Die stressprotektive Wirkung von Aminosäuren in *Bacillus subtilis*: Endogene Synthese von Prolin und die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat zum Schutz vor Hyperosmolarität und Hitze

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps – Universität Marburg
vorgelegt von

Monika Dolezal
aus Lüdenscheid

Marburg/ Lahn, 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Mai 2002 bis Oktober 2005 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am ……. angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Brune

Tag der mündlichen Prüfung am:

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation sind folgende Publikationen in Vorbereitung:

Dolezal, M., Kerres, A., Oulds, A. and Bremer, E.: GltT-mediated uptake of glutamate and aspartate and its role in thermoprotection in *Bacillus subtilis*.

Dolezal, M., Bursy, J., Kerres, A., Oulds, A., Gade, J. and Bremer, E.: Uptake and intracellular conversion of environmental amino acids used for proline accumulation under high salinity in *Bacillus subtilis*.

Dolezal, M., Brill, J., and Bremer, E.: Site-directed mutagenesis of the osmotically controlled promoter of the *proHJ* operon and its effect on proline production in *Bacillus subtilis*.

Dolezal, M., Hoffmann, T., and Bremer, E.: Molecular analysis of the osmoregulatory proline biosynthesis in *Bacillus licheniformis*.

Hoffmann,T., Dolezal, M., Gade, J., Sohn, J., and Bremer, E.: Effective chill protection of *Bacillus subtilis* by compatible solutes.

Inhaltverzeichnis

I. Zusammenfassung 1

II. Einleitung 2

1. Die Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts ist lebenswichtig für die Zelle 2
1.1 Adaptation an hyperosmotische Bedingungen in halotoleranten Bakterien am Beispiel *Bacillus subtilis* 4
1.1.1 Phase I: Die Akkumulation von K^+-Ionen 4
1.1.2 Phase II: Die Akkumulation kompatibler Solute 5
1.2 Stressprotektion durch die Akkumulation kompatibler Solute 5
1.2.1 Kompatible Solute in *Archaea* 7
1.3 Die Synthese von Prolin in *B. subtilis* 9
1.4 Die Aufnahme kompatibler Solute in *B. subtilis* 11
1.5 Die Vermittlung der osmotischen Regulation 14
1.6 Die Struktur σ^A-abhängiger Promotoren in *B. subtilis* 17
2. Die Aminosäure Glutamat 18
2.1 Funktionen von Glutamat in *B. subtilis* 18
2.2 Die Synthese von Glutamat in *B. subtilis* 19
2.3 Die Akkumulation von Glutamat unter hyperosmolaren Bedingungen 20
3. Hitzestress in *B. subtilis* 22
3.1 Der Hitzeschock in *B. subtilis* 22
3.2 Adaptiertes Wachstum unter Hitzestress in *B. subtilis* 23
4. Die generelle Stressantwort in *B. subtilis* 23
5. Zielsetzung der Arbeit 25

III. Material und Methoden 26

1. Chemikalien und Reagenzien 26
1.1 Verwendete kompatible Solute und Aminosäuren 26
1.2 Radiochemikalien 27
2. Plasmide, Mikroorganismen und Oligonukleotide 27
2.1 Plasmide 27
2.2 Bakterienstämme 29
2.2.1 *Escherichia coli*-Stämme 29
2.2.2 *Bacillus subtilis*-Stämme 29
2.2.3 Stämme anderer *Bacilli* 32
2.3 Oligonukleotide 32
2.3.1 Zur gerichteten Mutagenese verwendete Oligonukleotide 32
3. Medien und Zusätze 36
3.1 Vollmedien 36
3.2 Minimalmedien 36
3.3 Medienzusätze und Antibiotika 36
4. Mikrobiologische Methoden 37
4.1 Sterilisation 37
4.2 Wachstumsbedingungen zur Vermehrung von Bakterien 37
4.3 Ermittlung der Zelldichte 37
5. Genetische und molekularbiologische Methoden 38
5.1 Präparation von DNA und Gesamt-RNA 38

5.1.1 Präparation von Plasmid-DNA ... 38
5.1.2 Präparation chromosomaler DNA ... 38
5.1.3 Präparation von Gesamt-RNA ... 38
5.2 Analyse von Gesamt-RNA durch Northerntransfer und -hybridisierung ... 39
5.2.1 Herstellung der antisense RNA-Sonden ... 39
5.2.2 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern Blot) ... 39
5.3 Analyse von DNA durch Southerntransfer und -hybridisierung ... 39
5.3.1 Herstellung der DNA-Sonden ... 39
5.3.2 DNA-DNA-Hybridisierung (Sourthern Blot) ... 40
5.4 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration ... 40
5.5 Aufreinigung von DNA ... 40
5.6.1 Restriktion von DNA ... 40
5.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten ... 41
5.6.3 Agarosegelelektrophorese ... 41
5.6.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR ... 41
5.7 Sequenzierung von DNA ... 41
5.8 Transformation von Bakterien ... 41
5.8.1 Transformation von *B. subtilis* ... 41
5.8.2 Transformation von *E. coli* ... 42
5.9 Ortsgerichtete Mutagenesen ... 42
5.10 Computeranalysen ... 42
5.11 Bestimmung des Proteingehalts ... 42
5.12 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ... 42
6. Konstruktion von Plasmiden und Stämmen ... 43
6.1 Plasmidkonstruktion ... 43
6.2 Stammkonstruktionen ... 46
6.2.1 Konstruktion von *treA*-und *lacZ*-Fusionsstämmen ... 46
6.2.2 Konstruktion und Überprüfung von Unterbrechungsmutanten ... 47
7. Biochemische Methoden ... 49
7.1 Quantifizierung der β-Galaktosidase (LacZ)-Aktivität ... 49
7.2 Quantifizierung der Phosphoglucosidase (TreA)-Aktivität ... 50
7.3 Amylase-Test ... 51
7.4 HPLC-Messungen ... 51
7.4.1 Derivatisierung der Proben ... 51
7.4.2 Bestimmung der Prolinmenge mittels HPLC-Messung ... 51
7.5 Messung der Aufnahme ^{14}C-markierter Verbindungen ... 52
7.5.1 Bestimmung der Transportrate von ^{14}C-Aspartat, ^{14}C-Glutamat und ^{14}C Glycin Betain ... 52

IV. Ergebnisse
A Die osmotisch kontrollierte Prolinsynthese in *Bacilli* ... 53

1. Ein 153 bp großes DNA-Fragment enthält alle *cis* Elemente für die osmotische Regulation von *proHJ* in *Bacillus subtilis* ... 53
2. Die ortsgerichtete Mutagenese des *proHJ*-Promotors aus *B. subtilis* ... 54
2.1 Mutationen zur Verifizierung des postulierten osmoregulierten *proHJ*-Promotors ... 56
2.2 Mutationen zur Identifizierung von Schlüsselelementen für die osmotische Regulation von *proHJ* ... 57
3. Die *proHJ* Transktiption in den Promotormutanten ist immer noch durch Glycin Betain reprimierbar ... 61
4. Die Auswirkungen der Promotormutationen auf die *proHJ*-abhängige Prolinbiosynthese ... 63

4.1 Die Transkription von *proHJ* in den Promotormutanten 63
4.2 Die *proHJ*-Mutanten mit erhöhter Promotoraktivität weisen eine Prolinüberproduktion auf 66
5. Phänotyp der prolinüberproduzierenden *proHJ* -Promotormutanten 68
5.1 Die *proHJ*-Promotormutanten zeigen trotz Prolinüberproduktion keinen Wachstumsvorteil unter hyperosmolaren Bedingungen 68
5.2 Die *proHJ*-Promotormutanten zeigen trotz Prolinüberproduktion keinen Wachtumsvorteil unter Stressbedingungen 70
5.3 Die prolinüberproduzierenden *proHJ*-Promotormutanten sind weniger sensitiv gegenüber dem toxischen Prolinanalogon DHP 70
6. Die osmotische Regulation des *proHJ*-Operons 71
6.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) des $proH_{153}'$- Fragmentes 72
6.2 Die Schlüsseldeterminante zur osmotischen Regulation von *proHJ* liegt vermutlich in der 5´untranslatierten Region der mRNA 74
6.3 Das 126 bp minimale regulatorische *proHJ* - Fragment ist hochkonserviert in *Bacilli* 76
6.4 Deletionsanalysen der 5´UTR der *proHJ*-mRNA 77
6.5 Für die osmotische Regulation des *proHJ*-Operons ist keiner der bekannten Transkriptionsregulatoren aus *B. subtilis* verantwortlich 80
6.5.1 Eine *sigH*-Mutante besitzt eine höhere *proHJ*-Promotoraktivität 81
7. Gene der Prolinsynthese in *Bacillus licheniformis* 83
7.1 Die osmotisch regulierte Prolinsynthese in *B. licheniformis*. 84
7.2 Die Gene *proH*, *proJ* und *proAA* aus *B. licheniformis* werden als osmotisch reguliertes Operon transkribiert 85
7.3 In *B. licheniformis* erfolgt die Transkription der anabolen Prolinsynthesegene unabhängig von der externen Salinität 86
7.4 Reportergenfusionsanalysen der osmotisch regulierten *proHJAA*-Expression 88
7.4.1 Das in *Bacilli* hochkonservierte *proH´*-Minimalfragment (*B.li* $proH_{130}'$) enthält alle *cis* Elemente für die osmotische Induktion von *proHJ*AA aus *B. licheniformis* 88
7.4.2 Die Transkription der $proH_{130}'$-*treA* Fusion korreliert mit der externen Osmolarität und wird durch Glycin Betain reprimiert 89
7.4.3 Die Expression der $proH_{130}'$-*treA* Fusion wird durch einen plötzlichen hyperosmotischen Schock stimuliert 91

B Die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat

1. Funktionen der Aminosäure Glutamat in *B. subtilis* 93
2. Die potentiellen Glutamat-Transportsysteme in *B. subtilis* 93
2.1 GltT ist ein hochaffines Glutamat- und Aspartattransportsystem in *B. subtilis* 95
2.2 GltP und YveA zeigen weder hoch- noch niederaffinen Transport von Glutamat und Aspartat 98
2.3 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der GltT-abhängigen Glutamat- und Aspartataufnahme 100
2.4 Die Rolle von GltT bei der Verwertung von Aspartat und Glutamat als Stickstoffquellen in *B. subtilis* 102
2.5 Die Hitzeprotektion durch Glutamat und Aspartat ist abhängig von ihrer Aufnahme in die Zelle durch GltT 104
2.6 Die Glutamat- und Aspartataufnahme wird unter Hitzestress nicht stimuliert 106
2.7 Akkumulation von Glutamat und Aspartat bei 37°C und 52°C und die Rolle von GltT 108
2.8 Bestimmung der halbmaximalen thermoprotektiven Konzentration von Aspartat 110
3. Die osmoprotektive Wirkung der Aminosäuren Glutamat und Aspartat in *B. subtilis* ist abhängig von *gltT* und *proHJ* 111

3.1 Der GltT – vermittelte Transport von Aspartat und Glutamat wird unter hyperosmolaren Bedingungen nicht induziert ... 114
3.2 Akkumulation von Glutamat und Aspartat bei hoher Osmolarität ... 116
3.3 Bestimmung der halbmaximalen osmoprotektiven Aspartatkonzentration ... 118
3.4 Northern Blot Analysen des *gltT*-Transkripts ...
4. Komplementation der *gltT*-Mutante ... 120
5. Stressprotektive Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren in *B. subtilis* ... 125
5.1 Protektion gegen Thermostress (52°C) durch die exogene Zugabe von Aminosäuren in *B. subtilis* ... 125
5.2 Protektion gegen Kältestress durch die exogene Zugabe von Aminosäuren in *B. subtilis* 126
5.3 Protektion gegen hyperosmotischen Stress durch die exogene Zugabe von Aminosäuren in *B. subtilis* ... 126

V. Diskussion

1. Die Anhäufung der Aminosäure Prolin als osmotische Schutzsubstanz ... 129
1.1 Die Synthese von Prolin für osmoprotektive Zwecke in Bakterien ... 129
1.2 Die Synthese von Prolin für osmoprotektive Zwecke in Pflanzen ... 132
1.3 Die osmotische Regulation der Prolinsynthesegene in *B. subtilis* und *B. licheniformis* ... 134
1.4 In *B. subtilis* vermittelt eine Prolinüberproduktion keine erhöhte Salzresistenz ... 139
1.5 Die Degradation von Prolin in prolinakkumulierenden Organismen ... 141
2. Stressprotektion von *B. subtilis* durch exogen angebotene Aminosäuren ... 141
2.1 Die Wirkweise osmoprotektiver Aminosäuren in *B. subtilis* ... 141
2.3 Vorläufer für die osmoprotektive Prolinsynthese in *B. subtilis* ... 142
2.4 Die Wirkweise thermoprotektiver Aminosäuren ... 145
2.4 Cryoprotektive Aminosäuren ... 147
2.5 Die physiologische Bedeutung der Protektion durch Aminosäuren ... 148
3. Die Aufnahme von L-Glutamat und L-Aspartat in *B. subtilis* ... 149
3.1 Der Glutamat/ Aspartattransporter GltT aus *B. subtilis* ... 149
3.2 Strukturelle Merkmale der Glutamattransporterfamilie ... 151
3.3 GltT-vermittelte Glutamat- und Aspartataufnahme unter Hitzestress in *B. subtilis* ... 157
3.4 GltT-vermittelte Glutamat- und Aspartataufnahme unter hyperosmotischen Bedingungen in *B. subtilis* ... 158
3.5 GltT im Vergleich mit den Opu-Transportern aus *B. subtilis* ... 159
3.6 Das Protein GltP aus *B. subtilis* ... 161
3.7 Das Protein YveA aus *B. subtilis* ... 162

VI. Literatur ... 163

Danksagung ... 181

VII. Anhang ... 183
Abb. 4: Mutationen im σ^A – abhängigen Promotor von *proHJ* und die resultierenden Plasmide undStämme ... 183
Von K. Kobayashi auf Wechselwirkung mit *proHJ* getestete Regulatoren ... 184
Abb. 56: mögliche Sekundärstrukturen der 5´ UTR der mRNA der putativen *proH* Orthologe aus *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis* und *B. licheniformis* ... 185
Abb. 57: vorgeschlagene Sekundärstrukturen der *proH* 5´UTR mit eingeführten Deletionen ... 187
Abb. 58: Aminosäurensequenzvergleich der Proteine GltP und GltT aus *B. subtilis* ... 189
Schema der Pyrimidinsynthese in *B. subtilis* ... 190

Abbildungsverzeichnis:

Seite

Abb. 1: Einige der in Prokaryonten genutzten kompatiblen Solute 10

Abb. 2: In die Adaptation an hyper- und hypoosmolare Wachstumsbedingungen involvierte Systeme in *B. subtilis* (verändert nach Bremer, 2002). 14

Abb. 3: Die Glutamat- und Glutaminsynthese mit Ammonium als Stickstoffquelle in *B. subtilis* 22

Abb. 4: Mutationen im σ^A – abhängigen Promotor von *proHJ* und die resultierenden Plasmide und Stämme 183

Abb. 5: Das Plasmid pJS35 43

Abb. 6: Das pX-Derivat pMD15 44

Abb. 7: Das Plasmid pMD27 45

Abb. 8: Die durch das *proH$_{153}$´*- Fragment vermittelte Expression ist linear zur externen Osmolarität. 56

Abb. 9: Konstruktion der Reportergenstämme mit mutiertem *proHJ*-Promotor. 57

Abb. 10: Die Mutationen des *proHJ*-Promotors und die daraus resultierenden Aktivitäten. 60

Abb. 11: Die Hypermutanten zeigen immer noch eine feinabgestimmte osmotische Induktion. 61

Abb. 12: Repression des *proHJ* Promotors durch das kompatible Solut Glycin Betain. 63

Abb. 13: Konstruktion der Stämme mit mutiertem Promotor vor dem *proHJ* -Operon. 65

Abb. 14: Die Transkription des *proHJ*-Operons in den Hypermutanten. 66

Abb. 15: Der Prolingehalt der Promotormutanten korreliert mit den TreA – Aktivitäten. 68

Abb. 16: Wachstumsanalysen der Hypermutante MDB28 (*proH$_{153}$mutM10´-proHJ*) unter..... 70

Abb. 17: Die prolinüberproduzierende Mutante MDB28 (*proHmutM10´-proHJ*) ist weniger sensitiv gegenüber DHP im Vergleich zum Wildtypstamm JH642. 72

Abb. 18: EMSA des 153 bp *proHJ* regulatorischen Fragmentes. 74

Abb. 19: 126 bp genügen, um die osmotische Regulation von *proHJ* zu vermitteln. 76

Abb. 21: Die in die *proHJ*-Promotorregion eingeführten Mutationen M11 und 12. 80

Abb. 22: LacZ-Aktivität der Stämme MDB38 und MDB51 82

Abb. 23: Organisation der wahrscheinlichen Prolinsynthesegene in *B. licheniformis* 83

Abb. 24: Prolingehalt osmotisch gestresster *B. licheniformis* Zellen 84

Abb. 25: Transkriptionsanalysen der Gene *proH*, *proJ* und *proAA* in *B. licheniformis* 85

Abb. 26: Northern Blot Analysen der anabolen Prolinsynthesegene in *B. licheniformis* 87

Abb. 27: TreA – Aktivität der *proH´-treA*-Fusionen aus *B. licheniformis* 89

Abb. 28: TreA – Aktivität der $proH_{130}$*´-treA*–Fusion aus *B. licheniformis* 90

Abb. 29: TreA – Aktivität der $proH_{130}$*´-treA*–Fusion nach einem plötzlichen hyperosmotischen Schock 92

Abb. 30: Die Aufnahme von Glutamat in den Transportermutanten 96

Abb. 31: Die Aufnahme von Aspartat in den Transportermutanten 97

Abb. 32: Die Glutamat– und Aspartataufnahme in den Mehrfachmutanten bei einer Substratkonzentration von 1 mM 99

Abb. 33: Hanes-Woolf –Diagramm zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von GltT 101

Abb. 34: Wachstumskurve in SMM mit Glutamat bzw. Aspartat als einziger Stickstoffquelle 103

Abb. 35: Wachstumanalysen bei 52°C mit der Zugabe von Aspartat und Glutamat 105

Abb. 36: Analyse der Glutamat- und Aspartataufnahme bei hyperthermen Bedingungen 107

Abb. 37: Akkumulation von Glutamat und Aspartat bei 37°C und 52°C 109

Abb. 38: Wachstumsvermögen des Stammes JH642 bei 52°C in Abhängigkeit der supplementierten Aspartatkonzentration. 110

Abb. 39: Die osmoprotektive Wirkung von Glutamat und Aspartat in *B. subtilis* 112

Abb. 40: Die Osmoprotektion durch Glutamat und Aspartat ist abhängig von *gltT* und *proHJ* 113

Abb. 41: Transportanalysen der Stämme JH642 und ADB4 [(*gltT* x pUS19) 1 (*spec*)] unter hyperosmolaren Bedingungen 115

Abb. 42: Durch exogene Aufnahme akkumulierte Menge an Glutamat und Aspartat bei 0 und 0,8 M NaCl 117

Abb. 43: Ermittlung der halbmaximalen osmoprotektiven Konzentrationen von Prolin, Glutamat und Aspartat. 118

Abb. 44: Northern Blot Analysen des *gltT*–Transkripts 120

Abb. 45: Glutamataufnahme in der komplementierten *gltT*–Mutante 122

Abb. 46: Die Einbringung einer Kopie des Strukturgens *gltT* komplementiert den Phänotyp des Stammes ADB4 [(*gltT* x pUS19) 1 (*spec*)] 123

Abb. 47: Eine zusätzliche *gltT*–Kopie führt nicht zu einer besseren Hitzeprotektion durch Glutamat oder Aspartat 124

Abb. 48: Die Stressprotektion durch die proteinogenen Aminsosäuren in *B. subtilis* 127

Abb.49: Die Osmoprotektion durch proteinogene Amiosäuren ist abhängig von *proHJ*. 128

Abb.50: Die Prolinsynthesewege in den *Bacillus* Spezies *B. subtilis* und *B. licheniformis*. 131

Abb.51: Mögliche Sekundärstruktur der 5´UTR von *proH* aus *B. subtilis* 138

Abb. 52: Hydropathieanalysen der Glutamat/Aspartattransporter Glt_{Bsu} und Glt_{Ph} 153

Abb.53: Mechanismus der Substratbindung und –translokation im Glutamattransporter Glt_{Ph}. 154

Abb. 54: Sequenzvergleiche GltT-homologer Proteine 155

Abb. 55: Schematische Darstellung der Membrantopologie von Glt_{Ph} 155

Abb. 56: mögliche Sekundärstrukturen der 5´ UTR der mRNA der putativen *proH* Orthologe aus *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis* und *B. licheniformis* 185

Abb. 57: vorgeschlagene Sekundärstrukturen der *proH* 5´UTR mit eingeführten Deletionen... 187

Abb. 58: Aminosäurensequenzvergleich der Proteine GltP und GltT aus *B. subtilis* 189

Verwendete Abkürzungen:

%(w/v),%(v/v)	Gewichtsprozent, Volumenprozent
AcN	Acetonitril
ADAM	1-Aminoadmantan
BGSC	Bacillus Genetic Stock Center
cat,Cml$^{(R)}$	(resistent gegen) Chloramphenicol
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DHP	3,4 Dehydro DL-Prolin
DIG	Digoxygenin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (EDT acidic acid)
erm,Ery$^{(R)}$	(resistent gegen) Erythromycin
FMOC	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
GOGAT	Glutamatsynthase
kan,Kan$^{(R)}$	(Resistent gegen) Kanamycin
mcs	multiple cloning site
OD_{578}	optische Dichte bei 578 nm
oNPG	*ortho* - Nitrophenyl - ß - D - Glucopyranosid
P5C	Pyrollin-5-Carboxylat
P5CS	Pyrollin-5-Carboxylat-Synthase
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pNPG	*para* - Nitrophenyl - α - D - Glucopyranosid
rpm	Umdrehungen pro Minute, rotations per minute
SDS	Natrium - Dodecylsulfat, Sodium - Dodecylsulfat
Spc$^{(R)}$	(resistent gegen) Spectinomycin
TAE	Tris Acetat EDTA
TG	Trockengewicht
tet	(Resistent gegen) Tetracyclin
üN	über Nacht
Vol	Volumen
X - Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galactopyranosid

Wenn nicht näher bezeichnet, wurde die L-Form der angegebenen Aminosäuren verwendet.

I. Zusammenfassung

Bacillus subtilis akkumuliert unter hochosmolaren Bedingungen die Aminosäure Prolin via *de novo* Synthese als kompatibles Solut. Diese Synthese wird von den Enzymen ProJ, ProA und ProH vermittelt, wobei die Strukturgene *proH* und *proJ* als osmotisch kontrolliertes Operon exprimiert werden (Brill, 2002). In dieser Arbeit wurden die *in cis* benötigten Elemente für die osmoregulierte *proHJ*-Transkription lokalisiert. Mit Hilfe von Reportergenfusionen konnte ein minimales regulatorisches Fragment gefunden werden. Durch ortsgerichtete Mutagenesen dieses Fragmentes konnte geschlossen werden, dass sich die gesuchten *cis*-Elemente in der 5´untranslatierte Region von *proH* befinden. In diesem Zusammenhang durchgeführte Mutagenesen des *proHJ* Promotors ergaben Stämme, die eine Überproduktion von Prolin aufwiesen. Trotz des höheren intrazellulären Prolingehaltes zeigen diese Stämme gegenüber dem Wildtyp keinen Wachstumsvorteil unter Hypersalinität, sind aber weniger sensitiv gegenüber dem toxischen Prolinanalogon 3,4 Dehydro- DL- Prolin. Analysen des ebenfalls prolinakkumulierenden Bakteriums *Bacillus licheniformis* offenbarten eine große Ähnlichkeit zur Organisation der Prolinsynthesegene in *B. subtilis*. Das in *B. subtilis* gefundene regulatorische *proHJ*-Minimalfragment ließ sich ebenfalls in *B. licheniformis* identifizieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass es auch in *B. licheniformis* in der Lage ist, die osmotische Regulation der Transkription zu vermitteln. Weitere Analysen zeigten, dass es dieses Fragment auch in *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis* und *B. vallismortis* gibt. Eine Untersuchung der Auswirkung bekannter oder vermuteter Transkriptionsregulatoren aus *B. subtilis* konnte kein *trans*-aktives Regulationssystem identifizieren, das die osmotische Induktion von *proHJ* vermittelt.

Die Aminosäure Glutamat ist als Osmo- und Thermoprotektivum in *B. subtilis* bekannt (Kerres, 2002; Holtmann und Holtmann *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Na^+/H^+/ Symporter GltT aus der Familie der Glutamattransporter die hochaffine Aufnahme von Glutamat sowohl unter Stress- als auch unter Standardkonditionen vermittelt. Proteine der Glutamattransporterfamilie akzeptieren neben Glutamat auch Aspartat als Substrat. GltT konnte neben seiner Rolle als Glutamattransporter ebenfalls als hauptsächlicher Aspartattransporter in *B. subtilis* identifiziert werden. Die Aminosäure Aspartat konnte in dieser Arbeit erstmalig als Thermo- und Osmoprotektivum in *B. subtilis* charakterisiert werden. Mit Glutamat und Aspartat konnte zwei proteinogenen Aminosäuren stressprotektive Eigenschaften zugeordnet werden. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um eine verbreitete Wirkung von Aminosäuren handelt, wurden alle proteinogenen Aminosäuren auf ihre Protektion von *B. subtilis* bei Salz-, Hitze- und Kältestress getestet. Die Protektion bei Osmostress wurde durch Aminosäuren vermittelt, die in der Zelle in die Prolinsynthese einfließen können. Thermoprotektive Eigenschaften konnten bei zahlreichen Aminosäuren festgestellt werden, jedoch ist hier der Wirkmechanismus nicht endgültig geklärt. Keine der getesteten Aminosäuren erwies sich als potentes Cryoprotektivum.

II. Einleitung

1. Die Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts ist lebenswichtig für die Zelle

Die Konfrontation mit variierenden abiotischen Parametern charakterisieren das Leben insbesondere nicht-sessiler Mikroorganismen. Aktive Stressadaptationen sind daher unabdingbare Voraussetzungen für die Besiedelung der meisten Habitate. Die Mechanismen dieser Anpassung sind hochkonserviert in allen Domänen des Lebens (Roberts, 2005).

Die Besiedelung der oberen Bodenschichten z.B. erfordert eine flexible Begegnung mit wechselnden Wasserverfügbarkeiten, schwankenden Temperaturen und variierendem Nährstoffangebot (Poolman und Glaasker, 1998; Horsburgh und Moir, 1999; Welsh, 2000; Bremer, 2002; Pflüger und Müller, 2004). Der Umgang und die Anpassung an diese Parameter wurden im Gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* studiert.

Die Verfügbarkeit von Wasser im Habitat ist für das Überleben der Zelle von entscheidender Bedeutung (Kempf und Bremer, 1998; Roeßler und Müller, 2001; Kuhlmann und Bremer, 2001). Die Wasseraktivität a_w in der Zelle ist ein limitierender Faktor für den Zellstoffwechsel und das Wachstum (da Costa *et al.*, 1998; Kempf und Bremer, 2000). Da die bakterielle Zellwand unselektiv Makromoleküle passieren lässt, stellt die Cytoplasmamembran die wichtigste Abgrenzung zwischen Zelle und Umgebung dar. Sie ist zwar undurchlässig für Makromoleküle, hydrophile oder geladene Moleküle und Ionen, aber permeabel für Wasser (Galinski, 1993; Madigan *et al.*, 2000). Durch Flutung des Bodens durch Regen entstehen besondere Herausforderungen an den Mikroorganismus (Le Rudulier *et al.*, 1984; Wood, 1999; Hoffmann *et al.*, 2001). Es findet eine rasche Verdünnung der im Bodenwasser enthaltenen Substanzen statt; es entsteht eine hypoosmolare Umgebung. Entlang des osmotischen Gradienten diffundiert das Wasser von außen durch die semipermeable Cytoplasmembran in die Zelle. Der Zellinnendruck, der Turgor, erhöht sich, was sogar zum Platzen der Zelle führen kann. Um dies zu umgehen, besitzt *B. subtilis* die mechanosensitiven Kanäle MscS und MscL, die unselektiv die Ausschleusung osmotisch aktiver Substanzen übernehmen (Boiangiu, 2003; Hoffmann, persönliche Mitteilung). In Trockenphasen hingegen nimmt die Umgebung einen hyperosmolaren Charakter an; das Wasser diffundiert aus der Zelle in den Boden. Hier liegt die Gefahr für das Bakterium in dem Zusammenbruch des Turgors. Der Turgor beträgt unter optimalen Bedingungen bei Gram-negativen Bakterien zwischen 3 und 5 atm, bei Gram-positiven Bakterien bis zu 20 atm (Csonka, 1989; Kempf und Bremer, 2000). Für *B. subtilis* wurde der Turgor mit 19 atm bestimmt (Whatmore und Reed, 1990). Ein positiver

Turgor ist eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum von Mikroorganismen (Whatmore und Reed, 1990; Boch *et al.*, 1996; Bremer und Krämer, 2000; Roeßler und Müller, 2001; Poolman *et al.*, 2002). Der Grund hierfür wird in der „surface stress theory“ (Koch, 1983) vermutet. Diese Theorie geht davon aus, dass zur Verlängerung der Peptidoglycanstränge die Bakterienzellwand gestreckt sein muss: Diese Streckung erfolgt durch den Turgor. Bricht der Turgor zusammen, so kann die Zelle keine Zellwand mehr synthetisieren, d.h. weder wachsen noch sich vermehren. Im Extremfall kann es zur Plasmolyse kommen (Whatmore und Reed, 1990; Kempf und Bremer, 1998).

Der Einstrom von Wasser kann nicht nur osmotisch durch die semipermeable Membran erfolgen; in *Escherichia coli* wurde beispielsweise ein spezifischer Kanal, ein Aquaporin, gefunden (AqpZ, Calamita *et al.*, 1995). Aquaporine sind spezifische Kanäle, die den Durchtritt von Wasser in beide Richtungen durch die Membran erleichtern. Auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten solche Kanäle nachgewiesen werden (Pettersson *et al.*, 2005). In *B. subtilis* wurden bisher keine Aquaporine identifiziert (Holtmann *et al.*, 2004).
Da es in Mikroorganismen keinen aktiven Transport von Wasser gibt, muss die Zelle den Wasserein- bzw. den Wasserausstrom über das osmotische Potential ihres Cytoplasmas regeln (Galinski, 1993; Kempf und Bremer, 2000; Bremer, 2002). So akkumulieren z.B. halophile Mikroorganismen Ionen, um in ihren hypersalinen Habitate leben zu können (Galinski, 1993; Kempf und Bremer, 2000; Welsh, 2000). Diese Strategie wird auch als „salt-in“ -Strategie bezeichnet (Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 2000).

In vielen halotoleranten Bakterien, so auch in *B. subtilis*, erfolgt die Adaptation an hochosmolare Bedingungen über die Akkumulation organischer Osmolyte, der sogenannten kompatiblen Solute (Galinski, 1993; da Costa *et al.*, 1998; Gouffi und Blanco, 2000; Bremer, 2002). Die Anpassung an Salzstress von *B. subtilis* wird im Gegensatz zu der Strategie halophiler Mikroorganismen auch als „salt-out“-Strategie bezeichnet (Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 2000). Sie erlaubt die Besiedlung von Habitaten und Besetzung ökologischer Nischen, die sonst für nicht-halophile Organismen nicht bewohnbar wären (Bremer, 2002).

1.1 Adaptation an hyperosmotische Bedingungen in halotoleranten Bakterien am Beispiel *Bacillus subtilis*

Das natürliche Habitat von *B. subtilis* sind die oberen Schichten des Bodens. Dort ist das Bakterium ständig variierenden abiotischen Bedingungen wie Temperatur und Wasserverfügbarkeit ausgesetzt. Eine hohe Anpassungsfähigkeit an diese wechselnden Parameter ist obligatorisch für die Besiedlung solcher Habitate.

Setzt man *B. subtilis* hypersalinen Bedingungen aus, die im natürlichen Habitat z.B. durch Austrocknung des Bodens geschaffen werden, so werden neben den salzspezifische Stressproteinen auch Proteine des σ^B-Regulons, der generellen Stressantwort in *B. subtilis,* induziert. Die Gene des σ^B-Regulons werden nicht nur bei Salz- sondern auch bei Kälte-, Hitze- und Ethanolstress verstärkt exprimiert; sie verleihen eine generelle Stressresistenz (Maul *et al.*, 1995; Hecker *et al.*, 1996; Völker *et al.*, 1999). Die Sporulation, eine Möglichkeit des Umgangs mit extremen Umweltbedingungen, wird durch den Anstieg der Salzkonzentration blockiert. *B. subtilis* muss sich daher als vegetative Zelle an hyperosmolare Konditionen adaptieren (Ruzal *et al.*, 1998).

1.1.1 Phase I: Die Akkumulation von K^+-Ionen

Bei der spezifischen Antwort auf hyperosmolaren Stress erfolgt in *B. subtilis* eine biphasische Adaptation. Die erste Reaktion besteht in der Akkumulation von K^+-Ionen durch Aufnahme aus dem Medium (Whatmore *et al.*, 1990). Die Aufnahme erfolgt über das hochaffine Transportsystem KtrAB und das weniger affine System KtrCD (Holtmann *et al.*, 2003). Die Akkumulation von K^+-Ionen ist notwendig zur Wiederherstellung des Turgors und zur Synthese des kompatiblen Solutes Prolin (Whatmore und Reed, 1990, Whatmore *et al.*, 1990). Um die positive Nettoladung auszugleichen, ist die Akkumulation eines Gegenions nötig. In *E. coli* erfüllt die Aminosäure Glutamat diese Funktion (Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994). Auch in *B. subtilis* wurde vermutet, dass Glutamat als Gegenion zu K^+ akkumuliert wird; jedoch sieht man keinen deutlichen Anstieg des Glutamatspiegels in der Zelle nach einem Salzschock (Whatmore *et al.*, 1990). Die Akkumulation von K^+ erfolgt jedoch nur über einen relativ kurzen Zeitraum. Bei zu hoher intrazellulärerer K^+ - Konzentration wird das Cytoplasma alkalisiert (Krulwich *et al.*, 2001), und essentielle Vorgänge wie Proteinfunktionen und DNA-Protein-Interaktionen werden gestört (Kempf und Bremer, 1998). Daher folgt als zweiter Schritt der Osmostressantwort die Akkumulation kompatibler Solute. Der Efflux der K^+-Ionen aus der Zelle erfolgt vermutlich über

spezifische K^+-Effluxsysteme, die allerdings bisher noch nicht bekannt sind (Holtmann *et al.*, 2003).

1.1.2 Phase II: Die Akkumulation kompatibler Solute

Kompatible Solute können in viel höheren Konzentrationen akkumuliert werden als K^+-Ionen, da sie den Zellstoffwechsel nicht beeinträchtigen. Für die intrazelluläre Anhäufung von kompatiblen Soluten stehen prinzipiell zwei Mechanismen zur Verfügung: die Aufnahme vorgefertigter exogener Solute oder die energieaufwändigere, endogene *de novo* Synthese (Csonka und Epstein, 1996; Holtmann *et al.*, 2003).
In *B. subtilis* wurden bislang fünf Systeme charakterisiert (OpuA, B, C, D, E; osmoprotectant uptake), die die Aufnahme osmoprotektiver Substanzen katalysieren (Kempf und Bremer, 1998). Diese Transportsysteme vermitteln die Aufnahme von z.B. Glycin Betain, Cholin, Ectoin, Prolin u.a. (Abb. 2; Kempf, 1995; Kappes *et al.*, 1996; von Blohn *et al.*, 1997; Kappes *et al.*, 1999) Mittels der Gene *gbsA* und *gbsB* ist *B. subtilis* in der Lage, aus Cholin, aufgenommen über OpuB, Glycin Betain zu synthetisieren (Boch *et al.*, 1996). Desweiteren kann *B. subtilis* durch Aufnahme prolinhaltiger Di- und Tripeptide und ihrer intrazellulären Hydrolyse Prolin akkumulieren (Brill, 2002).

Darüber hinaus ist *B. subtilis* in der Lage, das kompatible Solut Prolin endogen *de novo* zu synthetisieren. Dies geschieht mittels der durch ProJ, ProA und ProH vermittelten Reaktionen ausgehend von dem Substrat Glutamat (*Brill, 2002*). Bei einer plötzlichen Erhöhung der Osmolarität des Mediums von 0 auf 0,4 M NaCl steigt die interne Prolinkonzentration von 16 auf 700 mM (Whatmore *et al.*, 1990). Dabei ist die Menge an akkumuliertem Prolin direkt proportional zur Osmolarität des Mediums (Brill, 2002). Genauer betrachtet wird die Synthese der Aminosäure Prolin in *B. subtilis* in Abschnitt 4.

1.2 Stressprotektion durch die Akkumulation kompatibler Solute

Die Anhäufung sogenannter kompatibler Solute ist ein in allen Domänen des Lebens verbreiteter Mechanismus zur Adaptation an hypertone Wachstumsbedingungen, auch wenn das Spektrum der genutzten Solute von Organismus zu Organismus verschieden ist (Kempf und Bremer, 1998; Roberts., 2005). Als kompatible Solute werden organische Osmolyte bezeichnet, die die Zelle in

hohen Konzentrationen akkumulieren kann, ohne ihren Metabolismus zu beeinträchtigen (Brown, 1976). Dabei handelt es sich in der Domäne der *Bacteria* um niedermolekulare Substanzen, deren Moleküle bei einem pH von 7 in der Regel ohne Nettoladung vorliegen (da Costa *et al.*, 1998; Kempf und Bremer, 1998; Pflüger und Müller, 2004; Yancey, 2005). Kompatible Solute protektieren die Zelle auf zweierlei Arten (Kempf und Bremer, 2000) vor hyperosmolarem Stress:

1.) Sie verringern die osmotische Potentialdifferenz zwischen Zelle und Umgebung, so dass der Wasserausstrom verringert und damit der Turgor stabilisiert wird. Kompatible Solute erhöhen die Menge an freiem Wasser in der Zelle und vergrößern somit das Volumen des Cytoplasmas. Die Menge an freiem Wasser stellt eine wichtige Determinante für das Zellwachstum dar (Cayley *et al.*, 1992; Kempf und Bremer, 1998).

2.) Sie verhindern die aufgrund der hohen Ionenstärke drohende Denaturierung von Proteinen und stabilisieren diese. Das Wirkprinzip von kompatiblen Soluten zur Stabilisierung von Proteinen ist noch immer nicht vollständig geklärt. Das zur Zeit bestehende Modell besagt, dass aufgrund von Kräften ähnlich hydrophoben Wechselwirkungen kompatible Solute von der Umgebung des Peptidrückgrates ausgeschlossen werden („preferential exclusion“, Arakawa und Timasheff, 1985). Diese Kräfte werden auch als „osmophobe Wechselwirkungen“ bezeichnet (Bolen und Baskakov, 2001). Unter diesen Bedingungen ist es für das Protein thermodynamisch nachteilig, seine Hydrathülle zu zerstören (Yancey, 1994; Kempf und Bremer, 1998). Auf diese Weise wird das Protein quasi „gezwungen“, in seiner nativen Struktur zu verweilen (Krämer und Bremer, 2000; Bolen und Baskakov, 2001; Sleator *et al.*, 2003).

Die bisher bekannten, osmoprotektiven kompatiblen Solute lassen sich verschiedenen Stoffklassen zuordnen: Polyole (z.B. Glycerin), Trimethylammoniumverbindungen (z.B. Glycin Betain), Disaccharide (z.B. Trehalose), Aminosäuren und ihre Derivate (z.B. Prolin, Ectoin) u.a. (Csonka, 1989; Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 1998; da Costa *et al.*, 1998). Die Akkumulation von kompatiblen Soluten kann sowohl durch die Aufnahme exogen vorliegender Substanzen als auch über die endogene *de novo* Synthese erfolgen (Csonka und Epstein, 1996; Holtmann *et al.*, 2004). Oft kann ein breites Spektrum exogener, vorgefertigter Substanzen aufgenommen werden, während die Möglichkeiten zur *de novo* Synthese sich meist auf ein oder zwei kompatible Solute beschränkt. *E. coli* und *B. subtilis* z.B. sind in der Lage, ein weites Spektrum an kompatiblen Soluten aufzunehmen, können aber unter hochosmolaren Bedingungen nur Trehalose bzw. Prolin endogen *de novo* synthetisieren (Strøm und Kaasen, 1993; Brill, 2002). Für die Synthese von z.B. Glycin Betain muss *B. subtilis* den Vorläufer Cholin aus dem Medium aufnehmen (Boch *et al.*, 1996; Abb.2).

Neben hyperosmolarem Stress können kompatible Solute Zellen aber auch vor anderen Stressfaktoren protektieren. So wirkt Ectoin in *Virgibacillus pantothenticus* nicht nur osmo- sondern auch kälteprotektiv (Kuhlmann, 2002). Dasselbe gilt für Glycin Betain in *Listeria monocytogenes* (Bayles und Wilkinson, 2000) und *B. subtilis* (Brigulla *et al*., 2003; Hoffmann *et al.*, in Vorbereitung). Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nutzt die Aminosäure Prolin als effizientes Cryoprotektivum (Morita *et al.*, 2002).

Die thermoprotektive Wirkung von Glycin Betain wurde im hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und im mesophilen Bakterium *B. subtilis* beschrieben (Holtmann, 2003). Im letzteren vermittelt das vergleichsweise schwache Osmoprotektivum Glutamat den stärksten Schutz vor Thermostress unter den getesteten kompatiblen Soluten (Holtmann und Bremer, 2003). Die thermoprotektive Wirkung von Trehalose ist in *Salmonella typhimurium* (Canovas *et al.*, 2001) und in dem Eukaryonten *S. cerevisiae* (Hounsa *et al.*, 1998) beschrieben.
In vitro wurde gezeigt, dass kompatible Solute wie Prolin Enzyme vor Denaturierung durch chemische Reagenzien protektieren können (Ou *et al.*, 2001). Außerdem wurde die Unterstützung molekularer Chaperone wie DnaK durch Prolin oder Glycin Betain ebenfalls *in vitro* und auch in Zellen unter Salz- und/oder Hitzestress dokumentiert. Aufgrund dieser proteinstabilisierenden Eigenschaften werden diese kompatiblen Solute auch als „chemical chaperones“ bezeichnet (Diamant *et al.*, 2001, 2003).

1.2.1 Kompatible Solute in *Archaea*

Die Stressantwort auf hyperosmolare Wachstumsbedingungen wurde auch in *Archaea* erforscht. Wie auch Eubakterien sind *Archaea* in der Lage, sowohl exogen angebotene kompatible Solute aufzunehmen als auch endogen *de novo* zu synthetisieren (Müller *et al.*, 2005). Die bisher bekannten, *Archaea*-spezifischen kompatiblen Solute unterscheiden sich von denen in Eubakterien dadurch, dass sie bei physiologischem pH-Wert eine negative Nettoladung besitzen, während bakterielle kompatible Solute ohne Nettoladung vorliegen (Roberts, 2005). Die in Abb.1 dargestellten Substanzen lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: in 1.) Zucker und Polyole und 2.) Aminosäuren und ihre Derivate (Pflüger und Müller, 2004).
Beispiele für ausschließlich archaelle kompatible Solute sind 2-*O*-D-Mannosyl-D-Glycerat, Diglycerolphosphat, α-Glucosylglycerat, β-Glutamat, β-Glutamin und Nε-Acetyl-β-Lysin, Di-*myo*-1,1´-Inositolphosphat und zyklisches 2,3 Biphosphoglycerat (Pflüger *et al.*, 2003). Die letzten beiden werden ebenfalls präferentiell zum Schutz vor Thermostress angehäuft (Martins und

Santos, 1995, Martins *et al.*, 1997). Auch aus anderen Domänen des Lebens bekannte kompatible Solute wie Prolin, Glutamat, Trehalose und Glycin Betain werden in *Archaea* genutzt (Müller *et al.*, 2005). Der halotolerante, archaelle Modellorganismus *Methanococcus thermolithotrophicus* akkumuliert unter moderater Hypersalinität (bis 1 M NaCl) die Aminosäure Glutamat als kompatibles Solut, sowohl in der α- als auch in der β-Form. Steigt die externe Osmolarität weiter an, so wird statt des Glutamats Nε-Acetyl-β-Lysin angehäuft, ein exklusiv von methanogenen *Archaea* genutztes Solut (Sowers *et al.*, 1990; Roeßler und Müller, 2001). Ähnliches wurde in *Methanococcus thermophila* beobachtet. Diese Hierarchie in der Akkumulation kompatibler Solute ist auch in Bakterien bekannt; *Virgibacillus pantothenticus* z.B. häuft bei moderater Hypertonie Prolin an, während bei höheren Osmolaritäten Ectoin akkumuliert wird (Kuhlmann, 2002). Die exogene Zugabe des kompatiblen Soluts Glycin Betain reprimiert in *M. thermophila* sowohl die Synthese von Glutamat als auch von Nε-Acetyl-β- Lysin (Sowers und Gunsalus, 1995). Die zur Synthese von Nε-Acetyl-β-Lysin aus L-Lysin benötigten Strukturgene stehen in *Methanosarcina mazei* Gö1 unter osmotischer Kontrolle (Pflüger *et al.*, 2003).

Die Nutzung von β-Aminosäuren ist mittlerweile auch in Eubakterien bekannt; *Nocardiopsis halophila* akkumuliert β-Glutamat (Roberts, 2005). Die Akkumulation von β-Aminosäuren ist insofern vorteilhaft, als dass sie im Gegensatz zu ihren α-Derivaten metabolisch inert sind. Pulse-chase-Experimente haben gezeigt, dass eine Anhäufung von α-Glutamat nur durch eine ständige, energieaufwändige Neusynthese möglich ist, um der gleichzeitigen Verstoffwechselung entgegenzuwirken. Im Gegensatz dazu bleibt der Gehalt an β-Glutamat konstant (Roberts, 2005).
Die Aufnahme kompatibler Solute zum Schutz vor Hitzestress ist in *Archaea* konnte in vielen halophilen *Archaea* nachgewiesen werden (Lamosa *et al.*, 1998). In diesen *Archaea* greift offenbar die Adaptation an Hitze und an Hypersalinität ineinander (Martins *et al.*, 1996a; Neves *et al.*, 2005). Bei den non-halophilen, hyperthermophilen *Archaea* ist *Archaeoglobus fulgidus* als Nutzer des kompatiblen Soluts Glycin Betain als thermische Schutzsubstanz bekannt (Holtmann, 2003).

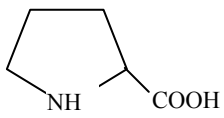
In *Thermococcus litoralis* konnte neben den bisher bekannten kompatiblen Soluten die Akkumulation der Aminosäure Aspartat als Antwort auf Hypersalinität nachgewiesen werden (Lamosa *et al.*, 1998). Die osmotisch stimulierte Anhäufung von Aspartat konnte auch in dem verwandten Organismus *Palaeococcus ferrophilus* nachgewiesen werden (Neves *et al.*, 2005). In beiden Fällen wird die Akkumulation durch die Aufnahme von vorgefertigtem exogenen Aspartat bewerkstelligt.

1.3 Die Synthese von Prolin in *B. subtilis*

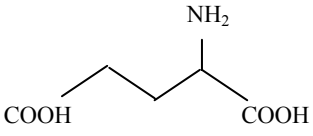
Die meisten kompatiblen Soluten sind metabolisch inerte Moleküle (Kempf und Bremer, 2000). Die Aminosäure Prolin bildet hierbei eine Ausnahme. Als proteinogene Aminosäure wird sie zur Proteinbiosynthese benötigt und kann unter Umständen sogar als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in *B. subtilis* verwertet werden (Kempf und Bremer, 1998; Moses, 1999).
Um den unterschiedlichen Anforderungen für Anabolismus und Osmoprotektion zu begegnen, gibt es in *B. subtilis* zwei Prolinsynthesewege (Abb.2). Dies ist zum einen der sogenannten ProBA – Weg, der die Enzyme ProB, ProA und ProI bzw. ProG umfasst und die Prolinsynthese für anabole Zwecke betreibt (Buxton, 1980; Ogura *et al.*, 1994; Belitsky *et al.*, 2001). ProA und ProB sind homolog zu den gleichnamigen Enzymen aus *E. coli* (Leisinger, 1996; Belitsky *et al.*, 2001). Daneben gibt es den osmotisch induzierbaren ProHJ- Weg, der für die Synthese von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen verantwortlich ist (Brill, 2002). Die Gene für ProH und ProJ sind als Operon organisiert und stehen unter osmotischer Kontrolle (Brill, 2002; Dolezal, 2002). Die γ-Glutamylphosphatreduktase ProA wird in beiden Synthesewegen genutzt; da sie aber nicht unter osmotischer Regulation steht, scheint der Basallevel an ProA in der Zelle auszureichen, um die unter Salzstress stark induzierte Prolinsynthese zu gewährleisten (Brill, 2002).

Die Transkription von *proBA* und *proI*, den Enzymen des anabolen Prolinsyntheseweges, unterliegt der Kontrolle durch eine T-Box abhängige transkriptionelle Antitermination und wird so dem Prolinbedarf der Zelle angepasst (Grundy und Henkin, 1993; Brill, 2002).
Das Enzym ProB unterliegt zusätzlich einer allosterischen Feedbackinhibition durch das Synthese-Endprodukt Prolin. Sein Isoenzym ProJ wird kaum durch Prolin inhibiert (*Brill, 2002*). So können unter Osmostress hohe Prolinmengen angehäuft werden. Die intrazelluläre Prolinkonzentration steigt von 16 auf 700 mM bei einer Erhöhung der Salinität des Mediums auf 0,4 M NaCl (Whatmore *et al.*, 1990). Die molekulare Grundlage für die verminderte Feedbackhemmung von ProJ durch Prolin wurde mit dem zelltoxischen Prolinanalogon 3,4 Dehydro D,L Prolin (DHP) in Organismen wie *E. coli* und *Serratia marcescens* untersucht (Rushlow *et al.*, 1985; Omori *et al.*, 1992). So konnten drei Aminosäurereste in ProB identifiziert werden, die vermutlich eine wichtige Rolle für die Feedbackinhibition spielen. Sowohl bei ProB-Enzymen aus DHP-resistenten Zellen der untersuchten Organismen als auch bei ProJ aus *B. subtilis* liegt eine Veränderung mindestens zweier dieser Aminosäurereste vor (Brill, 2002).

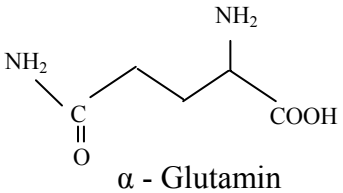
Aminosäuren und ihre Derivate:



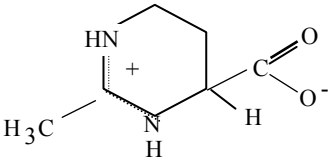
Prolin



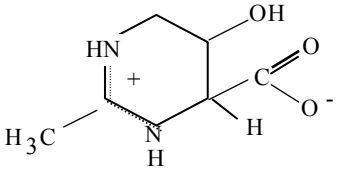
α - Glutamat



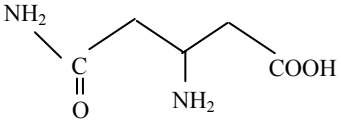
α - Glutamin



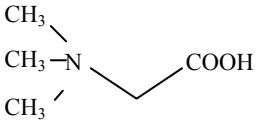
Ectoin



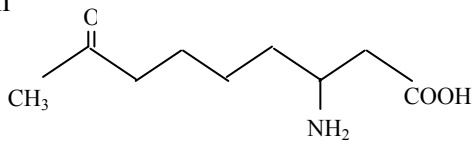
Hydroxyectoin



β - Glutamin

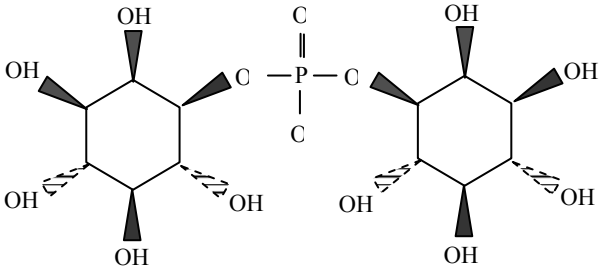


Glycin Betain

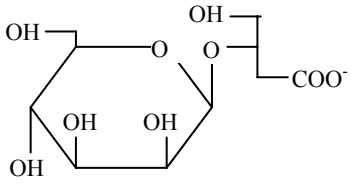


Nε-acetyl-Lysin

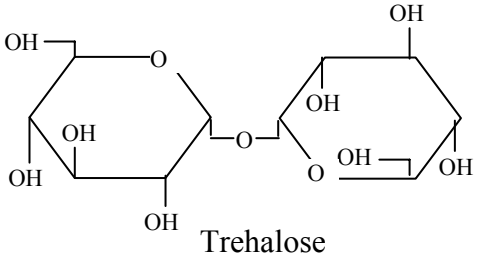
Zucker und Polyole:



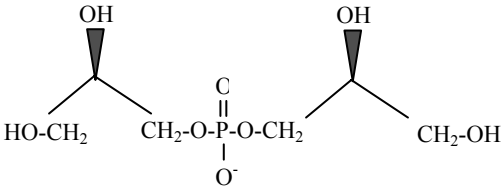
di-*myo*-1,1´-Inositolphosphat (DIP)



α-Mannosylglycerat



Trehalose



Diglycerolphosphat (DGP)

Abb.1: Einige der in Prokaryonten genutzten kompatiblen Solute.
In rot dargestellt: Bisher ausschließlich in *Archaea* nachgewiesene Substanzen.

1.4 Die Aufnahme kompatibler Solute in *B. subtilis*

Die Aufnahme kompatibler Solute aus dem Medium wird in der Regel der energieaufwändigeren Neusynthese vorgezogen (Dinnbier *et al.*, 1988). *B. subtilis* ist in der Lage, ein breites Spektrum osmotischer Schutzsubstanzen aufzunehmen, während sich die Fähigkeit zur endogenen *de novo* Synthese einzig auf Prolin beschränkt (Brill, 2002). Bisher wurden fünf Transportsysteme (OpuA-E) identifiziert, die die Aufnahme kompatibler Solute vermitteln. Zu ihrem Substratspektrum gehören sowohl Glycin Betain, Ectoin als auch Prolin, drei der am meisten genutzten kompatiblen Soluten in *Bacilli* (s.Abb.2). Es konnte gezeigt werden, dass diese Transporter die Aufnahme von kompatiblen Soluten nicht nur unter hyperosmotischem Stress vermitteln, sondern auch unter Hitze- und Kältestress (Holtmann und Holtmann *et al.*, 2004; Hoffmann, persönliche Mitteilung). Dabei konnte z.T. eine stressbedingte Induktion auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden. Als einziger Opu-Transporter wird OpuD durch hyperosmolare Stimuli zusätzlich auf Proteinebene aktiviert (Kempf und Bremer, 1998). Diese Induzierungen resultieren in einen erhöhten Transport der kompatiblen Solute unter hochosmolaren Bedingungen (Kempf und Bremer, 1995; von Blohn *et al.*, 1997; Holtmann, 2003).

OpuA, OpuB und OpuC gehören zur Gruppe der ABC-Transporter (Kempf und Bremer, 1995). Die Strukturgene ihrer Komponenten sind jeweils als Operon organisiert (z.B. *opuAA-opuAB-opuAC*), deren Transkription osmotisch stimuliert wird. Das Substratspektrum von OpuA und OpuC erstreckt sich über eine Bandbreite von Osmoprotektiva, während OpuB einzig den Transport von Cholin, dem Vorläufer für die GbsAB-vermittelte Synthese von Glycin Betain, katalysiert (s.Abb.2; Boch *et al.*, 1996). Die Expression von *opuB* und *gbsAB* steht unter der Kontrolle des Regulators GbsR (Holtmann *et al.*, 2004).
OpuD und OpuE bestehen aus jeweils einer Einzelkomponente. OpuD gehört zur Familie der Betain Carnitin Cholin Transporter (BCCT) (Kappes *et al.*,1996). Viele Mitglieder dieser Familie sind involviert in die Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen wie z.B. der Ectoin-Transporter EctT aus *V. pantothenticus* oder das Betain/Ectoin- Aufnahmesystem LcoP aus *Corynabacterium glutamicum* (Kuhlmann, unveröffentlicht; Steger *et al.*, 2004). OpuE gehört zu der Superfamilie der „Sodium Solut Symporter“ (SSF) (von Blohn *et al.*, 1997). Er vermittelt die Aufnahme von Prolin unter hyperosmolaren Bedingungen im Symport mit Na^+ und zeigt große Ähnlichkeit mit PutP aus *E. coli*, einer Prolinpermease, die die Prolinaufnahme für katabolische Zwecke vermittelt (von Blohn *et al.*, 1997). Auch in *B. subtilis* gibt es eine solche Permease (Moses, 1999). Un-

ter hyperosmotischen Konditionen wird die Transportaktiviät von PutP in *B. subtilis* allerdings gehemmt, sodass OpuE der einzige Prolintransporter unter Osmostress ist (Moses, 1999).

Die Transkription der *opu*-Gene verläuft in Abhängigkeit von der äußeren Osmolarität (Bremer, 2002). Alle *opu*-Gene besitzen einen σ^A-abhängigen Promotor, der durch hyperosmotischen Stress und Hitze aktiviert wird (Kempf und Bremer, 1995; von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter und Bremer, 1998; Holtmann und Bremer, 2003; Holtmann *et al.*, 2004). *opuD* und *opuE* werden zusätzlich von einem σ^B-abhängigen Promotor ausgehend transkribiert und zählen damit nicht nur zu den salzspezifischen, sondern auch zu den Proteinen der generellen Stressantwort (von Blohn *et al.*, 1997; Holtmann *et al.*, 2004). Dabei wurde für *opuE* eine transiente Aktivität des σ^B-Promotors nach einer plötzlichen Erhöhung der Osmolarität beobachtet, während die kontinuierliche Aktivität des σ^A-Promotors mit der externen Osmolarität korreliert (Spiegelhalter und Bremer, 1998). Die Aktivität des σ^A-Promotors des Gens *opuE* reicht aus, um die Akkumulation von Prolin unter hyperosmolaren Bedingungen zu gewährleisten (von Blohn *et al.*, 1997). Bis auf *opuB*, dessen Transkription durch sein Substrat Cholin stimuliert wird, wird keines der *opu*-Gene durch die Anwesenheit seiner Substrate verstärkt exprimiert (Holtmann *et al.*, 2004).

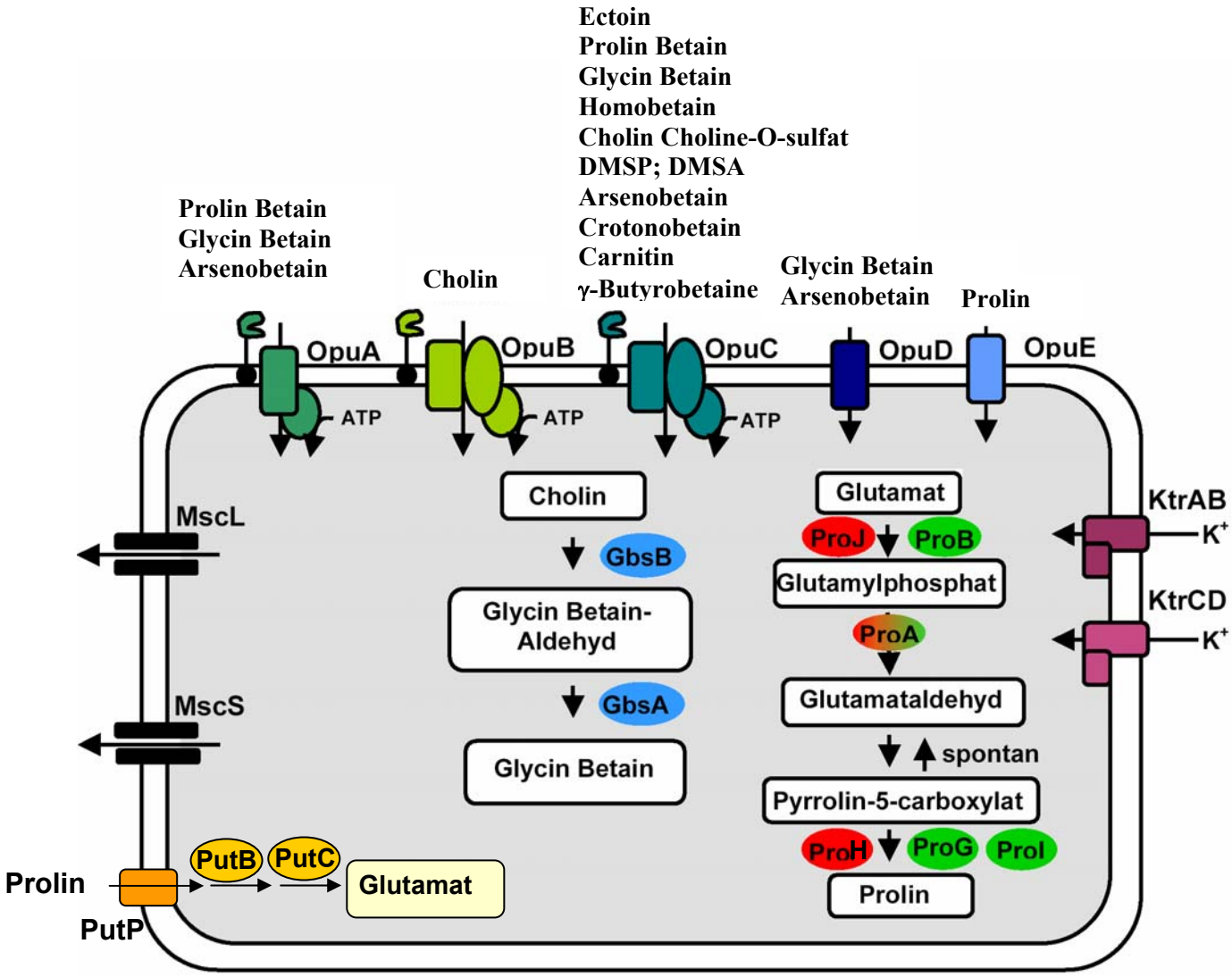


Abb.2: In die Adaptation an hyper- und hypoosmolare Wachstumsbedingungen involvierte Systeme in *B. subtilis* (verändert nach Bremer, 2002).

1.5 Die Vermittlung der osmotischen Regulation

Zellen sind in der Lage, osmotischen Stress qualitativ wie quantitativ wahrzunehmen und entsprechende Stressantworten einzuleiten. Für die Identität des ausschlaggebenden Signals bzw. der benötigten Sensoren, die die Osmostressantwort induzieren, gibt es bislang eine kontroverse Diskussion (Wood *et al.*, 2005).

Schon früher wurde vermutet, dass Proteine als Osmosensoren bzw. Osmoregulatoren fungieren, die osmotischen Stress wahrnehmen und bestimmte Regulationskaskaden auslösen (Hall und Silhavy, 1981; Kennedy, 1982). Es gibt u.a. die Hypothese, dass die Veränderung der Zellmorphologie als Folge hypersaliner Bedingungen (die Abnahme des Turgors, die Veränderung der Membranstruktur etc.) von bestimmten Sensorproteinen wahrgenommen und in eine Signalkaskade übersetzt wird, welche schließlich zur Induktion der osmoregulierten Gene führt (Poolman und Glaasker, 1998). Für die K^+-Transportsysteme Kdp und Trk in *E. coli* wurde vorgeschlagen, dass durch eine Abnahme des Turgors eine membranverankerte Kinase autophosphoryliert wird, die eine Signalkaskade auslöst, welche letztendlich zur Transkription der Transportergene führt (Csonka und Epstein, 1996; Jung *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass durch hypersaline Bedingungen nicht nur der Turgor abnimmt, sondern sich auch die Membran physikalisch verändert. Einigen Proteinen, die in die Aufnahme kompatibler Solute involviert sind, konnten osmosensorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Dazu gehören die Transporter BetP aus *C. glutamicum*, ProP aus *E. coli* und OpuA aus *Lactococcus lactis*. Rekonstitutionen dieser Proteine in Proteoliposomen wiesen eine osmotisch stimulierte Aktivität auf (Wood *et al.*, 2005). Nähere Untersuchungen von ProP aus *E. coli* in Proteoliposomen zeigen, dass die Wahrnehmung des osmotischen Reizes sowohl durch den C-Terminus als auch durch die durch Salzstress verursachte Veränderung der Phospholipidstruktur der Membran vermittelt wird (Tsatskis *et al.*, 2005).

Die K^+-Akkumulation scheint als Initialantwort eine Rolle für die später folgenden Reaktionen auf hyperosmolaren Stress zu spielen. In *B. subtilis* ist ohne die vorangegangene Anhäufung von K^+-Ionen keine Synthese von Prolin möglich; die Zelle stirbt (Whatmore *et al.*, 1990). Detailliertere Analysen ergaben allerdings, dass die transkriptionelle Induktion der Prolinsynthesegene *proHJ* auch ohne vorangegangene K^+- Aufnahme erfolgt. Erst die Translation von *proHJ* erfordert eine Kaliumakkumulation, da das Ribosom ein K^+-Ion in seinem aktiven Zentrum besitzt (Holtmann *et al.*, 2003). Kaliumglutamat hat sogar *in vitro* eine eher hemmende Wirkung auf die Transkription des *proHJ*-Operons (Brill, 2002). Auch konnte in *vivo* nachgewiesen werden, dass

die Induktion von *proU*, eines Transporters für die kompatiblen Solute Prolin und Glycin Betain aus *S. typhimurium* unabhängig ist von der internen Glutamatkonzentration (Csonka *et al.*, 1994).

Im Gegensatz dazu zeigten *in vitro* Analysen, dass das osmoregulierte Transportergen *proU* aus *E. coli*, durch Kaliumglutamat stimuliert exprimiert wird. In *E. coli* gibt es weiterhin Hinweise, dass Kaliumglutamat die Regulation des Gens *osmY* vermittelt. Unter nicht-induzierenden Bedingungen bindet die RNA-Polymerase so stark an die Promotorregion, dass eine Transkription unmöglich ist. Diese Promotorregion enthält ein spezielles, „Polymerase- fangendes" Element. Erst die Bindung des durch einen osmotischen Reiz akkumulierten Kaliumglutamats kann die Polymerase von der DNA lösen und so die Expression von *osmY* induzieren (Lee und Gralla, 2004).

In *Enterobacteria*ceae wie *E. coli* gibt es zwei grundlegende Theorien für die Induktion von hyperosmotisch regulierten Genen. Zum einen gibt es das Modell der „Turgor-Kontrolle", das die Abnahme des Turgors unter Hypertonie als Signal zur Aktivierung der Kaliumaufnahme, der ersten Phase der Osmoadaptation, vorschlägt. Der intrazelluläre Kaliumspiegel vermittelt dann als „second messenger" die Aktivierung der Gene der zweiten Phase (Epstein, 1986; Higgins *et al.*, 1987). Zum anderen gibt es das „Ionenstärke" – Modell, das den Wasserverlust und den damit einhergehenden Anstieg der cytoplasmischen Ionenkonzentration als primäres Signal vermutet (Poolman *et al.*, 2002). Es gibt Indizien für beide Modelle, wobei die Tatsache, dass in *S. typhimurium* nach einem Salzschock die transkriptionelle Induktion des Transportergens *proU* zeitlich vor der des Kaliumaufnahmesystems *kdp* stattfindet, mit keinem der beiden Modelle zu erklären ist (Balaji *et al.*, 2005).

Es gibt Zwei – Komponenten – Regulationssysteme (TCS), die möglicherweise eine Rolle bei der Induktion osmotischer regulierter Gene spielen. In *Listeria monocytogenes* wurde festgestellt, dass ein Stamm mit einem Defekt in dem TCS LisRK einen salzsensitiven Phänotyp besitzt (Sleator und Hill, 2005). In *C. glutamicum* konnte mit dem TCS MtrA-MtrB ein System identifiziert werden, das anscheinend in die transkriptionelle Induktion der Transportergene *betP, proP* und *lcoP* involviert ist (Möker *et al.*, 2004). In *B. subtilis* wurde für das TCS DegS-DegU gezeigt, dass es salzinduzierte Gene wie z.B. *wapA* kontrolliert (Kunst und Rapoport, 1995). Die Transkription von *degU* wird ebenfalls osmotisch stimuliert (Steil *et al.*, 2003). Auch alternative Sigmafaktoren könnten eine Rolle bei der Vermittlung der osmotisch kontrollierten Transkription spielen. Eine *B. subtilis* Nullmutante des alternativen Sigmafaktors σ^M kann unter Salzstress nicht

mehr wachsen (Thackray und Moir, 2003). Hierbei könnte es sich allerdings um einen unspezifischen Effekt handeln, ausgelöst durch die gestörte Zellwandstruktur dieser Mutanten (Bremer, 2002). In Eukaryonten wie *Alfalfa* und *Saccharomyces cerevisiae* spielen MAP-Kinasen eine Rolle als Signaltransduktoren bei der Vermittlung osmotischer Genregulation (Brewster *et al.*, 1993; Munnik *et al.*, 1999).

Andere Daten lassen eine zentrale Rolle der DNA-Topologie bei der Induktion von Stressantworten vermuten. So wurde gezeigt, dass in *B. subtilis* nach einem Hitzeschock sowie bei Sauerstoffmangel das negative DNA-supercoiling abnimmt, während es bei Kälte – oder Salzstress ansteigt (Krispin und Allmannsberger, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass in *B. subtilis* Gyrase-Mutanten die Osmotoleranz deutlich herabgesetzt ist (Alice und Sanchez- Rivas, 1997). Das Transkriptionsniveau des Gyrase-Gens *gyrA* steigt bei osmotischen Stress allerdings nicht an (Krispin und Allmannsberger, 1995). Es wurde gezeigt, dass in *E. coli* nach Zugabe des Gyrasehemmers Novobiocin die Transkriptionsraten der salzinduzierten Membranporin-Gene *ompF* und *ompC* (outer membrane protein) abnehmen. Gleichzeitig erwiesen sich bestimmte Proteine (OmpR und EnvZ) als essentiell für die osmotische Regulation von *ompF* und *ompC*. Daher wurde u.a. die Hypothese aufgestellt, dass durch äußere Faktoren die Topologie der DNA beeinflusst wird und damit eine Grundvoraussetzung für die Regulation von OmpC und OmpF geschaffen wird. Anscheinend wird nur aus dem Zusammenspiel zwischen DNA-Topologie und Regulatorproteinen eine flexible Stressantwort möglich (Graeme-Cook *et al.*, 1993).

Die Zellen müssen jedoch andere Signale wahrnehmen als nur die externe Salinität, denn die Supplementation eines hyperosmolaren Mediums mit z.B. Glycin Betain unterdrückt die Osmostressantwort vollständig (Brill, 2002).

