
Regulation der Gene für die Verwertung von Rhamnose und Heteromannan in *Bacillus subtilis*

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Stefanie Habersetzer

aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Jendrossek
Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2019

**Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart
2019**

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Stefanie Habersetzer

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Mattes für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Industrielle Genetik und die mir zur Verfügung gestellten Mittel.

Besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. Dieter Jendrossek für die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer möchte ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Dr. Josef Altenbuchner danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, die wertvollen Anregungen und die fachliche Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft, die abwechslungsreichen Gespräche rund um die Arbeit und darüber hinaus sowie für die vielen schönen Momente.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter und David für die fortwährende Unterstützung und die Motivation sowie für ihr Verständnis.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
SUMMARY	XVII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Der Modellorganismus <i>Bacillus subtilis</i>	3
2.1.1 Genetische Werkzeuge.....	6
2.1.2 Bedeutung für die Biotechnologie	8
2.2 Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels	10
2.2.1 Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR).....	10
2.2.2 Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem (PTS).....	11
2.2.3 Der globale Transkriptionsregulator CcpA.....	14
2.2.4 CcpA-unabhängige Katabolitrepression	15
2.2.5 Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand	19
2.2.6 Verwertung von Rhamnose	20
2.2.7 Verwertung von Heteromannanen.....	23
2.2.7.1 Struktur von (Hetero-)Mannanen.....	23
2.2.7.2 Postulierter Abbauweg von Glucomannan	26
2.2.7.3 Regulation des <i>gmu</i> -Operons.....	30
2.3 Zielsetzung	33
3 MATERIAL UND METHODEN	34
3.1 Material	34
3.1.1 Chemikalien	34
3.1.2 Geräte	34
3.1.3 Enzyme	35
3.1.4 Kommerzielle Kits	35
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	36
3.1.6 Kulturmedien und Medienzusätze.....	39
3.1.7 Bakterienstämme	43
3.1.8 Oligonukleotide	47

3.1.9	Plasmide	55
3.1.10	Computerprogramme/Datenbanken	62
3.2	Methoden.....	63
3.2.1	Mikrobiologische Methoden	63
3.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	63
3.2.1.2	Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur.....	63
3.2.1.3	Transformation von <i>E. coli</i> (TSS-Methode)	64
3.2.1.4	Transformation von <i>B. subtilis</i>	64
3.2.1.5	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> JM109	65
3.2.2	Molekulargenetische Methoden	66
3.2.2.1	Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration und Reinheit.....	66
3.2.2.2	DNA-Fällung mit Isopropanol	66
3.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
3.2.2.4	Kolonie-PCR	68
3.2.2.5	Hybridisierung von Oligonukleotiden	69
3.2.2.6	Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA.....	69
3.2.2.7	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	70
3.2.2.8	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	71
3.2.2.9	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	71
3.2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	71
3.2.2.11	Klonierung mittels Gibson-Assemblierung	71
3.2.2.12	Ortsgerichtete Mutagenese nach NEB (Q5® <i>Site-Directed Mutagenesis</i>)	72
3.2.2.13	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse und Alkoholfällung	73
3.2.2.14	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels Silikamembran	74
3.2.2.15	Kontroll-Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten (GATC)	74
3.2.2.16	Isolation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	74
3.2.2.17	Gezielte Manipulation des Genoms von <i>B. subtilis</i>	75
3.2.2.18	Transkriptionsstartbestimmung mittels der <i>Primer Extension</i> -Methode.....	77
3.2.2.19	Transkriptionsstartbestimmung mittels ARF-TSS	78
3.2.2.20	<i>in vitro</i> -DNase I- <i>Footprinting</i> -Experiment	79
3.2.2.21	DNA-Sequenzierung mit dem Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit.....	81
3.2.2.22	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit der ALFexpress II-Apparatur	83
3.2.2.23	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Kapillarelektrophorese	83
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	84
3.2.3.1	β -Galactosidase-Aktivitätstest (Miller Assay)	84
3.2.3.2	Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator	85
3.2.3.3	Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mittels Strep-Tag	86
3.2.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	86
3.2.3.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	87

3.2.3.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	88
3.2.3.7 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)	90
3.2.3.8 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	91
3.2.3.9 <i>Thermal Shift Assay (Differential Scanning Fluorimetry)</i>	92
3.2.4 Herstellung von Rhamnulose-1-Phosphat	93
3.2.4.1 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von Rhamnulose mittels RhaB.....	93
3.2.4.2 Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung phosphorylierter Zucker	94
4 ERGEBNISSE.....	95
4.1 Regulation des Rhamnose-Stoffwechsels in <i>Bacillus subtilis</i>	95
4.1.1 Rhamnose-Aufnahme in die Zelle.....	95
4.1.2 Organisation der Gene für die Verwertung von Rhamnose (<i>rhaEWRBMA</i>) als Operon	97
4.1.3 Kinetik der Expression	99
4.1.4 Negative Regulation durch das DNA-Bindeprotein RhaR und Kohlenstoff-Katabolitrepresion	100
4.1.5 Transkriptionsstart-Bestimmung	102
4.1.5.1 Promotor-Optimierung durch Basensubstitution	104
4.1.6 Deletionsanalyse.....	105
4.1.7 Expression von <i>rhaR-strep</i> in <i>E. coli</i>	107
4.1.8 Molekulargewichtsbestimmung durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)	109
4.1.9 Identifizierung der Operatorsequenz von RhaR	112
4.1.9.1 Komplementäre Basensubstitutionen innerhalb von P _{rhaEW}	112
4.1.9.2 DNase I- <i>Footprinting</i> -Assay	114
4.1.9.3 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	118
4.1.10 Identifizierung des Effektormoleküls von RhaR.....	122
4.1.10.1 Identifizierung des Effektormoleküls mittels Rhamnose-Stoffwechselmutanten.....	122
4.1.10.2 Gewinnung des vermuteten Effektors von RhaR (Rhamnulose-1-Phosphat).....	125
4.1.10.3 <i>In vitro</i> -Nachweis der Effektorbindung von RhaR mittels EMSA.....	128
4.1.11 Kohlenstoff-Katabolitrepresion – Nachweis der Funktionalität der <i>cre</i> -Sequenz.....	130
4.2 Regulation des Glucomannan-Stoffwechsels in <i>Bacillus subtilis</i>	133
4.2.1 Galactomannan-Verwertung	133
4.2.2 Heterologe Expression von <i>gmuR-strep</i> in <i>E. coli</i> und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	135
4.2.3 Die Organisation des <i>gmu</i> -Operons	136
4.2.4 Deletionsanalyse des Glucomannan-Promotors P _{gmuB}	140
4.2.5 Struktur des <i>gmuB</i> -Promotors	144
4.2.6 Nachweis der Interaktion von GmuR mit der P _{gmuB} -Promotorregion mittels EMSA.....	146
4.2.7 Identifizierung der Operatorsequenz von GmuR	148
4.2.7.1 DNase I- <i>Footprinting</i> -Assay	148

4.2.7.2 Komplementäre Basensubstitutionen innerhalb des P _{gmuB} -Promotors	150
4.2.8 Identifizierung des Effektors des Regulatorproteins GmuR.....	153
4.2.8.1 Identifizierung des vermutlichen GmuR-Effektormoleküls mittels Stoffwechselmutanten der Glucomannan-Verwertung	153
4.2.8.2 EMSA mit potenziellen Effektormolekülen von GmuR	155
4.2.8.3 Thermostabilität des Repressors GmuR in An- und Abwesenheit möglicher Effektoren	157
4.2.9 Aufklärung des Abbauweges von Gluco- und Galactomannan	158
4.2.9.1 Entstehung von freier Mannose.....	158
4.2.9.2 Auswirkungen einer Blockade der einzelnen Schritte des intrazellulären Abbauweges auf das Wachstum.....	160
5 DISKUSSION.....	163
5.1 Regulation des Rhamnose-Stoffwechsels	163
5.1.1 Negative Regulation des Rhamnose-Operons durch den Repressor RhaR	163
5.1.2 Identifizierung der RhaR-Operatorsequenz	165
5.1.3 Oligomerisierungsgrad von RhaR.....	167
5.1.4 Effektormolekül	168
5.1.5 CcpA-vermittelte Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR).....	169
5.1.6 Regulation durch die C-terminalen Domänen der α -Untereinheiten der RNA-Polymerase	170
5.1.7 Modell der Regulation des Rhamnose-Operons.....	171
5.1.8 DeoR-Regulatoren	173
5.1.9 Vergleich des Rhamnose-Verwertungssystems von <i>B. subtilis</i> mit <i>E. coli</i>	175
5.1.10 Aufnahme von Rhamnose in die Zelle	176
5.2 Regulation des Glucomannan-Stoffwechsels	179
5.3 Schlussfolgerung	192
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	193
7 ANHANG	216
7.1 Postuliertes Rhamnose-Operon von <i>Oceanobacillus iheyensis</i>	216
7.2 Plasmidkarten	217
7.3 DNA-Sequenzierung zugehörig zum DNase I- <i>Footprinting</i> -Experiment mit dem Regulator GmuR	218

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α -CTD	C-terminale Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase
Amp	Ampicillin
Anm.	Anmerkung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF-TSS	<i>adapter- and radioactivity-free identification of transcription start sites</i> (engl. für Identifizierung des TSS ohne Adapter und ohne Radioaktivität)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BKE	<i>Bacillus</i> Knockout Erythromycin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-terminal	carboxyterminal
cAMP	<i>cyclic</i> AMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CCR	Kohlenstoff-Katabolitrepression
cDNA	komplementäre DNA (von engl. <i>complementary</i> DNA)
chrom.	chromosomal
<i>cre</i>	<i>catabolite responsive element</i>
CTP	Cytidintriphosphat
Cy5	Cyanin 5
DC	Dünnschichtchromatographie

Abkürzung	Bedeutung
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphat
Δ (Delta)	Deletion
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR	<i>direct repeat</i> (engl., direkte Sequenzwiederholung)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
engl.	englisch
Erm ^(S)	Erythromycin(-sensitiv)
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lateinisch, und andere)
EtOH	Ethanol
EI	Enzym I
EII ^(x)	Enzym II (PTS-Permease für Substrat x)
FBP	Fructose-1,6-Bisphosphat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F6P	Fructose-6-Phosphat
Glc	Glucose
Glu	Glucitol
GM	Glucomannan
<i>gmu</i>	<i>glucomannan utilization</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure

Abkürzung	Bedeutung
HPr	Histidin-Protein
HTH	Helix-Turn-Helix
H ₂ O _{mp}	Reinstwasser (Millipore)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	invertierte Sequenzwiederholung (von engl. <i>inverted repeat</i>)
ISOCOT	<i>isomerase, CoA transferase and translation inhibitor</i>
K-Glutamat	Kaliumglutamat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> Nährmedium
LBG	<i>Locust Bean Gum</i>
M. U.	Miller Units (Einheit für Enzymaktivität)
Man	Mannose
MM	Minimalmedium
mRNA	<i>messenger RNA</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
N-terminal	aminoterminal
NaOH	Natriumhydroxid
<i>O. iheyensis</i>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
OD _x	optische Dichte bei Wellenlänge x
<i>ori</i>	Replikationsursprung (von engl. <i>origin of replication</i>)
P _x	Promotor von Gen x
P-His15-HPr	HPr-Phosphoprotein (Phosphorylierung an Histidin 15)

Abkürzung	Bedeutung
P-Ser46-HPr	HPr-Phosphoprotein (Phosphorylierung an Serin 46)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (von engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PRD	PTS-Regulationsdomäne
PTS	PEP-Phosphotransferasesystem
Rha	Rhamnose
RNA	Ribonukleinsäure (von engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	DNA-abhängige RNA-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute (von engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
R1P	L-Rhamnulose-1-Phosphat
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat (von engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEL	Spurenelementlösung
SMM	Spizizens Minimalmedium
Spc ^(R)	Spectinomycin(-resistent)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	TRIS-EDTA

Abkürzung	Bedeutung
<i>ter</i>	Transkriptionsterminator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle/-punkt
TSS(-Lösung)	<i>Transformation and Storage Solution</i>
TTP	Thymintriphosphat
TY	Trypton-Yeast (englisch für Hefeextrakt)
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Summary

In this study the regulation of the L-rhamnose and the hemicellulose heteromannan utilization genes of *Bacillus subtilis* (*rhaEWRBMA* and *gmuBACDREFG*, respectively) was investigated. The degradation genes each constitute an operon with an internal regulator gene (*rhaR* and *gmuR*, respectively).

The regulation of the rhamnose promoter (P_{rhaEW}) was studied by assaying the reporter gene (*lacZ*) expression. P_{rhaEW} is negatively regulated by the DeoR-type transcriptional regulator RhaR and is induced by rhamnose. Furthermore, the expression of the L-rhamnose operon is subjected to carbon catabolite control (CCR) and is repressed in the presence of a preferred carbon source such as glucose. A functional catabolite-responsive element (*cre*) is located within P_{rhaEW} and mediates CCR. In *B. subtilis* the conversion of L-rhamnose to L-lactate and dihydroxyacetone phosphate is catalyzed by the sequential action of four enzymes. As has been shown *in vivo* by single deletion of the structural genes, the phosphorylated intermediate, rhamnulose 1-phosphate (R1P), is the actual inducer of P_{rhaEW} . The specific interaction between the repressor RhaR and its DNA operator region upstream of the first gene was confirmed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The formation of two P_{rhaEW} -RhaR complexes with different mobility was observed, depending on the RhaR concentration, and they dissociated in the presence of the effector R1P. Two regions that were protected by RhaR were identified by DNase I footprinting experiments. The larger first region (38-45 nt) contains a direct repeat that is composed of two 17-bp sequences CAAAAA(T/C)AAACA(A/G)AAA(C/T), which are indispensable for the binding of RhaR. In addition, this RhaR binding site was confirmed by deletion analysis and block scanning mutagenesis of P_{rhaEW} . The smaller second region, also protected by RhaR (22 nt), includes a third direct repetition of the proposed 17-bp sequence motif CAAAAACAAACANAAAT with little divergence. In solution, RhaR is a monomer as concluded from gel permeation chromatography. Therefore, in the absence of rhamnose, presumably three RhaR monomers bind to these three directly repeated sequences located around the -35 and the -10 region, thereby blocking the binding of the RNA polymerase.

The fact that *B. subtilis* only grows poorly with rhamnose as the sole carbon source might be explained by the missing of a transporter. Growth with rhamnose was clearly improved by heterologous expression of a gene for a putative rhamnose

permease (*rhaY*) from *Oceanobacillus iheyensis*. It could not be clarified why an extremely long adaption time was necessary.

The glucomannan utilization (*gmu*) operon of *B. subtilis* encodes gene products putatively responsible for regulation, extracellular hydrolysis of β -1,4-linked heteromannan polysaccharides as well as uptake and degradation of the resulting oligomeric β -mannosides. Genetic analysis carried out in this study indicate that the oligosaccharides are hydrolyzed intracellular to the monomer D-mannose. Analysis of the single promoter upstream of the first gene *gmuB* (P_{gmuB}) fused to the *lacZ* gene reporter revealed that besides glucomannan the *gmu* operon can also be induced by galactomannan. Measurements of promoter activity in different mutants deficient in glucomannan metabolism suggest that the effector molecule of the GmuR repressor is a phosphorylated degradation product of the extracellular mannanase GmuG (presumably β -1,4-mannobiose), which arises from the uptake by a phosphoenolpyruvate-dependent transport system. Using EMSA, it has been shown that the GntR/HutC family repressor GmuR binds to its operator upstream of the *gmu* operon. When the protein concentration was increased, GmuR sequentially forms two P_{gmuB} -regulator complexes that migrate with different electrophoretic mobilities. In previous bioinformatic studies, a 18-bp binding site for GmuR was proposed (IR1), that comprises the conserved DNA motif in the HutC family (GTNTANAC). This central sequence that overlaps the -35 region is flanked by a 7-bp inverted repeat (TAAWWGT). The corresponding region was protected by GmuR against DNase I attack. However, the protected area (extending over 37 nt) was followed by a smaller second one (10 nt) covering the -10 region. This sequence includes an additional repetition of the right half of the inverted repeat with low discrepancy ('IR2). Block scanning mutagenesis was used to confirm that this sequence is also required for high affinity binding of GmuR. A model was proposed in which one GmuR dimer binds to IR1 and a second GmuR dimer binds to 'IR2, whereby the binding of RNA polymerase to the *gmuB* promoter is blocked.

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Gene für die Verwertung von L-Rhamnose (*rhaEWRBMA*) und der Hemicellulose Heteromannan (*gmuBACDREFG*) in *Bacillus subtilis* untersucht. Die Abbaugene sind jeweils in einem Operon mit einem internen Regulatoren (*rhaR* bzw. *gmuR*) zusammengefasst.

Die Regulation des Rhamnose-Promotors (P_{rhaEW}) wurde mittels *lacZ*-Reporteranalysen untersucht. P_{rhaEW} wird durch den DeoR-ähnlichen Regulator RhaR negativ reguliert und durch Rhamnose induziert. Außerdem unterliegt die Expression des Rhamnose-Operons der Kohlenstoff-Katabolitrepression und wird bei gleichzeitiger Anwesenheit einer bevorzugten Kohlenstoffquelle wie Glucose über eine funktionelle *cre*-Sequenz (für *catabolite responsive element*) innerhalb von P_{rhaEW} unterdrückt. L-Rhamnose wird in *B. subtilis* durch 5 enzymatisch katalysierte Schritte zu L-Lactat und Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt. Durch Deletion der einzelnen Strukturgene wurde *in vivo* gezeigt, dass das phosphorylierte Intermediat Rhamnulose-1-Phosphat (R1P) der eigentliche Induktor ist. Mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) wurde die spezifische Interaktion des Repressors RhaR mit seinem Operator stromaufwärts des ersten Gens nachgewiesen. In Abhängigkeit von der RhaR-Konzentration konnte die Bildung von zwei unterschiedlich großen P_{rhaEW} -RhaR-Komplexen beobachtet werden, die in Gegenwart des Effektormoleküls R1P wieder dissoziierten. In DNase I-*Footprinting*-Experimenten wurden zwei durch RhaR geschützte Bereiche identifiziert. Der erste, größere Sequenzabschnitt (38-45 nt) enthält eine direkte Sequenzwiederholung aus zwei 17 bp langen Sequenzen CAAAAA(T/C)AAACA(A/G)AAA(C/T), die unerlässlich für die RhaR-Bindung ist. Diese RhaR-Bindestelle konnte auch durch eine Deletionsanalyse von P_{rhaEW} sowie durch komplementäre Basensubstitutionen, die blockweise eingeführt wurden, bestätigt werden. In der kürzeren zusätzlich durch RhaR geschützten Region (22 nt) tritt das von der ersten Bindestelle abgeleitete 17 bp lange Sequenzmotiv CAAAAACAAACANAAAT mit wenigen Abweichungen erneut auf. Eine Gel-Permeations-Chromatographie ergab, dass RhaR in Lösung als Monomer vorliegt. Daher binden in Abwesenheit von Rhamnose vermutlich drei RhaR-Monomere an diese drei direkt wiederholten Sequenzen im Bereich der -35 und der -10 Region und verhindern die Bindung der RNA-Polymerase. Die Tatsache, dass *B. subtilis* mit Rhamnose als einziger Kohlenstoffquelle kaum wächst, könnte an dem Fehlen eines

Transporters liegen. Durch die heterologe Expression eines Gens für eine mutmaßliche Rhamnose-Permease (*rhaY*) aus *Oceanobacillus iheyensis* konnte das Wachstum auf Rhamnose deutlich verbessert werden. Warum aber dafür eine extrem lange Adaptationszeit nötig war, konnte nicht geklärt werden.

Das Glucomannan-Operon (*gmu*-Operon) von *B. subtilis* kodiert für Gene, die mutmaßlich für die Regulation, die extrazelluläre Hydrolyse von β -1,4-Heteromannan-Polysacchariden sowie die Aufnahme und den Abbau der dabei entstehenden oligomeren β -Mannoside verantwortlich sind. Hier durchgeführte genetische Analysen deuten darauf hin, dass die Oligosaccharide intrazellulär bis zum Monomer D-Mannose hydrolysiert werden. Durch Promotorstudien mit *lacZ* als Reporter und dem einzigen, vor dem ersten Gen *gmuB* liegenden Promotor (P_{gmuB}) wurde gezeigt, dass das *gmu*-Operon neben Glucomannan auch durch Galactomannan induziert werden kann. Die Messungen der Promotoraktivität in Stoffwechselmutanten der Heteromannan-Verwertung lassen darauf schließen, dass es sich bei dem Effektormolekül des Repressors GmuR um ein phosphoryliertes Abbauprodukt der extrazellulären Mannanase GmuG (vermutlich β -1,4-Mannobiose) handelt, welches durch Aufnahme über ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Transportsystem entsteht. Durch EMSA wurde gezeigt, dass der GntR/HutC-ähnliche Repressor GmuR an seinen Operator stromaufwärts des *gmu*-Operons bindet und dabei, abhängig von der Proteinkonzentration, nacheinander zwei P_{gmuB} -GmuR-Komplexe mit unterschiedlicher Mobilität ausbildet. Dieser Arbeit vorausgegangene bioinformatische Studien sagten eine 18 bp lange Bindestelle für GmuR vorher (IR1), die mittig das konservierte DNA-Motiv der HutC-Familie (GTNTANAC) enthält. Diese zentrale Sequenz, welche mit der -35 Region überlappt, wird von zwei inversen 7 bp langen Wiederholungen umgeben. Der entsprechende Bereich wurde im DNase I-*Footprinting*-Experiment durch GmuR geschützt. Allerdings folgte auf den 37 nt großen Abschnitt ein zusätzlicher kleinerer geschützter Abschnitt (10 nt) der die -10 Region bedeckt. Dieser Bereich enthält eine weitere invertierte Wiederholung des 7 bp langen DNA-Motivs TAAWWGT mit geringen Nukleotidabweichungen ('IR2). Durch komplementäre Basensubstitutionen wurde bestätigt, dass diese Sequenz Einfluss auf die Affinität von GmuR hat. Ein Modell wurde vorgeschlagen, bei dem ein GmuR-Dimer an IR1 und ein weiteres an 'IR2 bindet, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase an den *gmuB*-Promotor blockiert wird.

2 Einleitung

2.1 Der Modellorganismus *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ist ein stäbchenförmiges, grampositives Bakterium, das erstmals bereits 1835 von Ehrenberg unter dem Namen "*Vibrio subtilis*" (*vibrare*, lat. für schwingend) beschrieben wurde. Es zählt innerhalb der Abteilung der Firmicutes zu der Ordnung Bacillales. Cohn führte 1872 die Gattung *Bacillus* ein und änderte den Namen in *Bacillus subtilis*. Er wies nach, dass *B. subtilis* ungünstige Wachstumsbedingungen durch die Ausbildung von langlebigen Endosporen überdauern kann (Cohn, 1876). Diese metabolisch inaktiven Zellen sind äußerst resistent gegen Hitze, Bestrahlung, Austrocknung und oxidativen Stress (Nicholson *et al.*, 2000).

Die Sporen sind ubiquitär in der Luft, im Wasser und an Land verbreitet. Die vegetative Form dieser Bakterienart kann unter vielen verschiedenen Umweltbedingungen wachsen (Earl *et al.*, 2008). Als Hauptenergie- und Kohlenstoffquelle (C-Quelle) dienen heterotrophen Bakterien wie *B. subtilis* Kohlenhydrate. Ein beträchtlicher Teil seines Gen-Repertoires dient der Nutzung von zahlreichen C-Quellen, darunter auch viele pflanzliche Kohlenhydrate (Kunst *et al.*, 1997). *B. subtilis* ist fakultativ aerob und kann unter anaeroben Bedingungen die alternativen Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit sowie die Gärung zur Energiegewinnung nutzen (Nakano & Zuber, 1998). Der natürliche Lebensraum des mesophilen Bakteriums ist die obere Bodenschicht (Siala *et al.*, 1974) und die Rhizosphäre von verschiedenen Pflanzen (Earl *et al.*, 2008). Hier fördert es das Pflanzenwachstum u. a. durch die Produktion von sekundären Metaboliten, wie z. B. das Pflanzenhormon Indol-3-Essigsäure (IAA) (Mohamed & Gomaa, 2012). *B. subtilis* ernährt sich chemoorganoheterotroph und baut als typischer Saprophyt die pflanzlichen Zellwand-Polysaccharide ab (Ochiai *et al.*, 2007), um an die Nährstoffe in der Wurzel und im Samen zu gelangen. *B. subtilis* ist allerdings nicht nur ein saprophytisches Bodenbakterium sondern auch ein Darmkommensale von Tieren (Tam *et al.*, 2006) und des Menschen (Hong *et al.*, 2009).

Der Lebenszyklus des Sporenbildners setzt sich aus den drei unterschiedlichen physiologischen Phasen vegetatives Wachstum, Sporulation und anschließender Germination unter günstigeren Umweltbedingungen zusammen. Informationen über die Umgebung, wie das Nährstoffangebot und die Zelldichte, werden von dem Mikroorganismus durch Zwei-Komponenten-Systeme erkannt und weitergeleitet (Fabret *et al.*, 1999). Bei knappem Nahrungsangebot wird das Wachstum eingestellt. Zunächst peritrich begeißelte Zellen können an Oberflächen wie z. B. an den Wurzeln von Pflanzen einen Biofilm ausbilden (Vlamakis *et al.*, 2013). Hierbei handelt es sich um einen Zusammenschluss von unterschiedlichen Zelltypen, welche innerhalb diesem verschiedene Funktionen übernehmen. Eine selbstproduzierte extrazelluläre Matrix umhüllt diese heterogene Population, die aus genetisch identischen Zellen besteht, deren Gene aber unterschiedlich reguliert werden. Die Differenzierung zu einem Zelltyp ist jedoch nicht irreversibel und wird durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk gesteuert (Vlamakis *et al.*, 2013).

In diesem nimmt der globale Transkriptionsregulator Spo0A eine Schlüsselfunktion ein. Bei Nahrungsmangel oder Umweltstress erfolgt die Aktivierung des Antwortregulators Spo0A über eine Phosphorylierungskaskade (Burbulys *et al.*, 1991) an der fünf Sensor-Histidinkinasen (KinA–E) beteiligt sind (Jiang *et al.*, 2000). Änderungen in der Konzentration des phosphorylierten Transkriptionsfaktors Spo0A lösen bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwerts eine Anpassung des Expressionsprofils der Zelle aus, die mit Veränderungen in der Zell-Morphologie einhergeht (Fujita *et al.*, 2005).

Die Biofilmbildung beginnt – bei einer intermediären Konzentration an aktiviertem Spo0A (Fujita *et al.*, 2005) – mit der Differenzierung zu „sesshaften“, Matrix produzierenden Zellen und der Bildung von langen Zellketten. Das bifunktionelle Enzym EpsE koordiniert diese Entwicklung, indem es für die Synthese der Exopolysaccharide (EPS) benötigt wird und gleichzeitig die Rotation der Flagellen über eine inhibitorische Interaktion mit dem Flagellenmotorprotein FliG verhindert (Vlamakis *et al.*, 2013).

Bei einem ausreichend hohen Phosphorylierungsgrad von Spo0A wird die Sporulation eingeleitet (Fujita *et al.*, 2005) und die Zelle teilt sich asymmetrisch in eine kleinere Vorspore und eine größere Mutterzelle. Nach mehreren Phasen wird im

letzten Schritt die Spore durch programmierten Zelltod und Lyse der Mutterzelle freigesetzt (Stragier & Losick, 1996).

Ein anderes Zellschicksal stellt die Entwicklung der natürlichen Kompetenz dar. Nachdem eine ausreichend hohe Zelldichte erreicht wurde, erlangt ein geringer Teil der Population die Fähigkeit zur Aufnahme von exogener DNA aus der Umgebung (Grossman, 1995). Als extrazelluläres Signalmolekül für die Messung der Zelldichte dient der sekretierte Kompetenz-stimulierende Faktor ComX, der durch ein Zwei-Komponenten-System erkannt und weitergeleitet wird (Magnuson *et al.*, 1994). Diese Art der interzellulären Kommunikation wird als „*Quorum-Sensing*“ bezeichnet.

Zusätzlich koexistieren weitere Zelltypen innerhalb des Biofilms, wie z. B. sogenannte Kannibalen, welche Toxine sekretieren, die zur selektiven Lyse von Geschwisterzellen führen (González-Pastor *et al.*, 2003). Durch die gleichzeitige Expression von Resistenzgenen sind sie selbst hingegen vor diesen Toxinen geschützt (Ellermeier *et al.*, 2006; González-Pastor *et al.*, 2003).

Für die Besiedlung der Wurzeloberfläche wird das extrazelluläre Signal Surfactin benötigt (Bais *et al.*, 2004). Das Lipopeptid Surfactin ist ein Biotensid mit antimikrobieller Wirkung (Peypoux *et al.*, 1999), dessen Produktion in *B. subtilis* durch ComX ausgelöst wird (López *et al.*, 2009a; Magnuson *et al.*, 1994). Es fungiert ebenfalls als *Quorum-Sensing*-Signal, welches indirekt die Phosphorylierung von Spo0A stimuliert und dadurch die Matrix-Produktion initiiert (López *et al.*, 2009b). Die Subpopulation der Surfactin-produzierenden Zellen selbst reagiert allerdings nicht auf das unidirektionale Signal (López *et al.*, 2009a). Surfactin dient auch für Pflanzen als Signalmolekül, welches in diesen die induzierte systemische Resistenz einleitet (Ongena *et al.*, 2007). Um *B. subtilis* als Schutz vor Pathogenen anzulocken, sekretieren Pflanzen ihrerseits ebenfalls niedermolekulare Verbindungen wie z. B. Maleinsäure. Diese fördern in *B. subtilis* ähnlich zu Surfactin die Biofilm-Bildung durch Induktion der Gene für die Matrix-Produktion (Rudrappa *et al.*, 2008).

