > 3 (Daten)

Insgesamt 27 Gene entsprachen den beschriebenen Kriterien und sind in nachfolgender Tabelle 12 aufgelistet.

**Tab. 12:** Funktionen der durch DNA-Makroarrays identifizierte Gene, Induktionsfaktoren und Regulation durch andere Sigmafaktoren (falls bekannt). Rot unterlegte Gene wurden zusätzlich durch Northern-Blot-Analyse untersucht.

Gen	bekannte/vermutete Funktion	Induktionsfaktor	reguliert durch
<i>ask</i>	Aspartatkinase, Lysin-Biosynthese	2,34	-
<i>csbA</i>	Membranprotein unbekannter Funktion	1,97	$\sigma^B$
<i>csgA</i>	Sporulations-spezifisches SASP-Protein	2,18	$\sigma^G$
<i>gerAC</i>	Germinationsprotein der <i>B. subtilis</i> Spore	2,37	$\sigma^G/\sigma^F$
<i>infC</i>	Translations-Initiationsfaktor IF-3	2,13	$\sigma^W$
<i>leuC</i>	3-Isopropylmalat Dehydrogenase, Aminosäure Biosynthese	3,36	$\sigma^V$
<i>lytA</i>	Sekretion von Autolysin LytC	3,37	-
<i>murA</i>	UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase	3,04	-
<i>qcrC</i>	Menaquinol-Cytochrom C Reduktase	2,12	-
<i>rocA</i>	Aminosäure Metabolismus	3,05	$\sigma^{54}$
<i>ybbK</i>	hypothetisches Protein	2,06	-
<i>yjbG</i>	Oligoendopeptidase F Homolog, Initiation der Sporulation	2,23	-
<i>yoaH</i>	Chemotaxis-Protein	2,31	$\sigma^D$
<i>ypiP</i>	unbekannt	2,43	-
<i>ypzC</i>	hypothetisches Protein	2,38	-
<i>yqfG</i>	unbekannt	2,63	-
<i>yqhT</i>	Prolin-Peptidase	2,54	-
<i>yqiW</i>	unbekannt	3,18	-
<i>ythQ</i>	Permease eines ABC-Transporterproteins	2,3	$\sigma^W$
<i>yvcJ</i>	unbekannt	2,13	-
<i>yvpA</i>	Pektat-Lyase	2,33	-
<i>ywjH</i>	Transaldolase	2,61	-
<i>ywqE</i>	Tyrosine-Phosphatase	3,07	-
<i>ywqM</i>	Transkriptionsregulator (LysR-Familie)	2,38	-
<i>yxaj</i>	unbekannt	3,51	-
<i>yxdL</i>	ABC-Transporter-System	2,57	-
<i>yybS</i>	unbekannt	3,09	-

Alle, als mögliche Kandidaten für eine Regulation durch  $\sigma^{YlaC}$  in Frage kommenden Gene, wurden bezüglich ihrer Promotoren mit der ermittelten Sequenz des *ylaA*-Promotors (Abbildung 12, unten) verglichen. Diejenigen Kandidaten, welche in den -35- bzw. -10-Regionen Ähnlichkeiten zu der Sequenz des *ylaA*-Promotors aufwiesen (Abbildung 19), sind in obiger Tabelle rot unterlegt und wurden in Northern-Blot-Experimenten mit spezifischen Digoxigenin-markierten mRNA-Sonden gegen das jeweilige Gen untersucht. Dabei erwies sich kein Gen als tatsächlich durch  $\sigma^{YlaC}$  reguliert, da sich die Expressionsmuster in An- und Abwesenheit des Anti-Sigmafaktors nicht unterschieden. Abbildung 19 zeigt deutlich, dass die Promotorbereiche der untersuchten Gene zahlreiche Abweichungen zu der Promotorsequenz von *ylaA* aufweisen. Für  $\sigma^W$  wurde beschrieben, dass eine Abweichung von 2 - 3 Basen von der -35-Konsensus-Sequenz des  $\sigma^W$ -Promotors tolerieren kann. Bei Abstand zwischen der -35- und der -10-region wird von  $\sigma^W$  jedoch lediglich eine Variation von einem

Nukleotid toleriert (Huang *et al.*, 1998, 1999) Dies kann erklären, warum diese Promotoren nicht von  $\sigma^{YlaC}$  erkannt werden. Durchsucht man das gesamte *B. subtilis*-Genom nach der Promotorsequenz des *ylaA*-Promotors, so erhält man lediglich sieben präzise Übereinstimmungen. Diese sieben übereinstimmenden Sequenzen liegen jedoch alle innerhalb von Gen-Sequenzen und nicht in Bereichen, die für eine mögliche Promotorsequenz in Frage kommen. Vollführt man die gleiche Suchoperation mit der Sequenz des  $\sigma^W$ -Promotors, so findet man die 27 bereits publizierten, perfekt übereinstimmenden Sequenzen, von denen 14 als durch  $\sigma^W$  kontrolliert bestätigt werden konnten (Huang *et al.*, 1998). Der naheliegende Schluss aus diesen Ergebnissen wäre, dass  $\sigma^{YlaC}$  eventuell nur sein eigenes Operon reguliert. Ein ähnlicher Fall wurde für  $\sigma^Y$  aus *B. subtilis* beschrieben. Dieser ECF-Sigmafaktor reguliert neben seinem eigenen Operon lediglich ein weiteres Gen (Cao *et al.*, 2003). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Ergebnisse aus den DNA-Makroarrays nicht korrekt sind. Dem entgegen spricht jedoch, dass die Transkriptionsrate des Sigmafaktors  $\sigma^{YlaC}$  erhöht und die des Antisigmafaktors YlaD fast nicht detektierbar ist. Dadurch müssten Gene, die durch  $\sigma^{YlaC}$  reguliert werden, verstärkt exprimiert werden. Die *B. subtilis*-Stämme SZ76 und SZ77 wurden zudem durch LacZ-Test überprüft, in denen sich für *B. subtilis* SZ77 eine deutliche Anschaltung der  $P_{ylaA}$ -lacZ Reporterfusion zeigte (siehe 5.2). Etwa zur gleichen Zeit als diese Experimente in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, publizierten Asai und seine Mitarbeiter eine Arbeit, in der sie durch IPTG-kontrollierte Überproduktion des ECF-Sigmafaktors YlaC,  $\sigma^{YlaC}$ -regulierte Gene mit Hilfe von DNA-Mikroarrays identifizierten. Für  $\sigma^{YlaC}$  konnte sie lediglich drei Gene (*rplJ*, *yjeA*, *pdhD*) mit verstärkter Expression detektieren, die nicht zum *ylaA*-Operon selbst gehörten (Asai *et al.*, 2003). Dabei zeigten diese Gene einen nur geringen Induktionsfaktor, ähnlich wie in unserem Experiment. Die durch Asai identifizierten Gene konnten in unseren Experimenten jedoch nicht als durch  $\sigma^{YlaC}$  reguliert nachgewiesen werden. Allerdings sind die Ergebnisse der Arbeit von Asai mit der nötigen Skepsis zu betrachten, da sie auch für andere ECF-Sigmafaktoren aus *B. subtilis* sehr viele Zielgene annotierten, die in späteren Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden konnten. Die Arbeitsgruppe von John Helmann identifizierte lediglich ein  $\sigma^Y$ -reguliertes Gen, neben dem  $\sigma^Y$ -Operon selbst (Cao *et al.*, 2003), während Asai 11  $\sigma^Y$ -regulierte Gene annotierte (Asai *et al.*, 2003).

## 5.5 Untersuchung der Aktivierung von $\sigma^{\text{YlaC}}$ durch Proteolyse von YlaD

Im Rahmen der Untersuchungen von RsiW wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Protease identifiziert, YluC, die im Falle eines NaOH-Schocks am proteolytischen Abbau von RsiW beteiligt ist. Die transmembrane YluC-Protease ist ortholog zu der Protease RseP aus *E. coli* (Schöbel *et al.*, 2004). Des Weiteren zeigt YluC Ähnlichkeiten zum menschlichen SP2, einer integralen Membran- und Metalloprotease (Brown *et al.*, 2000), die an einem regulatorischen Prozess beteiligt ist, welcher als „Regulierte Intramembrane Proteolyse“ (RIP) bezeichnet wird. Durch RIP werden Membranproteine wie ATF6 und SREBP in der Ebene der Membran geschnitten, wodurch ein cytosolisches Fragment freigesetzt wird, welches dann als Transkriptionsaktivator wirken kann. Damit aber beispielsweise ATF6 zum Substrat für SP2 werden kann, muss erst durch eine weitere Protease (SP1) eine sperrige, die Transmembrandomäne von ATF6 flankierende Domäne durch Proteolyse entfernt werden. Eine derartige sterische Abschirmung gegen den Angriff durch membrangebundene Proteasen wird auch für andere Membranproteine vermutet (Lemberg and Martoglio, 2004). In Prokaryoten wurden bereits mehrere zu SP2 verwandte Proteasen beschrieben. Dazu gehören Eep aus *Enterococcus faecalis*, beteiligt an der Produktion von Peptid-Pheromonen (An *et al.*, 1999), SpoIVFB aus *B. subtilis*, beteiligt an der Prozessierung von aktivem  $\sigma^{\text{K}}$  aus pro- $\sigma^{\text{K}}$  (Rudner *et al.*, 1999) und RseP aus *E. coli*, beteiligt an dem sequentiellen Abbau von RseA, wobei zuerst die Protease DegS schneiden muss (Kanehara *et al.*, 2002; Ades, 2004). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zwischen RsiW und YlaD (Abbildung 8), und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bereits für zwei Anti-Sigmafaktoren (RseA und RsiW) eine Regulation durch RIP beschrieben wurde, sollte ein möglicher Einfluss von RIP auch am Beispiel von YlaD untersucht werden. Möglicherweise stellt RIP einen allgemeingültigen Regulationsmechanismus bei der Aktivierung von ECF-Sigmafaktoren dar.