Alles in allem konnte die Frage nach der Wahrnehmung von osmotischem Stress und die Vermittlung der Stressantwort bisher jedoch nicht zufriedenstellend beantwortet werden (Poolman *et al.*, 2002; Roberts, 2005).

1.6 Die Struktur σ^A-abhängiger Promotoren in *B. subtilis*

σ^A ist der vegetative Sigmafaktor der RNA-Polymerase in *B. subtilis* und somit für die Transkription der „housekeeping" Gene verantwortlich. Die Konsensussequenz σ^A-abhängiger Promotoren aus *B. subtilis* beinhaltet zwei konservierte Hexamere, die sogenannte -35 und -10 Regionen (TTGACA und TATAAT). Diese werden separiert durch einen Abstand von 17 Nukleotiden (Helmann, 1995). Viele Basen der Promotorsequenz sind sehr variabel und heterogen in den Promotoren zu finden, während einige wenige hochkonserviert und in bis zu 95% der Promotoren vorliegen (s.Abb.3). Die letzte Base der -10 Region ist in über 90% der Promotoren ein Thymidin. Tauscht man dieses Thymidin gegen ein Guanidin, so ist der Promotor inaktiv. Vermutlich hängt das mit der leichteren Aufschmelzung einer TA-Paarung im Gegensatz zu einer GC-Bindung zusammen (Helmann, 1995). Hervorzuheben ist neben den -35 und -10-Regionen ein TG-Dinukleotid an der Position -16, das in ca. 45% der σ^A-abhängigen Promotoren aus *B. subtilis* zu finden ist. In solchen Promotoren ist dieses Motiv ein essentielles Element, da seine Eliminierung zu einem dramatischen Verlust der Promotoraktivität führt (Voskuil und Chambliss, 1995, 2002). Eine Annäherung der Promotorsequenz in *B. subtilis* an die Konsensussequenz steigert die Promotoraktivität (Voskuil und Chambliss, 1995).

Es sind viele Mechanismen bekannt, die die Aktivität eines σ^A-abhängigen Promotors regulieren. Repressor- oder Aktivatorproteine können die Transkription eines σ^A-abhängigen Promotors beeinflussen. Die Bindestellen für diese Proteine können dabei stromauf- oder stromabwärts von der eigentlichen Promotorsequenz liegen. Mittlerweile sind auch andere Regulationsfaktoren von σ^A-abhängigen Promotoren bekannt, wie z.B. die Temperatur, Polymerase-fangende Elemente usw. (Repoila und Gottesmann, 2003; Lee und Gralla, 2004). Viele osmotisch regulierte Promotoren aus *B. subtilis* sind σ^A-abhängig, der Mechanismus ihrer Regulation konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

2. Die Aminosäure Glutamat

Glutamat ist neben seiner Funktion als proteinogene Aminosäure ein zentrales Metabolit, das in allen Domänen des Lebens für die Synthese anderer Aminosäuren eine große Rolle spielt.
In Säugetieren, insbesondere im Menschen, fungiert Glutamat als Neurotransmitter, der die Reizweiterleitung in den Synapsen vermittelt (Seal und Edwards, 2005).
Industrielle Bedeutung hat Glutamat in Form seines Natriumsalzes vor allen Dingen durch seine Anwendung als Geschmacksverstärker gewonnen. Im folgenden Abschnitt soll nun auf die Bedeutung von Glutamat in *B. subtilis* eingegangen werden.

2.1 Funktionen von Glutamat in *B. subtilis*

Glutamat ist als Aminosäure essentiell für die Proteinbiosynthese. In *B. subtilis* besitzt Glutamat daneben noch weitere Funktionen. So bildet Glutamat die zentrale Verknüpfung zwischen C- und N-Stoffwechsel. Die Glutamatsynthese wird sowohl von Rückkopplungen aus dem Stickstoff- wie aus dem Kohlenstoffwechsel kontrolliert (Wacker *et al.*, 2003). *B. subtilis* kann mit Glutamat als einziger Stickstoffquelle wachsen. Um allerdings als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt zu werden, wird eine katabole Glutamatdehydrogenase benötigt. Im Genom von *B. subtilis* gibt es zwei Gene, die für eine Glutamatdehydrogenase codieren: *rocG* und *gudB*. Die Transkription des Gens *rocG* wird nur durch Prolin, Arginin oder Ornithin induziert, aber nicht durch Glutamat. GudB ist durch eine Insertion von 9 bp funktionsunfähig. Beide Glutamatdehydrogenasen sind also unter Wachstumsbedingungen mit Glutamat als einziger Kohlenstoffquelle inaktiv. *B. subtilis* kann folglich -unter normalen Umständen- nicht mit Glutamat als einziger C- Quelle wachsen. Die Insertion in *gudB* ist jedoch relativ einfach wieder zu eliminieren, so dass durch eine Selektion mit Glutamat Mutanten isoliert werden können, die Glutamat als C- Quelle nutzen können (Belitsky und Sonenshein, 1998).
Neben seinen Funktionen im Metabolismus kann Glutamat bei exogener Zugabe in *B. subtilis* als Stressprotektivum dienen. So vermittelt Glutamat in *B. subtilis* einen nachweisbaren Wachstumsvorteil unter hyperosmolaren Bedingungen (Brill, 2002; Kerres, 2002). Es wurde nachgewiesen, dass Glutamat bei moderater Hypertonie das dominante, durch *de novo* Synthese akkumulierte kompatible Solut in *B. subtilis* ist. Erst bei höheren externen Osmolalitäten nimmt die Menge an akkumuliertem Glutamat ab und wird durch die via ProHJ erfolgende Synthese und Akkumulati-

on des potenteren Osmoprotektivums Prolin ersetzt (Brill, 2002). Es gibt allerdings auch *Bacilli*, die Glutamat als einziges Osmoprotektivum nutzen (Kuhlmann, 2002).
Das Wachstum von *B. subtilis* unter supraoptimalen Temperaturbedingungen (52°C) kann durch die Zugabe von Glutamat erheblich verbessert werden (Holtmann, 2003). Dabei zeigte der Vergleich mit anderen kompatiblen Soluten, dass das qualitativ relativ schwache Osmoprotektivum Glutamat *B. subtilis* zu den effizientesten Thermoprotektiva gehört (Holtmann und Holtmann *et al.*, 2004).

2.2 Die Synthese von Glutamat in *B. subtilis*

Die endogene Synthese von Glutamat erfolgt in *B. subtilis* ausschließlich mittels einer aus zwei Untereinheiten (GltA und GltB) bestehenden Glutamatsynthase (GOGAT). Diese katalysiert die Konversion von Glutamin und 2-Oxoglutarat in 2 Glutamat. Die Gene *gltA* und *gltB* werden als Operon transkribiert und unterliegen der Kontrolle des Transkriptionsaktivators GltC und des Repressors TnrA. GltC ist vermutlich für eine Rückkopplung des Glutamatauf- und abbaus zuständig (Belitsky und Sonenshein, 2004). TnrA vermittelt die Repression von *gltAB* durch das Endprodukt Glutamat (Belisky, 2002).
Glutamat und Glutamin spielen eine wichtige Rolle im N-Stoffwechsel von *B. subtilis*. Nahezu alle stickstoffhaltigen Moleküle im Metabolismus werden aus diesen beiden Substraten synthetisiert. Glutamat ist der hauptsächliche Stickstoffdonor der Zelle, d.h. der von außen aufgenommene Stickstoff wird bevorzugt zunächst in Glutamat fixiert. Dies ist am Beispiel von Ammonium, einer im Boden häufig genutzten Stickstoffquelle, im Detail untersucht. Wird Ammonium aufgenommen, so wird ein Molekül Glutamat mit einem Ammonium-Ion mit Hilfe der Glutaminsynthetase zu einem Molekül Glutamin umgewandelt. Aus einem Molekül Glutamin und 2-Oxoglutarat werden mit Hilfe der Glutamatsynthase zwei Moleküle Glutamat synthetisiert. Ein Molekül ist so für die weitere Ammonium-Aufnahme regeneriert, während ein weiteres Molekül Glutamat *de novo* entstanden ist, um in die Synthese anderer stickstoffhaltigen Metabolite einzufließen (s. Abb.3; Belitsky, 2002).

Besteht die Möglichkeit, exogenes Glutamat aufzunehmen, wird die Glutamatsynthese auf transkriptioneller Ebene inhibiert. Der verantwortliche Transkriptionsregulator ist GltC, der zur Aktivierung von *gltAB* benötigt wird und bei exogen angebotenem Glutamat inaktiv ist (Belitsky und Sonenshein, 2004). In manchen Organismen wird die Synthese von Glutamat ausgehend von

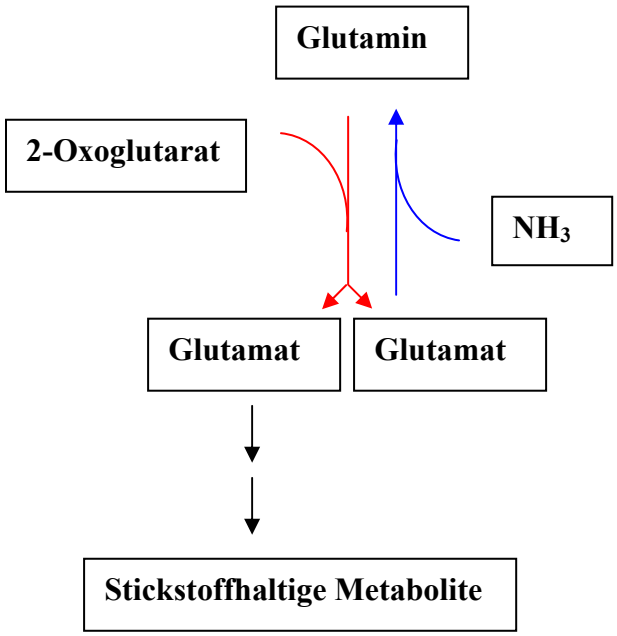
2-Oxoglutarat durch eine anabole Glutamatdehydrogenase vermittelt. *B. subtilis* besitzt kein solches Enzym (Belitsky, 2002).

2.3 Die Akkumulation von Glutamat unter hyperosmolaren Bedingungen via *de novo* Synthese

Die Analyse osmotisch gestresster Zellen verschiedener *Bacilli* und verwandter Genera zeigte, dass alle getesteten Organismen als Antwort auf hypertonische Bedigungen Glutamat durch *de novo* Synthese akkumulieren (Kuhlmann, 2002; Bursy, 2005). Allerdings wird neben Glutamat auch Prolin, Ectoin und Hydroxyectoin angehäuft. Die getesteten Organismen lassen sich unterteilen in Akkumulierer von I : ausschließlich Glutamat, II: Glutamat und Prolin, III: Glutamat und Ectoin, IV: Glutamat, Prolin und Ectoin und V: Glutamat, Ectoin und Hydroxyectoin (Kuhlmann, 2002). Glutamat scheint in dieser Reihe zwar das universellste, aber schwächste kompatible Solut zu sein. *Bacilli*, die nur Glutamat anhäufen (wie z.B. *Bacillus cereus*) können nur niedrige Salinitäten tolerieren, während die zusätzliche Akkumulation von Prolin (*B. subtilis*), Ectoin (*Bacillus alcalophilus*), Prolin und Ectoin (*Bacillus mojavensis*) oder Ectoin und Hydroxyectoin (*Bacillus clarkii, Salibacillus salexigens*) einen deutlichen Wachstumsvorteil unter hyperosmotischen Bedingungen darstellt (Bursy, 2005).

In Organismen wie *B. subtilis* wird Glutamat unter moderater Hypertonie angehäuft. Mit zunehmender externen Salinität wird weniger Glutamat, aber dafür mehr Prolin, ein potenteres kompatibles Solut, synthetisiert (Brill, 2002). Die Abnahme des Glutamatgehalts in den Zellen hängt dabei wahrscheinlich mit der Rolle von Glutamat als Substrat für die Prolinsynthese zusammen.

Eine solche hierarchisch strukturierte Synthese von kompatiblen Soluten ist ein verbreitetes Phänomen. Die *Bacillus* verwandte Spezies *Virgibacillus pantothenticus* z.B. akkumuliert unter hyperosmotischem Stress zunächst Prolin als dominantes kompatibles Solut. Offensichtlich reicht aber die durch Prolin vermittelte Protektion nur teilweise aus, um starken Salinitäten zu begegnen. Daher erfolgt in hochosmolarem Medium zusätzlich die Neusynthese von Ectoin (Kuhlmann, 2002). Bisher ist nicht endgültig geklärt, ob und wie die Glutamatsynthese unter hyperosmolaren Bedingungen in *Bacilli* induziert wird. Die von Kuhlmann (2002) und Brill (2002) durchgeführten Experimente in *B. subtilis* zur Glutamatgehaltbestimmung wurden in Medium mit Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle durchgeführt. Unter diesen Bedingungen entsteht Glutamat aus NH_4^+ und Glutamin. Diese Reaktion wird von der Glutamatsynthase GOGAT katalysiert. Die Gene *gltA* und *gltB*, die in *B. subtilis* für die Glutamatsynthase codieren, werden unter



Glutamat + NH_4^+ + ATP ↔ Glutamin + ADP + Pi

Glutaminsynthetase

Glutamin + 2-Oxoglutarat + NADPH + H^+ ↔ 2 Glutamat + $NADP^+$

Glutamatsynthase

Abb.3: Die Glutamat- und Glutaminsynthese mit Ammonium als Stickstoffquelle in *B. subtilis*.

Osmostress nicht induziert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivität der Glutamatsynthase bei einem Salzschock zurückgeht und sich erst wieder erholt, sobald sich die Zellen adaptiert haben (Höper *et al.*, 2005). Eine translationelle Aktivierung der GOGAT wurde bisher nicht untersucht. Es konnte eine weitere potentielle Glutamatsynthase in *B. subtilis* identifiziert werden, YerD. YerD weist eine zu 56,7% identische Aminosäuresequenz zu einer ferredoxinabhängigen Glutamatsynthase aus *Oceanobacillus iheyensis* auf. Das codierende Gen *yerD* steht unter der Kontrolle des Sigmafaktors σ^B, der die allgemeine Stressantwort in *B. subtilis* vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *yerD* unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen (10% NaCl) induziert wird. Weitere Analysen zeigten, dass eine *yerD*-Mutante unter Salzstress einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp besitzt. Dieser Phänotyp kann durch eine Supplementation mit Glutamat vollständig aufgehoben werden (Höper *et al.*, 2005).

Es wäre also denkbar, dass unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen die Glutamatsynthese via YerD verläuft.

3. Hitzestress in *B. subtilis*

3.1 Der Hitzeschock in *B. subtilis*

Mesophile Bakterien bevorzugen Wachstumstemperaturen zwischen 10 und 40°C (Seibert, 2004). Wird diese Temperatur plötzlich erhöht, so muss sich der Stoffwechsel innerhalb kürzester Zeit auf tiefgreifende Veränderungen einstellen. Dabei ist die drohende Denaturierung der Proteine die größte Gefahr für den Organismus.

In *B. subtilis* werden bei einem Hitzeschock drei Klassen von Hitzeschockproteinen (HSPs) aktiviert: NhrC-abhängige Proteine (Klasse I), die Proteine der generellen Stressantwort, deren Gene unter der Kontrolle des Sigmafaktors σ^B stehen (Klasse II) und die CtsR abhängigen Proteine (Klasse III). Weiterhin gibt es eine Reihe von Proteinen, die sich nicht in die ersten drei Klassen eingruppieren lassen und die bisher in Klasse IV zusammengefasst wurden (Schumann *et al.*, 2002).

Die Proteine der Klasse I werden von dem sogenannten HrcA-CIRCE-Mechanismus reguliert. CIRCE steht für „controlling inverted repeat of chaperone expression“ (Zuber und Schumann, 1994) und beschreibt ein Sequenzmotiv in der Promotorregion. Zu diesen Proteinen gehören u.a. die Chaperone DnaK und GroE, deren Gene durch einen Hitzeschock verstärkt exprimiert werden (Helmann *et al.*, 2001). Der Mechanismus der HrcA-CIRCE vermittelten Regulation basiert darauf, dass HrcE als Repressor für die Transkription von *dnaK* und *groE* fungiert, indem es an das CIRCE-Element bindet. Bei einer plötzlichen Temperaturerhöhung nimmt HrcA eine inaktive Form an; die Transkription kann in erhöhtem Maße stattfinden (Schumann *et al.*, 2002).

Zu der Klasse III, den CtsR-abhängigen Proteinen, gehören auch die Clp-Proteasen, die als Chaperone fungieren. In *B. subtilis* ist ClpC essentiell für das Wachstum unter Hitze- und auch unter Salzstress (Msadek *et al.*, 1994; Krüger *et al.*, 1994).
Ähnlich wie HrcA ist CtsR ein negativer Regulator, der unter Hitze instabil wird und so die Expression der betreffenden Gene freigibt (Derré *et al.*, 1999).

3.2 Adaptiertes Wachstum unter Hitzestress in *B. subtilis*

Das adaptierte Wachstum unter Hitze ist bei mesophilen Bakterien nicht so gut untersucht wie der Hitzeschock. Holtmann und Bremer (2003) analysierten das adaptierte Wachstum unter Hitze (52°C) im mesophilen Organismus *B. subtilis* und zeigten, dass viele der bekannten osmoprotektiven kompatible Solute wie Prolin oder Glycin Betain effektiven Schutz vor Thermostress bieten. Die Aufnahme aller getesteten Substanzen, bis auf Glutamat, verlief über die auch bei Osmostress genutzten Opu-Transportsysteme. Exogen angebotenes Glutamat hatte von den getesteten Supplementen die größte Wirkung auf das Wachstum bei Hitze. Dieser Effekt war vollkommen unabhängig von der Konversion von Glutamat zu Prolin (Holtmann, 2003).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass wie beim Wachstum bei niedrigen Temperaturen die generelle, durch den alternativen Sigmafaktor σ^B vermittelte Stressantwort in *B. subtilis* beim adaptierten Wachstum unter supraoptimalen Temperaturen konstitutiv angeschaltet ist (Holtmann *et al.*, 2004).

4. Die generelle Stressantwort in *B. subtilis*

Neben die für die jeweilige Stressart spezifische Adaptation besitzt *B. subtilis* ein Regulon, das bei einer ganzen Reihe von Stressarten zum Tragen kommt. Hierbei handelt es sich um das sogenannte σ^B-Regulon, das bei Hitze- und Salz-, aber auch bei Ethanol – und Kältestress etc. induziert wird (Hecker *et al.*, 1996; Price, 2002). Dabei überschneiden sich oft die spezifische und die generelle Stressantwort. So hat der osmotisch induzierte Transporter *opuE* z.B. sowohl einen σ^B- als auch einen σ^A-abhängigen Promotor und kann auch in einer *sigB*-Mutante immer noch Prolintransport für osmoprotektive Zwecke gewährleisten (von Blohn *et al.*, 1997).
Die Regulation erfolgt über die Aktivierung des Proteins σ^B, das wiederum die Transkription des Regulons einleitet. Unter normalen, nicht – induzierten Bedingungen wird σ^B von einem Anti-Sigmafaktor (RsbW) komplexiert und ist damit inaktiv. Der Anti-Sigmafaktor seinerseits wird unter Stress durch Komplexierung mit einem dephosphoryliertem Anti-Anti-Sigmafaktor (RsbV) inaktiviert und kann σ^B nicht mehr binden, womit die generelle Stressantwort in Gang kommt. Die Induktion von σ^B verläuft bei äußeren Signalen wie Osmo- und Ethanolstress über die RsbV-Phosphatase RsbU und bei inneren Signalen wie Nährstoffmangel und Stationärphase über das Isoenzym RsbP (Hecker und Völker, 2001).

Diese Regulation ist nicht unter allen Stressbedingungen gleich. So konnte gezeigt werden, dass der Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV bei der Hitzeinduktion des σ^B-Regulons umgangen werden kann (Holtmann *et al.*, 2004). Das σ^B-Regulon wird in der Regel nur transient angeschaltet und innerhalb kürzester Zeit nach Auftreten der Stresssituation wieder herunterreguliert. Adaptiertes Wachstum unter suboptimalen Temperaturen allerdings, ob Kälte oder Hitze, führen zu einer konstitutiven Anschaltung des Regulons (Brigulla *et al.*, 2003; Holtmann *et al.*, 2004).

5. Zielsetzung der Arbeit

B. subtilis synthetisiert *de novo* große Mengen des kompatiblen Solutes Prolin als Antwort auf hyperosmolare Wachstumsbedingungen. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Prolinsynthese für osmoprotektive Zwecke über den sogenannten ProHJ-Weg verläuft (Brill, 2002). Die Transkription der Strukturgene *proHJ* steht unter osmotischer Kontrolle. Ihre Stärke steht in enger Korrelation zur externen Salinität. In dieser Arbeit sollten die für die osmotische Regulation von *proHJ* essentiellen Determinanten identifiziert und charakterisiert werden.

Die Aminosäure Glutamat ist ein wirksames Osmo- und Thermoprotektivum in *B. subtilis* (Kerres, 2002; Holtmann, 2003). Es gibt fünf charakterisierte Aufnahmesysteme in *B. subtilis*, die die Aufnahme kompatibler Solute unter Salz- und Hitzestress katalysieren (OpuA bis OpuE) (Holtmann, 2003). Die Opu-Transporter sind nicht in der Lage, die Aufnahme von Glutamat zu vermitteln. Daher sollte in dieser Arbeit das für die Glutamataufnahme in *B. subtilis* verantwortliche Transportsystem identifiziert und charakterisiert werden.

Darüber hinaus sollten die stressprotektiven Eigenschaften anderer Aminosäuren neben Glutamat und Prolin analysiert werden.

III. Material und Methoden

1. Chemikalien und Reagenzien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen). Die Bestandteile von Komplexmedien stammten von Becton Dickinson (Augsburg). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von Amersham Biosciences (jetzt GE Healthcare, Freiburg), Fermentas (St. Leon-Rot), Eppendorf (Hamburg), Roche (Mannheim), Finnzymes (Espoo, Finnland) oder KMF Laborchemie (Lohmar) bezogen.

1.1 Verwendete kompatible Solute und Aminosäuren

Natrium-Aspartat und Natrium-Glutamatmonohydrat stammten von der Firma Merck. Sämtliche anderen Aminosäuren sowie Glycin Betain wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Konzentrationen der verwendeten Aminosäurestammlösungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:Verwendete L-Aminosäuren und kompatible Solute.

Aminosäure / kompatibles Solut	**Konzentration der Stammlösung (Lösungsmittel H_2O)**
Alanin	1 M
Arginin	10 mM
Asparagin	10 mM
Natrium-Aspartat	1 M
Cystein	10 mM
Glutamin	100 mM
Natrium-Glutamatmonohydrat	1 M
Glycin	1 M
Histidin	100 mM
Isoleucin	100 mM
Leucin	100 mM
Lysin	1 M
Methionin	166,66 mM
Phenylalanin	100 mM
Prolin	1 M
Serin	166,66 mM
Threonin	1 M
Tryptophan	10 mM
Tyrosin	2 mM*
Valin	100 mM
Glycin Betain	1 M

* in 1 x SMM

1.2 Radiochemikalien

[1-^{14}C]-Glycin Betain (55 mCi/mmol) stammte von American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, Mo, USA). L-[1-^{14}C]-Glutamat (45 mCi/mmol) wurde von DuPont (Boston, Ma, USA) und L-[1-^{14}C]-Aspartat (207 mCi/mmol) von GE Healthcare (Amersham Biosciences, Freiburg) bezogen.

2. Plasmide, Mikroorganismen und Oligonukleotide

Die Bezeichnung der Gene entspricht der von Bachmann (1990) vorgeschlagenen Nomenklatur.

2.1 Plasmide

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Quelle
pJMB1	Derivat von pMD476, Vektor geringer Kopienzahl (pACYC177 Replikationsursprung) mit promotorlosem *treA*, Amp^R Cm^R, *amyE* front und back	**M. Jebbar, unveröffentlicht**
pBKB143	Derivat von pJMB1, Vektor geringer Kopienzahl (pACYC177 Replikationsursprung) mit promotorlosem *lacZ*, Amp^R Cm^R	**B. Kempf, unveröffentlicht**
pBKS(-)	pBluescript ® II KS- Phagemid Vektor, ColE1-Derivat, Amp^R	**Stratagene, La Jolla**
pX	Vektor geringer Kopienzahl, Amp^R Cm^R, *amyE* front und back	**W. Schumann**
pJS35	Derivat von pJMB1, trägt *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)2 cat*]	**J. Brill, 2002**
pDG148	*E.coli* /*B.subtilis*-shuttlevektor mit *lac*-Promotor, Amp^R	**P. Graumann**
pADK2	pBKS(-)-Derivat, trägt *`gltP´*	**Kerres, 2002**
pMD1	pJMB1-Derivat, trägt *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$ mutM*1´*-treA)3 cat*]	**diese Arbeit**
pMD2	pJMB1-Derivat,trägt *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$ mutM2´-treA)4 cat*]	**diese Arbeit**
pMD3	pJMB1-Derivat,trägt *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$ mut1+2´-treA)5 cat*]	**diese Arbeit**
pMD4	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$ mutM5´-treA)6 cat*]	**diese Arbeit**
pMD5	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$ mutM4´-treA)7 cat*]	**Dolezal, 2002**
pMD6	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$ mutM7´-treA)8 cat*]	**Dolezal, 2002**
pMD7	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$ mutM6´-treA)9 cat*]	**diese Arbeit**

pMD8	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$ mutM3´-treA)*10 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD9	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$ mutM8´-treA)*11 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD10	pJMB1-Derivat,trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ mutM9´-treA)*12 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD12	pJMB1-Derivat,trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$mutM*10´*-treA)*14 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD13	pJMB1-Derivat,trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$mutM*11´*-treA)*15 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD14	pJMB1-Derivat,trägt *amyE*::[Φ*(proH$_{153}$mutM*12´*-treA)*16 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD15	pX-Derivat, trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ ´-proHJ)*1 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD16	pX-Derivat, trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ mutM5´-proHJ)*2 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD17	pX-Derivat, trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ mutM6´-proHJ)*3 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD18	pX-Derivat, trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ mutM7´-proHJ)*4 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD19	pX-Derivat, trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ mutM9´-proHJ)*5 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD20	pX-Derivat, trägt *amyE*::[Φ *(proH$_{153}$ mutM10´-proHJ)*6 *cat*]	**diese Arbeit**
pMD21	pDG148-Derivat; trägt *lac´- proA*	**diese Arbeit**
pMD22	pDG148-Derivat; trägt *lac´- proBA*	**diese Arbeit**
pMD23	pBKB143-Derivat; trägt [Φ (*proH$_{153}$´-lacZ erm*)1]	**diese Arbeit**
pMD24	pJMB1-Derivat, trägt [Φ *(proH$_{126}$´-treA*)17]	**diese Arbeit**
pMD27	pBKS$^-$-Derivat, trägt [(*´gltP´:: cat)*1]	**diese Arbeit**
pMD28	pX-Derivat, trägt *amyE*::[*gltT cat*]1	**diese Arbeit**
pMD29	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*B. li (proH$_{388}$´-treA)*1 *cat*]*	**diese Arbeit**
pMD30	pJMB1-Derivat, trägt *amyE*::[Φ*B. li (proH$_{130}$´-treA)2 cat*]*	**diese Arbeit**
pMD31	pJMB1-Derivat, trägt *amyE::* [Φ*(proH$_{153}$del1 ´treA)*17*cat*]	diese Arbeit
pMD32	pJMB1-Derivat, trägt *amyE::* [Φ*(proH$_{153}$del2´treA)*18 *cat*]	diese Arbeit
pMD33	pJMB1-Derivat, trägt *amyE::* [Φ*(proH$_{153}$del3´treA)*19 *cat*]	diese Arbeit
pMD34	pJMB1-Derivat, trägt *amyE::* [Φ*(proH$_{153}$del4´treA)*20 *cat*]	diese Arbeit

* Plasmid trägt Fragment aus *Bacillus licheniformis*

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 *Escherichia coli*-Stämme

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme aufgeführt. Bei allen Stämmen handelt es sich um Derivate von *E. coli* K-12.

Tabelle 3: *E. coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
DH5α	F⁻ λ⁻ E44 Δ*(argF-lac)* U169φ80*dlac*Δ*(lacZ)*M15 *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyr96 thi*-1 *relA*1	Hanahan,1983
MC4100	F⁻ λ⁻ *araD*139 Δ*(argF-lac)* U169 *deoC*1 *flb5301 rel A*1 *rpsL*150 *ptsF25 rbsR*	Casabadan, 1976
XL1Blue Epicurian®Coli	*recA*1 *endA*1 *gyrA96 thi*-1 *hsdR*17 *supE44 relA*1 *lac* [*F´proAB lacI*^{q} *Z*Δ*M15 Tn10* (TetR)][c]	Stratagene, La Jolla, USA

2.2.2 *Bacillus subtilis*-Stämme

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis*-Stämme aufgeführt.

Tabelle 4: *B. subtilis*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
168	*trpC2*	Kunst *et al*., 1997
M168	*trpC2*	Lorca *et al*., 2003
YveA⁻	M168 [*(yveA::neo)*]1	Lorca *et al*., 2003
SigH⁻	168 [*(sigH::cat)*1]	K. Kobayashi
JH642	*trpC2 pheA*1	BGSC[a],1A96
FSB1	JH642 [*(treA::neo)*1]	Spiegelhalter, 1998
TRB0	JH642 [*(treA::neo)*1 *amyE::(´treA cat)*1]	Spiegelhalter, 1998
ADB1	JH642 [*(gltP::neo)*1]	Kerres, 2002
ADB4	JH642 [*(gltT x* pUS19)1 (*spec*)]	Kerres, 2002
ADB5	JH642 [*(gltP::neo)*1*(gltT x* pUS19)1 (*spec*)]	Kerres, 2002
JSB36	JH642 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*2 *cat*]	Brill, 2002
JSB43	JH642 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-lacZ)*2 *cat*]	Brill, 2002

Stamm	**Beschreibung**	**Referenz/Quelle**
MDB6	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*3*cat*]	Dolezal, 2002
MDB7	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*4 *cat*]	Dolezal, 2002
MDB6a	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*3 *cat*]	diese Arbeit
MDB7a	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*4 *cat*]	diese Arbeit
MDB8	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*5 *cat*]	diese Arbeit
MDB9	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*6 *cat*]	diese Arbeit
MDB10	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*7 *cat*]	diese Arbeit
MDB11	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*8 *cat*]	diese Arbeit
MDB12	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*9 *cat*]	diese Arbeit
MDB13	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*10 *cat*]	diese Arbeit
MDB14	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*11 *cat*]	diese Arbeit
MDB15	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´treA)*12 *cat*]	diese Arbeit
MDB17	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*13 *cat*]	diese Arbeit
MDB18	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*14 *cat*]	diese Arbeit
MDB19	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´-treA)*15 *cat*]	diese Arbeit
MDB20	JH642 Δ(*proHJ::tet*)1 [*amyE::*(*proHJ cat*)1]	diese Arbeit
MDB21	JH642 Δ(*proHJ::tet*)1 [*(amyE::cat)*1]	diese Arbeit
MDB22	JH642 [*amyE::(proH$_{153}$´-proHJ cat*)1]	diese Arbeit
MDB23	JH642 [*amyE::cat)*2]	diese Arbeit
MDB24	JH642Δ(*proHJ::tet*)1 *amyE::*[*proH$_{153}$ mutM5´-proHJ cat*)2]	diese Arbeit
MDB25	JH642Δ(*proHJ::tet*)1 *amyE::*[*proH$_{153}$ mutM6´-proHJ cat*)3]	diese Arbeit
MDB26	JH642Δ(*proHJ::tet*)1 *amyE::*[*proH$_{153}$ mutM7´-proHJ cat*)4]	diese Arbeit
MDB27	JH642Δ(*proHJ::tet*)1 *amyE::*[*proH$_{153}$ mutM9´-proHJ cat*)5]	diese Arbeit
MDB28	JH642Δ(*proHJ::tet*)1 *amyE::*[*proH$_{153}$ mutM10´-proHJ cat*)6]	diese Arbeit

Stamm	**Beschreibung**	**Referenz/Quelle**
MDB29	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)1] pDG148	diese Arbeit
MDB30	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)1] pMD21	diese Arbeit
MDB31	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)*2*] pDG148	diese Arbeit
MDB32	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)*2*] pMD21	diese Arbeit
MDB33	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)*6*] pDG148	diese Arbeit
MDB34	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)*6*] pMD21	diese Arbeit
MDB35	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)1] pMD22	diese Arbeit
MDB36	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)*2*] pMD22	diese Arbeit
MDB37	JH642 Δ(*proHJ*::*tet*)1 *amyE*::[*(proHJ cat*)*6*] pMD22	diese Arbeit
MDB38	JH642 *amyE*::[Φ*(proH´- lacZ)2erm*]	diese Arbeit
MDB39	168 *(gltP::neo)*1	diese Arbeit
MDB40	168 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)	diese Arbeit
MDB42	M168 *(yveA::neo)*1 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)	diese Arbeit
MDB43	JH642 *(yveA::neo)*1	diese Arbeit
MDB44	JH642 *(yveA::neo)*1 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)	diese Arbeit
MDB47	JH642*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{126}$´-treA)*1*) cat*]	diese Arbeit
MDB50	JH642 *(sigH::cat)*1	diese Arbeit
MDB51	JH642 *(sigH::cat)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´lacZ)2erm*]	diese Arbeit
MDB52	JH642 (*gltP::cat*)1	diese Arbeit
MDB53	JH642 (*gltP::cat)*1 *(yveA::neo)*1	diese Arbeit
MDB54	JH642 (*gltP::cat)*1 *(yveA::neo)*1 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)	diese Arbeit
MDB55	JH642 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*) *amyE::*[*gltT cat*]1	diese Arbeit
MDB56	JH642 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*) *(amyE::cat)*1	diese Arbeit
MDB57	M168 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)	diese Arbeit

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
MDB58	JH642 *amyE::*[(*gltT cat)*1]	diese Arbeit
MDB59	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{B.li\ 388}$´treA)*15 *cat*]	diese Arbeit
MDB60	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{B.li\ 130}$´treA)*16 *cat*]	diese Arbeit
MDB61	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del1 ´treA)*17*cat*]	diese Arbeit
MDB62	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del2´treA)*18 *cat*]	diese Arbeit
MDB63	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del3´treA)*19 *cat*]	diese Arbeit
MDB64	JH642 *(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del4´treA)*20 *cat*]	diese Arbeit

2.2.3 Stämme anderer *Bacilli*

Tabelle 5: Stämme anderer *Bacilli.*

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
***Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42)**	Wildtypstamm	R. Borris
***Bacillus mojavensis* (DSM9205^T)**	Wildtypstamm	DSMZ
***Bacillus vallismortis* (DSM11031^T)**	Wildtypstamm	DSMZ
***Bacillus licheniformis* (DSM13^T)**	Wildtypstamm	DSMZ

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen) und biomers (Ulm) bezogen.

2.3.1 Zur gerichteten Mutagenese verwendete Oligonukleotide

In Tabelle 6 sind die zur ortsgerichteten Mutagenese von *proHJ* bzw. *cat* verwendeten Primer dargestellt. Die jeweilig eingeführten Mutationen sind unterstrichen. Eine Übersicht über die eingeführten Promotormutationen und die daraus resultierenden Stämme ist in Abb. 4 dargestellt.

Tabelle 6 : Zur ortsgerichteten Mutagenese verwendete Oligonukleotide

Mutagenese von *proHJ* aus *B. subtilis*	
Name	**Sequenz (5´→ 3´)**
1- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgaggtaacattttaaacgtgtgaaaatgcg
1- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaaatgttacctcgtgaggaaatgatgtc
2- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgtcgtaacattttaaacgtgtgaaaatgcg
2- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaaatgttacgacgtgaggaaatgatgtc
3- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgacgtaacattttaaacgtgtgaaaatgcg
3- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaaatgttacgtcgtgaggaaatgatgtc
4- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgtggtatcattttaaacgtgtgaaaatgcg
4- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaaatgataccacgtgaggaaatgatgtc
5- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgtggtaaaattttaaacgtgtgaaaatgcg
5- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaaatttaccacgtgaggaaatgatgtc
6- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgtggtataattttaaacgtgtgaaaatgcg
6- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaaattataccacgtgaggaaatgatgtc
7- MutHJ fwd	gacatcatttcctcacgtggtaacagtttaaacgtgtgaaaatgcg
7- MutHJ rev	cgcattttcacacgtttaaactgttaccacgtgaggaaatgatgtc
8- MutHJ fwd	ggccttcaaacttgacattttcctcacgtggtaacattttaaacg
8- MutHJ rev	cgtttaaaatgttaccacgtgaggaaaatgtcaagtttgaaggcc
9- MutHJ fwd	ggccttcaaacttgacatcatttcctcatcgtggtaacattttaaacg
9- MutHJ rev	cgtttaaaatgttaccacgatgaggaaatgatgtcaagtttgaaggcc
10- MutHJ fwd	ggccttcaaacttgacatcatttttcctcacgtggtaacattttaaacg
10- MutHJ rev	cgtttaaaatgttaccacgtgaggaaaaatgatgtcaagtttgaaggcc
12- MutHJ fwd	ggccttcaaacttgacatcatttttcctcacgtggtataattttaaacg
12- MutHJ rev	cgtttaaaattataccacgtgaggaaatgatgtcaagtttgaaggcc
13- MutHJ fwd	ggagatgttaccgatctgtgattaacagaaagtagccttatagg
13- MutHJ rev	cctataaggctactttctgttaatcacagatcggtaacatctcc
14- MutHJ fwd	gcgaacaaaggagatgttaccgatcagaaagtagcctttataggagc
14- MutHJ rev	gctcctataaaggctactttctgatcggtaacatctcctttgttcgc
proHJ del 1 fwd	ctcacgtggtaacattttaaacgtgtgaaaatgcggaacaaaggagatggtaccgatctttgatcaaaag

proHJ del 1 rev	cttttgatcaaagatcggtaacatctcctttgttccgcattttcacacgtttaaaatgttaccacgtgag
proHJ del 2 fwd	cattttaaacgtgtgaaaatgcgaacaaaccgatctttgatcaaaagaaagtagcctttatagg
proHJ del 2 rev	cctataaaggctactttcttttgatcaaagatcggtttgttcgcattttcacacgtttaaaatg
proHJ del 3 fwd	gcgaacaaaaaagcgaacaaaggagatgttaccaaaagaaagtagcctttataggagcaggatctatg
proHJ del 3 rev	catagatcctgctcctataaaggctactttcttttggtaacatctcctttgttcgctttttgttcgc
proHJ del 4 fwd	caaaggagatgttaccgatctttgatcaaaagaaataggagcaggatctatggcggaaggaatgatatc
proHJ del 4 rev	gatatcattccttccgccatagatcctgctcctatttcttttgatcaaagatcggtaacatctcctttg
Mutagenese des *cat*-Gens im Plasmid pBKB143	
Name	**Sequenz (5´→ 3´)**
cat-mut fwd	gataaaaatttaggaggcatatcaacagaactttgaataaaattgatttagacaattgg
cat-mut rev	ccaattgtctaaatcaattttattcaaagttctgttgatatgcctcctaaatttttatc

Tabelle 7: Primer aus dem Bereich des *proHJ*-Operons aus *B. subtilis*

Name	**Sequenz (5´→ 3´)**	**Beschreibung**
***Pvu*II-*proHJ* fwd**	ggaattccagctggaaacaatacaaatcaataatggcc	5´-Bereich von *proHJ*, fügt *Pvu*II Schnittstelle ein
***Pvu*II-*proHJ* rev**	ggaattccagctggcttgcgccttccgcg	3´-Bereich von *proHJ*, fügt *Pvu*II Schnittstelle ein
proHJ3-JS6 Bio	tccgccatagatcctgctcc	5´ biotinyliert; 5´- Bereich von *proHJ* Promotor (153 bp stromaufwärts vom Translationsstart)
proHJ5-JS17Bio	gtcgaaaagaaacaatacaaatc	5´ biotinyliert ; 3´- Bereich von *proHJ* Promotor (1 bp stromaufwärts vom Translationsstart)
Cy5proHJ3-JS6	tccgccatagatcctgctcc	5´Cy5; 5´- Bereich von *proHJ* Promotor (153 bp stromaufwärts vom Translationsstart)
Cy5proHJ5JS17	gtcgaaaagaaacaatacaaatc	5´Cy5; 3´- Bereich von *proHJ* Promotor (1 bp stromaufwärts vom Translationsstart)

Tabelle 8.: Zur Sequenzierung verwendete, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide

Name	**Sequenz (5´→ 3´)**	**Beschreibung**
M13 fwd	gtaaaacgacggccagt	5´Bereich von *lacZ*
pJMB1 IRD	ataagggtaactattgccg	pJMB1, stromaufwärts von *treA* und *Sma*I-Schnittstelle
treA IRD	accatttcctgtcgtatcg	pJMB1, stromabwärts von *treA* und *BamH*I-Schnittstelle

Tabelle 9.: Primer aus dem Bereich des *proBA* Operons aus *B. subtilis*

Name	**Sequenz (5´→ 3´)**	**Beschreibung**
***Sal*I-*proA* fwd**	gcgcgcggtcgacgctaaaggcaaacgcagtgacg	5´-Bereich von *proA,* fügt *Sal*I-Schnittstelle ein
***Sal*I-*proBA* fwd**	gcgcgcggtcgacttgtagaagagccgcggagg	5´-Bereich von *proBA,* fügt *Sal*I-Schnittstelle ein
***Sph*I-*proBA* rev**	gcgcggcatgcggctctcggtgtccccggc	3´-Bereich von *proB,* fügt *Sph*I Schnittstelle ein

Tabelle 10: Zur Herstellung von Northern-Sonden verwendete Primer.

Name	**Sequenz (5´→ 3´)**	**Beschreibung**
yveA No fwd	gattcgcctaccatttccggctgg	Stromaufwärts gelegener Bereich von *yveA*
yveA Norev	taatacgactcactatagggaggccaaagc-gaagcgcggggtgtcc	Stromabwärts gelegener Bereich von *yveA*, führt T7-Promotor ein
yhfH No fwd	ttggttatgctggggaaaatcacag	Stromaufwärts gelegener Bereich von *yhfH*
yhfH No rev	taatacgactcactatagggaggcaaatcgtttacttttta-tacagtcattgcag	Stromabwärts gelegener Bereich von *yhfH*, führt T7-Promotor ein
gltP5-ADK1	taatacgactcactatagggagggataccacgata-caggcgatcgc	Stromabwärts gelegener Bereich von *gltP*, führt T7-Promotor ein
gltP3-ADK2	atcggcgtgttagccctgatggc	Stromaufwärts gelegener Bereich von *gltP*
gltT5-ADK1	gccattattctcggactagccc	Stromaufwärts gelegener Bereich von *gltT*
gltT3-ADK2	taatacgactcactatagggaggtccatgatacgcg-gaagaaccg	Stromabwärts gelegener Bereich von *gltT*, führt T7-Promotor ein
proHJ-Sonde M fwd	gagcggcggcggagaagcg	interner Bereich von *proHJ*
proHJ-Sonde M rev	taatacgactcactatagggagggctgcgagcgtat-cattgtcg	interner Bereich von *proHJ* , führt T7-Promotor ein

Tabelle 11: Oligonukleotide aus dem *proHJAA*-Bereich von *B. licheniformis*

Name	Sequenz (5´→ 3´)	Beschreibung
B.li 388 Sma-proHJAA treA	aggcccgggttcgacaagcttgcaac	388 bp stromaufwärts von *proH* gelegener Bereich, enthält *Sma*I-Schnittstelle
B.li 130 Sma-proHJAA treA	cgccccgggcaaacttgacataatgatctaaagtg	130 bp stromaufwärts von *proH* gelegener Bereich, führt *Sma*I-Schnittstelle ein
B.li Bam-proHJAA treA	cgcggatcctgatcccgcccctataaaagctacg	*proH* Startcodon, führt *Bam*HI Schnittstelle ein

Name	Sequenz (5´→ 3´)	Beschreibung
B.li proH PE_1	ggattgaacgatgcctgagatcattccc	5´IRD 800, stromabwärts von *proH* gelegener Bereich
B.li proH PE_2	gccattgatcccgcccctataaaagc	5´IRD 800, stromabwärts von *proH* gelegener Bereich

Tabelle 12: Oligonukleotide aus dem *Bereich des cat*-Gens

Name	Sequenz (5´→ 3´)	Beschreibung
HindIII-Cm fwd	gcggcgaagcttctcatgtttgacagcttatcatcggc	Stromaufwärts von *cat* gelegener Bereich, führt *Hind*III-Schnittstelle ein
HindIII-Cm rev	ggccgcgaagcttcaaggaatggtgcatgcaaggagatggc	Stromabwärts von *cat* gelegener Bereich, führt *Hind*III-Schnittstelle ein

3. Medien und Zusätze

3.1 Vollmedien

Als Vollmedien wurden Luria-Bertani (LB) und Double-Yeast Trypton (DYT) wie beschrieben verwendet (Miller, 1992; Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung der Festmedien wurde pro Liter 17g Agar zugegeben. Die eingewogenen Substanzen wurden mit destilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

3.2 Minimalmedien

Als definiertes Minimalmedium für *B. subtilis* diente Spizizen´s Minimalmedium (SMM) (Spizizen, 1958) mit zusätzlichen Spurenelementen (Haarwood & Archibald, 1990). Als C-Quelle wurde 0,5% Glucose zugefügt. Zur Komplementation zweier Auxotrophien des *B. subtilis*-Stammes JH642 (*trpC2 pheA*1) und seiner Derivate wurde dem Medium Tryptophan (18 mg/l) und Phenylalanin (20 mg/l) zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurden pro Liter 17g Agar zugesetzt.

3.3 Medienzusätze und Antibiotika

Sterile Zusätze und Antibiotika wurden den autoklavierten und auf 50°C abgekühlten Medien zugesetzt.
Die in Tabelle 4 angegebenen Antibiotikakonzentrationen wurden sowohl in Flüssig- als auch in Festmedium verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Antibiotikakonzentrationen zur Selektion von *B. subtilis* und *E. coli*.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration für *B. subtilis*	Endkonzentration für *E. coli*
Ampicillin	H_2O	----------	100 µg /ml
Chloramphenicol	Ethanol	5 µg /ml	----------
Spectinomycin	H_2O	60 µg /ml	100 µg /ml
Erythromycin	H_2O	1 µg /ml	----------
Lincomycin*	H_2O	15 µg /ml	----------
Tetracyclin	Ethanol	5 µg /ml	15 µg /ml

***** nur zusammen mit Erythromycin verwendet

4. Mikrobiologische Methoden

4.1 Sterilisation

Medien und Lösungen wurden 20min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2µM Porengröße, Roth). Die Sterilisation von Glaswaren erfolgte 3 h bei 180°C.

4.2 Wachstumsbedingungen zur Vermehrung von Bakterien

Alle Kulturen wurden aerob bei 37°C gezogen. Kleine Volumina bis 10ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Roller inkubiert. Größere Volumina wurden in Erlenmeyerkolben bei 220rpm geschüttelt. Wachstumsexperimente bei hohen Osmolalitäten wurden folgendermaßen durchgeführt: 5 ml 1xSMM wurde mit Kolonien von Platte angeimpft und über Tag wachsen gelassen. Mit dieser Kultur wurde eine Übernachtkultur in 1xSMM (20 ml) angeimpft, mit der am nächsten Morgen die Hauptkultur angesetzt wurde. Hierbei wurde die Osmolalität des vorgelegten SMM mit NaCl so erhöht, dass nach dem Inokulieren mit der Übernachtkultur die gewünschte Endosmolalität erreicht wurde.
Für Wachstumsexperimente bei 52°C wurde mit exponentiell wachsenden Vorkulturen (gezogen bei 37°C) angeimpft und innerhalb von 10 bis 15min von 37°C auf 52°C erwärmt. Das weitere Wachstum wurde bei 52°C verfolgt.
Für Wachstumsexperimente bei 15°C wurde mit exponentiell wachsenden Vorkulturen (gezogen bei 37°C) Medium bei Raumtemperatur angeimpft. Diese Hauptkultur wurde dann in ein auf 15°C temperiertes Wasserbad gestellt und dort das weitere Wachstum verfolgt.

Festmedien wurden zunächst ca. 1 - 2 h bei 42°C getrocknet und dann mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse, sterilen Glaspipetten oder sterilen Glaskugeln beimpft. Die beimpften Platten wurden dann im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.3 Ermittlung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur (OD) erfolgte photometrisch (LKB Ultraspec®2000, Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm mit dem unbeimpften Wachstumsmedium als Blindwert. Bakteriensuspensionen ab einer OD_{578} von 0,5 wurden mit dem entsprechenden Wachstumsmedium verdünnt gemessen. Eine auf diese Weise ermittelte optische Dichte OD_{578} von 1 entspricht einer Zelldichte von etwa $1 \cdot 10^9$ Zellen / ml (Sambrook *et al.*, 1989).

5. Genetische und molekularbiologische Methoden

5.1 Präparation von DNA und Gesamt-RNA

5.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) angewandt. Plasmid DNA, die zur Transformation eingesetzt werden sollte, wurde über das QIAGEN Plasmid-Midi-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert.

5.1.2 Präparation chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *B. subtilis* wurde aus 10 ml Kultur mit Hilfe von DNA-bindenden Säulen (tip-20, QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert.

5.1.3 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *B. subtilis* und *B.licheniformis* wurde aus exponentiell wachsenden (OD_{578} 0,8-1) Zellen isoliert. Die Zellen wurden in SMM unter den jeweils angegebenen Bedingungen gezogen und beim Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurden 20 ml der Kultur mit 20 ml eiskaltem Killing Buffer (20mM TrisHCl pH 7,5; 20mM NaN_3 und 5mM $MgCl_2$) versetzt und für 10min bei 4°C und 3000 *g* abzentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gekühlt und anschließend in einem Membrandisruptor 2min bei 2600rpm mit Hilfe einer Teflonkugel zerkleinert. Das so entstandene Zellpulver wurde dann in 4ml Lysispuffer (4M Guanidinthiocyanat, 25mM Natriumacetat pH 5,2 und 0,5% N-Lauroylsarcosin), vorgewärmt auf 50°C, aufgenommen und auf 4 Eppendorfcups à 1 ml aliqotiert. Jedes Cup wurde mit 1 ml saurem Phenolmix versetzt (Phenol pH 4,5-5:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) und die Suspension wurde für 5min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 21000 *g* beschleunigt und die Phenolextraktion wurde mit der wässrigen Phase (ca. 800µl) wiederholt. Danach wurde die wässrige Phase mit Chloroform:Isoamylakohol (24:1, v/v) versetzt und 5min geschüttelt. Die Suspension wurde ebenfalls zur Phasentrennung zentrifugiert, die wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumen einer 3M-Natriumacetatlösung (pH 5,2) versetzt und die RNA wurde mit 2,5 Volumen 100%igem Isopropanol präzipitiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 10000 *g* wurde die erhal-

tene RNA mit 70% Ehanol gewaschen. Das RNA Pellet wurde dann in 30µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

5.2. Analyse von Gesamt-RNA durch Northerntransfer und -hybridisierung

5.2.1 Herstellung der antisense RNA-Sonden

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Sonden handelte es sich um einzelsträngige DIG-markierte RNA Sonden. Die Sonden wurden über *in vitro*-Transkription unter Verwendung des „StripEZ-T7 RNA kit" (Ambion, Austin, Tx, USA) hergestellt. Als Matrize für die *in vitro* Transkription dienten PCR-Produkte, die eine T7 Promotorsequenz trugen. Die Orientierung des T7-Promotors wurde so gewählt, dass antisense-Sonden generiert wurden (s. Tabelle 10). Als DIG-markiertes Nukleotid wurde DIG 11-UTP (Roche, Mannheim) in die Sonde eingebaut. Die Matrize wurde nach der Transkriptionsreaktion durch einen DNase-Verdau entfernt.

5.2.2 RNA-RNA Hybridisierung (Northern Blot)

Für den Northern-Transfer wurden 5-15µg RNA (die entsprechende Menge ist im Ergebnisteil angegeben) und 4µg peqGOLD High Range RNA-Leiter (peqlab, Erlangen) in 10mM MOPS pH 7 mit 50% Formamid und 6,5% Formaldehyd 5 min bei 70°C denaturiert und in einem 1,4%-igen Agarosegel in 10mM MOPS pH 7 für etwa 3 h elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nylon-Membran (Nytran® 0,45; Schleicher&Schuell, Dassel) erfolgte über Nacht (12-16 Stunden) mit 10xSSC (Sambrook *et al.*, 1989). Danach wurde die RNA mit Hilfe von UV-Licht (Stratalinker® 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Markerspur wurde abgeschnitten und die Banden wurden durch Färben in Methylenblau (0,005% in H_2O) sichtbar gemacht. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte circa 16 h in 5xSSC, 50% Formamid, 2% Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) 7% SDS und 0,1% Lauroylsarcosin). Anschließend wurde die Membran zweimal 5min bei 70°C in 2xSSC und 0,1% SDS und zweimal 15min bei 70°C in 0,2xSSC und 0,1% SDS gewaschen. Die weiteren Waschschritte erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989). Die Transkripte wurden auf einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences, Freiburg) mit 0,3-1ml ECF-Vista (Amersham Biosciences, Freiburg) als Substrat detektiert. Zur Verarbeitung der Daten, insbesondere zur Quantifizierung der Transkriptmengen, wurde die Image Quant™-Software von Molecular Dynamics, Inc. verwendet.

5.3 Analyse von DNA durch Southerntransfer und -hybridisierung

5.3.1 Herstellung der DNA-Sonden

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Southern Blot-Sonden handelte es sich um doppelsträngige DIG-markierte DNA Sonden, die mittels PCR hergestellt wurden. Als DIG-markiertes Nukleotid wurde DIG 11-UTP (Roche, Mannheim) in die Sonde eingebaut.

5.3.2 DNA-DNA Hybridisierung (Southern Blot)

Für den Southern-Transfer wurden 5-10µg DNA (die entsprechende Menge ist im Ergebnisteil angegeben) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen über Nacht verdaut. Diese Verdaue wurden zusammen mit 7µl DIG-DNA-Marker VII (Roche, Mannheim) auf 1%-igen

Agarosegel in 1xTAE über Nacht bei 30V elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nylon-Membran (Nytran® 0,45; Schleicher&Schuell, Dassel) erfolgte mit Hilfe einer Vakuumblotanlage (VacuGene™ XL, Pharmacia LKB) bei 70-80mbar Unterdruck. Dabei wurde das Gel zur Depurinierung zunächst 30min mit 0,25M HCl behandelt. Danach erfolgte die Neutralisierung mit 0,5M NaOH und 1,5M NaCl (30min). Anschließend wurde die DNA mit 1M Ammoniumacetat auf die Membran transferiert (1h). Nach dem Transfer wurde die DNA mit Hilfe von UV-Licht (Stratalinker® 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert.
Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte circa 16 h bei 68°C in 5xSSC, 50% Formamid, 2% Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) 7% SDS und 0,1% Lauroylsarcosin). Anschließend wurde die Membran zweimal 10min bei 68°C in 2xSSC und 0,1% SDS und zweimal 25min bei 68°C in 0,1xSSC und 0,1% SDS gewaschen. Die weiteren Waschschritte erfolgten nach den Angaben des „DIG-System User´s Guide“ (Roche). Die DNA-Fragmente wurden auf einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences, Freiburg) mit 0,3-1 ml ECF-Vista (Amersham Biosciences, Freiburg) als Substrat detektiert. Zur Verarbeitung der Daten, insbesondere zur Quantifizierung der Transkriptmengen, wurde die Image Quant™-Software von Molecular Dynamics, Inc. verwendet.

5.4 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde photometrisch (Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) durch die Messung der Absorption bei 260 und 280nm bestimmt. Eine A_{260} von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Der Quotient der Absorptionen bei 260nm (DNA) und 280nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

5.5 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerprotokoll (Quiagen).

5.6 Klonierungstechniken

5.6.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte in 20-50µl Gesamtvolumen mit 100-500ng DNA. Die Auswahl der Puffer sowie die Menge der eingesetzten Restriktionsendonukleasen, Reaktionstemperaturen und Reaktionszeiten entsprachen den Empfehlungen der Hersteller (Amersham Pharmacia, Freiburg bzw. Fermentas, St. Leon-Rot). Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte anschließend durch die Auftrennung in Agarosegelen.

5.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in 20µl Gesamtvolumen. Die Auswahl der Puffer, die Menge der eingesetzten Fragmente und Ligasen entsprachen den Angaben der Hersteller (Amersham Pharmacia, Freiburg; Roche, Mannheim; Fermentas, St. Leon-Rot).

10µl des Ligationsansatzes wurden in einer Dialyse entsalzt; hierzu wurden Membranfilter mit einer Porengröße von 0,02µM (Typ VS, Millipore, Schwalbach) verwendet und mittels Elektroporation in *E.coli*-Zellen eingebracht (s. Abschnitt 5.6.2).

5.6.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Restriktionsfragmenten erfolgte für 1-2 h bei 100-120V unter Verwendung von 0,6-1,8%igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Die Gele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend mit dem Videodokumentationssystem der Firma intas (Göttingen) fotografiert.

5.6.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mittels PCR mit dem EasyStartKit 100 der Firma Molecular Bio Products (San Diego) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die verwendeten DNA-Polymerasen stammten von der Firma Eppendorf (Taq), der Firma KMF Laborchemie (AmpliqonIII) und der Firma Finnzymes (Dynazyme ext, Phusion).

5.7 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden nach Sanger (1977) mit der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode durchgeführt. Dazu wurde der „Thermo Sequenase Fluorescent-labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-GTP" (Amersham Pharmacia) bzw. der Cycle Auto Reader Sequencing Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet. In die Sequenzreaktion wurden 1-2pmol des am 5´-Ende mit fluoreszierendem IRD800 markierten Oligonukleotid (MWG) und 50-100ng der Matrizen-DNA eingesetzt. Gelelektrophorese und Detektion der Reaktionsprodukte erfolgten mit einem Li-COR DNA-Sequencer Modell 4000 (MWG). Die Sequenzgele wurden aus Sequagel XR ultra pure und Sequagel complete ultra pure (Biozym) nach Angaben des Herstellers gefertigt. Zum Einlesen des Gellaufes und zur anschließenden Ermittlung der Sequenz wurde die Base ImageIR™-Software von MWG verwendet.
Jedes sequenzierte DNA-Fragment wurde in Stromauf- und Stromabwärtsrichtung analysiert.

5.8 Transformation von Bakterien

5.8.1 Transformation von *B. subtilis*

Für die Transformation von *B. subtilis* wird die in der stationären Phase auftretende natürliche Kompetenz ausgenutzt. Es wurde die „High Salt / Low Salt"-Methode angewendet (Harwood und Cutting, 1990), mit der Abwandlung, dass mit Bakterienkolonien von LB-Platten gearbeitet wurde.
Die transformierten DNA- Mengen variierten zwischen 0,5 und 5 µg. Plattiert wurde auf Selektionsplatten mit den angegebenen Antibiotika-Konzentrationen für *B. subtilis.*

5.8.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E.coli* wurde jeweils ein Aliquot des gewünschten Plasmids bzw. des dialysierten Ligationsansatzes (s. Abschnitt 5.2.2) über Elektroporation (Gene-Pulser, Bio-

Rad) in 40µl elektrokompetente Zellen eingebracht. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen („Bacterial electrotransformation and pulse controler manual. Version 1.0“).

5.9 Ortsgerichtete Mutagenesen

Zur gezielten Einführung ortsgerichteter Mutagenesen wurde der QuikChangeMutagenesis-Kit (Stratagene, La Jolla) nach Herstellerangaben verwendet. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5 dargestellt.

5.10 Computeranalysen

Datenbankvergleiche mit bekannten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) am National Center for Biotechnology Information (NCBI) über das World Wide Web (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt.
DNA-Sequenzanalysen wurden unter Verwendung des Programmpaketes Lasergene der Firma DNAStar (DNAStarLtd, London, UK) bzw. mit der Software „VectorNTI“ der Firma InforMax durchgeführt.

5.11 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brillantblau R250 in Lösung von 465 nm auf 595 nm durch Bindung von Protein. Die Bestimmung erfolgte mit dem BioRad Microassay (BioRad, München) mit Rinder-Serumalbumin als Standard. Dazu wurden 0,8 ml Probe oder Standard (0-20 µg) mit 0,2 ml BioRad-Reagenz versetzt, und die Absorption der Lösung bei 595 nm nach 15minuten Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt.

5.12 Electrophoretic mobillity shift assay (EMSA)

Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde mit Hilfe der Cy5-markierten Oligonukleotide Cy5-proHJ3-JS6 und Cy5-proHJ5-JS17 das 153bp große, regulatorische Fragment des *proHJ*-Operons in einer PCR amplifiziert (DynaZyme EXT Polymerase, Finnzymes). Parallel dazu wurden Zellen von *B. subtilis* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gezogen, in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (0,8-1) durch Zentrifugation geerntet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zellpellets wurden in 1ml Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7) mit 2,5mM Benzamidin und 0,3mg/ml PMSF als Proteasehemmer resuspendiert.
Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press. Es folgte die Proteingehaltbestimmung der erhaltenen Zellextrakte.
In jedem Ansatz wurden der Zellextrakt (150µg Protein) und 10µl des Cy5-markierten PCR-Fragmentes in DNA-Bindepuffer (10mM TrisHCl pH 7,5; 50mM KCl, 1mM Na_2-EDTA, 5% Glycerin, 50 µg/ml BSA; Filée *et al.*, 2001) inkubiert (30min, 37°C). Als Negativkontrolle diente eine Probe, die ohne Zellextrakt inkubiert wurde. Anschließend wurden die Proben auf ein TAE-Polyacrylamidgel aufgetragen (10% Acrylamid) und in 1 x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (40mA, 200V), s. auch Abschnitt 5.10.1). Das Gel wurde dann auf einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences) gescannt (Red Fluorescence) und die erhaltenen Daten mit Hilfe der Image Quant^{TM}-Software (Molecular Dynamics, Inc.) ausgewertet.

6. Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

6.1 Plasmidkonstruktionen

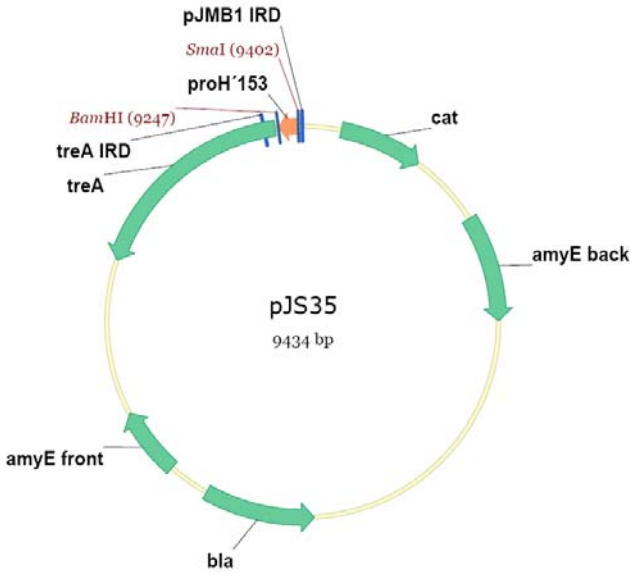


Abb.5: Das Plasmid pJS35.

pMD1: Das Plasmid pJS35 (pJMB1-Derivat mit Fusion des osmoregulierten 153bp-Promotorfragmentes des *proHJ*-Operons vor dem Reportergen *´treA)* wurde mit Hilfe des QuikChangeMutagenesis-Kits (Stratagene) in der -10 Region mutiert (Mutation M1), s.Abb. 4. Hierfür wurde das Primerpaar 1- MutHJ verwendet (s. 5.8). Die mutierten Plasmide wurden in *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert, dort zum Ring geschlossen und amplifiziert. Die Selektion erfolgte auf LB/Amp-Platten. Aus den erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide präpariert und die Mutationen durch Sequenzierungen verifiziert.

pMD2: Analog zu pMD1, mit Mutation M2 (Primer 2-MutHJ).

pMD3: Analog zu pMD1, mit Mutation M3 (Primer 3-MutHJ).

pMD4: Analog zu pMD1, mit Mutation M5 (Primer 5-MutHJ).

pMD7: Analog zu pMD1, mit Mutation M6 (Primer 6-MutHJ).

pMD8: Analog zu pMD1, mit Mutation M7 (Primer 7-MutHJ).

pMD9: Analog zu pMD1, mit Mutation M (Primer -MutHJ).

pMD10: Analog zu pMD1, mit Mutation M (Primer -MutHJ).

pMD11: Analog zu pMD1, mit Mutation M6 (Primer 6-MutHJ).

pMD12: Analog zu pMD1, mit Mutation M7 (Primer 7-MutHJ).

pMD13: Analog zu pMD1, mit Mutation M11(Primer 13-MutHJ).

pMD14: Analog zu pMD1, mit Mutation M12 (Primer 14-MutHJ).

pMD15: Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde das *proHJ*-Operon unter Einsatz der Primer *Pvu*II-proHJ fwd und rev mittels PCR amplifiziert. Das 2225bp PCR-Fragment wurde mit *Pvu*II geschnitten und in den ebenfalls mit *Pvu*II restringierten Vektor pX ligiert.

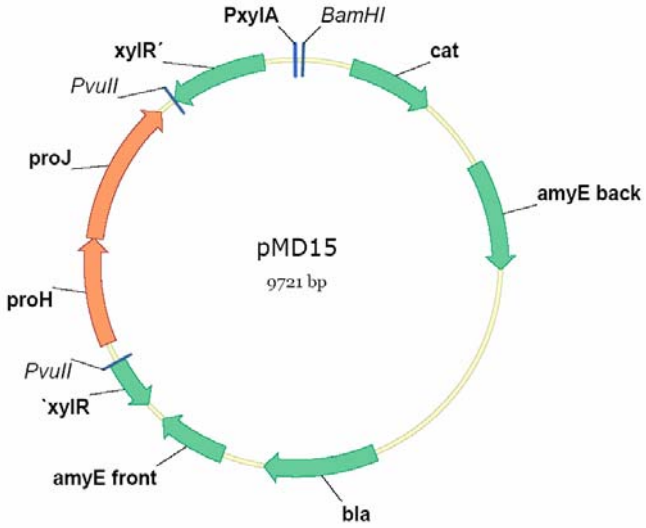


Abb.6: Das pX-Derivat pMD15.

pMD16: Das Plasmid pMD15 wurde mit Hilfe des QuikChangeMutagenesis-Kits (Stratagene) in der *proHJ*-Promotorregion mutiert (Mutation M1), s. Tabelle. Hierfür wurde das Primerpaar 1- MutHJ verwendet (s. 5.8). Die mutierten Plasmide wurden in *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert, dort zum Ring geschlossen und amplifiziert. Die Selektion erfolgte auf LB / Amp-Platten. Aus den erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide präpariert und die Mutationen durch Sequenzierungen verifiziert.

pMD17: Analog zu pMD16, mit Mutation M7 (Primer 7-MutHJ).

pMD18: Analog zu pMD16, mit Mutation M (Primer -MutHJ).

pMD19: Analog zu pMD16, mit Mutation M (Primer -MutHJ).

pMD20: Analog zu pMD1, mit Mutation M7 (Primer 7-MutHJ).

pMD21: Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde das *proA*-Gen unter Einsatz der Primer *Sal*I-*proA* fwd und *Sph*I-*proBA* rev mittels PCR amplifiziert. Das 1,6 kb große PCR-Fragment wurde mit *Sal*I und *Sph*I geschnitten und in den ebenfalls mit *Sal*I und *Sph*I restringierten Vektor pDG148 ligiert.

pMD22: Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde das *proBA*-Operon unter Einsatz der Primer *Sal*I-*proBA* fwd und *Sph*I-*proBA* rev mittels PCR amplifiziert. Das 2,6 kb große PCR-Fragment wurde mit *Sal*I und *Sph*I geschnitten und in den ebenfalls mit *Sal*I und *Sph*I restringierten Vektor pDG148 ligiert.

pMD23: Das *cat* Gen des *proH*$_{153}$*´-lacZ* Plasmids pBKB143 wurde mit Hilfe des Quik Change Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla) unter Einsatz der Oligonukleotide cat-mut fwd und cat-mut rev zur Funktionsuntüchtigkeit mutagenisiert.

pMD24: Aus dem Genom von *B. subtilis* wurden 126 bp stromaufwärts des *proHJ*-Operons unter Einsatz der Primer *proHJ*-Min 135 fwd und proHJ3-JS6 mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit *Bam*HI und *Sma*I geschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Sma*I behandelten Vektor pJMB1 ligiert.

pMD27: Aus dem Vektor pJMB1 wurde mit Hilfe der Primer *Hind*III-Cm fwd und *Hind*III-Cm rev das Chloramphenicol-Resistenzgen amplifiziert, das erhaltene 1280 bp PCR-Fragment mit *Hind*III restringiert und in den mit *Hind*III geschnittenen Vektor pADK1 ligiert.

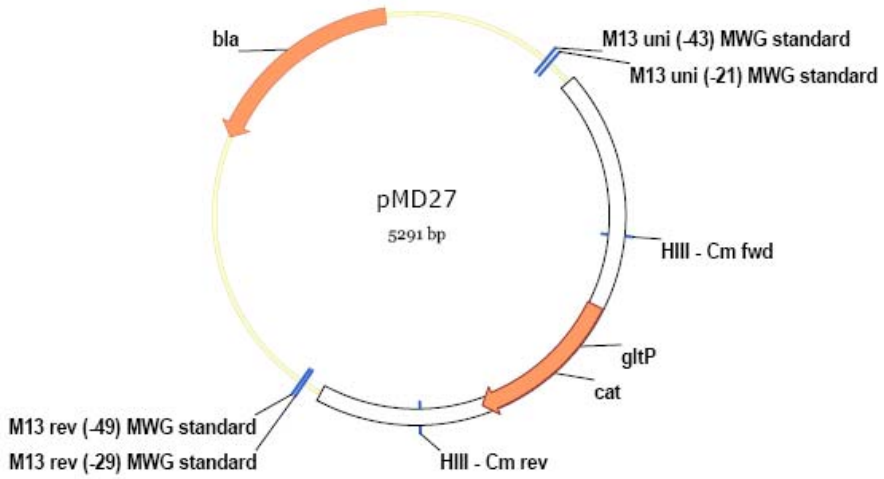


Abb.7: Das Plasmid pMD27.

pMD28: Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde das *gltT*-Gen unter Einsatz der Primer PvuII-gltT fwd 2 und rev mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene 2411 bp PCR-Fragment wurde mit *Pvu*II geschnitten, so dass es am 3´- Ende um 355 bp verkürzt wurde. Das verbleibende 2056 bp Fragment wurde in den ebenfalls mit *Pvu*II behandelten Vektor pX ligiert.

pMD29: Aus dem Genom von *B. licheniformis* wurden 388 bp stromaufwärts des *proH*-Gens unter Einsatz der Primer B.li 388 *Sma-proHJAA* treA und B.li Bam-*proHJAA treA* mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit *Bam*HI *und Sma*I geschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI / *Sma*I behandelten Vektor pJMB1 ligiert.

pMD30: Aus dem Genom von *B. licheniformis* wurden 130 bp stromaufwärts des *proH*-Gens unter Einsatz der Primer B.li 130 *Sma-proHJAA* treA und B.li Bam-*proHJAA treA* mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit *Bam*HI *und Sma*I geschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI / *Sma*I behandelten Vektor pJMB1 ligiert.

pMD31: Das Plasmid pJS35 wurde mit Hilfe des QuikChangeMutagenesis-Kits (Stratagene) in der *proHJ*-Promotorregion mutiert (Mutation del1). Hierfür wurde das Primerpaar del1-proHJ fwd und rev verwendet (s. 5.8). Die mutierten Plasmide wurden in *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert, dort zum Ring geschlossen und amplifiziert. Die Selektion erfolgte auf LB / Amp-Platten. Aus den erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide präpariert und die Mutationen durch Sequenzierungen verifiziert.

pMD32: Analog zu pMD31; Mutation del2 (Primerpaar del2 proHJ fwd und rev).

pMD33: Analog zu pMD31; Mutation del3 (Primerpaar del3 proHJ fwd und rev).

pMD34: Analog zu pMD31; Mutation del4 (Primerpaar del4 proHJ fwd und rev).