In Laborstämmen ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen allerdings weitgehend verloren gegangen (Branda *et al.*, 2001).

Der domestizierte Stamm *B. subtilis* 168 ging aus einer Mutagenese des ursprünglichen Marburg Stamms durch Röntgenstrahlung hervor (Burkholder & Giles, 1947). Das 4 Mb große Genom von *B. subtilis* 168 wurde 1997 vollständig sequenziert (Kunst *et al.*, 1997) und umfasst ungefähr 4.100 annotierte Gene. Nach

der Entwicklung von effizienteren und präziseren Sequenzierungsmethoden in den darauffolgenden Jahren wurde das gesamte Genom 2009 resequenziert und reannotiert (Barbe *et al.*, 2009).

Genetik, Biochemie und Physiologie von grampositiven Bakterien wurden am Beispiel von *B. subtilis* intensiv untersucht, sodass *B. subtilis* nach *Escherichia coli* das am besten untersuchte Bakterium ist (Harwood, 1992). Aufgrund seines Lebenszyklus dient *B. subtilis* als Modellsystem für die Sporulation, die Zelldifferenzierung und das Sozialverhalten von Bakterien.

2.1.1 Genetische Werkzeuge

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Ausbildung der natürlichen Kompetenz ist *B. subtilis* gut zugänglich für genetische Manipulationen. Die Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung wurde bereits 1958 von Spizizen, der ebenfalls mit dem *B. subtilis* Stamm 168 arbeitete, nachgewiesen. Der streng regulierte physiologische Zustand tritt nur unter bestimmten Umweltbedingungen in einem kleinen Teil der Population (10–20 %) auf (Hamoen *et al.*, 2003).

Der DNA-Aufnahmeapparat von *B. subtilis* besteht aus einem Pseudopilus, welcher aus vier verschiedenen G-Proteinen (ComGC, ComGD, ComGE und ComGG) aufgebaut wird (Chen & Dubnau, 2004), und einem DNA-Translokase-Komplex. Der die Zellwand durchdringende Pseudopilus ermöglicht exogener DNA den Zugang zu dem membrangebundenen Rezeptor ComEA (Provvedi & Dubnau, 1999). Nach Bindung der DNA wird der Doppelstrang vermutlich durch die membranständige Endonuklease NucA (Provvedi *et al.*, 2001) ca. alle 13,5–18 kb gespalten (Dubnau, 1999). Anschließend wird ein DNA-Strang unter ATP-Verbrauch durch den Transmembrankanal ComEC ins Zellinnere transportiert, während der komplementäre Strang durch ein noch unbekanntes Gegenstück zur *Streptococcus pneumoniae* Endonuklease NucA abgebaut wird (Claverys *et al.*, 2009). Der aufgenommene Einzelstrang wird durch Einzelstrang-bindende Proteine (SsbA, SsbB und DprA) stabilisiert und kann als Substrat für die RecA-vermittelte homologe Rekombination dienen (Yadav *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2014).

B. subtilis kann sowohl mit linearer chromosomaler DNA als auch mit zirkulärer Plasmid-DNA transformiert werden. Um eine RecA-vermittelte Integration durch

homologe Rekombination mit genomischer DNA zu ermöglichen, sollten die Sequenzabschnitte, welche homolog zum Chromosom sind, jeweils mindestens 500 bp umfassen (Fehér *et al.*, 2007). Der Mechanismus der extrachromosomalen Etablierung von Plasmid-DNA beruht vermutlich auf der intrazellulären Aneinanderlagerung von überlappenden Enden antiparalleler Einzelstränge (Vos *et al.*, 1981). Der Vektor kann anschließend durch DNA-Synthese bzw. DNA-Reparaturmechanismen rekonstituiert werden.

Es wurde eine Vielzahl von genetischen Werkzeugen entwickelt, mit denen das Genom von *B. subtilis* modifiziert werden kann. Klassische Strategien zur Erzeugung gezielter Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen im bakteriellen Chromosom nutzen den ubiquitären Mechanismus der homologen Rekombination aus. Gekoppelt mit der veränderten DNA-Sequenz wird gleichzeitig ein Resistenzgen eingebracht, welches als Selektionsmarker dient (Haldenwang *et al.*, 1980; Niaudet *et al.*, 1982; Shimotsu & Henner, 1986). Eine Deletionskassette enthält ein Resistenzmarkergen, welches von den beiden Sequenzen umgeben wird, die die Zielsequenz im Chromosom flankieren. Die Antibiotikum-Resistenz erlaubt die Selektion von Zellen, welche die Kassette über homologe Rekombination in ihr Genom integriert haben. Sind jedoch mehrere aufeinanderfolgende Mutationen in einem Stamm gewünscht, so stößt man bei dieser Methode bedingt durch die zur Verfügung stehende Anzahl an verschiedenen Resistenzgenen schnell an eine Grenze.

In den letzten Jahren wurden neue, markerlose Methoden und Strategien entwickelt. Bei Systemen, die auf dem Prinzip der „Gegenselektion“ beruhen, werden zunächst zusätzliche Gene in das Genom eingebracht, welche unter bestimmten Bedingungen toxisch wirken und durch Rekombination wieder beseitigt werden können. Dazu zählen z. B. Operator-Repressor-Systeme (Liu *et al.*, 2008), Suizidplasmide mit Letalgenen als Marker (Wenzel & Altenbuchner, 2015) und Auxotrophie-basierte Selektionssysteme (Motejadded & Altenbuchner, 2007). Strategien, welche die ortsspezifische Rekombination ausnutzen, zeichnen sich durch eine deutlich gesteigerte Rekombinationseffizienz aus (Dong & Zhang, 2014). Als Beispiel sei hier das Cre//loxP-System genannt, welches vom Bakteriophagen P1 abstammt. Die Verwendung von chimären Erkennungssequenzen verhindert eine genomische Instabilität und erlaubt mehrere Mutationen im selben genetischen Hintergrund

(Warth & Altenbuchner, 2013). Allerdings bleiben bei dieser Methode exogene Sequenzen im Chromosom zurück.

Die neu entwickelte, vielversprechende CRISPR-Cas9-Methode wurde mittlerweile auch in *B. subtilis* erfolgreich eingesetzt, um innerhalb kurzer Zeit zielgerichtete Mutationen in das Chromosom einzubringen (Altenbuchner, 2016; Westbrook *et al.*, 2016). Neben chromosomalen Insertionen bzw. Deletionen ermöglicht dieses System mit Einschränkungen auch Basensubstitutionen (Altenbuchner, 2016). Für die Anwendung dieser Methode wird nur ein Vektor benötigt und überdies ist keine vorherige genetische Manipulation des Ausgangsstamms erforderlich.

2.1.2 Bedeutung für die Biotechnologie

Eine der ersten industriellen Anwendungen von *B. subtilis* war die fermentative Herstellung des traditionellen japanischen Lebensmittels Natto aus Sojabohnen unter Einwirkung von *B. subtilis* (*natto*) (Harwood, 1992). Die genetische Zugänglichkeit und das umfassende Wissen über die Biochemie, Genetik und Zellphysiologie sowie die zellulären Anpassungsprozesse von *B. subtilis* begünstigen seine Verwendung als "Zellfabrik" (Harwood, 1992). *B. subtilis* bietet einige Vorteile gegenüber dem am häufigsten für die Produktion von heterologen Proteinen eingesetzten Wirtsorganismus *E. coli*. Bei einer Überproduktion in dem gramnegativen Bakterium stellen Einschlusskörperchen im Zyto- oder Periplasma häufig ein Problem dar (Baneyx & Mujacic, 2004). Dagegen sekretiert *B. subtilis* große Mengen an Proteinen über das Sec-SRP-Translokationssystem direkt in das Kulturmedium (Yamane *et al.*, 2004). Außerdem produziert *B. subtilis* aufgrund des Nichtvorhandenseins einer äußeren Membran keine Lipopolysaccharide mit endotoxischer Wirkung. Da *B. subtilis* keine invasiven Eigenschaften besitzt und für Menschen nicht pathogen ist, wird er allgemein als ein sicherer Wirt für die Produktion von gesundheitlich unbedenklichen Erzeugnissen erachtet (Boer & Diderichsen, 1991). Aus diesen Gründen erhalten endogene und heterolog exprimierte Proteine, die aus *B. subtilis* gewonnen wurden, in der Regel den GRAS-Status (Generally Recognized As Safe) durch die amerikanische "Food and Drug Administration" (Cutting, 2011). Von kommerziellem Interesse sind extrazelluläre Proteine von *B. subtilis* wie z. B. Proteasen für die Waschmittelindustrie oder Glycosidasen für die Stärkeindustrie.

Ferner dient *B. subtilis* als Produzent von Feinchemikalien, Biotreibstoff und Antibiotika (z. B. Bacilysin, Subtilin) (Harwood, 1992; Liu *et al.*, 2013). Eine weitere industrielle Anwendung ist die Herstellung rekombinanter Arzneimittel wie z. B. das menschliche α -Interferon (Terpe, 2006). Die heterologe Proteinproduktion, bei der deutlich geringere Ausbeuten erhalten werden, wurde in den letzten Jahren optimiert. Als Ansatzstellen dienten die Proteinsynthese selbst, die Sekretionsmaschinerie und die Proteinstabilität (Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2013). Der Aufbau und die Regulation der Stoffwechselwege wurde manipuliert und das Genom auch insgesamt stark reduziert, um sowohl die Produktions- als auch die Sekretionsraten zu erhöhen (Liu *et al.*, 2013).

2.2 Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels

Im Gegensatz zu den im Labor meist verwendeten reichhaltigen Vollmedien stehen Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung häufig nur sehr geringe Mengen der benötigten Nährstoffe zur Verfügung. Dies erfordert eine streng regulierte Anpassung an die zur Verfügung stehenden Nahrungsquellen, um Ressourcen einzusparen. Für die Aufrechterhaltung der zentralen Stoffwechselwege (Glykolyse, Pentosephosphatweg, Citratzyklus und 2-Oxoglutarat-Glutamat-Glutamin-Zyklus) benötigt die Zelle Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphat und Schwefel. Üblicherweise dient das verfügbare Substrat selbst als Effektormolekül, das eine Aktivierung der Gene, die für seine Verwertung benötigt werden, auslöst. Es existieren jedoch übergeordnete globale Regulationssysteme, die die Verwendung und Bevorzugung von Quellen des gleichen Nährstoffs koordinieren (Sonenshein, 2007). Die drei globalen Transkriptionsfaktoren CcpA, CodY und TnrA stehen an oberster Stelle des regulatorischen Netzwerks und regulieren die Transkription lokaler Transkriptionsfaktoren, die einen bestimmten Stoffwechselweg steuern (Leyn *et al.*, 2013; Sonenshein, 2007). Sie sprechen auf eine kleine Anzahl zentraler Stoffwechselintermediate an und koordinieren den Kohlenstoff- und den Stickstoff-Metabolismus (Sonenshein, 2007).

2.2.1 Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR)

Stehen Bakterien verschiedene Kohlenhydrate zur Verfügung, findet in der Regel eine Selektion der bevorzugten Kohlenhydrat-Quelle statt, die als einzige aufgenommen und verstoffwechselt wird. *B. subtilis* bevorzugt wie viele heterotrophe Bakterien das schnell abbaubare Monosaccharid Glucose. Ist diese Aldohehexose vorhanden, werden die Gene unterdrückt, welche für die Verwertung von anderen Kohlenhydraten mit untergeordneter Bedeutung benötigt werden. Dieser regulatorische Mechanismus wird als Kohlenstoff-Katabolitrepression (engl. *carbon catabolite repression*, kurz CCR) bezeichnet und gewährleistet einen ökonomisch optimalen Umgang mit den Ressourcen der Zelle. In *B. subtilis* lösen neben Glucose in unterschiedlichem Ausmaß auch viele weitere Kohlenhydrate CCR aus, sodass die Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen in einer hierarchischen Reihenfolge erfolgt (Brückner & Titgemeyer, 2002; Singh *et al.*, 2008).

Nahezu alle Gene und Operons, die für die Nutzung eines bestimmten Zuckers benötigt werden, stehen unter der Kontrolle eines Regulatorproteins. Infolge einer Induktorbindung vermittelt der zugehörige Regulator eine gesteigerte Genexpression. Dieser Induktionsprozess dient u. a. als Angriffspunkt für die Kohlenstoff-Katabolitrepression. Er wird z. B. durch eine (In-)Aktivierung des Transkriptionsfaktors mittels einer mit dem Phosphotransferasesystem (PTS) verbundenen Phosphorylierung oder durch den Mechanismus des Induktor-Ausschlusses unterdrückt (Brückner & Titgemeyer, 2002).

Über diese zuckerspezifischen Hemmungsmechanismen hinaus existiert eine vorgeschaltete globale Transkriptionskontrolle, die in grampositiven Bakterien mit geringem GC-Gehalt durch das pleiotrope Kontrollprotein CcpA (Abk. für engl. *catabolite control protein A*) ausgeübt wird. Über 300 Gene, von denen die meisten am Katabolismus von Kohlenhydraten beteiligt sind, stehen unter der Kontrolle von CcpA (Moreno *et al.*, 2001). Da die CcpA-abhängige Katabolitrepression von so gut wie allen Kohlenhydraten stimuliert wird, besitzt sie autoregulatorische Eigenschaften und führt zu einer negativen Rückkopplung (Brückner & Titgemeyer, 2002). Dieses Instrument dient der Anpassung der Zuckeraufnahme und -verwertung an die gegenwärtige metabolische Kapazität der Zelle und verhindert dadurch Wachstumsdefekte, die durch eine uneingeschränkte Zuckeraufnahme hervorgerufen werden würden (Brückner & Titgemeyer, 2002).

2.2.2 Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem (PTS)

Damit von der Zelle aufgenommene Zucker verstoffwechselt werden können, ist ein Phosphorylierungsschritt notwendig. Die Aufnahme von Mono-, Di- und Oligosacchariden erfolgt in *B. subtilis* über Symporter, ABC (engl. *ATP binding cassette*)-Transporter und über das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) (Stülke & Hillen, 2000). Beim PTS-Transportsystem handelt es sich um ein hochentwickeltes Multiproteinsystem, bei welchem der Transportprozess an eine gleichzeitige Phosphorylierung des Substrats gekoppelt ist. Dadurch entfällt hier die Notwendigkeit einer anschließenden, Kinase-abhängigen, intrazellulären Phosphorylierung (Deutscher *et al.*, 2002).

Das PTS-Transportsystem besteht aus den allgemeinen zytoplasmatischen PTS-Komponenten Enzym I (EI) und Histidin-Protein (HPr) sowie mehreren verschiedenen zuckerspezifischen Permeasen, die als Enzym II (EII), bezeichnet werden. Letztere bestehen aus je drei funktionellen Domänen, die in einem Protein vereint sein können oder als getrennte Polypeptide synthetisiert werden. Das Genom von *B. subtilis* kodiert für 15 verschiedene zuckerspezifische PTS-Permeasen, die zu fünf verschiedenen Proteinfamilien (Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose und Fructose) gehören (Reizer *et al.*, 1999).

In einer Phosphorylierungskaskade wird eine Phosphatgruppe ausgehend von dem Donor Phosphoenolpyruvat (PEP) nacheinander transient auf EI, HPr und den EII-Enzymkomplex übertragen. Die zwei hydrophilen Domänen EIIA und EIIB der EII-Permease sind die letzten beiden Enzyme in der Phosphorylierungskette. Der eigentliche Transportkanal wird durch die integral in der Membran verankerte EIIC-Domäne (und teils eine zusätzliche EIID-Subdomäne) gebildet. Nach der Bindung des Substrats an diese Domäne phosphoryliert EIIB letztendlich den eintretenden Zucker, welcher daraufhin in der Zelle freigesetzt wird (Deutscher *et al.*, 2002).

Neben dieser Transportfunktion fungiert das PTS-System gleichzeitig als ein Signaltransduktionssystem. EI phosphoryliert HPr an einem konservierten Histidin-Rest an Position 15 (P-His15-HPr). Der phosphorylierte Aminosäurerest dient als Phosphatdonor für die PTS-katalysierte Aufnahme und gleichzeitige Phosphorylierung von Kohlenhydraten (Deutscher *et al.*, 2002). Das Phosphatübertragende Protein HPr besitzt zusätzlich eine regulatorische Phosphorylierungsstelle an seinem konservierten Serin-Rest 46.

Eine bifunktionelle HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P) nimmt in diesem System eine Sensor-Funktion ein und passt den Phosphorylierungszustand von HPr an die Nährstoffversorgung der Zelle an. Bei hohen Konzentrationen des glykolytischen Intermediats Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) phosphoryliert die HPr-Kinase den Serin-Rest 46 von HPr ATP-abhängig (P-Ser46-HPr) (Deutscher & Saier, 1983). Auch die Umkehrreaktion wird durch die allosterisch regulierte Serin/Threonin-Proteinkinase katalysiert. Die Stimulation der Phosphatase-Aktivität erfolgt hauptsächlich durch anorganisches Phosphat, aber auch durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Acetylphosphat sowie die Abnahme des intrazellulären pH-Wertes infolge eines Nahrungsmangels (Ramström *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass der

Wechsel zwischen den zwei antagonistischen Aktivitäten über einen veränderten Oligomerisierungsgrad infolge der allosterischen Modifikationen erzielt wird (Ramström *et al.*, 2003).

Das natürliche Substrat der HPr-Kinase ist nicht-phosphoryliertes HPr, während PEP-abhängig phosphoryliertes P-His15-HPr hingegen ein schlechtes Substrat darstellt (Reizer *et al.*, 1998). Analog ist P-Ser46-HPr kein geeignetes Substrat für die EI-katalysierte Phosphorylierung (Monedero *et al.*, 2001). Die Proteinkinase EI konkurriert daher sehr wahrscheinlich direkt mit der biofunktionellen Kinase HPrK/P um HPr (Reizer *et al.*, 1998).

HPr, das an Serin 46 phosphoryliert worden ist, kann in einem *Pulldown*-Assay mit CcpA ko-isoliert werden (Deutscher *et al.*, 1995). Der Komplex aus dem konstitutiv synthetisierten (Miwa *et al.*, 1994) globalen Regulatorprotein CcpA und P-Ser46-HPr bindet mit hoher Affinität an sogenannte *cre* (engl. *catabolite responsive element*)-Sequenzen in der DNA (Fujita, 2009).

Das Genom von *B. subtilis* kodiert zusätzlich für ein zu HPr homologes Protein Crh (*Catabolite repression HPr*), das ebenfalls als Cofaktor spezifisch mit CcpA interagiert (Seidel *et al.*, 2005). Crh wird analog zu HPr durch HPrK/P und ATP an Serin 46 phosphoryliert (P-Ser46-Crh) (Galinié *et al.*, 1997). Da der konservierte Histidin-Rest an Position 15 in Crh durch Glutamin ersetzt ist, ist dieses Protein jedoch nicht am PTS-Transport beteiligt und besitzt nur eine regulatorische Funktion (Galinié *et al.*, 1997). Die in der *ptsH1*-Mutanten (HPr-S46A) noch verbliebene CCR kann durch eine zusätzliche Inaktivierung von Crh vollständig aufgehoben werden (Fujita, 2009). Im Vergleich zu HPr ist der Wirkungsgrad der Crh-vermittelten Katabolitkontrolle allerdings deutlich geringer (Fujita, 2009). Während der Funktionsverlust von P-Ser46-Crh nahezu vollständig durch P-Ser46-HPr ausgeglichen werden kann, kann HPr nur partiell durch Crh ersetzt werden.

Der unterschiedliche Wirkungsgrad von Crh und HPr beruht wahrscheinlich auf zwei wesentlichen Unterschieden. Während des Wachstums auf Kohlenhydraten weist HPr eine bis zu 100-fach höhere Syntheserate als Crh auf und liegt daher vermutlich in deutlich höheren Konzentrationen in der Zelle vor als Crh (Görke *et al.*, 2004). Zusätzlich besitzt der Effektor P-Ser46-Crh offenbar aufgrund einer schwächeren Bindung an den globalen Regulator CcpA eine geringere Affinität für diesen als P-Ser46-HPr (Schumacher *et al.*, 2006; Seidel *et al.*, 2005).

Es gibt Hinweise, die nahelegen, dass Crh eine spezifische Rolle während des Wachstums auf C-Quellen wie z. B. Succinat zukommt, bei denen es sich nicht um Kohlenhydrate handelt (Warner & Lolkema, 2003). Offenbar ist die Bedeutung der Corepressoren für die CCR zusätzlich abhängig von der Wachstumsphase. Während des Übergangs in die stationäre Phase scheint Crh weniger erlässlich für die CCR zu sein (Inácio & Sá-Nogueira, 2007).

2.2.3 Der globale Transkriptionsregulator CcpA

CcpA ist ein DNA-Bindeprotein aus der Familie der LacI/GalR-Repressoren (Henkin *et al.*, 1991). Biochemische Studien zeigten, dass die ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr und Crh notwendig ist für deren Interaktion mit CcpA (Seidel *et al.*, 2005). Jede Monomer-Untereinheit des CcpA-Dimers wird von je einem monomeren Cofaktor (Seidel *et al.*, 2005) gebunden (Seidel *et al.*, 2005; Swint-Kruse & Matthews, 2009). Neben diesen primären allosterischen Effektoren wird CcpA über eine zusätzliche Bindestelle durch die kleinen Effektormoleküle FBP und Glucose-6-Phosphat feinreguliert (Schumacher *et al.*, 2007; Swint-Kruse & Matthews, 2009). Allerdings wirken sich diese glykolytischen Intermediate nur positiv auf die DNA-Bindung des CcpA-Regulatorkomplexes aus, wenn dieser mit P-Ser46-HPr gebildet wurde (Schumacher *et al.*, 2007).

Zusammen mit seinem Coregulator reprimiert CcpA in Gegenwart von schnell abbaubaren Kohlenhydraten Gene, die an der Verwertung von anderen Zuckern sowie sekundären Kohlenstoff- (wie z. B. die C4-Dicarboxylate Malat, Fumarat und Succinat) und Stickstoffquellen beteiligt sind. Auch die Synthese von Sekundärmetaboliten wie Antibiotika wird gehemmt. Neben seiner hauptsächlich repressorischen Funktion stimuliert der CcpA-Coregulator-Komplex die Biosynthese von verzweigten Aminosäuren und Fettsäuren durch die Aktivierung der Expression des anabolen *ilv-leu*-Operons. Außerdem aktiviert der Proteinkomplex die Expression von Genen des Überflusmetabolismus und unterdrückt gleichzeitig die Verwertung von Glucose durch den Citratzyklus und die Atmungskette (Fujita, 2009).

Innerhalb des Genoms von *B. subtilis* wurden 50 *cre*-Sequenzen experimentell belegt (Fujita, 2009). Diese Operatorsequenzen für den CcpA-Coregulator-Komplex weisen die Konsensussequenz WWTGNAARCGNWWCAWW (N = A/C/G/T,

R = A/G, W = A/T) auf (Miwa *et al.*, 2000). Die Lage der *cre*-Sequenz bestimmt ihre Wirkungsweise (Fujita, 2009). Bindet der Phosphoprotein-CcpA-Komplex an eine *cre*-Sequenz stromaufwärts des Promotors, wird die Transkription – vermutlich durch eine direkte Interaktion des Komplexes mit der RNA-Polymerase – stimuliert. Eine Überlappung der *cre*-Sequenz mit der Promotorregion bzw. eine Positionierung stromabwärts der Transkriptionsstartstelle hingegen blockiert die Bindung des Transkriptionskomplexes bzw. die Transkriptionselongation.

Die Gegebenheit, dass 20 funktionelle *cre*-Sequenzen innerhalb des Proteinkodierenden Bereichs von Genen liegen (Fujita, 2009), liefert eine Erklärung für die relativ hohe Degeneration von *cre*-Sequenzen. Die konservierten Basen der Konsensussequenz entsprechen meist der *Wobble*-Position, wodurch offenbar die Schaffung einer *cre*-Operatorsequenz unter gleichzeitiger Beibehaltung der korrekten Aminosäuresequenz ermöglicht wurde (Miwa *et al.*, 2000).

2.2.4 CcpA-unabhängige Katabolitrepression

Neben dem Hauptregulatorprotein CcpA existieren in *B. subtilis* drei weitere Katabolitkontrollproteine, CcpB, CcpC und CcpN (Fujita, 2009). Die beiden Repressoren CggR und CcpN regulieren CcpA-unabhängig die Expression von Genen der Glykolyse bzw. der Gluconeogenese. Die Aktivität von CggR wird ähnlich zu CcpA durch glykolytische Intermediate (FBP, Dihydroxyacetonphosphat) moduliert (Brantl & Licht, 2010).

PTS-Regulationsdomäne (PRD)

Bei den Bacilli besitzt neben P-Ser46-HPr auch das am PTS-Transport beteiligte Phosphoprotein P-His15-HPr eine Funktion in der globalen, übergeordneten Katabolitkontrolle. Dieser CcpA-unabhängige Mechanismus ist an die PTS-Transportaktivität gekoppelt, die zu einem Abfluss der Phosphatgruppen in Richtung des importierten PTS-Zuckers führt. In Abwesenheit eines schnell verwertbaren PTS-Zuckers stimuliert P-His15-HPr indirekt die Expression einiger Gene für die Verwertung von weniger bevorzugten PTS-Zuckern, indem es eine als PTS-Regulationsdomäne (PRD) bezeichnete Peptidsequenz erkennt und phosphoryliert. Diese duplizierten PRDs (PRDI und PRDII) kontrollieren in gewissen

Transkriptionsregulatoren die Nukleinsäure-Bindung und besitzen meist zwei konservierte Histidin-Reste, die als regulatorische Phosphorylierungsstellen fungieren (Deutscher *et al.*, 2006).

Das Genom von *B. subtilis* kodiert für insgesamt 8 PRD-haltige Regulatoren (Reizer *et al.*, 1999), die modular aufgebaut sind (Greenberg *et al.*, 2002).

Antiterminatoren mit PRDs

Es sind 4 Antiterminatoren bekannt (LicT, GlcT, SacT und SacY), die neben der N-terminalen RNA-Bindedomäne zwei PRDs (PRDI und PRDII) mit gewöhnlich je zwei potentiellen Phosphorylierungsstellen für PTS-Proteine aufweisen (Deutscher *et al.*, 2006). Die Gene, die unter der Kontrolle des am besten untersuchten Antiterminators LicT stehen, werden konstitutiv transkribiert. Allerdings befindet sich in der Ziel-mRNA stromaufwärts der Protein-kodierenden Region ein intrinsischer Transkriptionsterminator (Krüger *et al.*, 1996; Schnetz *et al.*, 1996). Dieser Bereich überlappt mit einer konservierten RNA-Sequenz, welche als RNA-Antiterminator-(RAT)-Sequenz bezeichnet wird (Stülke, 2002). Antiterminatoren verhindern die Ausbildung einer Haarnadelstruktur durch die Terminatorsequenz, indem sie mit der RAT-Sequenz interagieren. Jedoch wirkt sich der Phosphorylierungszustand der PRDs auf ihre RNA-Bindefähigkeit aus. LicT wird in Abwesenheit des PTS-Zuckers (β -Glucosid) durch die akkumulierende phosphorylierte Form der zugehörigen EIIB^{Bgl}-Permeasedomäne reversibel an seiner PRDI phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Neben dieser Substrat-spezifischen Kontrolle (als Substratinduktion bezeichnet) wird die Aktivität von LicT in Abwesenheit von Glucose durch eine P-His15-HPr-abhängige, reversible Phosphorylierung der PRDII stimuliert (Deutscher *et al.*, 2006; Lindner *et al.*, 1999). Wird jedoch eine bevorzugte C-Quelle aufgenommen und verwertet, liegt HPr nicht-phosphoryliert bzw. in einem alternativen - für EI unzugänglichen – Phosphorylierungszustand (P-Ser46-HPr) vor. LicT ist daher nur dann aktiv, wenn das Substrat Salicin vorhanden ist und gleichzeitig keine schnell verwertbare C-Quelle wie Glucose verfügbar ist. Eine Ausnahme von diesem Schema stellen die *B. subtilis* Antiterminatoren SacY und GlcT dar, deren RNA-Bindeaktivität nicht von einer Phosphorylierung durch HPr abhängt und die somit nicht durch einen generellen CCR-Mechanismus reguliert werden (Stülke, 2002).

Transkriptionsaktivatoren mit PRDs

Im Allgemeinen ist der Regulationsmechanismus von Transkriptionsaktivatoren komplexer. In *B. subtilis* sind insgesamt 4 Transkriptionsaktivatoren der LevR- und der DeoR-Familie bekannt, die PRDs tragen (LevR, LicR, ManR, MtlR) (Fujita, 2009). Ihre DNA-Bindungsaktivität wird analog zu den Antiterminatoren über eine Reihe von regulatorischen (De-)Phosphorylierungen moduliert. Zusätzlich zu einer DNA-Bindedomäne und den zwei PRD-Domänen enthalten sie jedoch zwei zu den zytoplasmatischen Domänen der EII-Permeasen homologe IIA- und IIB-Domänen, in denen die Histidin- bzw. Cystein-Phosphorylierungsstelle konserviert ist (Greenberg *et al.*, 2002). Auch sie werden durch antagonistisch wirkende Phosphorylierungsereignisse durch PTS-Komponenten reguliert, allerdings unter Einbeziehung der regulatorischen IIA- und IIB-Domänen, sodass insgesamt 6 potentielle Phosphorylierungsstellen existieren (Greenberg *et al.*, 2002). Ähnlich zu den Antiterminatoren wird auch bei den Transkriptionsaktivatoren die generelle PTS-Transportrate in den Regulationsprozess einbezogen, wodurch eine übergeordnete Kontrolle durch einen bevorzugten PTS-Zucker ermöglicht wird (CCR-Mechanismus). Vereinfacht dargestellt wird die PRDII (und die PRDI) durch das allgemeine PTS-Protein P-His15-HPr phosphoryliert, während die regulatorischen IIA- und IIB-Domänen durch die EIIA- und/oder die EIIB-Domäne der zugehörigen PTS-Permease modifiziert werden (Joyet *et al.*, 2010; Tobisch *et al.*, 1999; Wenzel & Altenbuchner, 2013). Es existiert jedoch keine allgemeingültige Regel, welche der Domänen an den regulatorischen Phosphorylierungen beteiligt sind. Die Aktivität der Aktivatoren wird durch die Anwesenheit des Transportsubstrats und die Abwesenheit einer bevorzugten C-Quelle wie Glucose stimuliert (Fujita, 2009).