### 5.5.1 Untersuchung der proteolytischen Aktivität von YluC am Modell von $\sigma^{\text{W}}$ /RsiW

Obwohl durch verschiedene Stressfaktoren aktiviert, gibt es bezüglich des Mechanismus auf Zellwand-Stress zu reagieren auffällige Ähnlichkeiten zwischen  $\sigma^{\text{W}}$ /RsiW aus *B. subtilis* und  $\sigma^{\text{E}}$ /RseA aus *E. coli* (Schöbel *et al.*, 2004). Wurde das *yluC*-Gen in *B. subtilis* deletiert, so konnte ein  $\sigma^{\text{W}}$ -regulierter Promotor (*B. subtilis* BFS233 *yluC::tet*), nach einem NaOH-Schock, nicht mehr aktiviert werden, wie die Ergebnisse aus LacZ-Tests mit einer Reporterfusion eines  $\sigma^{\text{W}}$ -kontrollierten Promotors und *lacZ*, zeigen (siehe Tabelle 9). Um zu zeigen, dass dieser Effekt tatsächlich durch das Fehlen der Protease-Aktivität von YluC

verursacht wird, wurde ektopisch eine Xylose-regulierte Kopie von YluC in den *amyE*-Lokus integriert (*B. subtilis* BFS233 *yluC::tet amyE::P<sub>xyLA</sub> yluC*). In diesem Stamm konnte durch NaOH-Schock ein  $\sigma^W$ -kontrollierter Promotor wieder angeschaltet werden, selbst in Abwesenheit von Xylose. Dabei ist die Grundaktivität des Promotors  $P_{xyLA}$  bereits ausreichend, um den Effekt von *yluC::tet* auf die Expression eines  $\sigma^W$ -kontrollierten Promotors zu kompensieren. Durch Zugabe von Xylose wird, nach einem NaOH-Schock, letztendlich eine zum Wildtyp (BFS233) vergleichbare LacZ-Aktivität erreicht. Wird jedoch statt einer funktionsfähigen Kopie von *yluC* eine Kopie mit einer Mutation im aktiven Zentrum (Glutamat 21 ersetzt durch Alanin) von *yluC* ektopisch in *amyE* integriert, so kann selbst bei Zugabe von Xylose keine LacZ-Aktivität nach einem NaOH-Schock gemessen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass tatsächlich die proteolytische Aktivität von YluC für den Abbau von RsiW und damit für die Anschaltung von  $\sigma^W$ -regulierten Genen notwendig ist (Schöbel *et al.*, 2004). Das tatsächliche Vorhandensein von YluC-E21A konnte zwar aufgrund fehlender Antikörper nicht direkt nachgewiesen werden, jedoch korrelieren diese Ergebnisse sehr gut mit denen eines ähnlichen Experiments, welches mit RseP in *E. coli* durchgeführt wurde (Alba *et al.*, 2002). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die proteolytische Aktivität von YluC entscheidend für die Aktivierung von  $\sigma^W$  ist, sollte dieses Modell nun auf YlaD übertragen werden, um möglicherweise auch hier eine Beteiligung von RIP an der Regulation von  $\sigma^{Ylac}/YlaD$  nachweisen zu können.

### 5.5.2 Untersuchung der Proteolyse von YlaD durch YluC

Der Anti-Sigmafaktor YlaD weist große Sequenzähnlichkeiten zum Anti-Sigmafaktor RsiW auf (siehe Abbildung 8). Der Hauptunterschied zwischen beiden Proteinen besteht in der Abwesenheit der extracytoplasmatischen Domäne von YlaD. Um auszuschließen, dass es sich bei der veröffentlichten Sequenz von *ylaD* um eine, durch einen DNA-Sequenzierfehler verursachte, verkürzte Form handelt, wurde der Bereich vor und nach dem *ylaD*-Gen im *B. subtilis*-Chromosom (Wildtyp-Stämme 1012 und 168) sequenziert. Dabei konnte die Richtigkeit der vorliegenden Sequenz bestätigt werden. Um nun zu zeigen, dass der Anti-Sigmafaktor YlaD tatsächlich ein Membranprotein ist, wurde ein *B. subtilis*-Stamm konstruiert, der eine Kopie des *ylaD*-Gens unter IPTG-Kontrolle zusätzlich im Chromosom integriert hatte. Um YlaD durch Immunoblots auch nachweisen zu können, wurde an das N-terminale Ende von YlaD ein dreifacher FLAG-Epitop-Tag fusioniert (Abbildung 21, oben), da keine Antikörper gegen YlaD selbst verfügbar waren. Nach IPTG-Zugabe konnte in Membranfraktionen, mit Antikörpern gegen den FLAG-Tag, nur ein sehr schwaches Signal

für F<sub>3</sub>-YlaD nachgewiesen werden (Abbildung 21). Exprimierte man dieses Konstrukt ohne Transmembrandomäne von YlaD, so konnte das Fusionsprotein als deutliches Signal in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies belegt, dass YlaD in der Tat ein Membranprotein mit einer Transmembran-Domäne ist, und dass die vorhergesagte Transmembrandomäne am C-terminalen Ende von YlaD korrekt ist. Damit gehört YlaD zu der Gruppe membrangebundener Anti-Sigmafaktoren in *B. subtilis*, zu der auch RsiW, (Schöbel *et al.*, 2004), RsiX (Helmann, 2002) und YhdL/YhdK (Thackray und Moir, 2003) gehören. Um nun einen möglichen Einfluss der YluC-Protease auf die Stabilität von YlaD zu untersuchen, wurde in dem o.e. *B. subtilis*-Stamm, der F<sub>3</sub>-YlaD unter IPTG-Kontrolle exprimiert, das *yluC*-Gen deletiert. In Membranfraktionen dieses Stammes konnten große Mengen an F<sub>3</sub>-YlaD nachgewiesen werden (Abbildung 21 b), wodurch bestätigt wird, dass YlaD eine Substrat für die YluC-Protease darstellt. Im LacZ-Test konnte der Einfluss der YluC-Protease auf die Aktivität von  $\sigma^{\text{YlaC}}$  gezeigt werden, da YlaD im  $\Delta\text{yluC}$ -Hintergrund stabiler ist. Dadurch sinkt die LacZ-Aktivität der  $P_{\text{ylaA}}\text{-lacZ}$ -Reporterfusion (siehe Abbildung 44). Überexprimiertes YlaD wird scheinbar kontinuierlich von YluC abgebaut, da in Anwesenheit von YluC nur ein sehr schwaches Signal für F<sub>3</sub>-YlaD in Membranfraktionen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21 a). RsiW hingegen wird erst nach einem vorausgehenden proteolytischen Schritt zum Substrat für YluC, welches RsiW dann weiter abbaut (Schöbel *et al.*, 2004). Einem ähnlichen Regulationsmuster unterliegt auch der Anti-Sigmafaktor RseA aus *E. coli*. Dieser wird, beim Auftreten von extracytoplasmatischem Stress, zuerst von der DegS-Protease und anschließend von der, zu YluC orthologen Protease, RseP abgebaut. Das freigesetzte, cytoplasmatische Fragment von RseA wird dann letztendlich von der ClpXP-Protease so prozessiert, dass der immer noch gebundene Sigmafaktor  $\sigma^{\text{E}}$  freigesetzt wird (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002; Flynn *et al.*, 2004). Die Stabilisierung von F<sub>3</sub>-YlaD in Abwesenheit von YluC und mögliche Auswirkungen der Protease ClpXP wurden durch ein Puls-Markierungs-Experiment untersucht. Zu den bereits erwähnten Stämmen wurde ein Stamm verwendet, in dem die ATPase-Komponente der ClpXP-Protease deletiert, und somit ClpXP funktionsunfähig war (Abbildung 22). In Abwesenheit von YluC konnte man deutlich eine Stabilisierung des Signals für F<sub>3</sub>-YlaD erkennen, während das Fehlen einer funktionsfähigen ClpXP-Protease keinen Einfluss auf die Stabilität von F<sub>3</sub>-YlaD hatte (Abbildung 22). Wäre ClpXP am Abbau von YlaD beteiligt, so würde man nach Inaktivierung von ClpXP eine Anreicherung eines F<sub>3</sub>-YlaD-Fragmentes erwarten, wie es am Beispiel von RseA gezeigt werden konnte (Flynn *et al.*, 2004). Im Falle von RseA aus *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Prozessierung durch RseP

innerhalb der Transmembrandomäne von RseA am C-terminalen Ende ein proteolytischer Tag freigesetzt wird, welcher zwei Alanine an seinem Ende enthält. Diese Alanine sind Teil eines Signal-Motivs, welches durch ClpXP erkannt wird (Flynn *et al.*, 2003, 2004). Die Transmembrandomäne von YlaD enthält ebenfalls Alanine, genau wie die Transmembrandomäne von RsiW (Abbildung 48).

TM_RsiW	RTHPVI <span style="background-color: red;">AAA</span> AVFIILMGGGFFNS
TM_YlaD	GLLIMK <span style="background-color: red;">AA</span> CWFGAAVAMMLIIKL

**Abb. 48:** Alignment der Aminosäuresequenz von RsiW und YlaD innerhalb der Transmembrandomänen (TM).

Für RsiW konnte bereits eine Beteiligung von ClpXP am proteolytischen Abbau von RsiW nachgewiesen werden, wobei jedoch auch andere Proteasen am Abbau beteiligt sind (Wiegert, unveröffentlicht). So ist F<sub>3</sub>-YlaD zwar eindeutig ein Substrat für YluC, wobei die vorliegenden Experimente verdeutlichen, dass ClpXP zumindest nicht die einzige Protease sein kann, die am Abbau eines durch YluC geschnittenen YlaD beteiligt ist. Am Abbau von RseP geschnittenem RseA in *E. coli* sind neben ClpXP ebenfalls weitere Proteasen beteiligt (Flynn *et al.*, 2004). Man kann auch nicht ausschließen, dass eine andere ATPase-Komponente die Funktion der inaktivierten ClpX-Komponente übernimmt. In *B. subtilis* gibt es mit ClpC und ClpE zwei weitere ATPasen, die ebenfalls mit der Protease ClpP assoziieren können (Gerth *et al.*, 2004). Ebenso könnte der weitere Abbau durch Proteasen wie FtsH, Lon oder HslUV bewerkstelligt werden. Die Tatsache, dass YlaD anscheinend kontinuierlich von YluC abgebaut wird, ist ein entscheidender Unterschied im Regulationsmechanismus von  $\sigma^{\text{YlaC}}$ , verglichen mit  $\sigma^{\text{W}}$  aus *B. subtilis* und  $\sigma^{\text{E}}$  aus *E. coli*.

### 5.5.3 Untersuchung der Proteolyse weiterer Anti-Sigmafaktoren aus *B. subtilis* durch YluC

Eine Beteiligung von RIP an der Proteolyse von Anti-Sigmafaktoren konnte, auch durch Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, für die Anti-Sigmafaktoren RseA, RsiW und YlaD gezeigt werden (Alba *et al.*, 2002; Schöbel *et al.*, 2004). Möglicherweise stellt RIP einen generellen Mechanismus zur Regulation von ECF-Sigmafaktoren dar. Um dies genauer zu analysieren, wurde der Einfluss von YluC auf die Stabilität der Anti-Sigmafaktoren YrhM, RsiX und YhdL untersucht. Eine Untersuchung der Induktion der ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^{\text{V}}$  und  $\sigma^{\text{X}}$  im  $\Delta yluC$ -Hintergrund war nicht möglich, da für beide Sigmafaktoren keine geeigneten Stressoren bekannt waren. Im Fall von  $\sigma^{\text{M}}$  wurde die Induktion im  $\Delta yluC$ -Hintergrund nach