6.2 Stammkonstruktionen

6.2.1 Konstruktion von *treA*-und *lacZ*-Fusionsstämmen

Alle zur Konstruktion der *treA*-und lacZ-Reportergenfusionsstämme genutzten Plasmide sind Derivate der Plasmide pJMB1 (*treA*) oder pBKB143 (*lacZ*) und wurden durch doppelt homologe Rekombination in das chromosomale *amyE*-Gen der *B. subtilis*-Stämme FSB1 [*(treA::neo)*1] (*treA*-Fusionen) oder JH642 (*lacZ*-Fusionen) integriert. Um die komplette Integration der zirkulären Plasmide über einfache, homologe Rekombination zu verhindern, wurden diese vor der Transformation mit Restriktionsendonukleasen in dem nicht integrierenden Bereich linearisiert. Die Rekombinationen erfolgten zwischen auf plasmidcodierten 5´- und 3´- Bereichen von *amyE* und den entsprechenden Pendants auf dem Chromosom von *B. subtilis*. In den dadurch entstehenden Stämmen ist das chromosomale *amyE*-Gen durch die Fusion und das *cat*-Gen unterbrochen. Sämtliche Stämme wurden daher zunächst auf die Cm^R selektioniert und dann auf den Verlust ihrer *amyE*-vermittelten Amylase-Aktivität überprüft. Da in dieser Arbeit nur nichtcodierende Bereiche fusioniert wurden, musste bei der Konstruktion dieser transkriptioneller Fusionen der Leserahmen des *treA*-Gens nicht berücksichtigt werden.

MDB6a: Zur Konstruktion von MDB6a [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH*$_{153}$*´treA)2 cat*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] mit dem mit *Xho*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD5 transformiert.

MDB7a: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD6 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB8: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD1 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB9: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD2 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB10: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD3 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB11: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD4 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB12: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD7 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB13: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD8 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB14: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD9 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB15: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD10 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB17: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD12 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB18: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD13 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB19: Analog zu MDB6a; transformiert wurde das Plasmid pMD14 x *Xho*I x *Pst*I.

MDB38: Zur Konstruktion von MDB38 [*amyE::*[Φ*(proH$_{153}$´lacZ)2 erm*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes JH642 mit dem mit *Xho*I linearisierten Plasmid pMD23 transformiert.

MDB47: Zur Konstruktion von MDB47 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{126}$´ treA)2 cat*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] mit dem mit *Xho*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD24 transformiert.

MDB59: Zur Konstruktion von MDB59 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{B.li\ 388}$´ treA)cat*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1[*(treA::neo)*1] mit dem mit *Sca*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD29 transformiert.

MDB60: Zur Konstruktion von MDB60 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{B.li\ 130}$´ treA)cat*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1[*(treA::neo)*1] mit dem mit *Sca*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD29 transformiert.

MDB61: Zur Konstruktion von MDB61 [*(treA::neo)*1 *amyE::* [Φ*(proH$_{153}$del1´treA)*18 *cat*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] mit dem mit *Xho*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD31 transformiert.

MDB62: Zur Konstruktion von MDB47 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del2´treA)*18 *cat*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] mit dem mit *Xho*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD32 transformiert.

MDB63: Zur Konstruktion von MDB47 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del3´treA)*18 *cat*] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] mit dem mit *Xho*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD33 transformiert.

MDB64: Zur Konstruktion von MDB47 [*(treA::neo)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$del4´treA)*18 *cat*] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] mit dem mit *Xho*I und *Pst*I linearisierten Plasmid pMD34 transformiert.

6.2.2 Konstruktion und Überprüfung von Unterbrechungsmutanten

MDB39: Zur Konstruktion von MDB39 [*(gltP::neo)*1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes 168 mit dem mit *Cla*I und *Sac*II linearisierten Plasmid pADK2 transformiert. Transformanden wurden auf Kanamycin selektioniert.

MDB40: Zur Konstruktion von MDB40 [*(gltT x* pUS19)1 (*spec*)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes 168 mit dem Plasmid pADK5 transformiert. Transformanden wurden auf Spectinomycin selektioniert.

MDB41: Zur Konstruktion von MDB41 [*(gltP::neo)*1 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes MDB39 mit dem Plasmid pADK5 transformiert. Transformanden wurden auf Spectinomycin selektioniert und dann auf ihre Kanamycin-Resistenz überprüft.

MDB42: Zur Konstruktion von MDB42 [*(yveA::neo)*1 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes YveA$^-$ (Saier, 2003) mit dem Plasmid pADK5 transformiert. Transformanden wurden auf Spectinomycin selektioniert und dann auf ihre Kanamycin-Resistenz überprüft.

MDB43: Zur Konstruktion von MDB43 [*(yveA::neo)*1)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes JH642 mit chromosomaler DNA des Stammes YveA$^-$ transformiert. Transformanden wurden auf Kanamycin selektioniert.

MDB44: Zur Konstruktion von MDB44 [*(yveA::neo)*1) *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 (*spec*)] mit chromosomaler DNA des Stammes YveA$^-$ transformiert. Transformanden wurden auf Kanamycin selektioniert und dann auf ihre Spectinomycin-Resistenz überprüft.

MDB50: Zur Konstruktion von MDB50 [*(sigH::cat)*1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes JH642 mit chromosomaler DNA des Stammes SigH$^-$ (K. Kobayashi) transformiert. Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektioniert.

MDB51: Zur Konstruktion von MDB51 [*(sigH::cat)*1 *amyE::*[Φ*(proH$_{153}$'lacZ)2erm*]] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes MDB38 mit chromosomaler DNA des Stammes SigH$^-$ (K. Kobayashi) transformiert. Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektioniert und anschließend auf ihre Erythromycinresistenz überprüft.
MDB52: Zur Konstruktion von MDB52 [*(gltP::neo)*1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes JH642 mit dem mit *Xho*I und *Sca*I linearisierten Plasmid pMD27 transformiert. Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektioniert.

MDB53: Zur Konstruktion von MDB53 [(*gltP*::*cat)*1 *(yveA::neo)*1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes MDB43 mit chromosomaler DNA des Stammes MDB52 [*(gltP::neo)*1] transformiert. Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektioniert und anschließend auf ihre Kanamycinresistenz überprüft.

MDB54: Zur Konstruktion von MDB54 [(*gltP*::*cat)*1 *(yveA::neo)*1 *(gltT x* pUS19)1 (*spec*)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes MDB44 mit chromosomaler DNA des Stammes MDB52 [*(gltP::neo)*1] transformiert. Transformanden wurden auf Chloramphenicol selektioniert und anschließend auf ihre Kanamycin- und Spectinomycinresistenz überprüft.

7. Biochemische Methoden

7.1 Quantifizierung der ß-Galaktosidase (LacZ)-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität chromosomal integrierter *lacZ*-Reportergenfusionen unter verschiedenen osmolaren Wachstumsbedingungen wurden die Fusionsstämme sowohl bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen als auch unter Salzschock-Bedingungen in SMM-Medium wachsen gelassen. Zur Bestimmung der spezifischen ß-Galaktosidase-Aktivität

(Miller, 1992) wurde jeweils die OD_{578} der Bakteriensuspension und die ß-Galaktosidase-Aktivität des zugehörigen Zell-extraktes bestimmt. Bei den entsprechenden Versuchen entnommene Kulturproben von einem Volumen V von 1-2 ml wurden abzentrifugiert (2min, 15000rpm), in einem Trockeneis-Ethanolbad schockgefroren und bis zur Durchführung des Enzymtests bei -20°C gelagert. Die Pellets wurden dann in 500µl Z-Puffer (60 mM $Na_2HPO_4 * 2 H_2O$, 40 mM $NaH_2PO_4 * H_2O$, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 * 7 H_2O$, pH 7) resuspendiert und zur Permeabilisierung der Zellmembran mit 2 Tropfen Toluol und einem Tropfen 0,1% SDS versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde 5min bei RT inkubiert, anschließend wurden 1,5 ml Z-Puffer hinzugegeben und gut gemischt. Zum Starten der Enzymreaktionen wurden 400µl ONPG (4mg/ml) hinzupipettiert, gemischt und die Reaktion bei Auftreten einer leichten Gelbfärbung, spätestens jedoch nach einer Stunde, mit 1 ml 1M $NaCO_3$ gestoppt. Die Zeit zwischen Starten und Stoppen der Reaktion geht als Zeit t (min) in die Rechnung ein. Nach Abzentrifugation der Zellreste wurde die Extinktion bei 405 nm (E_{405}) bestimmt. Dabei diente ein Reaktionsansatz ohne Zellen als Referenz.
Die Berechnung der spezifischen ß-Galaktosidase-Aktivität $A_{ß\text{-}Gal}$ erfolgte nach folgender Formel:

$$A_{ß\text{-}Gal} = 1000 * E_{405} * 6{,}648 \; (OD_{578} * V * t * 0{,}1)^{-1}$$

$A_{ß\text{-}Gal}$: spezifische ß- Galaktosidase-Aktivität (nmol gespaltenes ONPG promin und mg Protein) [nmol $*min^{-1} * mg^{-1}$ = Miller unit pro mg Protein]

E_{405} : Extinktion des Spaltproduktes *o*-Nitrophenol bei 405 nm

OD_{578} : Optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

V : abzentrifugiertes Zelkulturvolumen in ml

t : Zeit vom Start der Reaktion mit ONPG bis zum Stoppen mit $NaCO_3$ in min

Der Faktor 1000 ergibt sich aus der Definition, dass eine vollständig induzierte Kultur eine ß-Galaktosidase-Aktivität von 1000 Miller-Units besitzt, wohingegen einer nicht-induzierten Kultur eine Aktivität von 1 Miller-Unit zugeschrieben wird (Miller, 1992). Der Faktor 6,648 [µmol $* mg^{-1} *$ ml] berücksichtigt das Reaktionsvolumen (3,4ml), die Küvettendicke von 1cm und den Extinktionskoeffizienten von *o*-Nitrophenol bei 405 nm ($\varepsilon_{405} = 4750\ M^{-1} * cm^{-1}$). Desweiteren wird vorausgesetzt, dass eine OD_{578} von 1 einer Zelldichte von 10^9 Zellen/ml entspricht und 10^9 Zellen ca. 0,1mg Protein enthalten ; also eine OD_{578} von 1 einer Proteinkonzentration von 0,1 mg / ml entspricht (Silhavy *et al.*, 1984).
Alle in dieser Arbeit angegeben spezifische ß-Galaktosidase-Aktivitäten sind Mittelwerte zweier unabhängig voneinander gemessener Probenreihen.

7.2 Quantifizierung der Phosphoglucosidase (TreA)-Aktivität

Analog zum ß-Galaktosidase-Enzymtest erfolgte die Bestimmung der Aktivität chromosomal integrierter *treA*-Reportergenfusionen unter verschiedenen osmolaren Wachstumsbedingungen. Dazu wurden die Fusionsstämme sowohl bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen als auch unter Salzschock-Bedingungen in SMM-Medium wachsen gelassen. Die Probenentnahme erfolgte wie beim ß-Galaktosidase-Enzymtest. Die tiefgefrorenen Pellets wurden in 500µl modifiziertem Z-Puffer pH 6 (Gotsche und Dahl, 1995; Helfert *et al*., 1995) mit 1mg/ml Ly-

sozym resuspendiert und zum Verdau der Zellwand 5min bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden 2min bei 15000rpm abzentrifugiert und 400µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo 400µl Z-Puffer (ohne Lysozym) hinzugefügt und die Reaktion mit 200µl PNPG (4 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) gestartet wurde. Die Ansätze wurden bei 28°C bis zu einer leichten Gelbfärbung, längstens jedoch 3 h inkubiert und die Reaktion anschließend mit 500µl 1 M $NaCO_3$ gestoppt.

Die Extinktion bei 420nm (E_{420}) wurde schnellstmöglich bestimmt und die spezifische Phosphoglucosidase-Aktivität A_{TreA} nach folgender Formel berechnet (Gotsche und Dahl, 1995; Helfert *et al.*, 1995):

$$A_{TreA} = 1500 * E_{420} * (OD_{578} * V * t * 0,1 * 0,8)^{-1}$$

A_{TreA} : spezifische TreA- Aktivität (nmol gespaltenes pNPG promin und mg Protein) [nmol $*min^{-1} * mg^{-1}$ = Miller unit pro mg Protein]

E_{420} : Extinktion des Spaltproduktes *o*-Nitrophenol bei 405 nm

OD_{578} : Optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

V : abzentrifugiertes Zelkulturvolumen in ml

t : Zeit vom Start der Reaktion mit pNPG bis zum Stoppen mit Na_2CO_3 in min

Der Faktor 1500 [µmol $*$ mg^{-1} $*$ ml] berücksichtigt den Extinktionskoeffizient von *p*-Nitrophenol (ε_{405} = 18300 $M^{-1} * cm^{-1}$) die Küvettendicke von 1cm, das Reaktionsvolumen von 1,5ml sowie die Definition, dass eine vollinduzierte Kultur eine Aktivität von 1000 Miller Units pro mg Protein aufweist.
Der Faktor 0,1 muss eingerechnet werden, da vorausgesetzt wird, dass eine OD_{578} von 1 einer Proteinkonzentration von 0,1mg/ml entspricht (s. ß-Galaktosidase-Enzymtest; Silhavy *et al*., 1984). Der Faktor 0,8 dient zur Korrektur des eingesetzten Volumens.

7. 3 Amylase-Test

Zur Kontrolle der stabilen Insertion der Reportergenfusionen in das *amyE*-Gen wurde der Nachweis für aktive α-Amylase geführt. Dazu wurde der zu untersuchende Stamm auf eine LB-Platte mit 1% Stärke plattiert und üN wachsen gelassen. Die bewachsene Platte wurde dann mit Gram-Jodlösung (0,5% (w/v) Jod, 1% Kaliumjodid) geflutet und die Kolonien von der Platte gespült. Der Überstand wurde verworfen. Bei *amyE*$^+$-Zellen wurde ein heller Hof sichtbar, in dem keine Stärke mehr vorhanden war, die vom Jod komplexiert werden konnte. Bei *amyE*$^-$-Zellen blieb alles in der dunkelvioletten Farbe des Jod-Stärke-Komplexes.

7.4. HPLC-Messungen (FMOC/ADAM)

7.4.1 Derivatisierung der Proben

Die Zellen für die quantitative HPLC-Analyse der Aminosäure Prolin wurden in 25 ml 1xSMM mit 0 und 0,6 M NaCl bis zu einer OD_{578} von 1 gezogen. Die Zellen wurden geerntet (6min, 5000rpm, Hettich-Zentrifuge) und wurden lyophyllisiert. Das Trockengewicht wurde bestimmt und die Zellen mit 500µl Extraktionsgemisch (Methanol/Chloroform/Wasser 10/5/4

(v/v/v)) unter heftigem Schütteln 60min extrahiert und anschließend mit gleichen Mengen (130µl) Chloroform und Wasser versetzt. Daraufhin wurde 30min geschüttelt und die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 13000rpm für 15min beschleunigt. Die Aminosäuren enthaltene, hydrophile obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und bei 55°C getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 500µl H_2O resuspendiert und wenn nötig mit H_2O verdünnt, um die Reaktion mit FMOC (9-Fluorenyl-Methoxycarbonylchlorid) in einem für die HPLC messbaren Bereich zu halten. Aminosäurestandards und Proben wurden mit FMOC modifiziert in Bezug auf die Vorsäulenderivatisierungs-Methode, bei der FMOC und 1-Aminoadamantan (ADAM) (E. Grom, Applications-Service) verwendet werden. Zu 40µl Natriumborat-Puffer (0,5M, pH 7,7) mit 50µM Taurin als internem Standard wurden 40µl der Probe oder des Standards einer angemessenen Konzentration (5-100µM) zugesetzt, gefolgt von 80µl FMOC-Reagenz II (Grom). Die Probe wurde 45s gevortext und dann mit 100µl ADAM-Lösung 50% Aceton (v/v) versetzt. Der Probe wurde dann mindestens 45s Zeit gelassen, um mit dem FMOC zu reagieren (Schüttler). 140µl Lösung A (20% Acetonitril, 0,5% Tetrahydrofuran in 50mM Natriumacetat-Puffer, pH 5) wurden zugegeben und nochmals mindestens 45s geschüttelt. Wenn nicht sofort in die Messung eingesetzt, konnte die Derivatisierungsreaktion auch bei -20°C gelagert werden.

7.4.2 Bestimmung der Prolinmenge mittels HPLC-Messung

Die verwendete HPLC (Sykam) besitzt ein automatisches Injektionssystem. Die Proben wurden so platziert, dass in einer Messreihe verteilt 5 Standards unterschiedlicher Konzentration mit gemessen werden. 10µl jeder Probe wurden auf einem „reversed phase“ System bestehend aus Vorsäule (120 ODS- 4HE, 10 x 4mm, Partikelgröße 5µM) und der Hauptsäule 120 ODS-4HE (75 x 4 mm, Partikelgröße 3µM) analysiert. Beide Säulen stammten von der Firma Grom (Rottenburg-Hailfingen). Das für Aminosäureauftrennung etablierte Lösungssystem bestand aus Puffer A (s.o.) und B (80% Acetonitril in 50mM Natriumacetat-Puffer, pH 5). Die chromatographische Auftrennung von Aminosäuren wurde bei einer Flussrate von 0,75 ml/min bei 45°C und einem Gradienten, aufgebaut aus Lösung A und B, durchgeführt (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Gradient zur Auftrennung von Aminosäuren

Zeit (min)	**Puffer A** (80% 50 mM NaAc pH 5; 20% AcN)	**Puffer B** (20% 50 mM NaAc pH 5; 80% AcN)
0	100%	0%
2	100%	0%
15	91%	9%
17	91%	9%
25	70%	30%
27	0%	100%
32	0%	100%
34	100%	0%
37	100%	0%
39	100%	0%

Die fluoreszierend markierten Aminosäuren wurden mit einem Fluoreszenz-Detektor (Jasco FP-2020 Plus) bei einer anregenden Wellenlänge von 245nm und einer emittierenden von 316nm detektiert.
Die ermittelten Spektren wurden mit Hilfe der ChromStar® Software (Sykam) ausgewertet.

7.5 Messung der Aufnahme ^{14}C-markierter Verbindungen

7.5.1 Bestimmung der Transportrate von ^{14}C-Aspartat, ^{14}C-Glutamat und ^{14}C-Glycin Betain

Für die Bestimmung der jeweiligen Substrataufnahmen wurden [1-^{14}C]-Aspartat (spezifische Aktivität: 45mCi/mmol, [1-^{14}C]-Glutamat (spezifische Aktivität: 45mCi/mmol) und [1-^{14}C]-Glycin Betain (spezifische Aktivität: 55mCi/mmol) verwendet. *B. subtilis* Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium gezogen und zum Inokulieren von 20ml Minimalmedium auf eine OD_{578} von 0,1 verwendet. Die Zellen wurden unter den jeweils angegebenen Bedingungen bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5-0,8) inkubiert. Zur Messung der Transportrate wurden 1,3 ml Kultur entnommen und die OD_{578} bestimmt.Der Kultur wurde radioaktiv markiertes Glutamat, Aspartat bzw. Glycin Betain in den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Zellen wurden bei der entsprechenden Wachstumstemperatur in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) unter Schütteln weiter inkubiert und in den im Ergebnisteil angegebenen Zeitabständen wurden jeweils 100µl Kultur entnommen und auf Nitrocellulosefilter (0,45µM, Schleicher&Schuell, Dassel) gesaugt. Es wurde mit isotonischem Medium nachgespült, die Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (QuicksafeA, Zinsser Analytic) überschichtet. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Beckmann Coulter, Liquid Szintillation 6500) bestimmt. Als Referenz für die eingesetzte Menge an Radioaktivität dienten 100µl ungefilterte Kultur. Die erhaltenen dpm wurden nach der unten angegebenen Formel in nmol aufgenommenes Substrat pro mg Protein umgerechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine OD_{578} einer Bakteriensuspension von 1 einem Proteingehalt von 0,1 mg ml^{-1} entspricht (Miller, 1992).

$$\frac{\text{nmol radioaktive Verbindung}}{\text{mg Protein}} = \frac{\text{dpm in 0,1 ml} * \text{nmol markierte Verbindung in 0,1 ml}}{OD_{578} * \text{0,01 mg Protein} * \text{dpm der Referenz in 0,1 ml}}$$

7.5.2 Bestimmung der Akkumulation von ^{14}C-Aspartat und ^{14}C-Glutamat

Für die Bestimmung der jeweiligen Substrataufnahmen wurden [1-^{14}C]-Aspartat (spezifische Aktivität: 45mCi/mmol und [1-^{14}C]-Glutamat (spezifische Aktivität: 45mCi/mmol) verwendet. *B. subtilis* Zellen wurden üN in Minimalmedium gezogen und zum Inokulieren von 16 ml Minimalmedium auf eine OD_{578} von 0,1 verwendet. Es wurde radioaktives Aspartat bzw. Glutamat in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben.
Die Zellen wurden unter den jeweils angegebenen Bedingungen bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5-0,8) inkubiert. Zur Bestimmung der jeweiligen Substrataufnahme wurden 0,1 bzw. 0,3ml Kultur entnommen und auf Nitrocellulosefilter (0,45µM, Schleicher&Schuell, Dassel) gesaugt. Es wurde mit isotonischem Medium nachgespült, die Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (QuicksafeA, Zinsser Analytic) überschichtet. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Beckmann Coulter, LS 6500) bestimmt. Als Referenz für die eingesetzte Menge an Radioaktivität dienten 0,1 bzw. 0,3ml ungefilterte Kultur. Die erhaltenen dpm wurden nach der unten angegebenen Formel in mM Substratkonzentration in der Zelle umgerechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine OD_{578} einer Bakteriensuspension von 1 einem Zellvolumen von 0,65µl entspricht entspricht (Moses, 1999).

$$\text{mM radioaktive Verbindung} = \frac{\text{dpm in 0,1 ml} * \text{nmol markierte Verbindung in 0,1 ml}}{OD_{578} * \text{0,65µl} * \text{dpm der Referenz in 0,1 ml}}$$

IV. Ergebnisse

A Die osmotisch kontrollierte Prolinsynthese in *Bacilli*

1. Ein 153 bp großes DNA-Fragment enthält alle *cis* Elemente für die osmotische Regulation von *proHJ* in *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis gehört zu der Gruppe von *Bacilli*, die als Reaktion auf hypertone Wachstumsbedingungen die Aminosäure Prolin als dominantes, endogen synthetisiertes kompatibles Solut akkumulieren (Kuhlmann und Bremer, 2001; Kuhlmann, 2002). Die *de novo* Biosynthese von Prolin für osmoprotektive Zwecke in *B. subtilis* erfolgt über die Enzyme ProJ, ProA und ProH. Während die Gene *proH* und *proJ* als Operon organisiert sind, dessen Transkription einem osmotischen Stimulus unterliegt, wird das Gen *proA* konstitutiv exprimiert (Brill, 2002).

Die detaillierte Analyse des *proHJ*-Operons ergab, dass seine Expression in einer linearen Abhängigkeit zur externen Salinität steht (Brill, 2002). In derselben Arbeit wurde ebenfalls ermittelt, dass auf dem 153 bp DNA-Fragment direkt stromaufwärts vom Translationsstart des *proH* Gens (*proH*$_{153}$´) alle *in cis* benötigten Elemente enthalten sind, um eine osmotische Regulation zu vermitteln (Abb.1A). Auf diesem Abschnitt befindet sich der von J. Brill kartierte σ^A-abhängige Promotor, von dem aus die Transkription unter hyperosmolaren Bedingungen stattfindet (Brill, 2002).

Da diese Daten die Grundlage für die weiteren, in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des *proHJ*-Promotors bildeten, wurden sie zunächst verifiziert. Hierfür wurde eine transkriptionelle Fusion des 153 bp DNA-Fragmentes mit dem Reportergen *treA* verwendet (*proH*$_{153}$´-*treA*), um die Promotoraktivität bei aufsteigenden externen Salinitäten zu verfolgen. Das Gen *treA* codiert für eine salztolerante Phosphoglucosidase aus *B. subtilis*, deren Aktivität mittels eines kolorimetrischen Enzymtests relativ einfach bestimmt werden kann. In den *B. subtilis*-Stämmen, die eine *treA*-Reportergenfusion tragen, ist das authentische *treA*-Strukturgen durch eine Antibiotika-Resistenzkassette unterbrochen (*treA*::*neo*).

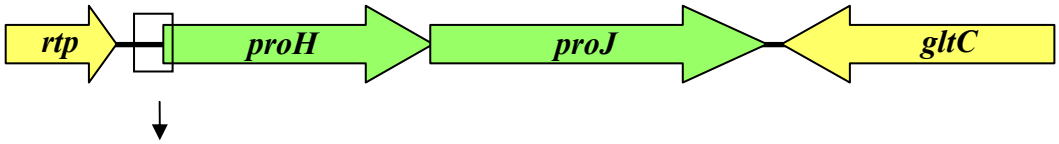
Bei den Fusionsexperimenten unter aufsteigenden Salinitäten im Medium wurde aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur des *B. subtilis*-Stammes JSB36 (*proH*$_{153}$´-*treA*) SMM mit aufsteigenden NaCl-Konzentrationen bis 0,8 M auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert

(OD_{578} = 0,8 bis 1). Es folgte die Bestimmung der TreA – Aktivität als Maß für die Expression des *proHJ*-Promotors (s.Abb.8). Es konnte gezeigt werden, dass die ermittelten TreA – Aktivitäten in einer linearen Korrelation zur externen Osmolarität stehen.
In diesem Experiment wurde bestätigt, dass das 153 bp – Minimalfragment nicht nur in der Lage ist, bei Hyperosmolarität den *proHJ* - Promotor zu aktivieren, sondern auch eine auf die externe Osmolarität fein abgestimmte Expression zu gewährleisten.

2. Die ortsgerichtete Mutagenese des *proHJ*-Promotors aus *B. subtilis*

2002 postulierte Jeanette Brill, dass die osmotisch regulierte Expression des *proHJ* Operons in *B. subtilis* ausgehend von einem Promotor erfolgt, der von dem vegetativen Sigmafaktor σ^A erkannt wird. Die im folgenden beschriebenen Mutagenesen der von Brill vorgeschlagenen *proHJ*-Promotorsequenz fanden in dem Plasmid pJS35 mit der *proH*$_{153}$*´-treA*-Fusion statt. Auf diese Weise konnte die Expression der mutierten Promotoren durch die Reporterenzymaktivität der Phosphoglucosidase TreA bestimmt werden (Abb.9). Das *proH*$_{153}$*´* -DNA-Fragment enthält alle *in cis* erforderlichen Elemente, um eine vollständige Osmoregulation zu gewährleisten. Die Mutationen wurden per PCR mit dem Vektor pJS35 (*proH*$_{153}$*´-treA*) als Target generiert. Die so entstandenen Plasmide pMD1 bis pMD12 wurden linearisiert und stabil in die *amyE*-Region im Chromosom des Stammes FSB1 (*treA::neo*) eingebracht (s. Abb.9). In den so entstandenen Stämmen MDB5 bis MDB17 wurde die Promotoraktivität unter hyperosmotischer Stimulation untersucht. Hierzu wurde aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur SMM und SMM mit 0,4 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde die TreA – Aktivität als Maß für die Aktivität des Promotors bestimmt.

A



5´ CATTATACATATTTGTCGAAAAGAAACAATACAAATCAATAATGGCCTTC

-35 **-10**

AAAC**TTGACA**TCATTTCCTCACG**TG**G**TAACAT**TTTAAACGTGTGAAAATGC

GAACAAAAAAGCGAACAAAGGAGATGTTACCGATCTTTGATCAAAAGAAA

rbs

GTAGCCTTTAT**AGGAG**CAGGATCT **ATG TTA CCG 3´** ***proH***

B

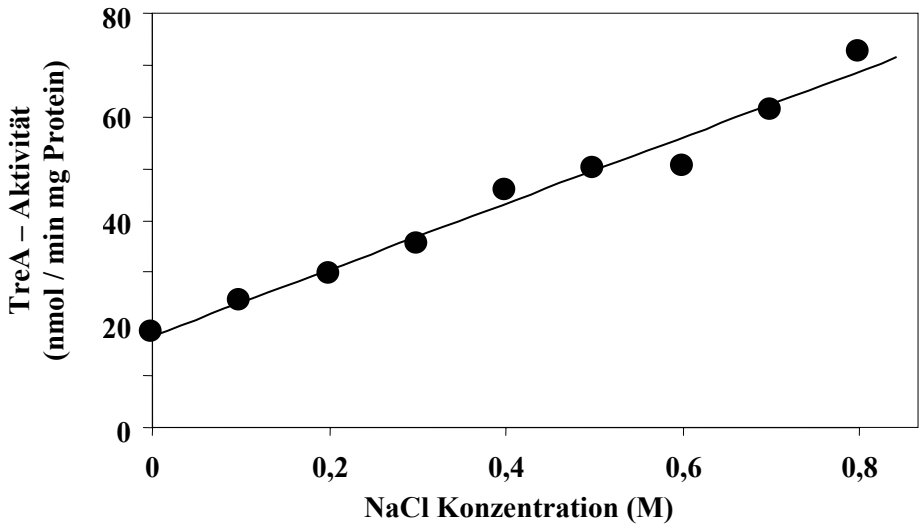


Abb. 8: Die durch das *proH$_{153}$´*- Fragment vermittelte Expression ist linear zur externen Osmolarität.

A: Die Genregion des *proHJ*-Operons auf dem Chromosom von *B. subtilis*.
In blau dargestellt ist die Sequenz des 153 bp Fragmentes, das alle *in cis* benötigten Elemente enthält, um eine feinregulierte osmotische Expression sicher zu stellen. Die Promotorsequenzen des kartierten σ^A-Promotors (-35, -10 und TG Motiv; Brill, 2002) sowie die putative Ribosomenbindestelle (rbs) sind hervorgehoben.
B: Aktivität der *proH$_{153}$´-treA*-Fusion bei aufsteigender externer Salinität.
Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur des Stammes JSB36 (*proH153´- treA)* wurde in SMM mit NaCl-Konzentrationen von 0 bis 0,8 M überimpft. Die Inokulation erfolgte auf eine OD_{578} von 0,1; bei einer OD_{578} von 0,8-1 wurden die Zellen geerntet und die TreA - Aktivität als Maß für die Expression des *proHJ*-Promotors bestimmt. Die präsentierten Daten wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt.

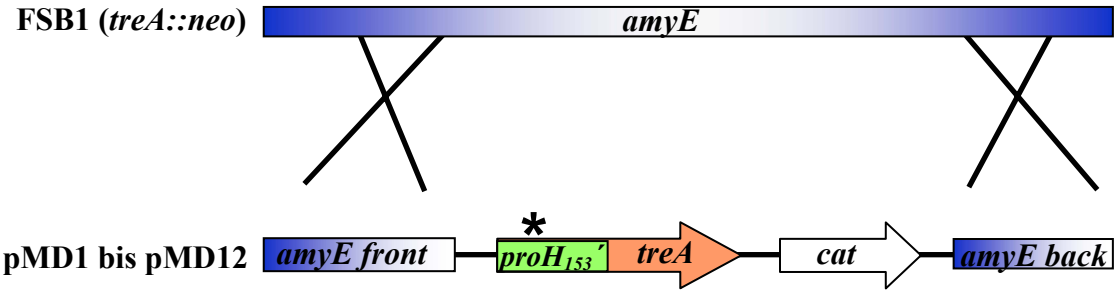


Abb. 9: Konstruktion der Reportergenstämme mit mutiertem *proHJ*-Promotor.

Die Mutagenese wurde im Vektor pJS35 (*proH*$_{153}$′*-treA*) durchgeführt und die so entstandenen Plasmide pMD1 bis pMD12 später mit Hilfe doppelt homologer Rekombination in die *amyE* Region des Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] eingebracht; *: durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführte Promotormutationen

2.1 Mutationen zur Verifizierung des postulierten osmoregulierten *proHJ* Promotors

Die Mutationen M1 bis M4 sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei der von Brill (2002) postulierten Promotorsequenz um den tatsächlichen Promotor der *proHJ*-Gene handelt. Zu diesem Zweck wurden in diese Promotorsequenz Mutationen eingeführt, die, falls es sich um den tatsächlichen Promotor handelt, einen kompletten Verlust der Expression zur Folge hätten (Abb.10).

Die Mutationen M1 und M2 betrafen das TG-Motiv vor der -10 Region. Dieses TG- Motiv, auch -16 Motiv genannt, spielt eine Rolle bei der Bildung des Komplexes DNA/ RNA-Polymerase und lässt sich bei ca. 45% der σ^A-abhängigen Promotoren in *B. subtilis* finden (Helmann, 1995). In diesen Promotoren scheint es ein essentielles Element zu sein, da bei seiner Deletion oder Mutation keine Promotoraktivität mehr nachweisbar ist (Voskuil und Chambliss, 2002). In dieser Arbeit wurden für die Verifizierung des *proHJ* - Promotors Mutationen gewählt, die das TG-Motiv schrittweise in AC konvertierten. Beide Mutationen, M1 und M2, führten zum erwarteten Ergebnis, dem kompletten Verlust der Promotoraktivität. Auch eine Kombination beider Mutationen wies, wie zu erwarten, keinerlei Promotoraktivität mehr auf (Daten nicht gezeigt). Die Mutation M4 richtete sich gegen die letzte Base der postulierten -10-Region, einem Thymidin. Dieses Thymidin lässt sich in nahezu allen *B. subtilis*-Promotoren finden und spielt eine wichtige Rolle bei

der Aufschmelzung der Promotorregion zur RNA-Polymerisation (Helmann, 1995). Mutiert man dieses Thymidin in ein G oder C, so kommt die Promotoraktivität zum Erliegen. Daher wird dieses Thymidin auch als „invariantes Thymidin“ bezeichnet. Bei der Konversion des invarianten Thymidins der postulierten *proHJ*-Promotorsequenz in ein Guanidin (Mutante M4) zeigt der Promotor erwartungsgemäß keinerlei Expression mehr. Die Mutationen M1 bis M4 untermauern also die These, dass es sich bei der von Brill (2002) vorgeschlagenen Sequenz um den tatsächlichen Promotor der *proHJ*-Gene handelt (Abb.10).

2.2 Mutationen zur Identifizierung von Schlüsselelementen für die osmotische Regulation von *proHJ*

Um etwaige Schlüsseldeterminanten zur osmotischen Regulation des σ^A–abhängigen *proHJ*-Promotors aus *B. subtilis* zu identifizieren wurden die Mutationen M5-M10 eingeführt. Hierbei wurde der Promotor sukzessive dahingehend verändert, dass eine Annäherung an die postulierte Konsensussequenz der σ^A-abhängigen Promotoren aus *B. subtilis* (Helmann, 1995) stattfand.

Da die -35-Region schon vollständig dem Konsensus entspricht, wurden dort keinerlei Mutationen eingeführt. Stattdessen wurden sowohl die -10 Region (M4, M5, M6) als auch der Abstand zwischen -35 und -10 Region (M7, M8, M9) oder beides (M10) verändert. Die ermittelten TreA - Aktivitäten als Maß für die Expression des *proHJ*-Promotors bei 0 und 0,4 M NaCl sind in Abb. 10 graphisch und in Tabelle 16 als numerische Werte dargestellt.

Alle Mutationen der -10 Region steigerten die Expression des Promotors. Die Einzelmutanten M4 und M5 wiesen eine 3-4 bzw. 5-6 fache höhere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf, während bei der Doppelmutante M6 eine 33fache Steigerung bei 0M, aber nur eine 16 fache Steigerung bei 0,4 M NaCl zu verzeichnen war.

Die Veränderungen des Abstandes zwischen -35 und -10 Region steigerten ebenfalls die Promotoraktivität. Eine Angleichung des Abstandes von 16 bp im authentischen *proHJ*-Promotor auf 17 bp der Konsensussequenz durch die Insertion einer Base führte zu einem 43 bzw. 23fachen Anstieg der Promotoraktivität. Um zu bestätigen, dass dieser Phänotyp tatsächlich auf die Verlängerung des Abstandes zwischen -35er und -10er Region zurückzuführen ist und nicht auf die Lokalisation der inserierten Base, wurde nochmals

an anderer Stelle eine Insertion vorgenommen (M8). Die Tatsache, dass die Mutation M8 dieselbe Promotoraktivität aufwies wie M7, ließ den Schluss zu, dass die beobachtete Expressionssteigerung einzig auf die Optimierung des Abstandes zwischen
-35 und -10 Region von 16 auf 17 bp zurückzuführen ist.

Um die Auswirkung einer Verlängerung des Abstandes über den Konsensus hinaus auf 18 bp zu untersuchen, wurden zwei Basen inseriert (Mutation M9). Die Aktivität dieses Promotors lag deutlich unter der der Mutanten M7 und M8 mit optimalem, 17 bp Abstand, war aber ca. 10-12fach höher als die des Wildtyps mit 16 bp.
In der Mutante M10 wurde der *proHJ*-Promotor komplett der Konsensussequenz angeglichen. Die Expressionsstärke dieser Mutante war genauso hoch wie die der 17 bp – Abstandsmutanten M7 und M8. Demnach kann die Aktivität dieser Mutanten nicht mehr durch eine gleichzeitige Mutation der -10er – Region gesteigert werden.
Bei sämtlichen expressionssteigernden Mutationen konnte stets immer noch eine Induktion der Promotoraktivität durch hyperosmotische Bedingungen nachgewiesen werden. Einzig der Induktionsfaktor von 0 auf 0,4 M NaCl war in einigen Mutanten um einiges niedriger als im Wildtyp (z.B. M10: Induktionsfaktor 1,7; Wildtyp: 3,2). Um zu klären, ob es sich dabei um eine echte Herabsetzung der osmotischen Induktion handelt oder um eine durch andere Faktoren begrenzte Promotoraktivität, wurde die Aktivität der Mutanten M5, M6, M7, M9 und M10 in SMM mit aufsteigenden NaCl-Konzentrationen vermessen. Bei der Kultivierung der Zellen wurde dabei genauso vorgegangen wie unter 1.) beschrieben. Hierbei zeigte sich, dass bei den Mutanten M5, M6 und M9 immer noch eine lineare Korrelation zwischen Promotoraktivität und externer Salinität besteht, während bei den Mutanten M7 und M10 ab einer externen NaCl – Konzentration von 0,4 M die Expression eine Sättigung erreicht (s. Abb.11). Die Mutanten verfügen also immer noch über eine feinregulierte, osmotische Induktion des *proHJ*-Promotors. Durch die eingeführten Mutationen ließ sich kein Promotorelement identifizieren, dass eine Schlüsselrolle bei der osmotischen Regulation von *proHJ* spielt. Einzig die Promotoraktivität an sich ließ sich - im Vergleich zum Wildtyp – durch gezielte Mutationen um Faktoren bis zu 43 (0M) bzw. 23 (0,4 M) steigern.

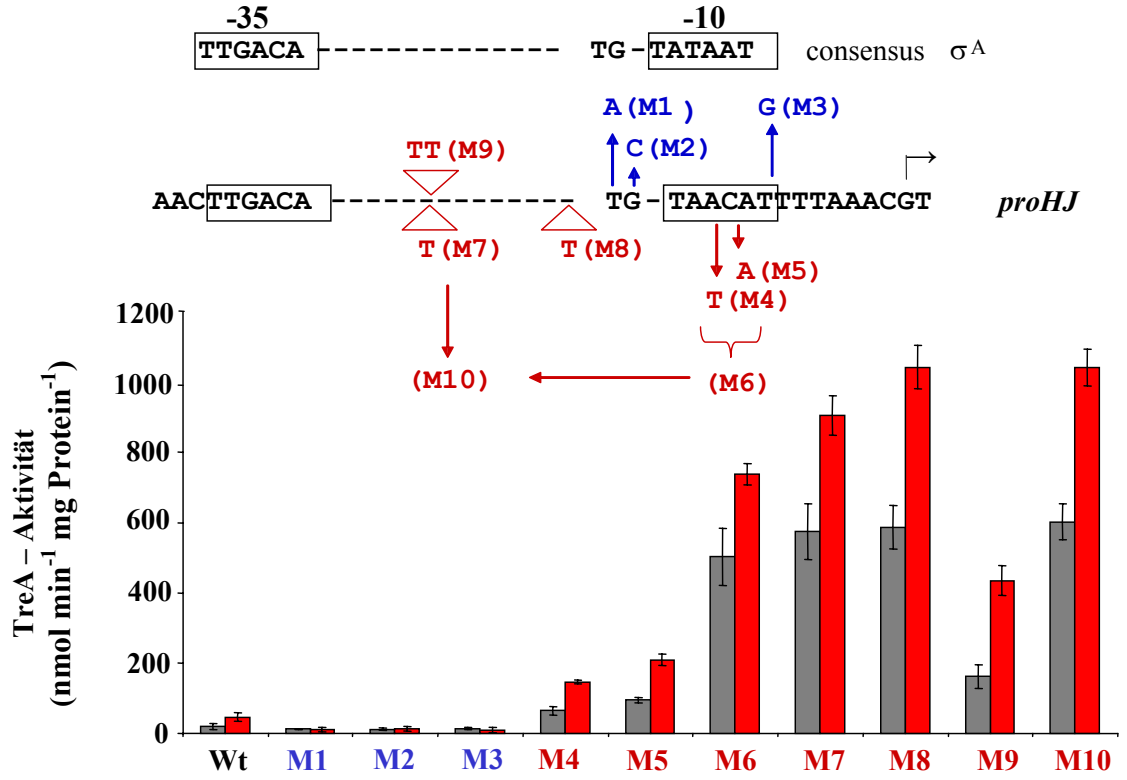


Abb.10: Die Mutationen des *proHJ*-Promotors und die daraus resultierenden Aktivitäten.

Die in den σ^A-abhängigen Promotor eingeführten Mutationen und die Aktivitäten der mutierten Konstrukte. Die präsentierten Daten sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Dreifachbestimmung und Standardabweichung.

Tabelle 16: Die TreA – Aktivitäten in den *proHJ*-Promotormutanten.

Mutante	0 M		0,4 M		Induktionsfaktor von 0 auf 0,4 M NaCl
	TreA-Aktivität (nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$)	Verhältnis Mutante: Wildtyp	TreA-Aktivität (nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$)	Verhältnis Mutante: Wildtyp	
Wildtyp	**14**	**1**	**42**	**1**	**3,2**
M4	64	4,5	146	3,2	2,3
M5	95	6,7	209	4,6	2,2
M6	503	35,9	738	16,4	1,5
M7	575	41	905	20,1	1,6
M8	587	41,9	1043	23,2	1,6
M9	162	11,6	435	9,6	2,7
M10	602	42,9	1043	23,2	1,7

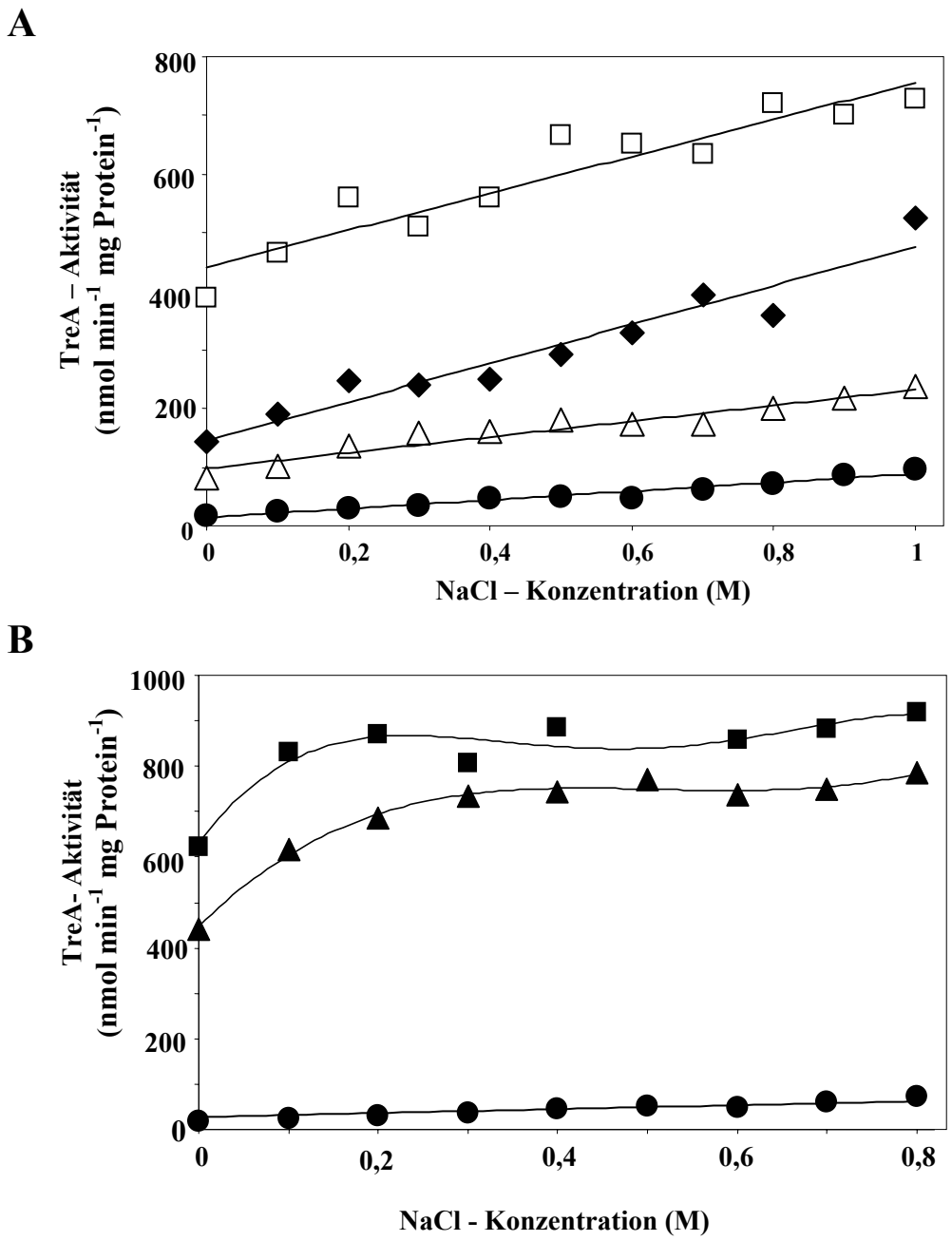


Abb.11: Die *proHJ*-Mutanten zeigen immer noch eine feinabgestimmte osmotische Induktion

Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur wurde SMM mit aufsteigenden NaCl-Konzentrationen auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,8-1) kultiviert. Anschließend wurden die TreA-Aktivitäten als Maß für die Expression des *proH* Promotors bestimmt. Die getesteten Stämme enthielten eine Fusion des mutierten *proH* Promotors mit dem Reportergen *treA:*
A: MDB11 (Δ) (*$proH_{153}$ mut M5´ – treA*), MDB15 (◆) (*$proH_{153}$mut M9´ – treA*), MDB12 (□) (*$proH_{153}$ mut M6´ – treA*)
B: MDB7a (▲) (*$proH_{153}$ mut M7´ – treA*) und MDB17 (■) (*$proH_{153}$mut 10´ – treA*)
In beiden Diagrammen ist als Referenz die Fusion des Wildtyppromotors im Stamm JSB36 (●) (*$proH_{153}$ – treA*) dargestellt. Die präsentierten Daten wurden jeweils in mindestens einem, unabhängigen Experiment bestätigt.

3. Die *proHJ* Transktiption in den Promotormutanten ist immer noch durch Glycin Betain reprimierbar

Die exogene Zugabe des Osmoprotektivums Glycin Betain setzt die Aktivität des salzinduzierten *proHJ* – Promotors in *B. subtilis* herab (Brill, 2002). Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Einführung bestimmter Mutationen in die Promotorsequenz eine gesteigerte Promotoraktivität zur Folge hat, die aber nach wie vor unter osmotischer Kontrolle steht. Um zu untersuchen, ob die Aktivität der mutierten Promotoren in gleicher Weise wie beim Wildtyppromotor durch Glycin Betain reprimiert werden kann, wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt. Exemplarisch wurde die Mutante mit der höchsten Promotoraktivität, Mutante M10, analysiert. Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur der Stämme JSB36 (*proH*$_{153}$*´- treA*) und MDB17 (*proH*$_{153}$ *mutM10´- treA*) wurde SMM mit 0,4 M NaCl, dem verschiedene Konzentrationen Glycin Betain zugesetzt wurden, auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Bei einer OD_{578} von 0,5-0,8 wurden die Zellen geerntet und die TreA-Aktivität als Maß für die Aktivität des fusionierten, mutagenisierten Promotors bestimmt.

Die Promotoraktivität wird sowohl in JSB36 (*proH*$_{153}$*´- treA*) als auch in MDB17 (*proH*$_{153}$ *mutM10´- treA*) bereits durch geringe Konzentrationen Glycin Betain reprimiert. Ohne die Zugabe von Glycin Betain beträgt die Promotoraktivität 42 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ (JSB36) bzw. 925 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ (MDB17). Bei 200 µM Glycin Betain erfolgt jeweils die maximale Repression der *proHJ* - Promotoraktivität auf ungefähr ein Drittel.

Diese verbleibende *proHJ*-Expression ist beim Stamm JSB36 vergleichbar mit der bei SMM ohne NaCl – Zugabe (s. Abb.1B) und liegt bei ca. 15 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$. Im Stamm MDB17 mit der Mutation M10 wird die Aktivität auf ca. 300 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ reprimiert, was deutlich unter der Aktivität in SMM liegt (etwa 600 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$).

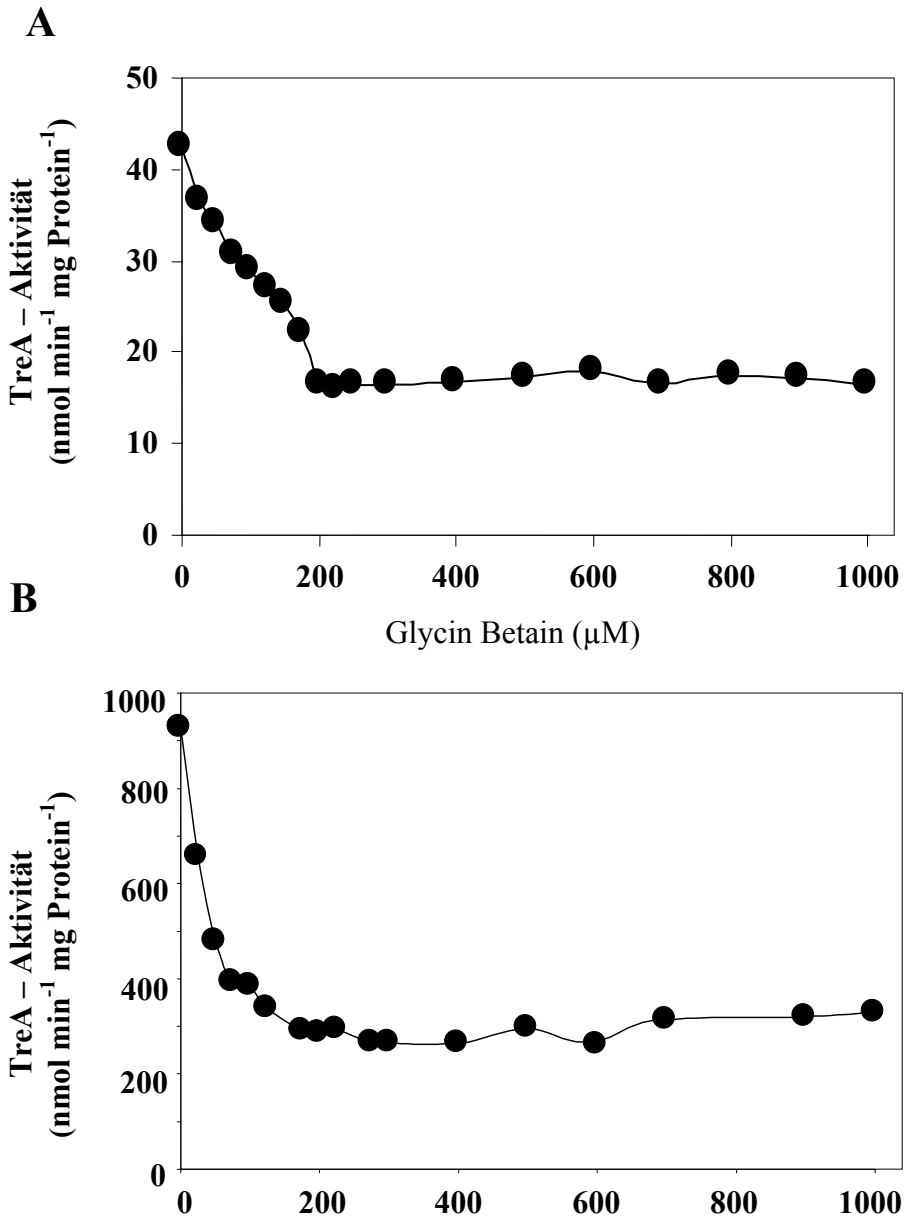


Abb. 12.: Repression des *proHJ* Promotors durch das kompatible Solut Glycin Betain.

Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur wurde SMM mit 0,4 M NaCl, dem verschiedene Konzentrationen Glycin Betain zugesetzt wurden, auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Bei einer OD_{578} von 0,5-0,8 wurden die Zellen geerntet und die TreA - Aktivität als Maß für die Expression des fusionierten Promotors bestimmt. Dargestellt sind die TreA-Aktivitäten in **A:** dem Stamm JSB36 (*$proH_{153}$´- treA*) und **B:** dem Stamm MDB17 (*$proH_{153}$ mut M10´- treA*). Die dargestellten Daten wurden in einem unabhängigen Experiment bestätigt.

4. Die Auswirkungen der Promotormutationen auf die *proHJ*-abhängige Prolinbiosynthese

Durch gezielte Veränderungen der *proHJ*-Promotorsequenz konnten Mutanten erzeugt werden, die eine gesteigerte Promotoraktivität aufwiesen. Nun sollten die Auswirkungen solcher transkriptionssteigernder Mutationen des *proHJ* - Promotors auf seinen natürlichen Hintergrund, die *proHJ*- Gene, untersucht werden. Zu klären war, ob eine durch Mutationen herbeigeführte Steigerung der *proHJ* Transkription zwingend mit einer Steigerung der Prolinsynthese einhergeht, da für die Synthese von Prolin neben ProH und ProJ ein weiteres Enzym benötigt wird: die γ – Glutamylphosphat - Reduktase ProA.

Um Stämme zu generieren, deren *proHJ*-Expression einzig von den mutierten Promotoren abhängt, wurde zunächst das Plasmid pMD15 (*proH$_{153}$´- proHJ*) als Target in eine gerichtete Mutagenese eingesetzt, bei der die ausgesuchten Mutationen M5, M6, M7, M9 und M10 (s. Abb.9) in die Promotorregion eingeführt wurden. Die auf diese Weise entstandenen Plasmide pMD16 bis pMD20 wurden mittels doppelt homologer Rekombination stabil in die *amyE*-Genregion des Stammes JSB8 [Δ*(proHJ::tet)*1] eingebracht (Abb.13). Die so konstruierten Stämme hießen MDB24 bis MDB28.
Im durch die Integration des Plasmides pMD15 (*proH$_{153}$´- proHJ*) in die *proHJ*-Mutante JSB8 [Δ(*proHJ::tet)*1] entstandenen Stamm MDB20 wurde durch Wachstumsanalysen und Bestimmung der Prolinakkumulation mittels HPLC die Komplementation des *proHJ* - Defekts nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dieser Stamm diente in weiteren Experimenten als Referenz.

4.1 Die Transkription von *proHJ* in den Promotormutanten

In den Stämmen MDB24 bis MDB28 *(*Δ *proHJ ::tet*) (*amyE::proH$_{153}$ mut´- proHJ cat*) wird die Expression der *proHJ* – Gene einzig von dem Promotor mit der eingebrachten gewünschten Mutation aus gesteuert. Um das Transkriptionsniveau des *proHJ* – Operons in diesen Stämmen zu untersuchen, wurden Northern Blot – Analysen exemplarisch mit den Stämmen MDB24 (*proH$_{153}$mut M5´- proHJ*) und MDB28 (*proH$_{153}$mutM10´- proHJ)*

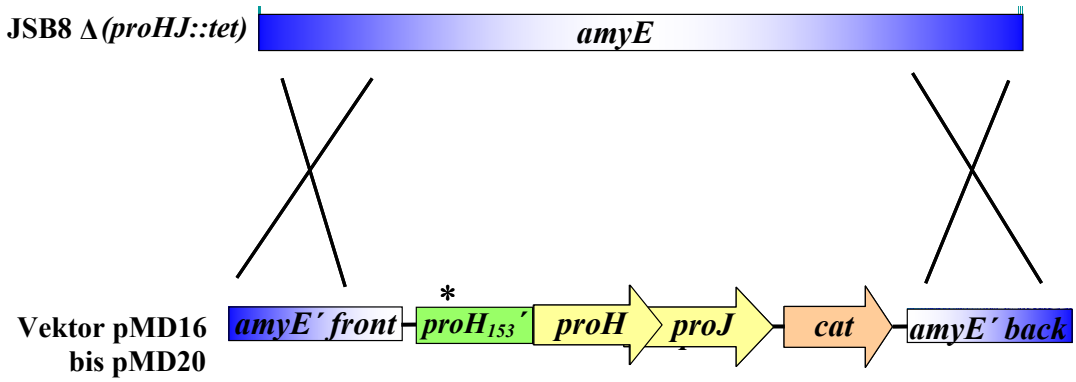


Abb. 13: Konstruktion der Stämme mit mutiertem Promotor vor dem *proHJ*-Operon.

Die Mutagenese wurde im Vektor pMD15 durchgeführt und die so entstandenen Plasmide pMD16 bis pMD20 später mit Hilfe doppelt homologer Rekombination in die *amyE* Region des Stammes FSB1 *(treA::neo)* eingebracht; *: durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführte Promotormutationen

durchgeführt. Hierzu wurde eine SMM Übernachtkultur der Stämme MDB24 und MDB28 in SMM bzw. SMM mit 0,4 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,8 – 1) kultiviert. Der Stamm MDB20 (*$proH_{153}$´- proHJ*) diente als Kontrolle. Die Gesamt-RNA wurde präpariert, auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die anschließende Hybridisierung erfolgte mit einer *proHJ* spezifischen, einzelsträngigen, DIG-markierten antisense-RNA-Sonde. Der hybridisierende Bereich dieser Sonde wurde so gewählt, dass er in der deletierten, durch eine Tetracyclinkassette ersetzten Region des Stammes JSB8 [Δ(*proHJ::tet*)1] lag. Dadurch wurden Artefakte, die durch die verbleibende Sequenz des authentischen *proHJ*-Operons auftreten könnten, vermieden.

Die *proHJ*-Transkription der Stämme MDB24 und MDB28, die die Mutationen M5 und M10 tragen, war deutlich erhöht im Vergleich zur Wildtypexpression im Stamm MDB20 (Abb.14). Da die Transkriptionsniveaus sehr unterschiedlich waren, mussten, um die Quantifizierung technisch möglich zu machen, unterschiedliche Mengen RNA für den Blot verwendet werden (MDB20: 15 µg, MDB24: 9 µg; MDB28: 3 µg). Um die Expressionen vergleichen zu können, wurde die entsprechende Signalstärke mittels der Image-QuaNT™ Software quantifiziert und in eine Signalstärke pro µg aufgetragene RNA umgerechnet. Dabei wurden nur die Transkripte mit voller Länge des *proHJ* Operons berücksichtigt. Die auf diese Weise ermittelte „Expressionsrate“ ist in Abb.14 B dargestellt.

Dabei zeigte sich, dass die Signalstärke pro µg RNA in MDB24 (M5) um Faktor 3-4 höher ist als im Referenzstamm MDB20. Bei dem Stamm MDB28, der die Mutation M10 trägt, wurde die Expression um Faktor 37 (0M) bzw. 27 (0,4M).

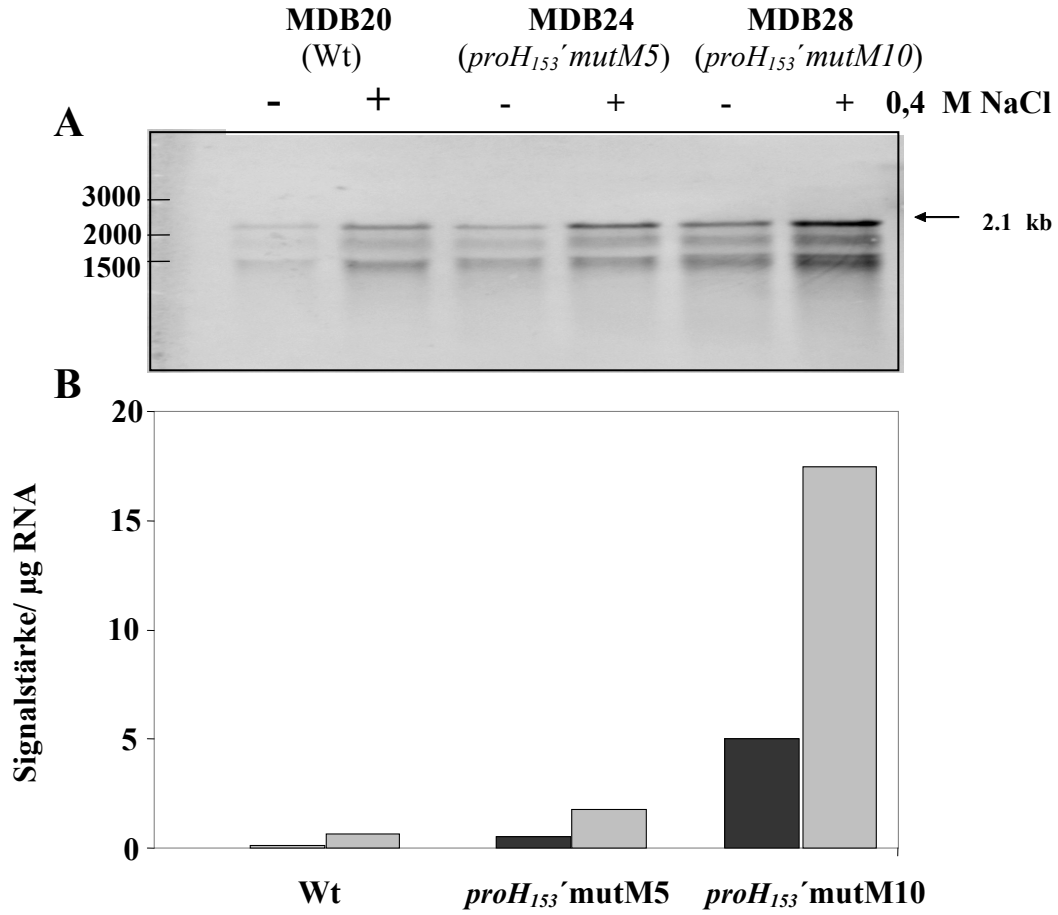


Abb. 14: Die Transkription des *proHJ*-Operons in den Hypermutanten.

Aus Zellen der Stämme MDB20 (*proH*$_{153}$´- *proHJ*), MDB24 (*proH*$_{153}$*mutM5*´- *proHJ*) und MDB28 (*proH*$_{153}$*mutM10*´-*proHJ*) wurde RNA präpariert und nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nylonmembran mit einer *proHJ* spezifischen RNA - Sonde hybridisiert. Die aufgetragenen RNA – Mengen waren 15 µg (MDB20), 9 µg (MDB24) und 3 µg (MDB28). Die detektierten Signale sind in **A** dargestellt. Zum Vergleich der Transkriptmengen wurden diese Signale mittels der Software ImageQuant™ quantifiziert und in eine Expressionsrate pro µg RNA umgerechnet (**B**).

4.2 Die *proHJ*-Mutanten mit erhöhter Promotoraktivität weisen eine Prolinüberproduktion auf

Es konnte gezeigt werden, dass einige der *proHJ*-Promotormutationen eine Überexpression des *proHJ* Operons zur Folge haben. In den Stämmen MDB24 (*proH$_{153}$´mutM5*) und MDB28 (*proH$_{153}$´mutM10*), in welchen die *proHJ* -Transkription einzig von den mutierten Promotoren abhängt, konnte eine deutliche Transkriptionssteigerung im Vergleich zum Wildtyppromotor nachgewiesen werden.

Es war nun die Frage zu klären, ob eine Steigerung der *proHJ*-Transkription ausreicht, um eine Prolinüberproduktion hervorzurufen, da zur Prolinsynthese ein weiteres, osmotisch nicht induziertes Gen gebraucht wird: *proA*. Um dieses zu untersuchen wurden die Stämme MDB24 bis MDB28 mit den Promotormutationen M5, M6, M7, M9 und M10 in SMM und SMM mit 0,4 M NaCl kultiviert. Nach dem Erreichen der frühen stationären Phase (OD_{578} = 2) wurden die Zellen geerntet. Es folgte der Zellaufschluss und die anschließende Derivatisierung des Zellextrakts, der dann mittels HPLC – Chromatographie auf seinen Prolingehalt hin analysiert wurde. Die erhaltenen Werte sind in Abb.15 graphisch und in Tabelle 17 als numerische Werte dargestellt.

Dabei zeigte sich, dass die *proHJ*-Promotormutanten eine Überproduktion an Prolin aufwiesen. Das Maß der Überproduktion entsprach dem Muster der in den *treA*-Fusionsexperimenten bestimmten Promotoraktivitäten. Die Mutanten mit den höchsten Promotoraktivitäten produzierten auch am meisten Prolin. Allerdings wurde die Prolinsynthese nicht in dem Maß gesteigert wie die Promotoraktivität. Die Mutante M10 z.B. wies eine TreA-Aktivitätssteigerung bei 0 und 0,4 M NaCl von Faktor 43 bzw. 23 zum Wildtyp auf, während der Prolingehalt um Faktor 15 bzw. 3 höher war.

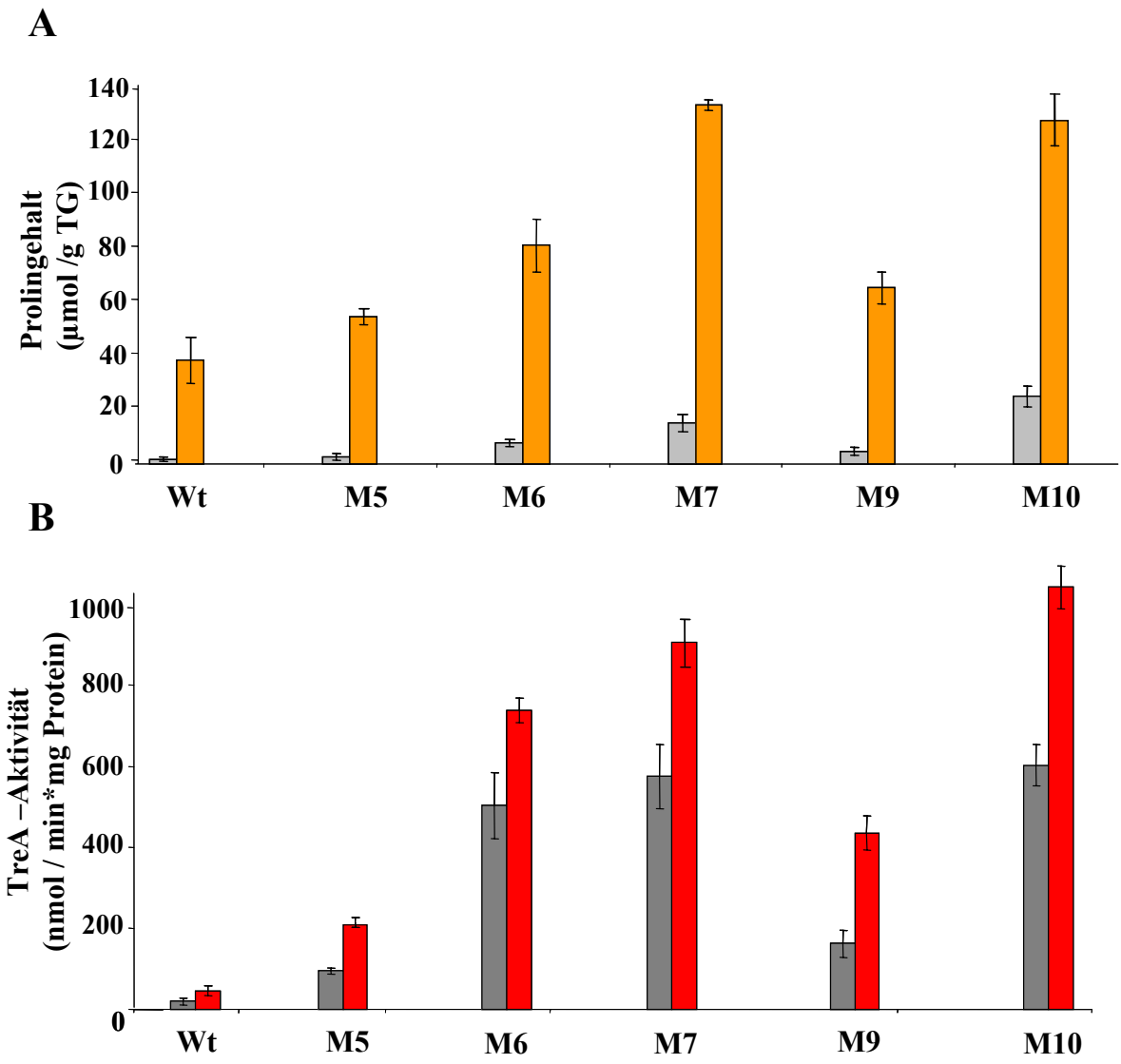


Abb. 15: Der Prolingehalt der Promotormutanten korreliert mit den TreA – Aktivitäten.