Induktor-Ausschluss

P-His15-HPr stimuliert in *B. subtilis* zusätzlich durch Phosphorylierung die Aktivität der Glycerinkinase GlpK, die den Induktor Glycerin-3-Phosphat (G3P) generiert. Auf diese Weise kann über den Phosphorylierungszustand der PTS-Komponente HPr die Verwertung des nicht-PTS-Zuckers Glycerin reguliert werden. In Gegenwart eines PTS-Zuckers wird die intrazelluläre Bildung des Induktors G3P unterbunden (Darbon *et al.*, 2002).

In manchen grampositiven Bakterien moduliert HPr außerdem die Aktivität gewisser Transportproteine, die an der Aufnahme von nicht-PTS Zuckern beteiligt sind. Das Phosphoprotein verhindert die Aktivierung der Genexpression durch den Induktor, indem es die Aktivität von Transportproteinen kontrolliert. In *Lactobacillus brevis* wird die Aufnahme von Galactose durch die Bindung von P-Ser46-HPr an den zugehörigen Protonen-Symporter gehemmt (Djordjevic *et al.*, 2001). Die Lactose-Permease von *Streptococcus thermophilus* hingegen besitzt eine EIIA-ähnliche Domäne, die in Abwesenheit von Glucose durch eine P-His15-HPr-abhängige Phosphorylierung aktiviert wird (Poolman *et al.*, 1995).

2.2.5 Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand

B. subtilis ist in Bereichen der oberen Bodenschicht mit zerfallendem organischen Material und Pflanzenwurzeln zu finden (Earl *et al.*, 2008). Als Saprophyt baut es die pflanzliche Zellwand ab, welche hauptsächlich aus komplexen, heterogenen Polysacchariden besteht (Ochiai *et al.*, 2007). Zu den Strukturpolysacchariden in der Zellwand zählen (mit abnehmendem Mengenanteil) Cellulose, Hemicellulose und Pektine.

Cellulose besteht aus β -1,4-glykosidisch verbundenen D-Glucose-Molekülen. Das unverzweigte Homopolymer bildet sogenannte Cellulosefibrillen, die als Gerüstsubstanz in eine Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen, Strukturproteinen und – in Sekundärwänden – zusätzlich in Lignin eingebettet sind.

Hemicellulose ist ein Sammelbegriff für verschiedene pflanzliche Polysaccharide mit komplexen Strukturen. Der Name entstand durch die irrtümliche Annahme, dass es sich hierbei um Zwischenprodukte der Cellulose-Synthese handle. Gegensätzlich zu den Pektinen ist die Zusammensetzung der Hemicellulosen abhängig vom Zelltyp und der Pflanzenart. Meist überwiegt eine Hemicellulose (Brett & Waldron, 1990). Zu den Hemicellulosen zählen Xylane, Mannane und Galactane, die nach ihren Hauptzuckerkomponenten (D-Xylose, D-Mannose bzw. D-Galactose) benannt sind. Die glykosidische Bindung wird zwischen dem C1- und dem C4-Atom bzw. weniger häufig mit dem C3- oder dem C6-Atom eines anderen Zuckers geknüpft. Im Gegensatz zu den kristallinen Cellulosefibrillen sind diese Polysaccharidketten kürzer (70–200 Monosaccharid-Einheiten) (Moreira & Filho, 2008), verzweigt, besser wasserlöslich und daher gut zugänglich für den mikrobiellen Abbau (Fuchs & Schlegel, 2007).

Pektine sind hauptsächlich aus D-Galacturonsäure (6-Carboxy-D-Galactose)-Monomeren aufgebaute Polysaccharide, die in der einfachsten Form (Homogalacturonan) linear über eine α -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. In dem wohl am weitesten verbreiteten Pektin Rhamnogalacturonan I sind zusätzlich α -L-Rhamnose-Einheiten über ihre C2- und C1-Hydroxylgruppen in die Hauptkette integriert und mit den C1- und C4-Atomen der D-Galacturonsäure-Einheiten verknüpft. Die beiden Monomer-Einheiten treten in der Hauptkette alternierend auf. Als Ansatzpunkte für monomere und oligomere Seitenketten aus D-Galactose und L-Arabinose dienen die C4-Atome der Rhamnose-Einheiten.

Rhamnogalacturonan II hingegen besteht aus einer homopolymeren Galacturonan-Hauptkette mit komplex aufgebauten Seitenketten (Ridley *et al.*, 2001).

B. subtilis sekretiert eine Vielzahl von Enzymen, die die pflanzlichen Polysaccharide abbauen, wie z. B. eine α -Amylase, Pektat-Lyasen, Xylanasen, Arabinasen und Glucanasen/Cellulasen (Voigt *et al.*, 2009).

2.2.6 Verwertung von Rhamnose

Die natürlich auftretende 6-Desoxyhexose L-Rhamnose ist u. a. Bestandteil der pflanzlichen Pektine und der Zellwände von vielen Bakterien (Giraud & Naismith, 2000; Mistou *et al.*, 2016). Der Einfachzucker ist Mannose strukturell sehr ähnlich (6-Desoxy-L-Mannose).

In *E. coli* wird Rhamnose über den Protonen-Symporter RhaT in die Zelle transportiert (Muiry *et al.*, 1993). Am intrazellulären Abbau von Rhamnose sind vier Enzyme beteiligt. Liegt die L-Rhamnopyranose in der α -Form vor, so wird sie zunächst durch die L-Rhamnose-Mutarotase RhaM in das energetisch weniger begünstigte β -Anomer überführt (Ryu *et al.*, 2004). Die β -Form wird vermutlich ähnlich zu dem katalytischen Mechanismus, der für das *Pseudomonas stutzeri* Enzym angenommen wird (Yoshida *et al.*, 2013), auch in *E. coli* bevorzugt durch die L-Rhamnose-Isomerase RhaA umgesetzt. RhaA katalysiert die Isomerisierung von L-Rhamnose zur Ketose L-Rhamnulose (6-Desoxy-L-Fructose), dem Substrat der L-Rhamnulokinase RhaB (Power, 1967; Wilson & Aji, 1957). Eine Kristallstrukturanalyse, bei der L-Rhamnulose im Komplex mit dem *E. coli* RhaB-Enzym die β -Form annahm (Grueninger & Schulz, 2007), bestärkt die Vermutung, dass RhaA dieses Anomer als Substrat bevorzugt. Das phosphorylierte Produkt L-Rhamnulose-1-Phosphat wird im letzten Schritt durch die Aktivität einer spezifischen L-Rhamnulose-1-Phosphat-Aldolase RhaD in L-Lactaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten (Kroemer *et al.*, 2003; Power, 1967). Als Intermediat der Glykolyse kann der C3-Körper DHAP anschließend in den zentralen Stoffwechsel eingespeist werden. L-Lactaldehyd kann in *E. coli* aerob durch die NAD⁺-abhängige Lactaldehyd-Dehydrogenase AldA zu Lactat und letztendlich Pyruvat oxidiert werden oder anaerob durch die NADH-abhängige

Oxidoreduktase FucO zu L-1,2-Propanediol reduziert werden (Baldomà & Aguilar, 1988).

Das L-Rhamnose-Regulon von *E. coli* besteht aus zwei Operons in entgegengesetzter Orientierung (*rhaBAD* und *rhaSR*) (Moralejo *et al.*, 1993), auf die in direkter Nachbarschaft das monocistronische *rhaT*-Gen folgt. Da unmittelbar stromabwärts des *rhaBAD*-Operons in gleicher Orientierung das *rhaM*-Gen folgt, ist dieses vermutlich das letzte Mitglied dieses Operons (Ryu *et al.*, 2005). Die Bindung des Effektormoleküls L-Rhamnose an den AraC/XylS-Transkriptionsaktivator RhaR führt zur Autoinduktion der regulatorischen Gene *rhaSR* (Egan & Schleif, 1993; Tobin & Schleif, 1987, 1990). Daraufhin aktiviert wiederum der Regulator RhaS, welcher ebenfalls zur AraC/XylS-Familie gehört, nach Bindung von L-Rhamnose die Transkription der Strukturgene *rhaBAD(M)* und *rhaT* (Egan & Schleif, 1993; Vía *et al.*, 1996).

Das Genom von *B. subtilis* kodiert für die Gene *rhaEW*, *rhaR*, *rhaB*, *rhaM* und *rhaA*, die wahrscheinlich zu einem einzigen Operon mit einem internen Regulatorgen (*rhaR*) zusammengefasst sind (Leyn *et al.*, 2013). Interessanterweise schließt das Rhamnose-Operon jedoch keinen Rhamnose-spezifischen Transporter ein. Die funktionelle Zuordnung basiert auf dem genetischen Kontext und Sequenzähnlichkeiten der Genprodukte zu Proteinen, die den Abbau von Rhamnose in anderen taxonomischen Gruppen katalysieren.

Abweichend von *E. coli* ersetzt u. a. in *B. subtilis* das chimäre Gen *rhaEW* (*rhaE-rhaW*) die Aldolase RhaD. Die N-terminale L-RhamnULOse-Phosphat-Aldolase-Domäne (RhaE) des *rhaEW*-Genprodukts ist mit einer C-terminalen L-Lactaldehyd-Dehydrogenase-Domäne (RhaW) fusioniert. Mit Hilfe eines zweistufigen *in vitro*-Enzymaktivitätstests und anschließender Massenspektrometrie wurde nachgewiesen, dass das bifunktionelle Enzym die zwei letzten Schritte des Abbaus von Rhamnose katalysiert und L-RhamnULOse-1-Phosphat zu L-Lactat und DHAP umsetzt (Rodionova *et al.*, 2013; siehe Abbildung 4.14 A, Seite 124). Zusätzlich wurde durch Wachstumsuntersuchungen gezeigt, dass Rhamnose nach einer Unterbrechung des *rhaEW*-Gens nicht mehr verwertet wird (Rodionova *et al.*, 2013).



Abbildung 2.1 Vorhergesagte DNA-Bindesequenz des DeoR-ähnlichen Regulatorproteins RhaR für die Ordnung Bacillales (Leyn *et al.*, 2013). Die Buchstabengröße spiegelt die relative Auftrittshäufigkeit der Base an der jeweiligen Position wider.

Der bisher nicht untersuchte Regulator RhaR besitzt eine N-terminale DNA-Bindedomäne mit Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv und ist Mitglied der nach dem *E. coli* Transkriptionsfaktor DeoR benannten DeoR-Familie (Kunst *et al.*, 1997). Sie setzt sich aus bakteriellen Transkriptionsrepressoren zusammen, die gewöhnlich den Zucker- und Nukleosid-Katabolismus kontrollieren. Das DNA-Bindemotiv von RhaR wurde *in silico* für die Ordnung Bacillales vorhergesagt (siehe Abbildung 2.1; Leyn *et al.*, 2013). In *B. subtilis* grenzt die 19 bp umfassende, unvollständige direkte Sequenzwiederholung mit einer Periodizität von 10 bp (5'-CAAAAATAAACA AAAATAA-3') unmittelbar stromaufwärts an die -35 Region des Rhamnose-Operons an.

2.2.7 Verwertung von Heteromannanen

Das Glucomannan-Operon (kurz *gmu*-Operon für *glucomannan utilization operon*) von *B. subtilis* ist an der Verwertung von Zellwand-Kohlenhydraten beteiligt (Sadaie *et al.*, 2008). Es besteht aus 8 Genen (*gmuBACDREFG*, früher *ydhMNOPQRST*), deren kodierte Proteine aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mutmaßlich am Abbau von (Gluco-)Mannanen beteiligt sind (Abbildung 2.2).

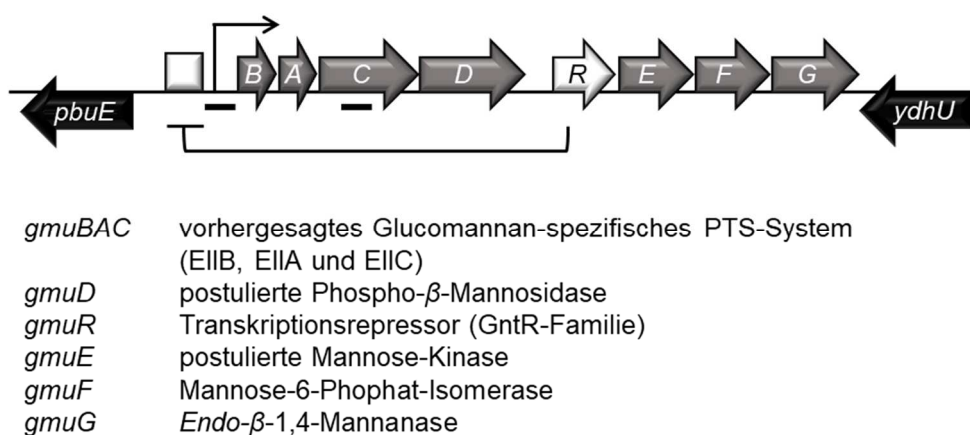


Abbildung 2.2 Organisation des Glucomannan-Operons von *B. subtilis*. Die Gene des Operons und die benachbarten Gene (schwarz) sind als offene Pfeile dargestellt. Eine *in silico* vorhergesagte Bindestelle für den Repressor GmuR (Viereck) befindet sich in der Promotorregion (abgewinkelter Pfeil) stromaufwärts des ersten Gens (*gmuB*). Neben der Regulation durch GmuR unterliegt das Operon der Kontrolle der CCR, die über zwei *cre*-Sequenzen (dicke Linien) ausgeübt wird.

2.2.7.1 Struktur von (Hetero-)Mannanen

Mannane sind Hemicellulosen, deren Hauptkette aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Mannose- und in Glucomannan zusätzlich aus Glucose-Einheiten besteht (Abbildung 2.3). Die Mannose-Einheiten können α -1,6-gebundene Galactose-Monomere als Seitenketten (Galactomannan bzw. Galactoglucomannan) (Brett & Waldron, 1990) und/oder an den Positionen O2/O3 Acetylgruppen tragen (Gilbert *et al.*, 2008).

Neben ihrer strukturgebenden Funktion als Hemicellulose, die als solche an Cellulose binden, dienen die Pflanzengummis Gluco- und Galactomannan als Speicherpolysaccharide (Moreira & Filho, 2008). In der Nahrungsmittelindustrie finden sie Anwendung als Geliermittel, Stabilisator, Ballaststoff und Präbiotikum. Außerdem werden sie in der Pharmaindustrie u. a. im Bereich der Arzneistoffgabe

eingesetzt und dienen dort z. B. als Überzug, der eine Modifikation der Freisetzung im Darm ermöglicht (Alonso-Sande *et al.*, 2009; Silveira & Bresolin, 2011).

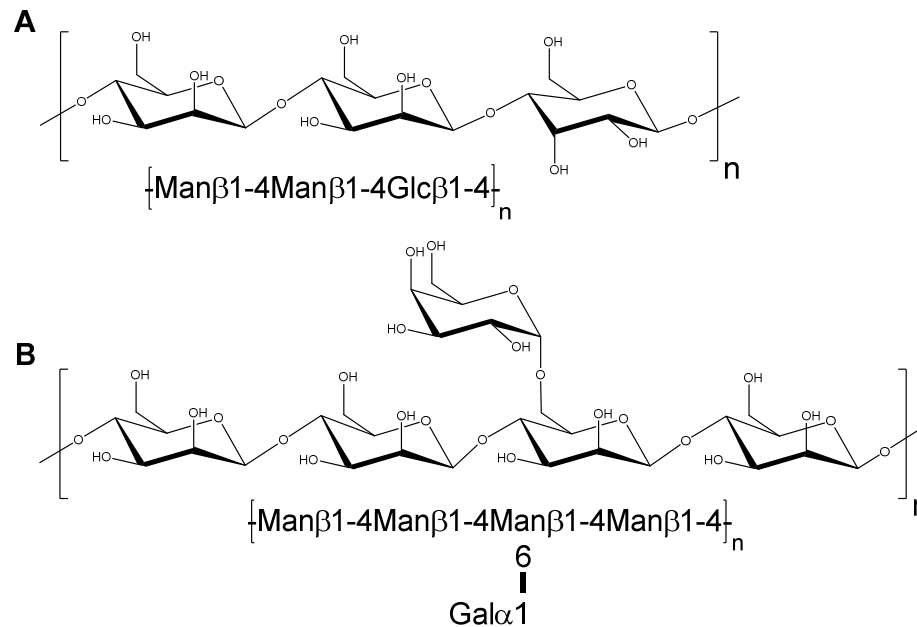


Abbildung 2.3 Strukturformel von Konjak-Glucomannan (A) und dem Galactomannan *Locust Bean Gum* (B). A) Glucomannane besitzen eine heterogene Hauptkette aus D-Mannose und D-Glucose. B) Im Galactomannan *Locust Bean Gum* tritt statistisch gesehen an jedem vierten Mannose-Rest in der homogenen Hauptkette eine Seitenkette aus D-Galactose auf (Gal, D-Galactose; Glc, D-Glucose; Man, D-Mannose).

Glucomannane sind Hauptbestandteil der Hemicellulosen in den sekundären Zellwänden von Gymnospermen (wie Koniferen) und sind in Wurzeln, Knollen und Zwiebeln enthalten (Alonso-Sande *et al.*, 2009; Brett & Waldron, 1990). In den Glucomannan-Heteropolymeren mit einer Kettenlänge von über 200 Monosacchariden sind die β -1,4-verknüpften, abwechselnden Einheiten von D-Glucose und D-Mannose-Monomeren willkürlich angeordnet (Brett & Waldron, 1990; Moreira & Filho, 2008). Das Verhältnis von D-Mannose zu D-Glucose sowie der Acetylierungsgrad (5–10 %) sind abhängig von der jeweiligen Quelle, aus der das Glucomannan isoliert wurde (Alonso-Sande *et al.*, 2009).

Aus der Wurzelknolle der Teufelszunge *Amorphophallus konjac* wird das sogenannte Konjak-Glucomannan mit einem D-Mannose-zu-D-Glucose-Verhältnis von etwa 1,6:1 gewonnen (Maeda *et al.*, 1980). Ungefähr alle 50–60 Einheiten verzweigt sich die

lineare Hauptkette über das C6-Atom der D-Glucose-Einheiten (Katsuraya *et al.*, 2003). Die Länge der β -1,6-glykosidisch gebundenen Seitenketten aus D-Glucose und D-Mannose (Katsuraya *et al.*, 2003) wird mit 11–16 Einheiten angegeben (Nishinari *et al.*, 1992). Innerhalb der Konjak-Glucomannan-Ketten treten sowohl Mannose-Mannose (Anzahl 13), Glucose-Mannose (oder Mannose-Glucose, Anzahl 8) als auch mit geringerer Häufigkeit Glucose-Glucose-Bindungen (Anzahl 5) auf (Katsuraya *et al.*, 2003). Da die durchschnittliche Länge der Mannose-Blöcke 2,6 beträgt, wird eine hohe Anzahl an Mannobiose- und Mannotriose-Einheiten angenommen (Katsuraya *et al.*, 2003).

Galactomannane sind die häufigsten Vertreter der Speicherkohlenhydrate in den Zellwänden und kommen vor allem als Hauptbestandteil im Endosperm der Samen von Leguminosen vor. Dort dienen sie als Reservekohlenhydrate und schützen durch ihre Fähigkeit, große Mengen an Wasser zu absorbieren, den Keimling vor dem Austrocknen (Brett & Waldron, 1990; Moreira & Filho, 2008). Außerdem können Galactomannane auch aus Hefen und Pilzen isoliert werden (Srivastava & Kapoor, 2005). Die Anzahl und Verteilung der D-Galactose-Verzweigungen entlang der Mannankette unterscheidet sich in Galactomannanen aus verschiedenen Quellen (Moreira & Filho, 2008). Die Samen des Johannisbrotbaums *Ceratonia siliqua* bestehen zu ca. 48 % aus Galactomannan (Srivastava & Kapoor, 2005). Das Galactomannan aus dem Endosperm von *C. siliqua* wird als Johannisbrotkernmehl bezeichnet (engl. *locust bean gum*, kurz LBG; auch bekannt als *carob bean gum*) und weist ein D-Mannose-zu-D-Galactose-Verhältnis von 4:1 auf (Srivastava & Kapoor, 2005). Die Seitenketten aus je einem einzelnen α -1,6-verknüpften D-Galactose-Rest sind unregelmäßig entlang der Mannanhauptkette verteilt; häufig treten substituierte Zweier- und (weniger häufig) Dreiergruppen auf (McCleary *et al.*, 1985).

Um die Hauptketten von Gluco- und Galactomannanen vollständig abzubauen, werden mehrere verschiedene Enzyme benötigt, die die Hydrolyse der glykosidischen Bindungen katalysieren. Meist extrazellulär lokalisierte *Endo*- β -1,4-Mannanasen greifen zunächst die internen β -1,4-glykosidischen Bindungen an und spalten diese entweder zufällig oder an spezifischen Positionen (Alonso-Sande *et al.*, 2009; Moreira & Filho, 2008). Sie erzeugen vor allem die Disaccharide β -1,4-D-Mannobiose, Cellobiose und 4-O- β -D-Glucopyranosyl-D-Mannopyranose. Die

Abspaltung von terminaler D-Mannose und D-Glucose von (zuvor durch eine Mannanase generierte) β -1,4-verknüpften Manno-Oligosacchariden wird durch die Enzyme *Exo*- β -1,4-Mannosidase bzw. β -1,4-Glucosidase katalysiert (Alonso-Sande *et al.*, 2009). Die Exohydrolasen setzen am nicht reduzierenden Ende Monosaccharide frei (Moreira & Filho, 2008). Um die Seitenketten zu entfernen - und die Hauptkette dadurch einem vollständigen Abbau freizugeben - sind außerdem Acetyl-Mannan-Esterasen (EC 3.1.1.6) und α -Galactosidasen (1,6- α -D-Galactosid-Galactohydrolase, EC 3.2.1.22) nötig (Moreira & Filho, 2008).

2.2.7.2 Postulierter Abbauweg von Glucomannan

B. subtilis sekretiert viele verschiedene Enzyme in die Umgebung, um pflanzliche Kohlenhydrate abzubauen. Durch die extrazelluläre Zerlegung der Polysaccharide in kleinere Einheiten können diese anschließend aufgenommen werden und als Energiequellen dienen (Deutscher *et al.*, 2002).

Die Aktivität der *Endo*- β -1,4-Mannanase GmuG (EC 3.2.1.78) wird benötigt, damit das *gmu*-Operon durch Glucomannan induziert werden kann. In ihrer Abwesenheit kann der *gmuB*-Promotor nur noch durch die vermutlichen Abbauprodukte von Glucomannan, Cellobiose und Mannobiose, induziert werden (Sadaie *et al.*, 2008). GmuG besitzt ein N-terminales Signalpeptid und wurde im extrazellulären Proteom von *B. subtilis* nachgewiesen (Voigt *et al.*, 2009). Das Enzym gehört zur Glykosid-Hydrolase-Familie GH26. Die Klassifizierung der GHs basiert auf Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz und der für sie vorausgesagten Struktur (Henrissat, 1991) und ist in der CAZy (engl. für carbohydrate-active enzymes)-Datenbank (www.cazy.org) hinterlegt. Die Glykosid-Hydrolase-Familien GH5 und GH26 beinhalten Endoglucanasen und β -Mannanasen (Davies & Henrissat, 1995) und hydrolysieren die glykosidische Bindung mit einem „*Retaining*“-Mechanismus, bei dem die Stereochemie des anomeren Zentrums erhalten bleibt.

Um den Mechanismus aufzuklären, durch den bei Polysaccharid-Substraten mit variabler Zuckersequenz die Substratspezifität bestimmt wird, wurden die biochemischen Eigenschaften und die Kristallstruktur der *B. subtilis* Mannanase GmuG untersucht (Tailford *et al.*, 2009). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Enzym die Substrate Glucomannan, Galactomannan und Steinnuss-

Mannan mit einer ähnlichen katalytischen Leistungsfähigkeit umgesetzt. Aus dem Substrat Mannohexaose setzt GmuG als Hauptprodukte Mannotetraose (Man₄) und das Mannodisaccharid (Man₂) sowie in geringeren Mengen ebenfalls Mannotriose (Man₃) frei. Bei der Inkubation von GmuG mit Mannopentaose entstehen hauptsächlich Man₃ und Man₂ und nur in geringen Mengen Man₄ und Mannose. Man₄ wiederum wird vor allem zu Man₂ und in geringen Mengen auch zu Man₃ und Mannose hydrolysiert. GmuG weist nur eine sehr geringe katalytische Effizienz gegenüber Mannotriose auf, welche bis zur Mannohexaose stetig zunimmt. Demnach besitzt das Enzym vermutlich 6 relevante Substratbindestellen. Die β -Mannanasen spalten die glykosidische Bindung ihres Substrats hydrolytisch zwischen den Zuckermolekülen an den Stellen -1 und +1. Auf der Grundlage von Strukturanalysen wurde für die Substratspezifität von GmuG (beginnend mit dem nicht reduzierenden Ende) die Zuckersequenz Mannose-Mannose-Mannose/Glucose-Mannose vorhergesagt, die an den Positionen -2 bis +2 gebunden wird.

Bei der GmuG-katalysierten Hydrolyse von Glucomannan entsteht als Reaktionsprodukt überwiegend Man₂ und nur in sehr geringen Mengen das Disaccharid aus Glucose und Mannose.

Srivastava *et al.* (2017) teilten die *Endo- β -1,4-Mannanasen* basierend auf ihrem Spaltungsmuster in drei verschiedene Gruppen ein. Die erste und die zweite Gruppe setzen aus Galactomannanketten substituierte Oligosaccharide frei, die endständig bzw. intern Galactose-Seitenketten tragen. Die dritte Gruppe bildet – vermutlich aufgrund sterischer Hinderung durch die α -1,6-verknüpfte Galactose – aus dem Heteromannan nur nicht-substituierte Manno-Oligosaccharide.

Die zuckerspezifischen PTS-Permeasen von *B. subtilis* vertreten sechs verschiedene EII-Familien. Das Genom von *B. subtilis* kodiert für sieben PTS-Proteine aus der Lactose-Familie. Zu diesen zählen neben dem YwbA-Protein mit unbekannter Funktion zwei vollständige PTS-Systeme, die vermutlich beide den Transport von β -Oligosacchariden katalysieren und deren EIIABC-Proteindomänen jeweils durch drei einzelne Gene kodiert werden (Reizer *et al.*, 1999). Aufgrund von Aminosäure-Sequenzvergleiche der Proteine, deren zugehörigen Gene innerhalb desselben Operons liegen, mit bereits charakterisierten Proteinen wird angenommen, dass das

Lic-PTS-System (*licBCA*) Oligo- β -Glucoside transportiert, während das Gmu-PTS-System (*gmuBAC*) für die Aufnahme von Oligo- β -Mannosiden verantwortlich ist (Reizer *et al.*, 1999; Sadaie *et al.*, 2008; Tobisch *et al.*, 1997). Bei der extrazellulären Hydrolyse des β -1,3-1,4-Glucans Lichenin durch die *Endo*- β -1,3-1,4-Glucanase LicS (BgIS) entstehen Penta-, Tetra- und Trisaccharide (Schnetz *et al.*, 1996; Tobisch *et al.*, 1997). Diese Abbauprodukte von Lichenin werden durch das zugehörige PTS-System in die Zelle importiert und dort wahrscheinlich durch die vermutete 6-Phospho- β -Glucosidase LicH hydrolysiert (Schnetz *et al.*, 1996; Tobisch *et al.*, 1997). Das Hauptsubstrat des $E1IC^{Lic}$ -Transporters ist unbekannt. Ähnlich zur Verwertung von Glucanen werden die durch GmuG aus den (Hetero-)Mannanketten freigesetzten β -Manno-Oligosaccharide wahrscheinlich über das postulierte Gmu-PTS-System aufgenommen und in der Zelle weiter hydrolysiert (Abbildung 2.4).

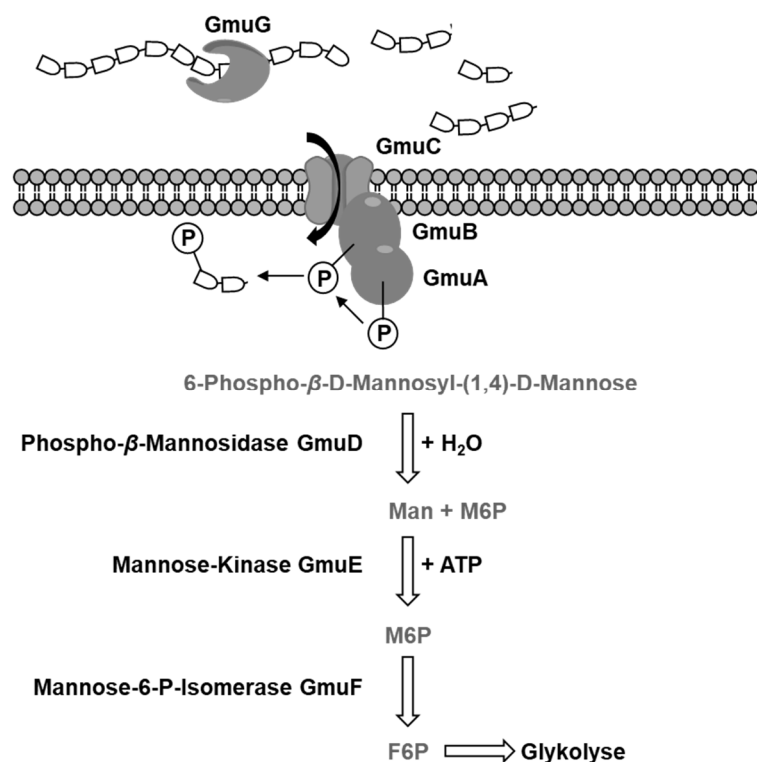


Abbildung 2.4 Postulierter Abbauweg von Glucomannan durch die im *gmu*-Operon kodierten Enzyme. Die extrazelluläre *Endo*- β -1,4-Mannanase GmuG spaltet das Heteropolysaccharid in kleinere β -Manno-Oligosaccharide (Tailford *et al.*, 2009). Anschließend können diese durch das mutmaßliche Oligo- β -Mannosid-spezifische PTS-System (*gmuBAC*) (Reizer *et al.*, 1999), das durch drei einzelne Gene kodiert wird, in die Zelle aufgenommen und verstoffwechselt werden (Man, Mannose; M6P, Mannose-6-Phosphat; F6P, Fructose-6-Phosphat).