Säureschock untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluss des Fehlens der YluC-Protease auf die Induktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies liegt möglicherweise daran, dass neben YhdL auch YhdK an der negativen Regulation von  $\sigma^M$  beteiligt ist (Hornsburch und Moir, 1999). RsiW und auch RseA wird erst zum Substrat für RIP, wenn vorher eine andere Protease im extracytoplasmatischen Bereich des Anti-Sigmafaktors geschnitten hat. Im Gegensatz zu YlaD und RsiW enthalten die Anti-Sigmafaktoren YrhM, RsiX und YhdL, laut Vorhersage durch DAS (Cserzo *et al.*, 1997), jeweils zwei Transmembran-Segmente (siehe Abbildung 23). Um eine zu YlaD bzw. RsiW vergleichbare Situation zu schaffen, wurden diese drei Antisigmafaktoren derart verkürzt exprimiert (YrhM62, RsiX70 und YhdL96), dass sie der Struktur von YlaD ähnelten, da YlaD im Gegensatz zu RsiW, kontinuierlich von YluC abgebaut wird (siehe 5.5.2). Im Falle der verkürzten, Flag-getaggten Proteine von RsiX und YhdL konnte im *yluC*-Knockout eine Anreicherung eines Fragmentes detektiert werden, dessen Bande, bei Anwesenheit von YluC, nicht nachweisbar war (Abbildung 24). Dies spricht dafür, dass diese beiden Anti-Sigmafaktoren möglicherweise ähnlich wie RsiW reguliert werden. Aufgrund eines Stressors wird der Anti-Sigmafaktor im extracytoplasmatischen Bereich von einer bislang unbekannt Protease geschnitten, was in unserem Fall durch die bereits verkürzten Versionen von RsiX und YhdL simuliert wurde. Erst nach diesem ersten, proteolytischen Schritt werden die Anti-Sigmafaktoren zum Substrat für die YluC-Protease (Schöbel *et al.*, 2004). Für das verkürzte F<sub>3</sub>-YrhM konnte kein Signal erhalten werden, weder im Wildtyp- noch im  $\Delta yluC$ -Hintergrund. Dies könnte auf eine generelle Instabilität für den Fall der alleinigen Überexpression des Anti-Sigmafaktors hinweisen. Für das Flag-getaggte Vollängen-RsiX konnte weder im Wildtyp- noch  $\Delta yluC$ -Hintergrund ein Signal nachgewiesen werden. Man hätte hier erwartet, dass YluC keinen Einfluss auf die Stabilität des Vollängen-F<sub>3</sub>-RsiX hat. Die erwartete Größe des Vollängen-F<sub>3</sub>-RsiX würde 44,3 kDa betragen. Möglicherweise wird das Signal durch starke Kreuzreaktions-Banden, verursacht durch die FLAG-Antikörper im Bereich um 45 kDa, überdeckt (Abbildung 25). Um zu zeigen, dass YluC nicht einfach jedes Membranprotein mit fehlender extracytoplasmatischer Domäne abbauen kann, wurde ein Kontrollexperiment mit F<sub>3</sub>-SecE durchgeführt. Das SecE-Protein ist ein Membranprotein mit einer Transmembrandomäne, bei dem ähnlich wie bei YlaD, nur wenige Aminosäuren in den extracytoplasmatischen Bereich hinein ragen und der N-Terminus im Cytoplasma liegt (Jeong *et al.*, 1993). Vergleicht man nun die Signale für F<sub>3</sub>-SecE im Wildtyp- und  $\Delta yluC$ -Hintergrund, so kann man bereits im Wildtyp-Hintergrund ein deutliches Signal für das F<sub>3</sub>-SecE detektieren. Berücksichtigt man die Signalintensitäten der FtsH-Ladungskontrolle, so ist kaum ein Unterschied zwischen den

Signalintensitäten von F<sub>3</sub>-SecE im Wildtyp- und  $\Delta yluC$ -Hintergrund feststellbar. Kürzlich konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass RseP aus *E. coli* in Transmembranregionen einiger Modellproteine schneiden kann. Ersetzte man in der Transmembran-Domäne des Modellproteins LacYTM1 Helix-destabilisierende Aminosäuren durch Helix-stabilisierende Aminosäuren, so konnte eine Inhibition der Proteolyse dieses Modellproteins durch RseP beobachtet werden. Die Autoren schließen deshalb nicht aus, dass RseP eine generelle Rolle beim Abbau von Transmembran-Segmenten spielt (Akiyama *et al.*, 2004).

Die YluC-Protease scheint jedoch auf F<sub>3</sub>-SecE keinen Einfluss zu haben. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeichnet sich ein generelles Regulationsschema ab, bei dem Anti-Sigmafaktoren durch regulierte intramembrane Proteolyse kontrolliert bzw. reguliert werden. Für Prokaryoten wurde dies zuerst für das  $\sigma^E$ /RseA-System aus *E. coli* (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002) und für das  $\sigma^W$ /RsiW-System aus *B. subtilis* gezeigt (Schöbel *et al.*, 2004). Generell scheint der RIP-Mechanismus, der zuerst in Eukaryoten entdeckt wurde (Weihofen und Martoglio, 2003), auch in Prokaryoten konserviert zu sein. In Prokaryoten wurden bislang I-Clips identifiziert, die an der Regulation der Stressantwort in *E. coli* und *B. subtilis* (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002; Schöbel *et al.*, 2004), der Sporulation in *B. subtilis* (Rudner *et al.*, 1999), der Zellpolarität in *Caulobacter crescentus* (Chen *et al.*, 2005) und der Virulenz bzw. der Zusammensetzung der Zellhülle in *M. tuberculosis* (Makinoshima and Glickman, 2005) beteiligt sind.

## 5.6 Analyse der Bindung von Zink an die cytoplasmatische Domäne von YlaD

Durch Sequenzvergleiche wurde in der cytoplasmatischen Domäne von YlaD ein Zinkbindungsmotiv (HCC-Motiv) identifiziert. Dieses Motiv findet man auch in anderen Anti-Sigmafaktoren, unter anderem auch in RsrA (*S. coelicolor*) und RsiW. Paget *et al.* (2001) postulierten deshalb eine neue Familie Zink-bindender Anti-Sigmafaktoren (ZAS). Um zu zeigen, dass YlaD ein Zink-Metalloprotein ist, wurde die cytoplasmatische Domäne von YlaD als Fusionsprotein, welches das HCC-Motiv an den Positionen H<sub>29</sub>XXXC<sub>33</sub>XXC<sub>36</sub> enthält, mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag (His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM) nativ aufgereinigt (siehe Abbildung 28). Zusätzlich wurden auch HCC-Mutanten aufgereinigt, in denen die Cysteine zu Alanin, respektive Serin, mutiert waren (His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TMC33/36A und His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TMC33/36S). Im Gegensatz zur Wildtyp-Variante und zur Alanin-Mutante aggregierte die Serin-Mutante fast komplett, wenn sie in *E. coli* überproduziert wurde (Daten nicht

gezeigt). Die nativ aufreinigbaren Varianten wurden durch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) untersucht. In einer Lösung mit 8  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TM}$  wurden 9,04  $\mu\text{M}$  Zink gemessen, während in einer 8  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TMC33/36A}$  kein Zink detektiert werden konnte. Somit ergibt sich für die Wildtyp-Variante ein Wert von 1,13 Mol Zink pro 1 Mol Protein. Damit gehört YlaD, neben RsrA (Paget *et al.*, 2001), ChrR (Newman *et al.*, 2001) und RsiW (Zellmeier, unveröffentlicht), eindeutig zu den Mitgliedern der ZAS-Familie von Anti-Sigmafaktoren, für die gebundenes Zink eindeutig nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich ist das HCC-Motiv bereits ein guter Hinweis auf ein komplexiertes Zinkion. Allerdings konnte für RsrA aus *S. coelicolor* bereits gezeigt werden, dass das erste Histidin innerhalb dieses HCC-Motivs nicht an der Koordinierung des Zinkions beteiligt ist, wohl aber einen strukturellen Einfluss auf die Anti-Sigmafaktor-Aktivität hat (Bae *et al.*, 2004). Da die Serin-Mutante nicht nativ aufgereinigt werden konnte, wurden sowohl die Wildtyp-Variante als auch beide HCC-Mutanten in Anwesenheit von 8 M Harnstoff denaturierend aufgereinigt (Abbildung 29). Auch hier konnte nicht genügend His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TMC33/36S}$  für weitere Experimente erhalten werden. Um die denaturierend aufgereinigten Proteine (His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TM}$  und His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TMC33/36A}$ ) rückzufalten, wurden verschiedene Proteinmengen mit einem 100fachen Überschuss an Puffer, der 2  $\mu\text{M}$  Zink und 1 mM DTT enthielt, verdünnt. Die Abnahme der Zink-Konzentration wurde kolorimetrisch unter Verwendung des Farbstoffs PAR bestimmt (Hunt *et al.*, 1985). Für die Wildtyp-Variante konnte eine äquimolare Bindung von Zink gemessen werden (Abbildung 30), wodurch die Ergebnisse der AAS bestätigt werden konnten. Die Alanin-Mutante konnte Zink nur in sehr geringen Mengen binden (Abbildung 30), ähnlich wie Pbp4\* (Zellmeier *et al.*, 2003), ein Protein ohne HCC-Motiv (Daten nicht gezeigt). Daher kann die Zinkbindung an die Alaninmutante als unspezifisch bezeichnet werden, was ebenfalls die Ergebnisse der AAS bestätigte. Die Affinität von His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TM}$  zu Zink war deutlich geringer, wenn dem Rückfaltungspuffer kein DTT zugegeben wurde (Daten nicht gezeigt). Wenn statt 1 mM DTT, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Oxidation der Cysteine) zum Rückfaltungspuffer gegeben wurde, so konnte His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta\text{TM}$  fast kein Zink mehr binden (Abbildung 30). Dies belegt die Wichtigkeit von reduzierten Cysteinen für die Komplexierung von Zink. Ob nun die Bindung von Zink an YlaD essentiell für die Anti-Sigmafaktor-Aktivität ist oder nicht, muss noch gezeigt werden. Im Falle von RsiW scheint die Mutation des HCC-Motivs keinen Einfluss auf die Anti-Sigmafaktor-Aktivität zu haben (Zellmeier, unveröffentlicht). Im Falle von ChrR konnte, ganz im Gegensatz zu RsiW, gezeigt werden, dass die Bindung von Zn<sup>2+</sup> essentiell für die Anti-Sigmafaktor-Aktivität ist und HCC-Mutanten nicht mehr als Anti-Sigmafaktor wirken (Newman *et al.*, 2001). Für RsrA wurde

hingegen gezeigt, dass  $Zn^{2+}$  für die Anti-Sigmafaktor-Aktivität nicht notwendig ist, wohl aber das HCC-Motiv für Wechselwirkungen zwischen Sigma- und Anti-Sigmafaktor (Kang *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass bislang kein induzierender Stressor für  $\sigma^{YlaC}$  identifiziert werden konnte, wurden die HCC-Mutanten nicht weiter durch *in vivo*-Experimente untersucht.