Der Prolingehalt ausgewählter *proHJ*-Mutanten ist in **A** dargestellt. Aus in SMM gewachsenen Übernachtkulturen der Stämme MDB20 und MDB24 bis MDB28 wurde SMM (■) und SMM mit 0,4 M NaCl (■) auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen der stationären Phase (OD_{578} = 2) kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse des Prolingehaltes mittels HPLC – Analysen. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung ± Standardabweichung. Die Stärke der Prolinüberproduktion der einzelnen Mutanten korreliert mit den in den Fusionsexperimenten ermittelten TreA- Aktivitäten (**B**) als Maß für die *proHJ* Promotoraktivität in SMM (■) und SMM mit 0,4 M NaCl (■).

Tabelle 17: Prolingehalt der *proHJ* Promotormutanten, TG: Trockengewicht.

Stamm	0 M		0,4 M	
	Prolingehalt (µmol g TG^{-1})	Prolingehalt Mutante: Wildtyp	Prolingehalt (µmol g TG^{-1})	Prolingehalt Mutante: Wildtyp
Wildtyp	**1,6**	**1**	**37**	**1**
Mutante M5	2,5	1,6	52,3	1,4
Mutante M6	7,4	4,6	77,7	2,1
Mutante M7	14,4	9	127,6	3,4
Mutante M9	4,4	2,8	62,7	1,7
Mutante M10	24	15	122,3	3,3

5. Phänotyp der prolinüberproduzierenden *proHJ*-Promotormutanten

5.1 Die *proHJ*-Promotormutanten zeigen trotz Prolinüberproduktion keinen Wachstumsvorteil unter hyperosmolaren Bedingungen

Der Befund, dass die Stämme MDB24 bis MDB28 Prolin überproduzierten, warf die Frage nach ihrer Osmoresistenz auf. Prolin ist ein wirksames Osmoprotektivum in *B. subtilis*. Der Wildtypstamm hat in SMM mit 0,4 M NaCl einen Prolingehalt von 37 µmol g TG^{-1} während z.B. die *proHJ* Mutante MDB28 (*proHmutM10´-proHJ*) unter gleichen Bedingungen einen Prolingehalt von 122 µmol g TG^{-1} aufweist. Es war denkbar, dass diese prolinüberproduzierende Stämme unter hochosmolaren Bedingungen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp haben.

Erste Analysen deuteten darauf hin, dass die Promotormutanten in SMM mit 1,1 M NaCl eventuell einen Wachstumsphänotyp besitzen. Um das Wachstum unter diesen Bedingungen zu analysieren wurde aus einer SMM Übernachtkultur SMM mit 1,1 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und das Wachstum anhand der Zunahme der OD_{578} verfolgt (Abb.16). Die Wachstumsanalysen sind mit den Stämmen MDB24 bis MDB28 (Mutanten M5, M6, M7, M9 und M10) durchgeführt worden. Als Referenz wurde parallel das Wachstum des Stammes MDB20 analysiert. Alle Mutanten verhielten sich gleich. Daher werden exemplarisch nur die Daten der Mutante M10, der Mutante mit der höchsten Prolinüberproduktion, gezeigt. In keinem Fall zeigte sich ein Wachstumsunterschied

zwischen Wildtyp und Mutante.

Auch weitere, unabhängige Experimente unter hypertonen Wachstumsbedingungen ergaben keinen Phänotyp. Die Promotormutanten haben demnach trotz der Überproduktion des kompatiblen Solutes Prolin unter den getesteten, hochosmolaren Bedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum.

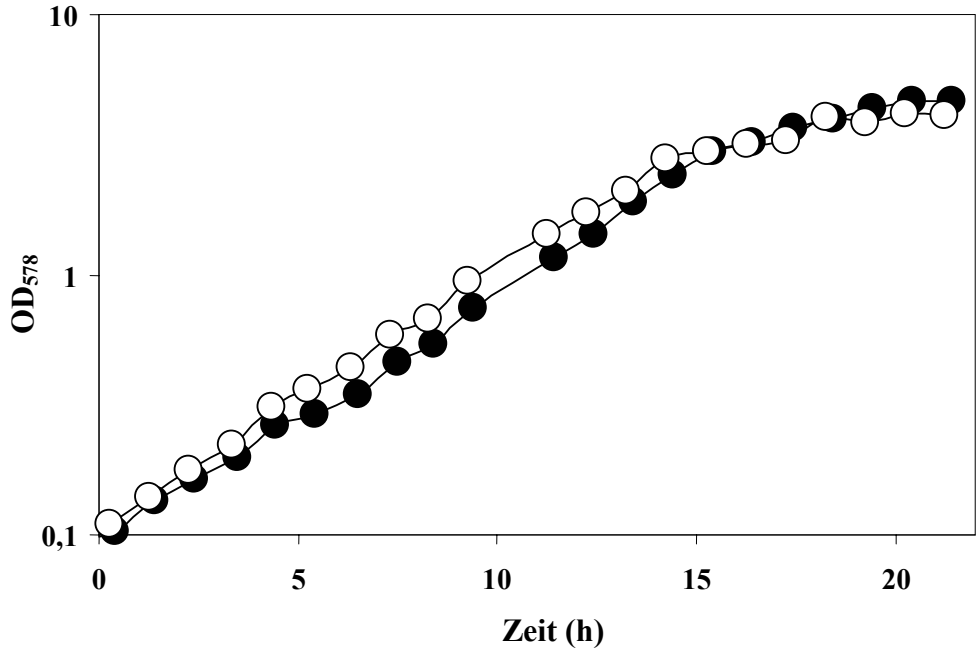


Abb. 16: Wachstumsanalysen der Hypermutante MDB28 (*proH$_{153}$mutM10´-proHJ*) unter hyperosmolaren Bedingungen.

Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur der Stämme MDB24 bis MDB28 und des Kontrollstammes MDB20 (○) wurde SMM, dessen Osmolarität durch 1,2 M NaCl erhöht wurde, auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Das Wachstum wurde anhand der OD_{578} – Zunahme in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Abgebildet ist exemplarisch das Wachstum des Stammes MDB28 (M10) (●).

5.2 Die *proHJ*-Promotormutanten zeigen trotz Prolinüberproduktion keinen Wachstumsvorteil unter Stressbedingungen

Prolin ist nicht nur ein Osmoprotektivum, sondern schützt *B. subtilis* auch vor Thermostress (Holtmann, 2003). Außerdem wurde es als Cryoprotektivum diskutiert (Hoffmann, pers. Mitteilung). Nichtsdestotrotz zeigen die prolinüberproduzierenden Stämme weder bei Hitze noch bei Kälte einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp.
Ebensowenig haben diese Stämme bei einem plötzlichen hypoosmotischen Schock einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt).
Weitere Versuche, die Prolinproduktion weiter zu steigern durch eine Überexpression des ProA Proteins oder durch die Zugabe des Substrates Glutamat und so einen Phänotyp zu erhalten brachten kein Ergebnis.

5.3 Die prolinüberproduzierenden *proHJ*-Promotormutanten sind weniger sensitiv gegenüber dem toxischen Prolinanalogon DHP

Aufgrund seiner Strukturanalogie zu der proteinogenen Aminosäure Prolin wird 3,4 Dehydro DL – Prolin (DHP) in Proteine eingebaut. Allerdings können Proteine, in die DHP statt Prolin eingebaut wurde, ihre Tertiärstruktur nicht mehr ausbilden und sind folglich inaktiv. Für die Zelle kann dies letal sein; daher ist DHP toxisch.
DHP wurde bereits früher verwendet, um Feedbackmutanten des Proteins ProB und damit prolinüberproduzierende Stämme zu selektieren. Eine Prolinüberproduktion kann den Effekt von DHP mildern, da mehr authentisches Prolin zum Einbau in die Proteine zur Verfügung steht. Vor diesem Hintergrund war die Frage zu klären, welche Wirkung DHP in den prolinüberproduzierenden *proHJ* -Promotormutanten hat. Dazu wurde die Mutante MDB28 (M10´*proHJ*) mit der höchsten Überproduktion auf ihre DHP – Resistenz überprüft und mit dem Wildtyp JH642 verglichen. Eine SMM-Übernachtkultur wurde in jeweils zwei Kolben auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert. In einem Kolben erfolgte die Zugabe von 1 mM DHP, während die andere unbehandelt blieb. Nach neunstündiger Kultivierung wurde das Wachstumsvermögen anhand der erreichten OD_{578} bestimmt (Abb.17).

Dabei stellte sich heraus, dass die Mutante MDB28 (*proHmutM10´-proHJ*) im Vergleich zum Wildtypstamm JH642 eine geringere Sensitivität gegenüber DHP besaß. Der Stamm JH642 zeigt nach DHP-Behandlung kein Wachstum, während das Wachstum des prolinüberproduzierenden Stammes MDB28 durch DHP kaum beeinträchtigt wird. Dem liegt vermutlich ein Verdünnungseffekt des DHPs durch das Überangebot an Prolin zugrunde.

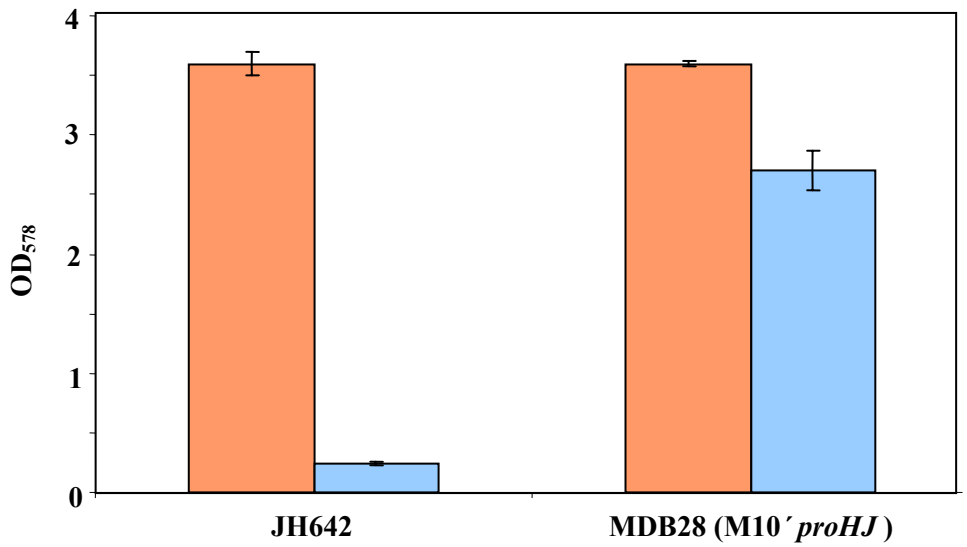


Abb. 17: Die prolinüberproduzierende Mutante MDB28 (*proHmutM10´-proHJ*) ist wenige sensitiv gegenüber DHP im Vergleich zum Wildtypstamm JH642.

Aus in SMM gewachsenen Übernachtkulturen der Stämme JH642 und MDB28 (M10´ *proHJ*) wurde SMM (■) und mit 1 mM DHP supplementiertes SMM (■) auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft. Nach neunstündiger Kultivierung wurde das Wachstumsvermögen anhand der erreichten OD_{578} bestimmt. Die präsentierten Daten sind die aus zwei unabhängigen Experimenten gebildeten Mittelwerte ± Standardabweichung.

6. Die osmotische Regulation des *proHJ* - Operons

Der osmotisch kontrollierte *proHJ*-Promotor wird von dem vegetativen Sigmafaktor σ^A erkannt. Die Regulation erfolgt also nicht über einen alternativen Sigmafaktor, wie das z.B. bei Hitzeschock oder Stickstofflimitation der Fall ist. Auch spielt nach bisherigen Kenntnissen der für die allgemeine Stressantwort verantwortliche Sigmafaktor σ^B bei der Expression des *proHJ* - Operons keine Rolle.

Das 153 bp minimale regulatorische Fragment ist in der Lage, eine osmoregulierte Expression zu vermitteln. Wird es mit dem Reportergen *treA* fusioniert, so unterliegt die

treA-Transkription einem osmotischen Stimulus. Wie der Regulationsmechanismus im Detail funktioniert, ist allerdings nicht bekannt.

6.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) des *proH*$_{153}$´-Fragmentes

Es gibt viele Beispiele für Transkriptionsregulationen, die mit Hilfe von Proteinen, Repressoren oder Aktivatoren, stattfinden. Bekanntestes Beispiel ist wohl die Transkription des *lac*-Operons aus *E. coli*, die u.a. von einem Repressorprotein (LacI) kontrolliert wird (Beyreuther *et al*., 1975).

Um die Hypothese zu untersuchen, dass ein Regulatorprotein bei der osmotischen Kontrolle des *proHJ*-Promotorfragmentes eine Rolle spielt, wurde ein sogenannter „Electrophoretic mobility shift assay", kurz EMSA, durchgeführt. Dieser Test beruht darauf, dass ein putatives Regulatorprotein an das 153 bp DNA-Fragment bindet und somit seine elektrophoretischen Eigenschaften verändert.

Es wurden Zellen in folgenden Medien bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase kultiviert: 0,1 x SMM, 1 x SMM, 1 x SMM mit 0,2 M NaCl und 1 x SMM mit 0,4 M NaCl. 0,1 x SMM wurde als Medium gewählt, da unter diesen Bedingungen der *proHJ* - Promotor nicht induziert ist (Dolezal, 2002). Die anderen Medien dienten dazu, unterschiedliche *proHJ*-Promotoraktivität zu induzieren, da die Aktivität linear der externen Osmolarität folgt (s. Abschnitt 1). Die Zellernte erfolgte per Zentrifugation, und Rohextrakte wurden präpariert. Das 153 bp-DNA-Fragment aus der *proHJ*-Promotorregion wurde mittels PCR amplifiziert, wobei fluoreszenzmarkierte Primer verwendet wurden. Die Inkubation der PCR–Produkte mit den entsprechenden Rohextrakten folgte, wobei darauf geachtet wurde, dass in jeder Inkubation gleiche Proteinmengen der Rohextrakte eingesetzt wurden. Als Kontrolle diente die Inkubation des PCR – Fragmentes ohne Rohextrakt. Die Proben wurden daraufhin auf einem 1 x TAE Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem Phosphoimager (Storm860, Amersham Pharmacia) analysiert. Die Laufweite des 153 bp-DNA-Fragmentes ließ sich mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten Enden nachweisen.

Die Analyse des Gels ergab, dass nach der Inkubation mit Rohextrakt aus Zellen mit induziertem *proHJ*-Promotor (1 x SMM ohne, plus 0,2 M, plus 0,4 M NaCl) das DNA – Fragment nicht so weit in Richtung der Anode gewandert war wie die Kontrolle ohne Rohextrakt. Die elektophoretischen Eigenschaften hatten sich in diesen Proben verändert. Die Probe mit 0,1 x SMM – Rohextrakt hingegen zeigte dieselbe Laufweite wie die Kontrolle ohne Rohextrakt.

Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass in den Proben mit aktivem *proHJ*-Promotorfragment tatsächlich etwas an das $proH_{153}'$- Fragment bindet, dass bei den Proben mit inaktivem *proHJ* -Promotor fehlt. Ob es sich hierbei um einen reellen Transkriptionsaktivator, ein Artefakt wie z.B. die RNA-Polymerase oder um unspezifisch bindende Proteine handelte, blieb unklar.

Der EMSA gibt Aufschluss über die Veränderung der elektrophoretischen Eigenschaften eines DNA – Moleküls und lässt somit Rückschlüsse auf die Bindung eines Proteins zu, kann aber nicht zur Identifizierung des putativen Regulatorproteins beitragen. Versuche, dieses an das $proH_{153}'$-Fragment bindende putative Protein zu isolieren, schlugen fehl. Eine Aufreinigung der „geshifteten" Banden aus dem EMSA – Gel brachte keinen Erfolg. Der Versuch, dieses putative Protein mit Hilfe des biotinilierten, an eine Streptavidin – Agarose gekoppelten $proH_{153}'$ – Fragmentes aufzureinigen schlug fehl.

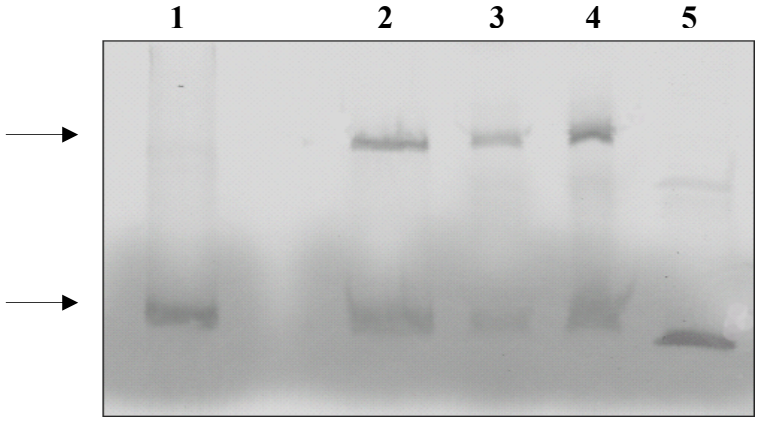


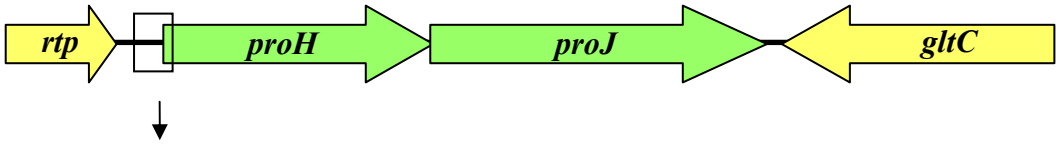
Abb.18: EMSA des 153 bp *proHJ* regulatorischen Fragmentes.

Das regulatorische $proH_{153}$- Fragment wurde mittels fluoreszenzmarkierter (Cy5) markierter Primer amplifiziert, mit Zellrohextrakt inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufweite des $proH_{153}$ – Fragmentes wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. **1:** 0,1 x SMM; **2:** 1 x SMM; **3:** 1 x SMM mit 0,2 M NaCl; **4:** 1 x SMM mit 0,4 M NaCl; **5:** Kontrolle ohne Zellextrakt. Die Probe mit Extrakt aus 0,1 x SMM-Zellen wies dieselbe Laufweite auf wie die Kontrolle ohne Zellextrakt. Alle anderen Proben mit Extrakten aus Zellen mit induziertem Promotor zeigten eine deutliche Retardierung des DNA-Fragmentes.

6.2 Die Schlüsseldeterminante zur osmotischen Regulation von *proHJ* liegt vermutlich in der 5´ nichttranslatierten Region der mRNA

Das *proH*$_{153}$´ - Fragment ist ausreichend, um eine osmotische Regulation des darauf folgenden Gens in *B. subtilis* zu gewährleisten. Dies konnte in den vorher beschriebenen Versuchen nachgewiesen werden. Der *proHJ*-Promotor liegt 32 bp stromabwärts vom 5´-Ende des *proH*$_{153}$´- Fragmentes und 93 bp stromaufwärts vom Translationsstart des *proH* Gens. Um die Frage zu klären, ob der Bereich stromaufwärts des Promotors oder die 5´untranslatierte Region der *proHJ*-mRNA verantwortlich ist für die osmotische Kontrolle oder ob sogar ein Zusammenspiel von beiden nötig ist, wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde ein *proH´*-Fragment hergestellt, dessen Bereich stromaufwärts des Promotors auf 5 bp verkürzt ist. Durch die Klonierung in den Vektor pJMB1 wurde es mit dem Reportergen *treA* fusioniert und mittels doppelt homologer Rekombination stabil in das Genom des *B. subtilis* Stammes FSB1 [*(treA::neo)*1] eingebracht. Aus einer in SMM gewachenen Übernachtkultur des so entstandenen Stammes MDB47 (*proH126´-treA*) wurde SMM und SMM mit 0,4 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,8-1) kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der TreA – Aktivität als Maß für die Expression des *proHJ* Promotors. Der Stamm JSB36 (*proH*$_{153}$´*- treA*) diente als Referenz (Abb.19).
Es zeigte sich, dass das *proH*$_{126}$´– Fragment in gleicher Weise wie das *proH*$_{153}$´ Fragment eine osmotische Regulation vermittelt. In den Promotormutagenesen konnte der Promotor als Schlüsselelement für die osmotische Regulation ausgeschlossen werden. Daher liegen die für eine osmotisch kontrollierte Transkription essentiellen *cis* Elemente also vermutlich in der 5´ untranslatierten Region der *proHJ*-mRNA in *B. subtilis*.

A



5´…TCATTATACATATTTGTCGAAAAGAAACAATACAAATCAATAATGGCCTT

-35 **-10**

CAAAC**TTGACA**TCATTTCCTCACG**TG**G**TAACAT**TTTAAACGTGTGAAAATGC

GAACAAAAAAGCGAACAAAGGAGATGTTACCGATCTTTGATCAAAAGAAA

GTAGCCTTTAT**AGGAG**CAGGATCT **ATG TTA CCG** . . . ***proH* 3´**

rbs

B

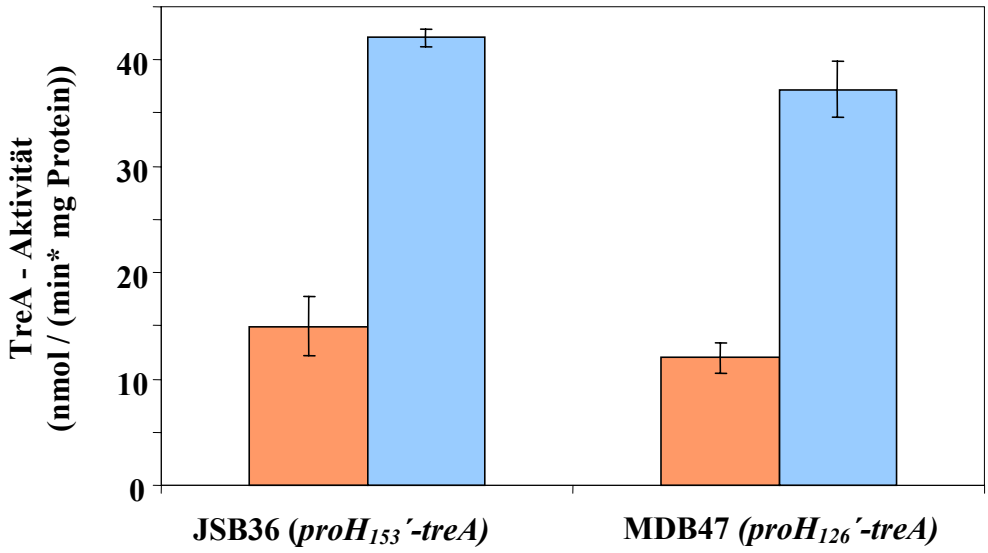


Abb. 19: 126 bp genügen, um die osmotische Regulation von *proHJ* zu vermitteln.

A: Die *proHJ*-Genregion aus *B. subtilis*. Das 126 bp Promotorfragment ist in blau dargestellt, die Elemente des osmoregulierten Promotors, der dazugehörige Transkriptionsstart und die putative Ribosomenbindestelle sind hervorgehoben (Brill, 2002). In rot markiert ist das 5´Ende des 153 bp Fragmentes.
B: Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur der Stämme JSB36 (*proH*$_{153}$*´-treA)* und MDB47 (*proH*$_{126}$*´-treA)* wurde in SMM und SMM mit 0,4 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD_{578} 0,8 bis 1) kultiviert. Als Maß für die Expression des *proHJ*-Promotors wurde die TreA-Aktivität bestimmt. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

6.3 Das 126 bp minimale regulatorische *proHJ* - Fragment ist hochkonserviert in *Bacilli*

Im letzten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Schlüsseldeterminante *in cis* für die osmotisch kontrollierte Transkription des *proHJ*-Operons aus *B. subtilis* in 126 bp stromaufwärts des *proH* Startcodons liegt. Neben *B. subtilis* gibt es noch weitere *Bacilli*, die unter Osmostress Prolin als kompatibles Solut durch endogene *de novo* Synthese akkumulieren (Bursy, 2005).

Aus drei dieser *Bacilli*, den Stämmen *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42), *Bacillus mojavensis* (DSM9205^T) und *Bacillus vallismortis* (DSM11031^T), wurde chromosomale DNA präpariert. Mit Hilfe der Oligonukleotide proHJ5-JS17 (bindet 153 bp vor Translationsstart des *proH* Gens) und proHJ5IRD (bindet innerhalb des *proH* Gens) wurde ein Fragment aus der *proH*-Region amplifiziert. Anschließend wurden die erhaltenen PCR – Produkte mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Primers proHJ5 IRD sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der aus *B. subtilis* bekannten Sequenz verglichen. Weiterhin wurde aus dem sequenzierten Genom von *Bacillus licheniformis* (Veith *et al*., 2004), einem weiteren Prolinakkumulierer, das entsprechende Fragment zu diesem Vergleich hinzugefügt.

Der Sequenzvergleich zeigte, dass bei allen getesteten Organismen offenbar das 5´-Ende eines *proH* ähnlichen Strukturgenes in dem amplifizierten Bereich liegt. Die Ähnlichkeiten zur Sequenz aus *B. subtilis* sind überzeugend (Abb. 20).

Fokussiert man den Sequenzvergleich auf das regulatorische 126 bp DNA – Fragment, so zeigt sich eine Sequenzidentität von 79% der *Bacilli*-Fragmente im Vergleich zu dem aus *B. subtilis*. Dabei fällt auf, dass die Sequenz aus *B. licheniformis* deutlich heterologer ist als die der anderen vier Organismen. Streicht man *B. licheniformis* aus dem Vergleich des 126 bp Fragmentes, so liegt die Sequenzidentität der verbleibenden *Bacilli* bei 95,3 % (Abb.20A).

Es lässt sich vermuten, dass die so ähnlichen Sequenzen in den jeweiligen Organismen ebenfalls eine osmotische Regulation vermitteln. Für *B. licheniformis* konnte dies sogar gezeigt werden (s. Kapitel 7).

6.4 Deletionsanalysen der 5´UTR der *proHJ*-mRNA

Die Daten der Promotormutagenese und der Verkürzung des minimalen regulatorischen Fragmentes lassen vermuten, dass sich die Schlüsseldeterminante zur osmotischen Regulation des *proHJ*- Promotors in der 5´ nichttranslatierten Region befindet. Um in dieser Region zwischen Promotor und Translationsstart von *proH* eventuelle für die Osmoregulation essentielle Elemente zu identifizieren, wurden Deletionsanalysen durchgeführt. Die mutierten Regionen wurden mit Hilfe des Sequenzvergleiches der *proH* Region verschiedener *Bacilli* ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, Bereiche zu deletieren, die hochkonserviert sind, da diese wahrscheinlich für eine osmotische Regulation wichtig sind.
Es wurden in vier einzelnen Mutanten jeweils ca. 10 bp aus dem Fragment eliminiert (*proH* del). Dies geschah mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese der *proH´-treA* Fusion im Vektor pJS35. Die entsprechenden Mutanten wurden mittels eines doppelt homologen Rekombinationsereignisses in den Stamm FSB1 [(*treA*::*neo*)1] eingebracht. Die so entstandenen Stämme wurden MDB61 bis MDB64 genannt. Zur Untersuchung des Phänotyps der *proH* del – Mutanten wurde aus einer SMM Übernachtkultur dieser Stämme SMM und SMM mit erhöhter Osmolarität (0,4 M NaCl) auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Nach dem Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,8 bis 1) wurde die TreA – Aktivität als Maß für die Expression des *proH* Promotors bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die eingeführte Deletion del1 die Expression des *proHJ*-Promotors steigert (um ca. Faktor 2), die osmotische kontrollierte, ca. zweieinhalbfache Induktion ist aber immer noch vorhanden. Die Einbringung der Deletion del 2 weist bei 0 M die gleiche Aktivität wie der Wildtyp auf, kann aber bei 0,4 M nicht mehr in dem Maße induziert werden (Faktor 1,5). Der Promotor mit der Deletion del3 ist inaktiv und lässt sich auch nicht durch einen osmotischen Reiz stimulieren. Die Deletion del4 führt zu einer geringeren Aktivität bei 0 M (16 statt 25 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$) und einer geringeren Induktion (Faktor 1,5).
Unter den vier eingeführten Deletionen zeigte die Deletion del3 den drastischsten Effekt auf die Aktivität des *proHJ* - Promotors. Daher wurde dieses Fragment in einer weiteren, ortsgerichteten Mutagenese detaillierter untersucht.

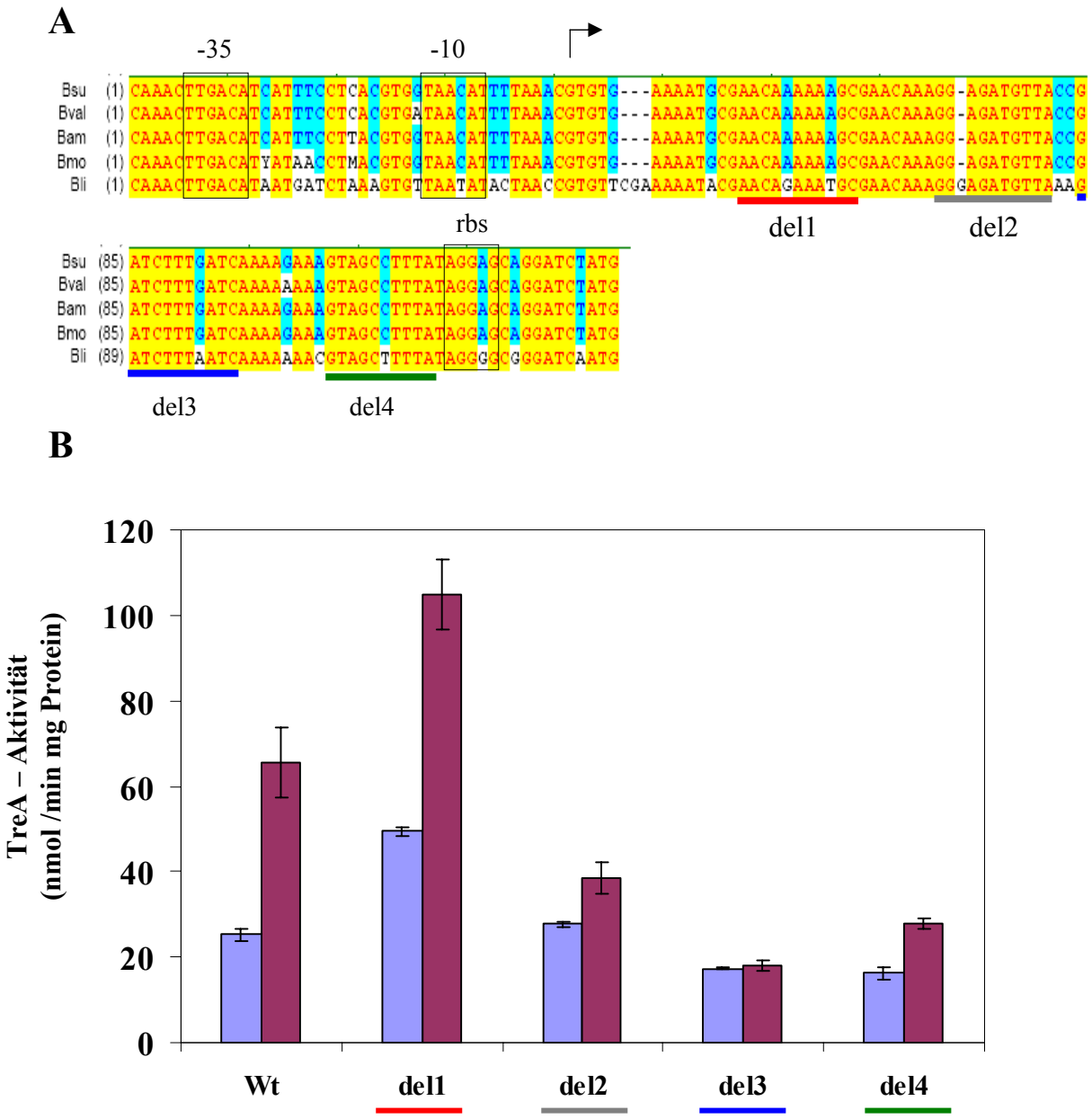


Abb. 20: Die in das *proH*$_{153}$´ Fragment eingeführten Deletionen und die daraus resultierende Promotoraktivitäten.

A: Sequenzvergleich der *proH*$_{126}$-Fragmente in ausgewählten *Bacilli*. Die Sequenzen aus *B. subtilis* (Bsu) und *B. licheniformis* (Bli) wurden den jeweiligen veröffentlichten Genomsequenzen entnommen. Zur Gewinnung der Sequenzen aus *B. amyloliquefaciens* (Bam), *B. mojavensis* (Bmo) und *B. vallismortis* (Bval) wurden die durch PCR mit *proH* spezifischen Primern gewonnenen PCR – Fragmente analysiert. Der in *B. subtilis* identifizierte Promotor ist umrandet; die deletierten Regionen sind farbig unterlegt.

B: Aktivität der Promotoren mit den eingeführten Deletionen del 1 – 4. Aus SMM Übernachtkulturen der Stämme MDB61 - 64 wurde SMM und SMM mit 0,4 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft, bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase (OD_{578} 0,8 – 1) kultiviert und die TreA-Aktivität als Maß für die Expression des *proHJ* Promotors bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

A

proHJ	**...CCGATCTTTGATCAAAAGAAA…**
proHdel3	**…CC----------AAAAGAAA…**
proHmutM11	**... CCGATC----------AGAAA…**
proHmutM12	**...CCGATCTGTGATTAACAGAAA…**

B

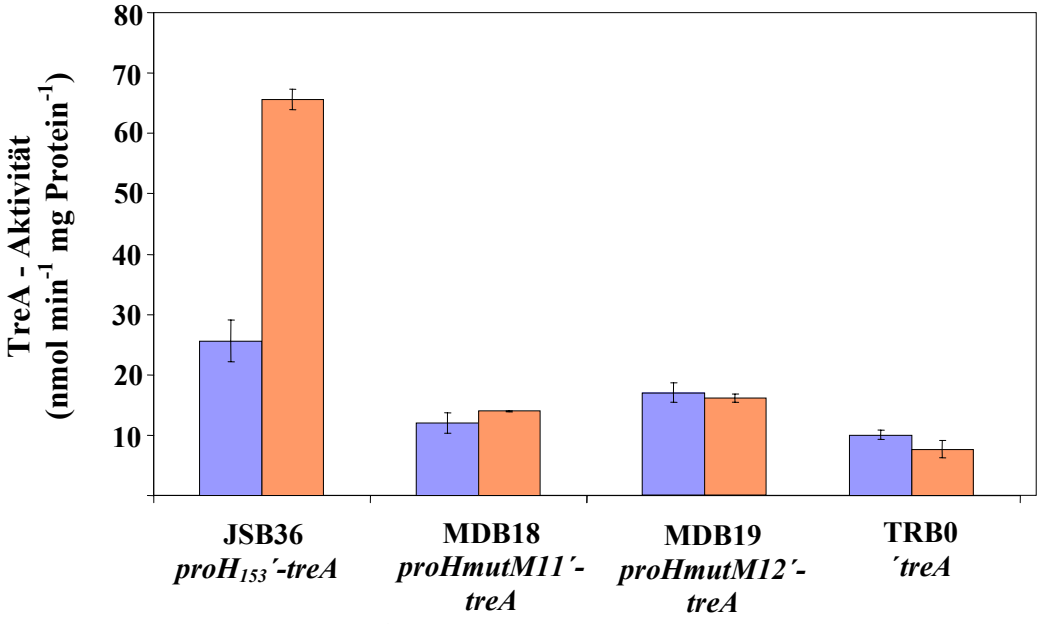


Abb. 21: Die in die *proHJ*-Promotorregion eingeführten Mutationen M11 und 12.

Die im vorangegangenen Experiment deletierte Region del3 wurde in einer weiteren Mutagenese detaillierter untersucht. Es wurden die Mutationen M11 und M12 eingeführt (A). Die Stämme mit diesen Promotormutationen wurden in SMM ohne (■) und mit 0,4 M NaCl (■) auf ihre TreA – Aktivität hin als Maß für die Expression des *proHJ* -Promotors analysiert. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

In der Mutation M11 wurde eine Region deletiert, die mit der del 3 Region um 7 bp überlappt. Der so mutierte Promotor weist kaum noch Expression auf, ebenso wie die del 3 - Mutante. Es war denkbar, dass dieser Effekt auf der Verkürzung der 5´UTR beruht und dass es dadurch zu einem Stabilitätsverlust der mRNA kommt. Um dies aufzuklären, wurde die Region durch einen Austausch von Basen verändert (M12). Diese Mutante zeigt denselben Aktivitätsverlust wie die eingeführten Deletionen (s. Abb.21). Ein Vergleich mit dem Kontrollstamm TRB0, der ein promotorloses *treA* trägt, zeigt, dass der Promotor in den Mutationen M11 und M12 praktisch nicht mehr aktiv ist. Dies lässt sich auch nicht durch einen osmotischen Reiz kompensieren.

6.5 Für die osmotische Regulation des *proHJ*-Operons ist keiner der bekannten Transkriptionsregulatoren aus *B. subtilis* verantwortlich

In Kooperation mit Kazuo Kobayashi (Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, Japan) wurde der Einfluss der bisher bekannten bzw. aufgrund ihrer Sequenzhomologie wahrscheinlichen Transkriptionsregulatoren aus *B. subtilis* auf *proHJ* untersucht (s. Anhang).

Dazu wurde zunächst eine transkriptionelle *lacZ* – Fusion der *proHJ*-Promotorregion benötigt, da die Reportergenaktivität auf Festmedium sichtbar gemacht werden sollte. Das Plasmid pMD23 *amyE*:: [Φ (*proH*$_{153}$′- *lacZ erm*)] wurde mittels doppelt homologer Rekombination stabil in die *amyE*-Region des Stammes JH642 eingebracht. Der so entstandene Stamm wurde MDB38 genannt.

Kazuo Kobayashi konstruierte eine Kollektion von *B. subtilis* Stämmen, bei denen jeweils ein Gen für einen putativen Transkriptionsregulator unterbrochen war. Um nun zu untersuchen, ob die *proHJ*-Expression von einem dieser Regulatoren kontrolliert wird, wurden die chromosomalen DNAs der Transkriptionsregulator- Mutanten präpariert und mittels natürlicher Kompetenz in den *proH*$_{153}$′*-lacZ* Stamm MDB38 eingebracht. Die Transformanden wurden auf die Chloramphenicolresistenz der Regulatormutation selektiert. Die Expression des Promotors wurde anhand der auf Festmedien (SMM und LB) mit X-Gal sichtbar gemachten β –Galaktosidase - Aktivität analysiert (s.Anhang 1).

Die einzige der untersuchten Mutanten, die ein vom Wildtyp abweichendes Expressionsmuster aufwies, war die *sigH* –Unterbrechungsmutante. Diese zeigte eine höhere *LacZ*-Aktivität als der Wildtypstamm MDB38.

In keiner der Mutanten konnte eine Herabsetzung der LacZ – Aktivität beobachtet werden.

6.5.1 Eine *sigH* – Mutante besitzt eine höhere *proHJ*-Promotoraktivität

Die einzige Mutation, die in dem von Kazuo Kobayashi durchgeführten Experiment einen Effekt auf die Aktivität des *proH*-Promotors hatte, war die Unterbrechung des *sigH*-Strukturgenes. In diesem Stamm zeigte der Promotor eine höhere Aktivität als im Wildtypstamm. Diese Experimente wurden sowohl in SMM als auch in LB durchgeführt. Nun sollte die osmotische Regulation der Aktivität untersucht werden.
Zu diesem Zweck wurde eine in SMM gewachsene Übernachtkultur der Stämme MDB38 (*proH*$_{153}$′- *lacZ*) und seines *sigH* ¯ -Derivates MDB51 in SMM und SMM mit erhöhter Osmolarität (0,4 M NaCl) auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Nach dem Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,8 bis 1) wurde die LacZ – Aktivität als Maß für die Expression des *proH* – Promotors bestimmt (s. Abb.22).

Dabei wurde bestätigt, dass die Disruption des *sigH*-Strukturgens eine erhöhte Aktivität des *proHJ*-Promotors zur Folge hat. Sowohl in 1 x SMM und 1 x SMM mit 0,4 M NaCl ließ sich, verglichen mit dem Wildtyp, eine doppelt so hohe Expression nachweisen (28 bzw. 62 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ im Vergleich zu 13 bzw. 28 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$). Einzig bei der in 0,1 x SMM gewachsenen Kultur lässt sich kein Unterschied feststellen (6 bzw. 8 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$). Beide Stämme zeigen nach wie vor eine osmotisch stimulierte Aktivität des *proHJ* - Promotors. Im Vergleich zu SMM wird die Aktivität in SMM mit 0,4 M NaCl in beiden Stämmen um den Faktor 2,2 induziert.

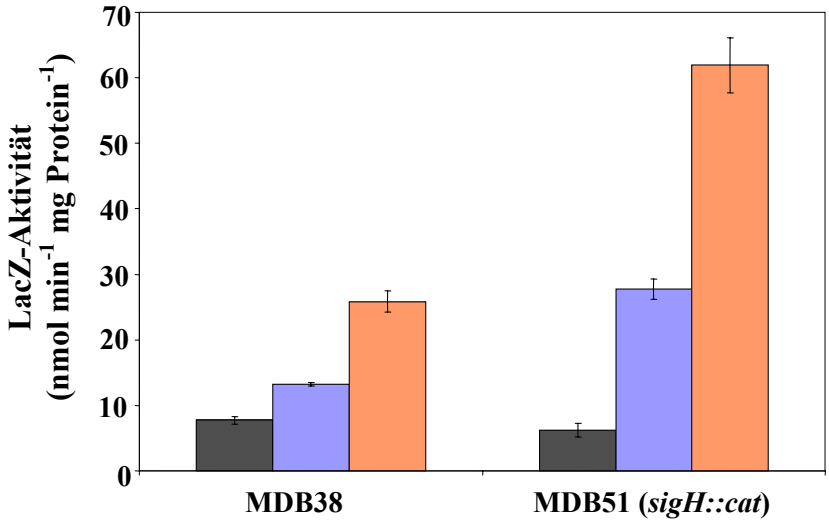


Abb. 22. LacZ-Aktivität der Stämme MDB38 und MDB51.

Beide Stämme tragen eine *proH*$_{153}$*'-lacZ* – Fusion. In MDB51 ist zusätzlich das Strukturgen *sigH* unterbrochen [(*sigH::cat*)1]. Dargestellt sind die nach Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,8-1) ermittelten LacZ Aktivitäten in 0,1 x SMM (■), 1 x SMM (■) und 1 x SMM mit 0,4 M NaCl (■). Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

7. Gene der Prolinsynthese in *B. licheniformis*

Bacillus licheniformis gehört wie *Bacillus subtilis* zu der Gruppe von *Bacilli*, die neben Glutamat Prolin als dominantes, endogen synthetisiertes kompatibles Solut nutzen (Kuhlmann, 2002; Bursy, 2005). Bei *B. licheniformis* handelt es sich aufgrund seiner Nutzbarkeit als Lieferant von Proteasen und Amylasen um einen Organismus von großem industriellen Interesse. Das Genom von *B. licheniformis* wurde sequenziert und veröffentlicht (Veith *et al*., 2004). Bioinformatische Analysen ergaben, dass es in *B. licheniformis* offensichtlich mehrere Prolinsynthesewege gibt. Die Prolinversorgung für anabole Zwecke wird in *B. subtilis* durch den ProBA-Syntheseweg sichergestellt (Belitsky, 1998). Die daran beteiligten Gene *proB*, *proA*, *proG* und *proI* besitzen ein jeweiliges Pendant im Genom von *B. licheniformis,* die ihrer Homologie entsprechend benannt worden (Abb. 23). Daneben liegen sowohl in *B. subtilis* als auch in *B. licheniformis* in einem Operon organisierte Prolinsynthesegene vor. Im Gegensatz zu der Genorganisation in *B. subtilis* allerdings befindet sich in diesem Operon stromabwärts der *proHJ*-Gene ein weiteres Gen, das eine Homologie zu *proA* aus *B. subtilis* aufweist und als *proAA* annotiert wurde (Veith *et al.*, 2004). Dieser Befund ließ vermuten, dass in *B. licheniformis* eine vollständige Separierung der Prolinsynthesewege für anabole und osmoprotektive Zwecke stattfindet.

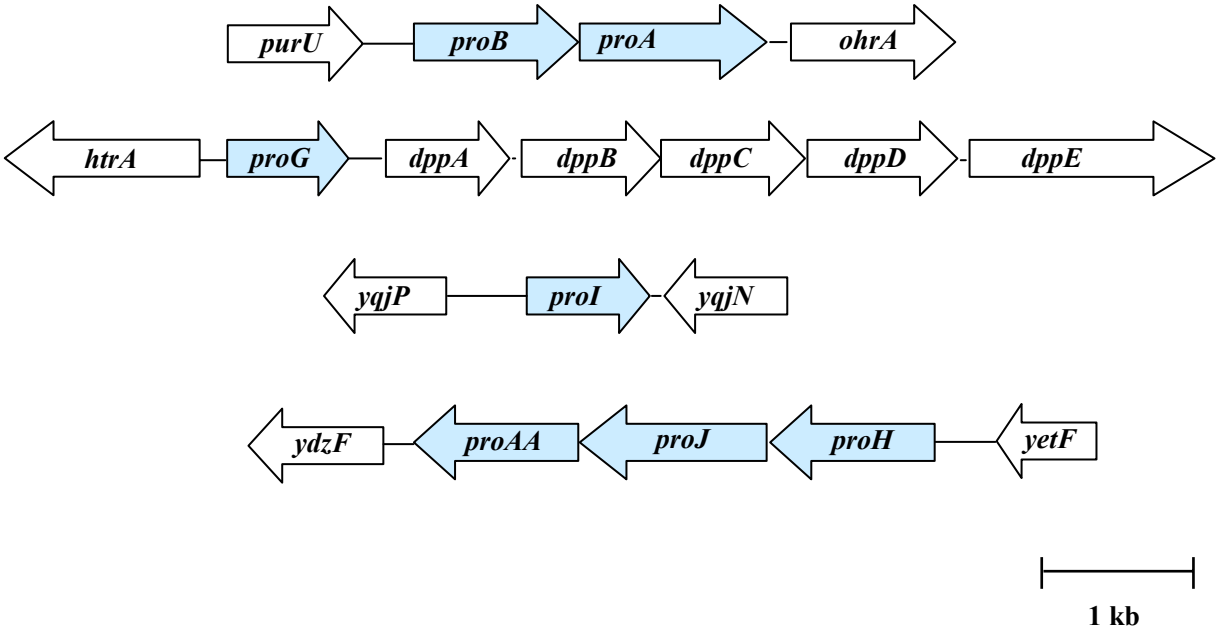


Abb. 23: Organisation der wahrscheinlichen Prolinsynthesegene in *B. licheniformis.*

Abgebildet ist die Organisation der wahrscheinlichen Prolinsynthesegene im Genom von *B. licheniformis*. Die Gene wurden aufgrund ihrer Homologie zu den bekannten Prolinsynthesegenen aus *B. subtilis* benannt.

7.1 Die osmotisch regulierte Prolinsynthese in *Bacillus licheniformis*

Die Anhäufung des kompatiblen Solutes Prolin verläuft in *B. subtilis* in enger Anlehnung an den umgebenden osmotischen Reiz. Allerdings lässt sich in diesem Organismus die osmotisch stimulierte Prolinsynthese durch die externe Zugabe eines kompatiblen Solutes wie z.B. Glycin Betain vollständig unterdrücken (Brill, 2002). Nun sollte die osmotisch kontrollierte Prolinakkumulation durch Neusynthese und die Auswirkungen von Glycin Betain in dem ebenfall prolinakkumulierenden Organismus *B. licheniformis* untersucht werden. Hierzu wurde der Wildtypstamm DSM13 in SMM mit aufsteigenden NaCl Konzentrationen ohne bzw. mit der Zugabe von 1 mM Glycin Betain bis zum Erreichen der frühen stationären Wachstumsphase ($OD_{578} = 2$) kultiviert. Aus den Ganzzellextrakten wurde der intrazelluläre Prolingehalt mittels HPLC bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass in *B. licheniformis* eine intrazelluläre Anhäufung von Prolin durch endogene Synthese erfolgt, deren Menge mit der Osmolarität des externen Mediums korreliert. Die äußere Zugabe eines kompatiblen Solutes wie Glycin Betain reprimiert die Neusynthese von Prolin. Die Prolinakkumulation wird durch die Zugabe von 1 mM Glycin Betain vollständig inhibiert (s. Abb.24).

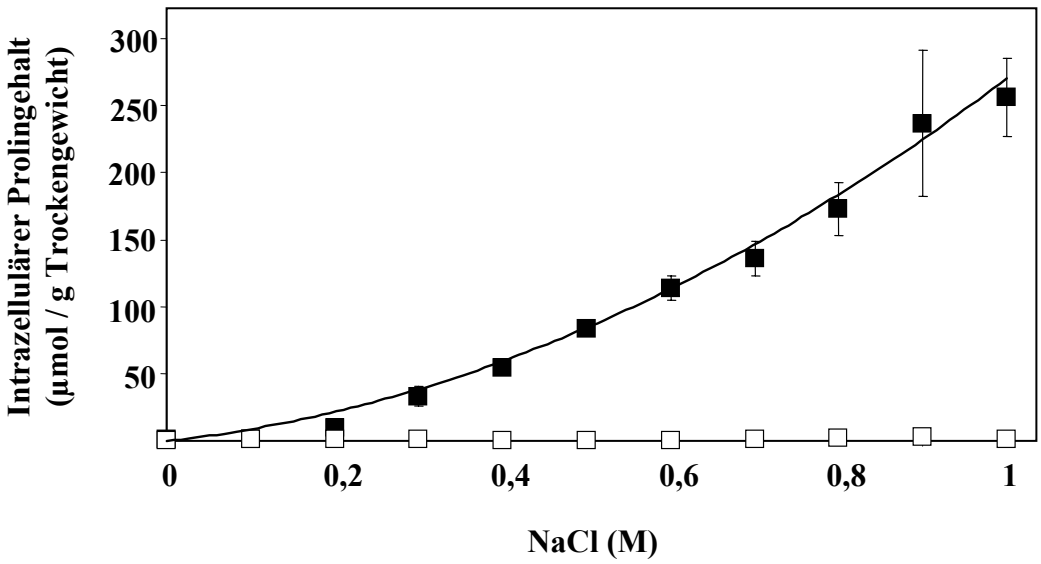


Abb. 24: Prolingehalt osmotisch gestresster *B. licheniformis* Zellen.

Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur des *B. licheniformis* Wildtypstammes DSM13 wurde SMM mit aufsteigenden NaCl – Konzentrationen auf eine OD578 von 0,1 angeimpft ohne (■) und mit der Zugabe von 1 mM Glycin Betain (□) und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase (OD578 = 2) kultiviert. Ganzzellextrakte wurden präpariert und der Prolingehalt mittels HPLC – Analysen bestimmt. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung ± Standardabweichung.

7.2 Die Gene *proH, proJ und proAA* aus *B. licheniformis* werden als osmotisch reguliertes Operon transkribiert

In Prokaryonten werden oft mehrere Gene, die ein- und denselben Stoffwechselweg betreffen, in einer polycistronischen mRNA als Operon transkribiert. So werden z.B. die Gene *proH* und *proJ* aus *B. subtilis* als Operon transkribiert, dessen Expression einem osmotischen Stimulus unterliegt (s. Abschnitt 7.1). Um zu klären, ob die Gene *proH, proJ* und *proAA* aus *B. licheniformis* ebenfalls als Operon transkribiert werden, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur des *B. licheniformis* Wildtypstammes DSM13 wurde in SMM und SMM mit 0,8 M NaCl bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,8 bis 1) kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde präpariert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit antisense RNA – Sonden, die spezifisch gegen *proH, proJ* bzw. *proAA* gerichtet waren (s. Abb.25).

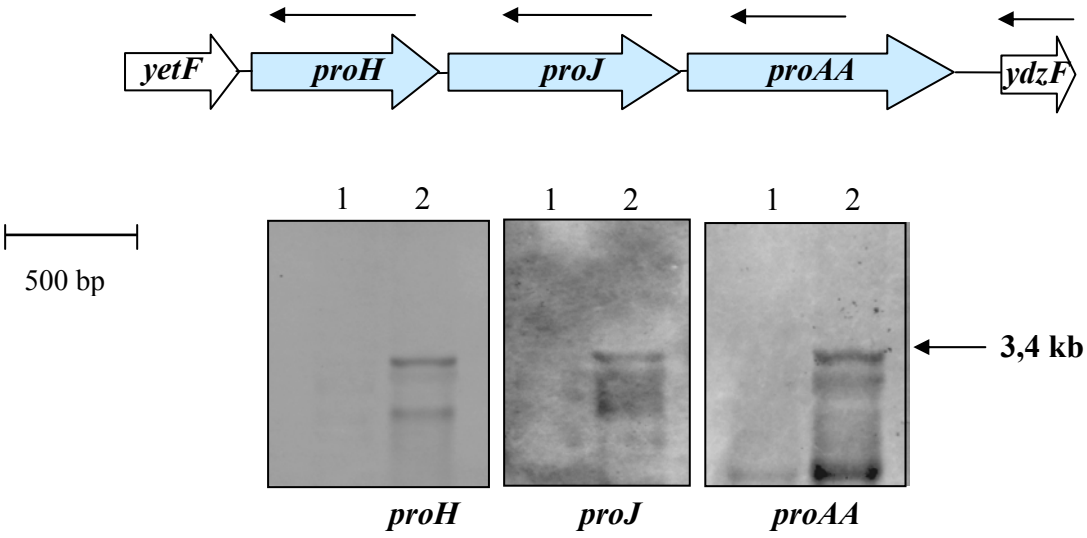


Abb.25: Transkriptionsanalysen der Gene *proH*, *proJ* und *proAA* in *B. licheniformis*.

Aus exponentiell wachsenden Zellen des *B. licheniformis* Stammes DSM13 in (1) SMM und (2) SMM, dessen Osmolarität mit 0,8 M NaCl erhöht wurde, wurde Gesamt-RNA präpariert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Nylonmembran wurde mit spezifischen Sonden, die gegen *proH* , *proJ* bzw. *proAA* gerichtet waren, hybridisiert. Pro Spur wurde 15 µg RNA eingesetzt. Die Lage der Sonden ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Die mit diesen drei Sonden detektierten Signale zeigten eine einzelne mRNA Spezies derselben Größe. Dieses Transkript wies eine Größe von ca. 3400 bp auf. Die kalkulierte Distanz zwischen dem Translationsstart von *proH* und dem Stopcodon von *proAA* beträgt 3258 bp, was im Einklang mit der detektierten Transkriptgröße steht. Dieses Transkript konnte nur in den osmotisch gestressten (0,8 M NaCl) Zellen nachgewiesen werden. *proH*, *proJ* und *proAA* werden also als Operon transkribiert, dessen Expression durch hohe Osmolarität stimuliert wird.
Der offene Leserahmen *ydzF* stromabwärts von *proAA* wird nicht mit *proHJAA* kotranskribiert. Dies konnte in Northern Blot Analysen mit einer *ydzF* spezifischen Sonde nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

7.3 In *B. licheniformis* erfolgt die Transkription der anabolen Prolinsynthesegene unabhängig von der externen Salinität

B. subtilis besitzt neben dem osmoregulierten Prolinsyntheseweg einen alternativen Weg, der die Zelle mit Prolin für anabole Zwecke versorgt. Dieser Syntheseweg wird von Isoenzymen zum ProHJ - Weg katalysiert: ProB, ProA, ProG und ProI. Die dafür codierenden Gene werden in *B. subtilis* unabhängig von der äußeren Osmolarität exprimiert (Brill, 2002).
Im Genom von *B. licheniformis* wurden Gene identifiziert, die eine hohe Homologie zu den anabolen Prolinsynthesegenen aus *B. subtilis* aufweisen. Sie wurden entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit als *proB*, *proA*, *proG* und *proI* bezeichnet (Veith *et al.*, 2004).
Die Gene *proB* und *proA* werden in *B. subtilis* als Operon transkribiert. Auf dem Chromosom von *B. licheniformis* liegen *proB* und *proA* direkt hintereinander mit einem Abstand von 13 bp, was wie in *B. subtilis* ebenfalls eine Kotranskription dieser beiden Gene vermuten ließ.
Zur detaillierten Transkriptionsanalyse der Gene *proB*, *proA*, *proG* und *proI* aus *B. licheniformis* wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden Zellen des *B. licheniformis* Wildtypstammes DSM13 in SMM und SMM mit erhöhter Osmolarität (0,8 M NaCl) bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD578 0,8 bis 1) kultiviert. Die daraus isolierte Gesamt – RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte mit antisense RNA – Sonden, die spezifisch gegen die Gene *proBA*, *proG* und *proI* gerichtet waren (Abb.26).
Die spezifischen Sonden gegen *proB* und *proA* detektierten jeweils eine einzelne mRNA – Spezies einer ungefähren Größe von 2700 bp. Die berechnete Distanz vom Translationsstart

von *proB* bis zum Translationsende von *proA* beträgt 2357 bp. *proB* und *proA* werden demnach als Operon transkribiert. Die detektierten Transkriptgrößen betrugen für *proG* ca. 850 bp und für *proI* ca. 1100 bp (die codierenden Sequenzen betragen 812 bzw. 821 bp). *proG* und *proI* werden demnach, wie auch in *B. subtilis*, jeweils als monocistronische mRNA transkribiert. Der Grund für das im Vergleich zu der codierenden Sequenz sehr große Transkript von *proBA* und *proI* könnte in einem stromaufwärts vom Translationsstart liegenden T-Box-Element liegen. Diese ist in den homologen Genen aus *B. subtilis* zu finden und weist eine Größe von ca. 250 bp auf (Brill, 2002). Mit der *proI* spezifischen Sonde ließen sich zwei Signale detektieren, die von der Größe her dicht beieinander lagen. Es konnte nicht geklärt werden, woher diese zweite Bande kommt.

In allen Fällen war die detektierte Transkriptionsstärke bei 0 M und 0,8 M gleich. Die Expression der anabolen Prolinsynthesegene in *B. licheniformis* erfolgt also unabhängig von äußeren osmotischen Reizen.

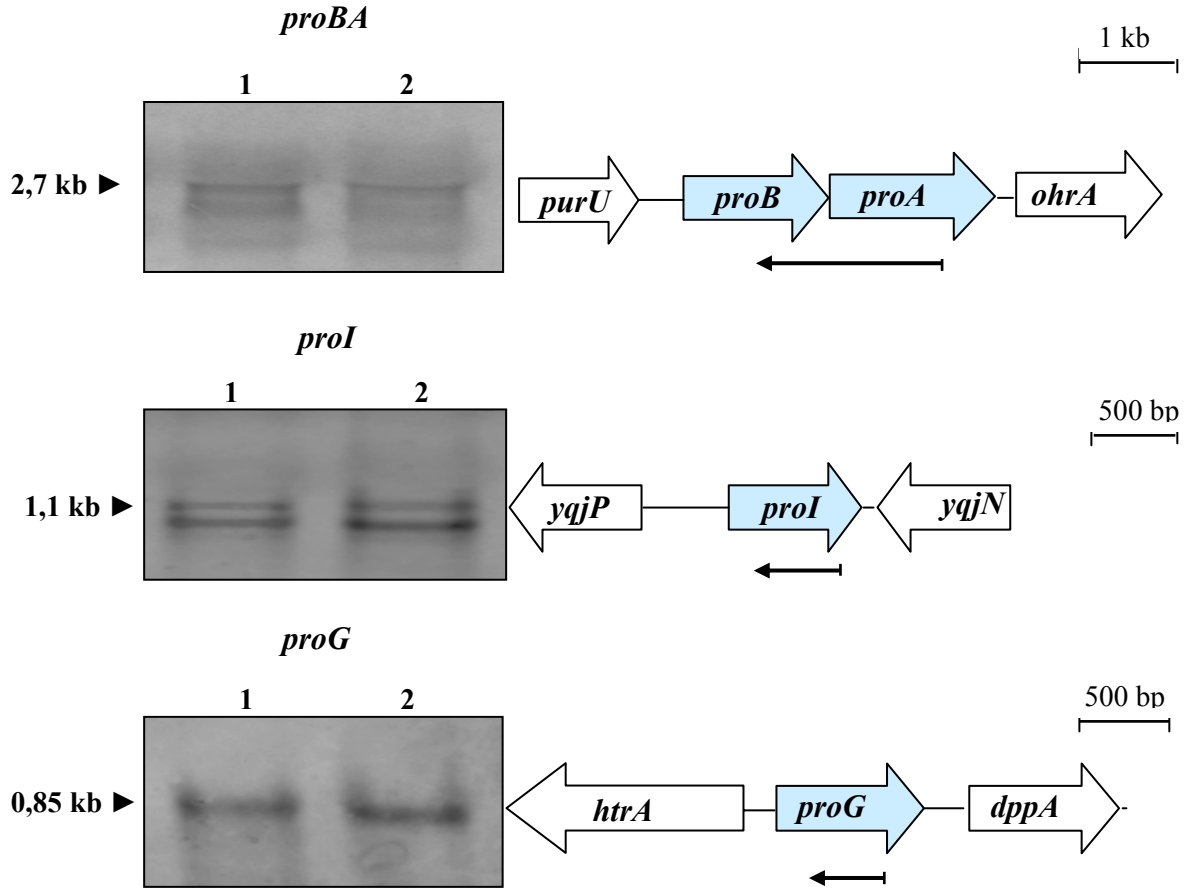


Abb.26: Northern Blot Analysen der anabolen Prolinsynthesegene in *B. licheniformis*.
Aus exponentiell wachsenden Zellen des *B. licheniformis*-Stammes DSM13 in (1) SMM und (2) SMM, dessen Osmolarität mit 0,8 M NaCl erhöht wurde, wurde Gesamt-RNA präpariert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Nylonmembran wurde mit spezifischen

Sonden, die gegen *proBA*, *proI* bzw. *proG* gerichtet waren, hybridisiert. Pro Spur wurde 15 µg RNA eingesetzt. Die Lage der Sonden ist durch Pfeile gekennzeichnet.

7.4 Reportergenfusionsanalysen der osmotisch regulierten *proHJAA*-Expression

7.4.1 Das in *Bacilli* hochkonservierte *proH´*-Minimalfragment (*B.li proH$_{130}$´*) enthält alle *cis* Elemente für die osmotische Induktion von *proHJAA* aus *B. licheniformis*

In *B. subtilis* wurde bereits gezeigt, dass 126 bp direkt stromaufwärts vom Translationsstart von *proH* ausreichen, um eine vollständige osmotische Regulation zu gewährleisten. Die *proH´*-Region in *B. subtilis* und *B. licheniformis* sind zu 78,9 % identisch. Durch eine 4 bp Insertion weist dieses Fragment in *B. licheniformis* eine Größe von 130 bp auf (s. Kapitel 6.4).

Um zu untersuchen, ob diese 130 bp ausreichen, um die osmotische Regulation von *proHJAA* in *B. licheniformis* zu vermitteln, wurden zwei transkriptionelle Fusionen mit dem Reportergen *treA* verwendet. Neben der Fusion der bereits erwähnten 130 bp wurde eine Fusion eines längeren Fragmentes (388 bp) konstruiert, um die osmotische Regulation beider Fragmente zu vergleichen. Da eine Analyse dieser Fusionen in *B. licheniformis* aufgrund seiner schwierigen Transformierbarkeit nicht möglich war, wurden sie in *B. subtilis* eingebracht und untersucht. Die entsprechenden Fragmente wurden aus dem Genom von *B. licheniformis* per PCR amplifiziert und dann in den Vektor pJMB1 vor das promotorlose Reportergen *treA* eingebracht. Mit den so entstandenen Plasmiden pMD29 und pMD30 wurden diese *treA*-Fusionen stabil ins Genom von *B. subtilis* integriert. Diese Integration erfolgte in das Gen *amyE* mittels doppelt homologer Rekombinationsereignisse. Die auf diese Weise erzeugten Stämme MDB59 und MDB60 wurden in SMM kultiviert und dann in SMM bzw. SMM mit 0,4 M NaCl auf eine OD578 von 0,1 angeimpft. Nach dem Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wurde die Aktiviät des Reportergenproduktes, TreA, als Maß für die Aktivität des fusionierten *proH*-Promotors bestimmt (Abb.27).

Bei der Fusion des 388 bp – Fragmentes konnte eine TreA – Aktivität von 12 (0M NaCl) bzw. 27 nmol min-1 mg Protein-1 (0,4M NaCl) ermittelt werden. Bei der Fusion des 130 bp – Fragmentes lagen die Aktivitäten bei 20 (0M NaCl) bzw. bei 44 nmol min-1 mg Protein-1

(0,4M NaCl). Bei beiden fusionierten Fragmenten zeigte sich in den osmotisch stimulierten Zellen (0,4 M NaCl) eine ca, 2,2 fach höhere Aktivität als bei SMM ohne NaCl. Es lässt sich kein Unterschied in der osmotischen Induzierbarkeit zwischen der Fusion des langen Fragmentes (388 bp, MDB59) und der Fusion des kurzen Fragmentes (130 bp, MDB60) feststellen. Damit konnte gezeigt werden, dass auf dem 130 bp Fragment alle *in cis* benötigten Elemente für eine vollständige Osmoregulation enthalten sind. Weiterhin konnte mit Hilfe der *proH´-treA* die bereits im Northern beobachtete die osmotische Induzierbarkeit bestätigt werden.

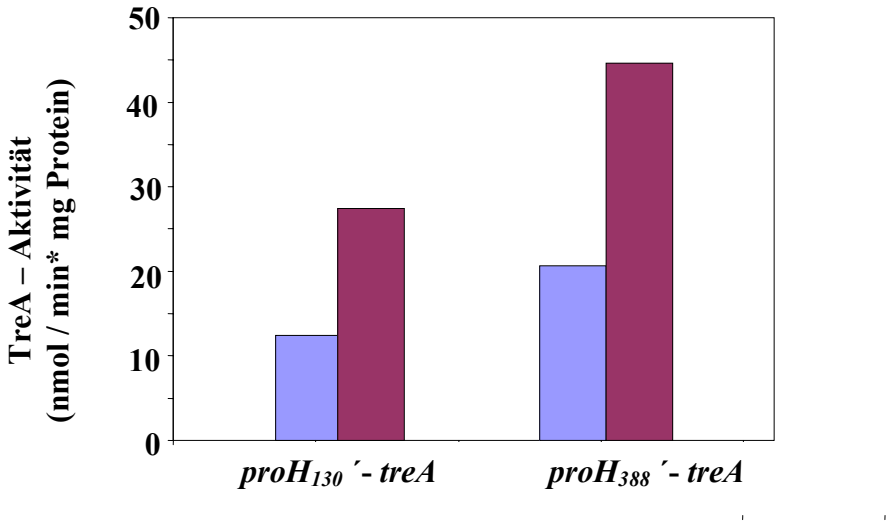


Abb.27: TreA – Aktivität der *proH´ - treA* Fusionen aus *B. licheniformis*.

Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur der Stämme MDB59 (*B. li proH$_{388}$ ´- treA*) und MDB60 (*B. li proH$_{130}$ ´- treA*) wurde in SMM (■) und SMM mit 0,4 M NaCl (■) auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,8 bis 1), woraufhin die TreA – Aktivität bestimmt wurde.

7.4.2 Die Transkription der *proH$_{130}$´- treA* Fusion korreliert mit der externen Osmolarität und wird durch Glycin Betain reprimiert

In *B. licheniformis* findet eine osmotisch induzierte Prolinsynthese statt, die durch die externe Zugabe des kompatiblen Solutes Glycin Betain fast vollständig unterdrückt werden kann.
Die aus dieser Prolinsynthese resultierende Akkumulation von Prolin steht in einer linearen Korrelation zu der Stärke des äußeren osmotischen Reizes (s. Kapitel 7.1).

Es war zu vermuten, dass die Feinregulation dieser Prolinsynthese wie in *B. subtilis* auf transkriptioneller Ebene durch die osmotische Kontrolle des *proHJ*-Promotors stattfindet. Die osmotische Induzierbarkeit des *proHJAA*-Promotors aus *B. licheniformis* wurde im vorangegangenen Abschnitt nachgewiesen. Um nun zu zeigen, dass der Promotor einer auf die äußere Salinität feinabgestimmten Regulation unterliegt, wurde die Reportergenfusion *B. li* $proH_{130}$*´-treA* unter verschieden starken äußeren osmotischen Reizen untersucht. Hierzu wurde eine in SMM gewachsene Übernachtkultur des Stammes MDB60 (*B.li* $proH_{130}$*´-treA*) in SMM mit erhöhter Osmolarität (0-1 M NaCl) ohne bzw. mit 1 mM Glycin Betain auf eine OD578 von 0,1 angeimpft und kultiviert. Nach dem Erreichen der mittlerern exponentiellen Wachstumsphase (OD578 0,8 – 1) wurde die TreA – Aktivität als Maß für die Expression des *proH* Promotors bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression des *proH* Promotors in einer direkten Beziehung zur externen Salinität steht. Die Zugabe des kompatiblen Solutes Glycin Betain reprimiert die Promotoraktivität auf ein Basalniveau (s. Abb.28). Die auf die äußere Hypertonie feinabgestimmte Synthese bzw. Akkumulation von Prolin in *B. licheniformis* wird also, wie in *B. subtilis*, auf transkriptioneller Ebene reguliert.

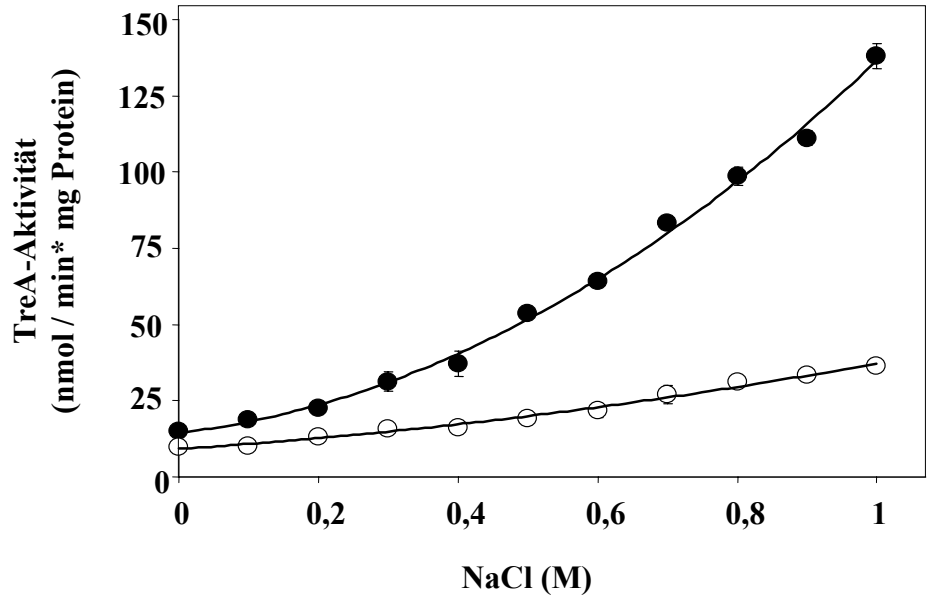


Abb.28: TreA-Aktivität der $proH_{130}$***´- treA*-Fusion aus *B. licheniformis*.**

Aus einer Übernachtkultur des Stammes MDB60 ($proH_{130}$*´- treA*) wurde SMM mit aufsteigenden NaCl – Konzentrationen ohne (●) und mit der Zugabe von 1 mM Glycin Betain (○) auf eine OD578 von 0,1 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD578 0,8 – 1), woraufhin die TreA-Aktivität bestimmt wurde.