An diesem intrazellulären Abbau sind vermutlich drei Enzyme beteiligt, die durch die innerhalb des *gmu*-Operons liegenden Gene *gmuD*, *gmuE* und *gmuF* kodiert werden.

Die angenommene Phospho- β -Mannosidase (bzw. 6-Phospho- β -Glucosidase nach uniprot.org) GmuD wurde aufgrund von Sequenzhomologie als Aryl-Phospho- β -Glucosidase identifiziert, die das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid zu 4-Methylumbelliferon und Glucose hydrolysiert (Setlow *et al.*, 2004). Allerdings wird die *gmuD*-Expression nicht durch die pflanzlichen Aryl- β -D-Glucoside Arbutin und Salicin induziert (Setlow *et al.*, 2004). Vermutlich spaltet GmuD endständige D-Mannose und D-Glucose von den importierten β -Manno-Oligosaccharidketten ab, welche nach dem PTS-Transport sehr wahrscheinlich phosphoryliert vorliegen.

Freie Glucose sowie freie Mannose werden von *B. subtilis* über das zugehörige PTS-System (*ptsG* bzw. *manP*) in die Zelle aufgenommen und gleichzeitig an ihrem C6-Atom phosphoryliert. Intrazellulär erfolgt anschließend die Umwandlung zu Fructose-6-Phosphat durch eine Glucose-6-Phosphat- bzw. Mannose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi* bzw. *manA*) und der weitere Abbau durch die Glykolyse (Fujita, 2009; Sun & Altenbuchner, 2010). Gelangen die Monomere unabhängig von ihren spezifischen PTS-Transportern in die Zelle, wird für ihre Verwertung alternativ eine Hexokinase wie die Glucokinase GlcK (Skarlatos & Dahl, 1998) benötigt. Die Kristallstruktur der annotierten Mannose-Kinase GmuE (von *B. subtilis* MC58) zeigte, dass dieses Enzym als Homodimer vorliegt und Bindedomänen für ADP und D-Fructose besitzt (Nocek *et al.*, 2011). Durch einen *in vitro*-Enzymaktivitätstest wurde die ATP-abhängige Fructokinase-Aktivität zusätzlich bestätigt, jedoch wurde Mannose als weiteres mögliches Substrat nicht untersucht. Da durch die Aktivität der postulierten Phospho- β -Mannosidase GmuD wahrscheinlich freie Mannose in der Zelle entsteht, ist davon auszugehen, dass diese - PTS-unabhängig - durch eine ATP-abhängige Hexokinase phosphoryliert werden muss, um metabolisiert werden zu können.

Das Genprodukt von *gmuF* ist homolog zur Mannose-6-Phosphat-Isomerase ManA, die durch das Mannose-Operon kodiert wird (Reizer *et al.*, 1999). Neben Mannose-6-Phosphat als Substrat katalysiert das *B. subtilis* (ATCC 23857) Enzym GmuF auch die reversible Isomerisierung von unphosphorylierter D-Mannose zu D-Fructose, jedoch mit einer ca. 30-fach höheren Michaelis-Menten-Konstante und einer ca. 6-fach niedrigeren katalytischen Konstante (Yeom *et al.*, 2009).

2.2.7.3 Regulation des *gmu*-Operons

Die Transkription des *gmu*-Operons steht unter der Kontrolle eines Sigma-A-abhängigen Promotors und wird vermutlich durch eine Rho-unabhängige Terminatorsequenz stromabwärts von *gmuG* begrenzt. An 5. Position innerhalb des Operons befindet sich ein Regulatorgen *gmuR*, welches homolog zur GntR-Transkriptionsfaktorfamilie ist (Kunst *et al.*, 1997; Reizer *et al.*, 1999). Die Analyse der Genexpression mittels eines chromosomal integrierten *gmuB-lacZ*-Fusionskonstrukts zeigte, dass das *gmu*-Operon durch Glucomannan und seine vermutlichen Abbauprodukte Mannobiose und Cellobiose induziert werden kann (Sadaie *et al.*, 2008). Eine Zugabe von Hefe-Mannan (ein aus α -1,6-verknüpften D-Mannose-Einheiten bestehendes Homopolymer) oder Carboxymethylcellulose (ein unverzweigtes Homopolymer aus β -1,4-verknüpften D-Glucose-Einheiten) zum Nährmedium hingegen führte zu keiner bzw. nur zu einer sehr schwachen Induktion.

Genetische Analysen zeigten außerdem, dass das *gmuR*-Gen einen Repressor kodiert. Die Genunterbrechung von *gmuR*, führte zu einer konstitutiven Expression des *gmu*-Operons (Sadaie *et al.*, 2008). Durch eine *in vitro*-Transkriptionsanalyse mit dem RNA-Polymerase-Kernenzym und rekonstituiertem Sigma-Faktor SigA wurde die direkte negative Regulation der Genexpression durch das rekombinante GmuR-Protein bestätigt (Yano *et al.*, 2011). Die Operatorsequenz von GmuR wurde für die Ordnung Bacillales vorhergesagt (Leyn *et al.*, 2013; Abbildung 2.5). In *B. subtilis* überdeckt das 18 bp lange, unvollständige Palindrom TAAAAGTATAGACATTTA die –35 Region des *gmuB*-Promotors.



Abbildung 2.5 Für den Transkriptionsfaktor GmuR vorhergesagtes DNA-Bindemotiv innerhalb der Ordnung der Bacillales (Leyn *et al.*, 2013). Die Buchstabengröße entspricht der relativen Häufigkeit der jeweiligen Basen an der entsprechenden Position.

Die GntR-Familie ist mit ca. 270 Mitgliedern eine der größten Proteinfamilien bakterieller Transkriptionsfaktoren (Rigali *et al.*, 2002). Sie trägt den Namen des

Repressors des Gluconat-Operons aus *B. subtilis* (Haydon & Guest, 1991). Transkriptionsregulatoren aus dieser Familie sind an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt, wie z. B. dem Kohlenstoff- und Aminosäure-Stoffwechsel, der Stressantwort und der Antibiotikaresistenz in *B. subtilis* (Leyn *et al.*, 2013). Ihre Mitglieder, bei denen es sich hauptsächlich um Repressoren handelt (Hu *et al.*, 2015), sind modular aufgebaut und besitzen ein N-terminales HTH-DNA-Bindemotiv (Haydon & Guest, 1991). Anhand der Ähnlichkeiten zwischen den heterogenen, globulären C-terminalen Effektor- und/oder Oligomerisierungsdomänen wird die Familie in sieben Unterfamilien (FadR, HutC, MocR, YtrA, AraR, DevA und PlmA) gegliedert (Jain, 2015).

GmuR gehört zur HutC-Unterfamilie, die nach dem „*histidine utilization repressor*“ HutC aus *Pseudomonas putida* benannt wurde. Ihre Mitglieder tragen eine C-terminale „*UbiC transcription regulator-associated*“ (UTRA)-Domäne für die Bindung niedermolekularer Verbindungen (Aravind & Anantharaman, 2003). Diese Effektor-domäne ähnelt in ihrer Faltungsstruktur der katalytischen Domäne der Chorismatlyase UbiC von *E. coli*; das aktive Zentrum ist jedoch durch die Effektorbindestelle ersetzt (Aravind & Anantharaman, 2003; Jain, 2015). Knapp ein Drittel der GntR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren von *B. subtilis* sind Mitglieder dieser Unterfamilie (GmuR, BglR/YydK, FrIR, TreR, GamR/YbgA und YmfC) und sind u. a. an der Verwertung von β -Glucosiden, Fructoselysin, Trehalose und Glucosamin beteiligt.

Zusätzlich zur negativen Regulation durch GmuR unterliegt das Glucomannan-Operon außerdem der Kohlenstoff-Katabolitrepression. Es wird in Anwesenheit der bevorzugten Kohlenstoffquelle Glucose durch einen CcpA-abhängigen Mechanismus stark reprimiert (Sadaie *et al.*, 2008). Stromaufwärts des *gmu*-Operons befindet sich eine Operatorsequenz für CcpA, die den Transkriptionsstartpunkt (TSS) des ersten Gens (*gmuB*) überdeckt (Position -1 bis +13 in Bezug auf den TSS). Eine genomweite Untersuchung von *cre*-Sequenzen in *B. subtilis* offenbarte eine hierarchische Struktur in der Regulation der CcpA-Zielgene (Marciniak *et al.*, 2012). Dabei zeigte sich, dass über die *cre*-Sequenz stromaufwärts von *gmuB* bereits bei einer geringen, künstlich induzierten Expression von CcpA eine Repression des *gmu*-Operons vermittelt werden kann.

Innerhalb des *gmuC*-Gens befindet sich eine weitere *cre*-Sequenz. Ihre Funktionalität wurde *in vivo* über die Transkriptionsblockade eines *spac*-Promotor-*cre-lacZ*-Fusionskonstrukts nachgewiesen, wenngleich diese *cre*-Sequenz eine vergleichsweise geringe repressorische Wirkung ausübte (Miwa *et al.*, 2000).

2.3 Zielsetzung

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Aufklärung der Regulationsmechanismen, die die Expression von Genen für die Verwertung von Zellwand-Polysacchariden in *B. subtilis* steuern.

Von Interesse war die Kontrolle der Gene, die mutmaßlich am Abbau von L-Rhamnose beteiligt sind. Basierend auf der Grundlage von bioinformatischen Untersuchungen wurde angenommen, dass die Gene durch den DeoR-ähnlichen Transkriptionsfaktor RhaR reguliert werden. Daher sollten die DNA-Bindeeigenschaften des Regulatorproteins durch biochemische Methoden charakterisiert und seine Operatorsequenz durch *in vivo* Promotorstudien sowie DNase I-Footprinting-Experimente identifiziert werden.

In einer vorausgegangenen Studie wurde die negative Regulation des *gmu*-Operons, welches der Verwendung des Zellwand-Polysaccharids Glucomannan dient, durch den Transkriptionsfaktor GmuR bereits beschrieben (Sadaie *et al.*, 2008). Im Rahmen der Etablierung eines *in vitro*-Transkriptionssystems wurde außerdem die spezifische Interaktion des rekombinanten Regulatorproteins GmuR mit der *gmuB*-Promotorregion mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* nachgewiesen (Yano *et al.*, 2011). Allerdings wurde die hier durch die weniger sensitive Ethidiumbromid-Färbung dargestellte DNA-Bindung nicht detailliert untersucht. Ebenfalls wurde das *in silico* vorhergesagte DNA-Bindemotiv nicht experimentell validiert. Daher sollten auch hier die DNA-Bindestellen und Bindeeigenschaften von GmuR überprüft und näher charakterisiert werden. Ferner sollten durch genetische Methoden die analoge Verwertung des Heteromannans Galactomannan durch die im *gmu*-Operon kodierten Enzyme bestätigt und der Abbauweg der beiden Heteromannane aufgeklärt werden.

Im Fokus der Untersuchungen lag auch die Aufdeckung des für beide Regulatoren vorher unbekanntes Effektormoleküls, welches die Anwesenheit der entsprechenden Kohlenstoffquelle signalisiert, indem es an den zugehörigen Transkriptionsfaktor (RhaR bzw. GmuR) bindet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die für die Erstellung der vorliegenden Arbeit benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Difco Laboratories Inc. (Detroit, USA), Life Technologies GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen.

Das L(+)-Rhamnose Monohydrat (Artikelnummer 4655.2) und D(+)-Cellobiose (Artikelnummer 5840.1) wurden bei Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) erworben. Mannobiose (O-MBI) und Konjak-Glucomannan (P-GLCML) wurden durch Megazyme u.c. (Bray, Irland) bezogen. Das Galactomannan *Locust Bean Gum* (aus dem Samen von *Ceratonia siliqua*, Artikelnummer G0753) wurde von dem Unternehmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) gekauft.

3.1.2 Geräte

Tabelle 3.1: Verwendete Laborgeräte.

Bezeichnung	Hersteller
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Microcentrifuge 5415D	Eppendorf AG (Hamburg)
SORVALL® RC-5B PLUS Superspeed Centrifuge	DuPont (Wilmington, USA)
Thermocycler TPersonal 48	Biometra GmbH (Göttingen)
Thermomixer Compact	Eppendorf AG (Hamburg)
UV-3100PC Spektralphotometer	VWR International GmbH (Darmstadt)

3.1.3 Enzyme

Tabelle 3.2: Verwendete Enzyme und die Hersteller, von denen diese bezogen wurden.

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (NEB)
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
DNase I (RNase-frei)	New England Biolabs (NEB)
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
Reverse Transkriptase ProtoScript® II	New England Biolabs (NEB)
RNase	Roche Applied Science
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs (NEB)
T4-RNA-Ligase	Thermo Scientific

3.1.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 3.3: Kommerzielle Kits, deren Hersteller und Verwendung.

Kit	Hersteller	Verwendung
DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN (Hilden)	Isolierung chromosomaler DNA (aus <i>Bacillus subtilis</i>)
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG (Jena)	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> Zellen
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)	Extraktion von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen, Reinigung von PCR-Produkten
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN (Hilden)	RNA-Isolierung

3.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.4: Benötigte Puffer und Lösungen für die Minipräparation von Plasmid-DNA nach Lee & Rasheed (1990).

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge
Resuspendierungspuffer	20 % (w/v) Glucose	22,7 ml
	2 M TRIS/HCl pH 8,0	6,25 ml
	0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0	10 ml
	VE-H ₂ O	461 ml
	RNase (10 mg ml ⁻¹)	12,5 ml
Lysepuffer	1 M NaOH	1,68 ml
	10 % (w/v) SDS	0,84 ml
	VE-H ₂ O	5,88 ml
Neutralisierungslösung	NH ₄ -Acetat	578,1 g l ⁻¹

Tabelle 3.5: Puffer für die Strep-Tactin®-Affinitätschromatographie.

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration
Waschpuffer W	1 M TRIS/HCl pH 8,0	100 mM
	NaCl	150–300 mM
Elutionspuffer E	1 M TRIS/HCl pH 8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
	Desthiobiotin	2,5 mM
Puffer R (Regeneration)	1 M TRIS/HCl pH 8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
	HABA	1 mM

Tabelle 3.6: Puffer und Lösungen für die elektrophoretische Trennung mittels SDS-PAGE.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge
Sammelgel (3 %)	VE-H ₂ O	3 ml
	0,5 M TRIS/HCl pH 6,8	1,25 ml
	10 % (w/v) SDS	50 µl
	Rotiphorese® Gel 30*	670 µl
	10 % (w/v) APS	50 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel (15 %)	VE-H ₂ O	4,7 ml
	1,5 M TRIS/HCl pH 8,8	5 ml
	10 % (w/v) SDS	200 µl
	Rotiphorese® Gel 30*	10 ml
	10 % (w/v) APS	100 µl
	TEMED	20 µl
5× SDS-Auftragspuffer	2 M TRIS/HCl pH 6,8	6,25 ml
	Na ₂ -EDTA	0,146 g
	40 % (w/v) SDS	6,25 ml
	β-Mercaptoethanol (reinst)	2,5 ml
	86 % (v/v) Glycerin	29 ml
	Bromphenolblau	0,05 g
	VE-H ₂ O	ad 50 ml
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Brillant-Blau R-250	2,0 g
	Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,5 g
	Ethanol	425 ml
	Methanol	50 ml
	Eisessig	100 ml
	VE-H ₂ O	ad 1,0 l
Entfärbelösung	Ethanol	450 ml
	Eisessig	100 ml
	VE-H ₂ O	450 ml

* 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1

Tabelle 3.7: Zusammensetzung weiterer Puffer und Lösungen.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge
Ammoniumheptamolybdat/ Cer(IV)sulfat-Reagenz (lichtgeschützte Lagerung)	Ce(SO ₄) ₂	0,5 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O	10,5 g
	konz. H ₂ SO ₄	15 ml
	VE-H ₂ O	245 ml
5× Bindungspuffer (EMSA)	1 M TRIS/HCl pH 7,5	50 mM
	KCl	250 mM
	BSA	250 µg ml ⁻¹
	Fischsperma-DNA	250 µg ml ⁻¹
	Glycerin	25 % (v/v)
	Dithiothreitol	10 mM
10× DNA-Auftragspuffer für Agarosegele	Xylencyanol	250 mg
	Bromphenolblau	250 mg
	Glycerin	50 % (v/v)
	0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0	ad 100 ml
Lugolsche Lösung (Stärke-Nachweis)	Iod	0,5 g
	Kaliumiodid	1,0 g
	VE-H ₂ O	ad 100 ml
Lysepuffer (Isolierung chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>)	1 M TRIS pH 8,0	2,5 ml
	0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0	5 ml
	20 % (w/v) Saccharose	50 ml
	0,5 M Glycin	100 µl
	VE-H ₂ O	ad 100 ml
	Lysozym (frisch zugegeben)	20,0 mg ml ⁻¹
Sequenziergel (6 % Polyacrylamid; 7,5 M Harnstoff) Rotiphorese® Sequenzier-Gelsystem (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	Verdünner (50 % Harnstoff)	21 ml
	Gelkonzentrat (5 % Acrylamid/ Bisacrylamid im Verhältnis 19:1 und 50 % Harnstoff)	9 ml
	Pufferkonzentrat (10x TBE in 50 % Harnstoff)	3,75 ml
	H ₂ O _{mp}	3,75 ml
	10 % (w/v) APS	187,5 µl
	TEMED	15 µl

Fortsetzung Tabelle 3.7: Zusammensetzung weiterer Puffer und Lösungen.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge
50× TAE	TRIS	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	Na ₂ -EDTA	18,6 g
	VE-H ₂ O	ad 1 l
10× TBE	TRIS	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M Na ₂ -EDTA (pH 8,0)	40 ml
	VE-H ₂ O	ad 1,0 l
TE 10.01	1 M TRIS/HCl pH 8,0	10 ml
	0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0	2 ml
	H ₂ O _{mp}	ad 1,0 l
Z-Puffer pH 7,0 (Miller Assay) (Lagerung bei 4 °C)	1 M Na ₂ HPO ₄	60 ml
	1 M NaH ₂ PO ₄	40 ml
	2 M KCl	5 ml
	1 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1 ml
	β-Mercaptoethanol	2,7 ml
	VE-H ₂ O	ad 1,0 l

3.1.6 Kulturmedien und Medienzusätze

Je nach Verwendungszweck wurden für die Anzucht und die Stammhaltung von *E. coli* bzw. *B. subtilis* verschiedene Nährmedien eingesetzt (s. Tabelle 3.8). Zur Herstellung von LB-Agar-Nährböden wurde das entsprechende Flüssigmedium vor der Sterilisation im Autoklaven mit 1,5 % (w/v) Euroagar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) versetzt. Die bei Selektivmedien eingesetzten Antibiotikakonzentrationen und sonstige Medienzusätze sind in Tabelle 3.9 bzw. Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Übersicht über verschiedene Kulturmedien für Vermehrung, Stammhaltung und Transformation von *B. subtilis* und *E. coli*. Vor der Verwendung wurden alle Medien 30 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert (* getrennt autoklaviert).

Medium		Zusammensetzung	Menge
Glycerinkulturmedium		86 % (v/v) Glycerin*	57,5 ml
		TY-Medium*	42,5 ml
LB-Medium (pH 7,2)		Trypton	10 g
		Hefeextrakt	5 g
		NaCl	5 g
		VE-H ₂ O	ad 1 l
Spizizens Minimalmedium (SMM) (Spizizen, 1958)		(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
		KH ₂ PO ₄	6 g
		K ₂ HPO ₄	14 g
		Na ₃ Citrat × 2 H ₂ O	1 g
		MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 g
		H ₂ O _{mp}	ad 1 l
Transformationsmedien für <i>B. subtilis</i>	Medium I (MG1)	10× SMM	1×
		20 % (w/v) Glucose*	0,5 % (w/v)
		Casamino Acids*	0,02 % (w/v)
	Medium II (MG2)	10× SMM	1×
		20 % (w/v) Glucose*	0,5 % (w/v)
		Casamino Acids*	0,01 % (w/v)
Transformationsmedium für <i>E. coli</i>: Transformation & Storage Solution (TSS) (Chung <i>et al.</i> , 1989)		LB-Medium (pH 6,5)	82,5 ml
		PEG 6000	10 g
		DMSO	5 ml
		2 M MgCl ₂	2,5 ml
TY-Medium (pH 7,2)		Trypton	5 g
		Hefeextrakt	2,5 g
		VE-H ₂ O	ad 0,5 l

Tabelle 3.9: Eingesetzte Konzentrationen der Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg ml ⁻¹ in 50 % EtOH	100 µg ml ⁻¹
Apramycin	50 mg ml ⁻¹ in H ₂ O _{mp}	50 µg ml ⁻¹
Erythromycin	10 mg ml ⁻¹ in 50 % EtOH	5 µg ml ⁻¹
Kanamycin	50 mg ml ⁻¹ in 0,1 M NaOH	5 µg ml ⁻¹
Spectinomycin	100 mg ml ⁻¹ in H ₂ O _{mp}	100 µg ml ⁻¹

Tabelle 3.10: Eingesetzte Medienzusätze und deren verwendete Konzentration.

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Casamino Acids	1 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,02 % (w/v)
Galactomannan (<i>Locust Bean Gum</i>)	1 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2 % (w/v)
D-Glucitol	20 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2 % (w/v)
Glucomannan (Konjak)	1 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2 % (w/v)
D-Glucose	20 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2-0,5 % (w/v)
K-Glutamat	20 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2 % (w/v)
L-Histidin × HCl × H ₂ O	0,5 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,005 % (w/v)
IPTG	100 mM in 50 % EtOH	250 µM
D-Mannose	20 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2-0,5 % (w/v)
L-Rhamnose	20 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,2 % (w/v)
<i>m</i> -Toluylsäure	1 M in DMSO	2 mM
L-Tryptophan	0,5 % (w/v) in H ₂ O _{mp}	0,005 % (w/v)
X-Gal	80 mg ml ⁻¹ in DMF	80 µg ml ⁻¹

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der Spurenelementlösung (SEL). Zusatz von 15 µl SEL pro 5 ml Kulturmedium.

Zusammensetzung	Menge
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	500 mg
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	16,7 g
0,5 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (pH 8,0)	108 ml
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	180 mg
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	160 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	180 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$	ad 1 l

3.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 3.12: Verwendete *Escherichia coli* Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ F[<i>traD36 proAB⁺ lacⁿ lacZ</i> Δ M15]	Nalidixinsäure	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> NM538	<i>supF hsdR</i>	-	Frischauf <i>et al.</i> , 1983

Tabelle 3.13: Verwendete *Bacillus subtilis* Stämme, die nicht im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden (Resistenzen: Erm, Erythromycin).

Stamm	relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz/Quelle
168	<i>trpC2</i>	-	Burkholder & Giles, 1947
IIG-Bs168-4	<i>trpC⁺ ΔmanPA spo⁻</i>	-	J. Altenbuchner, unveröffentlicht
KM0	<i>trpC⁺</i>	-	Rahmer <i>et al.</i> , 2015
KM574	<i>trpC2 ΔgmuG::loxP</i>	-	pJOE6732.1 \rightarrow BKE05880 K. Morabbi Heravi, unveröffentlicht
KM582	<i>trpC⁺ ΔgmuG::loxP</i>	-	pKAM041 \rightarrow KM574 K. Morabbi Heravi, unveröffentlicht
KM685	<i>trpC⁺ ΔgmuF::loxP-ermC-loxP</i>	Erm	pKAM041 \rightarrow BKE05870 K. Morabbi Heravi, unveröffentlicht
KM692	<i>trpC⁺ ΔgmuF::loxP</i>	-	pJOE6732.1 \rightarrow KM685 K. Morabbi Heravi, unveröffentlicht
KM719	<i>trpC2 ΔgmuR::loxP</i>	-	pJOE6732.1 \rightarrow BKE05850 K. Morabbi Heravi, unveröffentlicht

Stämme aus der Sammlung des *Bacillus Genetic Stock Centers*

(„BKE“ für *Bacillus Knockout Erythromycin*)

BKE05840	<i>trpC2 ΔgmuD::loxP-ermC-loxP</i>	Erm	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE05850	<i>trpC2 ΔgmuR::loxP-ermC-loxP</i>	Erm	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE05860	<i>trpC2 ΔgmuE::loxP-ermC-loxP</i>	Erm	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE05870	<i>trpC2 ΔgmuF::loxP-ermC-loxP</i>	Erm	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE05880	<i>trpC2 ΔgmuG::loxP-ermC-loxP</i>	Erm	Koo <i>et al.</i> , 2017

Tabelle 3.14: *B. subtilis* Stämme, die in dieser Arbeit konstruiert wurden. Die Nummern geben die Nukleotidposition relativ zum Transkriptionsstart an; bei durch ein Rautezeichen gekennzeichneten Ausnahmen relativ zum Startcodon des jeweiligen Gens. Mutationen innerhalb der Promotorregion (*) sind in eckigen Klammern angegeben (Basensubstitutionen, -insertionen bzw. -deletionen).

Stamm	relevanter Genotyp	Konstruktion
SH28	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-347 → +32)- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH22 → IIG-Bs168-4
SH32	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaM</i>	pSTH58 → IIG-Bs168-4
SH35	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaA</i>	pSTH60 → IIG-Bs168-4
SH36	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaB</i>	pSTH61 → IIG-Bs168-4
SH39	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaB</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-347 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH22 → SH36
SH42	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaM</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-347 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH22 → SH32
SH43	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-347 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH22 → SH35
SH44	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaEW</i>	pSTH66.1 → IIG-Bs168-4
SH45	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaR</i>} (-494 → -1) [#] - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH64 → IIG-Bs168-4
SH46	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaEW</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-347 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH22 → SH44
SH48	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>spoVAF</i> ⁻ <i>spolIAA</i> ::P _{<i>rhaEW</i>} - <i>rhaY</i>	pSTH71.1 → IIG-Bs168-4
SH49	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (<i>cre</i> *)(-347 → +32) [ATGAAAACGGATACAA → ATtAAcACGcgTcacA]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH77 → IIG-Bs168-4
SH50	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-35*)(-347 → +32) [-33 → -31 CAA → GAC]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH78 → IIG-Bs168-4
SH54	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-79 → +32)- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH82 → IIG-Bs168-4
SH55	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-55 → +32)- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH83 → IIG-Bs168-4
SH56	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-38 → +32)- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH84 → IIG-Bs168-4
SH60	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i>	pSTH85 → IIG-Bs168-4
SH61	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-347 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH22 → SH60
SH62	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-79 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH82 → SH60
SH63	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-55 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH83 → SH60
SH64	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter</i> -P _{<i>rhaEW</i>} (-38 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH84 → SH60

Fortsetzung Tabelle 3.14

Stamm	relevanter Genotyp	Konstruktion
SH65	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-60 → +32)- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH87 → IIG-Bs168-4
SH66	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-26 → -22 AAACA → TTTGT]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH88 → IIG-Bs168-4
SH67	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW(-35)} (-347 → +32) [-33 → -31 CAA → GAC]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH78 → SH60
SH68	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>rhaR</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-60 → +32) - <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH87 → SH60
SH70	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-33 → -28 CAAAAA → GTTTTT]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH98 → IIG-Bs168-4
SH71	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-68 → -63 TTTTTG → AAAAAC]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH101 → IIG-Bs168-4
SH72	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-47 → -43 AAACA → TTTGT]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH104 → IIG-Bs168-4
SH73	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-54 → -49 CAAAAA → GTTTTT]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH106 → IIG-Bs168-4
SH74	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-60 → -55 AAAAAG → TTTTTC]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH107 → IIG-Bs168-4
SH75	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [+5 → +10 ACAAAT → TGTTTA]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH108 → IIG-Bs168-4
SH76	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-41 → -36 AAACGA → TTTGCT]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH109 → IIG-Bs168-4
SH77	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-21 → -16 CAAATC → GTTTAG]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH99 → IIG-Bs168-4
SH78	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [-6 → -2 GAAAA → CTTTT]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH103 → IIG-Bs168-4
SH88	<i>spo</i> ⁻ Δ <i>manPA</i> Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{rhaEW} (-347 → +32) [+12 → +17 AAAGGG → TTTCCC]- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH100 → IIG-Bs168-4
SH90	Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{gmuB} (-467 → +31)- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH111 → KM0
SH91	Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{gmuC} (-501 → -1)#- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH112 → KM0
SH92	Δ <i>amyE</i> :: <i>ter-P</i> _{gmuR} (-402 → -1)#- <i>lacZ</i> - <i>spc</i>	pSTH113 → KM0
SH93	Δ <i>gmuD</i> :: <i>loxP</i> - <i>ermC</i> - <i>loxP</i>	chrom. DNA BKE05840 → KM0

Fortsetzung Tabelle 3.14

Stamm	relevanter Genotyp	Konstruktion
SH94	$\Delta gmue::loxP-ermC-loxP$	chrom. DNA BKE05860 → KM0
SH95	$trpC^+ \Delta gmur::loxP$	pKAM041 → KM719
SH96	$\Delta gmuD::loxP$	pJOE6732.1 → SH93
SH97	$\Delta gmue::loxP$	pJOE6732.1 → SH94
SH98	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH111 → SH95
SH99	$\Delta gmug::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH111 → KM582
SH100	$\Delta gmuf::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH111 → KM692
SH101	$\Delta gmuD::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH111 → SH96
SH102	$\Delta gmue::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH111 → SH97
SH105	$hisI' spc$	pHM30 → KM0
SH107	$hisI-P_{manP}-lacZ$	pMW678.6 → SH105
SH111	$\Delta gmue::loxP hisI' spc$	pHM30 → SH97
SH112	$\Delta gmue::loxP hisI-P_{manP}-lacZ$	pMW678.6 → SH111
SH114	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-43 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH121 → KM0
SH115	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-45 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH122 → KM0
SH116	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-56 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH124 → KM0
SH117	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-59 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH126 → KM0
SH118	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-51 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH123 → KM0
SH119	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-57 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH125 → KM0
SH121	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-43 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH121 → SH95
SH122	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-45 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH122 → SH95
SH123	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-51 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH123 → SH95
SH124	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-56 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH124 → SH95
SH125	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-57 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH125 → SH95
SH126	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-59 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH126 → SH95
SH131	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-35 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH129 → KM0
SH132	$\Delta gmur::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmub}(-35 \rightarrow +31)-lacZ-spc$	pSTH129 → SH95
SH134	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +30)$ [-17 → -14 TGAC → ACTG]-lacZ-spc	pSTH142 → KM0
SH135	$\Delta amyE::ter-P_{gmub}(-467 \rightarrow +30)$ [-7 + -5 AAT → TAA]-lacZ-spc	pSTH144 → KM0

Fortsetzung Tabelle 3.14

Stamm	relevanter Genotyp	Konstruktion
SH136	$\Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-467 \rightarrow +30)-lacZ-spc$	pSTH146 \rightarrow KM0
SH137	$\Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-467 \rightarrow +30)$ [-4 \rightarrow -2 CAA \rightarrow GTT]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH150 \rightarrow KM0
SH138	$\Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-467 \rightarrow +30)$ [-29 \rightarrow -26 TTTA \rightarrow AAAT]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH151 \rightarrow KM0
SH139	$\Delta gmuR::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-35^*)(-467 \rightarrow +30)$ [-35 T \rightarrow G]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH143 \rightarrow SH95
SH140	$\Delta gmuR::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-467 \rightarrow +30)-lacZ-spc$	pSTH146 \rightarrow SH95
SH141	$\Delta gmuR::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-35^*)(-467 \rightarrow +30)$ [-18 A \rightarrow AT]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH147 \rightarrow SH95
SH142	$\Delta gmuR::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-35^*)(-467 \rightarrow +30)$ [-17 T \rightarrow -] - <i>lacZ-spc</i>	pSTH148 \rightarrow SH95
SH143	$\Delta gmuR::loxP \Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-35^*)(-467 \rightarrow +30)$ [-34 A \rightarrow T]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH152 \rightarrow SH95
SH144	$\Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-467 \rightarrow +30)$ [-24 \rightarrow -23 AA \rightarrow TT]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH149 \rightarrow KM0
SH145	$\Delta amyE::ter-P_{gmuB}(-467 \rightarrow +30)$ [-19 \rightarrow -18 AA \rightarrow TT]- <i>lacZ-spc</i>	pSTH153 \rightarrow KM0

3.1.8 Oligonukleotide

Die für diese Arbeit benötigten Oligonukleotide (Tabelle 3.15 und Tabelle 3.16) wurden bei Eurofins Genomics (Ebersberg) bestellt und in H_2O_{mp} in einer Konzentration von $100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ gelöst. Oligonukleotide, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, wurden lichtgeschützt aufbewahrt, um Photobleichung zu vermeiden.