## 5.7 Analyse einer direkten Interaktion zwischen YlaC und der cytoplasmatischen Domäne von YlaD

Da die Aktivität des ECF-Sigmafaktors  $\sigma^{YlaC}$  möglicherweise durch eine direkte Interaktion mit seinem Anti-Sigmafaktor YlaD moduliert wird, wie es bereits für  $\sigma^W/RsiW$  aus *B. subtilis* (Schöbel *et al.*, 2004),  $\sigma^E/RseA$  aus *E. coli* (De las Penas *et al.*, 1997) und  $\sigma^E/ChrR$  aus *R. spaeroides* (Anthony *et al.*, 2004) gezeigt werden konnte, sollte eine derartige Wechselwirkung auch für  $\sigma^{YlaC}/YlaD$  nachgewiesen werden. Um dies zu zeigen, wurde das *in vivo* Hefe-Two-Hybrid-System verwendet, da der biochemische Nachweis einer Wechselwirkung zwischen Membranproteinen problematisch ist (Abbildung 31). Es wurde die Gal4-DNA-Bindungsdomäne an den C-Terminus der cytoplasmatischen Domäne von YlaD (ersten 75 Aminosäuren) fusioniert, die Gal4-Aktivierungsdomäne an den ECF-Sigmafaktor YlaC. Nach Transformation in *S. cerevisiae* AH109 konnten die von Gal4 kontrollierten Reporterkonstrukte, welche zu einer Aktivierung der Histidin-Prototrophie (*HIS3*) bzw. der Adenin-Prototrophie (*ADE2*) führen sollten, nicht aktiviert werden (Abbildung 32, oben). Die Positivkontrolle zeigte die gewünschte Aktivierung der Reporterkonstrukte, wodurch man von einer korrekten Durchführung des Assays ausgehen kann (Abbildung 32, oben). Ungefähr zur gleichen Zeit wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe, welche die Interaktion zwischen möglichen Anti-Sigmafaktoren und Sigmafaktoren in *B. subtilis* durch Hefe-Two-Hybrid-Assays untersuchte, ein ähnliches Ergebnis erhalten (Yoshimura *et al.*, 2004). Obwohl hier keine direkte Interaktion zwischen YlaC und der cytoplasmatischen Domäne von YlaD nachgewiesen werden konnte, ist das Hefe-Two-Hybrid-System durchaus geeignet, diese Art von Interaktionen nachzuweisen, da es bereits erfolgreich eingesetzt wurde, um eine direkte Interaktion zwischen  $\sigma^W/RsiW$  aus *B. subtilis* (Schöbel *et al.*, 2004) und  $\sigma^{CarQ}/CarR$  aus *M. xanthus* (Browning *et al.*, 2003) nachzuweisen. Eine direkte Interaktion zwischen nativ aufgereinigtem His<sub>6</sub>-YlaD $\Delta$ TM, gebunden an eine Ni-NTA-Säule, und FLAG<sub>3</sub>-YlaC aus *B. subtilis*-Zellextrakten konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Ein derartiges Experiment wurde bereits erfolgreich

eingesetzt, um eine Wechselwirkung zwischen an Ni-NTA immobilisiertem FecR und FecA zu zeigen (Enz *et al.*, 2000). Somit kann tatsächlich davon ausgegangen werden, dass es keine direkte Interaktion zwischen dem ECF-Sigmafaktor YlaC und seinem Anti-Sigmafaktor gibt. Eventuell wird die Wechselwirkung durch ein weiteres Protein vermittelt. Für  $\sigma^M$  konnten beispielsweise zwei negative Regulatoren (YhdL und YhdK) identifiziert werden, die beide downstream des *sigM*-Gens liegen. Sowohl YhdL als YhdK hatten einen negativen regulatorischen Effekt auf die Expression einer *sigM-lacZ*-Reporterfusion (Horsburgh and Moir, 1999). In Hefe-Two-Hybrid-Experimenten mit  $\sigma^M$  und YhdL bzw. YhdK konnte keine Wechselwirkung gezeigt werden. Erst bei der Verwendung der N-terminalen Domäne von YhdL konnte eine schwache Interaktion mit  $\sigma^M$  nachgewiesen werden. Starke Wechselwirkungen waren jedoch zwischen YhdL und YhdK nachweisbar (Yoshimura *et al.*, 2004). Ein ähnliches Bild zeichnet sich für  $\sigma^Y$  ab. Zwar konnte durch Hefe-Two-Hybrid-Experimente eine Wechselwirkung zwischen  $\sigma^Y$  und dem downstream-gelegenen *yx1C*-Gen gezeigt werden. Als negative Regulatoren von  $\sigma^Y$  erwiesen sich jedoch die beiden ebenfalls downstream-gelegenen Gene *yx1D* und *yx1E* (Cao *et al.*, 2003), während *yx1C* keinen Einfluss auf die Regulation von  $\sigma^Y$  hatte. Eine Wechselwirkung zwischen Yx1D bzw. Yx1E und  $\sigma^Y$  konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden (Yoshimura *et al.*, 2004). Die bis dato publizierten Resultate erlauben durchaus die Schlussfolgerung, dass der negative Regulator eines ECF-Sigmafaktors nicht notwendigerweise durch direkte Interaktion mit dem ECF-Sigmafaktor in Kontakt treten muss bzw. für eine Interaktion ein dritter Partner notwendig ist. Obwohl die molekularen Interaktionen zwischen  $\sigma^E$ /RseA (*E. coli*),  $\sigma^R$ /RsrA (*S. coelicolor*) und  $\sigma^E$ /ChrR (*R. sphaeroides*) bereits gut untersucht sind, ist es, aufgrund der mangelnden Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Familie der Anti-Sigmafaktoren schwierig vorherzusagen, auf welche Art und Weise Anti-Sigmafaktoren mit ihren jeweiligen Sigmafaktoren interagieren. Für  $\sigma^E$  aus *R. sphaeroides* wurden innerhalb der Region 2.1 Aminosäuren identifiziert, die für eine Inhibition durch ChrR essentiell sind. Durch Interaktion zwischen ChrR und  $\sigma^E$  wird verhindert, dass  $\sigma^E$  mit der RNA-Polymerase wechselwirkt (Anthony *et al.*, 2004). Diese für  $\sigma^E$  aus *R. sphaeroides* identifizierten Aminosäuren, die für eine Interaktion mit dem Anti-Sigmafaktor ChrR notwendig sind, konnten in der Sequenz von  $\sigma^{YlaC}$  nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch gibt es auch Beispiele für Anti-Sigmafaktoren, die derart wirken, dass sie Dissoziation zwischen Sigmafaktor und RNA-Polymerase erleichtern (Chadsey *et al.*, 1998) oder die Promotorerkennung durch die RNA-Polymerase verhindern (Adelman *et al.*, 1997).

## 5.8 Untersuchung der Funktionen von YlaA und YlaB

Der Anti-Sigmafaktor YlaD scheint kontinuierlich, also auch ohne vorausgegangenem Stress, von YluC abgebaut zu werden, wodurch sich die Frage nach dem Sinn dieses Regulationsschemas stellt. Zusätzlich fehlt in YlaD der komplette extracytoplasmatische Bereich, welcher im Falle von RsiW, nach NaOH-Schock, das Ziel des ersten proteolytischen Schnittes einer noch unbekannt Protease ist. Da der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^{YlaC}$ , im Gegensatz zu RsiW, in einem tetracistronischen Operon liegt, welches zusätzlich für zwei weitere Membranproteine kodiert (siehe Abbildung 33), sollte eine mögliche Beteiligung dieser Proteine an der Regulation von  $\sigma^{YlaC}$  genauer betrachtet werden. Insbesondere war es naheliegend, dass YlaA und/oder YlaB in einem Membrankomplex mit YlaD vorliegen und YlaD dadurch vor dem Zugriff der YluC-Protease abschirmen. Ebenso könnten YlaA und/oder YlaB die Wechselwirkung zwischen YlaC und YlaD vermitteln, was die fehlende Interaktion zwischen YlaC und YlaD im Hefe-Two-Hybrid Versuch erklären könnte. Man muss auch berücksichtigen, dass es sich bei der Überexpression von YlaD um ein artifizielles System handelte, da unter normalen Bedingungen wahrscheinlich alle Komponenten des *ylaA*-Operons in vergleichbaren Mengen vorliegen. Während YlaD im Rahmen dieser Arbeit als Anti-Sigmafaktor identifiziert werden konnte, ist die Funktion der beiden ersten Genprodukte des *ylaA*-Operons, YlaA und YlaB, bislang noch unbekannt. In einem ersten Experiment konnte gezeigt werden, dass F<sub>3</sub>-YlaD nur bei gleichzeitiger Expression von YlaA, YlaB und YlaC als deutliches Signal im Western-Blot nachweisbar war (Abbildung 34). Bislang konnte ein deutliches Signal für F<sub>3</sub>-YlaD nur bei Abwesenheit der YluC-Protease detektiert werden (siehe Abbildung 21). Abbildung 34 zeigt ein deutliches Signal für F<sub>3</sub>-YlaD (Spur 2) nur für den Fall, dass gleichzeitig die Expression der Gene *ylaABC*, durch Zugabe von Xylose, induziert wurde. Bei alleiniger Expression von F<sub>3</sub>-YlaD (Spur 3) im Hintergrund eines wildtypischen *ylaA*-Operons bzw. Expression von F<sub>3</sub>-YlaD ohne Expression der Gene *ylaABC* (Spur 1) kann kein entsprechendes Signal nachgewiesen werden. In Abwesenheit der YluC-Protease und gleichzeitiger Expression von F<sub>3</sub>-YlaD, erhält man ein starkes Signal für F<sub>3</sub>-YlaD mit und ohne Zugabe von Xylose (Spuren 5 und 6). Die Anwesenheit aller Komponenten des *ylaA*-Operons scheint das F<sub>3</sub>-YlaD-Protein vor dem Abbau durch die YluC-Protease zu schützen. Um eine mögliche Beteiligung der beiden Proteine YlaA und YlaB an der Regulation von YlaC detaillierter zu untersuchen, wurde in *B. subtilis* SZ93 das komplette *ylaA*-Operon durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt und chromosomale DNA dieses Stammes im Southern-Blot überprüft (Abbildung 35). In diesen Stamm wurden verschiedene IPTG-regulierbare Komponenten des *ylaA*-Operons sowie die *ylaA-lacZ*-

Reporterfusion (Abbildung 11) eingekreuzt. Alle Konstrukte wurden sowohl im Southern- als auch im Northern-Blot überprüft (Abbildungen 36 und 37), um die Verlässlichkeit der im Folgenden durchgeführten LacZ-Tests zu gewährleisten. Die mit allen Konstrukten durchgeführten LacZ-Tests zeigten, dass bei IPTG-regulierter Expression des gesamten *ylaA*-Operons nur eine sehr geringe LacZ-Aktivität messbar war. Exprimierte man die Gene *ylaBCD*, so stieg die LacZ-Aktivität, verglichen zur Expression des gesamten *ylaA*-Operons um den Faktor vier an. Nach alleiniger Expression von *ylaC* und *ylaD*, also dem ECF-Sigmafaktor und dem Anti-Sigmafaktor, konnte man eine um den Faktor 21 erhöhte LacZ-Aktivität messen (Abbildung 38). Diese hohe Aktivität, obwohl der Anti-Sigmafaktor *ylaD* zusammen mit *ylaC* exprimiert wurde, lässt sich dadurch erklären, dass YlaD durch die YluC-Protease kontinuierlich abgebaut wird (siehe 5.6). Durch das Fehlen von YlaA und YlaB kann YlaD nicht stabilisiert bzw. vor dem Abbau durch YluC geschützt werden. Die LacZ-Aktivitäten belegen, dass YlaB scheinbar den größeren Beitrag zur Stabilisierung von YlaD liefert, da die LacZ-Aktivität drastisch steigt, wenn *ylaB* nicht exprimiert wird. Die LacZ-Aktivität ist am geringsten, wenn alle Komponenten des *ylaA*-Operons exprimiert wurden, was möglicherweise darauf hindeutet, dass der Anti-Sigmafaktor YlaD durch die Proteine YlaA und YlaB stabilisiert wird. Transformiert man die IPTG-induzierbaren Konstrukte  $P_{spac}ylaBCD$ ,  $P_{spac}ylaCD$  und  $P_{spac}ylaC$  in *B. subtilis* Wildtyp-Hintergrund, so kann man im Northern-Blot mit einer Sonde gegen das *ylaA*-Gen die Auswirkungen der Induktion der Konstrukte auf die Transkription des wildtypischen *ylaA*-Operons detektieren (Abbildung 39). Induziert man alle Konstrukte mit IPTG, so kann man das Transkript des wildtypischen *ylaA*-Operons nicht nachweisen, wenn  $P_{spac}ylaBCD$ -Transkript gebildet wird (siehe Abbildung 39, Spur 1). Auch dies deutet darauf hin, dass YlaD möglicherweise durch YlaB stabilisiert wird, und somit der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^{YlaC}$  inaktiviert bleibt, wodurch die Transkription des wildtypischen *ylaA*-Operons nicht stattfinden kann, da dieses Operon ja durch  $\sigma^{YlaC}$  kontrolliert wird. Abbildung 39 zeigt zudem, dass die jeweils induzierten Komponenten des *ylaA*-Operons tatsächlich als Transkripte präsent waren. Neben einer möglichen Stabilisierung von YlaD durch YlaB lassen diese Ergebnisse ebenfalls den Schluss zu, dass YlaB selbst als Anti-Sigmafaktor wirken kann. Dem widerspricht aber die hohe Aktivität der  $P_{ylaA-lacZ}$ -Reporterfusion im *B. subtilis* SZ77.