7.4.3 Die Expression der *proH$_{130}$´-treA*-Fusion wird durch einen plötzlichen hyperosmotischen Schock stimuliert

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Korrelation zwischen der *proHJAA*-Promotoraktivität und der Osmolarität des Wachstumsmediums aufgezeigt. Um nun zu untersuchen, ob und in welcher Zeit der Promotor auf eine plötzliche Erhöhung der äußeren Osmolarität, also einen osmotischen Schock, reagiert, wurde ein sogenanntes „upshock"- Experiment durchgeführt.

Hierzu wurden in SMM gewachsene Übernachtkulturen in SMM auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Nach Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578} von 0,4 wurde die Osmolarität des Medium durch Zugabe von NaCl plötzlich erhöht, so dass eine Endkonzentration von 0,4 M NaCl im Medium vorlag. Nach diesem Schock wurden die Zellen ca. 3 h weiter kultiviert. Sowohl vor der NaCl-Zugabe als auch danach wurden Proben zur Bestimmung der TreA – Aktivität entnommen. Als Kontrolle diente eine Parallelkultur, der statt NaCl nur SMM zugesetzt wurde.

Mit Hilfe dieses Experimentes konnte die rasche Induktion des *proHJAA*-Promotors nach einem hyperosmotischen Schock verfolgt werden. Die TreA-Aktivität steigt innerhalb von 30 min nach NaCl-Zugabe an. Nach ca. 150 min erreicht die Aktivität einen Sättigungsbereich von 40 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ (ausgehend von 16 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ vor dem Schock). Dies bedeutet eine zweieinhalbfache Induktion. Im Vergleich dazu ist im letzten Abschnitt eine Aktivität von 37 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ für adaptiertes Wachstum bei 0,4 M NaCl bestimmt worden.

Wie erwartet, verändert sich in der nur mit SMM behandelten Kultur die TreA – Aktivität nicht, sie bleibt konstant bei ca. 16 nmol min-1 mg Protein-1.

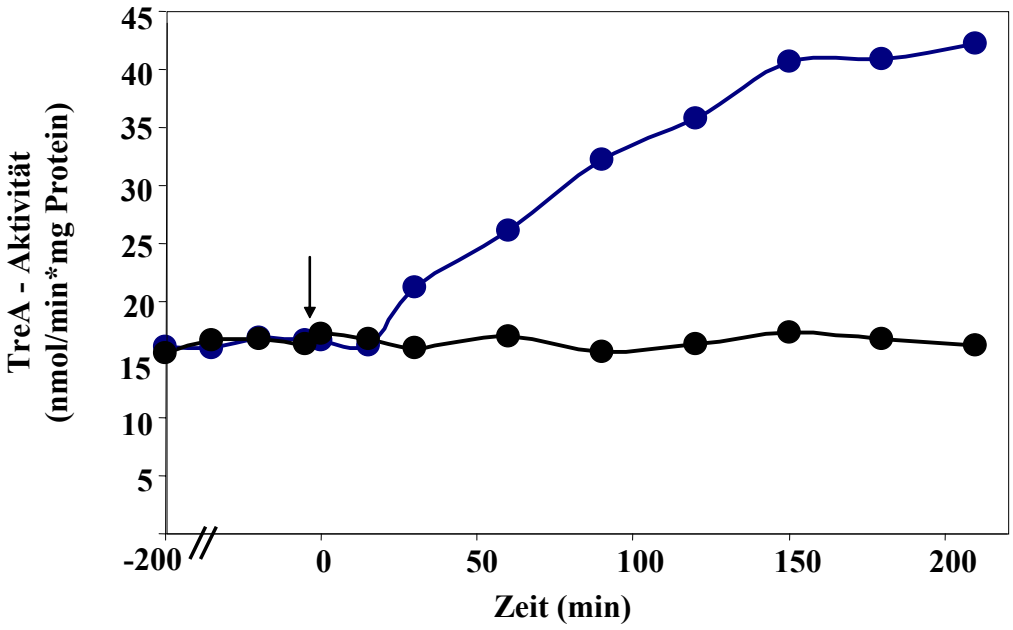


Abb.29: TreA – Aktivität der *proH$_{130}$´- treA* – Fusion nach einem plötzlichen hyperosmotischen Schock.

Aus einer Übernachtkultur des Stammes MDB60 (*proH$_{130}$´- treA*) wurde SMM auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und kultiviert. Nach Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} = 0,4) wurde zur plötzlichen Erhöhung der Osmolarität NaCl zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,4 M NaCl in der Kultur vorlag. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Aliquots zur Bestimmung der TreA – Aktivität entnommen (●). In einer Parallelkultur wurde statt 8 ml 5 M NaCl 8 ml SMM zugegeben (●). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der NaCl- bzw. SMM-Zugabe. Die präsentierten Daten wurden in Dreifachbestimmung ermittelt und in einem unabhängigen Experiment bestätigt.

B. Die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat und ihre Rolle bei der Stressprotektion in *Bacillus subtilis*

1. Funktionen der Aminosäure L-Glutamat in *B. subtilis*

Als proteinogene Aminosäure erfüllt L-Glutamat (Glutamat) eine wichtige Funktion im Stoffwechsel der Zelle. In machen Organismen besitzt Glutamat darüber hinaus noch weitere Eigenschaften. So z.B. vermag *B. subtilis* mit Glutamat als einziger Stickstoffquelle zu wachsen. Außerdem wirkt die Supplementation von Glutamat protektierend gegen Osmo- und Hitzestress in *B. subtilis* (Kerres, 2002; Holtmann, 2003).
Trotz dieser bekannten Funktionen war unklar, wie die Aufnahme von Glutamat in *B. subtilis* katalysiert wird und welche Transportsysteme dabei involviert sind. In dieser Arbeit sollte dies aufgeklärt werden.

2. Die potentiellen Glutamat – Transportsysteme in *B. subtilis*

Um das für die Aufnahme von Glutamat verantwortliche Transportsystem in *B. subtilis* zu identifizieren wurden zunächst Datenbankrecherchen durchgeführt.
Durch Analysen der *B. subtilis*-Genomsequenz (Kunst *et al.,* 1997) wurden zwei offene Leserahmen gefunden, die eine hohe Homologie zu Proteinen der Glutamattransporterfamilie aufwiesen, einer Familie von sekundären Transportsystemen. Hierbei handelte es sich um die Gene *gltT* und *gltP* (Kerres, 2002).
Das Gen *gltT (yhfG)* weist eine große Ähnlichkeit zu den *gltT* Genen aus *Bacillus stearothermophilus* (jetzt*: Geobacillus stearothermophilus*) und *Bacillus caldotenax* auf (Sequenzidentitäten 63,5% bzw. 62,6%), wurde aber in *B. subtilis* noch nicht näher untersucht. Aufgrund seiner Sequenzhomologie handelt es sich bei GltT wahrscheinlich um einen Na^+ H^+ / Glutamat Symporter, der ebenfalls Aspartat transportieren kann (Slotboom *et al.*, 1999).
Das Genprodukt von *gltP* hingegen wurde schon in der Literatur als Glutamattransporter beschrieben. Durch Komplementationsanalysen in *E.coli* und der Rekonstitution von GltP in Membranvesikeln wurde gezeigt, dass dieses Protein die Aufnahme von Glutamat und auch Aspartat vermitteln kann (Tolner *et al.*, 1995).

Neben *gltT* und *gltP* wurde in der Literatur ein weiteres Gen beschrieben, dessen Produkt eine Transportaktivität für Glutamat aufweist: *yveA*. YveA wurde als Aspartattransporter charakterisiert, der auch die Aufnahme von Glutamat katalysieren kann (Lorca *et al.*, 2003).
YveA gehört zu der Superfamilie der APC –Transporter (amino acids, polyamine, organocation). Diese Familie ist bisher nicht gut untersucht, und es sind nur wenige Mitglieder bekannt.

In der Diplomarbeit von Kerres (2002) wird ein weiterer offener Leserahmen, *yhcL,* erwähnt, der ebenfalls eine hohe Homologie zu Glutamattransportern aufweist. Außerdem wurde in Proteomanalysen der ABC – Tranporter YtmK als mögliches Glutamataufnahmesystem beschrieben (Bunai *et al.*, 2004). YhcL und YtmK wurden mittlerweile als Cystintransportsysteme charakterisiert (Burguière *et al.*, 2004) und daher in dieser Arbeit nicht weiter bearbeitet.

Die drei betrachteten Proteine GltP, GltT und YveA sind neben ihrer vermuteten Funktion als Glutamattransporter ebenfalls potentielle Aspartattransporter. Daher wurden sie parallel zum Glutamattransport auch auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Aufnahme von L-Aspartat (Aspartat) zu vermitteln.

Tabelle 18: Potentielle Glutamat/Aspartataufnahmesysteme in *B. subtilis*

Gene	Homolog zu/charakterisiert als	Transporterfamilie	Referenz
gltT	Glutamat/Na^+ H^+ Symporter Aspartat / Na^+H^+ Symporter	Glutamattransporterfamilie	----------
gltP	Glutamat/$2H^+$ Symporter Aspartat/ $2H^+$ Symporter	Glutamattransporterfamilie	Tolner *et al.*, 1995
yveA	Aspartattransporter Glutamattransporter	APC Superfamilie	Lorca *et al.* , 2003

2.1 GltT ist ein hochaffines Glutamat- und Aspartattransportsystem in *B. subtilis*

Anne Kerres hatte bereits 2002 in ihrer Diplomarbeit gezeigt, dass ein *gltT*–defizienter Stamm bei einer Substratkonzentration von 10 µM und in einem Zeitraum bis 100 Sekunden keinen detektierbaren Glutamattransport mehr aufweist. In dieser Arbeit sollte nun dieses Experiment mit anderen Parametern wie einer höheren Substratkonzentration und einem längeren Messbereich wiederholt werden, um auch niedrige Transportaktivitäten identifizieren zu können. Es folgte eine Analyse der Glutamat- bzw. Aspartataufnahme in den Stämmen JH642, ADB1 [(*gltP:neo*)1], ADB4 [*(gltT x* pUS19*)*1 *(spec)*], MDB43 [(*yveA::neo*)1], ADB5 [*(gltT x* pUS19)1*(spec)* (*gltP::neo*)1], MDB44 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*yveA::neo*)1], MDB53 [(*gltP::cat*)1 (*yveA::neo*)1] und MDB54 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*gltP::cat*)1 (*yveA::neo*)1]. In diesen Stämmen sind ein bzw. zwei Strukturgene der putativen Glutamattransporter unterbrochen. Im Stamm MDB54 sind alle drei Gene funktionsuntüchtig.

Die Stämme wurden in SMM bei 37°C bis zum Erreichen der frühen exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 0,7) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat versetzt (Endkonzentration 20 µM) und die Substrataufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei 37°C verfolgt (Abb.30 und 31).

Es stellte sich heraus, dass die Unterbrechung des Gens *gltT* mit einem drastischen Verlust der Glutamataufnahme einhergeht. Mutationen im Gen *gltP* und *yveA* haben einzeln oder in Kombination keinen detektierbaren Einfluss auf die Aufnahme von Glutamat oder Aspartat bei dieser Substratkonzentration. Unterbricht man zusätzlich zu *gltT* noch *gltP* oder *yveA* oder beide, so zeigt sich derselbe Phänotyp wie bei der einzelnen *gltT*-Mutation.

GltT ist demnach das hauptsächliche, hochaffine Glutamat-und Aspartataufnahmesystem in *B. subtilis*.

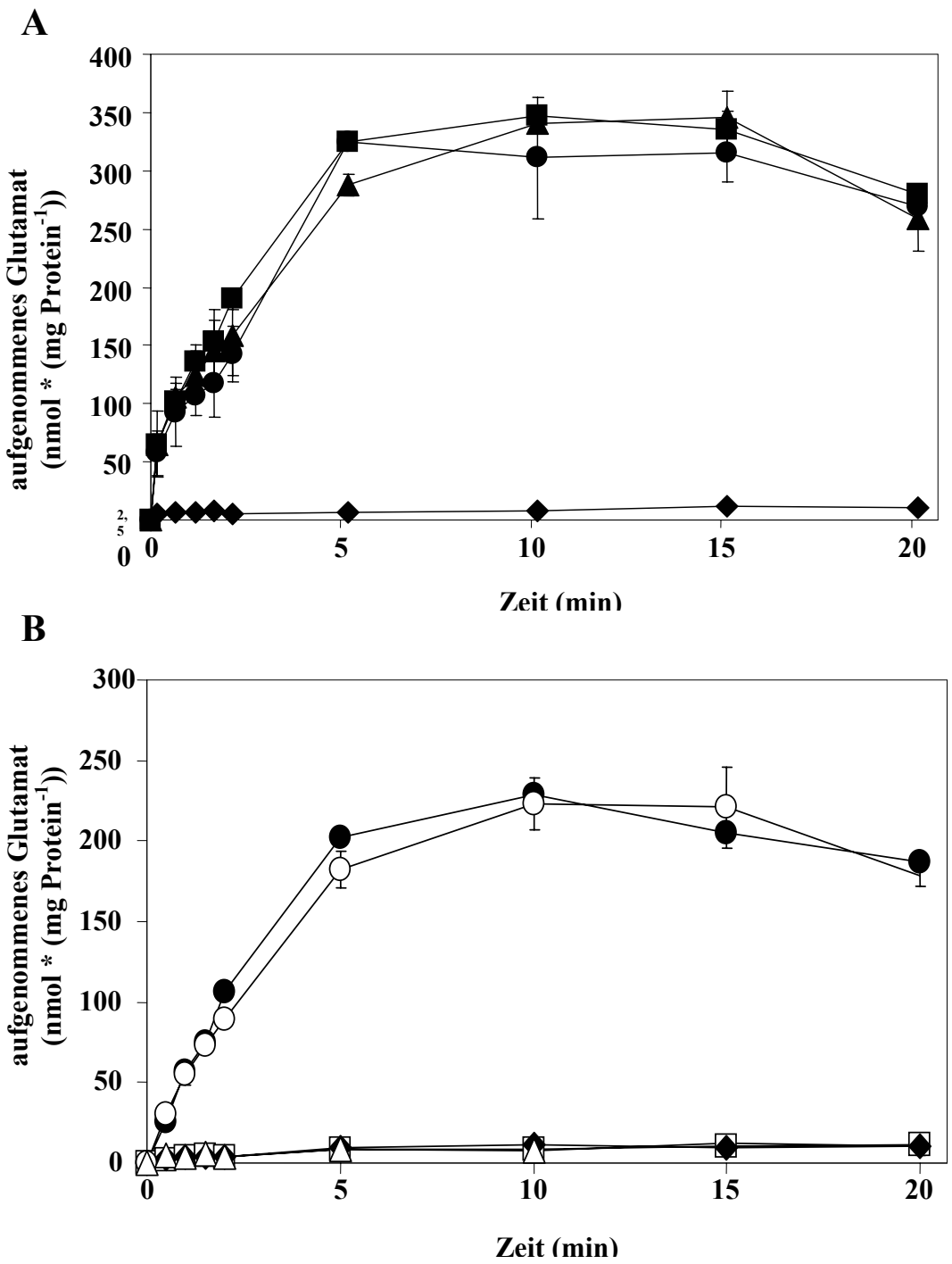


Abb. 30: Die Aufnahme von Glutamat in den Transportermutanten

Dargestellt ist die Aufnahme von Glutamat in den Einzel- und Mehrfachmutanten der putativen Glutamat/Aspartattransportergene. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. **A** Die Aufnahme von Glutamat in den Einzelmutanten, den Stämmen ADB1 (■) (*gltP*:neo), MDB43 (▲) und ADB4 (◆) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) und dem Wildtypstamm JH642 (●). **B** Die Aufnahme von Glutamat in den Mehrfachmutanten, den Stämmen MDB53 (○) (*gltP*::*cat*) (*yveA::neo*), MDB44 (♦) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*yveA::neo*)1], ADB5 (□) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*gltP::neo*)1], der Triplemutante MDB54 (Δ) [(*gltP::cat*)1 (*yveA::neo*)1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] und dem Wildtypstamm JH642 (●).

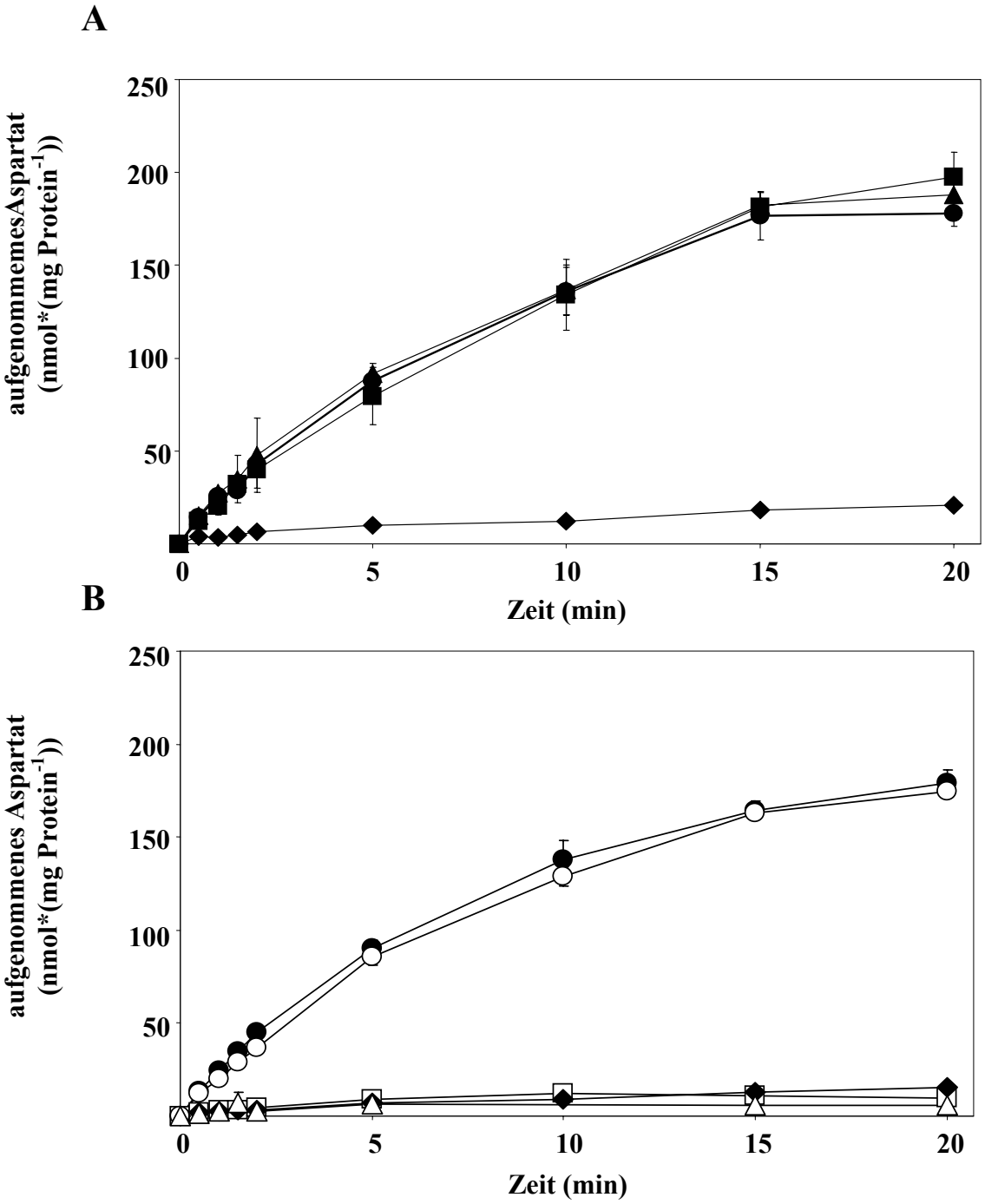


Abb. 31: Die Aufnahme von Aspartat in den Transportermutanten.

Dargestellt ist die Aufnahme von Aspartat in den Einzel- und Mehrfachmutanten der putativen Glutamat/Aspartattransportergene. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. **A** Die Aufnahme von Aspartat in den Einzelmutanten. Gezeigt ist die Aspartataufnahme in den Stämmen JH642 (●), ADB1 (■) (*gltP*:neo), MDB43 (▲) und ADB4 (◆) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]. **B** Die Aufnahme von Aspartat in den Mehrfachmutanten. Gezeigt ist die Aspartataufnahme in den Stämmen JH642 (●), MDB53 (○) (*gltP*:cat) (*yveA*:neo), MDB44 (◆) ([*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) (*yveA*:neo), ADB5 (□) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*gltP::neo*)1] und der Triplemutante MDB54 (Δ) [(*gltP::cat*)1 (*yveA::neo*)1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec)*].

2.2 GltP und YveA zeigen weder hoch- noch niederaffinen Transport von Glutamat und Aspartat

Bei einer Substratkonzentration von 20 µM wird die Glutamat– und Aspartataufnahme ausschließlich durch das Transportsystem GltT vermittelt. Die Genprodukte von *gltP* und *yveA* zeigten unter diesen Bedingungen keinerlei hochaffine Transportaktivität. Um zu untersuchen, ob *gltP* und/oder *yveA* bei der niederaffinen Glutamataufnahme eine Rolle spielen, wurden Transportanalysen bei einer Substratkonzentration von 1 mM durchgeführt. Dazu wurden Stämme verwendet, bei denen jeweils nur eines der Transportergene aktiv war. MDB44 [(*gltP*$^+$) *(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*yveA::neo*)1], ADB5 [(*yveA*$^+$) (*gltP::neo*)1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec)*], MDB53 [(*gltT*$^+$) (*yveA::neo*)1 (*gltP::cat*)1] und als Referenz die Triplemutante MDB54 [(*gltP*::*cat*)1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*yveA::neo*)1] wurden in SMM bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5-0,7) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mit radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat versetzt (Endkonzentration 1 mM). Die Substrataufnahme wurde bei 37°C in Abhängigkeit der Zeit verfolgt (s. Abb.32).

Auch bei der verhältnismäßig hohen Substratkonzentration von 1 mM zeigten die Stämme mit aktivem *gltP* (MDB44) bzw. *yveA* (ADB5) keine höhere Substrataufnahme als die Triplemutante MDB54 [(*gltP*::*cat*)1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*yveA::neo*)1]. Dies führte zu dem Schluss, dass unter den getesteten Bedingungen GltP und YveA keinen Einfluss auf den Transport von Glutamat und Aspartat haben.
Der Stamm MDB53 [(*gltT*$^+$) (*yveA::neo*)1 (*gltP::cat*)1] dagegen war wie erwartet in der Lage, sowohl Glutamat als auch Aspartat mit einer hohen Transportrate aufzunehmen (Glutamat: 422 nmol min^{-1} mg Protein^{-1}; Aspartat: 228 nmol min^{-1} mg Protein^{-1}).

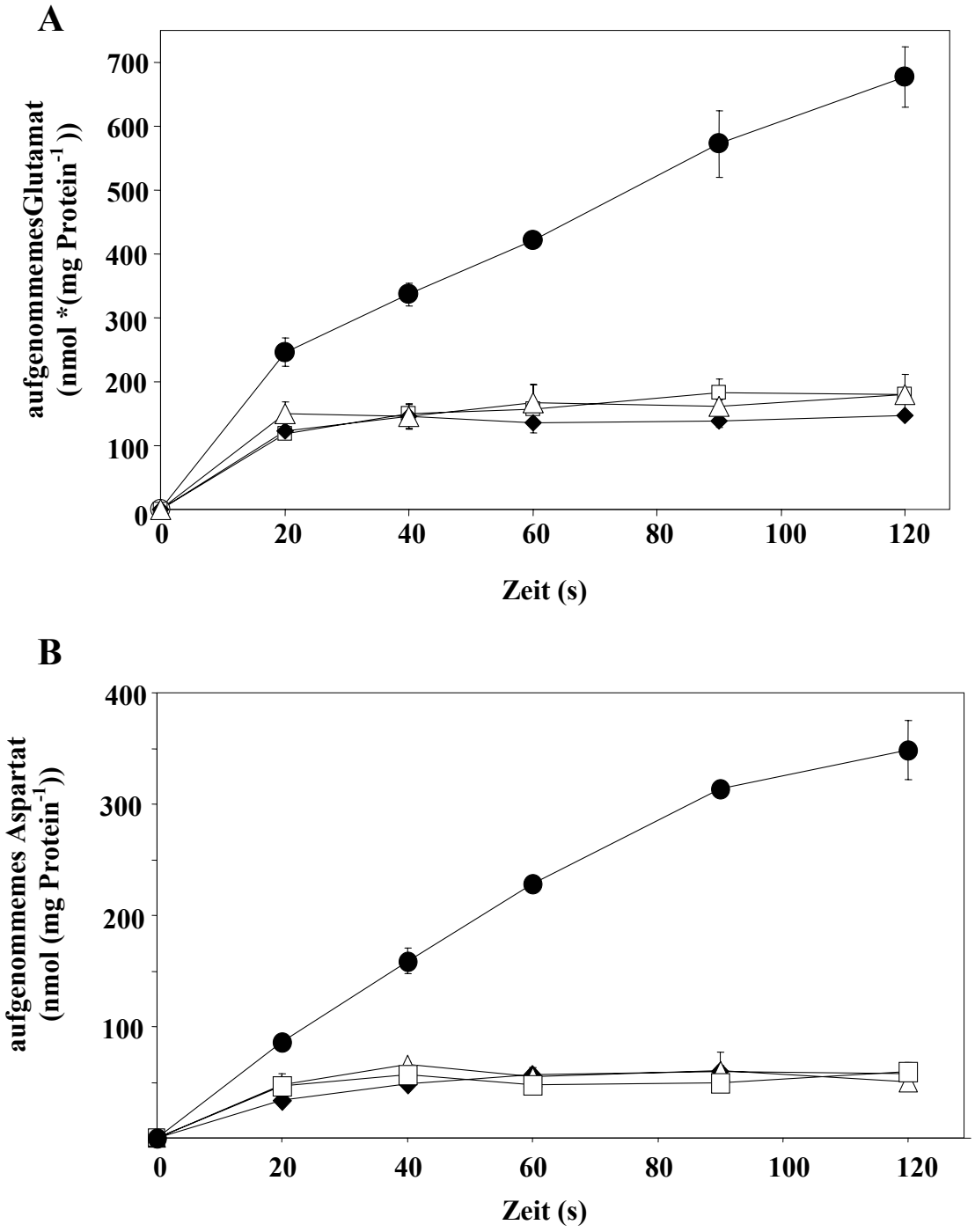


Abb. 32: Die Glutamat – und Aspartataufnahme in den Mehrfachmutanten bei einer Substratkonzentration von 1 mM.

Dargestellt ist die Aufnahme von Glutamat (**A**) und Aspartat (**B**) in den Stämmen MDB53 (●) [(*gltP*:cat) (*yveA*:neo)], ADB5 (□) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*gltP::neo*)], MDB44 (♦) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec) (yveA:neo)*] und der Triplemutante MDB54 (Δ) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*gltP::cat*) (*yveA:: neo*)]. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

2.3 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der GltT-abhängigen Glutamat – und Aspartataufnahme

GltT ist ein hochaffiner Glutamat– und Aspartattransporter, der bei 37°C und den bisher getesteten Substratkonzentration von 20 µM und 1 mM den hauptsächlichen Anteil an der Aufnahme dieser beiden Aminosäuren hat. Um die enzymkinetischen Parameter für GltT zu ermitteln wurden Transportanalysen mit verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Hierzu wurde MDB53 MDB53 [(*gltT*$^{+}$) (*yveA::neo*)1 (*gltP::cat*)1] verwendet, da in diesem Stamm die anderen putativen Glutamat-/ Aspartattransportergene *gltP* und *yveA* ausgeschaltet sind.

MDB53 wurde in SMM bei 37°C bis zum Erreichen der frühen exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5-0,7) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit unterschiedlichen Konzentrationen an radioaktiv markiertem Glutamat oder Aspartat versetzt (Endkonzentrationen 2 – 100 µM) und die Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei 37°C verfolgt. Die Transportraten (nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$) wurden ermittelt. Die Auftragung der erhaltenen Daten erfolgte in einem Hanes-Woolf Diagramm, das die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und der maximalen Transportrate (V_{max}) ermöglichte (Abb. 33).

Es gilt:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} ([S] + K_m)$$

Im Hanes – Woolf – Diagramm wird [S] / V gegen [S] aufgetragen, so dass der x – Achsenabschnitt bei - K_m liegt, während sich der Schnittpunkt mit der y- Achse bei K_m/ V_{max} befindet. Die auf diese Weise ermittelten Daten ergaben einen K_m von 38 ± 0,4 µM und eine V_{max} von 108 ± 5 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ für das Substrat Glutamat. Ähnliche kinetische Parameter wurden für das Substrat Aspartat bestimmt (K_m = 45 ± 5 µM; V_{max}= 62 ± 6 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$) (Abb. 33).

Diese Daten sprechen dafür, dass es sich bei GltT um einen Transporter mittlerer Affinität und hoher Transportrate handelt. Dabei wird die Aufnahme von Glutamat mit einer ungefähr doppelt so hohen Transportrate katalysiert wie die Aufnahme von Aspartat.

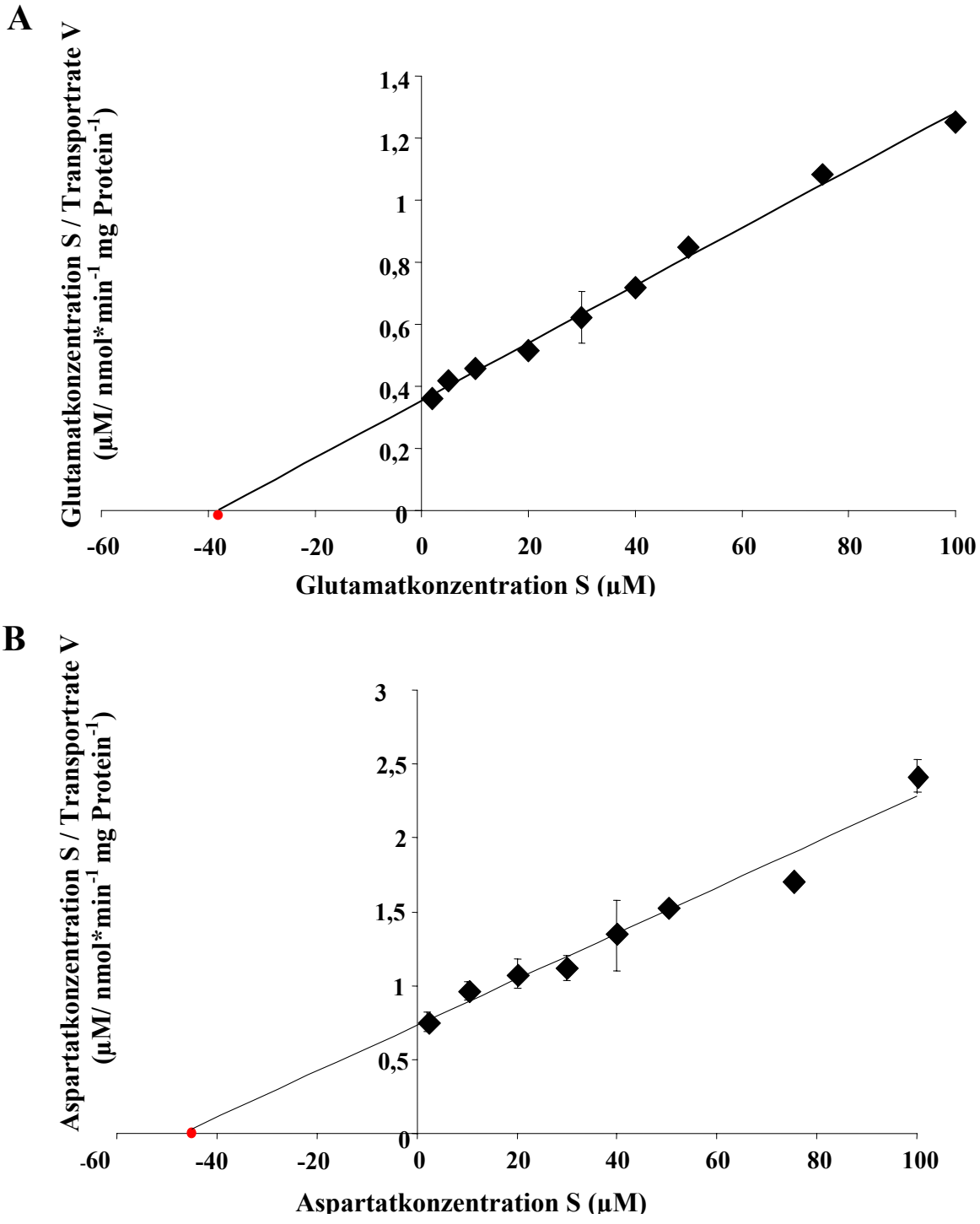


Abb. 33: Hanes-Woolf –Diagramm zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von GltT.

Bei Substratkonzentrationen von 2 bis 100 µM wurden im Stamm MDB53 [(*gltT* $^{+}$) (*gltP::cat*) (*yveA ::neo*)] Transportanalysen durchgeführt. Die spezifischen Transportraten für jede Substratkonzentration wurden ermittelt. Aufgetragen wurde der Quotient aus Substratkonzentration S (µM) und Transportrate V (nmol*min^{-1} mg Protein^{-1}) in Abhängigkeit der Substratkonzentration S (µM) für das Substrat Glutamat **(A)** und das Substrat Aspartat **(B)**. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit der x-Achse ist der negative K_m – Wert (in rot dargestellt).

2.4 Die Rolle von GltT bei der Verwertung von Aspartat und Glutamat als Stickstoffquellen in *B. subtilis*

Wie bereits in Abschnitt 1 erwähnt, kann die Aminosäure Glutamat in Abwesenheit von Ammoniumsulfat als ausschließliche Stickstoffquelle in *B. subtilis* genutzt werden (Belitsky und Sonenshein, 1998). Dasselbe trifft auf Aspartat zu (Sun und Setlow, 1991).

Ob die Aufnahme von Glutamat bzw. Aspartat unter solchen Bedingungen ebenfalls durch das Transportsystem GltT oder durch eines der anderen putativen Transportsysteme (GltP und/oder YveA) erfolgt wurde mittels eines Wachstumsexperimentes geklärt. Hierfür wurde modifiziertes SMM verwendet, in dem Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle durch Glutamat bzw. Aspartat ersetzt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, äquimolare Mengen an Stickstoff einzusetzen. Da ein Ammoniumsulfat – Molekül zwei Stickstoffatome besitzt und Glutamat / Aspartat nur eines, enthielt das modifizierte SMM 30 mM Glutamat bzw. Aspartat (Original SMM: 15 mM Ammoniumsulfat).
Die Stämme JH642, ADB4 [*(gltT x* pUS19*)*1*(spec)*], MDB53 [(*yveA::neo*)1 (*gltP::cat*)1] und MDB54 [*(gltP::cat)*1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec) (yveA::neo)*1] wurden in diesem modifizierten SMM sowohl mit Glutamat als auch mit Aspartat als jeweils alleiniger Stickstoffquelle bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert (OD_{578} 1 - 1,6) und dann auf eine OD_{578} von 0,1 im selben Medium inokuliert. Das Wachstum wurde anhand der OD_{578} - Zunahme in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (s. Abb. 34).
Beide Stämme mit intaktem *gltT*-Gen (JH642 und MDB53[(*yveA::neo*)1 (*gltP::cat*)1] verhielten sich völlig gleich und wiesen ein zügiges Wachstum mit einer Rate von 0,35 h^{-1} auf. Die Stämme mit defektem *gltT* hingegen zeigten ebenfalls Wachstum, aber mit einer deutlich geringeren Wachstumsrate (0,17 h^{-1}). Die Disruption der Gene *gltP* und *yveA* hatte keinerlei Auswirkung auf das Wachstumsverhalten. Es wurde also bestätigt, dass GltT der hauptsächliche Transporter für Glutamat und Aspartat ist. Es konnte keinerlei Transport nachgewiesen werden, der von GltP oder YveA katalysiert wird.
Darüber hinaus wurde ebenfalls die Existenz weiterer, noch unbekannter Glutamat – und Aspartataufnahmesysteme belegt, da selbst in der Triplemutante MDB54 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] (*gltP::neo) (yveA::neo*) ein Wachstum mit Glutamat bzw. Aspartat als einziger N – Quelle möglich ist. Bei diesen Systemen handelt es sich vermutlich um niederaffine Transporter, die die Glutamat- bzw. Aspartataufnahme nur unter hohen Substratkonzentrationen (hier: 30 mM) vermitteln können.

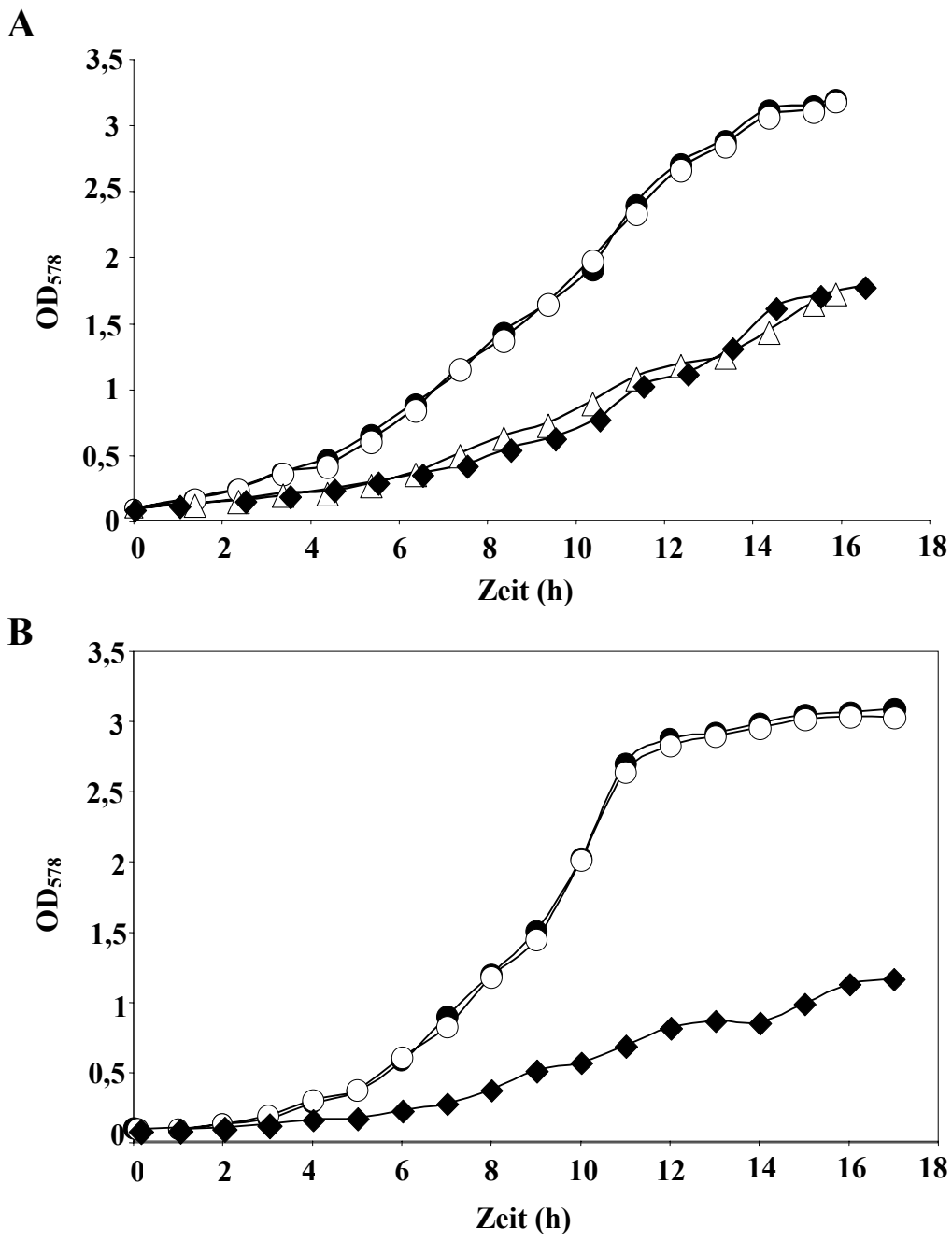


Abb. 34: Wachstumskurve in SMM mit Glutamat bzw. Aspartat als einziger Stickstoffquelle.

Dargestellt ist das Wachstum der Stämme JH642 (●), ADB4 (Δ) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*], MDB53 (○) [(*gltP::cat*)1 (*yveA::neo*)1] und MDB54 (♦) [(*gltP::cat*)1 (*yveA:neo*)1 *(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] mit Glutamat (**A**) bzw. Aspartat **(B**) als alleiniger Stickstoffquelle. Die abgebildeten Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar, das in einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt wurde.

2.5 Die Hitzeprotektion durch Glutamat und Aspartat ist abhängig von ihrer Aufnahme in die Zelle durch GltT

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, wird der hochaffine Glutamat- und Aspartattransport bei 37°C durch das Protein GltT katalysiert. Experimente unter Hitzestress (52°C) zeigten, dass Glutamat ein wirksames Thermoprotektivum in *B. subtilis* ist (Holtmann, 2003). Unklar war lediglich, ob und wie Glutamat unter diesen Umständen in die Zelle aufgenommen wird. Aspartat hingegen war noch nie auf thermoprotektive Eigenschaften hin untersucht worden.

Um die Frage zu klären, ob Aspartat einen positiven Effekt auf hitzegestresste *B. subtilis* Zellen hat, wurde ein Wachstumsexperiment bei 52°C durchgeführt. In diesem Versuch sollte gleichzeitig die Rolle von GltT bei der Thermoprotektion durch Glutamat bzw. Aspartat erläutert werden. Hierzu wurde aus einer in SMM bei 37°C gewachsenen Übernachtkultur der Stämme JH642 und ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] SMM ohne und mit 1mM Glutamat auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und ca. 10 Minuten bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde die Temperatur auf 52°C gebracht und das Wachstum der Zellen anhand der OD_{578} - Zunahme in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (s. Abb. 35). Es zeigte sich, dass sich die Wachstumsrate des Wildtypstammes JH642 bei 52°C durch die Supplementation von Aspartat von 0,14 h^{-1} auf 0,37 h^{-1} steigern lässt. Damit ist die Wachstumsrate sogar noch höher als bei der Zugabe von Glutamat (0,26 h^{-1}). Aspartat ist demnach ein sehr wirksames Thermoprotektivum in *B. subtilis*. Im Stamm ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] zeigten weder Glutamat noch Aspartat einen Effekt auf das Wachstum unter Hitzestress. Daraus kann geschlossen werden, dass die Schutzfunktion von Glutamat und Aspartat bei Hitze von ihrer Aufnahme in die Zelle abhängt und dass diese Aufnahme durch GltT vermittelt wird.

Die Disruption der Gene *gltP* und *yveA* hatte -einzeln oder in Kombination- keinerlei Effekt unter den getesteten Bedingungen. Experimente mit den Stämmen ADB1 [(*gltP::neo*)1] ,MDB43 [(*yveA::neo*)1] und MDB53 [(*gltP::cat*)1 (*yveA::neo*)1] zeigten dieselbe Protektion durch Glutamat und Aspartat bei 52°C wie der Wildtypstamm JH642 (Daten nicht gezeigt).

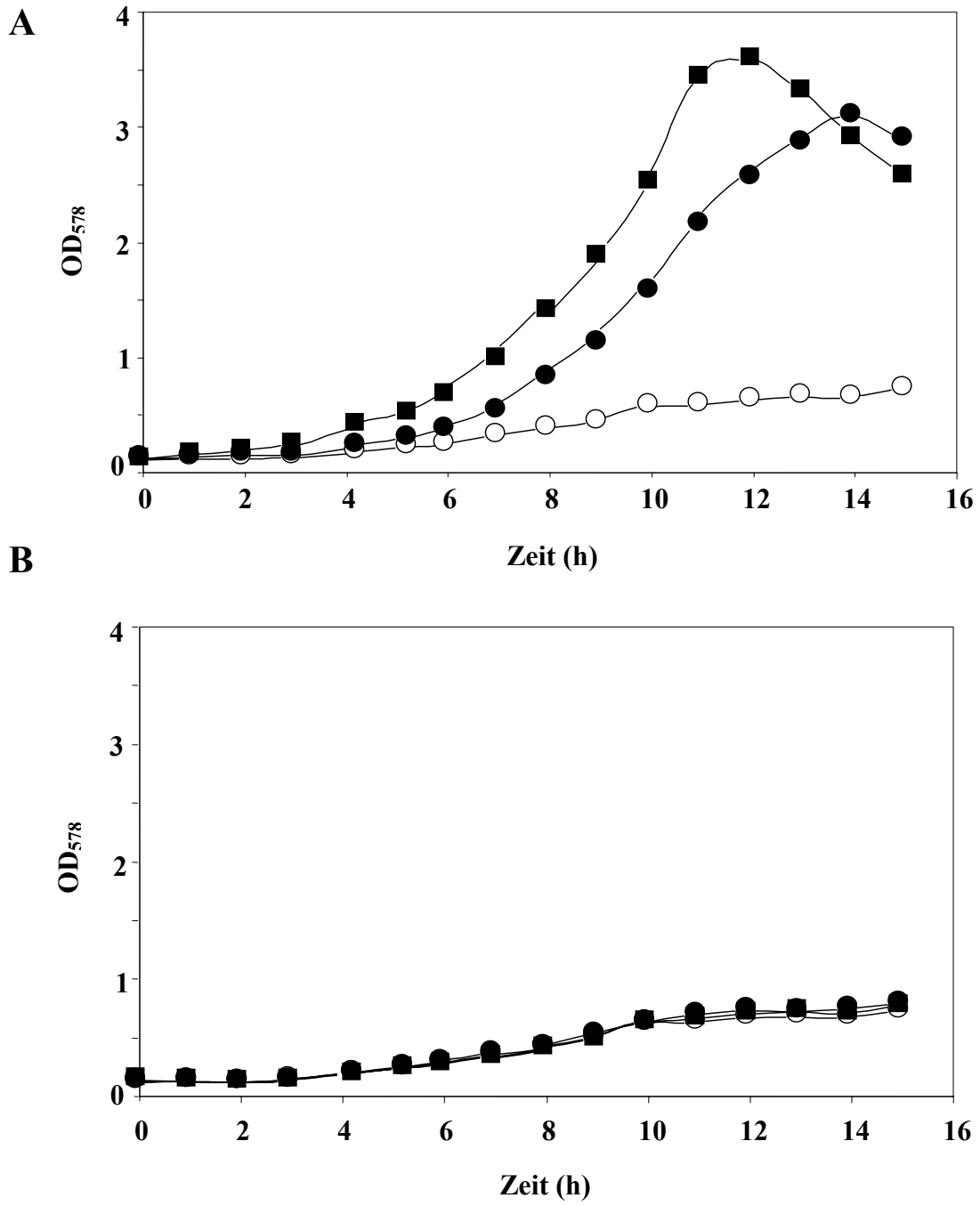


Abb. 35: Wachstumanalysen bei 52°C mit der Zugabe von Aspartat und Glutamat.

Dargestellt ist das Wachstum **A:** des Wildtypstammes JH642 und **B:** des Stammes ADB4 ([*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*])
bei 52°C ohne (○), mit der Zugabe des Thermoprotektivums Glutamat (●) und mit der Zugabe von Aspartat (■), beides mit einer Endkonzentration von 1 mM.

2.6 Die Glutamat- und Aspartataufnahme wird unter Hitzestress nicht stimuliert

Durch die Aufnahme von exogenem Glutamat und Aspartat kann *B. subtilis* unter Hitzestress sein Wachstum verbessern. Den Wachstumsanalysen zufolge wird diese Aufnahme von dem Transportsystem GltT vermittelt (s. Abschnitt 2.5).

Es sollte geklärt werden, ob der Transport der beiden Thermoprotektiva Glutamat und Aspartat unter Hitzestress stimuliert wird. Für die Aufnahme von Osmoprotektiva wie z.B. Glycin Betain ist bekannt, dass der Transport in die Zelle unter Osmostress induziert wird (Kempf und Bremer, 1998). Weiterhin sollte die Funktion von GltT als Haupttransportsystem von Glutamat und Aspartat unter hyperthermen Wachstumsbedingungen bestätigt werden.

Um diese beiden Punkte zu klären, wurden Transportanalysen mit Zellen, die bei 37°C und 52°C gewachsen waren, durchgeführt. Die Stämme JH642 und ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] wurden in SMM bei 37°C und bei 52°C bis zum Erreichen der frühen exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5-0,7) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat versetzt (Endkonzentration 20 µM) und die Substrataufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei der entsprechenden Temperatur verfolgt (Abb.36A).

Die erhaltenen Daten zeigten, dass im Stamm JH642 die Aufnahme von Glutamat bei 52°C mit einer wesentlich niedrigeren Transportrate im Vergleich zu 37°C erfolgte (37°C: 35 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$; 52°C: 9 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$). Gleiches gilt für den Transport von Aspartat (37°C: 21 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$; 52°C: 6 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$). Der Transport der Substrate Glutamat und Aspartat wird also unter hyperthermen Konditionen im Vergleich zu 37°C deutlich reduziert (Glutamat um ca. Faktor 4, Aspartat um ca. Faktor 3).

Die *gltT* – Mutante ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] weist weder bei 37°C noch bei 52°C eine detektierbare Glutamat- oder Aspartataufnahme auf. Dies bestätigt noch einmal die Daten aus dem Wachstumsexperiment, die GltT als Hauptglutamat – und Aspartattransporter bei 52°C vermuten ließen.

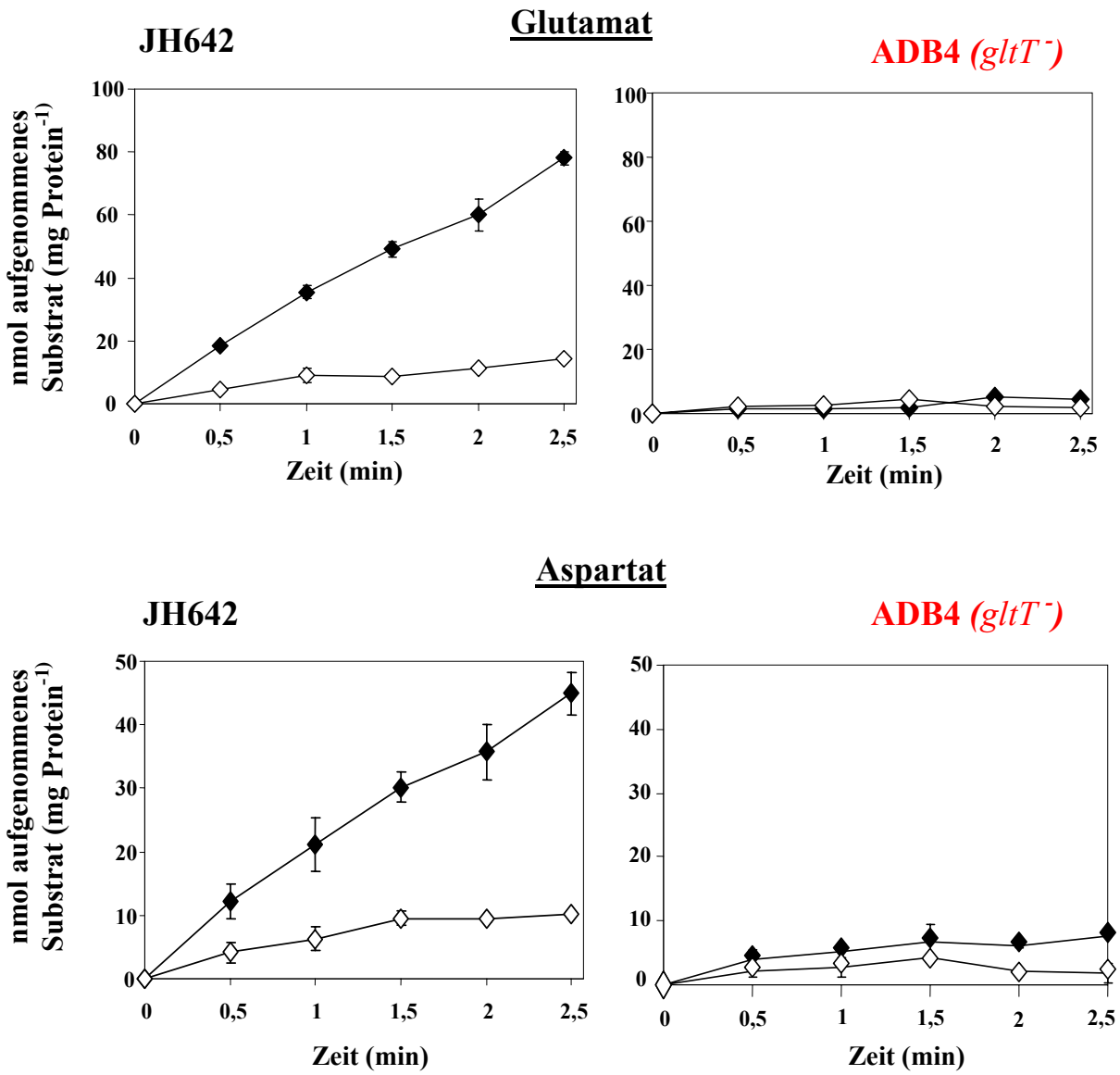


Abb.36: Analyse der Glutamat– und Aspartataufnahme bei hyperthermen Bedingungen.

Zum Zeitpunkt 0 wurde ein Aliquot der exponentiell wachsenden Kultur mit radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat mit einer Endkonzentration von 20 µM versetzt. Die Aufnahme wurde anhand der in den Zellen ermittelten Radioaktivität berechnet. Dargestellt ist die Aufnahme bei 37°C (◆) und 52°C (◇) in den Stämmen JH642 (schwarz) und ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] (rot). Die repräsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messreihen ± Standardabweichung.

2.7 Akkumulation von Glutamat und Aspartat bei 37°C und 52°C und die Rolle von GltT

Eine weit verbreitete Wirkweise von Stressprotektiva beruht auf ihrer Akkumulation in der Zelle. So wird exogen angebotenes Glycin Betain in *B. subtilis* z.B. sowohl unter Osmo- als auch unter Cryostress intrazellulär angehäuft (Kempf und Bremer, 1998; Tamara Hoffmann, pers. Mitteilung). Es stellte sich daher die Frage, ob die Thermoprotektion durch die Aufnahme von Glutamat und Aspartat in *B. subtilis* mit der intrazellulären Akkumulation dieser Aminosäuren einhergeht.

Zu diesem Zweck wurde die durch exogene Aufnahme akkumulierte Glutamat- und Aspartatkonzentration in Zellen analysiert, die bei 37°C bzw. 52°C gewachsen waren (Abb.37).

Dazu wurden die Stämme JH642 und ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] aus einer Vorkultur in Mininalmedium mit 1 mM radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat inokuliert (OD_{578} = 0,1) und bei 37°C und 52°C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5-1) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, auf Nitrocellulosefilter gesaugt, mit isotonischem Medium gewaschen und die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität bestimmt. Daraus wurde die aufgenommene Substratmenge errechnet und mit Hilfe des Zellvolumens von *B. subtilis* (eine OD_{578} von 1 entspricht 0,65 µl; Moses, 1999) auf die Konzentration innerhalb der Zellen umgerechnet.

Der Wildtypstamm JH642 zeigte bei 37°C die Akkumulation von 702 µM ± 11 Glutamat, während bei den 52°C- Zellen eine Akkumulation von 571 ± 17 µM nachgewiesen wurde. Ähnliche Daten wurden für die Anhäufung von Aspartat ermittelt: 864µM ± 9 (37°C) bzw. 704 µM ± 22. Unter hyperthermen Bedingungen findet also keine gesteigerte Akkumulation von Glutamat oder Aspartat statt.

Im Stamm ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] wurde erwartungsgemäß eine deutlich geringere Substratakkumulation nachgewiesen als im Wildtyp (Glutamat: 125 µM ± 2 (37°C) bzw. 154 µM ± 10 (52 °C); Aspartat: 101 µM ± 9 (37°C) bzw. 200 µM ± 23 (52°C)).

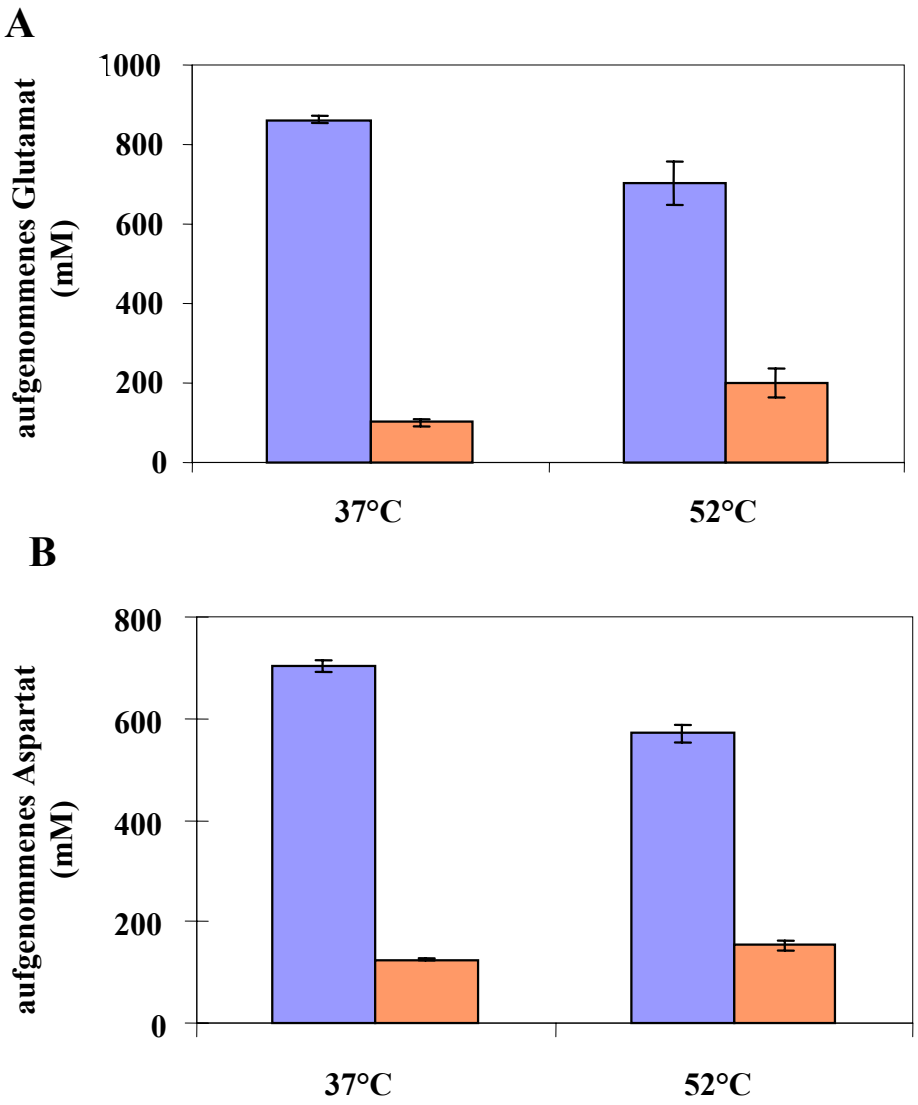


Abb. 37: Akkumulation von Glutamat und Aspartat bei 37°C und 52°C.

Dargestellt sind die durch Aufnahme akkumulierte Glutamat- (**A**) bzw. Aspartatmenge (**B**) bei 37°C und 52°C im Wildtypstamm JH642 (■) und in der *gltT*-Mutante ADB4 (■) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]. Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur wurde in SMM auf eine OD_{578} von 0,1 unter der Zugabe von radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat (1 mM Endkonzentration). Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

2.8 Bestimmung der halbmaximalen thermoprotektiven Konzentration vonAspartat

Die bisherigen Experimente zur hitzeprotektiven Wirkung von Glutamat und Aspartat wurden mit einer Endkonzentration von 1 mM durchgeführt. Da solch hohe Konzentrationen im Habitat von *B. subtilis*, den oberen Schichten des Bodens, unwahrscheinlich sind, sollte die halbmaximale thermoprotektive Konzentration ermittelt werden. Für Glutamat wurde sie bereits auf 60 µM bestimmt (Holtmann, 2003).

Um diesen Wert für Aspartat zu ermitteln wurde der Stamm JH642 bei 52°C in SMM mit aufsteigenden Aspartatkonzentrationen (0 bis 2000 µM) kultiviert und das Wachstumsvermögen anhand der nach 11 h erreichte OD_{578} bestimmt. (s.Abb.38). Dabei zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 1000 µM das Wachstum nicht mehr gesteigert werden kann; es tritt eine Sättigung ein. Bei einer Konzentration von 500 µM ist die Thermoprotektion halbmaximal, aber schon 40 µM haben einen positiven Effekt auf das Wachstum.

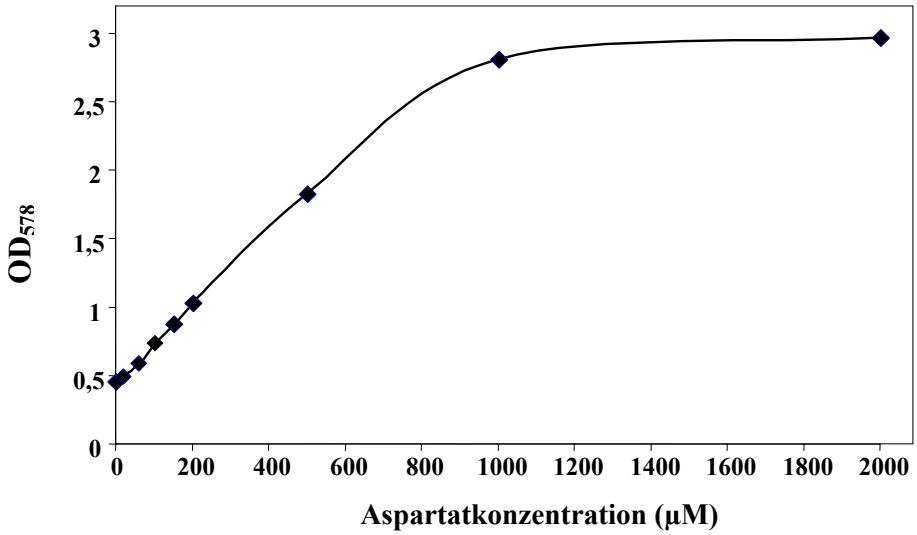


Abb. 38: Wachstumsvermögen des Stammes JH642 bei 52°C in Abhängigkeit der supplementierten Aspartatkonzentration.

Der Stamm JH642 wurde bei 52°C mit aufsteigenden Aspartatkonzentrationen (0- 2000 µM) wachsen gelassen. Dargestellt ist die nach 11 stündiger Kultivierung erreichte OD_{578} in Abhängigkeit der Aspartatkonzentration als Maß für das Wachstumsvermögen. Die präsentierten Daten wurden in einem unabhängigen Experiment bestätigt.

3. Die osmoprotektive Wirkung der Aminosäuren Glutamat und Aspartat ein *B. subtilis* ist abhängig von *gltT* und *proHJ*

Es wurde bereits gezeigt, dass exogen zugeführtes Glutamat in *B. subtilis* bei hypertonen Bedingungen einen Wachstumsvorteil vermittelt (Kerres, 2002; Holtmann, 2003). In *B. subtilis* sind fünf Transportsysteme bekannt, die für die Aufnahme osmoprotektiver Substanzen verantwortlich sind (osmoprotectant uptake; OpuA bis OpuE, Bremer und Kempf, 1998). Keines dieser Systeme ist in der Lage, den Transport von Glutamat zu katalysieren. Es lag die Vermutung nahe, dass die Glutamataufnahme unter hyperosmotischen Bedingungen ebenfalls durch GltT erfolgt. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein Punktexperiment durchgeführt. Dabei sollte gleichzeitig aufgeklärt werden, ob Aspartat ebenfalls osmoprotektive Eigenschaften aufweist. Ein paralleler Ansatz mit dem Stamm JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)1*] diente zur Erläuterung der Rolle des *proHJ*-Operons bei der osmoprotektiven Wirkung von Glutamat. Glutamat ist das Substrat der osmotisch stimulierten, ProHJ-vermittelten Prolinsynthese, und Prolin ist das vorherrschende, *de novo* synthetisierte kompatible Solut bei hochosmolaren Bedingungen in *B. subtilis* .

Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur der Stämme JH642, ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] und JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1] wurde SMM mit 1,2 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 überimpft und mit je 1 mM Aspartat, Glutamat, Prolin und Glycin Betain versetzt. Nach 13stündiger Kultivierung wurde das Wachstumsvermögen anhand der erreichten OD_{578} bestimmt (s. Abb.39).

In diesem Punktexperiment konnte gezeigt werden, dass Glutamat und Aspartat osmoprotektive Eigenschaften besitzen, wenn auch von unterschiedlicher Effizienz. Beide Substanzen werden anscheinend unter hochosmolaren Wachstumskonditionen hauptsächlich durch das Transportsystem GltT in die Zelle aufgenommen, da in der *gltT*-Mutante ADB4 sowohl Glutamat als auch Aspartat kaum noch einen positiven Effekt auf das Wachstum der Zellen haben. Die osmotischen Schutzeigenschaften dieser beiden Aminosäuren sind abhängig von der osmotisch kontrollierten Prolinsynthese, da die Unterbrechung der *proHJ*-Gene mit einer deutlichen Abschwächung der osmoprotektiven Eigenschaft von Glutamat und Aspartat einhergeht.

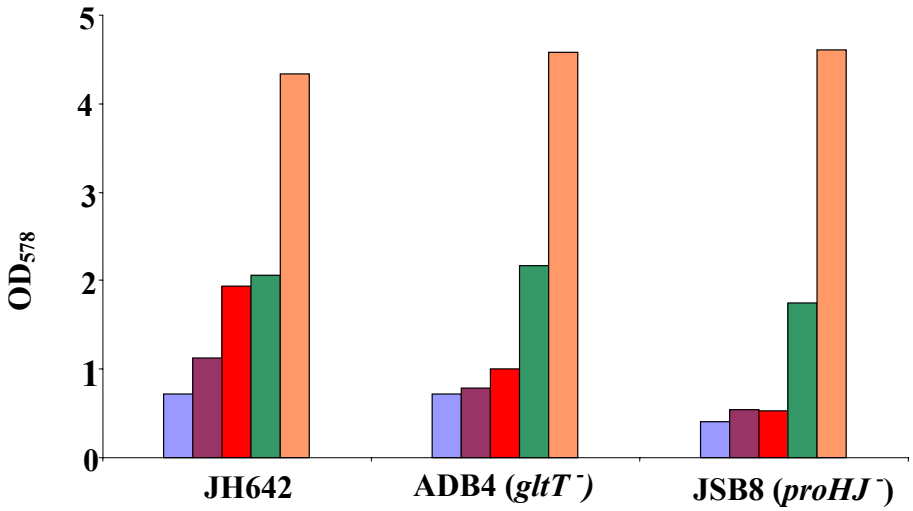


Abb.39: Die osmoprotektive Wirkung von Glutamat und Aspartat in *B. subtilis*.
Aus in SMM gewachsenen Übernachtkulturen der Stämme JH642, ADB4 (*gltT*:[*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) und JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1] wurde SMM mit 1,2 M NaCl ohne (■) und unter Zusatz von je 1 mM Aspartat (■), Glutamat (■), Prolin (■) und Glycin Betain (■) auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert. Dargestellt ist die nach 13stündiger Kultivierung erreichte OD_{578}. Präsentiert sind die Daten eines Experimentes, das in einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt wurde.

Zur näheren Analyse dieser Beobachtungen aus dem Punktexperiment wurden ausführlichere Wachstumsanalysen durchgeführt. Aus einer in SMM gewachsenen Übernahctkultur der Stämme JH642, ADB4 [*(gltT x* pUS19*)*1 *(spec)*] und JSB8 [Δ *(proHJ::tet)*1] wurde SMM mit 1,2 M NaCl und den entsprechenden Supplementen auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert. Das Wachstum wurde anhand der Zunahme der OD_{578} in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (s. Abb. 40).

Diese Wachstumsanalysen bestätigten die im Punktexperiment ermittelten Daten. Während die osmoprotektiven Eigenschaften von Prolin und Glycin Betain weder von GltT noch von *proHJ* abhängig sind, kommen die Schutzfunktionen von Aspartat und Glutamat hingegen können nur in einem *gltT* $^+$ *proHJ* $^+$ Stamm zum Tragen. GltT katalysiert die Aufnahme beider Aminosäuren. Die Abhängigkeit von *proHJ* lässt schließen, dass Glutamat und Aspartat nicht *per se* osmoprotektiv sind. Der durch Glutamat vermittelte Wachstumsvorteil unter hypertonen Bedingungen resultiert aus seiner Rolle als Substrat für die ProHJ-vermittelte Synthese des potenten kompatiblen Solutes Prolin. Die Tatsache, dass die Wirkung von Aspartat ebenfalls von *proHJ* abhängt, weist darauf hin, dass Aspartat in der Zelle erst zu Glutamat umgewandelt wird und dann in den ProHJ-Weg einfließt.