Tabelle 3.15 Verwendete Primer. Erläuterung: BS, Basensubstitution; FWD, *forward* (Vorwärts-Primer); REV, *reverse* (Rückwärts-Primer); ÜL, Überlappung mit dem 3'-Sequenzende des linearisierten Vektors nach dessen Verdau mit dem angegebenen Restriktionsenzym (Klonierung mittels *Gibson Assembly*, überlappende Sequenz ist unterstrichen). Zum Matrizenstrang komplementäre Nukleotide sind in Großbuchstaben geschrieben.

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	DNA-Fragment/ Verwendung
s7406	aaaaaaggatccGAATAATCTGCGTAATAGACTTTC	FWD	Kolonie-PCR (Anlagerung an <i>amyE'</i>)
s9242	aaaaaacatagtTGATATTCCTCCATACCCTT	REV	<i>P_{rhaEW}</i>
s9243	aaaaaagctagCCGGCGAATTGCAAACTTG	FWD	<i>P_{rhaEW}</i>
s9306	aaaaaacatATGCTAGTAGCAGAACGGCAG	FWD	<i>rhaR</i> (ohne Stopcodon)
s9307	aaaaaaggatccCCCTCTCTTCGAAAGAGG	REV	<i>rhaR</i> (ohne Stopcodon)
s9363	ATGACCATGATTACGGATTC	FWD	<i>lacZ'</i>
s9462	aaaaaaggatccGAAGGCGCACAGAAAATTG	FWD	<i>'rhaEW</i>
s9526	aaaaaaggatccCGCCAGCCATCATTAC	REV	<i>rhaB'</i>
s9528	aaaaaagtgcacCTGCCGTTCTGCTACTAG	REV	<i>'rhaEW</i>
s9589	5'P-GGGCCTCTTCGCTATTAC	REV	<i>lacZ-R1</i> (ARF-TSS)
s9694	aaaaaaggatccGCACTGTCCGCAGATTTAC	REV	<i>'iolU 'rhaA</i>
s9695	aaaaaagtgcacGCCCTGATGGAGGAATTC	FWD	<i>'iolU 'rhaA</i>
s9696	aaaaaagtgcacTGGACCTGTACACCAATTC	REV	<i>'tlpB rhaEW'</i>
s9697	aaaaaaggatccACGGCATTGCTGATCAAAC	FWD	<i>'tlpB rhaEW'</i>
s9747	aaaaaagtgcacGGGCACTTGCTCTAATTG	REV	<i>'rhaB-rhaM-rhaA'</i>
s9748	aaaaaaggatccCGGAGCCCGGAATGATTTTC	FWD	<i>'rhaB-rhaM-rhaA'</i>
s9749	aaaaaaggatccGGCAGTATAAATCATCCTTTC	REV	<i>rhaR</i>
s9750	aaaaaagtgcacCCGATGCTAGTAGCAGAAC	FWD	<i>rhaR</i>
s9751	aaaaaaggatccGCTTGCTCTCGATTGAATC	REV	<i>rhaA'</i>
s9752	aaaaaagtgcacTCGGATTTTCAGTCCTGTTG	FWD	<i>rhaA'</i>
s9753	aaaaaagtgcacCCGCTGTTTGTATTCTTCGTA	REV	<i>'rhaB</i>
s9754	aaaaaaggatccCGGAACATGGTCGTTAATC	FWD	<i>'rhaB</i>
s9776	<u>TTTTGCTTCCGTCAGCGCTGGATGCGGCGTGC</u>	REV	<i>lacZ'</i> (ÜL pKAM243 <i>Afel</i>)
s9937	aaaaaagtgcacATCAGCTGGAGGAACATTAC	FWD	<i>'rhaEW rhaR'</i>
s9938	aaaaaaggatccCCTGCCACTCATTGGAATC	REV	<i>'rhaEW rhaR'</i>

Fortsetzung Tabelle 3.15

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	DNA-Fragment/ Verwendung
s9939	<u>ccggcgcccacgtgg</u> GCCCGTGAAGCGTTTAAAC	FWD	<i>P_{rhaR}</i> (ÜL pKAM243 <i>NheI</i>)
s9940	<u>gaatccgtaatcatggt</u> CATCGGTAACGCCCTTCCTCA	REV	<i>P_{rhaR}</i> (ÜL <i>lacZ</i> - s9363/s9776)
s9994	CGTGCAGTTCAGGAATGT	FWD	Nachweis Δ <i>gmuA</i>
s9995	CGGCAAATTCGTTAACAC	REV	Nachweis Δ <i>gmuA</i>
s10002	aaaaaagagcTCCGGCGAATTGCAAACCTTG	FWD	<i>P_{rhaEW}</i>
s10004	aaaaaacatATGAGCAAGCAAAGATTTGC	FWD	<i>rhaY</i> (<i>Oceanobacillus</i> <i>ihayensis</i>)
s10029	aaaaaagagctcCACCTTCCTTGAATCAATAG	REV	<i>rhaY</i> (<i>O. ihayensis</i>)
s10087	aaaaaacaTATGACCTTTCGCAATTGTG	FWD	<i>rhaB</i> ohne Stopcodon (<i>E. coli</i> K12)
s10088	aaaaaaggatccTGCGCAAAGCTCCTTTGTC	REV	<i>rhaB</i> ohne Stopcodon (<i>E. coli</i> K12)
s10090	aaaaaagctaGCTGCTTCTTTTTTTGTTAAAAG	FWD	5'-Verkürzung <i>P_{rhaEW}</i> (Δ bis -80)
s10091	aaaaaagctagcGCAAAAATAAACAAAACGATTC	FWD	5'-Verkürzung <i>P_{rhaEW}</i> (Δ bis -56)
s10092	aaaaaagctagcCGATTCAAAACAAAACAGAAATC	FWD	5'-Verkürzung <i>P_{rhaEW}</i> (Δ bis -39)
s10093	cgtcacAATAAAAGGGTATGGAGGAATATC	FWD	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (<i>cre</i> -Sequenz)
s10094	cgtgtaATTATATATGATTTCTGTTTGTGTTTTG	REV	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (<i>cre</i> -Sequenz)
s10095	AAAAACGATTgacAAACAAACAGAAATCATATATA ATG	FWD	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (-33 & -31)
s10096	GTTTATTTTTGCTTTTTTAACAAAAAAG	REV	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (-33 & -31)
s10285	<u>gaattcgagctcgggtac</u> GGCGTTACCCAACCTTAATC	FWD	<i>lacZ</i> -F3 (ARF-TSS) (ÜL pUC18 <i>KpnI</i>)
s10286	<u>cttgcatgcctgcagg</u> GGCCAGTGAATCCGTAATC	REV	<i>lacZ</i> -R2 (ARF-TSS) (ÜL pUC18 <i>SaI</i>)
s10396	GAGCGGATCAGGACGAAT	FWD	Nachweis Δ <i>gmuG</i>
s10397	AGTGCTTCCTGAAATACCAA	REV	Nachweis Δ <i>gmuG</i>

Fortsetzung Tabelle 3.15

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	DNA-Fragment/ Verwendung
s10454	aaaaaagtcgacCCGGCATCGGTAAAAGCT	FWD	<i>rhaB'</i>
s10691	aaaaaagctagcAAAAAGCAAAAATAAACAAAAACG	FWD	5'-Verkürzung P_{rhaEW} (Δ bis -61)
s10692	ATTCAAAAACtttgtGAAATCATATATAATGAAAACG GATAC	FWD	BS in P_{rhaEW} (-26 → -22)
s10693	CGTTTTTGTTTATTTTTGCTTTTAAAC	REV	BS in P_{rhaEW} (-26 → -22)
s10919	CTGCTTTCTTaaaaacTAAAAAGCAAAAATAAAC AAAAACG	FWD	BS in P_{rhaEW} (-68 → -63)
s10920	CAGATATGCCGCTTTCTC	REV	BS in P_{rhaEW} (-68 → -63)
s10921	TTTTTTTGTTttttcCAAAAATAAACAAAAACGATTC AAAAAC	FWD	BS in P_{rhaEW} (-60 → -55)
s10922	GAAAGCAGCAGATATGCC	REV	BS in P_{rhaEW} (-60 → -55)
s10923	TGTTAAAAAGgttttTAAACAAAAACGATTCAAAAA CAAAC	FWD	BS in P_{rhaEW} (-54 → -49)
s10924	AAAAAAGAAAGCAGCAGATATG	REV	BS in P_{rhaEW} (-54 → -49)
s10925	AAGCAAAAATtttgtAAAACGATTCAAAAACAAACA G	FWD	BS in P_{rhaEW} (-47 → -43)
s10926	TTTAACAAAAAAGAAAGCAGC	REV	BS in P_{rhaEW} (-47 → -43)
s10929	AAAAACGATTgttttCAAACAGAAATCATATATAAT GAAAAC	FWD	BS in P_{rhaEW} (-33 → -28)
s10930	GTTTATTTTTGCTTTTAAACAAAAAAG	REV	BS in P_{rhaEW} (-33 → -28)
s10931	AAAACAAACacttagATATATAATGAAAACGGATA CAAATAAAAG	FWD	BS in P_{rhaEW} (-21 → -16)
s10932	TGAATCGTTTTTGTTTATTTTTGC	REV	BS in P_{rhaEW} (-21 → -16)
s10933	CATATATAATcttttCGGATACAAATAAAAGGGTAT G	FWD	BS in P_{rhaEW} (-6 → -2)

Fortsetzung Tabelle 3.15

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	DNA-Fragment/ Verwendung
s10934	ATTTCTGTTTGTGTTTTGAATCG	REV	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (-6 → -2)
s10935	GATACAAATAttcccTATGGAGGAATATCACATAT GGTGC	FWD	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (+12 → +17)
s10936	CGTTTTCATTATATATGATTTCTGTTTG	REV	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (+12 → +17)
s10937	GAAAACGGATtgtttaAAAAGGGTATGGAGGAATAT CACATATG	FWD	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (+5 → +10)
s10938	ATTATATATGATTTCTGTTTGTGTTTTG	REV	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (+5 → +10)
s10976	AAATAAACAAAttgctTTCAAAAACAAACAGAAATCA TATATAATGAAAACG	FWD	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (-41 → -36)
s10977	TTGCTTTTTAACAAAAAAGAAAGC	REV	BS in <i>P_{rhaEW}</i> (-41 → -36)
s11005	TACCTCCACGTTTAGGCAGT	FWD	Nachweis Δ <i>gmuF</i>
s11006	TGTCTGCTGGGCATTAGG	REV	Nachweis Δ <i>gmuF</i>
s11018	<u>tcgtttttggatccggcgcccacgtggctagc</u> GGGATGAACAA GGCATCATTC	FWD	<i>P_{gmuR}</i> (ÜL KAM243 <i>NheI</i>)
s11020	<u>tcgtttttggatccggcgcccacgtggctagc</u> CGGCCAGATA CTGCATATC	FWD	<i>P_{gmuB}</i> (ÜL KAM243 <i>NheI</i>)
s11021	<u>cggccagtgaatccgtaatcatggtcat</u> CTGCTATCCCCCT GTTATATAAAC	REV	<i>P_{gmuB}</i> (ÜL KAM243 <i>NdeI</i>)
s11022	<u>tcgtttttggatccggcgcccacgtggctagc</u> CGGTCCGCAA TGAGCTT	FWD	<i>P_{gmuC}</i> (ÜL KAM243 <i>NheI</i>)
s11023	<u>cggccagtgaatccgtaatcatggtcat</u> CCTATCCACCCCGA TTTTTATATATTC	REV	<i>P_{gmuC}</i> (ÜL KAM243 <i>NdeI</i>)
s11037	AATGCCTATAAAAACCGATA	FWD	Nachweis Δ <i>gmuR</i>
s11038	TCATCCGGCATCTTTGTG	REV	Nachweis Δ <i>gmuR</i>
s11051	<u>cggccagtgaatccgtaatcatg</u> TCATTGGTATCCTCCG GCAG	REV	<i>P_{gmuR}</i> (ÜL KAM243 <i>NdeI</i>)
s11052	aaaaacatATGAATAAATACGAAATCATTGC	FWD	<i>gmuR</i> (ohne Stopcodon)

Fortsetzung Tabelle 3.15

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	DNA-Fragment/ Verwendung
s11053	aaaaaggatccGCGCCGTATGTTTACAGAAG	REV	<i>gmuR</i> (ohne Stopcodon)
s11054	<u>aacaataataatggagtcatga</u> ACATATGAATAAATACGA AATCATTGCAAATGAAATG	FWD	<i>gmuR</i> (ÜL pSTH63 <i>NdeI</i>)
s11055	<u>tagagaataggaacttcgaa</u> CTGCAGCCCGGGTACTT	REV	<i>gmuR</i> (ÜL pSTH63 <i>PstI</i>)
s11058	GGCGTGATGCAGCTTATC	FWD	Nachweis Δ <i>gmuD</i>
s11059	CCGGCAGCTGTTTGATATC	REV	Nachweis Δ <i>gmuD</i>
s11060	CGGAACGCATCGGAAAATC	FWD	Nachweis Δ <i>gmuE</i>
s11061	CCCTCCCCATAGTCTTTC	REV	Nachweis Δ <i>gmuE</i>
s11369	tggatccggcgcccacgtggctagcTATATTTATTTTATAAA AGTATAG	FWD	5'-Verkürzung P_{gmuB} (Δ bis -57)
s11370	tggatccggcgcccacgtggctagcTTATTTTATAAAAGTAT AGAC	FWD	5'-Verkürzung P_{gmuB} (Δ bis -52)
s11372	tggatccggcgcccacgtggctagcGATTATATTTATTTTAT AAAAG	FWD	5'-Verkürzung P_{gmuB} (Δ bis -60)
s11373	tggatccggcgcccacgtggctagcTTATATTTATTTTATAA AAG	FWD	5'-Verkürzung P_{gmuB} (Δ bis -58)
s11374	tggatccggcgcccacgtggctagcTATAAAAGTATAGACA TTTAAAAT	FWD	5'-Verkürzung P_{gmuB} (Δ bis -46)
s11375	tggatccggcgcccacgtggctagcTAAAAGTATAGACATT TAAAATTA	FWD	5'-Verkürzung P_{gmuB} (Δ bis -44)
s11376	ggtgttttgctccgtcagcGCTGGATGCGGCGTGCGG	REV	5'-Verkürzung P_{gmuB}
s11515	AGTATAGACAaaatAAATTAATGACTATAATAAAT CAATG	FWD	BS in P_{gmuB} (-29 → -26)
s11516	TTTATAAAATAAATATAATCATATTTTTTTCC	REV	BS in P_{gmuB} (-29 → -26)
s11517	AGACATTTAAAtTTAAATGACTATAATAAATCAATGT AAG	FWD	BS in P_{gmuB} (-24 → -23)
s11518	ATACTTTTATAAAATAAATATAATCATATTTTTTTCC	REV	BS in P_{gmuB} (-24 → -23)
s11519	TTTAAAATTAAtTGACTATAATAAATCAATGTAAGCG	FWD	BS in P_{gmuB} (-19 → -18)
s11520	TGTCTATACTTTTATAAAATAAATATAATC	REV	BS in P_{gmuB} (-19 → -18)
s11521	TAAAATTTAAactgTATAATAAATCAATGTAAGCGTT TTAATAAC	FWD	BS in P_{gmuB} (-17 → -14)

Fortsetzung Tabelle 3.15

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	DNA-Fragment/ Verwendung
s11522	AATGCTATACTTTTATAAAATAAATATAATC	REV	BS in P _{gmuB} (-17 → -14)
s11523	TGACTATAATtAaCAATGTAAGCGTTTTAATAAC	FWD	BS in P _{gmuB} (-7 + -5)
s11524	TTTAATTTTAAATGTCTATACTTTTATAAAATAAAT ATAATC	REV	BS in P _{gmuB} (-7 + -5)
s11525	CTATAATAATgttTGTAAGCGTTTTAATAACAGGG	FWD	BS in P _{gmuB} (-4 → -2)
s11526	TCATTTAATTTTAAATGTCTATACTTTTATAAAAT AAATATAATC	REV	BS in P _{gmuB} (-4 → -2)
s11527	ATAAAAGTATtGACATTTAAAATTAATGAC	FWD	BS in P _{gmuB} (A-34T)
s11528	AAAATAAATATAATCATATTTTTTTCCG	REV	BS in P _{gmuB} (A-34T)
s11529	TATAAAAGTAgAGACATTTAAAATTAATGAC	FWD	BS in P _{gmuB} (T-35G)
s11530	AAATAAATATAATCATATTTTTTTCCG	REV	BS in P _{gmuB} (T-35G)
s11531	aaaaaagctagcTAGACATTTAAAATTAATGACTA	FWD	5'-Verkürzung P _{gmuB} (Δ bis -36)
s11537	tGACTATAATAATCAATGTAAGCG	FWD	P _{gmuB} Insertion 1 bp (-18 A → AT)
s11538	ATTTAATTTTAAATGTCTATACTTTTATAAAATAA ATATAATC	REV	P _{gmuB} Insertion 1 bp (-18 A → AT)
s11539	GACTATAATAATCAATGTAAGCG	FWD	P _{gmuB} Deletion 1 bp (-17 T → -)
s11540	TTTAATTTTAAATGTCTATACTTTTATAAAATAAAT ATAATC	REV	P _{gmuB} Deletion 1 bp (-17 T → -)
s11549	aaaaaacataTGCTATCCCCCCTGTTATTA	REV	P _{gmuB}

Tabelle 3.16 Oligonukleotide zur Erzeugung von DNA-Fragmenten für den *Mobility Shift Assay* (EMSA) bzw. den *DNase I-Footprinting-Assay*. Längere DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert; kurze Fragmente wurden durch die Hybridisierung von zueinander komplementären Oligonukleotiden (*) erzeugt. Erläuterung: BS, Bindestelle; FWD, *forward* (Vorwärts-Primer); REV, *reverse* (Rückwärts-Primer). Zum Matrizenstrang nicht komplementäre Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Fluoreszenzfarbstoffe: Cyanin-Farbstoff Cy5; FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

Name	Sequenz (5' → 3')	Richtung	Anlagerung an
s5959	5'-Cy5-GCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s5960	5'-Cy5-CCAGTCACGACGTTGTA AAC	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s9943	CATGGCGGAAGAACTTCAG	FWD	<i>P_{rhaEW}</i>
s10089	CCAGTCACGACGTTGTA AAC	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s10180	5'-FITC-CCAGTCACGACGTTGTA AAC	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s10284*	5'-FITC-tttttCAAAAATAAACAAAAACGAaaatt	FWD	vermutete RhaR-BS
s10317*	5'-FITC-aatttTCGTTTTTGTATTATTTTTGaaaa	REV	vermutete RhaR-BS
s10318	5'-FITC-CATGGCGGAAGAACTTCAG	FWD	<i>P_{rhaEW}</i>
s10602	5'-FITC-GCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s10620	5'-Cy5-CGGGCCTCTTCGCTATTAC	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s10663*	5'-FITC-AAAAAGCAAAAATAAACAAA AACGATTCAAAAACAACAGAAATCAT	FWD	vermutete RhaR-BS
s10664*	5'-FITC-ATGATTTCTGTTTGT TTTTGAAT CGTTTTTGT TTTATTTTTGCTTTTT	REV	vermutete RhaR-BS
s10665*	5'-FITC-ACCATATTTGATATTCCTCCAT ACCCTTTTATTTGTATCCGTTTTCA	REV	vermutete RhaR-BS
s10666*	5'-FITC-TGAAAACGGATACAAATAAAAGG GTATGGAGGAATATCAAATATGGT	FWD	vermutete RhaR-BS
s10667*	5'-FITC-TTTATTTGTATCCGTTTTTCATT ATATATGATTTCTGTTTGT TTTTGA	REV	vermutete RhaR-BS
s10668*	5'-FITC-TCAAAAACAACAGAAATCAT ATATAATGAAAACGGATACAAATAAA	FWD	vermutete RhaR-BS
s10669	5'-FITC-CGGGCCTCTTCGCTATTAC	REV	<i>lacZ</i> (universell)
s10729	5'-CY5-CAGCAGGCATTCAGGATATC	FWD	<i>P_{rhaEW}</i>
s11115	5'-FITC-CCGTTGATGAGTGTACCAC	FWD	<i>P_{gmuB}</i>
s11116	CCGTTGATGAGTGTACCAC	FWD	<i>P_{gmuB}</i>
s11298	5'-Cy5-CCTGATTACAAAAAATGTC	FWD	<i>P_{gmuB}</i>
s11299	CCTGATTACAAAAAATGTC	FWD	<i>P_{gmuB}</i>

3.1.9 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren, die bereits zur Verfügung standen, sind in Tabelle 3.17 aufgelistet. Die Konstruktion der neu erzeugten Vektoren ist in Tabelle 3.18 und Tabelle 3.19 (Integrationsvektoren) dargestellt. Wichtige Plasmidkarten befinden sich im Anhang (s. Kapitel 7.2).

Tabelle 3.17: In dieser Arbeit verwendete Vektoren. Resistenzgene: *aac(3)IV*, Apramycin; *bla*, Ampicillin; *erm*, Erythromycin; *spc*, Spectinomycin.

Name	Anwendung/ relevanter Genotyp	Referenz/Quelle
pHM30	<i>B. subtilis</i> -Integrationsvektor ' <i>hisF hisI</i> ' <i>spc</i> ' <i>yvcA yvcB</i> ' <i>bla</i>	Motejadded & Altenbuchner, 2007
pJOE4786.1	Sequenzierungsvektor <i>lacPOZ</i> ' <i>bla ori</i> _{pUC18}	Jeske & Altenbuchner, 2010
pJOE6089.4	<i>E. coli</i> -Expressionsplasmid <i>ori</i> _{pBR322} <i>rop cer rhaP_{BAD}-eGFP-strep rrnB bla</i>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2012
pJOE6732.1	<i>B. subtilis</i> -Expressionsplasmid (instabil) <i>ori</i> _{pAMβ1} <i>repDE P_{xyI}-creP1 spc ori</i> _{pUC18} <i>bla</i>	J. Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE6743.1	Klonierungs- und <i>B. subtilis</i> Integrationsvektor <i>P_{manP}-manP ter spc ter lacPOZ</i> ' <i>ori</i> _{pUC18} <i>bla</i>	Wenzel & Altenbuchner, 2015
pJOE6982.1	<i>P_{manP}-manP ter spc ter</i> ' <i>spoVAF</i> ' <i>dacF ori</i> _{pUC18} <i>bla</i>	J. Altenbuchner, unveröffentlicht
pKAM041	<i>B. subtilis</i> -Integrationsvektor <i>bla ori</i> _{pUC18} <i>ter-trpD-trpC-trpF</i> '- <i>ter</i>	Rahmer <i>et al.</i> , 2015
pKAM243	<i>B. subtilis</i> -Integrationsvektor <i>amyE</i> '- <i>ter-P_{mtIA}-lacZ-spc</i> '- <i>amyE erm ori</i> _{pBR322} <i>bla</i>	K. Morabbi Heravi, unveröffentlicht
pMW678.6	<i>B. subtilis</i> -Integrationsvektor <i>yvcB</i> '- <i>yvcA-ter-P_{manP}-lacZ-ter-hisI</i> '- <i>hisF bla</i>	Wenzel & Altenbuchner, 2013
pNG418.3	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor <i>xyIS Pm-lacZ oriT aac(3)IV rep</i>	Graf & Altenbuchner, 2013
pSUN390.1	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor <i>rhaP_{BAD}-manR-His₆ rrnB bla rop</i>	Sun, 2010
pUC18	Sequenzierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

Tabelle 3.18: In dieser Arbeit generierte Plasmide. In runden Klammern sind die Restriktionsenzyme, mit denen der Ausgangsvektor und das Insert vor der Ligation verdaut wurden, angegeben (AP, zusätzliche Behandlung mit alkalischer Phosphatase). Wurde das Insert durch eine PCR erzeugt, so sind die verwendeten Primerpaare (s..../s....) sowie in eckigen Klammern die Template-DNA aufgeführt. Ist kein Template angegeben, so wurde chromosomale DNA aus *B. subtilis* 168 eingesetzt. Promotorsequenz von Gen x (P_x): Positionsangaben beziehen sich auf den Startpunkt der Transkription. Wurden in die ursprüngliche Promotorsequenz Mutationen (*) eingebracht (Basensubstitutionen, -insertionen bzw. -deletionen), so sind diese in eckigen Klammern genauer beschrieben.