### 5.8.1 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen YlaD und YlaB

Da es offensichtlich keine Wechselwirkung zwischen YlaC und YlaD alleine gibt (siehe 5.7), sollte die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen YlaB und YlaD untersucht werden, da

für YlaB ein stabilisierender Einfluss auf YlaD gezeigt werden konnte (siehe 5.8). Möglicherweise können YlaD und YlaB auch nur gemeinsam mit YlaC wechselwirken. Exprimiert man unter Xylose-Kontrolle YlaB mit einem N-terminalen Myc-Tag gemeinsam mit GFP-YlaD (Abbildung 40), so kann man das GFP-YlaD Fusionsprotein auch in Anwesenheit der YluC-Protease nachweisen (Abbildung 41). Zusätzlich zum immunologischen Nachweis von GFP-YlaD mit GFP-Antikörpern und von Myc-YlaB mit Antikörpern gegen den Myc-Tag kann auch die GFP-Fluoreszenz im *B. subtilis*-Zellextrakt detektiert werden. Dazu wurden 30  $\mu$ l *B. subtilis*-Zellextrakt der entsprechenden Stämme in einer Mikrotiterplatte mit Fluoreszenzlicht bestrahlt und die dadurch angeregte Fluoreszenz des GFP-YlaD aufgenommen (Abbildung 41, unten). Die Zellen, in denen Myc-YlaB und GFP-YlaD gemeinsam exprimiert wurden, wiesen eine ähnlich starke Fluoreszenz auf, wie diejenigen Zellen, in denen nur GFP-YlaD exprimiert wurde, aber die YluC-Protease fehlte. Verwendet man ein Konstrukt, in dem neben Myc-YlaB F<sub>3</sub>-YlaD (*B. subtilis* SZ109) unter Xylose-Kontrolle produziert wird (Abbildung 42), kann man durch die Verwendung von FLAG-Agarose eine direkte Wechselwirkung zwischen YlaB und YlaD nachweisen. Mit ähnlichen Experimenten wurden die oligomeren Eigenschaften des Tat-Protein-Komplexes in *E. coli* (De Leeuw *et al.*, 2002) und die Bindung von FecR an FecA, ebenfalls in *E. coli* (Enz *et al.*, 2000), erfolgreich untersucht. Isolierte Membranfraktionen aus *B. subtilis* SZ109 wurden solubilisiert und mit FLAG-Agarose inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der FLAG-Agarose und Ablösung gebundener Proteine mit SDS-haltigem Puffer konnte im Western-Blot sowohl YlaB, als auch YlaD nachgewiesen werden. Dabei scheint die Menge an detektierbarem YlaB von der Menge an vorhandenem YlaD abhängig zu sein. Dies kann man feststellen, wenn man die Menge an YlaB und YlaD vor und nach der Inkubation, mit der FLAG-Agarose vergleicht. Durch ein Kontrollexperiment mit membrangebundenem FtsH-Protein konnte eine unspezifische Bindung von Myc-YlaB an die FLAG-Agarose ausgeschlossen werden. Selbiges gilt für die alleinige Expression von Myc-YlaB (Daten nicht gezeigt). Im einem Hefe-Two-Hybrid-Versuch, der mit den beiden negativen Regulatoren von  $\sigma^M$ , Yhdl und YhdK, durchgeführt wurde, konnte ebenfalls eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nachgewiesen werden (Yoshimura *et al.*, 2004). Scheinbar wird YlaD durch die Interaktion mit YlaB, vor dem proteolytischen Abbau durch die YluC-Protease geschützt. Eine stabilisierende Wirkung wird auch für das RseB-Protein aus *E. coli* postuliert. Dabei soll RseB den Komplex aus  $\sigma^E$ /RseA stabilisieren und somit vor proteolytischem Abbau schützen (Ades *et al.*, 1999; Collinet *et al.*, 2000). Vor kurzem wurde außerdem gezeigt, dass RseB die Prozessierung von intaktem RseA durch RseP inhibiert. RseB leistet dadurch einen wichtigen

Beitrag zur Feinregulierung der proteolytischen Stabilität von RseA (Grigorova *et al.*, 2004). Durch Überexpression einer Komponente des SecYEG-Translokationskomplexes, nämlich SecY, wird diese schnell von der membrangebundenen Metalloprotease FtsH abgebaut. Nur wenn SecY und SecE in gleichem Maße vorhanden sind, also SecY im Komplex mit SecE vorliegt, wird SecY nicht abgebaut (Kihara *et al.*, 1995). Die unter 5.8 und 5.9 beschriebenen LacZ-Tests lassen den Schluss zu, dass der Anti-Sigmafaktor am stabilsten ist, wenn er im Komplex mit allen Komponenten des *ylaA*-Operons exprimiert wird.

### 5.9 YlaB wirkt nicht als negativer Regulator von $\sigma^{YlaC}$

Vergleicht man die LacZ-Aktivitäten eines *B. subtilis*-Stammes, in dem im *ylaABCD*-Knockout-Hintergrund die Transkription von *ylaB* und *ylaC* induziert wurde, mit den LacZ-Aktivitäten, der bereits in Abbildung 39 dargestellten Stämme, so fällt auf, dass man eine geringere LacZ-Aktivität messen kann, als für die alleinige Expression von *ylaC* (Abbildung 44). Besonders interessant ist hier der Vergleich mit einem Stamm, in dem YlaC und YlaD produziert werden, und zusätzlich die YluC-Protease deletiert wurde (siehe Tabelle 13).

**Tab. 13:** LacZ-Aktivitäten in  $\Delta ylaA \text{ amyE}::ylaA-lacZ$  (aus Abbildung 44)

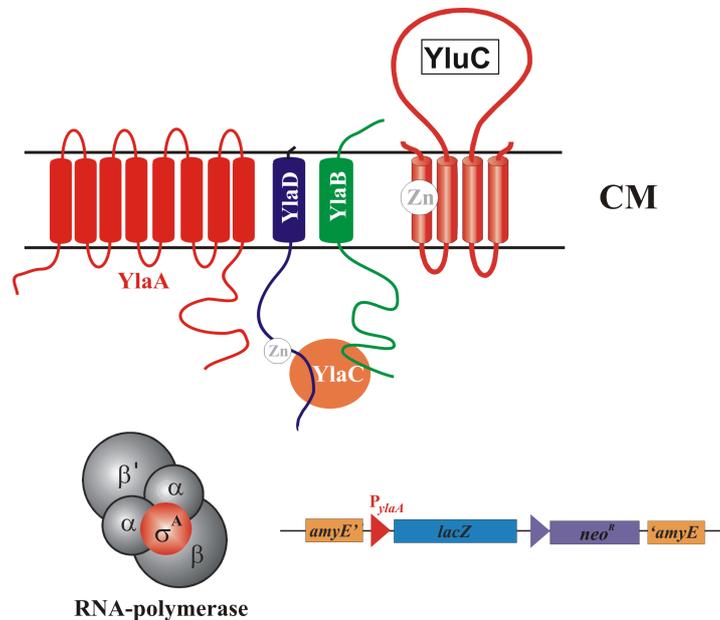
Konstrukte	LacZ-Aktivität
$P_{spac}ylaABCD$	0,5
$P_{spac}ylaBCD$	1,7
$P_{spac}ylaBC$	19,9
$P_{spac}ylaC$	34,7
$P_{spac}ylaCD$	36,2
$P_{spac}ylaCD \Delta yluC$	18,8

Werden nur der Anti-Sigmafaktor und der Sigmafaktor gebildet, so erhält man eine hohe LacZ-Aktivität, da der Anti-Sigmafaktor, YlaD, durch YluC kontinuierlich abgebaut wird (siehe auch 5.5.2). Ist die YluC-Protease deletiert, so verringert sich die LacZ-Aktivität auf die Hälfte, was darauf hindeuten könnte, dass YlaB nicht nur zur Stabilisierung, sondern auch zur Interaktion mit YlaC benötigt wird. Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen unter 5.2 überein, da in dem Fall YlaD durch die Xylose-induzierte Produktion von YlaA und YlaB vor einem Abbau durch YluC geschützt war und somit als Anti-Sigmafaktor wirken konnte. Wird hingegen zusätzlich zum ECF-Sigmafaktor YlaC und YlaB gebildet, so kann man nur eine um den Faktor 1,8 geringere LacZ-Aktivität, verglichen mit der alleinigen Produktion von YlaC

messen. Dies würde darauf hindeuten, dass YlaB neben der stabilisierenden Wirkung auf YlaD (siehe 5.8) in gewissem Maße auch als Anti-Sigmafaktor wirken könnte. Die Tatsache, dass zwei negative Regulatoren für einen ECF-Sigmafaktor identifiziert wurden, ist durchaus nicht ungewöhnlich, wie dies offensichtlich für  $\sigma^M$  und  $\sigma^Y$  der Fall ist. Für  $\sigma^M$  wurden die Genprodukte zweier downstream-gelegener Gene, *yhdL* und *yhdK*, als Anti-Sigmafaktoren identifiziert (Horsburgh and Moir, 1999, Thackray and Moir, 2003). Für  $\sigma^Y$  wurden ebenfalls zwei Proteine identifiziert, die als negative Regulatoren der  $\sigma^Y$ -Aktivität wirken können. Die beiden Proteine werden von den zwei downstream von *sigY* gelegenen Genen *yxID* und *yxIE* kodiert. Dabei scheint YxIE der stärkere, negative Regulator der  $\sigma^Y$ -Aktivität zu sein, verglichen mit YxIC (Cao *et al.*, 2003). Aufgrund der hohen Streuung der Werte der LacZ-Aktivitäten (siehe Fehlerbalken in Abbildung 44) wurde der entsprechende Stamm im Northern-Blot untersucht (Abbildung 45). Dort konnte bereits ohne IPTG-Zugabe ein, wenn auch sehr schwaches Signal für das *lacZ*-Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 45, Spur 1). Dies deutet eher darauf hin, dass keine Repression der LacZ-Aktivität durch YlaB erfolgt. In einem weiteren Northern-Blot mit mRNA eines Stammes, in dem man die Expression von *ylaB* durch Xylose und die Expression von *ylaC* durch IPTG regulieren konnte, war ebenfalls Transkript für das autoregulierende, wildtypische *ylaA*-Operon nachweisbar (Abbildung 46). Selbst bei Vorhandensein großer Mengen an *ylaB*-Transkript im Vergleich zu der Menge an *ylaC*-Transkript kann man *ylaA*-Transkript nachweisen (Abbildung 46, Spur 4). In allen Fällen konnte ohne Expression von *ylaC* kein *ylaA*-Transkript detektiert werden. Vergleicht man die Ergebnisse der oben beschriebenen Northern-Blot-Experimente mit denen aus den LacZ-Tests, so ist es unwahrscheinlich, dass YlaB ebenfalls als Anti-Sigmafaktor wirkt. Warum in unseren Experimenten die LacZ-Tests mit *B. subtilis* SZ99 den Anschein erwecken, als könne YlaB ebenfalls als zweiter Anti-Sigmafaktor neben YlaD wirken, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse der Northern-Blots, durchgeführt mit mRNA zweier unterschiedlicher Stämme, schlossen jedoch eine Wirkung von YlaB als negativer Regulator von  $\sigma^{YlaC}$  aus. Möglicherweise ist aus unbekanntem Gründen die Stabilität der *ylaBC*-mRNA in diesem Stamm beeinträchtigt oder der Stamm ist instabil. Da die Proben zur Isolierung der mRNA (Abbildung 45) bereits 20 min nach Induktion mit IPTG entnommen wurden, während die LacZ-Aktivität erst 60 min nach IPTG-Zugabe bestimmt wurde, kann über mRNA-Stabilität zum Zeitpunkt 60 min keine Aussage getroffen werden. Berücksichtigt man zusätzlich die Ergebnisse aus 5.8, so liegt die Funktion von YlaB eindeutig in der Stabilisierung von YlaD und nicht in Wirkung als Anti-Sigmafaktor.