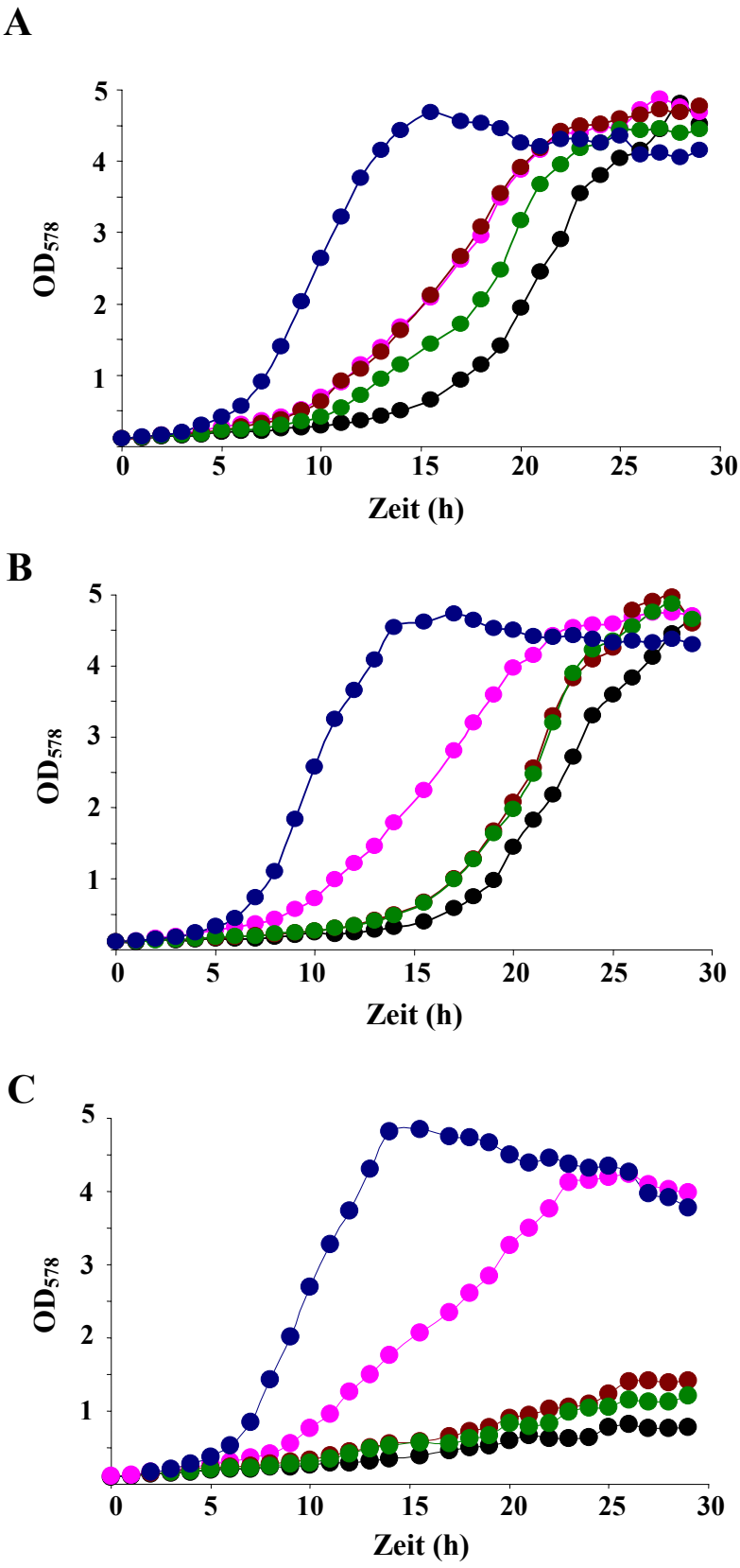


Abb. 40: Die Osmoprotektion durch Glutamat und Aspartat ist abhängig von *gltT* und *proHJ* .

Dargestellt sind Wachstumsanalysen in SMM mit 1,2 M NaCl der Stämme **A** JH642 , **B** ADB4 [(*gltT x* pUS19)1 *(spec)*] und **C** JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1]. Das Wachstum ohne (●) und mit der Supplementation von je 1 mM Aspartat (●), Glutamat (●), Prolin (●) und Glycin Betain (●) wurde verfolgt.

3.1 Der GltT – vermittelte Transport von Aspartat und Glutamat wird unter hyperosmolaren Bedingungen nicht induziert

Die vorangegangenen Wachstumsanalysen zeigten, dass die Aufnahme von Glutamat und Aspartat unter hypertonen Wachstumskonditionen hauptsächlich von dem Transportsystem GltT vermittelt wird. Um die Frage zu klären, ob die Aufnahme unter diesen Bedingungen induziert wird, wurde der Transport unter hyperosmolaren Bedingungen analysiert. Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur der Stämme JH642 und ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) wurde SMM und SMM mit 0,8 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und bis zum Erreichen der frühen exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 – 0,7) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mit radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat versetzt (Endkonzentration 20 µM). Die Glutamat– und Aspartataufnahme wurde bei 37°C in Abhängigkeit der Zeit verfolgt. Als Positivkontrolle für einen durch Hypertonie stimulierten Transport wurde parallel die Aufnahme von Glycin Betain analysiert, ebenfalls mit einer Substratkonzentration von 20 µM (s. Abb. 41).
Die Transportanalysen zeigten, dass im Stamm JH642 unter hyperosmotischen Bedingungen die Aufnahme von Glutamat nicht induziert wird, sondern im Gegenteil geringfügig reprimiert wird (SMM: 36 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 2; SMM mit 0,8 M NaCl: 26 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 0,8). Die Aspartattransportrate unter Salzstress ist deutlich geringer als in SMM (SMM: 21 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 4; SMM mit 0,8 M NaCl: 13 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 4). Beide Substrate können in der *gltT* – Mutante ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) kaum noch aufgenommen werden.

Dagegen wurde die als Referenz untersuchte Glycin Betain – Aufnahme sowohl in JH642 als auch in ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] durch hochosmolare Wachstumsbedingungen stimuliert; die Transportrate ließ sich in JH642 von 152 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 7 auf 264 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 20 steigern; in ADB4 [(*gltT x* pUS19)1 *(spec)*] von 148 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 7 auf 276 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ ± 12 (s. Abb. 41).
Diese Daten belegen, dass der Transport von Glutamat und Aspartat auch unter hochosmolaren Bedingungen durch GltT vermittelt, aber nicht induziert wird. Die Aufnahme von Glycin Betain erfolgt unabhängig von GltT durch die Transporter OpuA, OpuC und OpuD (Kappes *et al.*, 1996) und kann durch osmotische Reize stimuliert werden.

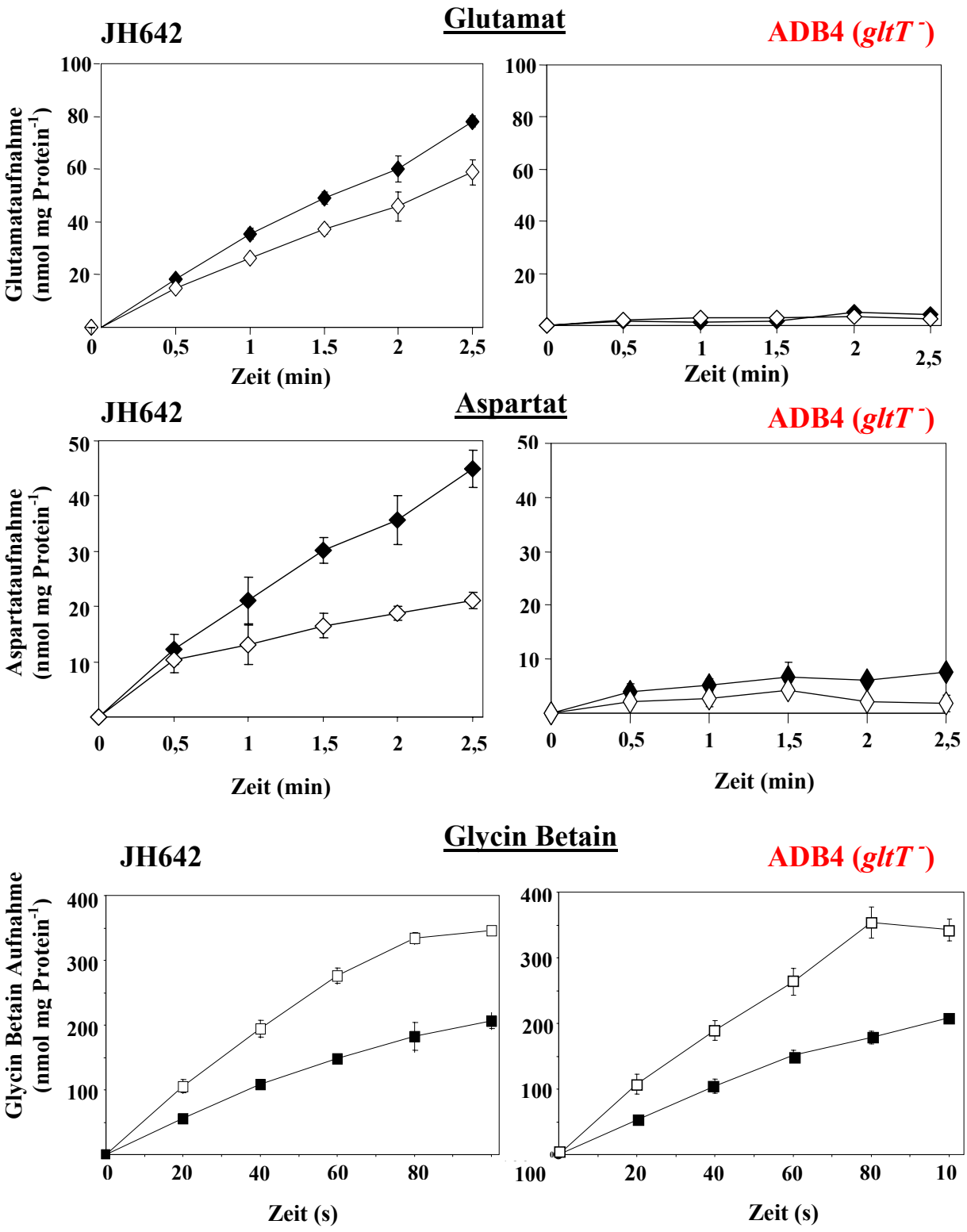


Abb.41: Transportanalysen der Stämme JH642 und ADB4 [(*gltT x* pUS19)1 *(spec)*] unter hyperosmolaren Bedingungen.

Aus einer in SMM (■) und SMM mit 0,8 M NaCl (□) exponentiell wachsenden Kultur wurde ein Aliquot entnommen und zum Zeitpunkt 0 mit radioaktiv markiertem Glycin Betain in einer Endkonzentration von 20 µM versetzt. Die Glutamataufnahme wurde anhand der intrazellulären Radioaktivität ermittelt und in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

3.2 Akkumulation von Glutamat und Aspartat bei hoher Osmolarität

Um die durch exogene Aufnahme akkumulierte Menge Glutamat bzw. Aspartat unter hypertonen Bedingungen zu untersuchen wurden sogenannte Poolexperimente durchgeführt. Aus in SMM gewachsenen Übernachtkulturen der Stämme JH642, ADB4 [*(gltT x* pUS19*)* 1 *(spec)*] und JSB8 [(*proHJ::tet)*1] wurde SMM auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft, mit radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5 bis 1) kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die aufgenommene Menge Substrat anhand der in den Zellen verbliebenden Radioaktivität bestimmt (s. Abb. 42). Dabei ergab sich, dass der Wildtypstamm JH642 in SMM 702 ± 11 µM Glutamat durch exogene Aufnahme akkumuliert. Dies lässt sich durch eine Osmolaritätserhöhung mit 0,8 M NaCl geringfügig steigern (790 ± 43 µM). Im Stamm JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1] ist die angehäufte Glutamatkonzentration unter beiden Bedingungen mit 920 ± 51 µM bzw. 915 ± 92 µM in gleich. Der Stamm ADB4 [*(gltT x* pUS19*)*1 *(spec)*] zeigt sowohl in SMM als auch in SMM mit 0,8 M NaCl nur eine geringfügige Akkumulation des Glutamates: 125 ± 2 µM bzw. 160 ± 5 µM.

Dagegen lässt sich die intrazelluläre Anhäufung von Aspartat im Wildtypstamm JH642 durch erhöhte Osmolalität (0,8 M NaCl) steigern (864 ± 9 µM auf 1055 ± 54 µM). Selbes gilt für den Stamm JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1] (SMM: 871 ± 14 µM; SMM mit 0,8 M NaCl: 1110 ± 28 µM). Der Stamm ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) weist eine vergleichbar geringe Aspartatakkumulation auf: 101 ± 9 µM in SMM und 188 ± 39 µM in SMM mit 0,8 M NaCl. Bei beiden Substraten zeigt sich im Stamm ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] eine im Vergleich zum Wildtyp sehr geringe Akkumulation, was die Rolle von GltT als hauptsächlichen Glutamat- und Aspartattransporter bestätigt.

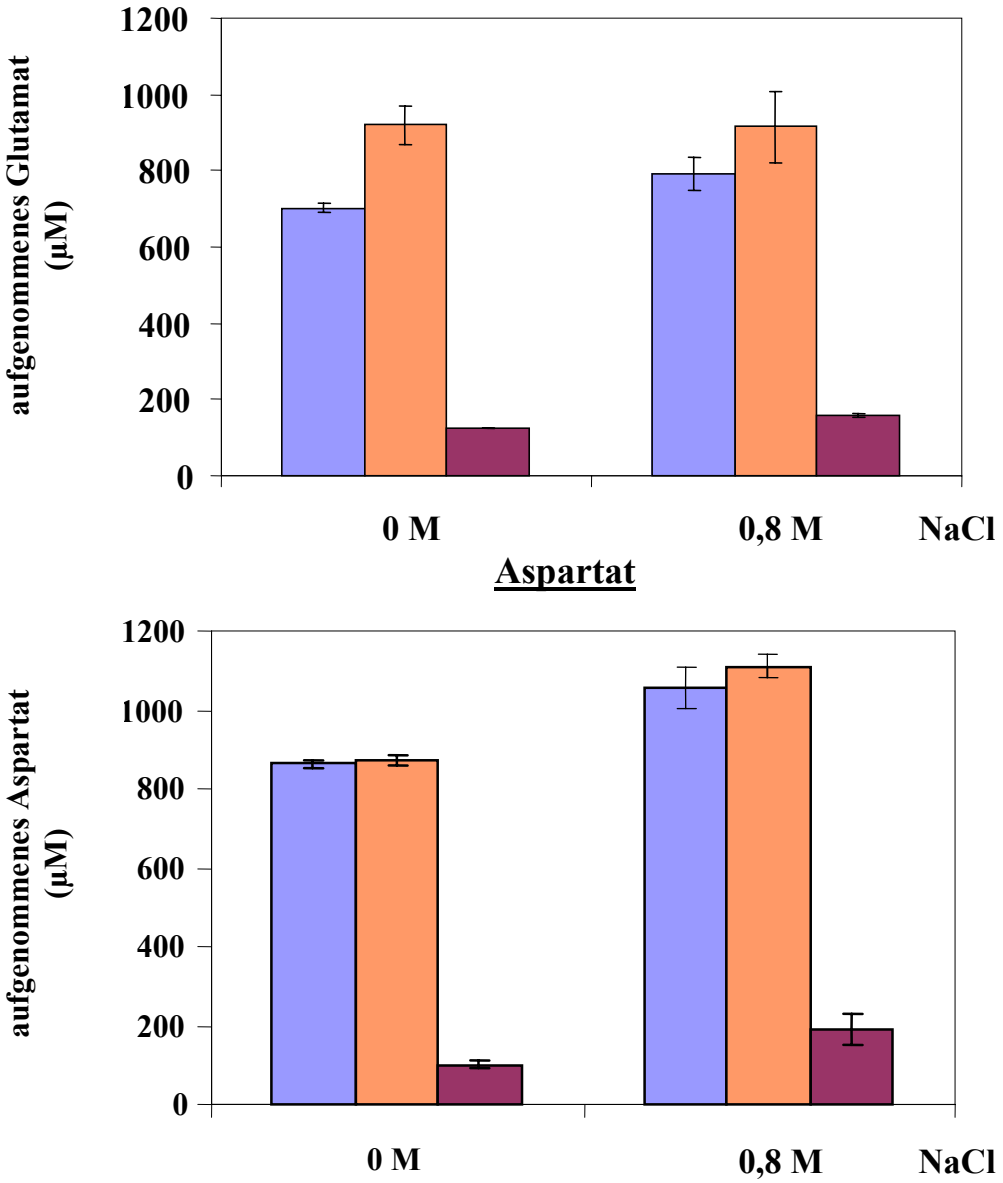


Abb. 42: Durch exogene Aufnahme akkumulierte Menge an Glutamat und Aspartat bei 0 und 0,8 M NaCl.

Dargestellt ist die akkumulierte Glutamat- und Aspartatmenge bei 0 und 0,8 M NaCl im Wildtypstamm JH642 (■), in der *proHJ* – Mutante JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1] (■) und in der *gltT* – Mutante ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] (■). Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur wurde SMM und SMM mit 0,8 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 unter der Zugabe von radioaktiv markiertem Glutamat bzw. Aspartat (Endkonzentration 20 µM) inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5-0,8). Die in den Zellen verbleibende Radioaktivität wurde bestimmt und daraus die intrazelluläre Aspartatkonzentration ermittelt. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

3.3 Bestimmung der halbmaximalen osmoprotektiven Aspartatkonzentration

Bei den bisher vorgestellten Experimenten zur Demonstration der osmoprotektiven Eigenschaften von Glutamat und Aspartat wurde eine Konzentration von 1 mM eingesetzt.
Diese hohe Konzentration im umgebenden Medium ist unter den natürlichen Wachstumsbedingungen von *B. subtilis* eher unwahrscheinlich. Daher sollte der Grad der Abhängigkeit der Osmoprotektion von der angebotenen Aspartatkonzentration untersucht werden. Es sollte die halbmaximale Konzentration von Aspartat ermittelt werden, die zur Protektion gegen osmotischen Stress in *B. subtilis* ausreicht.
Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur des Wildtypstammes JH642 wurde SMM mit 1,2 M NaCl, supplementiert mit Prolin, Glutamat- bzw. Aspartat in Konzentrationen von 0 bis 1 M auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft. Nach 13-stündiger Kultivierung wurde das Wachstumsvermögen anhand der erreichten OD_{578} bestimmt (s. Abb. 43). Dabei zeigte sich, dass schon die Zugabe von 250 µM Glutamat bzw. Prolin einen osmoprotektiven Effekt hat, während Aspartat in höheren Mengen eingesetzt werden muss. Die halbmaximale Protektion ist bei allen drei Substanzen bei ca. 400 µM zu beobachten. Aspartat kann allerdings das Wachstum nur bis zu Faktor 3 steigern, während Glutamat und Prolin die effizienteren Osmoprotektiva sind und ein bis zu 6-fach höheres Wachstum vermitteln.

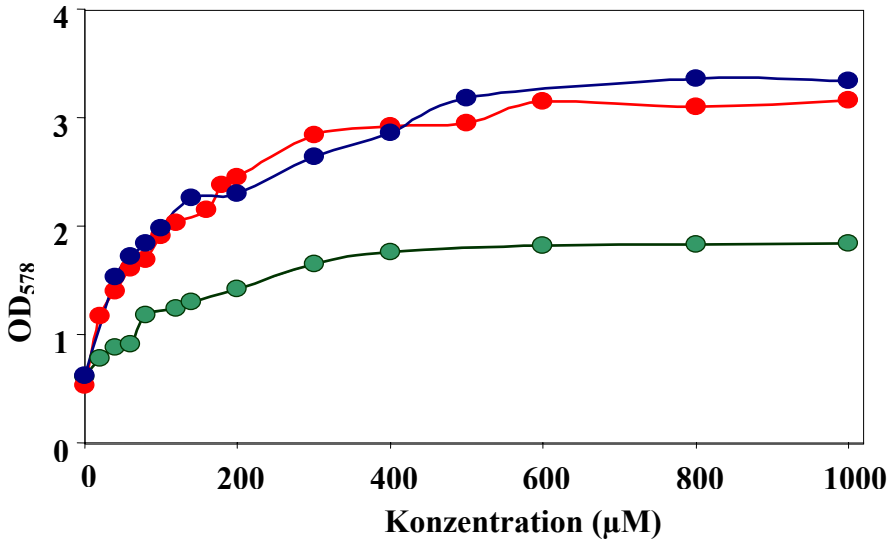


Abb. 43: Ermittlung der halbmaximalen osmoprotektiven Konzentrationen von Prolin, Glutamat und Aspartat.

Aus einer in SMM gewachsenen Übernachtkultur des Wildtypstammes JH642 wurde SMM mit 1,2 M NaCl, supplementiert mit Glutamat (●), Aspartat (●) oder Prolin (●) in Konzentrationen von 0 – 10000 µM auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft. Nach 13-stündiger Kultivierung wurde das Wachstumsvermögen anhand der erreichten OD_{578} bestimmt.

3.4 Northern Blot Analysen des *gltT* - Transkripts

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass GltT die hochaffine Aufnahme von Glutamat und Aspartat unter verschiedensten Bedingungen katalysiert. Daher sollte untersucht werden, ob auf transkriptioneller Ebene eine Regulation vom Gen GltT stattfindet.

Das Gen *gltT* wird im Genom von *B. subtilis* von den Genen *yhfH* und *yhfF* flankiert, wobei nur *yhfH* in derselben Orientierung wie *gltT* liegt.

Für die Northern Blot Analysen wurden Wachstumskonditionen ausgewählt, unter denen die Aufnahme von Glutamat und Aspartat nachgewiesenermaßen durch GltT stattfindet. Es sollte geklärt werden, ob der Umstand der jeweiligen Stresssituation eine Induktion der *gltT*-Transkription bewirkt.

Die Testbedingungen waren: Osmostress (1,2 M NaCl), Hitzestress (52°C) und Wachstum mit Glutamat bzw. Aspartat als alleiniger Stickstoffquelle. Darüber hinaus wurde analysiert, ob die Anwesenheit des Substrates Glutamat allein eine Auswirkung auf die Expression hat. Aus unter diesen Testbedingungen exponentiell wachsenden Zellen (OD_{578} 0,8 bis 1) wurde die Gesamt-RNA präpariert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Übertragen auf eine Nylonmembran mit einer *gltT*-spezifischen antisense RNA Sonde hybridisiert. In allen Fällen konnte eine einzelne mRNA Spezies von ca. 1700 nt detektiert werden (s. Abb. 44). Dies ist größer als erwartet, da die codierende Sequenz von *gltT* 1287 bp beträgt. Es war daher aufzuklären, ob das Gen *yhfH*, das für ein putatives Regulatorprotein codiert, mit *gltT* kotranskribiert wird. Dies wurde allerdings durch Northern Blot Analysen mit einer *yhfH* spezifischen Sonde (Daten nicht gezeigt) ausgeschlossen. *gltT* wird demnach in einer monocistronischen mRNA transkribiert.

In keiner der Proben lässt sich eine Induktion im Vergleich zur Referenzprobe (SMM, 37°C) feststellen, im Gegenteil: bei 52°C ist das detektierte Signal schwächer. Dies könnte mit der technisch schwierigen RNA-Isolation aus Hitze-Zellen.zusammenhängen. Diese Analysen zeigten, dass auf transkriptioneller Ebene keine Regulation von *gltT* stattfindet, sondern dass *gltT* konstitutiv exprimiert wird.

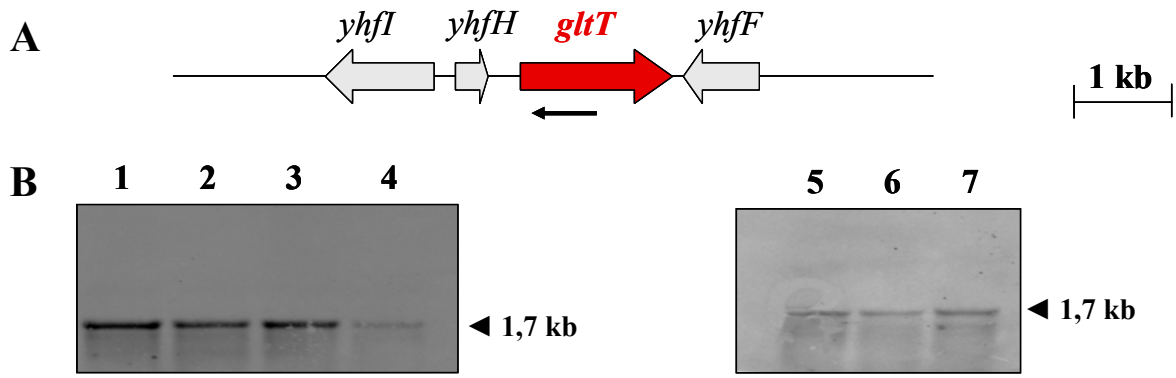


Abb. 44: Northern Blot Analysen des *gltT* – Transkripts.

Die Expressionsstärke des *gltT* – Gens wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert: 1 und 5: SMM 37°C, 2: SMM 37°C mit 1 mM Glutamat, 3: SMM 37°C mit 1,2 M NaCl, 4: SMM 52°C, modifiziertes SMM mit Glutamat (6) oder Aspartat (7) als alleinige Stickstoffquelle. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden in mindestens einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt.

4. Komplementation der *gltT* – Mutante

Bisher wurde die Funktion von GltT anhand des Phänotyps der *gltT* – Mutante ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] charakterisiert. Diese Mutante zeigt keinen hochaffinen Glutamat- und Aspartattransport mehr und wird bei Thermostress nicht mehr durch Glutamat und Aspartat protektiert (s. Kapitel 2.5). Um zu demonstrieren, dass diese Beobachtungen tatsächlich aus der Unterbrechung des *gltT*-Strukturgens resultieren und nicht auf ein Artefakt dieses Stammes zurückzuführen sind, wurde die Mutante ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] komplementiert. Dazu wurde der Bereich *´yhfH gltT* mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pX kloniert. Der so entstandene Vektor pMD28 ließ sich durch homologe Sequenzen stabil in die *amyE* Region des Stammes ADB4 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] integrieren. Die auf diese Weise entstandene Stamm wurde MDB55 genannt [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] *(amyE::gltT cat).*

Parallel dazu wurde der Vektor pMD28 in den Wildtypstamm JH642 eingebracht, um einen Stamm mit doppelter Kopienzahl von *gltT* zu erzeugen. Dieser Stamm wurde MDB58 *($gltT^+$)* (*amyE::gltT cat*) genannt. Es sollte untersucht werden, ob eine Überproduktion von GltT eine gesteigerte Glutamataufnahme zur Folge hat.

Zu MDB57 und MDB58 wurden Kontrollstämme hergestellt, die jeweils statt des Vektors pMD28 den leeren Vektor pX enthalten (MDB56 bzw. MDB23). Der Glutamattransport in den Stämmen MDB55, MDB58, MDB56 und MDB23 wurde analysiert. Die Stämme wurden in SMM bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5-0,7) kultiviert. Zu

diesem Zeitpunkt wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit radioaktiv markiertem Glutamat versetzt (Endkonzentration 20 µM) und die Glutamat-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei 37°C verfolgt.

Die Transportdaten zeigen, dass der Stamm MDB55 ([*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*]) (*amyE*: *gltT* cat) eine nur wenig geringere Glutamataufnahme (78 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$) aufweist wie der Stamm MDB23 (*gltT*$^{+}$) (*amyE* cat) mit authentischem *gltT* in Einzelkopie (123 nmol min-1 mg $Protein^{-1}$, s. Abb. 45). MDB56, die *gltT*-Mutante, die nur den leeren pX – Vektor enthält, zeigt dagegen fast keine Aufnahme von Glutamat (4 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$). Dies zeigt, dass die Einbringung einer Kopie des *gltT* – Strukturgens in eine *gltT* – Mutante den Glutamattransport wiederherstellt.

Der Stamm MDB58 *(gltT* $^{+}$*)* (*amyE*: *gltT cat*) mit zwei Kopien des *gltT* – Gens zeigte unter den getesteten Bedingungen mit 20 µM Substrat die höchste Glutamattransportrate: 198 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ im Vergleich zu 123 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ im Stamm MDB23 mit nur einer *gltT* - Kopie. Eine Überexpression von *gltT* resultiert also in einer höheren Aufnahmerate von Glutamat. Zusätzlich zum Glutamattransport wurde ebenfalls das Wachstum bei Hitze analysiert.

Mit Übernachtkulturen der Stämme MDB23 (*gltT* $^{+}$ *amyE*: cat) , MDB55 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*amyE*::*gltT cat)*], MDB58 [*gltT* $^{+}$ (*amyE*::*gltT cat*)] und MDB56 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] *amyE*::*cat*) wurde SMM jeweils auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft. Nach kurzzeitiger Kultivierung bei 37°C (10-15 min) wurde die Wachstumstemperatur auf 52°C erhöht. Das Wachstum wurde anhand der OD_{578} -Zunahme in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (s. Abb. 46).

Es zeigte sich, dass die Einbringung einer Kopie des *gltT*-Gens in die *gltT* – Mutante deren Phänotyp komplementiert. Der Stamm MDB55 [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)* (*amyE*::*gltT cat*)] wurde in gleicher Weise wie der Kontrollstamm MDB23 [*gltT* $^{+}$ *(amyE::cat)*] durch Glutamat und Aspartat gegen Hitzestress protektiert.

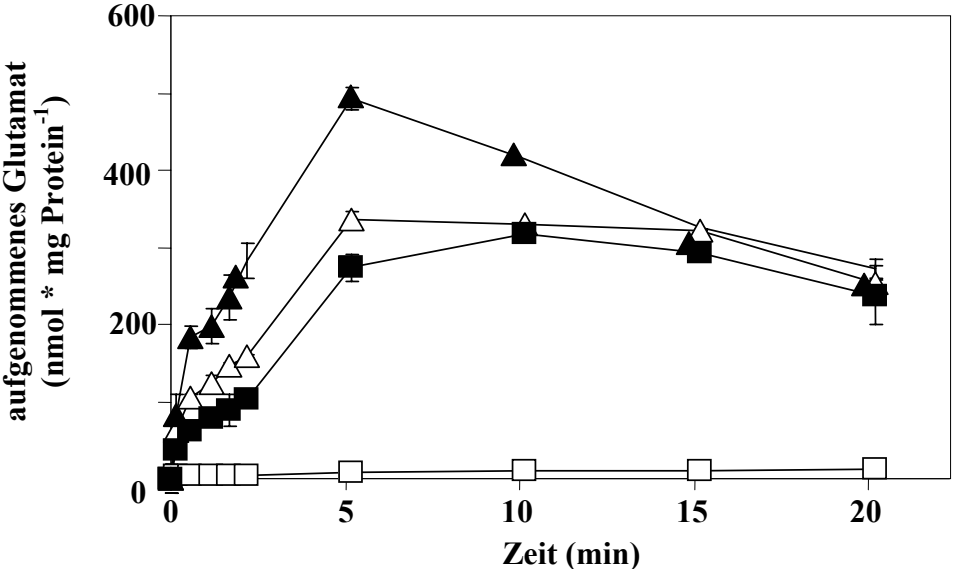


Abb. 45: Glutamataufnahme in der komplementierten *gltT* – Mutante.

Dargestellt ist die Aufnahme von Glutamat in den Stämmen MDB23 (Δ) (*gltT*$^+$ *amyE*: cat) , MDB55 (■) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] *amyE ::gltT cat*), MDB58 (▲) (*gltT*$^+$ *amyE* : *gltT* cat) und MDB56 (□) [*(gltT x* pUS19)1 *(spec)*] *amyE::*cat). Ein Aliquot einer exponentiell wachsenden SMM – Kultur der jeweiligen Stämme wurde zum Zeitpunkt 0 mit radioaktiv markiertem Glutamat (Endkonzentration 20 µM) versetzt. Die Substrataufnahme wurde anhand der in den Zellen ermittelten Radioaktivität in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

Der Stamm MDB58 [*gltT*$^+$ (*amyE*::*gltT* cat)] mit zwei Kopien des *gltT* Strukturgens zeigte in den Transportanalysen zwar eine höhere Glutamataufnahme als der Kontrollstamm MDB23 (*gltT*$^+$ *amyE*: cat), zeigte aber unter Hitzestress mit Glutamat dasselbe Wachstumsvermögen wie dieser. Der erhöhte Transport reicht scheinbar nicht aus, um unter Thermostress das Wachstum noch mehr zu verbessern (s. Abb. 47).

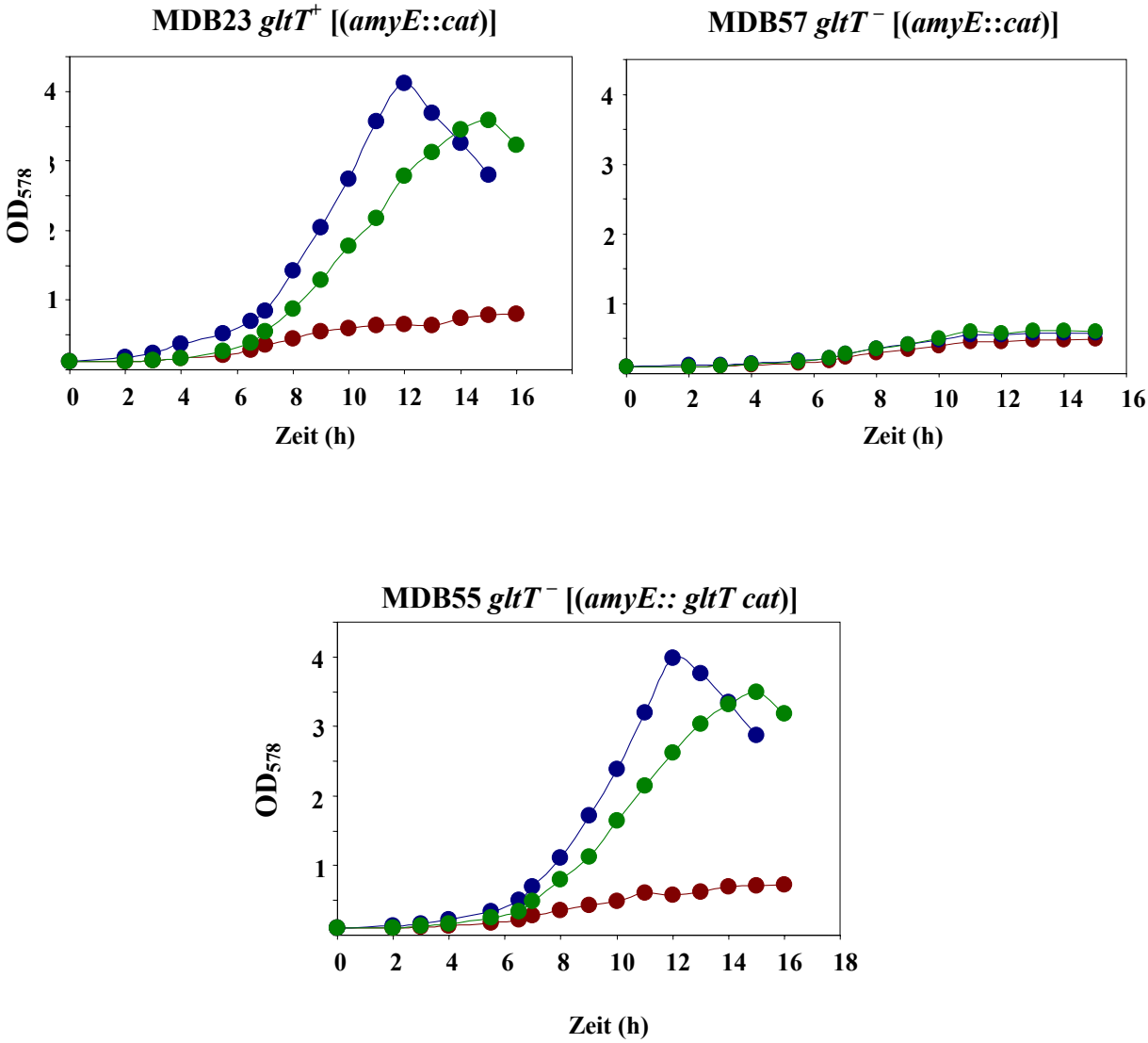


Abb. 46: Die Einbringung einer Kopie des Strukturgens *gltT* komplementiert den Phänotyp des Stammes ADB4 [(*gltT x* pUS19)1 *(spec)*].

Dargestellt ist das Wachstum der Stämme MDB23 [*gltT*$^+$ (*amyE*::*cat*)], MDB57 [*gltT* $^-$ (*amyE*::cat)] und der komplementierten *gltT* – Mutante MDB55 [*gltT* $^-$ (*amyE:: gltT cat*)] bei 52°C ohne Supplemente (●) und mit Glutamat (●) bzw. Aspartat (●) in einer Konzentration von je 1 mM.

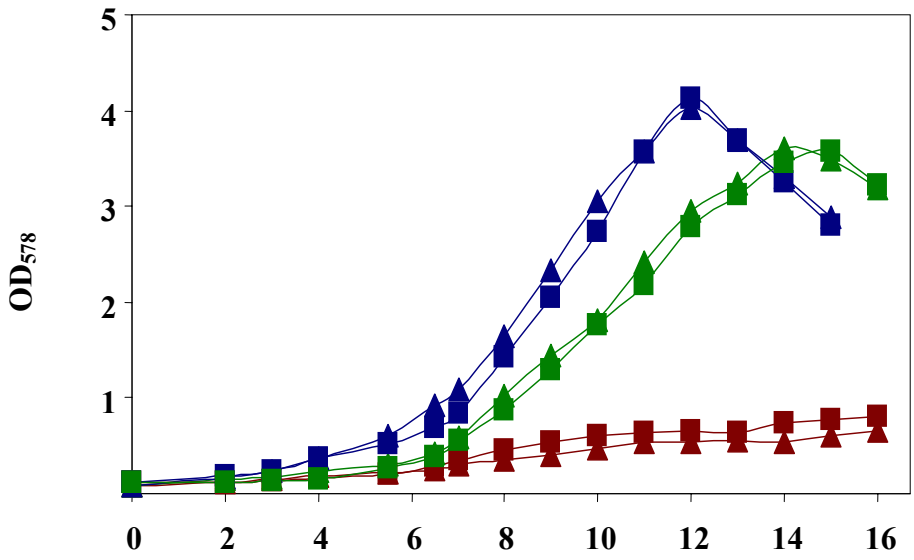


Abb. 47: Eine zusätzliche *gltT*-Kopie führt nicht zu einer besseren Hitzeprotektion durch Glutamat oder Aspartat.

Dargestellt ist das Wachstum der Stämme MDB23 [*gltT*$^{+}$ (*amyE*::*cat*)] (▲▲▲) und MDB58 [*gltT* $^{+}$ (*amyE*::*gltT* cat)] (■■■) bei 52°C ohne Supplemente (▲■) und mit Glutamat (▲■) und Aspartat (▲■) in einer Konzentration von je 1 mM.

5. Stressprotektive Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren in *B. subtilis*

Bisher konnte gezeigt werden, dass Glutamat und Aspartat als proteinogene Aminosäuren sowohl thermo- als auch osmoprotektive Eigenschaften in *B. subtilis* aufweisen. Um zu untersuchen, ob es auch noch andere proteinogene Aminosäuren gibt, die *B. subtilis* vor Stress schützen können, wurden Punktexperimente unter Osmo-, Thermo- und Cryostress durchgeführt. Bis auf die Analysen unter Cryostress, die aufgrund des kältesensitiven Phänotyps des *B. subtilis* Stammes JH642 mit dem Stamm 168 durchgeführt wurden, wurde der Stamm JH642 verwendet. Unter allen Stressbedingungen wurden die Kulturen mit je 1 mM der Aminosäuren bzw. Glycin Betain supplementiert.

5.1 Protektion gegen Thermostress (52°C) durch die exogene Zugabe von Aminosäuren in *B. subtilis*

Aus einer exponentiell wachsenden SMM Kultur (OD_{578} 0,5-0,7) des Stammes JH642 wurde SMM auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und bei 52°C kultiviert. Das Wachstumsvermögen wurde nach 11 h anhand der erreichten OD_{578} bestimmt (s. Abb.48A).

Bis auf Leucin, Lysin, Methionin und Tyrosin haben alle proteinogenen Aminosäuren einen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* unter Hitzestress (52°C).

Die exogene Zugabe von Cystein, Isoleucin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan und Valin führt interessanterweise zu einem geringeren Wachstum.

Bei der Supplementation aller anderen Aminosäuren zeigt sich nach 11 h bei 52°C ein größeres Wachstumsvermögen als ohne Supplemente. Dabei lassen sich Unterschiede in der Qualität der einzelnen Thermoprotektiva feststellen (in Klammern angegeben ist der Faktor, um den das Wachstum gesteigert werden konnte). Die besten thermischen Schutzsubstanzen sind Aspartat, Glutamin (Faktor 4,5) und Alanin (Faktor 4). Glutamat, Glycin und Histidin (Faktor 3,3) folgen, nur geringfügig schwächer sind Prolin und Glycin Betain (Faktor 2,8). Die geringste Protektion der getesteten Substanzen wurde vermittelt durch Arginin und Asparagin (Faktor 2,2 bzw. 1,7).

5.2 Protektion gegen Kältestress durch die exogene Zugabe von Aminosäuren in *B. subtilis*

Aus einer exponentiell wachsenden SMM Kultur (OD_{578} 0,5-0,7) des Stammes 168 wurde SMM auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und bei 15°C kultiviert. Das Wachstumsvermögen wurde nach 72 h anhand der erreichten OD_{578} bestimmt (s. Abb.48B).
Die Aminosäuren Cystein, Serin, Threonin und Tyrosin haben einen negativen Einfluss auf das Wachstum unter 15°C. Das Wachstum ließ sich einzig durch die Zugabe von Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Prolin und Glycin Betain steigern. Alle anderen getesteten Aminosäuren zeigten keinen Effekt.

5.3 Protektion gegen hyperosmotischen Stress durch die exogene Zugabe von Aminosäuren in *B. subtilis*

Aus einer SMM Übernachtkultur des Stammes JH642 wurde SMM, dessen Osmolalität mit 1,2 M NaCl erhöht wurde, auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und bei 15°C kultiviert. Das Wachstumsvermögen wurde nach 13 h anhand der erreichten OD_{578} bestimmt (s. Abb.49A).
Ein wachstumsfördernder Effekt ließ sich für Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Prolin und Glycin Betain feststellen. Mit Cystein, Serin, Threonin oder Tyrosin supplementierte Zellen zeigten ein reprimiertes Wachstum.
Unter hyperosmotischem Stress ist Prolin das dominante, endogen synthetisierte kompatible Solut in *B. subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990). Seine osmotisch kontrollierte Biosynthese erfolgt über den ProHJ-Weg aus dem Vorläufer Glutamat (Belitsky *et al.*, 1999).
Die Funktion als Substrat für die Prolinsynthese ist der hauptsächliche Grund für die osmoprotektive Wirkung von Glutamat. Eine *proHJ*- Mutante kann bei hoher Osmolalität kaum noch durch Glutamat protektiert werden (s. Abschnitt 3).
Um dies auch für die anderen Aminosäuren zu analysieren wurde ein Punktexperiment mit den osmoprotektiv wirkenden Aminosäuren in den Stämmen JH642 und JSB8 [Δ*(proHJ ::tet)*1] durchgeführt (s. Abb.49). Dabei zeigte sich, dass die Supplementation der untersuchten Aminosäuren Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat im Stamm JSB8 [Δ*(proHJ ::tet)*1] ohne Wirkung auf das Wachstumsvermögen blieb. Dieser Befund legt nahe, dass die osmoprotektiven Eigenschaften dieser Aminosäuren auf ihrer intrazellulären Konversion in das kompatible Solut Prolin über den ProHJ-Syntheseweg beruhen.

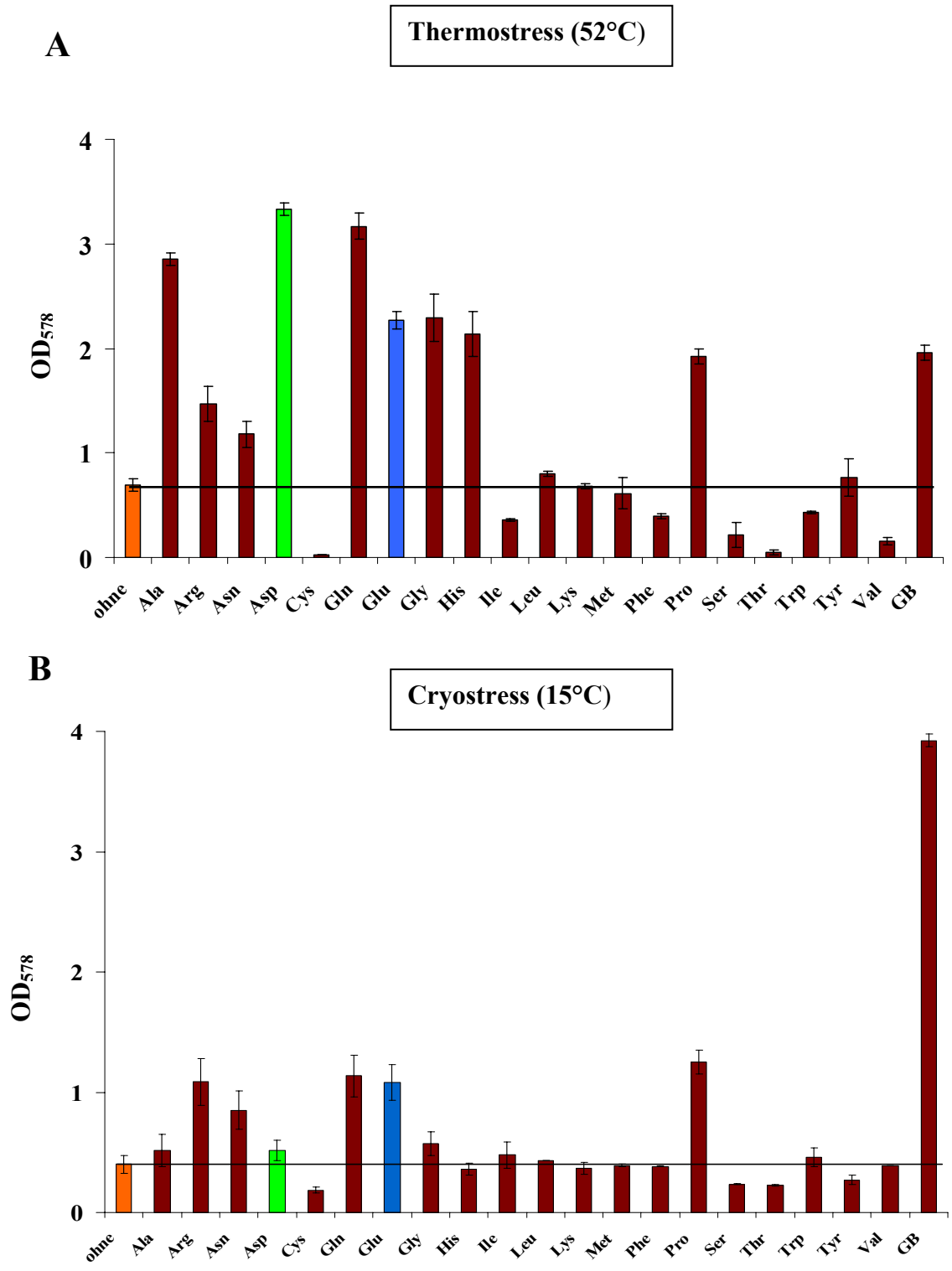


Abb. 48: Die Stressprotektion durch die proteinogenen Aminsosäuren in *B. subtilis*.

Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur des Stammes JH642 bzw.168 wurde in SMM auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft, mit je 1 mM der proteinogenen Aminosäuren bzw. Glycin Betain supplementiert und **A:** bei 52°C 11 h kultiviert bzw. **B:** bei 15°C 72 h kultiviert. Das Wachstumsvermögen wurde anhand der erreichten OD_{578} bestimmt. Hervorgehoben sind die Probe ohne Supplemente (orange), mit Aspartat (grün) und Glutamat (blau). Die präsentierten Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

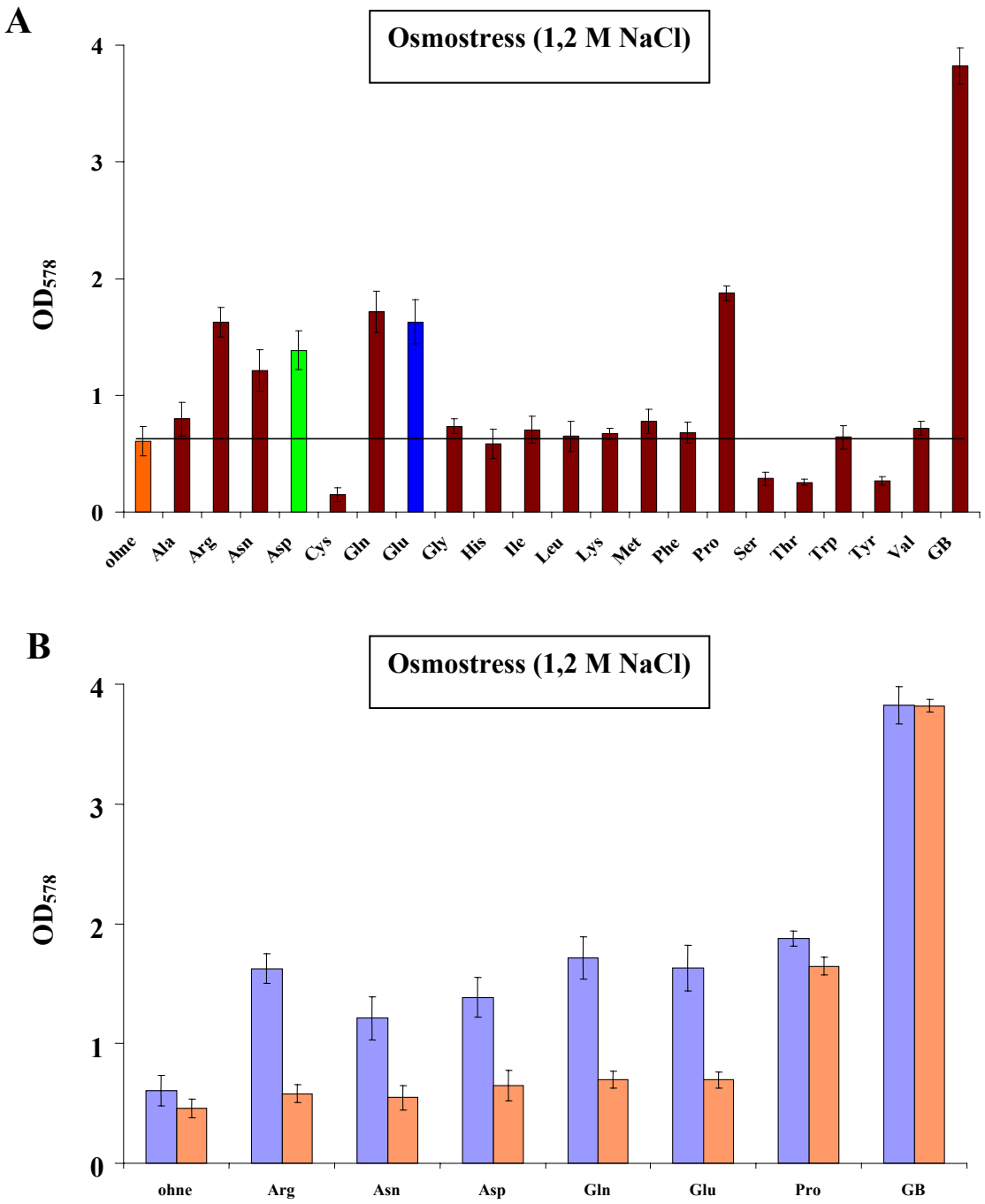


Abb. 49: Die Osmoprotektion durch proteinogene Amiosäuren ist abhängig von *proHJ*.

Eine in SMM gewachsene Übernachtkultur wurde in SMM mit 1,2 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft, mit je 1 mM der proteinogenen Aminosäuren bzw. Glycin Betain supplementiert und das Wachstumsvermögen anhand der nach 13 h erreichten OD_{578} bestimmt.
A: der Stamm JH642 wird durch eine Reihe von proteinogenen Aminosäuren protektiert; hervorgehoben sind Aspartat (grün) und Glutamat (blau).
B: die osmoprotektiven Eigenschaften der Aminosäuren Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro und GB in den Stämmen JH642 (■) und JSB8 [Δ *(proHJ ::tet)*1](■).

V. Diskussion

Die durch die Osmolarität determinierte Wasserverfügbarkeit des Habitats ist für Mikroorganismen eines der wichtigsten Parameter für Wachstum und Vermehrung. Da sie extremen Schwankungen unterliegen kann, ist für die Zelle eine aktive Anpassungsfähigkeit essentiell. Zur Tolerierung extrem hypertoner Bedingungen ist die Akkumulation kompatibler Solute in allen Domänen des Lebens verbreitet (Roberts, 2005). Diese Anhäufung erfolgt präferentiell durch die Aufnahme vorgefertigter kompatibler Solute oder zumindest ihrer Vorläufer aus der Umgebung. Sind im Medium keine solchen Substanzen vorhanden, so greift die Zelle auf die Akkumulation endogen *de novo* synthetisierter kompatibler Solute zurück. (Holtmann *et al*., 2004). In dieser Arbeit wurde die Adaptation an hyperosmotische Bedingungen im bodenbewohnenden, Gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* untersucht. *B. subtilis* ist in der Lage, ein Spektrum an kompatiblen Soluten aus dem Boden aufzunehmen, während sich die Fähigkeit zur *de novo* Synthese auf ein kompatibles Solut, die Aminosäure Prolin, beschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Prolinsynthese für osmoprotektive Zwecke als auch die Aufnahme der Aminosäuren Glutamat und Aspartat näher untersucht.

1. Die Anhäufung der Aminosäure Prolin als osmotische Schutzsubstanz

1. 1 Die Synthese von Prolin für osmoprotektive Zwecke in Bakterien

Im Genus *Bacillus* und in nah verwandten Genera lassen sich etliche Spezies finden, die unter hyperosmolarem Stress Prolin als dominantes, endogen *de novo* synthetisiertes kompatibles Solut anhäufen (Bursy, 2005). Kompatible Solute sind in der Regel metabolisch inerte Moleküle. Prolin bildet hierbei eine Ausnahme: Als proteinogene Aminosäure muss Prolin synthetisiert und degradiert werden, dies muss unter einer metabolischen Regulation passieren. Im Gegenzug muss gewährleistet sein, dass als Antwort auf einen hyperosmolaren Reiz eine rasche Akkumulation von Prolin stattfinden kann. Das bedeutet u. a., dass die Prolinabbausysteme unter diesen Bedingungen angepasst werden müssen (s. Kapitel 1.5).

Die Prolinbiosynthese in Bacteria erfolgt in drei enzymatisch katalysierten Schritten ausgehend vom Substrat Glutamat. Die Nomenklatur der involvierten Enzyme lehnt sich an die Prolinsynthesegene aus *E. coli* an: ProA (γ-Glutamylphophat-Reduktase), ProB (γ- Glutamylkinase) und ProC (Δ^1Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehdrogenase) (Baich, 1969; Hayzer und Leisin-

ger, 1980). Die Enzyme greifen in der Reihenfolge ProB – ProA – ProC in die Synthese ein. In den meisten Bakterienspezies sind die Gene für ProA und ProB als Operon *proBA* organisiert, während *proC* als monocistronische mRNA exprimiert wird (Sleator *et al*., 2003).

B. subtilis besitzt zwei Prolinsynthesewege: Zum einen der ProBA Weg, der homolog ist zu dem aus *E. coli*, und der die Zelle mit Prolin für anabole Funktionen versorgt; zum anderen der ProHJ Weg, der die Anhäufung von Prolin für osmoprotektive Zwecke gewährleistet (s. Abb. 50). ProJ ist ein Isoenzym zu ProB. ProH ist wie ProG und ProI ein ProC Ortholog. Verbunden sind beide Wege über die Glutamat-γ- Semialdehyd - Dehydrogenase ProA (Brill, 2002). ProB unterliegt einer allosterischen Feedbackhemmung durch das Endprodukt Prolin, die durch bestimmte Aminosäurereste vermittelt wird. Im Isoenzym ProJ sind die verantwortlichen Aminosäurereste verändert, so dass ProJ nicht durch Prolin inhibiert wird. Dadurch kann Prolin bis hin zu molaren Konzentrationen angehäuft werden (Belitsky *et al*., 2001).

Jedes in die Prolinsynthese involvierte Gen aus *B. subtilis* hat ein gleichnamiges Pendant in *B. licheniformis* (Veith *et al.*, 2004). Allerdings besitzt *B. licheniformis* statt nur einem sogar zwei ProA Homologe, die als *proA* und *proAA* annotiert wurden. *proA* liegt, wie in *B. subtilis*, stromabwärts von *proB*. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *proB* und *proA* in *B. licheniformis* in einer bicistronischen mRNA unabhängig von der externen Osmolarität transkribiert wird.
proAA liegt stromabwärts von *proH* und *proJ* und wird mit diesen beiden Genen als osmotisch reguliertes Operon exprimiert. Das heißt, dass in *B. licheniformis* die osmotisch kontrollierte Prolinsynthese völlig unabhängig von der für metabolische Zwecke operiert (s. Abb.50). Diese Entwicklung paralleler Prolinsynthesewege für anabole und osmoprotektive Prolinversorgung ist in *Bacilli* verbreitet. In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise darauf präsentiert, dass in den *Bacillus* Spezies *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis* und *B. vallismortis* homologe Gene zu *proH* aus *B. subtilis* vorhanden sind, die osmotisch kontrolliert werden. Ob in diesen Organismen beide Prolinsynthesewege völlig unabhängig voneinander operieren wie in *B. licheniformis*, oder ob diese Wege durch gemeinsam genutzte Enzyme verbunden sind wie in *B. subtilis*, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

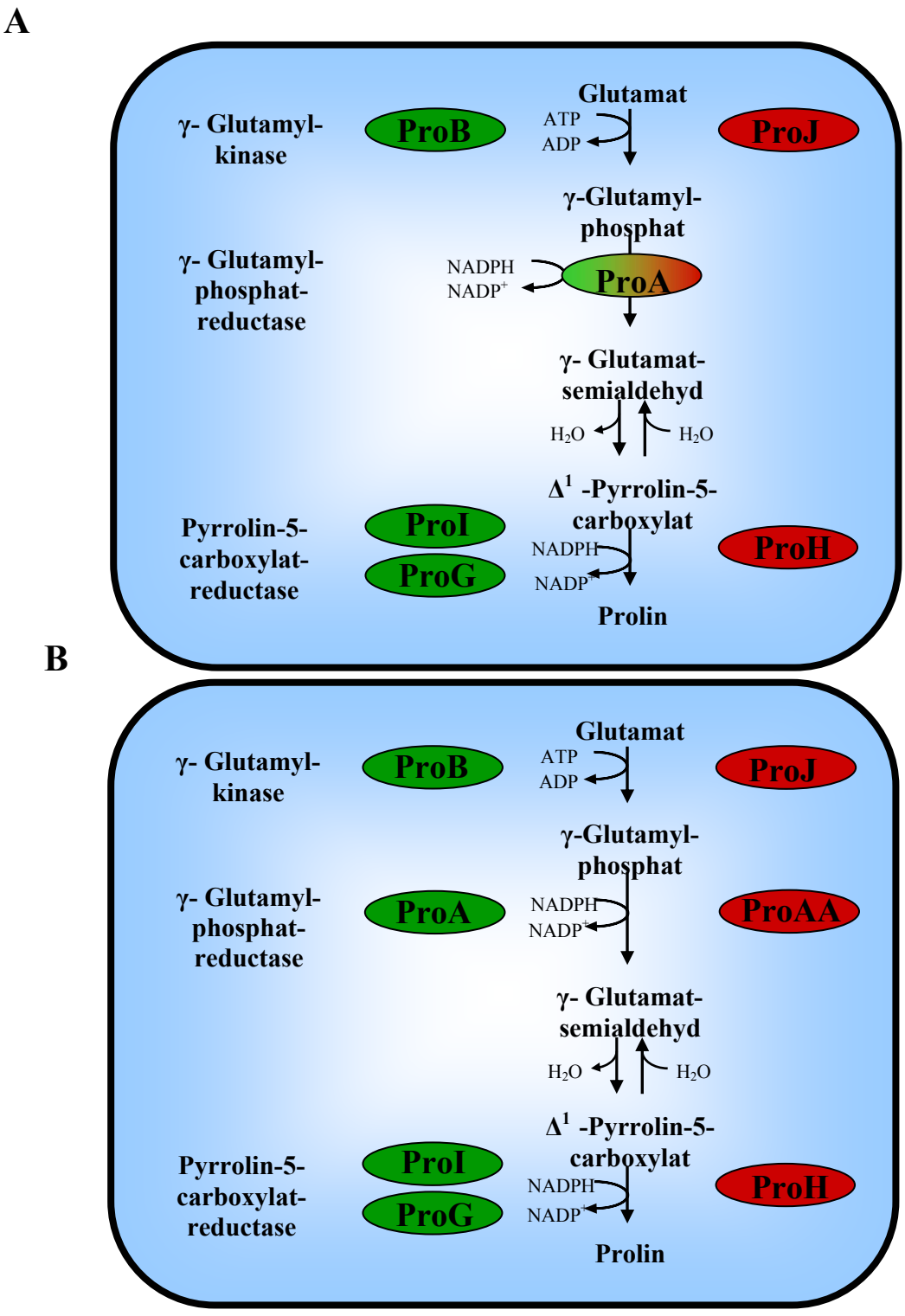


Abb.50: Die Prolinsynthesewege in den *Bacillus* Spezies *B. subtilis* (A) und *B. licheniformis* (B).

A: aus J. Brill, 2002; B: aufgrund der Sequenzhomologie annotierte Enzymfunktionen aus Veith *et al.*, 2004. In grün: die Prolinsynthese für den anabolen Bedarf, in rot: für osmoprotektive Zwecke.

Es gibt jedoch auch Organismen, die die Anhäufung von Prolin als kompatibles Solut und die Synthese von Prolin für den Stoffwechselbedarf mit einem gemeinsamen Biosyntheseweg bewältigen. Dazu gehören z.B. *Corynebacterium glutamicum*, *Listeria monocytogenes* und auch die *Bacillus* Spezies *Bacillus halodurans.* Eine Unterbrechung der *proBA*-Gene von *L. monocytogenes* führt nicht nur zu einem Defekt in der osmotischen Akkumulation unter Hypertonie, sondern auch zu einem prolinauxotrophen Phänotyp (Sleator *et al*., 2001). In diesem Organismus konnte bisher keine osmotisch abhängige *proBA* oder *proC* Transkription nachgewiesen werden. Analysen der Genomsequenz lassen vermuten, dass *L. monocytogenes* ähnlich wie *B. subtilis* mehrere ProC-Orthologe besitzt (Sleator *et al*., 2003).

In *C. glutamicum* sind die Gene *proB* und *proA* durch ein drittes Gen (*unk*) voneinander separiert (Ankri *et al*., 1996). Es ist unklar, ob *proB-unk-proA* als Cluster oder jeweils einzeln als monocistronische mRNAs transkribiert werden. Interessanterweise führt ein Defekt im *proA*-Gen nicht zu einer Prolinauxotrophie. Es existiert also eine alternative Möglichkeit, γ- Glutamylphosphat zu reduzieren; vermutlich spielt dabei die Aspartatsemialdehyd- Dehydrogenase Asd eine Rolle (Serebrijski *et al*., 1995; Ankri *et al*., 1996). Die Gene *asd* und *proA* aus *C. glutamicum* komplementieren die Auxotrophie einer *proA*-defekten *E. coli*- Mutante. *proA* komplementiert allerdings nur unter hypertonen Bedingungen effektiv, was darauf hindeutet, dass *proA* einen eigenen, osmotisch induzierbaren Promotor besitzt (Serebrijski *et al*., 1995). Dies wird gestützt durch Northern Blot- und Mikroarray-Analysen, die eine salzstimulierte Expression von *proA* nachgewiesen haben. Die Transkription von *proB* und *proC* steht vermutlich ebenfalls unter osmotischer Kontrolle (Ley, 2001; Weinand, 2004).

1.2 Die Synthese von Prolin für osmoprotektive Zwecke in Pflanzen

In Pflanzen kann Prolin, wie in Bacteria, aus dem Substrat Glutamat synthetisiert werden. Die dabei benötigten enzymvermittelten Reaktionen verlaufen homolog, wobei die prokaryotischen Enzyme ProA und ProB in Pflanzen durch ein bifunktionelles Enzym, die Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase (P5CS) ersetzt werden. P5CS weist Aktivitäten sowohl einer γ-Glutamylkinase (ProB) als auch einer γ-Glutamylphosphat-Reduktase (ProA) auf. Die Sequenzidentität zu ProA und ProB aus *E. coli* beträgt 35,7 % bzw. 33,3 % (Kishor *et al*., 2005). Alternativ können Pflanzen Prolin aus dem Substrat Arginin herstellen. Arginin wird durch eine Arginase zu Ornithin umgewandelt. Durch eine Ornithin-δ-Aminotransferase (δ-

OAT) wird Ornithin zu γ - Glutamat – Semialdehyd, das durch eine spontane Reaktion zu Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) kondensiert. An dieser Stelle verschmilzt dieser Prolinsyntheseweg mit dem Glutamatweg; P5C wird durch die Aktivität einer P5C-Reduktase zu Prolin umgewandelt (Adams und Frank, 1980).

Die Existenz alternativer Prolinsynthesewege ist die Grundlage einer auf den aktuellen Prolinbedarf zugeschnittenen Regulation. Prolin ist neben seiner Funktion als osmotische Schutzsubstanz auch eine proteinogene Aminosäure. Im pflanzlichen Modellorganismus *Vigna aconitifolia* wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Transkription des Gens für die P5CS osmotisch induziert wird, während die Expression der δ-OAT von der externen Osmolarität unberührt bleibt. Dies und noch weitere Experimente lassen vermuten, dass in *V. aconitifolia* die anabole Prolinsynthese über den sogenannten Arginaseweg (δ-OAT) verläuft, während die Anhäufung von Prolin als Adaptation an hypertone Wachstumsbedingungen über den Glutamatweg (P5CS) sichergestellt wird. Die allosterische Endprodukthemmung durch Prolin ist bei der P5CS im Vergleich zum prokaryotischen ProB deutlich herabgesetzt (Delauney *et al*., 1993). Die durch Hypertonie stimulierte P5CS - Expression konnte ebenfalls in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden (Yoshiba *et al*., 1995). Interessanterweise wies das aus Sojabohnen stammende Gen für die P5C – Reduktase, die für die Reduktion von Δ^1 – Pyrrolin- 5-Carboxylat zu Prolin verantwortlich ist und in beiden Prolinsynthesewegen eine Rolle spielt, in *E. coli* eine osmotisch regulierte Transkription auf (Delauney und Verma, 1990). Hierbei ist es bemerkenswert, dass die osmotische Regulation offensichtlich domänenübergreifend funktioniert. In Pflanzen mit mehreren P5CS Isoenzymen ist oft nur eines osmotisch induzierbar. Dies wurde in *Medicago truncatula* und Tomatenpflanzen gezeigt (Armengaud *et al*., 2004). Die Prolinakkumulation in Pflanzen und die Induktion der Synthesegene geht einher mit der Repression der Gene für die Prolindegradation (s. Kapitel 1.5) (Delauney und Verma, 1993; Peng und Verma, 1996).

1.3 Die osmotische Regulation der Prolinsynthesegene in *B. subtilis* und *B. lichenifomis*

Die Synthese von Prolin als proteinogener Aminosäure muss einer metabolischen Regulation unterliegen. Gleichzeitig muss für die Nutzung von Prolin als kompatibles Solut seine rapide Anhäufung, z.B. nach einem Salzschock, möglich sein. Um diesen beiden Anforderungen zu begegnen, gibt es in vielen prolinakkumulierenden Bakterien zwei -mehr oder minder- getrennte Wege für die Prolinproduktion.

Reportergenfusionsexperimente in *B. subtilis* mit der *proH*-Region aus *B. licheniformis* zeigten, dass sich die für die osmotisch regulierte Expression relevanten *cis*-Elemente auf 130 bp direkt stromaufwärts vom Translationsstart von *proH* befinden. Dieses Fragment zeigt eine hohe Homologie zum korrespondierenden Fragment aus *B. subtilis* (Sequenzidentitität 78,9%), das ebenfalls die osmotisch kontrollierte Expression von *proH* vermittelt.
Sequenzvergleiche mit den *Bacilli Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus mojavensis* und *Bacillus vallismortis*, ebenfalls prolinakkumulierende Organismen, zeigten, dass dieses *proH´*-Fragment sehr gut konserviert ist. Die Sequenzidentität zum entsprechenden Fragment aus *B. subtilis* beträgt in allen Fällen mehr als 95%. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Fragmente in den entsprechenden *Bacilli* ebenfalls die osmotische Regulation von *proH* vermitteln.

Die Frage nach den für die osmotische Regulation verantwortlichen Schlüsseldeterminanten sollte in dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Die *proHJ*-Gene sind das in *B. subtilis* am stärksten osmotisch induzierte Gencluster (Steil *et al*., 2003). Ihre physiologische Aufgabe ist gut untersucht (Brill, 2002). Daher eignet sich *proHJ* hervorragend für detaillierte Untersuchungen der osmotisch kontrollierten Transkription.
Zunächst wurde der von J. Brill (2002) postulierte osmotisch regulierte Promotor durch gezielte Mutationen verifiziert. Weitere, ortsgerichtete Mutagenesen dieses verifizierten, osmoregulierten σ^A-Promotors sollten dazu dienen, für die osmotische Regulation essentielle Promotordeterminanten zu identifizieren. Eine sukzessive Annäherung an die Konsensussequenz σ^A-abhängiger Promotoren (Helmann, 1995) führte zwar zu einer dramatischen Erhöhung der Transkription; diese wurde aber immer noch osmotisch stimuliert. Dieses Phänomen ist auch bei der Mutagenese des *opuE*-Promotors aus *B. subtilis* aufgetreten (Spiegelhalter, 1999).

Ähnliches wurde ebenfalls bei der Mutation des osmoregulierten *proU* Promotors in *S. typhimurium* beobachtet; auch dort stieg in den meisten Mutanten die Basalaktivität, ohne die osmotische Kontrolle einzubüßen (Druger-Liotta *et al*., 1987). Auch die Aktivität nicht-osmotisch regulierter σ^A-Promotoren steigt, wenn die Promotorsequenz dem Konsensus angeglichen wird (Voskuil und Chambliss, 1995). Offensichtlich hat die durch die verbesserte Erkennungssequenz gesteigerte Initiation der RNA-Polymerase nichts mit der osmotischen Regulation zu tun.
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Gelretardationsexperimente mit *B. subtilis*-Zellextrakten deuteten darauf hin, dass unter *proHJ*-induzierenden Bedingungen ein Protein an die *proHJ*-Promotorregion bindet. Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei keineswegs um ein reelles Aktivatorprotein handelt, sondern um Artefakte,wie z.B. die RNA-Polymerase, unspezifisch bindende Proteine oder Veränderungen des elektrophoretischen Laufverhaltens aufgrund Sekundärstrukturänderungen. Sämtliche bekannte und potentielle Transkriptionsregulatoren aus *B. subtilis* wurden in Zusammenarbeit mit K. Kobayashi auf ihren Einfluss auf die *proHJ* Expression hin untersucht. Keines dieser Systeme offenbarte sich unter den getesteten Bedingungen als Aktivator für *proHJ*. Die einzige Mutante, die ein vom Wildtyp abweichendes Transkriptionsprofil aufwies, war der *sigH*⁻ - Stamm. SigH zeigte hierbei allerdings eher den Effekt eines Repressors: Die Inaktivierung des Strukturgens *sigH* führte zu einer höheren, aber immer noch osmotisch kontrollierten Expression von *proHJ*, ein ähnlicher Phänotyp wie bei der Deletion del1 der 5´UTR (s.u.).