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	relevanter Genotyp / DNA-Fragment
pSTH16	s9242/s9243 (<i>NheI/NdeI</i>)	pJOE4786.1 (<i>NheI/NdeI</i>)	<i>rhaEW</i> -Promotor (P_{rhaEW}) (-347 → +32)
pSTH25	s9306/s9307 (<i>NdeI/BamHI</i>)	pUC18 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>rhaR</i> (ohne Stopcodon)
pSTH38	pSTH25 (<i>NdeI/BamHI</i>)	pSUN390.1 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>rhaP_{BAD}-rhaR-His₆</i>
pSTH53	s9748/s9747 (<i>BamHI/SalI</i>) + s9695/s9694 (<i>SalI/BamHI</i>)	pUC18 (<i>BamHI</i> , AP)	' <i>rhaB-rhaM-rhaA</i> ' ' <i>rhaA</i> '- <i>ioIU</i> ($\Delta rhaA$)
pSTH54	s9750/s9749 (<i>SalI/BamHI</i>) + s9748/s9747 (<i>BamHI/SalI</i>)	pUC18 (<i>SalI</i> , AP)	<i>rhaR-rhaB</i> ' ' <i>rhaB-rhaM-rhaA</i> ' ($\Delta rhaB$)
pSTH55	s9754/s9753 (<i>BamHI/SalI</i>) + s9752/s9751 (<i>SalI/BamHI</i>)	pUC18 (<i>BamHI</i> , AP)	' <i>rhaB-rhaM</i> ' ' <i>rhaM-rhaA</i> ' ($\Delta rhaM$)
pSTH58	pSTH55 (<i>BamHI</i>)	pJOE6743.1 (<i>BamHI</i>)	$\Delta rhaM$
pSTH59	pSTH38 (<i>NdeI/BamHI</i>)	pJOE6089.4 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>rhaP_{BAD}-rhaR-strep</i>
pSTH60	pSTH53 (<i>BamHI</i>)	pJOE6743.1 (<i>BamHI</i>)	$\Delta rhaA$
pSTH61	pSTH54 (<i>SalI</i>)	pJOE6743.1 (<i>XhoI</i>)	$\Delta rhaB$
pSTH63	pSTH59 (<i>NdeI/PstI</i>)	pNG418.3 (<i>NdeI/PstI</i>)	Pm- <i>rhaR-strep</i>
pSTH65	s9697/s9696 (<i>BamHI/SalI</i>) + s9937/s9938 (<i>SalI/BamHI</i>)	pUC18 (<i>BamHI</i> , AP)	' <i>tIpB-rhaEW</i> ' ' <i>rhaEW-rhaR</i> ' ($\Delta rhaEW$)
pSTH66.1	pSTH65 (<i>BamHI</i>)	pJOE6743.1 (<i>BamHI</i>)	$\Delta rhaEW$

Fortsetzung Tabelle 3.18

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	relevanter Genotyp / DNA-Fragment
pSTH67	pJOE6982.1 (<i>Bam</i> HI)	pJOE4786.1 (<i>Bam</i> HI)	' <i>spoVAF</i> ' ' <i>dacF</i> ' (Δ <i>spoVAF</i> - <i>spoIIAA</i>)
pSTH69	s10002/s9242 (<i>Sac</i> I/ <i>Nde</i> I) + s10004/s10029 [<i>O. iheyensis</i>] (<i>Nde</i> I/ <i>Sac</i> I)	pUC18 (<i>Sac</i> I, AP)	P_{rhaEW} - <i>rhaY</i>
pSTH70	pSTH69 (<i>Sac</i> I)	pSTH67 (<i>Sac</i> I, AP)	' <i>spoVAF</i> '- P_{rhaEW} - <i>rhaY</i> '-' <i>dacF</i> '
pSTH71.1	pSTH70 (<i>Bam</i> HI)	pJOE6743.1 (<i>Bam</i> HI)	' <i>spoVAF</i> '- P_{rhaEW} - <i>rhaY</i> '-' <i>dacF</i> '
pSTH74	s10087/s10088 [<i>E. coli</i> JM109] (<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI)	pSTH59 (<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI)	<i>rhaP</i> _{BAD} - <i>rhaB</i> - <i>strep</i>
pSTH76	pSTH74 (<i>Nde</i> I/ <i>Pst</i> I)	pSTH63 (<i>Nde</i> I/ <i>Pst</i> I)	P_m - <i>rhaB</i> - <i>strep</i>
pSTH79	s9242/s10090 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	pJOE4786.1 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	P_{rhaEW} (-79 → +32)
pSTH80	s9242/s10091 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	pJOE4786.1 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	P_{rhaEW} (-55 → +32)
pSTH81	s9242/s10092 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	pJOE4786.1 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	P_{rhaEW} (-38 → +32)
pSTH85	s9462/s9528 (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I) + s10454/s9526 (<i>Sal</i> I/ <i>Bam</i> HI)	pJOE6743.1 (<i>Bam</i> HI)	' <i>rhaEW</i> '-' <i>rhaR</i> '-' <i>rhaB</i> ' (Δ <i>rhaR</i>)
pSTH86	s9242/s10691 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	pJOE4786.1 (<i>Nhe</i> I/ <i>Nde</i> I)	P_{rhaEW} (-60 → +32)
pSTH90	s10929/s10930 [pSTH16] ^β		P_{rhaEW} (-347 → +32) [-33 → -28 CAAAAA → GTTTTT]
pSTH91	s10931 /s10932 [pSTH16] ^β		P_{rhaEW} (-347 → +32) [-21 → -16 CAAATC → GTTTAG]
pSTH92	s10935/s10936 [pSTH16] ^β		P_{rhaEW} (-347 → +32) [+12 → +17 AAAGGG → TTTCCC]
pSTH93	s10919/s10920 [pSTH16] ^β		P_{rhaEW} (-347 → +32) [-68 → -63 TTTTTG → AAAAAC]

Fortsetzung Tabelle 3.18

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	relevanter Genotyp / DNA-Fragment
pSTH94	s10925/s10926 [pSTH16] ^β		<i>P_{rhaEW}</i> (-347 → +32) [-47 → -43 AAACA → TTTGT]
pSTH95	s10933/s10934 [pSTH16] ^β		<i>P_{rhaEW}</i> (-347 → +32) [-6 → -2 GAAAA → CTTTT]
pSTH96	s10923/s10924 [pSTH16] ^β		<i>P_{rhaEW}</i> (-347 → +32) [-54 → -49 CAAAA → GTTTTT]
pSTH97	s10921/s10922 [pSTH16] ^β		<i>P_{rhaEW}</i> (-347 → +32) [-60 → -55 AAAAAG → TTTTTC]
pSTH102	s10937/s10938 [pSTH16] ^β		<i>P_{rhaEW}</i> (-347 → +32) [+5 → +10 ACAAAT → TGTTTA]
pSTH105	s10976/s10977 [pSTH16] ^β		<i>P_{rhaEW}</i> (-347 → +32) [-41 → -36 AAACGA → TTTGCT]
pSTH110	s11052/s11053 (<i>NdeI/BamHI</i>)	pSTH59 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>rhaP_{BAD}-gmuR-strep</i>
pSTH114	s11054/s11055 [pSTH110] ^α	pSTH63 (<i>NdeI/PstI</i>)	<i>Pm-gmuR-strep</i>
pSTH130	s11549/s11020 (<i>NheI/NdeI</i>)	pJOE4786.1 (<i>NheI/NdeI</i>)	<i>P_{gmuB}</i> (-467 → +30)
pSTH131	s11521/s11522 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-467 → +30) [-17 → -14 TGAC → ACTG]
pSTH132	s11537/s11538 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-35*)(-467 → +30) [-18 A → AT]
pSTH133	s11539/s11540 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-35*)(-467 → +30) [-17 T → -]
pSTH134	s11517/s11518 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-467 → +30) [-24 → -23 AA → TT]
pSTH135	s11525/s11526 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-467 → +30) [-4 → -2 CAA → GTT]
pSTH136	s11529/s11530 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-35*)(-467 → +30) [-35 T → G]
pSTH138	s11515/s11516 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-467 → +30) [-29 → -26 TTTA → AAAT]
pSTH139	s11527/s11528 [pSTH130] ^β		<i>P_{gmuB}</i> (-35*)(-467 → +30) [-34 A → T]

Fortsetzung Tabelle 3.18

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	relevanter Genotyp / DNA-Fragment
pSTH140	s11519/s11520 [pSTH130] ^β		P _{gmuB*} (-467 → +30) [-19 → -18 AA→TT]
pSTH141	s11523/s11524 [pSTH130] ^β		P _{gmuB*} (-467 → +30) [-7 + -5 AAT → TAA]

^α Assemblierung und Klonierung der PCR-Produkte mittels der *Gibson Assembly*-Klonierungsmethode (Kapitel 3.2.2.11)

^β *DpnI*-, T4-Polynukleotidkinase- & T4-DNA-Ligase-Behandlung der PCR-Produkte (ortsgerichtete Mutagenese nach NEB, Kapitel 3.2.2.12)

Tabelle 3.19: In dieser Arbeit erzeugte *B. subtilis*-Integrationsvektoren (*amyE*-Locus). Die Restriktionsendonukleasen, mit denen der *amyE*-Integrationsvektor pKAM243 und das Insert vor der Ligation geschnitten wurden, sind in runden Klammern vermerkt. Wenn das Insert mittels PCR-Amplifikation gewonnen wurde, sind die eingesetzten Oligonukleotide (s.../s....) und das verwendete Template (in eckigen Klammern) angegeben (168, chromosomale DNA aus *B. subtilis* 168). Die Promotorsequenz innerhalb der Integrationskassette des Ausgangsvektors (*amyE'*-ter-Promotorsequenz-*lacZ*-*spc'*-*amyE*) wurde durch die jeweils angegebene Promotorsequenz ersetzt. Die Nukleotidposition beziehen sich auf den Transkriptionsstartpunkt bzw. – wenn durch ein Rautezeichen kenntlich gemacht - auf das Startcodon des jeweiligen Gens. Handelt es sich um eine mutierte Promotorsequenz (*), so sind die eingebrachten Basensubstitutionen, -insertionen bzw. -deletionen näher erläutert (eckige Klammern).

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	Promotorsequenz
pSTH22	pSTH16 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{rhaEW} (-347 → +32)
pSTH64	s9939/s9940[168] ^{α+} s9363/9776[pKAM243] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	P _{rhaR} (-494 → -1) [#]
pSTH77	s10093/s10094 [pSTH22] ^β		P _{rhaEW (cre*)} (-347 → +32) [ATGAAAACGGATACAA → ATtAAcACGcgTcacA]
pSTH78	s10095/s10096 [pSTH22] ^β		P _{rhaEW(-35*)} (-347 → +32) [-33 → -31 CAA → GAC]
pSTH82	pSTH79 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{rhaEW} (-79 → +32)
pSTH83	pSTH80 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{rhaEW} (-55 → +32)
pSTH84	pSTH81 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{rhaEW} (-38 → +32)

Fortsetzung Tabelle 3.19

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	Promotorsequenz
pSTH87	pSTH86 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-60 \rightarrow +32)$
pSTH88	s10692/s10693 [pSTH22] ^β		$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-26 \rightarrow -22 AAACA \rightarrow TTTGT]
pSTH98	pSTH90 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-33 \rightarrow -28 CAAAAA \rightarrow GTTTTT]
pSTH99	pSTH91 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-21 \rightarrow -16 CAAATC \rightarrow GTTTAG]
pSTH100	pSTH92 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [+12 \rightarrow +17 AAAGGG \rightarrow TTTCCC]
pSTH101	pSTH93 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-68 \rightarrow -63 TTTTGT \rightarrow AAAAAAC]
pSTH103	pSTH95 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-6 \rightarrow -2 GAAAA \rightarrow CTTTT]
pSTH104	pSTH94 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-47 \rightarrow -43 AAACA \rightarrow TTTGT]
pSTH106	pSTH96 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-54 \rightarrow -49 CAAAAA \rightarrow GTTTTT]
pSTH107	pSTH97 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-60 \rightarrow -55 AAAAAG \rightarrow TTTTTC]
pSTH108	pSTH102 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [+5 \rightarrow +10 ACAAAT \rightarrow TGTTTA]
pSTH109	pSTH105 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> , <i>NdeI</i>)	$P_{rhaEW}(-347 \rightarrow +32)$ [-41 \rightarrow -36 AAACGA \rightarrow TTTGCT]
pSTH111	s11020/s11021 [168] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	$P_{gmuB}(-467 \rightarrow +31)$
pSTH112	s11022/s11023 [168] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	$P_{gmuC}(-501 \rightarrow -1)$ [#]
pSTH113	s11018/s11051 [168] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	$P_{gmuR}(-402 \rightarrow -1)$ [#]
pSTH121	s11375/s11376 [pSTH111] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	$P_{gmuB}(-43 \rightarrow +31)$
pSTH122	s11374/s11376 [pSTH111] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	$P_{gmuB}(-45 \rightarrow +31)$
pSTH123	s11370/s11376 [pSTH111] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	$P_{gmuB}(-51 \rightarrow +31)$

Fortsetzung Tabelle 3.19

Name	Insert (geschnitten mit)	Ausgangsvektor (geschnitten mit)	Promotorsequenz
pSTH124	s11369/s11376 [pSTH111] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	P _{gmuB} (-56 → +31)
pSTH125	s11373/s11376 [pSTH111] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	P _{gmuB} (-57 → +31)
pSTH126	s11372/s11376 [pSTH111] ^α	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	P _{gmuB} (-59 → +31)
pSTH129	s11531/s11376 [pSTH111] (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>AfeI</i>)	P _{gmuB} (-35 → +31)
pSTH142	pSTH131 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30) [-17 → -14 TGAC → ACTG]
pSTH143	pSTH136 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-35*)(-467 → +30) [-35 T → G]
pSTH144	pSTH141 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30) [-7 + -5 AAT → TAA]
pSTH146	pSTH130 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30)
pSTH147	pSTH132 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-35*)(-467 → +30) [-18 A → AT]
pSTH148	pSTH133 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-35*)(-467 → +30) [-17 T → -]
pSTH149	pSTH134 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30) [-24 → -23 AA → TT]
pSTH150	pSTH135 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30) [-4 → -2 CAA → GTT]
pSTH151	pSTH138 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30) [-29 → -26 TTTA → AAAT]
pSTH152	pSTH139 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-35*)(-467 → +30) [-34 A → T]
pSTH153	pSTH140 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	pKAM243 (<i>NheI</i> / <i>NdeI</i>)	P _{gmuB} [†] (-467 → +30) [-19 → -18 AA → TT]

^α Assemblierung und Klonierung der PCR-Produkte mittels der *Gibson Assembly*-Klonierungsmethode (Kapitel 3.2.2.11)

^β *DpnI*-, T4-Polynukleotidkinase- & T4-DNA-Ligase-Behandlung der PCR-Produkte (ortsgerichtete Mutagenese nach NEB, Kapitel 3.2.2.12)

3.1.10 Computerprogramme/Datenbanken

- Microsoft® Office 2016 (Word, Excel, PowerPoint)
- CloneManager® Basic Version 8 (Planung von Klonierungen, Primer-Wahl)
- ChemDraw® Professional 16.0
- Datenbanken: *SubtWiki* (Michna *et al.*, 2016); BsubCyc (<https://bsubcyc.org/>)

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *B. subtilis* und *E. coli*

Flüssig- und Plattenkulturen von *E. coli* oder *B. subtilis* Stämmen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37 °C in LB-Medium angezogen. Bei Antibiotika-resistenten Stämmen wurde ein Selektivmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum eingesetzt (Tabelle 3.9). Wurden auxotrophe Bakterienstämme in Minimalmedium angezogen, so wurde die entsprechende Aminosäure zum Nährmedium hinzugefügt (Tabelle 3.10).

Übernachtskulturen (ÜNK) wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und ca. 15-17 h im Roller bei 37 °C inkubiert. Die aus der ÜNK angeimpften Hauptkulturen wurden auf dem Schüttler bei 150 rpm kultiviert. Um eine gute Durchlüftung zu gewährleisten, entsprach das Volumen der Kultur höchstens 20 % des Volumens des verwendeten Schüttelkolbens. Die Sauerstoffversorgung des fakultativ aeroben Bakteriums *B. subtilis* wurde zusätzlich durch die Verwendung von Schüttelkolben mit Schikane sichergestellt.

Um benötigte Bakterienstämme kurzfristig zu lagern, wurden diese auf Agarplatten vereinzelt und bei ca. 4 °C bis zu 4 Wochen aufbewahrt.

Zur langfristigen Stammhaltung wurde eine Dauerkultur aus einer 5 ml-ÜNK angelegt. Die ÜNK wurde pelletiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm, RT) und in 2 ml Glycerinkulturmedium resuspendiert. Aliquots à 1 ml wurden in Gefrier Röhrchen bei -70 °C eingefroren.

3.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur

Die Zelldichte einer Bakteriensuspension wurde über Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) im Spektrophotometer (VWR UV-3100PC Spektralphotometer) ermittelt. Die Probe wurde vor der Messung in dem verwendeten Nährmedium so verdünnt, dass eine OD_{600} von 0,5 nicht überschritten wurde. Die Trübungsmessung erfolgte gegen das unbeimpfte Medium.

3.2.1.3 Transformation von *E. coli* (TSS-Methode)

Die Transformation von *E. coli* JM109 bzw. NM538 Zellen erfolgte nach der TSS-Methode (Transformation and Storage Solution) nach Chung *et al.* (1989) durch Hitzeschock.

Dazu wurde eine Hauptkultur im Verhältnis 1:100 mit der ÜNK angeimpft und bei 37 °C inkubiert (Schüttler), bis diese eine OD₆₀₀ von ca. 0,4 erreicht hatte. Daraufhin wurden die Bakterienzellen pelletiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm, RT), in 1/25 Volumen eisgekühlter TSS-Lösung resuspendiert und auf Eis gelagert. Zu je 200 µl kompetenter *E. coli* Zellen wurden ca. 100–200 ng Plasmid-DNA bzw. der Ligationsansatz gegeben und gemischt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Plasmid-Zugabe mitgeführt. Nach einer mindestens 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Transformationsansätze für 90 s bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Zellen wurden unverzüglich danach wieder auf Eis abgekühlt und in Kulturröhrchen mit 2 ml LB-Medium ohne Antibiotikum transferiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C (Roller) wurden bei einer Retransformation von Plasmid-DNA 100 µl der Zellsuspension ausplattiert. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde die Kultur abzentrifugiert und das resuspendierte Zellpellet ausgestrichen. Zur Selektion der Transformanten wurden LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum verwendet.

3.2.1.4 Transformation von *B. subtilis*

Um Plasmid-DNA oder chromosomale DNA in *B. subtilis* Zellen einzubringen, wurde die natürliche Kompetenz von *B. subtilis* (Spizizen, 1958) ausgenutzt. Anagnostopoulos & Spizizen entwickelten 1961 ein Protokoll, welches die Ausbildung dieses physiologischen Zustands, der nur unter bestimmten Umweltbedingungen auftritt, fördert. Eine Abwandlung dieses Protokolls wurde angewendet.

Eine 2 ml-ÜNK in MG1 wurde 1:10 in MG2 verdünnt (Tabelle 3.8) und diese Kultur bei 37 °C geschüttelt. Nach 90 min wurde 1 ml aus dieser Kultur entnommen, in ein Röhrchen überführt und mit der gewünschten DNA (ca. 500 ng–1 µg) versetzt. Die Transformation von *B. subtilis* wird durch die Verwendung von Plasmid-Multimeren begünstigt (Canosi *et al.*, 1978). Daher wurde die Plasmid-DNA entweder aus dem

zur Bildung von Plasmid-Multimeren neigenden *E. coli* Stamm NM538 isoliert oder durch einen Restriktionsverdau linearisiert und anschließend religiert. Nach 60 min Inkubation im Roller bei 37 °C wurde die Kultur abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 10 min, 4.500 rpm, RT) und auf einem Selektivnährboden mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

3.2.1.5 Heterologe Genexpression in *E. coli* JM109

Für die heterologe Expression von Plasmid-kodierten Genen wurden Expressionsvektoren eingesetzt, die auf dem XylS/Pm-System basieren (Graf & Altenbuchner, 2013). Als Wirtstamm diente *E. coli* JM109.

Eine 10 ml-Kontrollkultur und eine 50 ml-Hauptkultur wurden je 1:100 aus einer Übernackkultur in LB-Medium mit Apramycin angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Induktion des Pm-Promotors mit 2 mM *m*-Toluylsäure erfolgte während der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 bis 0,6. Nach 4 h Wachstum bei 30 °C bzw. 37 °C (je nach Plasmid) wurde die gesamte induzierte Kultur bzw. 10 OD₆₀₀ Zellen aus der nicht-induzierten Kontrollkultur geerntet (Heraeus Megafuge, 5.000 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde mit Waschpuffer W (100 mM TRIS/HCl pH 8, 150–300 mM NaCl) gewaschen (5.000 rpm, 5 min, RT) und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.2.1 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration und Reinheit

Die Konzentration und Reinheit von doppel- (ds) oder einzelsträngiger (ss) DNA bzw. von RNA wurde durch photometrische Messung ermittelt. Dazu wurde die Absorption von je 3 μl Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm (Abs_{260}) mit einem Nanophotometer (Implen GmbH, München) bestimmt. Als Leerwert diente die Abs_{260} des verwendeten Puffers. Je Probe wurden drei Messungen vorgenommen und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert gebildet. Ein OD-Wert von 1 entspricht 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNA, 33 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ssDNA bzw. 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ RNA. Als Reinheitsmaß diente der Quotient aus Abs_{260} und Abs_{280} sowie der Quotient aus Abs_{260} und Abs_{230} .

3.2.2.2 DNA-Fällung mit Isopropanol

Um eine DNA-Probe aus einer wässrigen Lösung zu verdrängen, wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und die DNA nach 5 min Inkubation bei RT sedimentiert (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 10 min, 13.200 rpm, RT). Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 100 % EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die gereinigte DNA durch die Zugabe des gewünschten Volumens an $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ wieder in Lösung gebracht.

3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA mittels PCR wurde die Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase von NEB verwendet, die PCR-Produkte mit glatten Enden erzeugt. Das thermostabile Enzym verfügt über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die das Korrekturlesen (engl. *proofreading*) während der DNA-Synthese ermöglicht. Um die Prozessivität zu erhöhen, ist die DNA-Polymerase zusätzlich mit einer Sso7d-Domäne fusioniert, die unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und das PCR-Programm können Tabelle 3.20 bzw. Tabelle 3.21 entnommen werden. Für die Reinigung der PCR-

Fragmente wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ verwendet. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen.

Tabelle 3.20 PCR-Ansatz für die Amplifikation mit der Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase von NEB. Um überspiralisierte Plasmid-DNA zu entspannen wurden dem Reaktionsansatz 3 % DMSO zugefügt.

Komponente	Volumen
5× Q5-Reaktionspuffer	20 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
DMSO (bei Plasmid-DNA)	3 µl
Vorwärts-Primer (100 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts-Primer (100 pmol/µl)	1 µl
Genomische DNA (ca. 1 ng–1 µg) bzw. Plasmid-DNA (ca. 1 pg–1 ng)	variabel
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U µl ⁻¹)	1 µl
H ₂ O _{mp}	ad 100 µl

Tabelle 3.21 PCR-Bedingungen unter Verwendung der Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB). Zur Abschätzung der Annealing-Temperatur (X) für das verwendete Primerpaar wurde der „T_m Calculator“ von NEB (<https://tmcalculator.neb.com/>) verwendet (normalerweise 3 °C über der Schmelztemperatur T_m des Primers mit der geringeren T_m).

Temperatur	Zeit	Zyklen
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	30×
X °C	20 s	
72 °C	20–30 s/kb	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

3.2.2.4 Kolonie-PCR

Um den Genotyp eines *B. subtilis* Stamms für einen bestimmten Locus zu verifizieren, wurde die Kolonie-PCR-Methode angewendet. Dafür wurden Primer gewählt, die außerhalb der Region von Interesse liegen und diese im Genom flankieren. Zur Gewinnung der chromosomalen Template-DNA wurde Zellmaterial einer Einzelkolonie von einem Agarnährboden entnommen und in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ suspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Inkubation für 10 min bei 99 °C und 900 rpm (Eppendorf Thermomixer Compact), anschließendem Schockgefrieren bei -70 °C für 20 min und erneuter 10-minütiger Inkubation bei 99 °C und 900 rpm. Das Zelldebris wurde pelletiert (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 5 min, 13.200 rpm, RT) und der Überstand, der die genomische DNA enthielt, als Template für die Kolonie-PCR eingesetzt. Die Kolonie-PCR wurde mit der DreamTaq DNA-Polymerase durchgeführt, die keine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das verwendete Temperaturprofil sind in Tabelle 3.22 bzw. Tabelle 3.23 dargestellt.

Tabelle 3.22 Zusammensetzung des Ansatzes für die Kolonie-PCR mit der DreamTaq DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen
10× DreamTaq Green Buffer	3,0 μl
10 mM dNTP-Mix	0,6 μl
Vorwärts-Primer (100 pmol/ μl)	0,3 μl
Rückwärts-Primer (100 pmol/ μl)	0,3 μl
chromosomale DNA	2 μl
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U μl^{-1})	0,3 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$	ad 30 μl

Tabelle 3.23 Bedingungen für die Kolonie-PCR mittels DreamTaq DNA-Polymerase. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde mit der Wallace-Regel (T_m in °C = $2 \times [\text{Anzahl A+T}] + 4 \times [\text{Anzahl G+C}]$) ermittelt und eine Annealing-Temperatur (X) gewählt, die 3–5 °C unter der Schmelztemperatur lag.

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	1,5 min	
92 °C	0,5 min	30×
X °C	0,5 min	
72 °C	1 min/kb	
72 °C	10 min	

3.2.2.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um ein kurzes, doppelsträngiges DNA-Fragment zu generieren, wurden zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide (Eurofins Genomics, Ebersberg) miteinander hybridisiert. Der Ansatz, in dem sich jeweils 100 pmol der beiden Oligonukleotide befanden, wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ auf ein Gesamtvolumen von 50 μl ergänzt. Die folgenden Schritte wurden lichtgeschützt in einem Eppendorf Thermomixer Compact durchgeführt.

Das Gemisch wurde zunächst für 3 min bei 99 °C denaturiert, um mögliche intramolekulare Sekundärstrukturen zu zerstören. Danach erfolgte die Hybridisierung durch langsames Abkühlen. Dazu wurde die Lösung zunächst für 10 min bei 65 °C und anschließend für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Oligonukleotide für 30 min auf RT abgekühlt.

3.2.2.6 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA

Zur Erzeugung von kompatiblen Enden, die miteinander ligiert werden konnten, wurden 100 ng–1 μg gereinigte DNA (Plasmid-DNA oder PCR-Produkte) eingesetzt. Die optimalen Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer, Inkubationszeit), die sich nach dem verwendeten Restriktionsenzym richten, wurden entsprechend der Herstellerangaben (New England Biolabs) gewählt. Ein Restriktionsverdau enthielt

1 μl 10 \times Reaktionspuffer (NEBuffer) und 1 μl (10–20 U μl^{-1}) Restriktionsenzym und wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ auf ein Gesamtvolumen von 10 μl ergänzt. Der Ansatz wurde 15–60 min entsprechend dem Temperaturoptimum der verwendeten Restriktionsendonuklease inkubiert. Bei einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen mindestens 50 bp auseinanderlagen und die eine ausreichend hohe Aktivität (mindestens 50 %) im selben Reaktionspuffer besaßen, wurden in einem 20 μl -Ansatz beide Enzyme gleichzeitig eingesetzt. Ansonsten wurden die Reaktionen hintereinander durchgeführt. Vor der Zugabe des zweiten Restriktionsenzym wurde die DNA dann zunächst mit Isopropanol gefällt (Kapitel 3.2.2.2).

Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden entweder durch ihre Auftrennung in einem Agarosegel (Kapitel 3.2.2.8 und Kapitel 3.2.2.9) oder durch das Reinigungskit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ entsprechend der Herstellerangaben gereinigt.

3.2.2.7 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Bei einer ungerichteten Klonierung entstehen durch die Linearisierung der Vektor-DNA mittels Restriktionsverdau zwei zueinander kompatible Enden. Um eine intramolekulare Ligation des Vektors zu verhindern, wurde das geschnittene Vektorfragment zunächst enzymatisch durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Das Enzym katalysiert die hydrolytische Abspaltung der endständigen 5'-Phosphatgruppen, sodass für die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen während der darauffolgenden Ligation die 5'-Phosphatgruppen der Insert-DNA benötigt werden.

Für die Phosphatase-Behandlung wurde der Verdauansatz mit der geschnittenen Vektor-DNA mit 7 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$, 2 μl 10 \times Phosphatasepuffer sowie 1 μl (5 U μl^{-1}) Antarktische Phosphatase (NEB, Frankfurt/Main) versetzt und der Reaktionsansatz 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die Reinigung wurde mit dem kommerziellen Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in 0,7–2%igen (w/v) Agarosegelen (SeaKem®-LE-Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) bei einer Spannung von 70–100 V. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1× DNA-Auftragspuffers versetzt. Zur Visualisierung enthielten das Agarosegel sowie der 1× TAE-Laufpuffer je 0,4 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid. Um die Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde der DNA-Längenstandard „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (75 bp bis 20 kb) der Firma Thermo Scientific mitgeführt.

3.2.2.9 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe das gewünschte Fragment zu isolieren, wurde dieses gelelektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt. Im Anschluss wurde die Bande mit der entsprechenden Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ aus der Agarose isoliert. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt.

3.2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden oder kompatiblen Überhängen wurde mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase durchgeführt. Vektor- und Insert-DNA wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5 bei DNA-Fragmenten kleiner als 200 bp eingesetzt. Der Ligationsansatz enthielt außerdem Ligasepuffer mit ATP (1× Endkonzentration) sowie 1 µl (5 U µl⁻¹) T4-DNA-Ligase und wurde mit H₂O_{mp} auf ein Gesamtvolumen von 10–20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte entweder für 30–60 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Mit dem Ligationsansatz wurden dann kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert (Kapitel 3.2.1.3).

3.2.2.11 Klonierung mittels Gibson-Assemblierung

Bei dem Zusammenbau nach Gibson (*Gibson Assembly*) handelt es sich um eine alternative Klonierungsmethode, die es ermöglicht, mehrere DNA-Fragmente in einer

einzigsten Reaktion nahtlos miteinander zu fusionieren (Gibson *et al.*, 2009). Da überlappende (15–20 bp), mittels PCR-amplifizierte Fragmente kloniert werden, bleiben bei dieser Restriktionsenzym-freien Methode keine zusätzlichen exogenen Sequenzen zurück. Der kommerziell erhältliche NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix (2×) (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) enthält eine 5′-Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase. Die 5′-Exonuklease erzeugt 3′-Überhänge, die sich an das überlappende 3′-Ende ihres Fusionspartners anlagern. Die entstandenen Lücken können anschließend durch die Polymerase aufgefüllt und die Einzelstrangbrüche durch die Ligase verknüpft werden.

Mit Hilfe dieser alternativen Klonierungsmethode wurden ein oder zwei DNA-Fragmente in der Orientierung gerichtet mit dem Zielvektor ligiert. Der Reaktionsansatz enthielt - neben dem Master Mix (1× Endkonzentration) - 50–100 ng Vektor-DNA und einen 3-fachen molaren Überschuss je Insert-DNA. Betrug die Länge des Inserts weniger als 200 bp, wurde das Insert in einem 5-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10–20 µl wurde 15 min bei 50 °C inkubiert (Eppendorf Thermomixer Compact) und anschließend bis zur Transformation auf Eis (bzw. bei -20 °C) gelagert. Mit 2 µl des Fusionsprodukts wurden 200 µl kompetente *E. coli* JM109-Zellen transformiert (TSS-Methode).