## 5.10 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^{YlaC}$  durch den im selben Operon liegenden Anti-Sigmafaktor YlaD negativ reguliert wird. Das YlaB-Protein, welches ebenfalls durch das *ylaA*-Operon kodiert wird, schützt den Anti-Sigmafaktor YlaD vor einem Abbau durch die RIP-Protease YluC.



**Abb. 49:** Modell der Organisation der Komponenten des *ylaA*-Operons. Durch Interaktion mit YlaB und YlaD wird  $\sigma^{YlaC}$  daran gehindert, mit der RNA-Polymerase zu interagieren, wodurch keine Transkription des *ylaA*-Operons erfolgen kann. Zudem wird YlaD durch Interaktion mit YlaB vor dem Abbau durch YluC geschützt.

Da YlaD offensichtlich nicht alleine mit  $\sigma^{YlaC}$  interagieren kann, wäre es interessant zu untersuchen, ob YlaB und YlaD möglicherweise nur gemeinsam mit  $\sigma^{YlaC}$  wechselwirken können (siehe Modell Abbildung 49). Ebenso wäre es interessant, den Einfluss der Zinkbindung auf die Stabilität bzw. die Aktivität des Anti-Sigmafaktors YlaD genauer zu untersuchen.

Ungeklärt ist bislang auch die Frage, welche Gene, außer dem *ylaA*-Operon selbst, durch  $\sigma^{YlaC}$  reguliert werden. Möglicherweise reguliert  $\sigma^{YlaC}$  ausschließlich sein eigenes Operon, wie dies beispielsweise für  $\sigma^{FecI}$  aus *E. coli* gezeigt werden konnte (Braun *et al.*, 2003). Der ECF-Sigmafaktor  $\sigma^Y$  aus *B. subtilis* reguliert, neben seinem eigenen Operon, nur ein weiteres Gen (Cao *et al.*, 2003). Durch weitere Transkriptomanalysen mit geeigneten Stämmen wäre es durchaus sinnvoll, nochmals nach  $\sigma^{YlaC}$ -regulierten Genen zu suchen. Sollte man  $\sigma^{YlaC}$ -regulierte Gene identifizieren können, so könnte man eventuell aufgrund der Funktion dieser Gene auf mögliche Stressfaktoren, welche zu einer Induktion von  $\sigma^{YlaC}$  führen, Rückschlüsse ziehen. Letztlich stellt sich auch die Frage, welche Komponente des *ylaA*-Operons als Sensor eines potentiellen Stressfaktors fungiert und wie die Freisetzung von  $\sigma^{YlaC}$  vonstatten geht.

Aufgrund seiner Topologie als Transmembranprotein mit acht Membrandurchgängen könnte YlaA eine Rolle bei der Wahrnehmung des Stresses und eventuell auch beim Transport potentieller Stressoren spielen. Vor kurzem wurde eine neue Familie von Histidin-Kinasen mit stark verkürzter, extracytoplasmatischer Domäne beschrieben. Die Sensor-Domäne dieser neuen Familie von „intramembrane-sensing“ Histidin-Kinasen liegt fast komplett in der cytoplasmatischen Membran. Dadurch vermutet man, dass diese Histidin-Kinasen Signale innerhalb der Cytoplasmamembran wahrnehmen (Mascher *et al.*, 2003). Zusätzlich treten diese Histidin-Kinasen immer in Verbindung mit einem ABC-Transporter auf. Auf unseren Fall übertragen, könnten YlaD und/oder YlaB den Stress innerhalb der Membran wahrnehmen und YlaA könnte, aufgrund seiner Topologie, eine Art Transporter darstellen. In *Bacillus licheniformis* konnte nach der Komplettierung der Genomsequenz ein Operon identifiziert werden, das in Aufbau und Sequenz sehr ähnlich dem *ylaA*-Operon aus *B. subtilis* ist (Rey *et al.*, 2004). Auch das *ylaA*-Operon aus *B. licheniformis* kodiert vermutlich für einen ECF-Sigmafaktor. Eventuell könnten Stressoren, die zu einer Induktion des *ylaA*-Operons aus *B. licheniformis* führen, in *B. subtilis* die gleiche Induktion bewirken.

## 6 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

A	Adenin
A <sub>xxx</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von XXX nm
aa / AA	Aminosäure
AAS	Atomabsorptions-Spektroskopie
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AD	DNA-Aktivierungsdomäne
ad	adjust
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua	Wasser
3AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BD	DNA-Bindungsdomäne
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>cat</i>	Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
CDP-Star	Dinatrium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan}-4-yl)-1-phenylphosphat
Cm	Chloramphenicol
CM	Cytoplasmamembran
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. tetanii</i>	<i>Clostridium tetanii</i>
d	desoxy
Da	Dalton
dd	didesoxy
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
DIG	Digoxygenin
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
ECF	extracytoplasmatische Funktion
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGTA	Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-tetraacetat
EK	Endkonzentration
Erm	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
<i>ftsH</i>	filamentation temperature sensitive
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde
His	Histidin
HS	high salt
Hsp	Hitzeschockprotein
IAA	Isoamylalkohol
iCLIPs	intramembrane-cleaving proteases
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Lysogenic-Broth bzw. Luria-Bertani (Wachstumsmedium)
LiAc	Lithiumacetat
LMW	low molecular weight
LS	low salt
M	molar
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MW	molecular weight
<i>M. xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
NBT	Nitrotetrazolium-Blau
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD <sub>xxx</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von XXX nm
o. e.	oben erwähnt
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
orf	offenes Leseraster
<sup>33</sup> P	Phosphorisotop der Massenzahl 33
p.a.	pro analysis
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerase Chain Reaction
PBP4*	Penicillin-Bindeprotein 4*
pmol	Picomol
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
R	resistent
RIP	regulated intramembrane proteolysis
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
$\sigma$	Sigmafaktor
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SDS	Nariumdodecylsulfat
sec	Sekunde
<sup>35</sup> S	Schwefelisotop der Massenzahl 35
SMM	Spizizens Minimal Medium
s.o.	siehe oben
Spec	Spectomycin
ss	einzelsträngig
<i>S. typhimirium</i>	<i>Salmonella typhimirium</i>
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton-X-100	Polyoxymethylenether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Vol.	Volumen
v/v	Volumen / Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht / Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Y2H	Hefe Two Hybrid
YPD	Yeast-extract-Peptone-Dextrose
ZAS	Zink-bindender Anti-Sigmafaktor
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren sind mit dem international gebräuchlichen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

## 7 Literaturverzeichnis

**Adelman K., Orsini G., Kolb A., Graziani L., Brody E. N. (1997).**

The interaction between the AsiA protein of bacteriophage T4 and the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase.

J. Biol. Chem. **272**: 27435–27443.

**Ades S. E., Connolly L. E., Alba B. M., Gross C. A. (1999)**

The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor.

Genes Dev. **13**: 2449-2461.

**Ades Sarah E. (2004)**

Control of the alternative sigma factor  $\sigma^E$  in *Escherichia coli*.

Current opinion in Microbiology, **7**: 157-162.

**Akiyama Y., Kanehara K., Ito K. (2004)**

RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane transmembrane sequences.

EMBO J. **23(22)** : 4434-42.

**Alba B. M., Leeds J. A., Onufryk C., Lu C. Z., Gross C. A. (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.

**An F.Y. et al. (1999)**

Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1.

J. Bacteriol. **181**: 5915–5921.

**Angastopoulos C., Spizizen J. (1961)**

Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*.

J Bacteriol **81**: 741-746.

**Anthony J. R., Newman J. D., Donohue T. J. (2004)**

Interactions Between the Rhodobacter sphaeroides ECF Sigma Factor,  $\sigma^E$ , and its Anti-sigma Factor, ChrR.

J. Mol. Biol. **341**: 345–360.

**Arber, W. (1978)**

Restriktionsendonucleasen.

Angew. Chem. **90**: 79-85.

**Bae J.-B., Park J.-H., Hahn M.-Y., Kim M.-S., Roe J.-H. (2004)**

Redox-dependent changes in RsrA, an anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor*: Zinc release and disulfide bond formation.

J. Mol. Biol. **335**: 425-435.

**Bashyam M. D. and Hasnain S. E. (2004)**

The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infection, Genetics and Evolution* **4**: 301-308.

**Bentley S. D., Chater K. F., Cerdanon-Tarraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., et al. (2002)**

Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**: 141-147.

**Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L. and Boyer H. W. (1977)**

Construction and characterisation of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2): 95-113.

**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.

**Braun V., Mahren S., and Ogierman M. (2003)**

Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr. Op. Microbiol.* **6**:173–180.

**Browning D. F, Whitworth D. E, Hodgson D. A. (2003)**

Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Mol. Microbiol.* **48**(1): 237-51.

**Brown M. S., Ye J., Rawson R. B., Goldstein J. L. (2000)**

Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391-398.

**Brutsche S. and Braun V. (1997)**

SigX of *Bacillus subtilis* replaces the ECF-sigma factor FecI of *Escherichia coli* and is inhibited by RsiX. *Molec. Gen. Genet.* **256**: 416-425.

**Burnette W. N. (1981)**

“Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.

**Camacho A. and Salas M. (1999)**

Effect of Mutations in the “Extended -10” Motif of Three *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$ -RNA Polymerase dependent Promoters. *J. Mol. Biol.* **286**: 683-693.

**Campbell E. A., Tupy J. L., Gruber R., Wang S., Sharp M., Gross C. A., Darst S. A. (2003)** Crystal structure of *Escherichia coli* sigmaE with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol. Cell* **11**: 1067-1078.

**Cao M., Bernat B. A., Wang Z., Armstrong R. N. Helmann J. D. (2001)**

FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmatic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*.

*J. Bacteriol.* **183**: 2380-2383.