Durch die Verkürzung des minimalen regulatorischen *proH´*- Fragmentes und den Ausschluß des Promotors deutet alles auf die 5´ untranslatierte Region (5´UTR) der *proH* mRNA als Schlüsselelement für die osmotische Kontrolle von *proHJ* hin. Es gibt vielfach Beispiele für Genregulationen, die durch Elemente in der 5´UTR vermittelt werden. Diese Elemente werden riboswitches (RS) genannt. Das Feedbackregulation des Lysinsynthesegens *lysC* in *B. subtilis* wird z.B. durch einen RS kontrolliert. Bei der Bindung von Lysin ändert sich die RNA – Konformation derart, dass eine Terminationsstruktur entsteht (Sudarsan *et al*., 2003). Auch temperaturbedingte Geninduktionen werden von RS vermittelt (Waldminghaus *et al*., 2005). Um die Rolle der 5´UTR und eines eventuellen RS für die Transkription von *proHJ* in *B. subtilis* aufzuklären, wurden durch gezielte Mutagenesen in den konservierten Bereichen Deletionen eingeführt. Die so entstandenen Konstrukte (*proH* del1-4) zeigten interessante Expressionsmuster. Die Deletion del1 führte zu einer höheren Expression (Faktor 2), verhielt sich aber in Bezug auf die osmotische Induzierbarkeit genauso wie der Wildtyp. Denkbar wä-

re, dass durch diese Deletion ein „silencing“ Element ausgeschaltet wurde, das für die Repression des Promotors, aber nicht für seine osmotische Regulation zuständig ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Deletionsanalysen des *proU*-Operons aus *S. typhimurium* gemacht. *proU* codiert für ein Glycin Betain- und Prolinaufnahmesystem, dessen Transkription unter osmotischer Kontrolle steht. Die Deletion der *proU* Region +73 bis +274, führt zu einer höheren, aber immer noch osmotisch stimulierten Expression. Daraus wurde geschlossen, dass sich in dieser Region ein sogenanntes „silencing“ Element befindet (Fletcher und Csonka, 1995). Interessanterweise deckt sich dieser Phänotyp genau mit der *proH*-Expression in einer *sigH*-Mutante. *proHJ* hat keinen *sigH*-Promotor. Man könnte spekulieren, dass *sigH* eine, wenn auch indirekte, Wechselwirkung mit der in del1 deletierten Region eingeht. Die Einführung der Deletionen del2 und del4 setzte die osmotische Induzierbarkeit des *proHJ*-Promotors herunter. Anscheinend wurden mit diesen Deletionen Elemente betroffen, die direkt oder indirekt mit der osmotischen Regulation zu tun haben. Ob diese Elemente proteinbindende Motive sind oder ob es sich hierbei um strukturgebende Sequenzen handelt, konnte nicht geklärt werden.

Vorschläge für die Sekundärstrukturbildung der *proH* 5´UTR wurden mit Hilfe des Programmes mfold (http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold) erstellt. Eines dieser Modelle ist in Abb. 51 dargestellt. In dieser vorgeschlagenen Struktur ist die durch die Deletion del1 betroffene Region ein komplett einzelsträngiger Bereich. Die del2- sowie die del4-Region sind Bereiche, in denen es teilweise zu einer Doppelstrangbildung der RNA kommt. Mit der Deletion del3 und M11, die sich zum Teil überlappten, wurde die Promotoraktivität komplett unterdrückt. Durch detailliertere Untersuchungen dieser Region konnten letztendlich drei Basen identifiziert werden, die offenbar essentiell für die Transkription sind (Mutation M12). Alle durch die Mutationen del3, M11 und M12 veränderten Basen gehen in dem in Abb. 51 abgebildeten Modell Paarungen mit benachbarten Basen ein. Möglicherweise ist dies essentiell für eine Stabilisierung der mRNA. Damit könnte der komplette Verlust der Promotoraktivität in den angesprochenen Mutanten erklärt werden. Vergleiche mit Strukturen der (aufgrund der hohen Sequenzähnlichlichkeit vermuteten) 5´UTR der anderen *Bacilli* zeigten fast eine vollständige Übereinstimmung in den Regionen del1 bis del4 mit der aus *B. subtilis* bekannten Sekundärstruktur. Einzig *B. licheniformis* weicht in einer Base in Region del3 ab; hier ist sie ungepaart während sie in *B. subtilis* Teil eines Doppelstranges ist. Die (möglicherweise für die osmotische Induktion bedeutenden) Regionen del2 und del4 sind in *B. subtilis* und *B. licheniformis* identisch (s. Anhang).

Vorschläge für Sekundärstrukturen, bei denen ein Wegfall der Region del1 bis del4 berücksichtigt wurde, sind im Anhang gezeigt. Auffallend ist dabei, dass die für die mutierten Fragmente vorgeschlagenen Sekundärstrukturen energetisch gesehen günstiger sind als das Wildtypfragment (Mutanten: dG = ca. -20 kJ/ mol im Vergleich zu dG = -9 kJ/ mol) und daher möglicherweise rigidere Bindungen enthalten. Detailliertere Analysen dieser Regionen konnten im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr durchgeführt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der Promotor- und der UTR-Mutagenese, so fällt auf, dass in beiden Fällen Mutanten erzeugt werden konnten, die zwar immer noch osmotisch stimuliert, aber auf einem höheren Basalniveau exprimiert werden als der Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *proHJ* zwei unterschiedlichen Regulationen unterliegt. Zum einen scheint die *proHJ*-Transkription einem „silencing“ zu unterliegen, also einem Element, dass die Transkription reprimiert. Zum zweiten scheint es ein davon unabhängiges System zu geben, dass die osmotisch induzierte Expression gewährleistet.
Die Repression der *proHJ*-Expression hat vermutlich energetische Gründe. Die Analyse der erzeugten Mutanten hat demonstriert, dass eine höhere Transkription und eine damit einhergehende vermehrte Produktion von Prolin keinen physiologischen Sinn hat. Weder lässt sich dadurch mehr Salz – noch Kälte- oder Hitzeresistenz in *B. subtilis* hervorrufen. Daher ist es für die Zelle sinnvoll, die Prolinproduktion auf dem geringsten Level zu halten, der ausreicht, sich entsprechend der osmotischen Gegebenheiten zu schützen.
Wie die osmotische Regulation von *proHJ* im einzelnen funktioniert, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Promotor an sich nicht die Schlüsseldeterminante der osmotisch kontrollierten Transkription birgt, sondern dass diese sich anscheinend in der 5´untranslatierten Region der *proH*-mRNA befindet. Diese Vermutung resultiert aus der Beobachtung, dass bestimmte Mutationen dieser Region die osmotische Induzierbarkeit von *proHJ* herabsetzten. Die Suche nach *trans*-aktiven Elementen ergab, dass keiner der zurzeit bekannten potentiellen Transkriptionsregulatoren aus *B. subtilis* die osmotische Regulation von *proHJ* vermittelt.

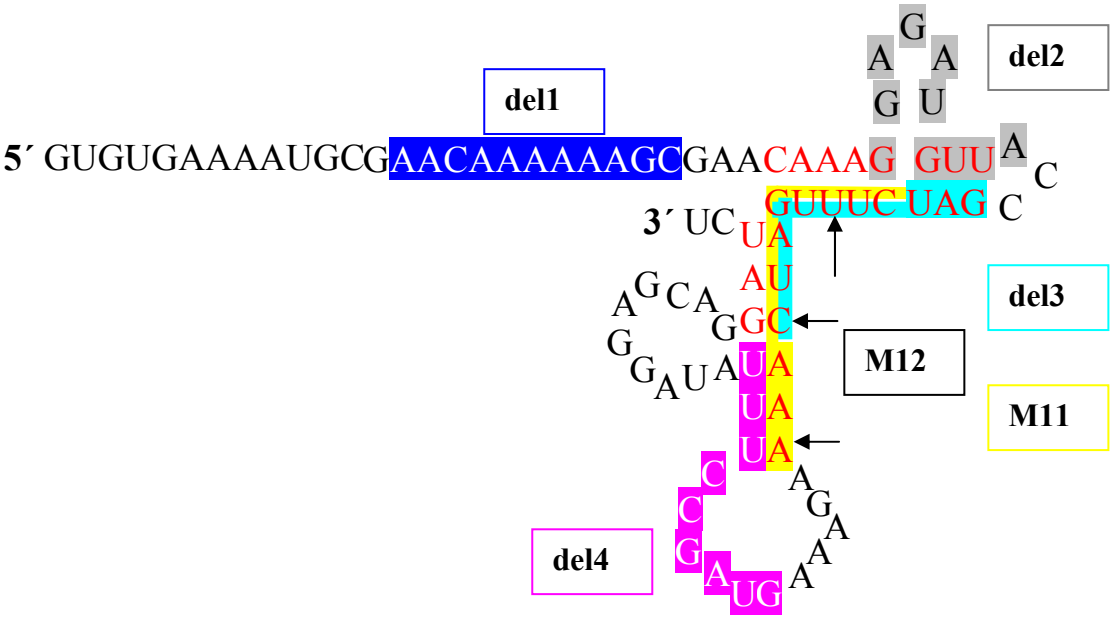


Abb. 51: Mögliche Sekundärstruktur der 5´UTR von *proH* aus *B. subtilis*.

Die Erstellung des abgebildeten Modells erfolgte mit dem Programm mfold (http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold). Hervorgehoben sind in rot die vorhergesagten Doppelstrangbereiche. Eingezeichnet sind die eingeführten Deletionen del1 (dunkelblau unterlegt), del2 (grau unterlegt), del3 (hellblau unterlegt), M11 (gelb unterlegt) und del4 (pink unterlegt). Die Pfeile kennzeichnen die in der Mutation M12 ausgetauschten Basen. Die Parameter für dieses Modell waren 37°C und 50 mM NaCl.

1.4 In *B. subtilis* vermittelt eine Prolinüberproduktion keine erhöhte Salzresistenz

Prolin ist das unter Hypertonie dominante endogen synthetisierte kompatible Solut in *B. subtilis*. In dieser Arbeit wurden durch Veränderungen des *proHJ*-Promotors *B. subtilis* - Mutanten erzeugt, die Prolin überproduzierten (3-15 fach je nach Osmolarität). In keinem der durchgeführten Experimente zeigten diese Stämme einen Wachstumsvorteil unter hyperosmotischem Stress. Sie waren aber weniger sensitiv gegenüber dem toxischen Prolinanalogon D,L 3,4 Dehydroprolin, was mit der Verdünnung von DHP durch den vermehrten Prolingehalt zusammenhängt.
Die Überproduktion des kompatiblen Soluts Prolin und ihre Auswirkungen auf die Osmotoleranz war schon mehrfach Gegenstand eingehender Untersuchungen in verschiedenen Organismen. In *L. monocytogenes* besitzen feedbackinhibierte Mutanten von ProB zwar einen höheren intrazellulären Prolingehalt, aber keine erhöhte Salzresistenz. *E. coli* (Δ *proBA*) Stämme aber, die das mutierte *L. monocytogenes proBA* Konstrukt heterolog exprimieren, zeigen eine deutlich höhere Osmotoleranz als der Wildtyp (Sleator *et al*., 2001). In Anlehnung an dieses Experiment wurde in dieser Arbeit das *proHJ*-Operonkonstrukt mit hyperaktivem Promotor in *E. coli* eingebracht. Dies führte leider nicht zum erwarteten Ergebnis. Diese Zellen zeigten keine vom Wildtyp abweichende Osmoresistenz (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise funktioniert die osmotische Regulation von *proHJ* in *E. coli* nicht. Desweiteren könnte der Pool an ProA, das neben *proHJ* für die Prolinsynthese gebraucht wird, ein weiterer, limitierender Faktor sein, da *proBA* aus *L. monocytogenes* konstitutiv exprimiert wird.

Stämme von *Salmonella typhimurium*, die durch eine ProB-Mutation Prolin überproduzierten, zeigen eine erhöhte Osmotoleranz. Eine Bestimmung des intrazellulären Prolingehalts dieser Stämme ergab eine 30 bis 400-fach höhere Prolinanhäufung als im Wildtyp, abhängig von der Osmolarität des Mediums (Csonka, 1981). Bedenkt man, dass in den in dieser Arbeit behandelten *B. subtilis* Mutanten der Prolingehalt nur um Faktor 3 bis 15 im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass dies nicht ausreichend war, um einen reellen Wachstumsvorteil unter hyperosmolaren Bedingungen zu erzeugen.
Das für die erhöhte Prolinproduktion in *S. typhimurium* verantwortliche mutierte *proB* Gen wurde zusammen mit *proA* heterolog in *E. coli* exprimiert. Die auf diese Weise konstruierten Stämme waren resistent gegenüber dem toxischen Prolinanalogon L-Azetidin-2-Carboxylat (AZC), was auf eine Prolinüberproduktion schließen ließ. Interessanterweise zeigten jedoch

über die Hälfte dieser Mutanten dennoch keine höhere Salzresistenz. Dies erinnert sehr an die Situation in *B. subtilis* -Promotormutanten. Möglicherweise reicht bereits eine vergleichsweise geringfügige Steigerung des internen Prolinpools aus, um den Effekt toxischer Prolinanaloga zu mildern, während zur Verbesserung der Salzresistenz ein dramatischer Anstieg des intrazellulären Prolingehalts vonnöten ist.

In Pflanzen wurde schon mehrfach beschrieben, dass eine Überproduktion von Prolin einhergeht mit einer erhöhten Resistenz gegen Salz und Austrocknung (Hong *et al*., 2000; Han und Hwang, 2003; Kishor *et al*., 2005). In transgenen Tabakpflanzen z.B. wurde eine Prolinüberproduktion durch die Einbringung des Gens P5CS aus *Vigna aconitifolia*, das für eine Δ^1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase codiert, erzielt. Dieses Enzym erfüllt sowohl die Funktion einer γ-Glutamylkinase (ProB) als auch die einer Glutamat-γ-Semialdehyd – Dehydrogenase (ProA) und setzt Glutamat in Δ^1-Pyrrolin-Carboxylat um. Die Prolinüberproduktion verlieh diesen transgenen Pflanzen eine erhöhte Salzresistenz (Kishor *et al*., 1995). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* schützt Prolin wirksam vor Kälte. Eine Prolinüberproduktion führt hier zu einer höheren Überlebensrate nach Einfrieren (Takagi *et al*., 2000; Morita *et al*., 2002).

Vergleicht man diese Ergebnisse miteinander, so fällt auf, dass es in Gram-positiven Bakterien offenbar schwierig ist, einen Wachstumsvorteil durch die Überproduktion des kompatiblen Solutes Prolin zu erzielen, während es für Gram–negative Bakterien und Eukaryonten durchaus positive Beispiele gibt.

1.5 Die Degradation von Prolin in prolinakkumulierenden Organismen

Zum Abbau von Prolin wird in pflanzlichen Zellen durch eine Prolinoxidase bzw. Prolindehydrogenase Prolin zu Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) oxidiert, das wiederum durch eine P5C-Dehydrogenase zu Glutamat umgesetzt wird. In Bakterien wie z. B. *E. coli* werden beide Reaktionen von einem Enzym, PutA, katalysiert (Ling *et al*., 1994).
Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass Prolin durch die Enzyme PutB und PutC (Prolinoxidase und P5C-Dehydrogenase) zu Glutamat degradiert wird. Die Gene *putB* und *putC* sind zusammen mit *putP* als Operon organisiert, dessen Expression schon durch geringe Mengen externes Prolin (10 µM) im Medium induziert wird. *putP* codiert für einen hochaffinen Prolintransporter (Atkinson *et al*., 1990; Moses, 1999; Bremer, 2002). Arrayanalysen hyperosmotisch gestresster *B. subtilis* Zellen zeigten, dass *putPCB* unter Salzstress nicht reprimiert wird, sondern konstitutiv exprimiert wird (Steil *et al*., 2003). Detailiertere Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, dass die Transportaktivität unter PutP durch hyperosmolare Bedingungen reprimiert wird (Moses, 1999). Wie *B. subtilis* es schafft, die PutBC-vermittelte Degradation des unter Hochsalz akkumulierten Prolins zu verhindern, ist bisher noch nicht vollständig geklärt (Bremer, 2002).

Es existieren zahlreiche Hinweise darauf, dass der Abbau von Prolin in Pflanzen unter Salzstress gehemmt wird (Delauney und Verma, 1993; Peng und Verma, 1996; Kishor *et al*., 2005). Das Gen für die Prolinoxidase in *A. thaliana*, ERD5, wird z.B. unter dehydrierenden Bedingungen reprimiert (Kiyosue *et al*., 1996). Die P5C-Dehydrogenase aus Kartoffelpflanzen wird *in vitro* durch NaCl, genauer Chloridionen, gehemmt (Forlani *et al*., 1997). Darüber hinaus ist es bereits mehrfach gelungen, durch gezielte Ausschaltung der Prolinabbaugene in Pflanzen prolinüberproduzierende Stämme zu erzeugen (Nanjo *et al*., 1999; Kishor *et al*., 2005).

2. Stressprotektion von *B. subtilis* durch exogen angebotene Aminosäuren

2.1 Die Wirkweise osmoprotektiver Aminosäuren in *B. subtilis*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die proteinogenen Aminosäuren Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat und Prolin osmoprotektive Eigenschaften besitzen. Für Prolin und Glutamat war dies bereits bekannt (von Blohn, 1997; Kerres, 2002). Bis auf Prolin

haben alle diese Aminosäuren in einem *proHJ*-defektem Stamm kaum noch einen Effekt auf das Wachstum unter Salzstress. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass alle osmoprotektiven Aminosäuren via ProHJ zu Prolin umgewandelt werden. Prolin ist das dominante, endogen synthetisierte kompatible Solut in *B. subtilis*. Glutamat dient als direktes Substrat für die ProHJ-vermittelte Prolinsynthese. Glutamin, Asparagin und Aspartat können alle in je einem enzymatischen Schritt zu Glutamat umgewandelt werden und dann in den ProHJ-Weg einfließen (s. Abb. 51). *B. subtilis* besitzt meherere Orthologe der Aspartataminotransferase (AspD, YhdR, YkrV, YurG, YwfG) sowie der Asparaginsynthetase (AsnB, AsnH, AsnO); es ist unklar, welche Enzyme hier zum Tragen kommen. Auch die unter hyperosmolaren Bedingungen operierenden Aufnahmesysteme für Arginin, Asparagin und Glutamin sind unbekannt. Ein Aufnahmesystem für Asparagin wurde bisher nicht charakterisiert. Für die Aufnahme von Glutamin gibt es mindestens zwei ABC-Transporter: GlnHMPQ und YckIJK (Kunst *et al*., 1997). Unter isoosmotischen Bedingungen wird Arginin durch das System ArtPQM in die Zelle aufgenommen (Helmann, 2001). Nach der Aufnahme kann Arginin sogar auf zwei Arten zu Prolin umgewandelt werden. Arginin wird zunächst durch die Arginase RocF in Ornithin konvertiert; dieses wiederum wird mit 2-Oxoglutarat durch RocD in Glutamat umgesetzt. Bei dieser Reaktion entsteht allerdings ebenfalls γ-Glutamat Semialdehyd, das spontan zu Pyrrolin-5-Carboxylat reagiert, dem Substrat für ProH (s. Abb.). Die Tatsache, dass andere Aminosäuren wie z.B. Histidin, das ebenfalls in zwei enzymkatalysierten Schritten zu Glutamat umgewandelt werden kann, nicht osmoprotektiv wirken, lässt vermuten, dass die Protektion durch Arginin auf seiner Konversion zu γ – Glutamat Semialdehyd beruht, das dann in die ProHJ –vermittelte Prolinsynthese einfließt.

2.3 Vorläufer für die osmoprotektive Prolinsynthese in *B. subtilis*

Nach den in 2.2 beschriebenen Experimenten wurde geschlossen, dass alle getesteten, osmoprotektiv wirkende Aminosäuren nicht selbst angehäuft werden, sondern zu dem potenten kompatiblen Solut Prolin umgewandelt werden.

B. subtilis besitzt demnach eine Spannbreite von Möglichkeiten, Prolin unter hypertonen Bedingungen zu akkumulieren. Neben der Prolinaufnahme aus der Umgebung durch das salzinduzierte Transportsytem OpuE (von Blohn *et al*., 1997) gibt es die Möglichkeit der Aufnahme von Vorläufern für die Prolinsynthese wie Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat. Weiterhin können auch prolinhaltige Di- und Oligopeptide über die Transporter Dpp

bzw. Opp aufgenommen und dann zu Prolin hydrolysiert werden (Brill, 2002). Dies unterscheidet sich von der Situation in *L. monocytogenes*, wo die Verwendung von Di- und Oligopeptiden zwar ebenfalls eine Möglichkeit zur Anpassung an hyperosmotische Konditionen ist; dabei werden allerdings direkt die Peptide angehäuft und nicht zu Prolin hydrolysiert (Sleator *et al*., 1993; Amezaga *et al*., 1995). Der dabei verwendete Transporter ist der Di- und Tripeptidtransporter DtpT (Wouters *et al*., 2005). Ähnlich ist die Situation in *Lactobacillus*, wo die Peptide wenigstens zum Teil akkumuliert und nicht hydrolysiert werden (Piuri *et al*., 2003). Ist keine vorgefertigte osmotische Schutzsubstanz im umgebenden Medium verfügbar, wird Prolin in *B. subtilis* endogen *de novo* synthetisiert. Diese vielfältigen Möglichkeiten zur Prolinakkumulation garantieren in *B. subtilis* eine flexible Anpassung unter hochosmolaren Bedingungen (Abb. 51a).

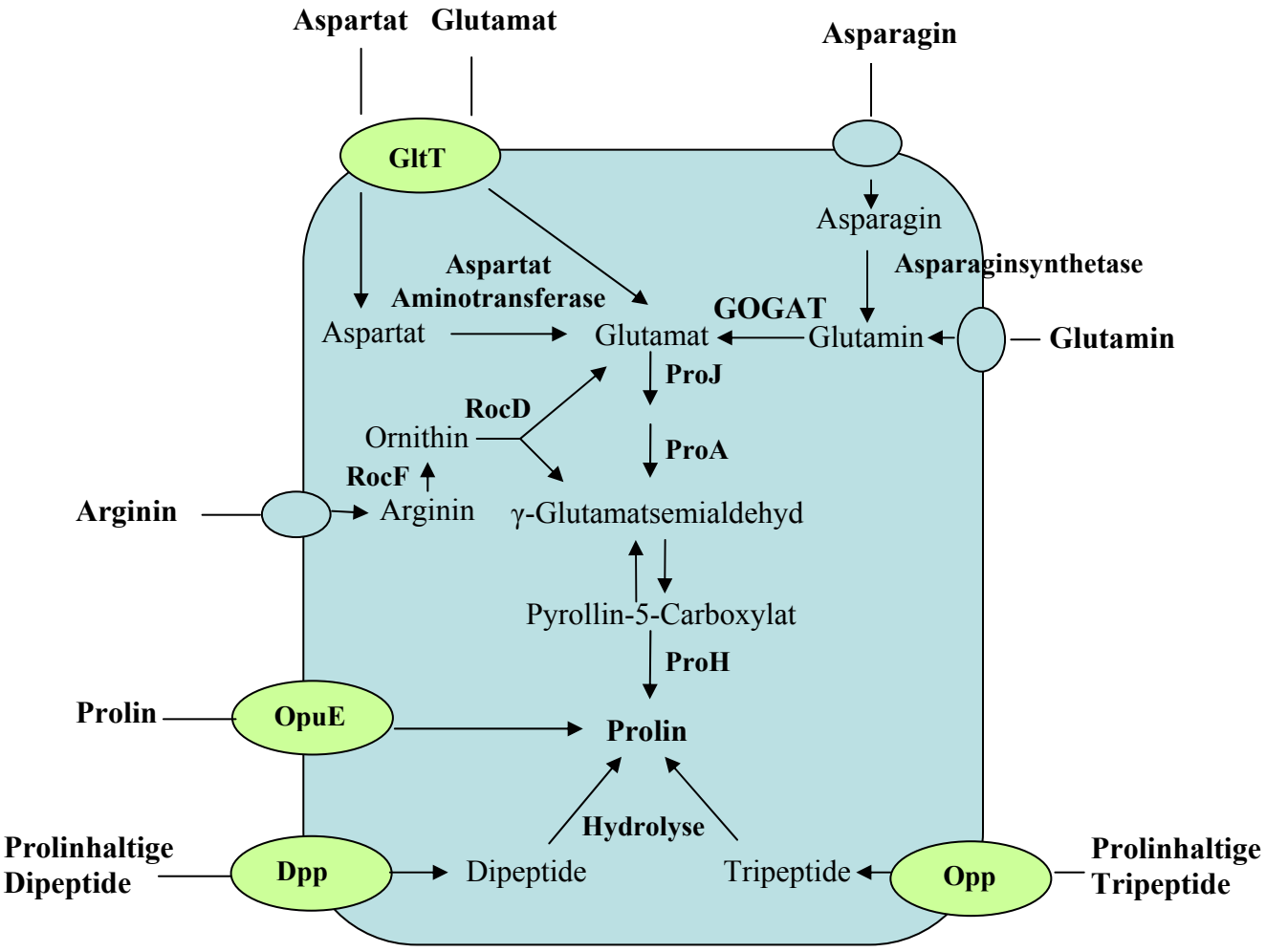


Abb.51a: Die Prolinakkumulation in *B. subtilis* unter hyperosmolaren Bedingungen.

Dargestellt ist die Aufnahme möglicher Vorläufer für die Prolinsynthese und ihre intrazelluläre Konversion. Die unter Hypersalinität aktiven Aufnahmesysteme für Asparagin, Glutamin und Arginin sind unbekannt. *B. subtilis* besitzt meherere Orthologe der Aspartataminotransferase (AspD, YhdR, YkrV, YurG, YwfG) sowie der Asparaginsynthetase (AsnB, AsnH, AsnO); es ist unklar, welche Enzyme hier verwendet werden. GOGAT: Glutamatsynthase

2.4 Die Wirkweise thermoprotektiver Aminosäuren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ganze Reihe von proteinogenen Aminosäuren einen positiven Einfluss auf das Wachstum unter Hitzestress von *B. subtilis* haben. Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Glycin, Histidin und Prolin erwiesen sich als effektive Thermoprotektiva. Für Glutamat und Aspartat, die in dieser Arbeit aufgrund ihres Transports via GltT näher untersucht wurden, wurde gezeigt, dass sie bei Hitzestress zwar aufgenommen, aber nicht in der Zelle angehäuft werden. Auch andere thermoprotektive kompatible Solute wie Glycin Betain werden unter Hitzestress im Vergleich zu 37°C nicht verstärkt akkumuliert. Es wird vermutet, dass zum Schutz vor supraoptimalen Wachstumstemperaturen bereits geringe Mengen akkumulierten Solutes genügen, um eine Proteinstabilisierung zu gewährleisten (Holtmann, 2003). Dies könnte erklären, warum für Aspartat und Glutamat keine gesteigerte Anhäufung bei 52°C festgestellt werden konnte. Experimente in *E. coli* haben gezeigt, dass die Supplementation von Glycin Betain und Kaliumglutamat einen verstärkenden Effekt auf DnaK hat, ein Chaperon, das unter Hitzestress die Auflösung von Proteinaggregaten vermittelt (Diamant *et al.,* 2003). Dieser Mechanismus könnte auch ein Grund für die thermoprotektiven Eigenschaften der Aminosäuren sein. Für Glycin Betain ist bekannt, dass es auch *in vitro* Proteine vor Denaturierung unter Hitze bewahren kann (Holtmann, 2003). Für Glutamat oder Aspartat ist dies noch nicht gezeigt worden.

Wachstumsexperimente mit der *proHJ*-Mutante JSB8 [Δ*(proHJ::tet)1*] unter Hitze zeigten, dass die Hitzeprotektion durch Glutamat unabhängig ist von *proHJ* (Holtmann und Bremer, 2004). Interessanterweise erfolgt zwar eine transkriptionelle Induktion von *proHJ*, es wird aber kein endogen synthetisiertes Prolin in Hitzezellen akkumuliert (Holtmann, 2003). Somit unterscheidet sich die osmoprotektive Wirkweise von Aminosäuren gravierend von der thermoprotektiven, auch wenn es Aminosäuren wie z.B. Prolin gibt, die sowohl bei Salz- als auch bei Hitzestress schützen können. Aspartat und Glutamat, zwei potente thermische Schutzsubstanzen im mesophilen Bakterium *B. subtilis*, werden in hyperthermophilen Archaea als kompatible Solute zum Schutz vor Osmostress genutzt. Ihre durch Salzstress bedingte Akkumulation wurde in *Methanococcus thermolithotrophicus* (Glutamat) sowie in *Thermococcus litoralis* und *Palaeococcus ferrophilus* (Aspartat) beobachtet (Lamosa *et al.*, 1998; Roeßler und Müller, 2001; Neves *et al*., 2005).

Die Wirksamkeit der thermoprotektiven Aminosäuren ist sehr spezifisch. Es lassen sich deutliche Unterschiede in dem durch die Protektion vermittelten Wachstumsvermögen von *B. subtilis*-Zellen feststellen. Alle thermoprotektiven Aminosäuren sind im Stoffwechsel miteinander verbunden, aber nicht alle, die korreliert sind, sind thermoprotektiv. In Arrayanalysen von *B. subtilis* Zellen, die einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, fanden sich keine induzierten Gene, die helfen konnten, den Zusammenhang und die Wirkung der thermoprotektiven Aminosäuren aufzuklären. Die Gene für die Argininbiosynthese und –aufnahme werden zwar nach einem Hitzeschock induziert (Helmann *et al*., 2001), Arginin selbst ist aber nur ein Thermoprotektivum mittlerer Effizienz.

Die mit Abstand besten thermischen Schutzsubstanzen in *B. subtilis* sind Glutamin und Aspartat, zwei zentrale metabolische Intermediate. Man könnte vermuten, dass die anderen thermoprotektiv wirkenden Aminosäuren in eine von diesen beiden umgewandelt werden und eventuell danach in einen wichtigen, unter Hitzestress kollabierenden Stoffwechselweg einfließen. Dies würde die unterschiedlichen thermoprotektiven Qualitäten der einzelnen Aminosäuren erklären. Glutamin spielt auch in anderen Organismen eine wichtige Rolle bei der Adaptation an hypertherme Bedingungen. In Hamsterzellen konnte z.B. gezeigt werden, dass der Glutaminpool unter Hitzestress um ca. 80% abnimmt, was auf eine reprimierte Synthese oder eine gesteigerte Verstoffwechselung hindeutet. Exogene Zugabe von Glutamin wirkt in diesen Zellen, vermutlich durch die Komplementation des fallenden internen Glutaminspiegels, thermoprotektiv (Goh *et al*., 1988). Die in allen Domänen des Lebens vorkommende Glutamatsynthase GOGAT wandelt Glutamin in Glutamat um und ist als „fragiles Enzym“ bekannt. Es gibt Hinweise in Maispflanzen darauf, dass sie bei Hitze inaktiv wird und dadurch eine Akkumulation ihres Substrates Glutamin stattfindet (Logan *et al*., 1992). In Eukaryonten induziert Glutamin Proteine, die Teil der Hitzeschockantwort sind. Eine Vorbehandlung mit Glutamin kann Zellen helfen, sich nicht nur besser an Hitze, sondern verschiedene Stressarten zu adaptieren (Wischmeyer *et al*., 2001; Wischmeyer, 2002). In menschlichen Zellen wurde die Auswirkung von exogen angebotenem Glutamin ausführlich untersucht. Dabei zeigte sich, dass Glutamin in vielen Zellprozessen eine regulatorische Rolle spielt, vom Metabolismus über die Zellteilung bis hin zur Apoptose (Curi *et al*., 2005). Glutamin inhibiert in menschlichen Colon-Epthitelzellen die Apoptose. Dieser Effekt von Glutamin auf die Zelle ist in seiner Rolle als Substrat für die Pyrimidinsynthese begründet (Evans *et al*., 2005). Die Aminosäuren Aspartat und Glutamin sowie Glutamat, ein ebenfalls potentes Thermoprotektivum, werden auch in *B. subtilis* für die Pyrimidinsynthese benötigt (Switzer *et al*., 2002).

Proteomanalysen proliferierender *B. subtilis* Zellen haben gezeigt, dass dieser Syntheseweg in proliferierenden Zellen angeschaltet ist (Eymann *et al*., 2004). Denkbar wäre, dass der thermoprotektive Effekt von Aspartat, Glutamin und Glutamat in *B. subtilis* auf ihrem Beitrag zur Pyrimidinsynthese beruht (Schema der Pyrimidinsynthese in *B. subtilis* im Anhang).

Aspartat dient in *B. subtilis* ebenfalls als Vorläufer für die Synthese von Dihydropicolinsäure, das in die Zellwandsynthese eingeht (Belitsky, 2002) oder dem Reduktionsäquivalent NAD (de Vries *et al*., 1995). Denkbar wäre auch hier, dass zumindest einer dieser Synthesewege unter Hitzeeinfluss an Relevanz gewinnt oder komplementiert werden muss. Aspartat scheint auch in Eukaryonten wirksam vor Hitzestress zu schützen. Es gibt Studien, in denen Aspartat Legehennen verabreicht wurde, die unter Hitzestress gesetzt wurden. Die normale Hitzestressreaktion der Hennen, ein dramatischer Verlust des Gewichts, konnte durch Magnesium-Aspartathydrochlorid verhindert werden (Donoghue *et al*., 1990).

In *E. coli* ist z.B. bekannt, dass unter Hitzestress die Biosynthese von Methionin inhibiert wird. Exogen angebotenes Methionin kann das Hitzewachstum deutlich verbessern und sogar die maximale Wachstumstemperatur von 43°C auf 44°C erhöhen (Ron und Davis, 1971). Methionin ist in *B. subtilis* kein Thermoprotektivum (Daten nicht gezeigt). Die exogene Zugabe von Glutamat und Aspartat in *B. subtilis* dagegen verbessert zwar ebenfalls das Hitzewachstum, kann aber die maximale Wachstumstemperatur von 52°C nicht erhöhen (Holtmann, 2003; Daten nicht gezeigt). Dies ist interessant, wenn man bedenkt, dass Glycin Betain, das einen protektierenden Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* bei Kälte hat, die minimale Wachstumstemperatur von 15°C auf 13°C verschieben kann (Hoffmann *et al*., in Vorbereitung).

2.4 Cryoprotektive Aminosäuren

Einige kompatible Solute wurden neben ihrer Funktion als Osmoprotektiva auch als potente Cryoprotektiva charakterisiert. Dazu gehören z.B. Glycin Betain, das *Listeria monocytogenes* und *B. subtilis* sowohl unter Salz- als auch unter Kältestress schützt, und Ectoin, das in dem *Bacillus* verwandten Organismus *Virgibacillus pantothenticus* einen positiven Effekt auf Salz- und Kältewachstum hat (Kuhlmann, 2002; Bursy, 2005; Hoffmann, persönliche Mitteilung).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Reihe der proteinogenen Aminosäuren das Wachstum von *B. subtilis* unter Osmostress fördern. Unter Cryostress durchgeführte Wachstumsexperimente zeigten jedoch, dass eine Supplementation von Aminosäuren in einer Konzentration von 1 mM kaum einen Einfluss auf das Wachstum hat. Die beobachteten Effekte waren im Vergleich zu denen des bereits nachgewiesenen Cryoprotektivums Glycin Betain sehr gering. Für die Aminosäuren Aspartat, Glutamin und Glutamat zeigte sich ein leichter Wachstumsvorteil (ca. zweifache OD_{578} nach 72 h). Ob diese Eigenschaften auf die Konversion zu Prolin via *proHJ* beruhen, wurde nicht geklärt. Einerseits besteht die Vermutung, dass die Expression von *proHJ* durch Kälte induziert wird (Hoffmann, pers. Mitteilung), andererseits hatte exogen angebotenes Prolin keinen kälteprotektiven Effekt. HPLC- Analysen zeigten außerdem, dass in bei Kälte gewachsenen *B. subtilis* Zellen kein Prolin durch endogene *de novo* Synthese angehäuft wird (Hoffmann *et al*., in Vorbereitung).

2.5 Die physiologische Bedeutung der Protektion durch Aminosäuren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die exogene Zugabe proteinogener Aminosäuren einen positiven Effekt auf das Wachstum von *B. subtilis* unter Stressbedingungen wie Hypertonie, Hitze und Kälte hat. Im natürlichen Habitat von *B. subtilis*, den oberen Schichten des Bodens, werden organische Moleküle aus Wurzelexudaten oder zersetzendem biologischem Material frei. Die Aufnahme solcher vorgefertigter Moleküle ist für *B. subtilis* energetisch günstiger als ihre *de novo* Synthese.

Shahjee und Mitarbeiter untersuchten 2002 die protektive Wirkung einiger ausgewählter Aminosäuren auf *E. coli* -Zellen unter Stressbedingungen wie Salz, Hitze und Kälte. Dabei fanden sie heraus, dass L-Prolin *E. coli* vor Hitze und Kälte, am wirksamsten aber jedoch vor Salz schützt. L-Alanin, L-Lysin und L-Serin sind ebenfalls potente Osmoprotektiva, aber weniger effiziente Cryoprotektiva; bei Hitze zeigen sie gar keinen Effekt. Interessanterweise zeigen die D-Isomere dieser Aminosäuren entweder gar keinen oder sogar einen negativen Effekt auf das Wachstum von *E. coli.* Die Supplementation mit Pepton schützt in *E. coli* und auch *L. monocytogenes* vor Osmostress. In *E. coli* beruhte dieser Effekt einzig auf der Anhäufung des im Pepton befindlichen freien Prolins (Amezaga und Booth, 1999). Nähere Analysen in *L. monocytogenes* zeigten, dass sich der intrazelluläre Aminosäuregehalt beim Wachstum

unter Salz mit Peptonzugabe verändert. Glutamat, Glycin, Hydroxyprolin, Prolin, Alanin und Aspartat werden in dieser Reihenfolge angehäuft (Amezaga *et al*., 1995). Die Verwendung von Aminosäuren als Stressprotektiva scheint also ein verbreitetes Phänomen in *Bacteria* zu sein.

Die Frage, ob eine Aminosäure als Stressprotektivum genutzt werden kann, geht einher mit der Frage nach ihrem Vorkommen im natürlichen Habitat des betrachteten Organismus. In den oberen Bodenschichten, dem Habitat von *B. subtilis*, wird der zu Verfügung stehende Aminosäurepool aus zersetzendem biologischem Material, hauptsächlich Pflanzen, und Wurzelexudaten gespeist.
Da Pflanzen Prolin als dominantes kompatibles Solut durch *de novo* Synthese anreichern (bis zu 80% des Aminosäurepools in der Zelle), wird bei der Zersetzung von pflanzlicher Biomasse Prolin frei und kann von den umgebenden Organismen aufgenommen werden. Glutamat und Glutamin, die ebenfall in relativ hoher Konzentration in der pflanzlichen Zelle vertreten sind, werden ebenfalls verfügbar. Die dominanten Aminosäurekomponenten in Wurzelexudaten sind Aspartat und Glutamat sowie ihre Amide Asparagin und Glutamin (Jones und Darrah, 1993; Sonawane *et al*., 2003) und stehen somit der Aufnahme durch andere, bodenbewohnende Organismen zur Verfügung. Damit offenbart sich der Vorteil, den *B. subtilis* aufgrund seiner Fähigkeit besitzt, ausgerechnet diese Substanzen als Vorläufer für die Synthese seines dominanten Osmoprotektivums zu nutzen. Trotz seiner auf ein einziges kompatibles Solut, Prolin, beschränktes Spektrum an *de novo* synthetisierten osmotischen Schutzsubstanzen erfolgt eine optimale Ressourcenausnutzung durch die Rekrutierung verschiedenartiger Moleküle als Ausgangstoffe für die Prolinsynthese.

3. Die Aufnahme von L-Glutamat und L-Aspartat in *B. subtilis*

Die Aminosäure L-Glutamat (Glutamat) hat neben ihrer Rolle als proteinogene Aminosäure noch andere wichtige Funktionen in *B. subtilis*. Glutamat ist ein zentrales Metabolit, das den C- und N-Stoffwechsel verknüpft. Es kann als einzige N-Quelle genutzt werden. Exogen angebotenes Glutamat hat außerdem einen positiven Einfluss auf das Wachstum unter Stressbedingungen wie Hitze und Hypertonie (Kerres, 2002; Holtmann, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte dies auch für L-Aspartat (Aspartat) nachgewiesen werden. Das für die Aufnahme von Glutamat und Aspartat verantwortliche System, GltT, wurde ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert.

3.1 Der Glutamat- und Aspartattransporter GltT aus *B. subtilis*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Glutamat- und Aspartataufnahme in *B. subtilis* haben ergeben, dass GltT ($GltT_{Bsu}$) der Haupttransporter dieser beiden Aminosäuren ist. Als kinetische Parameter wurden für das Substrat Glutamat ein K_m von 38 ± 0,4 µM und ein V_{max} von 108 ± 5 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$ bestimmt. Ähnliche Werte wurden für das Substrat Aspartat ermittelt (Km = 45 ± 5 µM, V_{max} = 62 ± 6 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$). Bei GltT handelt es sich aufgrund seiner Sequenzhomologie vermutlich um einen Glutamat/ H^+/Na^+ Symporter. Er lässt sich in die Überfamilie der DAACS-Aufnahmesysteme eingruppieren. DAACS steht für Dicarboxylate Amino Acids Cation Symporter und umfasst eine Vielzahl von sekundären Transportern aus allen Domänen des Lebens (Saier, 2000). Innerhalb dieser Gruppe gehört GltT zu der Familie der Glutamattransporter, unter denen sich Proteine aus *Bacteria*, *Eukarya* und *Archaea* befinden. Die K_m-Werte in dieser Familie liegen in Bereichen bis 100 µM, was gut zu den für GltT ermittelten Werten passt (Slotboom *et al*., 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass GltT sowohl unter Stressbedingungen (Hitze, Hypertonie) als auch unter Standardbedingungen mit den N – Quellen Glutamat bzw. Aspartat und/oder Ammoniumsulfat der hauptsächliche, hochaffine Glutamat- und Aspartattransporter in *B. subtilis* ist. Eine *gltT*-defekte Mutante hat unter Bedingungen mit Aspartat bzw. Glutamat als einziger Stickstoffquelle einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp. Außerdem zeigt sie einen dramatischen Verlust der Protektion durch Aspartat und Glutamat bei Hitze- und Osmostress. Dieser Phänotyp

wurde durch eine Komplementation mit dem Strukturgen *gltT* vollständig aufgehoben. Das Protein GltT scheint konstitutiv exprimiert zu werden, da es unter so verschiedenen Wachstumsbedingungen aktiv ist. Tatsächlich zeigte die Analyse des Transkriptionsprofils des Gens *gltT* eine konstant hohe Transkription über alle untersuchten Bedingungen hinweg. Einzig bei 52°C schien die Expression schwächer zu sein; dies könnte aber seine Gründe in der technisch schwierigen Aufbereitung der RNA aus Hitzezellen haben. Allerdings sprechen auch die Transportanalysen bei 52°C für eine verminderte *gltT*-Expression. Es konnte keinerlei transkriptionelle Kontrolle von *gltT* nachgewiesen werden. Bedingungen, unter denen GltT als aktives Transportsystem identifiziert wurde, hatten keinerlei Einfluss auf die Expression des Strukturgens. Weder Hitze- noch Osmostress, noch die Substrate Aspartat und Glutamat allein oder in Kombination mit der N- Quelle Ammoniumsulfat vermochten die *gltT*-Transkription zu stimulieren. Eine translationelle Regulation wurde nicht untersucht. Für die konstante Präsenz von GltT in der Zelle sprechen Proteomanalysen proliferierender *B. subtilis*-Zellen, in denen GltT nachgewiesen werden konnte (Eymann *et al.*, 2004). Das Gen *gltT* wurde als putatives Mitglied des CodY Regulons in *B. subtilis* charakterisiert. CodY ist ein Transkriptionsregulator, der Gene der frühen stationären Wachstumsphase kontrolliert. Sie werden unter exponentiellem Wachstum reprimiert; bei einer Abnahme des intrazellulären GTP-Pools bei Eintritt in die Stationärphase wird CodY inaktiv und gibt die Transkription frei. Interessanterweise scheint *gltT* durch CodY nicht reprimiert, sondern aktiviert zu werden, da die *gltT*-Expression in einer *codY*-Mutante deutlich zurückgeht (Molle *et al.*, 2003). Nimmt man dies zusammen mit der Tatsache, dass das Gen *gltP* unter der Kontrolle des Stationärphasen – Sigmafaktors σ^H steht, könnte man vermuten, dass GltT in exponentiell wachsenden und GltP in Stationärphasenzellen aktiv ist. GltP ist ein weiterer potentieller Glutamat- und Aspartattransporter (Tolner *et al*., 1995). In dieser Arbeit durchgeführte Wachstumsanalysen konnten diese Hypothese allerdings nicht untermauern. Ein *gltP*-defizienter Stamm zeigt unter den getesteten Bedingungen in der stationären Phase keinen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtypstamm (s. Kapitel 3.5: Das Protein GltP).

Dass es neben GltT noch andere Aufnahmesysteme für Glutamat und Aspartat geben muss, zeigte sich beim Wachstum mit diesen beiden Aminosäuren als alleiniger N-Quelle. Eine *gltT* – Mutante weist unter diesen Bedingungen zwar ein verlangsamtes, aber dennoch gutes Wachstum auf. Unter diesen Testbedingungen (30 mM Substrat) konnte sowohl Glutamat als auch Aspartat offensichtlich durch andere, vermutlich niederaffine Systeme aufgenommen werden. Dabei handelt es sich allerdings weder um GltP noch um YveA, da ein *gltP*$^-$ *gltT*$^-$

yveA$^-$ -Stamm dasselbe Wachstum aufweist wie eine alleinige *gltT*-Mutante. Diese anderen Transportsysteme wurden in dieser Arbeit nicht identifiziert. Es gibt in *B. subtilis* mehrere Proteine, die dafür in Frage kämen, beispielsweise der C_4 – Dicarboxylattransporter DctA, ein möglicher Kandidat für niederaffinen Glutamat- und Aspartattransport.
Unter Hitzestress wird die Glutamat- und Aspartataufnahme allein von GltT vermittelt, da eine Unterbrechung von *gltT* einen vollständigen Verlust der Protektion durch Glutamat und Aspartat bei Hitze bedeutet. Bei Osmostress gibt es noch weitere aktive Transportsysteme, da hier auch bei inaktivem *gltT* noch immer eine Protektion durch Glutamat und Aspartat besteht. Die GltT-vermittelte Aufnahme von Aspartat und Glutamat unter Osmo- und Hitzestress in *B. subtilis* wird in den nächsten Abschnitten behandelt.

3.2 Strukturelle Merkmale der Glutamattransporterfamilie

Mitglieder der Glutamattransporterfamilie, darunter auch die hier untersuchten Proteine GltT und GltP, sind sekundäre Transporter, die die Aufnahme von Glutamat und Aspartat in Symport mit Kationen, bevorzugt H^+ und/oder Na^+, vermitteln (DAACS Überfamilie) (Saier, 2000).
Strukturelle Besonderheit der Glutamattransporterfamilie sind sogenannte „reentrant loops“, die in der Substratbindung eine Rolle spielen. Reentrant loops sind Helices, deren Ausläufer sich im extrazellulären Raum befinden, während die Mitte in der Membran verankert ist (Slotboom *et al.*, 1999; Grunewald *et al.*, 2002).
Mit Hilfe der Kristallstruktur eines prokaryontischen, archaellen Mitgliedes der Glutamattransporterfamilie, Glt_{Ph} aus *Pyrococcus horikoshii*, wurde die Funktionsweise dieser Proteine detailliert untersucht (Yernool *et al.*, 2004). Trotz der verhältnismäßig geringen Sequenzidentität (27,3%) von GltPh und des in dieser Arbeit als hochaffinen Glutamat- und Aspartattransporter in *B. subtilis* identifizierten Proteins GltT zeigten die Hydropathieanalysen beider Proteine eine große Ähnlichkeit zueinander (Abb.52). Diese Analysen wurden mit Hilfe des Programms TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) erstellt. Einzig im C-terminalen Bereich zeigten sich Unterschiede. Glt_{Ph} besitzt eine Transmembranregion mehr als $GltT_{Bsu}$. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die wesentlichen, in Glt_{Ph} identifizierten Strukturmerkmale auf $GltT_{Bsu}$ übertragbar sind.

Glt_{Ph} ist als Trimer organisiert. Dies war bereits früher als spezifische Eigenschaft der Glutamattransporter festgehalten worden (Yernool *et al*., 2003). Die einzelnen Monomere haben die Struktur eines spitz zulaufenden Keils. Drei Keile formen eine Art Kelch, wobei die spitze Seite der Keile durch die Cytoplasmembran in das Zellinnere ragt. Die breite Seite befindet sich im extrazellulären Raum. Am Boden des Kelchs, der mit Flüssigkeit gefüllt ist, befinden sich die Bindestellen für Substrat und Cosubstrat. Die Bindestellen befinden sich zwischen dem HP1- und HP2-Motiv, die, je nach Konformation, die Bindestellen unzugänglich machen können. HP steht für „hairpin" und bezeichnet eine helikale Haarnadelstruktur. Durch die Flüssigkeit gelangt das Substrat/ Cosubstrat an die Bindestellen, der Transporter ist dabei zur Außenseite der Zelle hin geöffnet (HP2- Konformation: offen; HP1 – Konformation: geschlossen). Durch die Besetzung der Bindestellen schließt sich der Transporter nach außen und öffnet sich dafür nach innen (HP1- Konformation: geschlossen; HP2 – Konformation: offen). Das Substrat kann jetzt in die Zelle entlassen werden. Das Prinzip dieser Funktionsweise ist die alternierende Zugänglichkeit (Abb. 53, Jardetzky, 1966). Blast – Analysen der Sequenz von GltT aus *B. subtilis* mit den bis dato im Internet verfügbaren Datenbanken ergeben mindestens 30 Proteine, die eine signifikante Ähnlichkeit mit $GltT_{Bsu}$ aufweisen. Darunter sind sowohl Transporter aus Gram – positiven, wie z. B. mehrere *Bacillus* Spezies, *Clostridium perfringens*, und *Lactobacillus planarum* als auch aus Gram- negativen Organismen, wie z.B. *E. coli, Pseudomonas fluorescens* oder *Yersinia pestis.* Ein Sequenzvergleich der GltT-Transporter aus den *Bacilli B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. stearothermophilus* (jetzt: *Geobacillus stearothermophilus*), und *B. caldotenax* ergab, dass diese 6 Proteine zu über 57% identisch sind mit $GltT_{Bsu}$ (s. Anhang). Es wird vermutet, dass diese Transporter Glutamat und Aspartat in Symport mit Na^+ und H^+ aufnehmen. Im Fall der GltT-Proteine aus *B. staerothermophilus* und *B. caldotenax* wurde dies bereits belegt (Tolner *et al*., 1992). In *Bacilli* ist GltT also weit verbreitet und hoch konserviert.

Vergleicht man die Proteine GltP aus *B. subtilis* ($GltP_{Bsu}$) und Glt_{Ph} aus *P. horikoshii* mit diesen $GltT_{Bsu}$, so fällt auf, dass GltP eine hohe Sequenzidentität zu $GltT_{Bsu}$ besitzt (43%), obwohl es ein Protonsymporter ist. Glt_{Ph} dagegen, wie $GltT_{Bsu}$ ein $Na^+/H^{+/}$ Symporter, ist sehr heterolog mit Sequenzidentitäten von 27,3% (zu $GltT_{Bsu}$) bzw. 30% (zu $GltP_{Bsu}$). Der eukaryontische Glutamat- und Aspartattransporter Glt-1 aus *Rattus norvegicus* hebt sich deutlich von den prokaryontischen Proteinen ab. Er symportiert 3 Na^+-Ionen und einem Proton und antiportiert dagegen ein K^+-Ion. Die Sequenzidentitäten sind, obwohl es sich um Proteine derselben Transporterfamilie handelt und $Glt\text{-}1_{Rno}$ wie $GltT_{Bsu}$ ein Na^+/H^+-Symporter

ist, relativ gering (19,7% zu $GltT_{Bsu}$ bzw. 19% zu $GltP_{Bsu}$). Es besteht aber auch kaum Ähnlichkeit zu Glt_{Ph}, dem vergleichsweise heterologen Protein aus der Reihe der prokaryontischen Glutamattransporter (Sequenzidentität Glt_{Ph} und Glt-1_{Rno}: 24%) (s. Anhang). Auch fällt auf, dass Glt-1_{Rno} am N- und C– Terminus wesentlich länger ist als die prokaryontischen Transporter. Trotz ähnlicher Funktion weisen Glt-1_{Rno} und die Na^+/H^+/ Symporter aus *Bacilli* eine Sequenzidentität von nur 8,5% auf. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen (Abb. 54) sind die in die Substratbindung involvierten Reste gekennzeichnet, die eine vergleichsweise gute Konservierung aufweisen. Weiterhin sind die in die Na^+ - Bindung involvierten Aminosäuren hervorgehoben, es zeigte sich, dass $GltP_{Bsu}$ als reiner Protonensymporter hier interessanterweise in zwei von drei Fällen mit dem Na^+/H^+-Symporter $GltT_{Bsu}$ identisch ist.

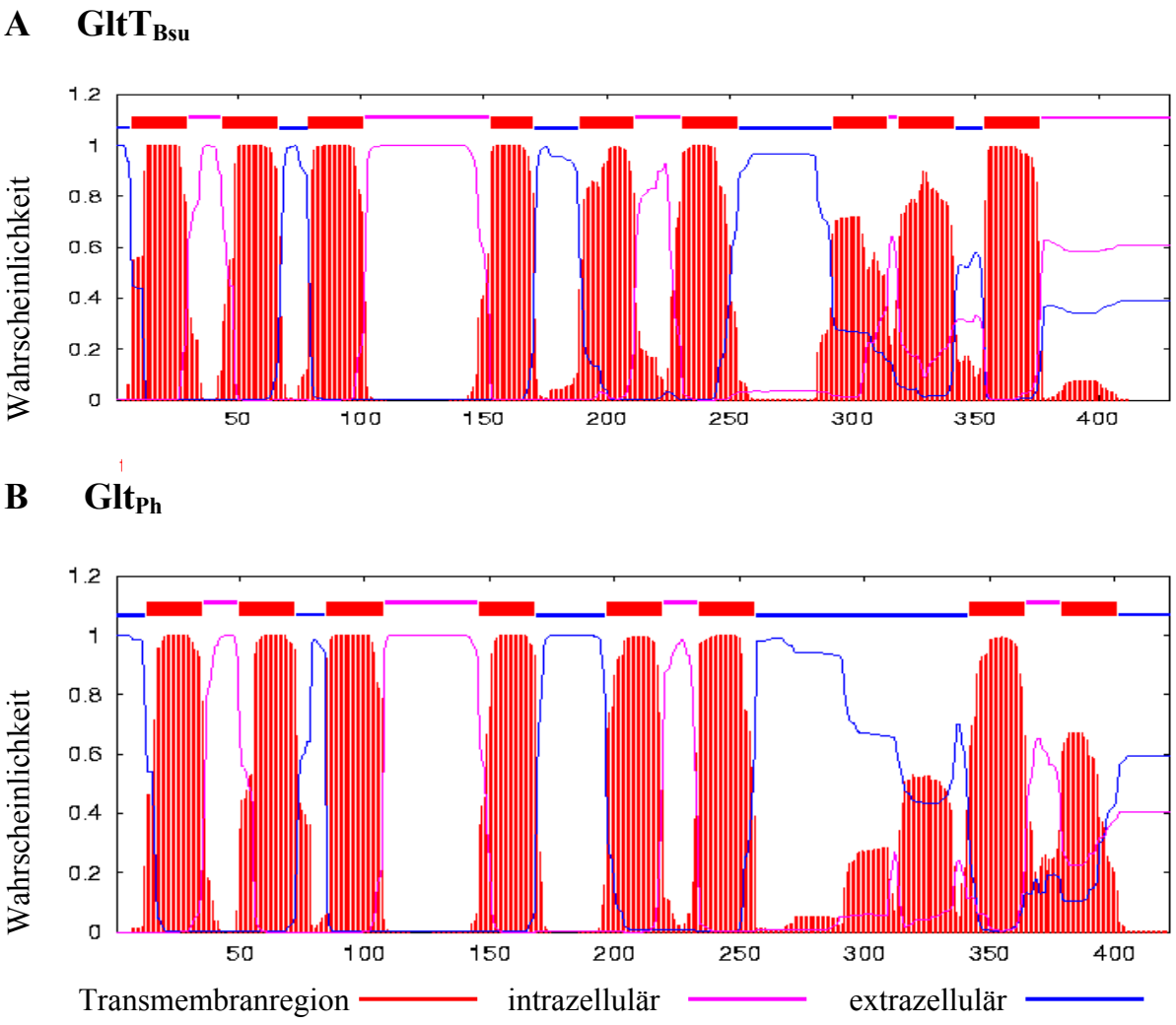


Abb. 52: Hydropathieanalysen der Glutamat/Aspartattransporter Glt_{Bsu} und Glt_{Ph}.
Die abgebildeten Hydropathieanalysen wurden erstellt mit dem Programm TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0).

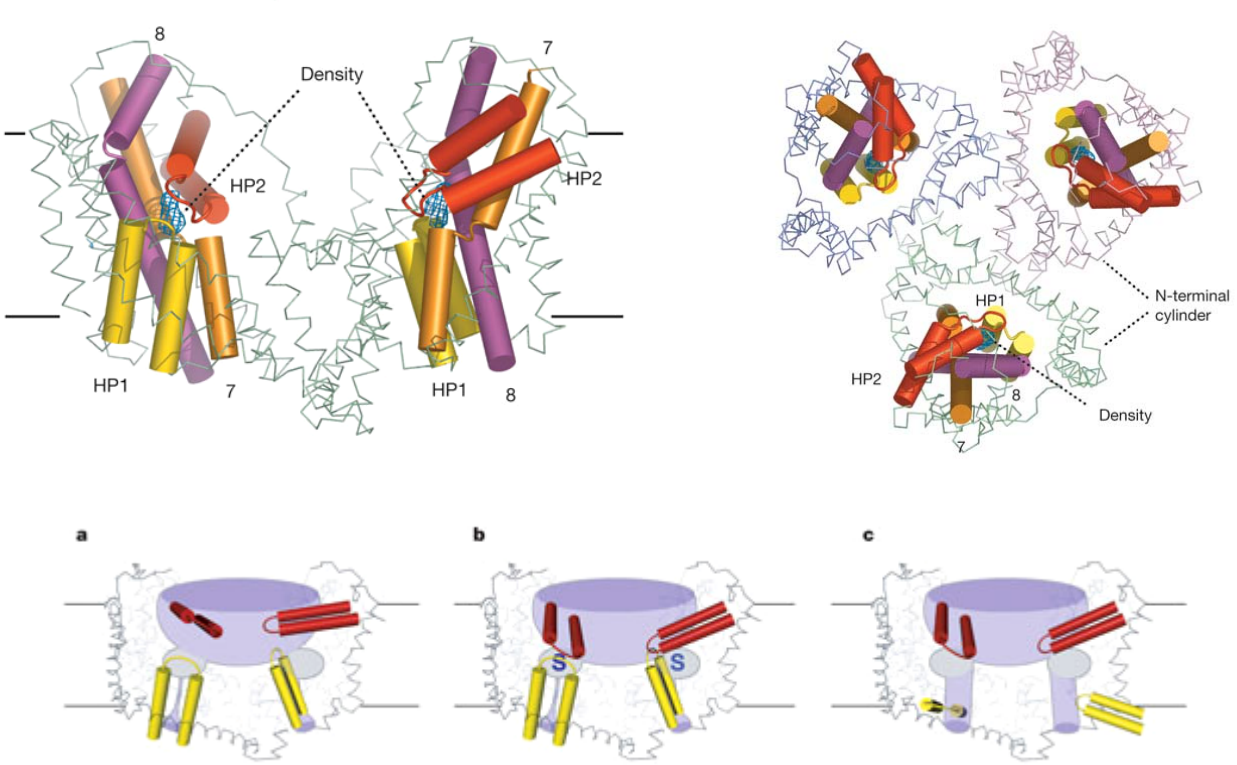
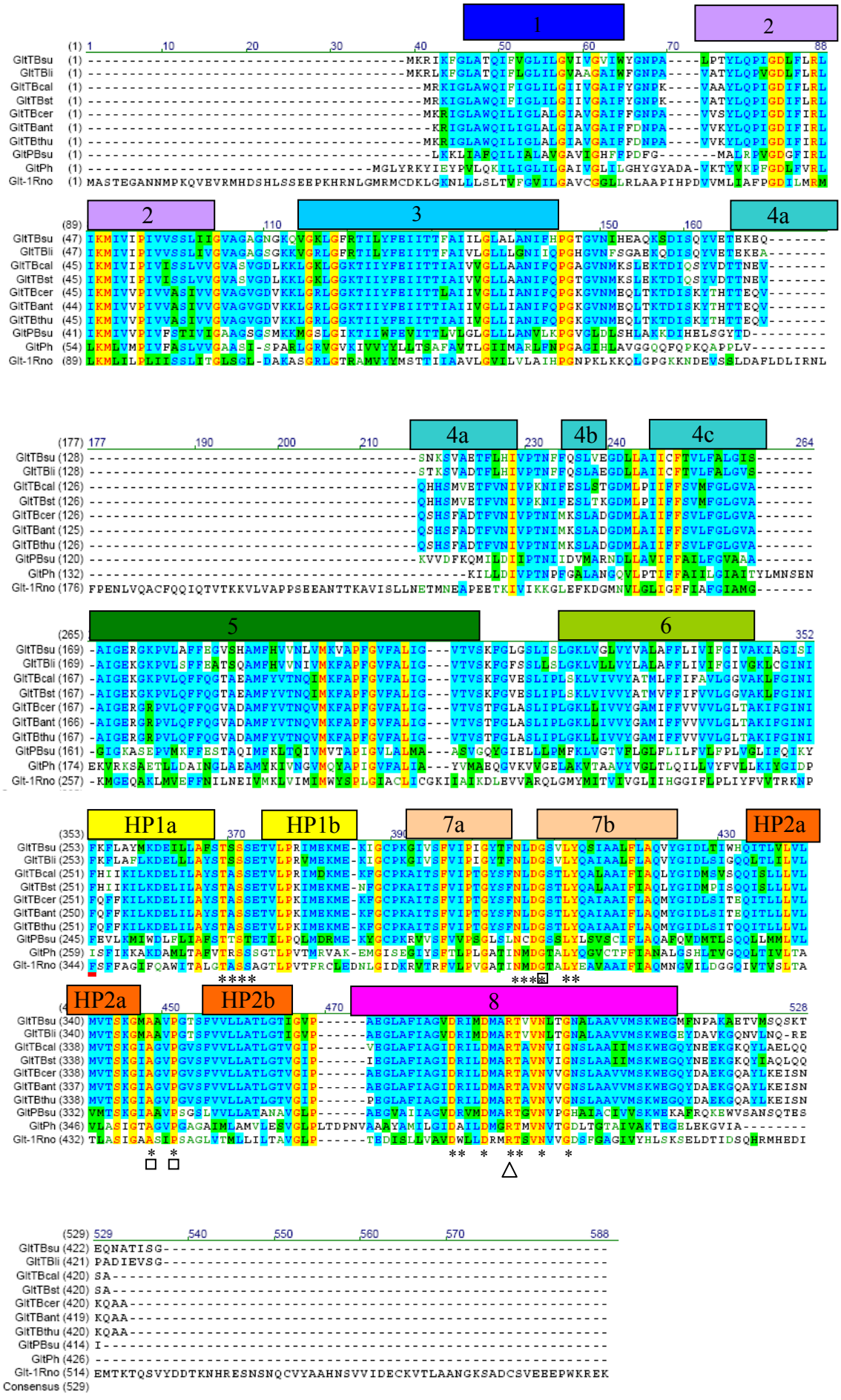


Abb.53: Mechanismus der Substratbindung und –translokation im Glutamattransporter Glt_{Ph}.

Glt_{Ph} ist als Trimer organisiert, in den Abbildungen sind jeweils nur zwei Monomere zu sehen.
A: Glutamattransporter formen eine Art Kelch, dessen Boden mit Wasser bedeckt ist. Dort befinden sich auch die Substratbindestellen (Substrat in blau), eine pro Monomer.
B: Die Substratbindung und seine Translokation wird von den helikalen Hairpins HP1 und HP2 vermittelt. Kommt das Substrat (S) von der extrazellulären Seite, so muss die HP2 in einer offenen Konformation sein (a). Das Substrat (S) wird gebunden, die Konformation ist geschlossen (b). Zur Entlassung des Substrates ins Innere der Zelle wird nun die HP1 Konformation geöffnet, vermutlich bewegt sich HP1 dabei in Richtung Cytosol (c). aus: Yernool *et al*., 2004


1
2
3
4a
4b
4c
5
6
HP1a
HP1b
7a
7b
HP2a
HP2b
8
GltTBsu
GltTBli
GltTBcal
GltTBst
GltTBcer
GltTBant
GltTBthu
GltPBsu
GltPh
Glt-1Rno
Consensus

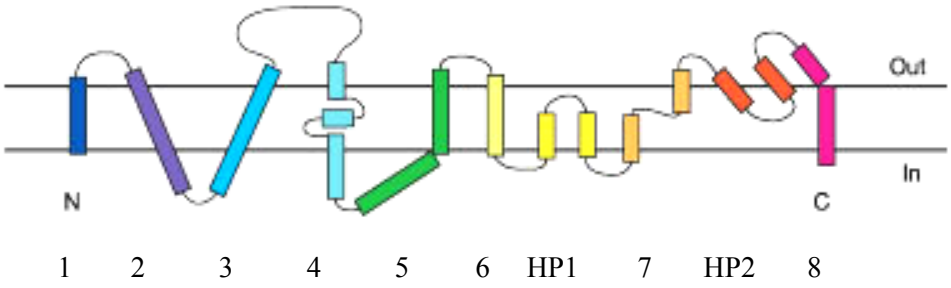


Abb. 55: Schematische Darstellung der Membrantopologie von Glt_{Ph}.
Aus: Yernool *et al*., 2004.

letzte Seite:

Abb. 54: Sequenzvergleiche GltT-homologer Proteine.

Dargestellt sind die Proteinsequenzen GltT-homologer Proteine. Die von Yernool *et al*., 2004 postulierten Domänen sind farbig gekennzeichnet. Dabei entsprechen die Farben denen der postulierten Membrantopologie aus Abb.55. Die in den Transport von Glutamat involvierten Reste sind mit einem Stern (*), die an der Bindung von Na^+ beteiligten Aminosäuren durch ein Quadrat (□) gekennzeichnet.
Die Sequenzen stammen aus folgenden Organismen: Bsu: *Bacillus subtilis*; Bli: *Bacillus licheniformis*; Bcal: *Bacillus caldotenax*; Bst: *Bacillus stearothermophilus*; Bcer: *Bacillus cereus*; Bant: *Bacillus anthracis*; Bthu: *Bacillus thuringiensis*; Ph: *Pyrococcus horikoshii*; Rno: *Rattus norvegicus*.

3.3 GltT-vermittelte Glutamat- und Aspartataufnahme unter Hitzestress in *B. subtilis*

Die thermoprotektive Wirkung der Aminosäure Glutamat in *B. subtilis* konnte bereits nachgewiesen werden (Holtmann, 2003). Die Wirksamkeit von Aspartat als thermische Schutzsubstanz in *B. subtilis* wurde in der vorliegenden Arbeit zum erstenmal beschrieben. Die Wirkweise dieser beiden Substanzen wird im vorangegangenen Kapitel näher erläutert. Die Aufnahme beider Aminosäuren erfolgt nach in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ausschließlich durch GltT. Eine Unterbrechung des Strukturgens *gltT* führt zu einem kompletten Verlust der Protektion durch Glutamat und Aspartat bei Hitze.

GltT ist seiner Sequenzhomologie nach ein Glutamat / H^+ / Na^+ -Symporter. Transporter aus thermophilen Organismen symportieren Glutamat ebenfalls mit H^+ und Na^+ (*B. stearothermophilus*, de Vrij *et al.,* 1988, Heyne *et al*., 1991; *Thermus thermophilus*, Holtom *et al*., 1993) oder nur Na^+ (*Clostridium fervidus*, Speelmans *et al*., 1993; *Bacillus* TA2.A1, Peddie *et al*., 1999), während ansonsten der Symport von 2 H^+ ebenfalls weit verbreitet ist (z.B. *E. coli*, Tolner *et al*., 1992). Dies hat vermutlich seinen Grund darin, dass sich bei Hitze die Permeabilität der Cytoplasmamembran verändert: Sie wird durchlässiger für Protonen, was einen negativen Einfluss auf den Protonengradienten hat. Es ist demnach schwieriger, unter diesen Bedingungen einen Protonensymport aufrechtzuerhalten als einen Symport mit Na^+ - Ionen, da letztere bei Hitze nicht durch die Membran diffundieren (van de Vossenburg *et al*., 1995; Peddie *et al*., 1999). Allerdings spielt auch die Membranzusammensetzung eine Rolle. In *E. coli* produzierte Na^+/ H^+- Glutamat-Symporter aus *B. caldotenax* und *B. stearothermophilus* verloren aufgrund der veränderten Membrankomposition im heterologen Wirt ihre Kationenselektivität und symportierten Glutamat nur mit H^+ (Tolner *et al*., 1992).

GltT aus *B. subtilis* weist eine große Ähnlichkeit zu den gleichnamigen Proteinen aus den thermophilen Spezies *B. stearothermophilus* und *B. caldotenax* auf (Sequenzidentität 63,5 % bzw. 62,6 %). Dies könnten Anhaltspunkte dafür sein, dass GltT ein auch unter supraoptimalen Wachstumstemperaturen stabiles Protein ist und daher den alleinigen Transport von Glutamat und Aspartat in *B. subtilis* unter Hitze gewährleisten kann.