3.2.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese nach NEB (Q5[®] Site-Directed Mutagenesis)

Um eine Zielsequenz durch Basensubstitutionen, -insertionen oder -deletionen zu mutieren, wurde zunächst eine PCR (Kapitel 3.2.2.3) mit Primern durchgeführt, welche die einzubringende Sequenzänderung an ihrem 5′-Ende tragen bzw. den zu deletierenden Bereich aussparen. Als Template für die Mutagenese-PCR diente ein Vektor, der die zu mutierende Sequenz trägt. Durch die Verwendung von Rücken-an-Rücken-Oligonukleotiden wurde der gesamte Ausgangsvektor amplifiziert. Anschließend wurde die methylierte Template-DNA abgebaut, indem das gereinigte PCR-Produkt (ca. 1 µg) 1 h bei 37 °C mit 1 µl (20 U µl⁻¹) *DpnI* verdaut wurde. Der Restriktionsverdau wurde durch eine Isopropanol-Fällung gereinigt und das DNA-Pellet in 8 µl H₂O_{mp} gelöst. Nach der Zugabe von 1 µl 10× T4-DNA-Ligase-Puffer (mit 5 mM ATP) und 1 µl (10 U µl⁻¹) T4-Polynukleotidkinase wurde erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die phosphorylierten 5′-Enden miteinander ligiert,

indem 8 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$, 1 μl 10 \times T4-DNA-Ligase-Puffer sowie 1 μl (5 U μl^{-1}) T4-DNA-Ligase zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurden. Die Ligation wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Mit dem Ligationsprodukt wurden kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert (TSS-Methode).

3.2.2.13 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse und Alkoholfällung

Plasmid-DNA wurde kostengünstig mittels klassischer alkalischer Lyse und anschließender Isopropanol-Fällung anhand eines modifizierten Protokolls nach Lee & Rasheed (1990) aus *E. coli* Zellen isoliert.

Die DNA-Extraktion erfolgte aus einer 2 ml-ÜNK einer Plasmid-tragenden Einzelkolonie in LB-Selektivmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Die Bakteriensuspension wurde pelletiert (Heraeus Megafuge, 5 min, 4.500 rpm, RT) und in 200 μl Resuspendierungspuffer (Tabelle 3.4) aufgenommen. Eine Verunreinigung der DNA durch RNA wurde durch die Zugabe von RNase vermieden. Es wurde für 5–10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellyse durch Zugabe von 300 μl Lysepuffer, wodurch die Phospholipide und Membranproteine durch das Detergens SDS solubilisiert wurden. Die Alkalisierung durch NaOH bewirkte zudem die Denaturierung der freigesetzten Proteine und der DNA. Die Lösung wurde nach maximal 5 min mit 400 μl 7,5 M Ammoniumacetat neutralisiert, wodurch eine Renaturierung der niedermolekularen Plasmid-DNA erlaubt wurde. Die chromosomale DNA und Proteine wurden abzentrifugiert (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 5 min, 13.200 rpm, RT) und ca. 800 μl des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 700 μl Isopropanol zum Überstand präzipitiert. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und die ausgefällte DNA durch Zentrifugation (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 10 min, 13.200 rpm, RT) sedimentiert. Nach dem Waschen des DNA-Pellets mit 100 % EtOH (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 5 min, 13.200 rpm, RT) wurde es luftgetrocknet und die gereinigte DNA in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ aufgenommen. Durch einen anschließenden Restriktionsverdau mit je 3–5 μl Probe wurde die Identität der isolierten Plasmid-DNA analysiert.

3.2.2.14 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Silikamembran

Die Isolation von hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurde mit dem „innuPREP Plasmid Mini Kit“ der Analytik Jena AG (Jena) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden 5–15 ml einer stationären ÜNK eingesetzt, die in LB-Selektivmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen wurde. Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die gereinigte Plasmid-DNA (je 3–5 µl) wurde mittels Restriktionsanalyse kontrolliert und bei 4 °C bzw. -20 °C aufbewahrt.

3.2.2.15 Kontroll-Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten (GATC)

Alle mittels PCR generierten Sequenzen innerhalb eines neu konstruierten Vektors wurden nach ihrer Klonierung durch eine Sequenzierung kontrolliert. Die DNA-Sequenzierung nach Sanger wurde von GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Proben enthielten 400–500 ng der aufgereinigten Plasmid-DNA bzw. 100–400 ng aufgereinigtes PCR-Produkt und 25 pmol des Sequenzierungsprimers. Das Gesamtvolumen betrug 10 µl.

3.2.2.16 Isolation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Um chromosomale DNA aus einem *B. subtilis* Stamm zu isolieren, wurde aus einer ÜNK 4 OD₆₀₀ Zellsuspension entnommen und abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4.500 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 180 µl Lysepuffer (Tabelle 3.7) resuspendiert. Für die DNA-Extraktion aus dem Lysat wurde das Kit „DNeasy® Blood & Tissue“ der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Das weitere Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll. Die Integrität der gewonnenen chromosomalen DNA wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die genomische DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2.17 Gezielte Manipulation des Genoms von *B. subtilis*

B. subtilis wurde genetisch manipuliert, indem der endogene Reparaturmechanismus der homologen Rekombination ausgenutzt wurde. Zunächst wurden jeweils mindestens 700 bp der genomischen DNA-Sequenzen, welche die zu mutierende Zielsequenz flankieren, mittels PCR amplifiziert. Bei Gendeletionen wurden Start- und Stopcodon des zu deletierenden Gens - unter Beachtung des offenen Leserahmens - beibehalten. War der Abstand zwischen zwei Genen kleiner als 20 bp, so wurde außerdem auch die ribosomale Bindestelle des unmittelbar stromabwärts folgenden Gens unberührt gelassen. Die beiden PCR-Fragmente wurden anschließend über die eingeführten Restriktionsschnittstellen in der richtigen Orientierung miteinander fusioniert. Für Insertionen wurde die gewünschte DNA-Sequenz zwischen zwei je mindestens 700 bp lange DNA-Sequenzen eingefügt, welche homolog zu den beiden DNA-Abschnitten sind, die den Integrationsorts im Genom flankieren.

Ein in dieser Arbeit verwendetes markerloses Deletionssystem (Wenzel & Altenbuchner, 2015) basiert auf dem Suizidplasmid pJOE6743.1. Der in *B. subtilis* nicht replizierende Integrationsvektor trägt neben der multiplen Klonierungsstelle zur Insertion einer Deletionskassette und den Selektionsmarkern (Ampicillin- bzw. Spectinomycin-Resistenz) im Plasmid-Rückgrat das Gen für den Mannose-Transporter ManP. Wird dieses Plasmid-kodierte Gen im Hintergrund einer $\Delta manPA$ -Doppelmutation in die Zelle eingebracht, entsteht durch die Zugabe von Mannose zum Kulturmedium ein letaler Effekt. Dieser Effekt entsteht durch eine mutmaßliche intrazelluläre Akkumulation des Intermediats Mannose-6-Phosphat (M6P), das aufgrund der fehlenden M6P-Isomerase ManA nicht weiter abgebaut werden kann und dadurch toxisch wirkt. Dieses System ermöglicht - durch die Gegenselektion mit Mannose - die Selektion von Zellen, bei denen nach Integration des in *B. subtilis* nicht-replikativen Plasmids via homologer Rekombination ein weiteres Rekombinationsereignis (Doppelcrossover) stattgefunden hat. Bei überlebenschfähigen Zellen wurde das Plasmid-Rückgrat (einschließlich des Spectinomycin-Markergens) während dieses zweiten homologen Rekombinationsschritts wieder aus dem Chromosom ausgeschnitten. Je nach dem, an welchem der beiden homologen Sequenzen die intramolekulare Rekombination stattgefunden hat, wurde entweder

die Ausgangslage (Wildtyp-Sequenz) wieder hergestellt oder die mutierte Sequenz beibehalten.

Der Ausgangsstamm wurde mit einem zuvor konstruierten Derivat von pJOE6743.1 transformiert. Vier Transformanten wurden unter Selektionsdruck auf LB-Agarnährboden mit Spectinomycin vereinzelt. Mit je einer isolierten Einzelkolonie wurden 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und ca. 8 h bei 37 °C inkubiert (Roller). Die Kultur wurde in einer 10⁻⁴-Verdünnung in 1 ml frisches LB-Medium mit 0,5 % D-Mannose überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Roller). Am Folgetag wurden je 100 µl einer 3 × 10⁻⁶ Verdünnung der Übernachtskultur auf LB-Agarnährböden mit 0,5 % D-Mannose ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf Spectinomycin-Sensitivität getestet und die Kandidaten mittels Kolonie-PCR (Kapitel 3.2.2.4) analysiert. Für den Nachweis der Mutation wurden die äußeren beiden Primer, die für die Erzeugung der Deletions- bzw. der Integrationskassette verwendet wurden, eingesetzt.

Eine weitere Methode, das pHM30/pHM31-System, wurde angewendet, um eine *P_{manP}-lacZ*-Expressionskassette markerfrei in das Chromosom von *B. subtilis* zu integrieren (Motejadded & Altenbuchner, 2007). Im ersten Schritt wird bei dieser Methode durch eine Transformation mit dem Integrationsvektor pHM30, der ein verkürztes *hisI*-Gen und stromabwärts das Spectinomycin-Resistenzgen trägt, eine Histidin-Auxotrophie verursacht. Diese wird im zweiten Schritt durch die Transformation einer Spectinomycin-resistenten Mutante mit einem Derivat des Integrationsvektors pHM31 (hier pMW678.6, Wenzel & Altenbuchner, 2013) wieder aufgehoben. Das pHM31-Derivat trägt das intakte *hisI*-Gen und stromabwärts die zu integrierende DNA-Sequenz. Hierdurch wird eine Selektion der Transformanten auf Histidin-Prototrophie ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden Minimalmedium-Agarplatten (SMM) ohne Histidin verwendet, die mit 0,5 % D-Glucose supplementiert wurden, und diese 2 d bei 37 °C inkubiert. Die als Resultat des homologen Rekombinationsereignisses entstandene Histidin-Auxotrophie (1. Schritt) bzw. Spectinomycin-Sensitivität (2. Schritt) wurde jeweils überprüft.

3.2.2.18 Transkriptionsstartbestimmung mittels der *Primer Extension*-Methode

Der Transkriptionsstart des Rhamnose-Promotors von *B. subtilis* wurde mit der *Primer Extension*-Methode bestimmt. Dazu wurde im ersten Schritt RNA aus dem *B. subtilis* Stamm SH61 ($\Delta rhaR \Delta amyE::ter-P_{rhaEW}-lacZ-spc$) isoliert. In diesem Regulator-defizienten Stamm wurde *lacZ* ausgehend vom *rhaEW*-Promotor konstitutiv transkribiert. Eine ÜNK von SH61 wurde in einer 1:50 Verdünnung in eine 50 ml-Hauptkultur überführt. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C (Schüttler) wurden ca. 20 OD₆₀₀ Zellen geerntet (Heraeus Megafuge, 5.000 rpm, 5 min, RT) und das Zellpellet einmal mit 500 µl H₂O_{mp} gewaschen. Die Expression von *lacZ* wurde mittels Miller Assay kontrolliert (Kapitel 3.2.3.1).

Die RNA wurde mit dem „RNeasy® Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. RNase-freies H₂O_{mp} bzw. TE 10.01 wurde durch Behandlung mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (vor Zugabe des primären Amins TRIS) bei 37 °C über Nacht hergestellt und anschließend unter dem Abzug 45 min im Dampfdrucktopf autoklaviert. Das Zellpellet wurde in 100 µl RNase-freiem TE mit 5 mg ml⁻¹ Lysozym resuspendiert und die Zellen 15 min bei 37 °C und 850 rpm aufgeschlossen (Eppendorf Thermomixer Compact). Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll für die Reinigung von RNA-Proben. Der mitgelieferte RLT-Puffer wurde dazu mit 10 µl ml⁻¹ β-Mercaptoethanol versetzt. Die RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem H₂O_{mp} von der Säule eluiert und auf Eis gelagert. Die Gesamt-RNA wurde zunächst mit DNase I behandelt. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 39 µl RNase-freiem H₂O_{mp}, 10 µl des mitgelieferten 10× Reaktionspuffers und 1 µl (2 U µl⁻¹) DNase I (RNase-frei) gemischt und der Reaktionsansatz 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA erneut mit dem kommerziellen Kit „RNeasy® Mini“ (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Die Integrität der gewonnenen Gesamt-RNA wurde auf einem Agarosegel anhand der ribosomalen Banden (16S und 23S) überprüft.

Anschließend wurden 50 µg RNA nach der Zugabe von 2 Volumen 100 % EtOH und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,2) über Nacht bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge *fresco*, 10 min, 13.000 rpm, 4 °C) pelletiert und 2-mal mit 200 µl 100 % EtOH gewaschen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wurde in 4 µl RNase-freiem H₂O_{mp} resuspendiert und die mRNA von Interesse mit dem Cy5-markierten Primer s10620 in cDNA transkribiert. Zunächst wurde die

RNA-Lösung 3 min bei 65 °C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt bevor 0,5 µl (20 U) RNase-Inhibitor (aus der Maus, NEB, Frankfurt/Main), 0,5 µl Primer (10 pmol/µl), 1 µl 100 mM Dithiothreitol und 2 µl 5× cDNA-Synthese-Puffer (für ProtoScript® II-Enzym) zugegeben wurden (alle folgenden Schritte wurden möglichst abgedunkelt durchgeführt). Die Anlagerung des Primers wurde 20 min bei 55 °C durchgeführt und der Reaktionsansatz anschließend für 5 min auf RT abgekühlt. Daraufhin wurde die reverse Transkription durch die Zugabe von 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl (200 U) der reversen Transkriptase ProtoScript® II gestartet. Nach Inkubation für 1 h bei 42 °C wurde die Reaktion mit 5 µl 3× Ladebuffer „Gel Loading Dye, Purple“ (NEB, Frankfurt/Main) beendet. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Der *amyE*-Integrationsvektor pSTH22, der das P_{rhaEW} -*lacZ*-Fusionskonstrukt trägt und zur Generierung des Stammes SH61 verwendet wurde, wurde mit dem Primer s10620 wie in Kapitel 3.2.2.21 beschrieben sequenziert.

Die DNA-Proben wurden 3 min bei 80 °C denaturiert, bevor jeweils 5 µl am automatischen DNA-Sequenziergerät ALFexpress II (ehemals Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) aufgetrennt wurden (Kapitel 3.2.2.22).

3.2.2.19 Transkriptionsstartbestimmung mittels ARF-TSS

Eine weitere Bestimmung des Transkriptionsstarts erfolgte nach einer auf der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) basierten Methode nach Wang *et al.* (2012), die als ARF-TSS (für *Adapter- and radioactivity-free identification of transcription start sites*) bezeichnet wird. Als Ausgangsmaterial diente eine mit DNase I behandelte RNA-Probe, die aus dem Regulator-defizienten *B. subtilis* Stamm SH61 ($\Delta rhaR \Delta amyE::ter-P_{rhaEW}$ -*lacZ*-*spc*) isoliert wurde (wie bereits zuvor beschrieben, Kapitel 3.2.2.18). Um die Integrität der gereinigten Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde die Schärfe der ribosomalen 16S- und der 23S-Bande (von ca. 1 µg Gesamt-RNA) mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Im nächsten Schritt wurde das mRNA-Produkt des konstitutiv transkribierten P_{rhaEW} -*lacZ*-Reportergenkonstrukts in cDNA umgeschrieben. Hierbei diente ca. 1 µg der isolierten Gesamt-RNA als Template. Die reverse Transkription mit ProtoScript® II erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.2.18 beschrieben. Als Primer für die Reaktion diente hier jedoch der Rückwärts-Primer s9589 (R1-Primer), welcher innerhalb des

lacZ-Gens bindet und an seinem 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt. Nach 60 min Inkubation bei 42 °C wurde die RNA durch 1 N NaOH (30 min bei 65 °C) abgebaut (Eppendorf Thermomixer Compact). Die cDNA wurde dann mit dem Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ entsprechend dem Protokoll des Herstellers gereinigt und mit 15 µl des mitgelieferten NE-Puffers aus der Säule eluiert.

Mit Hilfe der T4-RNA-Ligase wurde die erhaltene cDNA zirkularisiert. Der Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt 1 ng cDNA, 1 µl 10× Reaktionspuffer (vom Hersteller mitgeliefert), 1 µl BSA (1 mg ml⁻¹) und 1 µl (10 U µl⁻¹) T4-RNA-Ligase. Die cDNA wurde über Nacht bei 4 °C ligiert. Auf diese Weise wurde der Startpunkt der Transkription mit dem 5'-Ende des R1-Primers (s9589) verknüpft. Nach erneuter Aufreinigung wurde die gesamte ligierte cDNA als Template in einer PCR mit der Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase (Kapitel 3.2.2.1) eingesetzt. Die Amplifikation dieser zirkulären DNA-Struktur wurde mit den Rücken-an-Rücken Primern s10285 (F3-Primer) und s10286 (R2-Primer) durchgeführt. Diese beiden Oligonukleotide binden stromaufwärts des R1-Primers (s9589) an *lacZ*. Das ca. 165 bp große, gereinigte PCR-Produkt wurde mittels *Gibson Assembly* in den *Sall/KpnI*-verdauten Sequenzierungsvektor pUC18 kloniert. Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurde aus drei der erhaltenen positiven Transformanten Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

3.2.2.20 *in vitro*-DNase I-Footprinting-Experiment

Um die genaue Sequenz zu ermitteln, an die ein Regulatorprotein bindet, wurde ein DNase I-Footprinting-Experiment durchgeführt. Zunächst wurde das DNA-Bindeprotein in einer *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)-Bindungsreaktion (Kapitel 3.2.3.8) an ein am 5'-Ende Cy5-markiertes DNA-Fragment gebunden, welches die mutmaßliche Bindestelle enthält. Die Bindungsreaktion enthielt 600 fmol DNA (bzw. ca. 2 pmol DNA bei einer späteren Auftrennung durch Kapillarelektrophorese), aufsteigende Mengen an über Strep-Tactin aufgereinigtem Protein und das entsprechende Volumen an 5× EMSA-Bindungspuffer (Endkonzentration 1×). Nach Beendigung der Bindungsreaktion wurden 10 mM MgCl₂ zugefügt und der Ansatz 5 min bei RT präinkubiert. Die DNA wurde nach der Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von DNase I 1 min bei RT

hydrolytisch gespalten. Diese Vorgehensweise diente dazu, die Reaktionsbedingungen zu eruieren, bei denen die Endonuklease jedes DNA-Molekül nur einmal schneidet. Hierfür wurden zuvor verschiedene Verdünnungsstufen der DNase I-Lösung ($2 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) mit DNase I-Puffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,0; 50 mM NaCl; 1 mM TCEP; 10 mM MgCl_2 ; 50 % Glycerin) hergestellt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 1 Volumen Stopplösung (50 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kälber-Thymus-DNA) beendet. Als Negativkontrolle diente das Bandenmuster des jeweiligen DNA-Fragments, das in Abwesenheit des Regulators durch die DNase I verdaut wurde.

Zur Kontrolle der DNA-Protein-Interaktion wurde die EMSA-Bindungsreaktion gleichzeitig mit einem äquivalenten, FITC-markierten DNA-Fragment durchgeführt und in einem nativen Polyacrylamid-Gel analysiert.

Vor der Auftrennung mit der ALFexpress II-Apparatur (ALFexpress II, ehemals Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) wurden die Proben durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Zur Abtrennung der Proteine wurde das DNA-Protein-Gemisch mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) versetzt und zentrifugiert (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 5 min, 13.200 rpm, RT). Die DNA, welche in der oberen wässrigen Phase enthalten war, wurde vorsichtig abgezogen (ca. 0,4 Volumen) und mit 2 Volumen 100 % EtOH über Nacht bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Nach dem die DNA 30 min bei 13.000 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert wurde (Heraeus Biofuge *fresco*), wurde das DNA-Pellet mit $500 \mu\text{l}$ 100 % EtOH gewaschen (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 5 min, 13.200 rpm, RT) und luftgetrocknet. Die DNA wurde in $10 \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ aufgenommen und mit $5 \mu\text{l}$ 3x Ladepuffer „Gel Loading Dye, Purple“ (NEB, Frankfurt/Main) versetzt.

Die Probenvorbereitung für die Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese erfolgte durch Ethanol-Fällung der DNA. Die Ansätze wurden mit 2 Volumen 100 % EtOH und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gemischt und die DNA über Nacht bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ präzipitiert. Die pelletierte DNA (Heraeus Biofuge *fresco*, 30 min, 13.000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) wurde zweimal mit je $200 \mu\text{l}$ 70 % EtOH gewaschen (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 5 min, 13.200 rpm, RT) und das Pellet getrocknet (SpeedVac Concentrator SVC100H des Herstellers Savant). Die DNA wurde in $6 \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$ resuspendiert. Für die spätere Auftrennung der DNA über Kapillarelektrophorese wurden $5 \mu\text{l}$ je Probe eingesetzt.

Alle hier beschriebenen Schritte wurden möglichst lichtgeschützt durchgeführt.

Zur Bestimmung der Nukleotidabfolge des geschützten DNA-Abschnitts wurde das verwendete DNA-Fragment wie in Kapitel 3.2.2.21 beschrieben sequenziert. Hierfür wurde derselbe Vektor als Template eingesetzt, der auch bei der Amplifikation des DNA-Fragments mittels PCR zum Einsatz kam. Die DNA-Sequenzierungsproben wurden anschließend gleichzeitig mit der DNase I-verdauten DNA elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.2.2.22 bzw. 3.2.2.23).

3.2.2.21 DNA-Sequenzierung mit dem Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit

Die Sequenzierungsreaktionen der Vektoren pSTH22 und pSTH111 wurden mit dem „Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit“ (Affymetrix Inc., High Wycombe, UK) nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden Primer verwendet, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert waren.

Tabelle 3.24 Pipettierschema für 4 Sequenzierungsreaktionen mit dem „Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit“ (Affymetrix Inc., High Wycombe, UK).

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (ca. 40 fmol)	
Reaktionspuffer	2,0 µl
Cy5-markierter Primer (4 pmol/µl)	1,0 µl
DMSO	1,0 µl
Thermo Sequenase™ DNA-Polymerase	2,0 µl
H ₂ O _{mp}	ad 17,5 µl

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung (Tabelle 3.24) wurde à 4 µl aliquotiert und jedes Aliquot mit 4 µl eines Terminationsmixes (ddATP, ddCTP, ddGTP bzw. ddTTP) versetzt. Im Anschluss wurde die Sequenzierung im Thermozykler durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind Tabelle 3.25 zu entnehmen.

Tabelle 3.25 *Cycle-Sequencing-Programm* für die DNA-Sequenzierung unter Verwendung des „Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kits“ (Affymetrix Inc., High Wycombe, UK). Die Annealing-Temperatur (X) wurde 5–10 °C niedriger als die Schmelztemperatur des eingesetzten Oligonukleotid-Primers gewählt. Die Schmelztemperatur (T_m) wurde näherungsweise aus dem GC-Gehalt des Oligonukleotids nach der Wallace-Regel (T_m in °C = $2 \times [\text{Anzahl A+T}] + 4 \times [\text{Anzahl G+C}]$) berechnet.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	
95 °C	0,5 min	30×
X °C	0,5 min	
72 °C	1 min	
4 °C	∞	

Die elektrophoretische Auftrennung und die Auswertung der Cy5-markierten DNA-Proben fanden entweder am automatischen DNA-Sequenziergerät ALFexpress II (ehemals Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) oder am Kapillarelektrophorese-System CEQ8000 (Beckman Coulter) statt.

Für eine spätere Auftrennung am DNA-Sequenziergerät ALFexpress II wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 4 µl 3× Ladepuffer „Gel Loading Dye, Purple“ (NEB, Frankfurt/Main) beendet und bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Auftrennung von je 5 µl Probe wurde die DNA 3 min bei 80 °C denaturiert.

Sollten die DNA-Proben durch eine Kapillarelektrophorese analysiert werden, so wurde der Reaktionsansatz durch eine Ethanolpräzipitation wie in Kapitel 3.2.2.20 beschrieben gereinigt und in 39,5 µl *Sample Loading Solution* (reines Formamid, Produktnummer 608082, Beckman Coulter) resuspendiert. Als Längenstandard für die Auftrennung wurden 0,5 µl GenomeLab™ DNA Size Standard 600 (Produktnummer 608095, Beckman Coulter) zugefügt.

3.2.2.22 Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit der ALFexpress II-Apparatur

Die am 5'-Ende mit dem Fluorophor Cy5 markierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem automatischen DNA-Sequenziergerät ALFexpress II (ehemals Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) getrennt. Das 0,3 mm dicke Sequenziergel enthielt 6 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid und 7,5 M Harnstoff (Rotiphorese® Sequenzier-Gelsystem A431, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Tabelle 3.7). Vor dem Auftragen von je 5 µl Probe auf das Polyacrylamid-Gel wurde die DNA 3 min auf 80 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Detektion der DNA wurde durch die Cy5-Markierung der Abbruchfragmente ermöglicht. Die Auftrennung erfolgte unter den in Tabelle 3.26 aufgeführten Bedingungen mit 0,5× TBE als Laufpuffer.

Tabelle 3.26 Elektrophorese-Bedingungen für die Auftrennung von DNA im ALFexpress II-Sequenziergerät.

Parameter	Wert
Laufzeit	500 min
Spannung	1500 V
Stromstärke	60 mA
Leistung	30 W
Temperatur	55 °C
Sample int.	2 s

3.2.2.23 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wurde mit dem automatischen Sequenziersystem CEQ8000 (Beckman Coulter) durchgeführt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden nach der Reinigung mit 0,5 µl des Längenstandards GenomeLab™ DNA Size Standard 600 (Produktnummer 608095) versetzt und mit *Sample Loading Solution* (reines Formamid, Produktnummer 608082, beides Beckman Coulter) auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente

erfolgte bei einer Spannung von 4,2 kV für 75 min mit der voreingestellten Methode „Frag-4“.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 β -Galactosidase-Aktivitätstest (Miller Assay)

Zur Durchführung von Promotoranalysen wurde der zu untersuchende Promotor unmittelbar stromaufwärts des *lacZ*-Gens kloniert. Auf diese Weise wurde die Promotoraktivität durch die Aktivität des Reporterenzym dargestellt. Die quantitative Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte nach Miller (1972).

Hierzu wurde eine 10 ml-Hauptkultur in LB_{Spc} 1:50 mit einer ÜNK angeimpft. Nach 2-stündigem Wachstum bei 37 °C lag die OD₆₀₀ der Kulturen bei ca. 0,4 und es wurden 0,2 % des jeweiligen Induktors zugefügt. Die Kulturen wurden bis zur letzten Probenahme weiter bei 37 °C inkubiert (Schüttler). Zur Messung der Enzymaktivität wurde die OD₆₀₀ der Kultur bestimmt und es wurden 100 μ l Zellsuspension entnommen. Nach der Zugabe von 900 μ l Z-Puffer und 10 μ l Toluol zu der entnommenen Probe (eventuell geeignet verdünnt) wurde diese für 30 min bei 37 °C rotiert. Anschließend wurde das Toluol unter dem Abzug abgedampft. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 200 μ l des chromogenen Substrats *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (20 mM Lösung in Z-Puffer) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C (Eppendorf Thermomixer Compact) inkubiert und die Zeit bis zur Beendigung der Reaktion gemessen. Beim Eintreten einer deutlichen Gelbfärbung wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 μ l Na₂CO₃ (1 M) abgebrochen. Unmittelbar danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 1 min, 13.200 rpm) und die OD bei den Wellenlängen 420 nm und 550 nm im Photometer gegen die Blindprobe gemessen.

Die Enzymaktivität in Miller Units (M. U.) wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$1 \text{ Miller Unit} = 1000 \times \frac{OD_{420} - (1,75 \times OD_{550})}{t \times V \times OD_{600}}$$

Erläuterungen: t , Reaktionszeit in Minuten; V , Probenvolumen in Milliliter (hier 0,1); OD_{420} , Absorption von *o*-Nitrophenol; OD_{550} , Streuung durch Zelldebris (1,75 = Annäherungsfaktor für den durch Zelldebris verursachten Fehler bei 420 nm); OD_{600} , Zelldichte.

Für die Untersuchung der Regulation des Glucomannan-Operons wurde von diesem Protokoll abgewichen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Gluco- und Galactomannan konnte hier keine hochkonzentrierte Stammlösung verwendet werden. Daher war es notwendig, das bestehende Protokoll abzuändern. Mit der Übernackkultur wurde zunächst eine 30 bzw. 40 ml-Vorkultur angeimpft und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Bestimmung der erreichten OD_{600} wurde die Vorkultur in mehrere Hauptkulturen gesplittet. Dazu wurden pro Hauptkultur je 4 OD_{600} Zellen aus der Vorkultur entnommen und bei RT 5 min bei 5.000 rpm pelletiert (Heraeus Megafuge). Unmittelbar danach wurden die Zellen in 10 ml Hauptkulturmedium resuspendiert, welches auf 37 °C vorgewärmt wurde. Das Hauptkulturmedium wurde aus 10× LB-Medium hergestellt (1× Endkonzentration) und mit 0,2 % des jeweiligen Zuckers (1%ige Stammlösung) und Spectinomycin versetzt.

Wurden die Kulturen in Spizizens Minimalmedium (SMM) ohne Citrat angezogen, so wurden die Zellen von Beginn an mit dem entsprechenden Zucker induziert, um ein Wachstum zu ermöglichen.