**Cao M., Wang T., Ye R., Helmann J. D. (2002)**

Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis*  $\sigma^W$  and  $\sigma^M$  regulons.

*Mol. Microbiol.* **45**: 1267-1276.

**Cao M, Salzberg L, Tsai C. S, Mascher T, Bonilla C, Wang T, Ye R. W, Marquez-Magana L, Helmann J. D. (2003)**

Regulation of the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function protein sigma(Y) and its target promoters.

*J. Bacteriol.* **185**: 4883-90.

**Cao M. and Helmann J. D. (2004)**

The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigmaX factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides.

*J. Bacteriol.* **186**(4): 1136-46.

**Cao M., Moore C. M., Helmann J. D. (2005)**

*Bacillus subtilis* paraquat resistance is directed by  $\sigma^M$ , an extracytoplasmic function sigma factor, and is conferred by YqjL and BcrC.

*J. Bacteriol.* **187**(9): 2948-56.

**Chadsey, M. S., Karlinsey, J. E. & Hughes, K. T.(1998).**

The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* s28 RNA polymerase holoenzyme.

*Genes Dev.* **12**: 3123–3136.

**Chen J. C., Viollier P. H., Shapiro L. (2005)**

A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant.

*Mol. Microbiol.* **55**: 1085-1103.

**Cohen S., Chang A., Hsu L. (1972)**

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA

*Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 2110-2114

**Collinet B., Yuzawa H., Chen T., Herrera C., Missiakas D. (2000)**

RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA:sigmaE interaction in the cytoplasm and the availability of sigmaE RNA polymerase.

*J. Biol. Chem.* **275**: 33898-33904.

**Cserzo M., Wallin E., Simon I., von Heijne G., Elofsson A. (1997)**

Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface.

*Prot. Eng.* **10**: 673-676.

**De Las Penas, A., Connolly, L., and Gross, C.A. (1997)**

The  $\sigma^E$ -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of  $\sigma^E$ .  
Mol. Microbiol. **24**: 373–385.

**De Leeuw E., Granjon T., Porcell I., Alami M., Carr S. B., Müller M., Sargent F., Palmer T., Berks B. C. (2002)**

Oligomeric Properties and Signal Peptide Binding by *Escherichia coli* Tat Protein Transport Complexes.  
J. Mol. Biol. **322**: 1135–1146.

**Deuerling E., Mogk A., Richter C., Purucker M., Schumann W. (1997)**

The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion.  
Mol Microbiol. **23**: 921-933.

**Dineen S.S., Bradshaw M., Karasek C.E., and Johnson E.A. (2004)**

Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the type A2 neurotoxin gene cluster in *Clostridium botulinum*.  
FEMS Microbiol. Lett. **235**: 9–16.

**Dombroski A. J, Johnson B. D, Lonetto M, Gross C. A. (1996)**

The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **93(17)**: 8858-62.

**Duncan L., Losick R. (1996)**

SpoIIAB is an anti- $\sigma$  factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein  $\sigma^F$  from *B. subtilis*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 2325-29.

**Engelmann S., Lindner C. and Hecker M. (1995)**

Cloning, nucleotide sequence and regulation of *katE* encoding a  $\sigma^B$ -dependent catalase in *Bacillus subtilis*.  
J. Bacteriol. **177**: 5598-5605.

**Enz S., Mahren S., Strocher U. H., Braun V. (2000)**

Surface Signaling in Ferric Citrate Transport Gene Induction: Interaction of the FecA, FecR, and FecI Regulatory Proteins.  
J. Bacteriol. **182**: 637-646.

**Flynn J. M, Neher S. B, Kim Y. I, Sauer R. T, Baker T. A. (2003)**

Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals.  
Mol. Cell. **11(3)**: 671-83.

**Flynn J. M., Levchenko I., Sauer R. T., Baker T. A. (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.

**Fredrick K. and Helmann J. D. (1997)**

RNA polymerase sigma factor determines start-site selection but is not required for upstream promoter element activation on heteroduplex (bubble) templates.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**: 4982–4987, Biochemistry.

**Gerth U., Kirstein J., Mostertz J., Waldminghaus T., Miethke M., Kock H., Hecker M. (2004)**

Fine-Tuning in Regulation of Clp Protein Content in *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol. **186**: 179-191.

**Grigorova I. L., Chaba R., Zhong H. J., Alba B. M., Rhodius V., Hermann C., Gross C. A. (2004)**

Fine-tuning of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  envelope stress response relies on multiple mechanisms to inhibit signal-independent proteolysis of the transmembrane anti-sigma factor RseA.

*Genes Dev.* **18**: 2686-2697.

**Gross C. A., Lonetto M. and Losick R. (1992)**

Bacterial sigma factors.

In: Transcriptional Regulation, Ausgabe 1 (S.L. McKnight and K.R. Yamamoto, Herausgeber), Seite 129-176, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.

**Haas H., Becker W. M., Maasch H. J., Schlaak M. (1986)**

Analysis of allergen components in grass pollen extracts using immunoblotting.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **79**: 434-440.

**Härtl, B., Wehrl, W., Wiegert, T., Homuth, G., and Schumann, W. (2001)**

Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction

of compatible expression cassettes.

J. Bacteriol. **183**: 2696–2699.

**Haldenwang W. G. (1995)**

The sigma factors of *Bacillus subtilis*.

Microbiol. Rev. **59**: 1-30.

**Haldenwang W. G. and Losick R. (1980)**

A novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**: 7000-7004.

**Hecht (2001)**

Analyse des *ssrA*-Tagging-Mechanismus von *Bacillus subtilis*.

Diplomarbeit, Uni Bayreuth.

**Hecker M. and Völker U. (2001)**

General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria.

Adv. Microb. Physiol. **44**: 35-91.

**Helmann J. D. and Chamberlin M. J. (1988)**

Structure and function of bacterial  $\sigma$ -factors.

Annu. Rev. Biochem. **57**: 839-872.

**Helmann J. D. (1999)**

Anti-sigma factors.

Curr. Opin. Microbiol. **2**: 135-141.**Helmann J. D. (2002)**

The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors.

Adv. Microb. Phys. **46**: 47-110.**Hinton D. M., March-Amegadzie R., Gerber J., Sharma M. (1996)**Bacteriophage T4 middle transcription system : T4-modified RNA polymerase; AsiA, a  $\sigma^{70}$  binding protein; and transcriptional activator MotA.Methods Enzymol. **274**: 43-57.**Holmes, D. W., Quigley, M. (1981)**

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.

Anal. Biochem. **114**: 193-197.**Homuth G., Masuda S., Mogk A., Kobayashi Y., Schumann W. (1997)**The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic.J. Bacteriol. **179**: 1153-1164.**Homuth G. (1997)**Transkriptionsanalyse des *dnaK*-Locus von *Bacillus subtilis*.

Dissertation, Universität Bayreuth.

**Horsburgh M. J. and Moir A. (1999)**SigmaM, an ECF RNA Polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt.Mol. Microbiol. **32 (1)**: 41-50.**Horsburgh M. J., Thackray P. D., Moir A. (2001)**Transcriptional responses during outgrowth of *Bacillus subtilis* endospores.Microbiology **147 (11)**: 2933-41.**Huang X., Decatur A., Sorokin A. and Helmann J. D. (1997)**The *Bacillus subtilis*  $\sigma^X$  protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to the survival of high temperature stress.J. Bacteriol. **179**: 2915-2921.**Huang X., Fredrick K. L. and Helmann J. D. (1998)**Promotor recognition by *Bacillus subtilis*  $\sigma^W$ : Autoregulation and partial overlap with the  $\sigma^X$ -regulon.J. Bacteriol. **180**: 3765-3770.**Huang X., Gaballa A., Cao M., Helmann J. D. (1999)**Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function  $\sigma$  factor,  $\sigma^W$ . Mol. Microbiol. **31**: 361-371.**Hughes K. T. and Mathee K. (1998)**

The anti-sigma factors.

Annu. Rev. Microbiol. **52**: 231-371.

- Hunt J. B., Neece S. H., Ginsburg A. (1985)**  
The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase.  
Anal. Biochem. **146** 150-157.
- Isono K., Shimizu M., Yoshimoto K., Niwa Y., Satoh K., Yokota A., Kobayashi H. (1997)**  
Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of  $\sigma^{70}$  factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*.  
Proc. Nat.l Acad. Sci. USA, **94**: 14948-14953.
- Iwabuchi K., Li B., Bartel P., Fields S. (1993)**  
Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization.  
Oncogene **8**: 1693-1696.
- James P., Halladay J., Craig E. A. (1996)**  
Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast.  
Genetics **144**: 1425-1436.
- Jeong S.M., Yoshikawa H., Takahashi H. (1993)**  
Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*.  
Mol. Microbiol. **10**: 133-142.
- Kaltwasser M., Wiegert T., Schumann W. (2002)**  
Construction and Application of Epitope- and Green Fluorescent Protein-Tagging Integration Vectors for *Bacillus subtilis*.  
Appl. Environ. Microbiol. **68**: 2624-2628.
- Kanehara K., Ito K., Akiyama Y. (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.
- Kanehara K., Ito K., Akiyama Y. (2003)**  
YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA.  
EMBO J. **22**: 6389-6398.
- Kang C. M., Brody M. S., Akbar S., Yang X., Price C. W. (1996)**  
Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *B. subtilis* transcription factor  $\sigma^B$  in response to environmental stress.  
J. Bacteriol. **178**: 3846-53.
- Kang J. G., Paget M. S., Seok Y. J., Hahn M. Y., Bae J. B., Hahn J. S. (1999)**  
RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox exchange.  
EMBO J. **18**: 4292-4298.
- Keiler K. C., Waller P. R., Sauer R. T. (1996)**  
Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA.  
Science **271**: 990-993.

**Kellner E. M., Decatur A., Moran C. P. Jr. (1996)**

Two-stage regulation of an anti-sigma factor determines developmental fate during bacterial endospore formation.

Mol. Microbiol. **21**: 913-24.

**Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (1995)**

FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**: 4532-4536.

**Kim L., Mogk A., and Schumann W. (1996)**

A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application.

Gene **181**: 71-76.

**Krojer T., Garrido-Franco M., Huber R., Ehrmann M., Clausen T. (2002)**

Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new proteasechaperonemachine.

Nature, **416**: 455-459.

**Kroos L., Zhang B., Ichikawa H. and Yu Y.T (1999)**

Control of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation.

Mol. Microbiol. **31**: 1285-1294.

**Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S. et al. (1997)**

The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.

Nature **390**: 249-256.

**Kutsukake K. and Iino T. (1994)**

Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*.

J. Bacteriol. **176**: 3598-3605.

**Laemmli U. K. (1970)**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, **227**: 689-695.

**Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. (1983)**

Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**: 4045-4049.

**Leichert L. I. O., Scharf C., Hecker M. (2003)**

Global Characterisation of Disulfide Stress in *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol. **185**: 1967-1975.

**Lemberg M. K., Martoglio B. (2004)**

On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane.

FEBS Letters **564**: 213-218.

**Li B., Fields S. (1993)**

Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using yeast two-hybrid system.

FASEB J. **7**: 957-963.

**Li W., Shrinivasula S. M., Chai J., Li P., Wu J. W., Zhang Z., Alnemri E. S., Shi Y. (2002)**

Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 436-441.