Die GltT-Transportdaten unter Hitze (52°C) zeigten, dass sowohl Glutamat als auch Aspartat mit einer wesentlich geringeren Rate in die Zelle aufgenommen werden als bei 37°C. Der Grund hierfür könnte in der in Northern Blot Analysen nachgewiesene Rückgang der *gltT* Transkription bei 52°C sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass $GltT_{Bsu}$ bei Hitze an Aktivität verliert. Dennoch belegen die Wachstumsanalysen bei 52°C, dass Glutamat und

Aspartat *B. subtilis* effektiv vor Hitzestress protektieren. Im Einklang mit diesem Befund stehen die Analysen des durch die Aufnahme exogenen Glutamats bzw. Aspartats angehäuften intrazellulären Pools, die zeigen, dass trotz des verzögerten Transports bei 52°C fast genausoviel Glutamat bzw. Aspartat angehäuft wird wie bei 37°C. Möglicherweise ist es von Bedeutung, dass im Transportassay 20 µM Substrat eingesetzt wurden, während in den Poolbestimmungen 1 mM verwendet wurde. Unter solch hohen Substratkonzentrationen könnten sich die Transportraten bei 37°C und 52°C einander annähern, da dies weit über dem für 37°C ermittelten K_m-Wert liegt. Eine weitere Möglichkeit ist auch, dass es einen ständigen Efflux von Glutamat und Aspartat bei 37°C gibt, während beide Substanzen bei 52°C in der Zelle verbleiben. Es ist z.B. bekannt, dass es in *B. subtilis* einen ständigen Efflux von Prolin gibt, das mittels des Transporters OpuE wieder in die Zelle transportiert werden muss (Moses, 1999). Für Glutamat und Aspartat wurde dies bisher nicht untersucht.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits bei den Opu-Transportern aus *B. subtilis* gemacht. Im Vergleich zu 37°C wird bei 52°C wird die Transkription der *opu*-Gene induziert, während der Transport wesentlich schlechter verläuft. Dennoch reicht diese Transportaktivität aus, um bei 52°C eine fast identische intrazelluläre Glycin Betain-Konzentration anzuhäufen wie bei 37°C (Holtmann, 2003).

3.4 GltT-vermittelte Glutamat- und Aspartataufnahme unter hyperosmotischen Bedingungen in *B. subtilis*

Exogen angebotenes Glutamat wirkt osmoprotektiv in *B. subtilis*. Dies wurde in Wachstumsanalysen gezeigt (Brill, 2002; Kerres, 2002). Aspartat wurde in dieser Arbeit zum erstenmal als osmotische Schutzsubstanz in *B. subtilis* beschrieben. Die Wirkweise dieser beiden Substanzen wird im vorangegangenen Kapitel näher erläutert.

In *B. subtilis* gibt es fünf bekannte Aufnahmesysteme für Osmoprotektiva (OpuA – OpuE). Die Gene *opuA-opuE* werden durch externe Hypersalinität induziert (Bremer, 2002). Obwohl diese Transportsyteme ein breites Substratspektrum abdecken, sind sie nicht in der Lage, die Aufnahme von Glutamat und/oder Aspartat zu katalysieren.

In der Arbeit von Anne Kerres (2002) wurde erstmals gezeigt, dass der Transport von Glutamat unter Salzstressbedingungen zum größten Teil vom Aufnahmesysten GltT abhängt.

In dieser Arbeit wurden diese Daten bestätigt und detaillierter untersucht. Ein *gltT*-defekter *B. subtilis*-Stamm zeigt massive Defizite in seiner Protektierbarkeit durch Glutamat.
Es stellte sich heraus, dass GltT zwar der hauptsächliche Glutamat- und Aspartattransporter unter hyperosmolaren Bedingungen ist, jedoch nicht der einzige. Ein *gltT*-defizienter Stamm wird immer noch zu einem gewissen Teil unter hyperosmotischem Stress durch Glutamat und Aspartat protektiert. Im Gegensatz zur Glutamat– und Aspartataufnahme unter Hitzestress, wo GltT der einzige operierende Transporter zu sein scheint, sind unter Osmostress neben GltT ein oder mehrere weitere Transportsysteme aktiv, die jedoch bisher unbekannt sind. Der Transport osmotischer Schutzsubstanzen wird in *B. subtilis* oft durch hypersaline Bedingungen induziert; Beispiel hierfür ist die Aufnahme von Glycin Betain (Kempf und Bremer, 1994) oder auch Prolin (von Blohn *et al*., 1997). Der Glutamat- und Aspartattransport dagegen wird unter hypersalinen Bedingungen nicht induziert, er verläuft sogar mit einer niedrigeren Rate als unter isoosmotischen Konditionen. Nichtsdestotrotz ist der Transport unter Salzstress anscheinend ausreichend, um eine effektive Protektion durch Glutamat und Aspartat zu gewährleisten, wie die Wachstumsanalysen unter 1,2 M NaCl demonstrieren. Die Analyse des durch die Aufnahme von exogenem Glutamat bzw. Aspartat angehäuften Pools zeigten, dass bei 0,8 M NaCl, trotz verlangsamter Transportrate, sogar geringfügig mehr akkumuliert wurde als bei 0 M. Dies steht im Einklang mit der bekannten Wirkweise kompatibler Solute, der intrazellulären Anhäufung unter hypertonen Bedingungen. Allerdings wird die Aufnahme kompatibler Solute, die in *B. subtilis* durch die Opu-Transporter erfolgt, durch Salzstress stimuliert.

3.5 GltT im Vergleich mit den Opu-Transportern aus *B. subtilis*

Die Opu-Proteine aus *B. subtilis* vermitteln nicht nur den Transport kompatibler Solute unter hypertonen Bedingungen, sondern auch unter Hitze- und Kältestress. OpuA, OpuB und OpuC sind ABC-Transporter, während es sich bei OpuD und OpuE wie bei GltT um sekundäre Transporter handelt (s. auch Einleitung, Kapitel 1.4). OpuE ist wie GltT ein Na^+-Symporter (von Blohn *et al*., 1997).

GltT ist in der vegetativen Zelle konstitutiv präsent (Eymann *et al*., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf transkriptioneller Ebene keine Induktion durch Hitze oder Hypertonie stattfindet, sondern dass die Transkription des Gens *gltT* nahezu unabhängig von den getesteten äußeren Umständen konstitutiv auf einem hohen Level stattfindet. Einzig

Hitzestress hatte eine negative Auswirkung auf die *gltT*-Expression; hier kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein experimentelles Problem handelte.
Im Gegensatz zu *gltT* werden die Strukturgene der Opu-Transporter durch Stressbedingungen wie Salz und Hitze induziert (Kempf und Bremer, 1995; von Blohn *et al*., 1997; Holtmann, 2003, Bremer, 2004). Nichtsdestotrotz verläuft der Opu-vermittelte Transport von z.B. Glycin Betain bei 52°C dennoch zehnmal langsamer als bei 37°C (Holtmann und Bremer, 2004). Dies unter Hitze reprimierte Transport wurde in dieser Arbeit auch für die GltT-vermittelte Glutamat- und Aspartataufnahme nachgewiesen. Dennoch kann *B. subtilis* auch mit diesen niedrigen Transportraten fast die gleiche intrazelluläre Konzentration an Glycin Betain bzw. Glutamat oder Aspartat aufbauen wie bei 37°C. Diese Menge ist anscheinend ausreichend, um eine effektive Thermoprotektion zu gewährleisten.

Hyperosmotische Reize stimulieren den Opu-abhängigen Transport, aber nicht die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat. Im Gegenteil wird der von GltT katalysierte Transport bei 0,8M NaCl im Vergleich zu isoosmotischen Bedingugen gehemmt. Dennoch ist wie beim Opu-Transport die Menge an exogen aufgenommenem und akkumuliertem Substrat größer unter Hypersalinität.
Die Opu-Transporter sind hochaffine Aufnahmesysteme in *B. subtilis*. Bei der Bestimmung ihrer enzymkinetischen Parameter zeigten sich K_m-Werte im mikromolaren Bereich. Auch die für GltT bestimmten K_m-Werte bewegen sich in dieser Region, wenngleich sie um Faktor 4 bis 10 höher liegen als die der Opus. Bei den V_{max}-Werten gehört GltT mit OpuA eindeutig zu den Transportern mit der höchsten Transportrate. Dies gewährleistet eine hochaktive Aufnahme der jeweiligen Substrate aus dem Medium.

Tabelle 18: Übersicht der enzymkinetischen Parameter der Opu-Transporter und GltT in SMM (aus Kappes *et al*., 1996, 1999 und Moses, 1999).

Transporter	Substrat	K_m (µM)	V_{max} (nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$)
OpuA	Glycin Betain	2,4	110
OpuB	Cholin	1	21
OpuC	Glycin Betain	5,1	41
OpuD	Glycin Betain	9,5	16
OpuE	Prolin	12	27
GltT	Glutamat	38	108
	Aspartat	45	62

3.6 Das Protein GltP aus *B. subtilis*

Aufgrund seiner Sequenzhomologie gehört GltP zu der Enzymfamilie der Glutamattransporter (Slotboom *et al*., 1999). Es weist eine hohe Homologie zu anderen Glutamattransportern aus Pro- und Eukaryonten auf. Die Sequenzidentität zu GltT aus *B. subtilis* beträgt 43%.

1995 wurde das Produkt des Gens *gltP* aus *B. subtilis* 6GM als Glutamat / Aspartattransporter beschrieben. Diese Erkenntnis wurde aus Komplementationsanalysen in *E.coli* sowie durch Rekonstitutionen des Proteins GltP in Membranvesikeln gewonnen. Die auf diese Weise ermittelten kinetischen Parameter waren K_m = 9 µM und V_{max} = 65 nmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$, was für einen Transporter hoher Affinität und mittlerer Transportrate spricht (Tolner *et al.*, 1995). Eine *in vivo* Analyse von GltP in *B. subtilis* wurde nicht durchgeführt.

Anne Kerres hatte bereits 2002 in ihrer Diplomarbeit gezeigt, dass eine Inaktivierung des Gens *gltP* keinen detektierbaren Effekt auf die Glutamataufnahme hat (Kerres, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Um zu verifizieren, dass es sich bei dem -ebenfalls in dieser Arbeit genutzten – von A. Kerres konstruierten Stamm ADB1 tatsächlich um eine *gltP* – Mutante handelt, wurden Northern Blot Analysen mit einer *gltP* spezifischen Sonde durchgeführt. Diese bekräftigten, dass im Stamm ADB1 keine *gltP* Transkription stattfindet. Eine andere *gltP*-Mutante (MDB52) zeigte sowohl beim Transport als auch beim Wachstum denselben Phänotyp wie der Stamm ADB1 (Daten nicht gezeigt).

Der *gltP* defiziente Stamm ADB1 [(*gltP::neo*)1] zeigte unter keiner der untersuchten Bedingungen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Es konnte kein Transport von Glutamat und/ oder Aspartat durch GltP festgestellt werden.

Tolner *et al.* nutzten bei ihren Analysen den *B. subtilis* Stamm 6GM, während in der vorliegenden Arbeit das 168 – Derivat JH642 verwendet wurde. Die *gltP*-Gensequenz ist in den Stämmen 6GM und 168 identisch (Tolner *et al.*, 1995; Kunst *et al.*, 1997). Es stellte sich die Frage, ob das Gen *gltP* im Stamm JH642 eventuell durch eine Mutation funktionsunfähig ist. Um dies zu klären wurde eine Unterbrechung des Gens *gltP* im Stamm 168 erzeugt und der so entstandene Stamm MDB39 analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Inaktivierung des Genes *gltP* hatte auch im Stamm 168 unter den getesteten Bedingungen keinen Effekt auf den Glutamattransport.

Array - Analysen zeigen, dass das Gen *gltP* zum *sigH*-Regulon gehört (Britton, 2002). SigH wird erst in der stationären Wachstumsphase aktiv. Northern Blot Analysen mit in der Stationärphase geernteten Zellen zeigten allerdings keine *gltP* Induktion im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase (Daten nicht gezeigt). Trotz der großen Sequenzähnlichkeit zum potenten Transportsystem GltT konnte in dieser Arbeit in keinem Experiment ein Beitrag von GltP zur Glutamat – oder Aspartataufnahme nachgewiesen werden. Es ist jedoch möglich, dass GltP nur unter bestimmten Bedingungen aktiv ist, die von den Testbedingungen abweichen.

3.7 Das Protein YveA aus *B. subtilis*

Das von *yveA* codierte Protein wurde als Aspartataufnahmesystem charakterisiert (Lorca *et al.*, 2003). Es wurde in die Enzymsuperfamilie APC eingruppiert. APC steht für amino acids, polyamine, organocation und gibt somit einen Überblick über die Substrate der Transporter dieser Familie. YveA wurde als Prototyp einer neuen Untergruppe, AGT (aspartate/glutamate transporter) eingestuft.

Die *yveA* – Mutante MDB43 [(*yveA*::neo)1] wurde durch Transkriptionsanalysen als *yveA* defizienter Stamm verifiziert. Allerdings zeigte sie in keinem der durchgeführten Versuche, weder beim Transport noch beim Wachstum, ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten.
Versuche, die in der Publikation von Lorca *et al.*, 2003, beschriebenen Wachstumsanalysen zu reproduzieren, scheiterten. In dem angegebenen Medium fand kein Wachstum der *B. subtilis* Stämme statt. Dasselbe Medium diente bei Lorca und Mitarbeitern auch zur Kultivierung der Zellen für die Transportanalysen. Daher konnten auch die enzymkinetischen Parameter, die sich aus der Transportanalyse ergaben, nicht miteinander verglichen werden.
In dieser Arbeit konnte unter keiner der getesteten Konditionen ein YveA – vermittelter Transport von Glutamat und/ oder Aspartat nachgewiesen werden.

VI. Literatur

Adams, E., and Frank, L. (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu Rev Biochem* **49**: 1005-1061.

Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M., and Ghazi, A. (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **273:** 26670 - 26674.

Alice, A.F., and Sanchez - Rivas, C. (1997) DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Curr Microbiol* **35:** 309 - 315.

Amezaga, M.R., and Booth, I.R. (1999) Osmoprotection of *Escherichia coli* by peptone is mediated by the uptake and accumulation of free proline but not of proline-containing peptides. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5272-5278.

Amezaga, M.R., Davidson, I., McLaggan, D., Verheul, A., Abee, T., and Booth, I.R. (1995) The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology* **141** (Pt 1): 41-49.

Angelidis, A.S., and Smith, G.M. (2003) Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7492-7498.

Ankri, S., Serebrijski, I., Reyes, O., and Leblon, G. (1996) Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of th *proA* step. *J Bacteriol* **178**: 4412-4419.

Arakawa, T., and Timasheff, S.N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47:** 411 – 414.

Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-De March, G., and Savoure, A. (2004) Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiol Plant* **120**: 442-450.

Atkinson, M.R., Wray, L.V., Jr., and Fisher, S.H. (1990) Regulation of histidine and proline degradation enzymes by amino acid availability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172**: 4758-4765.

Baich, A. (1969) Proline synthesis in *Escherichia coli*. A proline-inhibitable glutamic acid kinase. *Biochim Biophys Acta* **192**: 462-467.

Balaji, B., O'Connor, K., Lucas, J.R., Anderson, J.M., and Csonka, L.N. (2005) Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium,* determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8273-8283.

Barber, D. A. and Gunn, K. B. (1974). The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. *New Phytol* **73:** 39–45.

Barron, A., Jung, J.U., and Villarejo, M. (1987) Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli. J Biol Chem* **262:** 11841 - 11846.

Bayles, D.O., and Wilkinson, B.J. (2000) Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett in Appl Microbiol* **30:** 23 - 27.

Belitsky, B.R., and Sonenshein, A.L. (1998) Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. *J Bacteriol* **180**: 6298-6305.

Belitsky, B.R., Brill, J., Bremer, E., and Sonenshein, A.L. (2001) Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis. J Bacteriol* **183:** 4389 - 4392.

Belitsky, B.R. (2002) Biosynthesis of Amino Acids of the Glutamate and Aspartate Families, Alanine, and Polyamines. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells". (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 203- 232. ASM Press, Washington, D.C.

Belitsky, B.R., and Sonenshein, A.L. (2004) Modulation of activity of *Bacillus subtilis* regulatory proteins GltC and TnrA by glutamate dehydrogenase. *J Bacteriol* **186**: 3399-3407.

Belitsky, B.R., Kim, H.J., and Sonenshein, A.L. (2004) CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. *J Bacteriol* **186**: 3392-3398.

Boch, J., Kempf, B., and Bremer, E. (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**: 5364-5371. *J Bacteriol* **176:** 5364 – 5371.

Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., and Bremer, E. (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**: 5121-5129.

Bolen, D.W., and Baskakov, I.V. (2001) The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310:** 955 - 963.

Bremer, E. (2002) Adaptation to changing osmolarity. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells". (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 385 - 389. ASM Press, Washington, D.C.

Bremer, E., and Krämer, R. (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: „Bacterial Stress Responses" (G. Storz and R. Hengge - Aronis, Eds.), pp. 79 - 97. ASM Press, Washington, D.C.

Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.

Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Volker, A., Bremer, E., and Volker, U. (2003) Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* **185**: 4305-4314.

Brill, J. (2002) Biosynthese und Anhäufung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels *de novo* Synthese und Aufnahme prolinhaltiger Peptide in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.

Brill, J., and Bremer, E. (2002) A separate biosynthetic pathway mediates accumulation of the compatible solute proline in response to hypertonicity in *Bacillus subtilis.* In Vorbereitung.

Britton, R.A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. and Grossman, A. D. (2002) Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis. J Bacteriol* **184**: 4881-4890.

Brown, A.D. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40:** 803 - 846.

Bursy, J. (2005) Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgens. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.

Buxton, R.S. (1980) Selection of *Bacillus subtilis* strain 168 mutants with deletions of the PBSX prophage. *J Gen Virol* **46:** 427 - 437.

Calamita, G., Bishai, W.R., Preston, G.M., Guggino, W.B., and Agre, P. (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli. J Biol Chem* **270:** 29063 - 29066.

Calamita, G., Kempf, B., Bonhivers, M., Bishai, W.R., Bremer, E., and Agre, P. (1998) Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ. Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3627-3631.

Calamita, G., Kempf, B., Rudd, K.E., Bonhivers, M., Kneip, S., Bishai, W.R., Bremer, E., and Agre, P. (1997) The aquaporin-Z water channel gene of *Escherichia coli*: structure, organization and phylogeny. *Biol Cell* **89**: 321-329.

Campbell, N.A. (1997) Biologie. Spektrum - Verlag, Heidelberg.

Canovas, D., Fletcher, S.A., Hayashi, M., and Csonka, L.N.(2001) Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol* **183**: 3365-3371.

Cayley, S., Lewis, B.A., Record, T.M. Jr. (1992) Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **273:** 75 - 83.

Csonka, L.N. (1981) Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **182**: 82-86.

Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53:** 121 - 147.

Csonka, L.N., Ikeda, T.P., Fletcher, S.A., and Kustu, S. (1994) The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the *proU* operon. *J Bacteriol* **176**: 6324-6333.

Csonka, L.N., and Epstein, W. (1996) Osmoregulation. In „*Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology." (F.C. Neidhard, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger, Eds.) pp. 1210 - 1223. ASM Press, Washington, D.C.

Curi, R., Lagranha, C.J., Doi, S.Q., Sellitti, D.F., Procopio, J., Pithon-Curi, T.C., Corless, M., and Newsholme, P. (2005) Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* **204**: 392-401.

da Costa, M.S., Santos, H., and Galinski, E.A. (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. In: Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, Vol.61, pp. 117 - 153.

De Vrij, W., Bulthuis, R.A., and Konings, W.N. (1988) Comparative study of energy-transducing properties of cytoplasmic membranes from mesophilic and thermophilic *Bacillus* species. *J Bacteriol* **170**: 2359-2366.

De Vries, C.A., Hassett, D.J., Flynn, J.L., and Ohman, D.E. (1995) Genetic linkage in *Pseudomonas aeruginosa* of *algT* and *nadB*: mutation in *nadB* does not affect NAD biosynthesis or alginate production. *Gene* **156**: 63-67.

Delauney, A.J., and Verma, D.P. (1990) A soybean gene encoding delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol Gen Genet* **221**: 299-305.

Delauney, A.J., Hu, C.A., Kishor, P.B., and Verma, D.P. (1993) Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem* **268**: 18673-18678.

Derre, I., Rapoport, G., and Msadek, T. (1999) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **31**: 117-131.

Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., and Goloubinoff P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276:** 39586 - 39591.

Diamant, S., Rosenthal, D., Azem, A., Eliahu, N., Ben-Zvi, A.P., and Goloubinoff, P. (2003) Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress. *Mol Microbiol* **49**: 401-410.

Dinnbier, U.E., Limpinsel, E., Schmidt, R., and Bakker, E.P. (1988) Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150:** 348 – 357.

Dolezal, M. (2002) Die osmotische Regulation des *proHJ*-Operons aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps- Universität Marburg.

Donoghue, D.J., Krueger, W.F., Donoghue, A.M., Byrd, J.A., Ali, D.H., and el Halawani, M.E. (1990) Magnesium-aspartate-hydrochloride reduces weight loss in heat-stressed laying hens. *Poult Sci* **69**: 1862-1868.

Druger-Liotta, J., Prange, V.J., Overdier, D.G., and Csonka, L.N. (1987) Selection of mutations that alter the osmotic control of transcription of the *Salmonella typhimurium proU* operon. *J Bacteriol* **169**: 2449-2459.

Eisenberg, H., and Wachtel, E.J. (1987) Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16:** 69 - 92.

Epstein, W. (1986) Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli. FEMS Microbiol Rev* **39:** 73 – 78.

Evans, M.E., Jones, D.P., and Ziegler, T.R. (2005) Glutamine inhibits cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells via the pyrimidine pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G388-396.

Fletcher, S.A., and Csonka, L.N. (1995) Fine-structure deletion analysis of the transcriptional silencer of the *proU* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**: 4508-4513.

Forlani, G., Scainelli, D., and Nielsen, E. (1997) [delta]1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase from Cultured Cells of Potato (Purification and Properties). *Plant Physiol* **113**: 1413-1418.

Frymier, J.S., Reed, T.D., Fletcher, S.A., and Csonka, L.N. (1997) Characterization of transcriptional regulation of the *kdp* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **179**: 3061-3063.

Galinski, E.A. (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: Molecular principles, water solute interactions, stress protection. *Experientia* **49:** 487 – 496.

Galinski, E.A. (1998) Osmoadaptation in Bacteria. *Adv Microb Physiol* **37:** 273 – 328.

Galinski, E.A., and Trüper, H.G. (1994) Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15:** 95 – 108.

Goh, C.J., Dumbroff, E.B., and Lepock, J.R. (1988) Amino acid pools in CHL V79 cells during induction of thermotolerance: reduction in free intracellular glutamine. *J Cell Physiol* **135**: 139-144.

Gotsche, S., and Dahl, M. K.(1995) Purification and characterization of the phospho - α - (1,1) – glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **174:** 2711 – 2716.

Gouffi, K. and Blanco, C. (2000) Is the accumulation of osmoptoectant the unique mechanism involved in baterial osmoprotection? *Int J Food Microbiol* **55**: 171-174.

Graeme - Cook, K.A., May, G., Bremer, E., and Higgins, C.F. (1989) Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **3:** 1287 - 1294.

Hall, M.N., and Silhavy, T.J. (1981) Genetic analysis of the major outer membrane proteins of *Escherichia coli. Annu Rev Genet* **15:** 91 - 142.

Han, K. H. and Hwang, C. H. (2003) Salt tolerance enhanced by transformationof a *P5CS* gene in carrot. *J. Plant Biotechnol* **5**,149–153.

Hanahan, A. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166:** 577.

Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (1990) Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.

Häse, C.C., Le Dain, A.C., and Martinac, B. (1995) Purification and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270:**18329 - 18334.

Hayzer, D.J., and Leisinger, T. (1980) The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **118**: 287-293.

Hecker, M., and Volker, U. (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**: 35-91.

Hecker, M., Schumann, B., and Völker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis. Mol Microbiol* **19:** 417 – 428.

Helfert, C., Gotsche, S., and Dahl, M. (1995) Cleavage of trehalose–phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho-α (1,1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol Microbiol* **16:** 111 – 120.

Helmann, J.D. (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* **23:** 2351 - 2360.

Helmann, J.D., Wu, M.F., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M., and Paddon, C. (2001) Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* **183**: 7318-7328.

Hengge - Aronis, R. (1996) Back to log - phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21:** 887 - 893.

Heyne, R.I., de Vrij, W., Crielaard, W., and Konings, W.N. (1991) Sodium ion-dependent amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **173**: 791-800.

Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L., and Booth, I.R. (1987) Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? *Trend Biochem Sci* **12:** 339 - 344.

Higgins, C.F., Dorman, C.J., Stirling, D.A., Waddell, L., Booth, I.R., May, G., and Bremer, E. (1988) A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic control of gene expression in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli. Cell* **52:** 569 - 584.

Hoch, J.A. (1991) Genetic analysis in *Bacillus subtilis. Methods Enzymol* **204:** 305 – 320.

Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U., and Bremer, E. (2001) High - salinity induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184:** 718 - 727.

Hoffmann,T., Dolezal, M., Gade, J., Sohn, J., and Bremer, E.: Effective chill protection of *Bacillus subtilis* by compatible solutes. In Vorbereitung.

Holtmann, G. (1999) Kaliumaufnahme in *Bacillus subtilis.* Diplomarbeit. Philipps- Universität Marburg.

Holtmann, G. (2002). Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.

Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N., and Bremer, E. (2003) KtrAB and KtrCD: two K+ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* **185**: 1289-1298.

Holtmann, G., and Bremer, E. (2004) Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* **186**: 1683-1693.

Holtmann, G., Brigulla, M., Steil, L., Schutz, A., Barnekow, K., Volker, U., and Bremer, E. (2004) RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *J Bacteriol* **186**: 6150-6158.

Holtom, G. J., R. J. Sharp, and R. A. D. Williams (1993) Sodium-stimulated transport of glutamate by *Thermus thermophilus* strain B. *J. Gen. Microbiol.**139*:**2245–2250.

Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., and Verma, D.P. (2000) Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* **122**: 1129-1136.

Höper, D., Volker, U., and Hecker, M. (2005) Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**: 2810-2826.

Horsburgh, M.J., and Moir, A. (1999) σ^M , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol Microbiol* **32:** 41 - 50.

Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S., and Prior, B.A. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671 - 680.

Jardetzky, O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* **211**: 969-970.

Jebbar, M., von Blohn, C., and Bremer, E. (1997) Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC – transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett* **154:** 325 – 330.

Jones, D. L. and Darrah, P. R. (1993) Influx and efflux of amino acids from *Zea mays* L. roots and their implications for N-nutrition and the rhizosphere. *Plant Soil* **155**: 87–90.

Jung, K., Tjaden, B., and Altendorf, K. (1997) Purification, reconstitution and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272:** 10847 - 10852.

Kappes, R.M., Kempf, B., and Bremer, E. (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**: 5071-5079.

Kappes, R., and Bremer, E. (1998) Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and γ–butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144:** 83 – 90.

Kappes, R.M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier – Wagner, J., and Bremer, E. (1999) Two evolutionarily closely related ABC – transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis. Mol Microbiol* **32:** 203 – 216.

Kempf, B., and Bremer, E. (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**: 16701-16713.

Kempf, B., and Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319-330.

Kempf, B., and Bremer, E. (2000) Water – deficient environments. In „ Encyclopedia of Microbiology“. Vol.4, pp. 884 - 897. Academic Press.

Kennedy, E.P. (1982) Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79:** 1092 - 1095.

Kerres, A. (2002) Die Rolle von Glutamat bei der Anpassung von *Bacillus subtilis* an hohe Osmolarität. Diplomarbeit. Philipps- Universität Marburg.

Kishor, P., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C., and Verma, D. (1995) Overexpression of [delta]-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* **108**: 1387-1394.

Kishor P. B. K., Sangam, S., Amrutha1, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* **88:** 424-438.

Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabo-

lism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1323-1335.

Klein, W., Ehmann, U., and Boos, W. (1991) The repression of trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli* by high osmolarity is mediated by trehalose-6-phosphate phosphatase. *Res Microbiol* **142:** 359 - 371.

Koch, A. (1983) The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv Microb Physiol* **24:** 301 - 366.

Konings, W.N., Poolman, B., and van Veen, H.W. (1994) Solute transport and energy transduction in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 369-380.

Krispin, O., and Allmannsberger, R. (1995) Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134:** 129 - 135.

Kruger, E., Volker, U., and Hecker, M. (1994) Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* **176**: 3360-3367.

Krulwich, T.A., Masahiro, I., and Guffanti, A.A. (2001) The Na^+ - dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochem Biophys Acta* **1505:** 158 – 168.

Kuhlmann, A., and Bremer, E. (2001) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus spp. Appl Env Microbiol* **68:** 772 - 783.

Kuhlmann, A. (2002). Biosynthese und Transport des kompatiblen Solutes Ectoin in *Bacillus spp*. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.

Kunst, F., and Rapoport, G. (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 2403-2407.

Kunst, F., Msadek, T., Bignon, J., and Rapoport, G. (1994) The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **145**: 393-402.

Kunst, F., Ogasawara, N., Modzer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borcher, S. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram – positive *Bacillus subtilis*. *Nature* **390:** 249 – 256.

Lamosa, P., Martins, L.O., Da Costa, M.S., and Santos, H. (1998) Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus spp. Appl Environ Microbiol* **64**: 3591-3598.

Lee, S.J., and Gralla, J.D. (2004) Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Mol Cell* **14**: 153-162.

Leisinger, T. (1996) Biosynthesis of proline. In „*Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology." (F.C. Neidhard, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger, Eds.) Vol. 1 pp. 434 – 441. ASM Press, Washington, D.C.

LeRudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T., and Valentine, R.C. (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224:** 1064 - 1068.

Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., and Booth IR (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J* **18:** 1730 - 1737.

Ley, O. (2001) Bedeutung der Prolin-Biosynthese bei der Osmoregulation von C*orynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Ling, M., Allen, S.W., and Wood, J.M. (1994) Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. *J Mol Biol* **243**: 950-956.

Logan, T.M., Zhong, P., and Lynn, D.G. (1992) Metabolic thermotolerance: magnetic resonance detected protection of glutamate synthase. *Biochemistry* **31**: 7256-7263.

López - García, P., Antón, J., Abad, J.P., and Amils, R. (1994) Halobacterial megaplasmids are negatively supercoiled. *Mol Microbiol* **11:** 421 - 427.

Lorca, G., Winnen, B., and Saier, M.H., Jr. (2003) Identification of the L-aspartate transporter in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 3218-3222.

Lucht, J., and Bremer, E. (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol Rev* **14:** 3 - 20.

Madern, D., Ebel, C., and Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* **4:** 91 - 98.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2000) Brock: Biology of Microorganisms. Prentice - Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey

Martins, L.O., Carreto, L.S., Da Costa, M.S., and Santos, H. (1996) New compatible solutes related to Di-myo-inositol-phosphate in members of the order Thermotogales. *J Bacteriol* **178**: 5644-5651.

Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S., Hecker, M. (1995) σ^B dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **248:** 114 – 120.

McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., and Epstein, W. (1994) Interdependence of K^+ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli. J Biol Chem* **269:** 1911 - 1917.

Measures, J.C. (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257:** 398 - 400.

Menzel, R., and Gellert, M. (1987) Modulation of transcription by DNA supercoiling: a deletion analysis of the *Escherichia coli gyrA* and *gyrB* promotors. *Proc Natl Acad Sci* USA **84:** 4185 - 4189.

Miller, J. H. (1992) A short course in bacterial genetics, a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

Moe, P.C., Blount, P. and Kung, C. (1998) Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol Microbiol* **28:** 583 - 592.

Möker, N., Brocker, M., Schaffer, S., *Krämer*, R., Morbach, S., and Bott, M. (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**: 420-438.

Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A.L. (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol* **185**: 1911-1922.

Morita, Y., Nakamori, S., and Takagi, H. (2002) Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **94**: 390-394.

Moses, S. (1999) Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.

Msadek, T., Kunst, F., and Rapoport, G. (1994) MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5788-5792.

Muller, V., Spanheimer, R., and Santos, H. (2005) Stress response by solute accumulation in *Archaea*. *Curr Opin Microbiol* **8**: 729-736.

Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I.I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., and Hirt, H. (1999) Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J* **20**: 381-388.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **461**: 205-210.

Neves, C., da Costa, M.S., and Santos, H. (2005) Compatible solutes of the hyperthermophile *Palaeococcus ferrophilus*: osmoadaptation and thermoadaptation in the order Thermococcales. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8091-8098.

Notley - McRobb, L., King, T., and Ferenci, T. (2002) *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol* **84:** 806 - 811.

Ogura, M., Kawata - Mukai, M., Itaya, M., Takio, K., and Tanaka,T. (1994) Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS* - dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176:** 5673 - 5680.

Omori, K., Suzuki, S., Imai, Y., and Komatsubara, S. (1992) Analysis of the mutant *proBA* operon from a proline - producing strain of *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* **138:** 693 - 699.

Ou, W.B., Park, Y.D., and Zhou, H.M. (2001) Molecular mechanism for osmolyte protection of creatine kinase against guanidine denaturation. *Eur J Biochem* **268:** 5901 - 5911.

Peddie, C.J., Cook, G.M., and Morgan, H.W. (1999) Sodium-dependent glutamate uptake by an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* strain, TA2.A1. *J Bacteriol* **181**: 3172-3177.

Peekhaus, N., Tolner, B., Poolman, B., and *Krämer*, R. (1995) The glutamate uptake regulatory protein (Grp) of Zymomonas mobilis and its relation to the global regulator Lrp of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 5140-5147.

Peng, Z., Lu, Q., and Verma, D.P. (1996) Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet* **253**: 334-341.

Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Volker, U., and Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.

Pfluger, K., and Muller, V. (2004) Transport of compatible solutes in extremophiles. *J Bioenerg Biomembr* **36**: 17-24.

Pfluger, K., Baumann, S., Gottschalk, G., Lin, W., Santos, H., and Muller, V. (2003) Lysine-2,3-aminomutase and beta-lysine acetyltransferase genes of methanogenic archaea are salt induced and are essential for the biosynthesis of N-epsilon-acetyl-beta-lysine and growth at high salinity. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6047-6055.

Pichereau, V., Hartke, A., Auffray, Y. (2000) Starvation and osmotic stress induced multiresistances. Influence of extracellular compounds. *Int J Food Microbiol* **55:** 19 – 25.

Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., and Ruzal, S.M. (2003) Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *J Appl Microbiol* **95**: 372-379.

Poolman, B., and Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29:** 397 - 407.

Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H., Friesen, R.H., Moe, P.C., and van der Heide, T. (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Mol Microbiol* **44**: 889-902.

Price, C. (2002). General stress response. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells". (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 369 - 384. ASM Press, Washington, D.C.

Raunser, S., Haase, W., Bostina, M., Parcej, D.N., and Kuhlbrandt, W. (2005) High-yield expression, reconstitution and structure of the recombinant, fully functional glutamate transporter GLT-1 from Rattus norvegicus. *J Mol Biol* **351**: 598-613.

Repoila, F., and Gottesman, S. (2003) Temperature sensing by the *dsrA* promoter. *J Bacteriol* **185**: 6609-6614.

Roberts, M.F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**: 5.

Roeßler, M., and Müller, V. (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ Microbiol* **3:** 743 - 754.

Ron, E.Z., and Davis, B.D. (1971) Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine. *J Bacteriol* **107**: 391-396.

Rushlow, K.E., Deutch, A.H., and Smith, C.J. (1985) Identification of a mutation that relieves gamma - glutamyl - kinase from allosteric feedback inhibition by proline. *Gene* **39:** 109 - 112.

Ruzal, S.M., Lopez, C., Rivas, E., and Sanchez - Rivas, C. (1998) Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **36:** 75 - 79.

Saier, M.H., Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 354-411.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a labaratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

Sanger, F., Coulson, S. and A.R. (1977) DNA – sequencing with chain – terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74:** 5463 – 5467.

Schumann, W., Hecker, M. and Msadek, T. (2002) Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells". (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 359-368. ASM Press, Washington, D.C.

Seal, R.P., and Edwards, R.H. (2005) Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol*

Seibert, T.M. (2004) Die molekulare und physiologische Analyse des osmotisch- und kälteinduzierten Gens *yocH* aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps- Universität Marburg.

Serebrijski, I., Wojcik, F., Reyes, O., and Leblon, G. (1995) Multicopy suppression by *asd* gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous *proA* in *proA* mutants. *J Bacteriol* **177**: 7255-7260.

Shahjee, H.MD., Banerjee, K., and Ahmad, F. (2002) Comparartive analysis of naturally occurring osmolytes and their D-isomers on protection of *Escherichia coli* against environmental stresses. *J Biosci* **27:** 515-520.

Shingler, V. (1996) Signal sensing by σ^{54} - dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol Microbiol* **19:** 409 - 416.

Silhavy, T., Berman, M. L., and Enquist, L. W. (1984) Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

Sleator, R.D., and Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 49-71.

Sleator, R.D., and Hill, C. (2005) A novel role for the LisRK two-component regulatory system in listerial osmotolerance. *Clin Microbiol Infect* **11**: 599-601.

Sleator, R.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2001) Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2571-2577.

Sleator, R.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2001) Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4560-4565.

Sleator, R.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2003) A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1-9.

Slotboom, D.J., Konings, W.N., and Lolkema, J.S. (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 293-307.

Slotboom, D.J., Sobczak, I., Konings, W.N., and Lolkema, J.S. (1999) A conserved serine-rich stretch in the glutamate transporter family forms a substrate-sensitive reentrant loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14282-14287.

Sonawane, A., Kloppner, U., Derst, C., and Rohm, K.H. (2003) Utilization of acidic amino acids and their amides by pseudomonads: role of periplasmic glutaminase-asparaginase. *Arch Microbiol* **179**: 151-159.

Sowers, K.R., Robertson, D.E., Noll, D., Gunsalus, R.P., and Roberts, M.F. (1990) N epsilon-acetyl-beta-lysine: an osmolyte synthesized by methanogenic archaebacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9083-9087.

Speelmans, G., de Vrij, W., and Konings, W.N. (1989) Characterization of amino acid transport in membrane vesicles from the thermophilic fermentative bacterium *Clostridium fervidus*. *J Bacteriol* **171**: 3788-3795.

Spiegelhalter, F. (1999) Die transkriptionell kontrollierte Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis* am Beispiel der Prolin- und Glycin – Betain – Transportsysteme OpuE und OpuD. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.

Spiegelhalter, F., and Bremer, E. (1998) Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis* : contribution of the sigma A- and sigma B- dependent stress response promotors. *Mol Microbiol*. **29:** 285 – 296.

Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by desoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA* **443:** 1072 – 1078.

Steger, R., Weinand, M., *Krämer*, R., and Morbach, S. (2004) LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett* **573**: 155-160.

Steil, L. (2000) Identifizierung und Charakterisierung sporulationsspezifischer Gene in *Bacillus subtilis* mit Hilfe der DNA - Array - Technik. Diplomarbeit. Philipps- Universität Marburg.

Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Volker, U., and Bremer, E. (2003) Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol* **185**: 6358-6370.

Steinmetz, M., and Richter, R. (1994) Plasmids designed to alter the antibiotic resustance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis,* through *in vivo* recombination. *Gene* **142:** 79 - 83.

Strøm, A.R., and Kaasen, I. (1993) Trehalose metabolism in *Escherichia coli* : stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol*. **8:** 205 – 210.

Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer, M., and Bakker, E.P. (1996) K^+ circulation across the procaryotic cell membrane. In: (Konings, W.N., Kaback, H.R., Lolkema, J.S. (eds)) Transport processes in eukaryotic and procaryotic organisms. Elsevier, Amsterdam, pp. 473 - 499.

Sudarsan, N., Wickiser, J.K., Nakamura, S., Ebert, M.S., and Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev* **17**: 2688-2697.

Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Guy, H.R., and Kung, C. (1996) MscL: a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*. *Soc Gen Physiol Ser* **51:** 133 - 141.

Switzer, R.L., Zalkin, H., and Saxild, H.H. (2002) Purine, Pyrimidine and Pyridine Nucleotide Metabolism. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells". (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 255-270. ASM Press, Washington, D.C.

Takagi, H., Sakai, K., Morida, K., and Nakamori, S. (2000) Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 103-108.

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**: 3491-3498.

Tolner, B., Poolman, B., and Konings, W.N. (1992) Characterization and functional expression in *Escherichia coli* of the sodium/proton/glutamate symport proteins of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*. *Mol Microbiol* **6**: 2845-2856.

Tolner, B., Ubbink-Kok, T., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995) Cation-selectivity of the L-glutamate transporters of *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*: dependence on the environment in which the proteins are expressed. *Mol Microbiol* **18**: 123-133.

Tolner, B., Ubbink-Kok, T., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995) Characterization of the proton/glutamate symport protein of *Bacillus subtilis* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 2863-2869.

Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W., and Wood, J.M. (2005) The Osmotic Activation of Transporter ProP Is Tuned by Both Its C-terminal Coiled-coil and Osmotically Induced Changes in Phospholipid Composition. *J Biol Chem* **280**: 41387-41394.

van de Vossenberg, J.L., Ubbink-Kok, T., Elferink, M.G., Driessen, A.J., and Konings, W.N. (1995) Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Mol Microbiol* **18**: 925-932.

Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., and Gottschalk, G. (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 204-211.

Völker, U., Maul, B., and Hecker, M. (1999) Expression of a σ^B – dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181:** 3942 – 3948.

von Blohn, C. (1997) Die Rolle des Transportsystems OpuE in *Bacillus subtilis* bei der Homöostase von Prolin unter hochosmotischen Umweltbedingungen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R.M., and Bremer, E. (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25:** 175 – 187.

Voskuil, M.I., and Chambliss, G.H. (2002) The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J Mol Biol* **322**: 521-532.

Voskuil, M.I., Voepel, K., and Chambliss, G.H. (1995) The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**: 271-279.

Wacker, I., Ludwig, H., Reif, I., Blencke, H.M., Detsch, C., and Stulke, J. (2003) The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology* **149**: 3001-3009.

Waldminghaus, T., Fippinger, A., Alfsmann, J., and Narberhaus, F. (2005) RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria. *Biol Chem* **386**: 1279-1286.

Wang, J. - Y., and Syvanen, M. (1992) DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol Microbiol* **6:** 1861 - 1866.

Weinand, M. (2004) Expressoionsregulation von Transportern kompatibler Solute in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Universität zu Köln.

Welsh, D.T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24:** 263 - 290.

Whatmore, A.M., and Reed, R.H. (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K^+ in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136:** 2521 – 2526.

Whatmore, A.M., Chudek, J.A., and Reed, R.H. (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis. J Gen Microbiol* **136:** 2527 – 2535.

Wischmeyer, P.E. (2002) Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* **18**: 225-228.

Wischmeyer, P.E., Kahana, M., Wolfson, R., Ren, H., Musch, M.M., and Chang, E.B. (2001) Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol* **90**: 2403-2410.

Wood, J.M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane - based sensors. *Microbiol and Molecular Biol Rev* **63:** 230 - 262.

Wood, J.M., Culham, D.E., Hillar, A., Vernikovska, Y.I., Liu, F., Boggs, J.M., and Keates, R.A. (2005) A structural model for the osmosensor, transporter, and osmoregulator ProP of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**: 5634-5646.

Wouters, J.A., Hain, T., Darji, A., Hufner, E., Wemekamp-Kamphuis, H., Chakraborty, T., and Abee, T. (2005) Identification and characterization of Di- and tripeptide transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5771-5778.

Yancey, P.H. (1994) Compatible and counteracting solutes. In: Strange, K (Ed) Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. CRC Press, Boca Raton, pp. 81 - 109.

Yancey, P.H. (2004) Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. *Sci Prog* **87**: 1-24.

Yernool, D., Boudker, O., Folta-Stogniew, E., and Gouaux, E. (2003) Trimeric subunit stoichiometry of the glutamate transporters from *Bacillus caldotenax* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **42**: 12981-12988.

Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **431**: 811-818.

Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., and Shinozaki, K. (1995) Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J* **7**: 751-760.

Zhang, X., Fletcher, S.A., and Csonka, L.N. (1996) Site-directed mutational analysis of the osmotically regulated *proU* promoter of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 3377-3379.

Zuber, U., and Schumann, W. (1994) CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 1359-1363.

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Bremer für die Überlassung des interessanten Themas und die intensive Betreuung während der Promotion.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Brune für die spontane Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens.

Kazuo Kobayashi von der Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, Japan, danke ich für die Analyse des Einflusses putativer Transkriptionsregulatoren auf die *proHJ*-Expression.

Ein ganz spezieller Dank gebührt Dr. Jan Bursy, der mir nicht nur an der HPLC mit Rat und Tat zur Seite stand.

Alexandra Oulds verdient an dieser Stelle ein ganz großes Lob für ihren technischen Beitrag zu meiner Arbeit. Aber auch an Daniela Störmer, Jutta Gade und Maritha Lippmann geht ein großes Dankeschön für Ihre stete Einsatzbereitschaft, mir unter die Arme zu greifen.

Dr. Tamara Hoffmann danke ich für die stete Unterstützung in labortechnischen Fragen.

Auch den anderen Kollegen der AG Bremer und Buckel möchte ich ein ganz herzliches Dankeschön sagen. Als da waren: Anne Ku., Anne K., Nathalie, Annette, Antje, Tim, Michael, Till, Teodora, Ina, Holger, Gundula, Andrea, Marina, Linda, Jochen, Heike, Carmen, Birgit, Deanny, Gudrun, Katja, Patricia, Jutta S., Iris, Leslie, Marc, Marco, Silke und noch viele andere. Die Zeit mit Euch war großartig.

Katrin Jeß und Valeska Schwarz möchte ich nicht nur für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danken, sondern auch für eine grandiose Zeit in Marburg, die Unterstützung in allen Lebenslagen, das Verständnis für mangelnde Zeit meinerseits aufgrund widerspenstiger Bakterien, und noch vieles mehr.

Meiner Familie möchte ich danken, weil sie mich stets unterstützt, motiviert und aufgefangen hat und stets unerschütterliches Vertrauen in meine Fähigkeiten hatte. Allen voran geht mein Dank an meine Mutter und meinen Stiefvater, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern immer für mich da waren, und ohne die ich nicht das wäre, was ich heute bin.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Arne für seine Unterstützung, ohne die diese Arbeit sicherlich unmöglich gewesen wäre, sein Verständnis für lange und ungewöhnliche Arbeitszeiten und die Verpflegung während so mancher Nachtschicht im Labor.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe.

…….

Marburg / Lahn, im Januar 2006

VII. Anhang

		-35 -10	vor *treA*	vor *proHJ*
	σ^A-Konsensus	**TTGACA----------TG-TATAAT** 17 bp		
	proHJ	**TTGACA----------TG-TAACAT** 16 bp		
M1	1-MutHJ	TTGACA----------**A**G-TAACAT 16 bp	**pMD1 MDB8**	
M2	2-MutHJ	TTGACA----------T**C**-TAACAT 16 bp	**pMD2 MDB9**	
M1+2	3-MutHJ	TTGACA----------**AC**-TAACAT 16 bp	**pMD3 MDB10**	
M4	4-MutHJ	TTGACA----------TG-TA**T**CAT 16 bp	**pMD5 MDB6**	
M5	5-MutHJ	TTGACA----------TG-TAA**A**AT 16 bp	**pMD4 MDB11**	**pMD 16 MDB 24**
M6	6-MutHJ	TTGACA----------TG-TA**TA**AT 16 bp	**pMD7 MDB12**	**pMD 17 MDB 25**
M3	7-MutHJ	TTGACA----------TG-TAACA**G** 16 bp	**pMD8 MDB13**	
M7	8-MutHJ	TTGACA-----**-**----------TG-TAACAT 17 bp	**pMD6 MDB7**	**pMD 18 MDB 26**
M8	9-MutHJ	TTGACA----------**-**--TG-TAACAT 17 bp	**pMD9 MDB14**	
M9	10-MutHJ	TTGACA-----**--**----------TG-TAACAT 18 bp	**pMD10 MDB15**	**pMD 19 MDB 27**
M10	12-MutHJ	TTGACA-----**-**----------TG-TA**TA**AT 17 bp	**pMD12 MDB17**	**pMD 20 MDB 28**

Abb. 4: Mutationen im σ^A – abhängigen Promotor von *proHJ* und die resultierenden Plasmide und Stämme.

Tab. 20: Von K. Kobayashi auf Wechselwirkung mit *proHJ* getestete Regulatoren aus *B. subtilis* .

Platte 1

araR	ansR	alsR	ahrC	adaA	acoR	abrB	abh
ccpB	ccpA	bmrR	bltR	bkdR		azlB	arsR
cspD	cspC	cspB	comK	comA	codY	citT	citR
fnr	exuR	deoR	degU	degR	degA	dctR	ctsR
gltC	glpP	glnR	glcT	glcR	gerE	fur	fruR
kdgR	iolR	hutP	hrcA	hpr	gutR	gntR	gltR
lrpA	lmrA	licT	licR	lexA	levR	lacR	kipR
mtrB	mta	msmR	mntR	lytT	lytR	lrpC	lrpB
rbsR	pyrR	purR	pksA	phoP	perR	paiB	paiA
sigB	senS	sacY	sacV	sacT	rsiX	rocR	resD
sigV	sigM	sigL	sigH	sigG	sigF	sigE	sigD
splA	soj	slr	sinR	sigZ	sigY	sigX	sigW

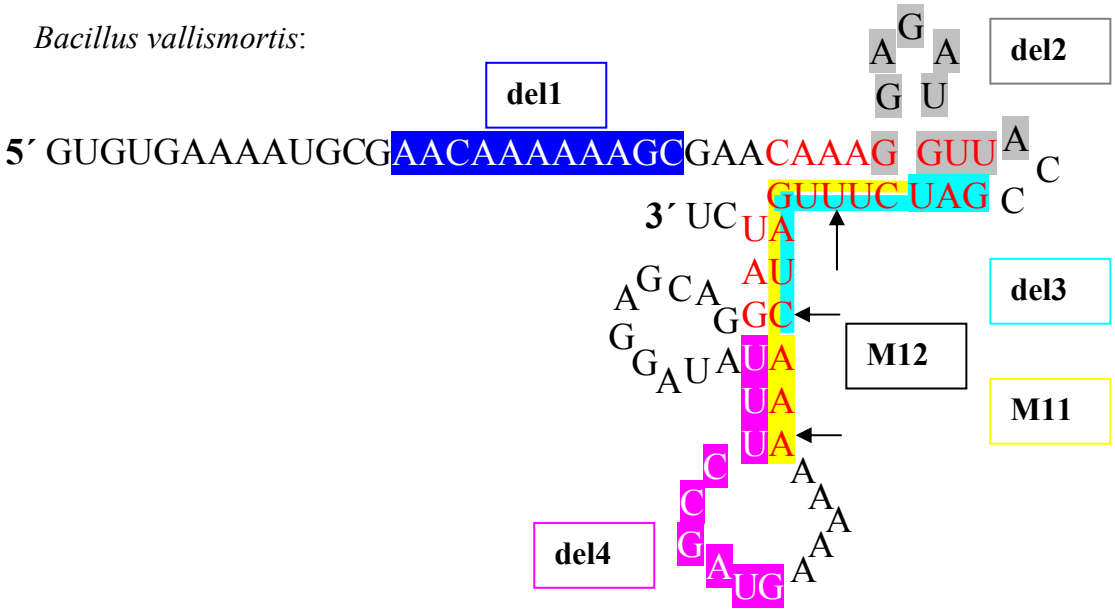
Platte 2

treR	tnrA	tenA	spoVT	spoIIII	spoIII(	spo0J	spo0A
ybdJ	ybbH	ybbB	yazB	yabJ	xylR		xpf
yccH	ycbL	ycbG	ycbB	ybgA	ybfP	ybfI	ybfA
ycnK	ycnF	ycnC	yclJ	yclA	ycgK	ycgE	yceK
ydeF	ydeE	ydeC	ydcN	ydcH	ydaA	yczG	ycxD
ydgC	ydfL	ydfI	ydfF	ydfD	ydeT	ydeS	ydeL
yetL	yesS	yesN	yerO	ydhQ	ydhC	ydgJ	ydgG
yhbI	yfmP	yfiV	yfiR	yfiK	yfiF	yfiA	yezC
yisR	yhjM	yhjH	yhgD	yhdQ	yhdI	yhcZ	yhcF
ykvE	ykuM	ykoZ	ykoM	ykoG	ykmA	yjdC	yisV
yocG	yobS	yobQ	yobD	yoaU	ymfC	ylaC	ykvZ
yplP	yozG	yozA	yotL	yopS	yopO	yonR	yofA

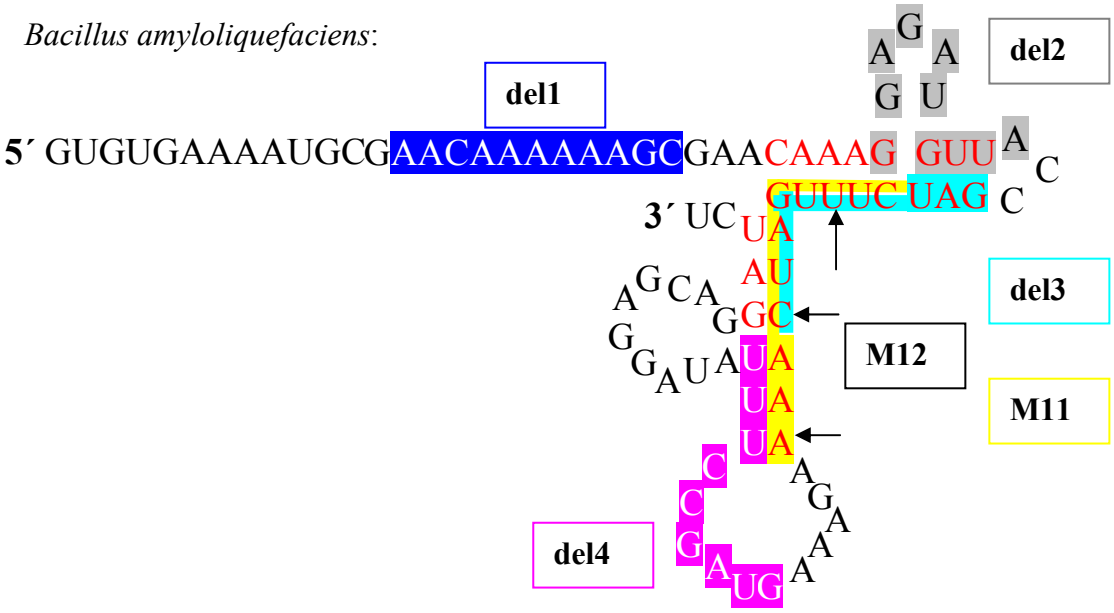
Platte 3

yrkP	yrhI	yrdQ	yraN	yraB	yqaF	yqaE	ypoP
ytzE	yttP	ytsA	ytrA	ytlI	ytdP	ysmB	ysiA
yuxN	yusT	yusO	yusF	yurK	yulB	yugG	yufM
yvdT	yvdE	yvcP	yvbU	yvbA	yvaO	yvaN	yvaF
yvqA	yvoA	yvnA	yvmB	yvkB	yvhJ	yvfU	yvfI
ywhA	ywfK	ywcC	ywbI	ywaE	yvzC	yvrH	yvqC
yxdJ	yxbF	yxaF	yxaD	ywtF	ywrC	ywqM	ywoH
zur	yydK	yybE	yybA	yyaN	yyaA	yxjO	yxjL

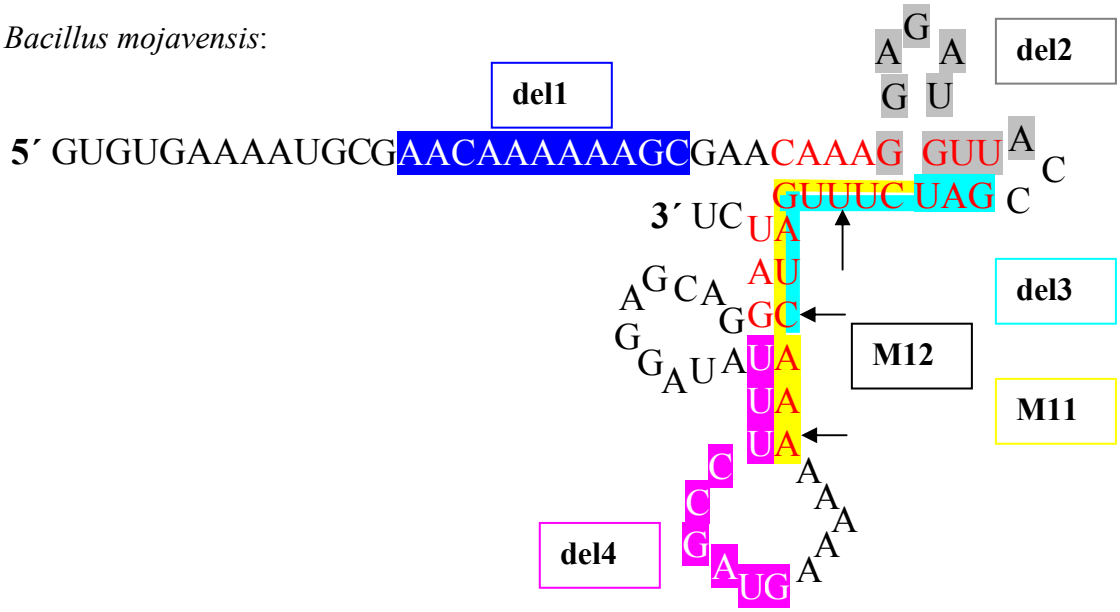
Bacillus vallismortis:



Bacillus amyloliquefaciens:



Bacillus mojavensis:



Bacillus licheniformis:

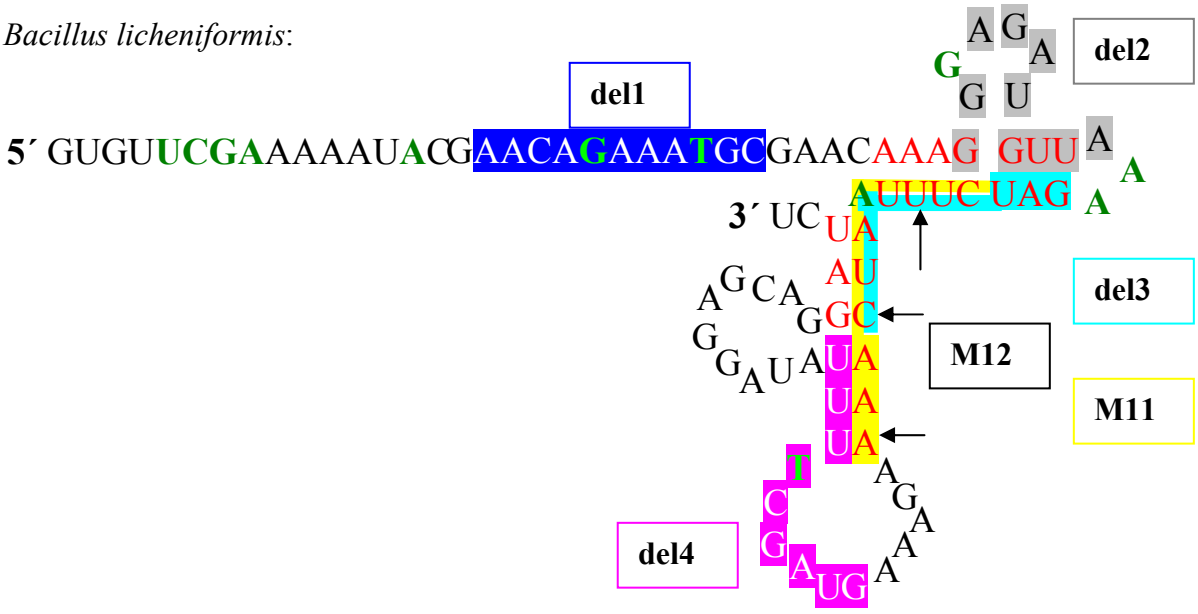
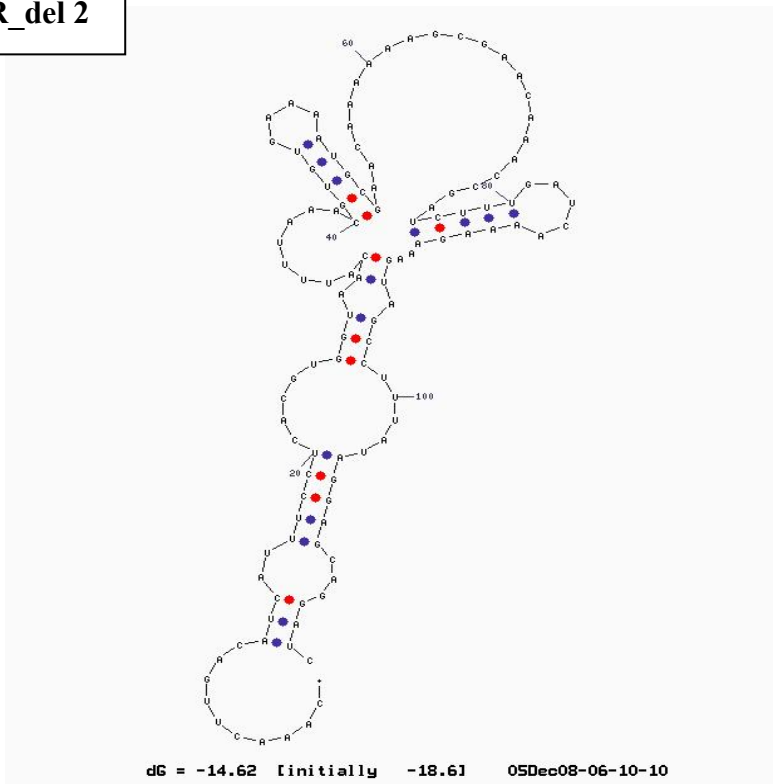
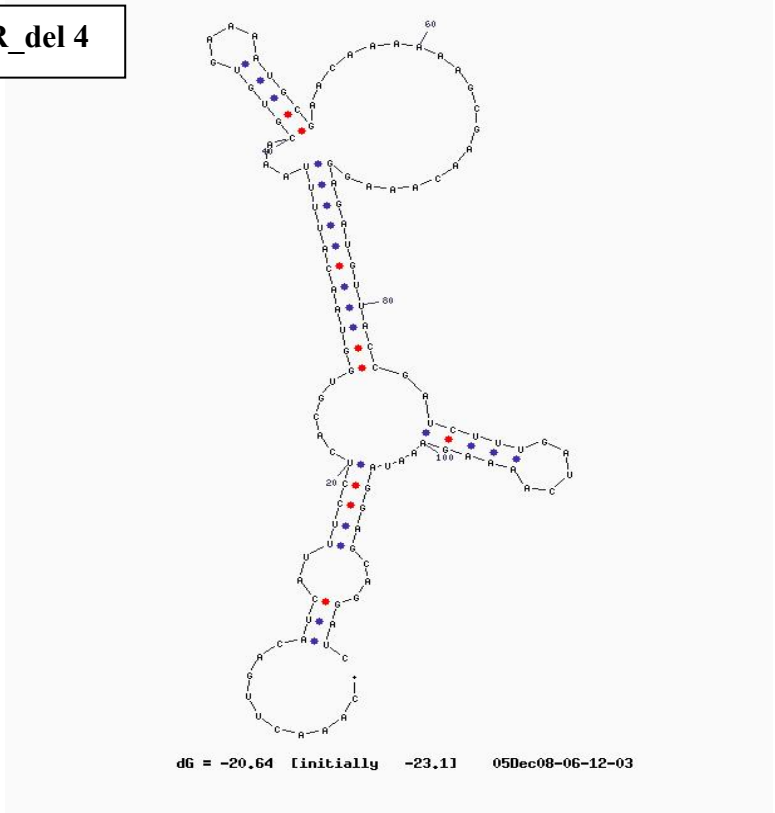


Abb. 56: mögliche Sekundärstrukturen der 5´ UTR der mRNA der putativen *proH* Orthologe aus *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis* und *B. licheniformis*. Die gewählten Parameter waren 37°C und 50 mM NaCl. In grün: die von der Sequenz aus *B. subtilis* abweichenden Nukeotide. Die in das *B. subtilis* –Fragment eingeführten Mutationen sind gekennzeichnet.

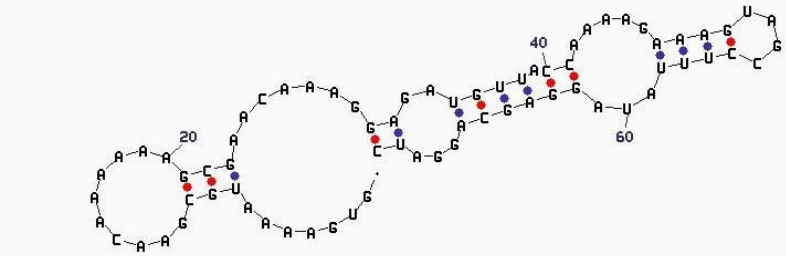
proH 5´UTR_del 2



proH 5´UTR_del 4

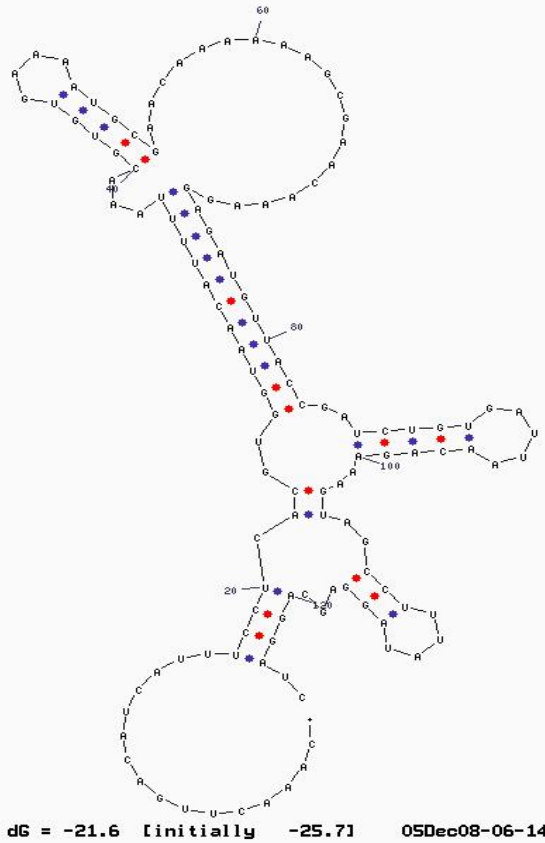


proH 5´UTR_del3



dG = -5.5 [initially -5.5] proH del3

proH 5´UTR_M12



dG = -21.6 [initially -25.7] 05Dec08-06-14-49

Abb. 57: vorgeschlagene Sekundärstrukturen der *proH* 5´UTR aus *B. subtilis* mit eingeführten Mutationen.
Parameter: s. Abb.56

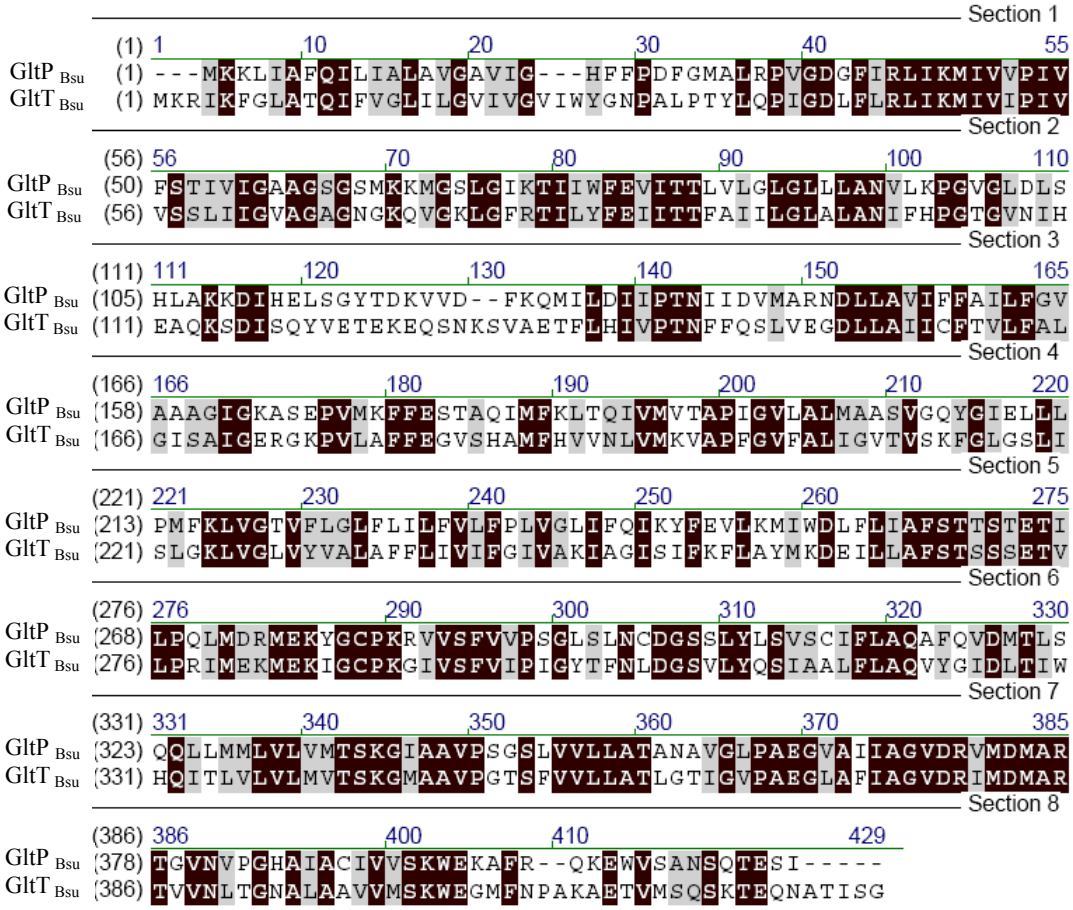


Abb. 58: **Aminosäurensequenzvergleich der Proteine GltP und GltT aus *B. subtilis*.** Es besteht eine Sequenzidentität von 43%.

Lebenslauf

Zur Person: Monika Dolezal
geb. am 07.01.1978 in Lüdenscheid
ledig

Schulbildung:

1984-1988 Adolf-Kolping-Grundschule Lüdenscheid
1988-1996 Bergstadt-Gymnasium Lüdenscheid
1996-1997 Städtisches Ganztagsgymnasium der Stadt Siegen,
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Studium und Promotion:

1997-2002 Diplomstudiengang Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Okt. 1999 Vordiplom
März 2002 Diplom mit den Schwerpunkten
Mikrobiologie, Genetik, Virologie und Biochemie

Mai 2001-
März 2002 Anfertigung der Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie mit dem Titel:

„Untersuchungen der osmotischen Regulation des *proHJ*-Operons aus *Bacillus subtilis*“

seit Mai 2002 Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. Erhard Bremer; Titel der Dissertation:

„Die stressprotektive Wirkung von Aminosäuren in *Bacillus subtilis*: Endogene Synthese von Prolin und die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat zum Schutz vor Hyperosmolarität und Hitze“

Mai 2002-
April 2005 Mitglied des Graduiertenkollegs „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“

Mai 2004-
Dez 2005 Mitglied des SFB395: „Interaktion, Anpassung und katalytische Fähigkeiten von Bodenmikroorganismen“