**Lonetto M., Gribskov M. and Gross C.A. (1992)**

The  $\sigma^{70}$ -family: Sequence conservation and evolutionary relationships.

*J. Bacteriol.* **174**: 3843-3849.

**Lonetto M. A., Brown K. L., Rudd K. E. and Buttner M. J. (1994)**

Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial  $\sigma$  factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7573-7577.

**Mahren S., Enz S., and Braun V. (2002)**

Functional Interaction of Region 4 of the Extracytoplasmic Function Sigma Factor FecI with the Cytoplasmic Portion of the FecR Transmembrane Protein of the *Escherichia coli* Ferric Citrate Transport System.

*J. Bacteriol.* **184**: 3704-3711.

**Makinoshima H. and Glickmann M. (2005)**

Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis.

*Nature*, **436**: 406-409.

**Mani N. and Dupuy B. (2001)**

Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 5844-5849.

**Marvaud J. C., Eisel U., Binz T., Niemann H. and Popoff M. R. (1998)**

TetR is a positive regulator of the tetanus toxin gene in *Clostridium tetanii* and is homologous to BotR.

*Infect. Immun.* **66**: 5698-5702.

**Mascher T., Margulis N. G., Wang T., Ye R. W., Helmann J. D. (2003)**

Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon.

*Mol. Microbiol.* **50**: 1591-1604.

**Missiakas D., Mayer M.P., Lemaire M., Georgopoulos C., Raina S. (1997)**

Modulation of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins SurA, FkpA and Skp/OmpH.

*Mol. Microbiol.* **24**: 355-371.

**Missiakas D., Raina S. (1998)**

The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation.  
Mol. Microbiol. **28**: 1059-1066.

**Mitchell J. E., Zheng D., Busby S. J. and Minchin S. D. (2003)**

Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*.  
Nucleic Acids Res. **31 (16)**: 4689-4695.

**Mogk A., Hayward R. and Schumann W. (1996)**

Integrative vectors for constructing single-copy transcriptional fusions between *B. subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes.  
Gene **182**: 33-36.

**Mogk A. (1997)**

Die GroEL-Chaperoninmaschine moduliert die Aktivität des Repressors HrcA von *B. subtilis*.  
**Dissertation**, Universität Bayreuth.

**Moncrief J. C., Barroso L. A., and Wilkins T. D. (1997)**

Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins.  
Infect. Immun. **65**: 1105–1108.

**Moraleda-Munoz A, Perez J, Fontes M, Murillo FJ, Munoz-Dorado J. (2005)**

Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*.  
Mol. Microbiol. **56(5)**: 1159-68.

**Newman J. D., Anthony J. R., Donohue T. J. (2001)**

The Importance of Zinc-binding to the Function of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR as an Anti-Sigma Factor.  
J. Mol. Biol. **313**: 485-499.

**Paget M. S., Bae J., Hahn M.Y., Li W., Kleanthous C., Roe J. H., Buttner J. M. (2001)**

Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigmafactor with a thiol-disulphide redox switch.  
Mol. Microbiol. **39**: 1036-1047.

**Paget M. and Helmann J. D. (2003)**

The  $\sigma^{70}$  family of sigma factors.  
Genome Biology, **4**: 203.

**Perego M., Glaser P., Minutello A., Strauch M. A., Leopold K., Fischer W. (1995)**

Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation.  
J Biol Chem. **270(26)**: 15598-606.

**Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J. D., Völker U., Hecker M. (2001)**

Global Analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*.  
J. Bacteriol. **183**: 5617-5631.

**Pietiainen M., Gardemeister M., Mecklin M., Leskela S., Sarvas M., Kontinen V. P. (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.

**Ponting C.P., (1997)**

Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast and plants. *Protein Sci.* **6**: 464-468.

**Ponting C. P., Philips C., Davies K. E., Blake D. J. (1997)**

PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* **19**: 469-479.

**Priest, F. G. (1989)**

Products and applications. In C. R. Harwood (ed.), *Bacillus*, Biotechnology Handbooks Vol. 2. Plenum press, New York & London.

**Qiu J. and Helmann J. D. (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.

**Raffestin S., Dupuy B., Marvaud J. C., and Popoff M. R. (2004)**

BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04377.

**Ravio T. and Silhavy T.J. (2001)**

Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 591-624.

**Reischl S., Wiegert T., Schumann W. (2003)**

Isolation and Analysis of Mutant Alleles of the *Bacillus subtilis* HrcA Repressor with Reduced Dependency on GroE Function. *J Biol Chem.* **277**: 32659-32667.

**Rey M. W., Ramaiya P., Nelson B. A., Brody-Karpin S. D., Zaretsky, E. J., et al., (2004)**

Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* **5**: (10), R77.

**Rudner D. Z., Fawcett P. and Losick R. (1999)**

A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14765-14770.

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977)**

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

**Saito H., Shibata T., Andor T. (1979)**

Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis*.

Mol. Gen. Genet. **170**: 117-122.

**Sambrook and Russel (2001)**

Molecular cloning.

Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.

**Schöbel S., Zellmeier S., Schumann W., Wiegert T. (2004)**

The *Bacillus subtilis*  $\sigma^W$  anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC.

Mol. Microbiol. **52**(4): 1091-1105.

**Schultz J. E. and Matin A. (1991)**

Molecular and Functional Characterization of a Carbon Starvation Gene of *Escherichia coli*.

J. Mol. Biol **218**: 129-140.

**Schulz A., Tzschaschel B., Schumann W. (1995)**

Isolation and analysis of mutants of the *dnaK* operon of *Bacillus subtilis*.

Mol. Microbiol. **15**: 1088-1093.

**Schumann, W., Ehrlich, S. D., Ogasawara, N. (2001)**

Functional Analysis of Bacterial Genes.

Chichester: John Wiley and Sons.

**Sorokin A., Bolotin A., Purnelle B., Hilbert H., Lauber J., Düsterhöft A. and Ehrlich S. D. (1997)**

Sequence of the *Bacillus subtilis* genome region in the vicinity of the *lev* operon reveals two new extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factors SigV and SigZ.

Microbiol. **143**: 2939-2943.

**Smith G. L., Socransky S. S., Smith C. M. (1989)**

Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms.

Oral Microbiol. Immunol. **4**: 47-51.

**Snyder W. B. and Silhavy T. J. (1995)**

$\beta$ -Galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*.

Journal of Bacteriology **177**: 953-963.

**Southern E.M. (1975)**

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. **98**: 503-517.

**Sprenger, H., Konrad, L., Rischkowski, E., Gemsa, D. (1995)**

Background Reduction in Northern Analysis by Preabsorption of Digoxigenin-Labeled Riboprobes.

Bio Techniques **19**: 62-63.

**Storz, G., and Hengge-Aronis, R. (2000)**

Bacterial Stress Responses.

Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

**Stragier P. and Losick R. (1996)**Molecular genetics of Sporulation in *B. subtilis*.Annu. Rev. Genet. **30**: 297-341.**Thackray P. D. and Moir A. (2003)**SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress.J. Bacteriol. **185**(12): 3491-8.**Tojo S., Matsunaga M., Matsumoto T., Kang C. M., Yamaguchi H., Asai K., Sadaie Y., Yoshida K., Fujita Y. (2003)**Organization and expression of the *Bacillus subtilis sigY* operon.J. Biochem. (Tokyo);**134**(6): 935-46.**Toptchieva A., Sisson G., Bryden L. J., Taylor D. E. and Hoffman P. S. (2003)**An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*.Microbiology **149**: 1285-1295.**Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979)**

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**: 4350-4354.**Turner M.S. and Helmann J. D. (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.**Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M. (1994)**Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*Microbiol. **140**: 741-752**Völker U., Völker A., Maul B., Hecker M., Dufour A., Haldenwang W. G. (1995)**Separate mechanisms activate  $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses.J. Bacteriol. **177**: 3771-3780.**Walsh N. P., Alba B. M., Bose B., Gross C. A., Sauer R. T. (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.**Weihofen A. and Martoglio B. (2003)**

Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides.

Trends Cell Biol. **13**: 71-78.

**Wiegert T., Homuth G., Versteeg S., Schumann W. (2001)**

Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis*  $\sigma^W$  regulon.  
Mol. Microbiol. **41**: 59-71.

**Wilson K., Goulding K.H. (1991)**

Methoden der Biochemie.  
Georg Thieme Verlag Stuttgart.

**Wösten M. M. S. M. (1998)**

Eubacterial sigma-factors.  
FEMS Microbiology Reviews **22**: 127-150.

**Wolfe M. S., Kopan R. (2004)**

Intramembrane proteolysis: theme and variations.  
Science **305**: 1119-1123.

**Yang X., Kang C. M., Brody M. S., Price C. W. (1996)**

Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor.  
Genes Dev. **10**: 2265-75.

**Yanish-Perron C., Viera J., Messing J. (1985)**

Improved phage M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors.  
Gene **33**: 103-119.

**Yoshimura M., Asai K., Sadaie Y., Yoshikawa K. (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., Zuber U., Schumann W., Wiegert T. (2003)**

The Absence of FtsH Metalloprotease Activity Causes Overexpression of the sigma(W)-controlled *pbpE* Gene, Resulting in Filamental Growth of *Bacillus subtilis*.  
J. Bacteriol. **185**: 973-982.

**Zellmeier S., Schöbel S., Schumann W., Wiegert T. (2005)**

RsiW of *Bacillus subtilis* Belongs to the Group of Zn(II) -binding Anti-Sigma Factors.  
unveröffentlicht

**Zellmeier S., Hofmann C., Thomas S., Wiegert T., Schumann W. (2005)**

Identification of  $\sigma^V$ -dependent genes of *Bacillus subtilis*.  
FEMS Microbiol Lett. **253**: 221-229.

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Schumann für die freundliche Überlassung des sehr interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die gewährten Freiräume. Vielen Dank auch für die finanzielle Unterstützung, die mir die Teilnahme an mehreren Tagungen im In- und Ausland ermöglichte.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Thomas Wiegert für die zahlreichen Denkanstöße, Ratschläge, fruchtbaren und kritischen Diskussionen und natürlich für die exzellente wissenschaftliche Betreuung. Danke auch für viel Spaß bei der Laborarbeit und für die Einführung in den Aufbau eines P.A.L.Fs.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Karin für ihre unendliche Hilfsbereitschaft und für zahlreiche Tipps und Tricks bei der Laborarbeit bedanken. Vielen Dank auch für die vielen heiteren und ernsten Momente, unter anderem auch bei der Zähmung des „bösen Computers“.

Petra danke ich für die Portion gute Laune, die sie jeden Tag ins Labor bringt und dafür, dass sie mir meinen oft exzessiven Verbrauch an Glasgeräten nie übelgenommen hat.

Brigitte danke ich dafür, dass sie auf charmante Weise für einen reibungslosen Ablauf des Lehrstuhlbetriebes gesorgt hat und in allen Fragen, Bayreuth betreffend, immer einen guten Tipp zur Hand hatte.

Allen Mitarbeitern der AG Lehner danke ich für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung bei den Hefe-Two-Hybrid Experimenten.

Dr. Lothar Gremer (Lehrstuhl Mikrobiologie) danke ich für die Einführung in die Atomabsorptions-Spektroskopie.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, danke ich für ihre immer währende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Sandra danke ich, dass sie so ist, wie sie ist und mich so liebt, wie ich bin.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth, noch an einer anderen Hochschule, versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, August 2005

Stephan Zellmeier