3.2.3.2 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Um die Zellproteine freizusetzen, wurden die *E. coli* Zellen mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators EmulsiFlex[®]-C5 (Avestin Europe GmbH, Mannheim) aufgeschlossen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die pelletierten Zellen in ca. 15 ml Waschpuffer W (100 mM TRIS/HCl pH 8; 150–300 mM NaCl) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann einem Druck von ca. 10.000 bis 15.000 kPa ausgesetzt. Nach vollständiger Lyse der Kultur (ca. 3-5 Durchläufe) wurde die lösliche Zellfraktion durch Zentrifugation (Sorvall RC 5B Plus Kühlzentrifuge, SS-34-Festwinkelrotor, 30 min, 15.000 rpm, 4 °C) von der unlöslichen Zellfraktion abgetrennt. Der lösliche Rohextrakt wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und das Sediment in dem gleichen Volumen Waschpuffer W resuspendiert. Um die Löslichkeit des Proteins von Interesse zu untersuchen, wurde von beiden Fraktionen eine Probe (je 12 µl) entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der Genexpression dienten gleich behandelte Proben einer mitgeführten Kontrollkultur, welche nicht induziert wurde.

3.2.3.3 Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mittels Strep-Tag

Nach dem Zellaufschluss wurde das gewünschte Strep-Tag II-Protein mittels Affinitätschromatographie aus der löslichen Fraktion des Rohextrakts isoliert (Tabelle 3.5) (Schmidt & Skerra, 2007). Alle folgenden Schritte wurden bei ca. 4 °C durchgeführt. Die Trennsäule wurde mit 0,5–1 ml Strep-Tactin® Sepharose® (IBA GmbH, Göttingen) gepackt und mit 5 Säulenvolumen (engl. *column volume*, CV) Waschpuffer W äquilibriert. Danach wurde das geklärte Lysat vollständig auf die Säule aufgetragen. Es folgten 5 Waschrunde mit je 1 CV Puffer W. Das gewünschte Protein wurde in 6 Schritten durch die Zugabe von je 0,5 CV Puffer E von der Säule eluiert (GmuR-Strep-Tag wurde in 4 Schritten eluiert; wobei für den ersten und den letzten Schritt 1 CV eingesetzt wurde). Zuletzt wurde die Säule mit 3× 5 CV Puffer R und anschließend 0,5 ml 0,5 M NaOH regeneriert und mit 2× 4 CV Puffer W erneut äquilibriert.

Die Reinigung des Proteins wurde mittels SDS-PAGE verfolgt. Von jeder einzelnen Wasch- und Elutionsfraktion sowie vom Durchfluss wurden hierzu je 12 µl Probe entnommen. Um die Reinheit des rekombinanten Proteins zu bestimmen, wurde die Intensität der mit Coomassie gefärbten Proteinbanden mittels ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) gemessen.

3.2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Beim Bradford-Test (Bradford, 1976) wird die unspezifische Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 an v.a. basische und aromatische Aminosäurereste ausgenutzt (Compton & Jones, 1985), um den Proteingehalt einer Probe quantitativ zu bestimmen. Der Triphenylmethanfarbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Die Komplexbildung mit Proteinen bewirkt eine Stabilisierung der

anionischen Form und hierdurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm (Compton & Jones, 1985).

Für die Messung des Proteingehalts einer Probe wurde der Protein Assay der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Das 5× konzentrierte Färbereagenz wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Zu 1 ml 1× Farbreagenz wurden 20 µl Probe (in geeigneter Verdünnung) hinzugefügt, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte gegen das freie 1× Farbreagenz (1 ml), das mit 20 µl der für die Reinigung verwendeten Pufferlösung (ohne Desthiobiotin) versetzt wurde. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt, die mit Hilfe des Standardproteins BSA (0,2–0,6 mg ml⁻¹) erstellt wurde.

3.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970), die in einem vertikalen System durchgeführt wurde. Das diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel setzte sich aus einem 3%igen Sammelgel (pH 6,8) und einem 15%igen Trenngel (pH 8,8) zusammen (Tabelle 3.6). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Volumen an 5× SDS-Auftragspuffer versetzt und in Gegenwart von β -Mercaptoethanol für 5 min bei 99 °C (Eppendorf Thermomixer Compact) denaturiert und reduziert.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel bis die Proben am Ende des neutralen Sammelgels in einer Ebene konzentriert vorlagen. Als Laufmittel diente 1× TRIS-Glycin-SDS-Puffer (Rotiphorese® 10× SDS-PAGE, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Als Komigrationsstandard wurde der Proteinmarker „PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder“ (Thermo Scientific) eingesetzt. Nach dem Eintritt der Proben in das leicht alkalische Trenngel erfolgte die eigentliche Auftrennung der Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel. Sobald die Bromphenolblau-Front das Trenngel vollständig durchlaufen hatte, wurde die Gelelektrophorese beendet.

Die Proteinbanden wurden durch die Coomassie-Blau-Färbung visualisiert (Tabelle 3.6). Das Polyacrylamid-Gel wurde dazu zunächst 30 min unter Schütteln bei RT

gefärbt. Anschließend wurde die Coomassie-Färbelösung durch die Entfärbelösung ausgetauscht und erneut 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Zur Entfärbung des verbliebenen Hintergrunds folgte eine weitere Inkubation in 7,5 % (v/v) Essigsäure bis der ungebundene Farbstoff restlos aus dem Gel gelöst wurde.

3.2.3.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird in Abwesenheit des denaturierenden Detergens SDS unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Laufgeschwindigkeit der Proteine, die in ihrer aktiven, funktionellen Form vorliegen, durch ihre Größe und ihre pH-abhängige Nettoladung bestimmt. Die native PAGE wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Laufgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten in An- und Abwesenheit eines potenziellen DNA-Bindeproteins zu untersuchen (EMSA, Kapitel 3.2.3.8). Die Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes verursacht ein verzögertes Laufverhalten gegenüber der ungebundenen DNA. Für die Auftrennung von freien DNA-Fragmenten (50–400 bp) oder von freien doppelsträngigen Oligonukleotiden (20–70 bp) und dem gebundenen DNA-Protein-Komplex eignen sich Polyacrylamid-Gele mit einem Vernetzungsgrad von 4–12 % (Laniel *et al.*, 2001). Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Gele kann Tabelle 3.27 entnommen werden.

Tabelle 3.27 Native Polyacrylamid-Gele (6 %). Zur Analyse des RhaR-DNA-Komplexes (a) und der GmuR-DNA-Komplexe (b) wurden unterschiedliche Gele eingesetzt. *) 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1.

Komponente	Volumen ^a	Volumen ^b
H ₂ O _{mp}	7,6 ml	5,7 ml
Rotiphorese [®] Gel 30*	2 ml	2 ml
50× TAE-Puffer	200 µl	-
10× TBE-Puffer	-	200 µl
TEG	-	2 ml
10 % (w/v) APS	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Nachdem das Polyacrylamid-Gel polymerisiert war (nach ca. 45 min) wurde ein 15-minütiger Vorlauf des Gels bei 4 °C und 10 mA pro Gel durchgeführt, um eine konstante Temperatur während der Probenaufftrennung zu gewährleisten (Laniel *et al.*, 2001). Als Laufpuffer wurde 1× TAE-Puffer (bzw. 0,05× TBE für die Analyse der GmuR-DNA-Komplexe verwendet. Im Anschluss wurden je Probe 10 µl aufgetragen. Als Farbmarker für die Bestimmung der Laufgeschwindigkeit wurde 5× SDS-Auftragspuffer verwendet. Der Elektrophoreselauf wurde bei 20 mA (bzw. 5 mA bei 0,05× TBE) pro Gel so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front (nach ca. 1 h) die Unterkante des Gel erreicht hatte. Um eine Dissoziation des DNA-Protein-Komplexes während der elektrophoretischen Auftrennung zu verhindern, wurde diese bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Außerdem wurde eine Photobleichung des Fluorophors durch Abdecken der Elektrophoresekammer mit einem Kartondeckel vermieden. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Banden wurden mit dem „Molecular Dynamics Storm 860 PhosphorImager™“ (GE Healthcare GmbH, München) detektiert.

3.2.3.6.1 Natives Polyacrylamid-Gradientengel (5–20 %)

Zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins in seiner nativen Form wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers ein natives Polyacrylamid-Gradientengel (5–20 %) hergestellt (Tabelle 3.28). Es wurden 300 ng–12 µg gereinigtes Protein (Benzonase-behandelt, siehe Kapitel 3.2.3.7), das zuvor mit 5 % (v/v) Glycerin versetzt wurde, aufgetragen. Als Anhaltspunkt für den Fortschritt der Elektrophorese wurde in eine Spur 5× SDS-Auftragspuffer aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 20 mA pro Gel mit 1× TAE als Laufpuffer so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front des SDS-Auftragspuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die Coomassie-Färbung erfolgte wie für die SDS-PAGE beschrieben (Kapitel 3.2.3.5).

Tabelle 3.28 Zusammensetzung des nativen Polyacrylamid-Gradientengels (5–20 %). *) 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1.

Komponente	5 %	20 %
H ₂ O _{mp}	8 ml	3 ml
Rotiphorese® Gel 30*	1,7 ml	6,7 ml
50× TAE-Puffer	200 µl	200 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

3.2.3.7 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in ihrem nativen Zustand wurde die gereinigte Proteinfraction mittels Größenausschluss-Chromatographie (auch Gel-Permeations-Chromatographie, GPC) aufgetrennt.

Dazu wurden zunächst die Wirtszellen geerntet, in denen die Transkription des Strep-Tag II-Proteins induziert wurde, und diese im Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex®-C5 (Avestin Europe GmbH, Mannheim) aufgeschlossen (Kapitel 3.2.3.2). Die DNA im geklärten Lysat (Überstand) wurde anschließend durch die Benzonase-Endonuklease abgebaut. Dies erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation des Rohextrakts bei RT mit 2 mM MgCl₂ und 2 µl ($\geq 250 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) Benzonase® Nuclease (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Der DNA-Abbau wurde auf einem Agarosegel verfolgt. Anschließend wurde der Rohextrakt auf eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule aufgetragen, um das Protein von Interesse zu isolieren (Kapitel 3.2.3.3). Um eventuell ausgefallenes Protein abzutrennen, wurde das Säuleneulat vor der Auftrennung abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 10 min, 13.000 rpm, 4 °C) und der Überstand eingesetzt.

Die GPC wurde bei RT an einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage (Merck Hitachi, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Diese setzte sich zusammen aus einer L-7100 Pumpe, einer L-7000 Schnittstelle, einem Rheodyne 9725i-Injektor mit einer 100 µl-Probenschleife und einem S3205 UV/VIS-Detektor (Sykam GmbH, Gilching) zur Detektion der Proteine bei 280 nm. Die chromatographische Auftrennung erfolgte in zwei miteinander verbundenen TSKgel®

G3000SW_{XL} Säulen (7,8 mm ID × 30 cm L, 5 µm) (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart) bei einer Flussrate von 0,5 ml min⁻¹. Das verwendete Laufmittel ist bei jedem Versuch angegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Software „D-7000 HPLC System Manager“.

Zur Kalibrierung der TSKgel® G3000SW_{XL} Säule wurden die in Tabelle 3.29 aufgeführten Standardproteine eingesetzt. Das Totvolumen (V_0) entsprach dem Elutionsvolumen (V_e) von Dextran Blau 2000.

Tabelle 3.29 Als Größenstandard für die Kalibrierung der TSKgel® G3000SW_{XL} Säule (Tosoh Bioscience, Stuttgart) verwendete Proteine mit Molekulargewicht (MW) und Hersteller.

Protein	MW (kDa)	Hersteller
Carboanhydrase	29	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Conalbumin	75	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Dextran Blau	2.000	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
γ-Globulin	158	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Myoglobin	17	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Ovalbumin	44	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Ribonuklease A	13,7	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

3.2.3.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) wurde eine vermutete Interaktion zwischen einem DNA-Bindeprotein und einem bestimmten DNA-Fragment untersucht und die DNA-Bindeeigenschaften näher charakterisiert. Der Sequenzabschnitt, innerhalb dessen eine Bindestelle für ein DNA-bindendes Protein vermutet wurde, wurde entweder mittels PCR amplifiziert oder durch die Hybridisierung von kurzen (ca. 30–50 bp), zueinander komplementären Oligonukleotiden generiert (Kapitel 3.2.2.5). Um eine spätere Detektion der zu testenden DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurden diese markiert, indem Primer verwendet wurden, die an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (bzw. Cy5) modifiziert waren.

Die Bildung des DNA-Protein-Komplexes erfolgte während einer Bindungsreaktion, in die 40–200 fmol PCR-Fragmente (bzw. 50 fmol doppelsträngiges Oligonukleotid) und

durch Affinitätschromatographie gereinigtes Protein eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle diente eine DNA-Probe ohne Proteinzugabe. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 μl (aufgefüllt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{mp}}$) durchgeführt und in 1 \times EMSA-Bindungspuffer (Tabelle 3.7) 30 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert (Anm.: bei der Analyse der GmuR-DNA-Komplexe enthielt die Bindungsreaktion zusätzlich 4 % TEG). Unmittelbar danach wurde die gesamte Bindungsreaktion in einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Kapitel 3.2.3.6).

Die Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

3.2.3.8.1 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D

Die DNA-Protein-Interaktion wurde durch die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D quantitativ analysiert. Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität des Regulators zum eingesetzten Sequenzabschnitt. Je größer der Wert, desto geringer ist die Affinität bzw. desto mehr wird die dissoziierte Form bevorzugt. Für die Bestimmung der K_D wurde der EMSA wie zuvor beschrieben mit schrittweise aufsteigenden Proteinnengen durchgeführt. Die Auswertung wurde mit der ImageQuant Software (Version 5.2, Molecular Dynamics) vorgenommen, welche es ermöglicht, die Intensität der DNA-Banden, die der freien DNA-Probe bzw. dem RhaR-DNA-Komplex entsprechen, zu bestimmen. Die Fluoreszenzintensität wurde um die Hintergrundintensität korrigiert. Der prozentuale Anteil an freier, ungebundener DNA wurde anhand der Gesamtintensität der jeweiligen Spur (freie DNA-Bande und DNA-Bande des DNA-Protein-Komplexes) berechnet und anschließend in einem Koordinatensystem gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante entspricht dem Wert, bei dem 50 % der DNA-Fragmente durch das DNA-Bindeprotein gebunden sind.

3.2.3.9 Thermal Shift Assay (Differential Scanning Fluorimetry)

Der *Thermal Shift Assay* wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob potentielle Effektormoleküle eines Regulatorproteins mit diesem interagieren. Die temperaturabhängige Entfaltung eines Proteins kann durch die Verwendung des

unspezifischen Proteinfarbstoffs SYPRO Orange durch eine Zunahme seiner Fluoreszenz beobachtet werden. Dieser Effekt beruht auf der Löschung der Fluoreszenz von SYPRO Orange in wässriger Umgebung und der unspezifischen Interaktion des Farbstoffs mit hydrophoben Seitenketten aus dem Inneren von Proteinen, die im Verlauf der Proteindenaturierung zunehmend exponiert werden. Die Schmelzkurve eines Proteins kann daher über die Zunahme der Fluoreszenzintensität von SYPRO Orange ermittelt werden. Die Bindung eines niedermolekularen Liganden führt zu einer Stabilisierung des Proteins, die durch eine höhere Schmelztemperatur angezeigt wird.

Die 5000× konzentrierte Stammlösung „SYPRO® Orange Protein Gel Stain“ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) wurde unmittelbar vor der Verwendung 1:100 in DMSO verdünnt. Die Reaktionsansätze enthielten je 5× SYPRO® Orange und wurden durch die Zugabe des entsprechenden Volumens des Puffers der Proteinlösung auf ein konstantes Gesamtvolumen von je 50 µl gebracht. Die Schmelzkurve des Komplexes aus SYPRO® Orange und Protein wurde mit dem quantitativen Echtzeit-PCR-Gerät „Mastercycler® ep realplex“ (Eppendorf AG, Hamburg) aufgezeichnet. Dazu wurde die Intensität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 520 nm über einen Temperaturbereich von 20 °C bis 90 °C in Intervallen von 0,2 °C gemessen.

3.2.4 Herstellung von Rhamnulose-1-Phosphat

3.2.4.1 In vitro-Phosphorylierung von Rhamnulose mittels RhaB

Die *in vitro*-Phosphorylierung von Rhamnulose mit Hilfe der zuvor gereinigten *E. coli* Kinase RhaB wurde nach Chiu & Feingold (1964) durchgeführt. Es wurden 2,5 µM RhaB-Strep-Tag; 5 mM L-Rhamnulose; 25 mM ATP; 5 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol und 50 mM TRIS/HCl (pH 8,5) in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsprodukt, Rhamnulose-1-Phosphat, wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt.

Die Phosphorylierung wurde durch die Umkehrreaktion nachgewiesen. Die Dephosphorylierung von 10 µl des gereinigten Substrats Rhamnulose-1-Phosphat

wurde mit 20 U alkalischer Phosphatase in 1× Phosphatasepuffer 3 h bei 37 °C ausgeführt. Für die Auswertung wurde der gesamte Reaktionsansatz (20 µl) auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen.

3.2.4.2 Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung phosphorylierter Zucker

Die Phosphorylierung von Zuckern kann mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (DC) beobachtet werden. Um die Phosphorylierung von L-Rhamnulose nachzuweisen, wurde nach dem von Meyer *et al.* (1997) publizierten Protokoll vorgegangen. Je Ansatz wurden 2× 5 µl auf eine DC-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial der stationären Phase (Kieselgel 60 F254, Merck KGaA, Darmstadt) aufgetragen. Die luftgetrocknete DC-Platte wurde anschließend mit dem Laufmittel *n*-Butanol-Ethanol-H₂O (5:3:2, v/v/v) 3 h entwickelt. Um die Spots mit Zucker sichtbar zu machen, wurde die getrocknete DC-Platte kurz in das Ammoniumheptamolybdat/Cer(IV)sulfat-Reagenz (Tabelle 3.7) eingetaucht und nach dem Trocknen für ca. 10-20 min auf 90 °C erhitzt (Vakuumtrockenschrank Typ VTR 5036, Heraeus Holding GmbH, Hanau).

Um das Reaktionsprodukt der Phosphorylierung zu isolieren, wurde eine präparative DC durchgeführt. Dazu wurden 50 µl des Reaktionsansatzes - gleichmäßig auf drei Laufspuren verteilt - auf eine DC-Platte aufgetragen. Zusätzlich wurden 10 µl dieses Ansatzes auf die äußerste Laufspur aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte wie oben beschrieben. Die äußerste Laufspur wurde nach der Entwicklung von der DC-Platte abgetrennt und mit dem Ammoniumheptamolybdat/Cer(IV)sulfat-Reagenz gefärbt. Sie diente als Referenz für die Laufweite von Rhamnulose-1-Phosphat. Auf dieser Laufhöhe wurde das Trägermaterial von der ungefärbten DC-Platte abgekratzt. Der im Kieselgel enthaltene Zucker wurde durch die Zugabe von 300 µl 50 % EtOH aus dem Trägermaterial gelöst und das Kieselgel durch eine sich anschließende Zentrifugation (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, 10 min, 13.200 rpm, RT) abgetrennt. Das Eluat im Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und auf ein Endvolumen von 50 µl eingengt (SpeedVac Concentrator SVC100H des Herstellers Savant). Das auf diese Weise gereinigte Rhamnulose-1-Phosphat wurde in die darauffolgenden Versuche eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation des Rhamnose-Stoffwechsels in *Bacillus subtilis*

4.1.1 Rhamnose-Aufnahme in die Zelle

Die Gene für die Verwertung von Rhamnose liegen im Genom von *Bacillus subtilis* in einem Operon. Dieses wurde anhand von Sequenzhomologien identifiziert. Allerdings fehlt innerhalb des Operons ein Transporter für die Aufnahme von Rhamnose in die Zelle. *B. subtilis* kann nicht in Minimalmedium wachsen, wenn L-Rhamnose als einziges Kohlenhydrat zugegeben wird (Abbildung 4.1). Daher muss man annehmen, dass der Transporter auch nicht außerhalb dieses Operons kodiert wird, wie es z. B. bei *Escherichia coli* der Fall ist (Tate *et al.*, 1992).

Zu der Ordnung der Bacillales zählt auch das alkaliphile und halotolerante Tiefseebakterium *Oceanobacillus iheyensis*, dessen Genom ebenfalls bereits vollständig sequenziert wurde (Takami *et al.*, 2002). Innerhalb seines Rhamnose-Genclusters befindet sich das Gen *rhaY*, welches als L-Rhamnose spezifische Permease annotiert wurde (s. Anhang Abbildung 7.1).

Das *rhaY*-Gen wurde ektopisch unter der Kontrolle des endogenen Rhamnose-Promotors P_{rhaEW} in *B. subtilis* exprimiert. Dazu wurde zunächst die 1,3 kb große Deletionskassette für die Sporulationsgene *spoVAF'* bis *spoIIAA* aus dem Vektor pJOE6982.1 über *Bam*HI in den positiven Selektionsvektor pJOE4786.1 integriert (pSTH67). Die Promotorsequenz stromaufwärts des Rhamnose-Operons (P_{rhaEW}) und das Permease-Gen *rhaY* wurden über PCR amplifiziert (s10002/s9242 bzw. s10004/s10029). Als Template diente chromosomale DNA aus *B. subtilis* 168 bzw. aus *O. iheyensis*. Die PCR-Fragmente wurden über *Nde*I miteinander fusioniert und über *Sac*I mittig zwischen die beiden Fragmente der Deletionskassette von pSTH67 integriert (pSTH70).

Im letzten Schritt wurde die hierdurch konstruierte Integrationskassette $\Delta spoVAF'-spoIIAA::P_{rhaEW}-rhaY$ über *Bam*HI in den positiven Klonierungs- und Integrationsvektor pJOE6743.1 eingefügt (Vektor pSTH71.1). Die Manipulation des

Genoms von *B. subtilis* wurde durch die Verwendung eines markerlosen Deletions- (und Integrations-)Systems eingeführt, welches auf dem Suizidplasmid pJOE6743.1 basiert (s. Kapitel 3.2.2.17; Wenzel & Altenbuchner, 2015). Damit diese Methode eingesetzt werden kann, muss eine $\Delta manPA$ -Doppelmutation vorliegen. Deshalb wurde als Ausgangsstamm der nicht-sporulierende Stamm IIG-Bs168-4 eingesetzt, welcher von dem Laborstamm *B. subtilis* 168 abstammt. Der Stamm, der aus der Transformation von IIG-Bs168-4 mit pSTH71.1 hervorging, wurde als SH48 bezeichnet.

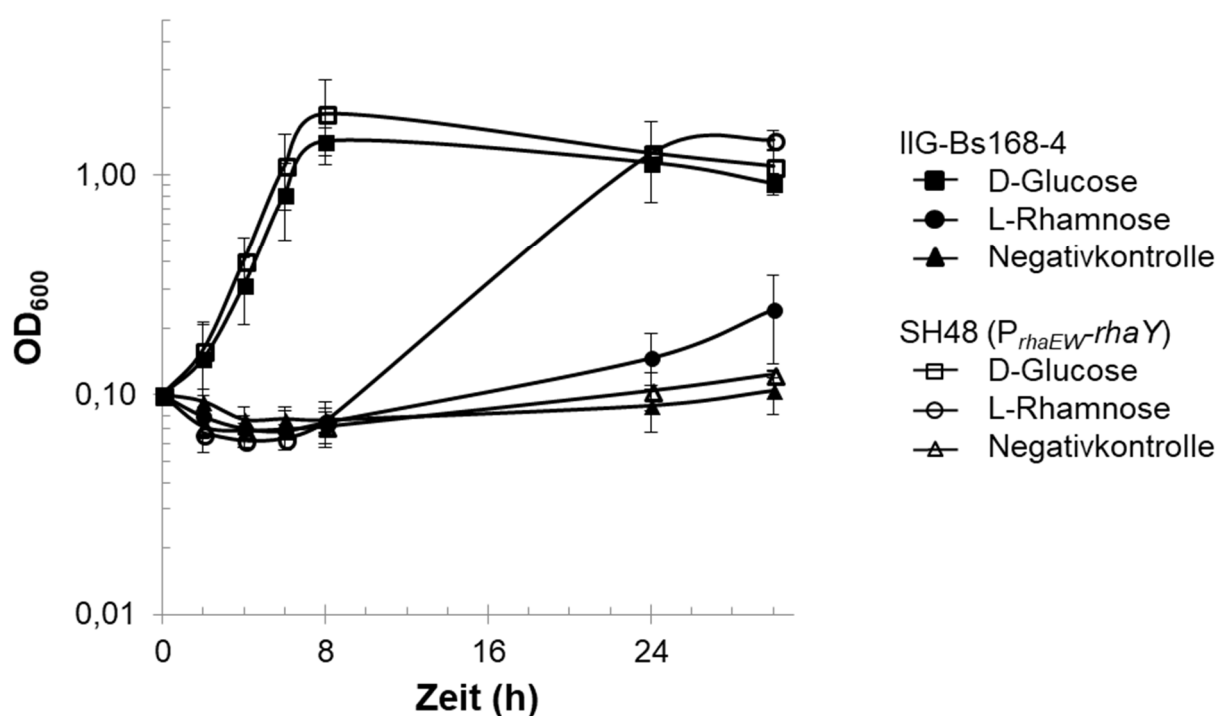


Abbildung 4.1 Wachstum von *B. subtilis* auf verschiedenen Zuckern. Das Wachstum der Stämme IIG-Bs168-4 (isogener Wildtyp, geschlossene Symbole) und SH48 ($\Delta spoVAF'-spoIIAA::P_{rhaEW}-rhaY$, offene Symbole) in SMM ohne Citrat (supplementiert mit 0,2 % Kalium-Glutamat und SEL) bei 37 °C wurde verfolgt. Als einzige Kohlenhydratquelle wurde je 0,2 % D-Glucose (Viereck) bzw. L-Rhamnose (Kreis) bereitgestellt (Dreieck, Negativkontrolle ohne Zucker). Die im Stamm SH48 genomisch integrierte *rhaY*-Expressionskassette setzt sich aus dem endogenen Rhamnose-Promotor (P_{rhaEW}) und dem Rhamnose-Permease-Gen *rhaY* aus *O. iheyensis* zusammen. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (Fehlerbalken) aus je drei Messungen.

Im Anschluss wurde das Wachstum des neu erzeugten Stamms mit dem des Ausgangsstamms bei 37 °C in Minimalmedium verglichen. Die Übernackturen wurden in SMM ohne Citrat (zusätzlich versetzt mit 0,2 % Kalium-Glutamat als Stickstoffquelle und Spurenelementlösung SEL) mit 0,5 % Glucose angezogen. Aus diesen wurden die Hauptkulturen so angeimpft, dass die Start-OD₆₀₀ 0,1 entsprach. Dazu wurden die Zellen aus der ÜNK zunächst pelletiert und gewaschen. Als einzige Kohlenhydratquelle wurde je 0,2 % L-Rhamnose bzw. D-Glucose, welche über das PTS-System aufgenommen wird, zur Verfügung gestellt. Die Negativkontrolle ohne Zucker zeigte kein Wachstum. Die Integration des vermuteten Rhamnose-Permease-Gens *rhaY* erlaubte das Wachstum in Minimalmedium mit Rhamnose als einzige Kohlenhydratquelle (Abbildung 4.1). Nach 30 h konnte ein deutlich höhere optische Dichte (OD₆₀₀ von 1,44) als beim Wildtyp (OD₆₀₀ von 0,24) gemessen werden. Allerdings wurde eine relativ lange *lag*-Phase beobachtet, die mindestens 8 h betrug.

4.1.2 Organisation der Gene für die Verwertung von Rhamnose (*rhaEWRBMA*) als Operon

Das regulatorische Gen *rhaR* befindet sich an zweiter Stelle des Operons für die Verwertung von L-Rhamnose (Abbildung 4.2 A). Bei einer vorausgegangenen Untersuchung des Transkriptom von *B. subtilis* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde neben der Transkriptionseinheit ausgehend von dem *rhaEW*-Promotor eine zweite Transkriptionseinheit detektiert. Diese beginnt 50 bp stromaufwärts der codierenden Sequenz von *rhaR* (Nicolas *et al.*, 2012).

Für die Untersuchung der Regulation der Rhamnose-Abbaugene wurde daher zunächst überprüft, ob die hintereinander geschalteten Gene gemeinsam reguliert werden oder ob sich ein weiterer Promotor vor *rhaR* befindet.

Dazu wurden 379 bp (s9243/s9242) bzw. 494 bp (s9939/s9940) der Sequenzen, die unmittelbar stromaufwärts von *rhaEW* (P_{rhaEW}) bzw. *rhaR* (P_{rhaR}) liegen, mit dem *lacZ*-Reporter gen des *amyE*-Integrationsvektors pKAM243 fusioniert. Die Promotorsequenz P_{rhaEW} wurde über die eingebrachten *NheI*- und *NdeI*-Schnittstellen in pKAM243 integriert (pSTH22). P_{rhaR} wurde mittels der *Gibson Assembly*-Klonierungsmethode zusammen mit einem *lacZ*-Amplifikat (s9363/s9776) über *NheI*/*AfeI* in pKAM243 eingebracht (pSTH64). Der *B. subtilis* Stamm IIG-Bs168-4

wurde mit den neu erzeugten Vektoren transformiert und die erhaltenen Einzelkolonien dahingehend selektioniert, dass ein Doppelcrossover-Ereignis stattgefunden hat. In Kolonien mit dem Genotyp *amyE⁻ spc^R erm^S* sollte das Promotor-*lacZ*-Fusionskonstrukt in den *amyE*-Locus integriert worden sein. Die generierten Stämme SH28 ($\Delta amyE::P_{rhaEW-lacZ}$, *spc^R*) und SH45 ($\Delta amyE::P_{rhaR-lacZ}$, *spc^R*) wurden zusätzlich durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar s7406/s9242 bzw. s7406/s9940 kontrolliert.

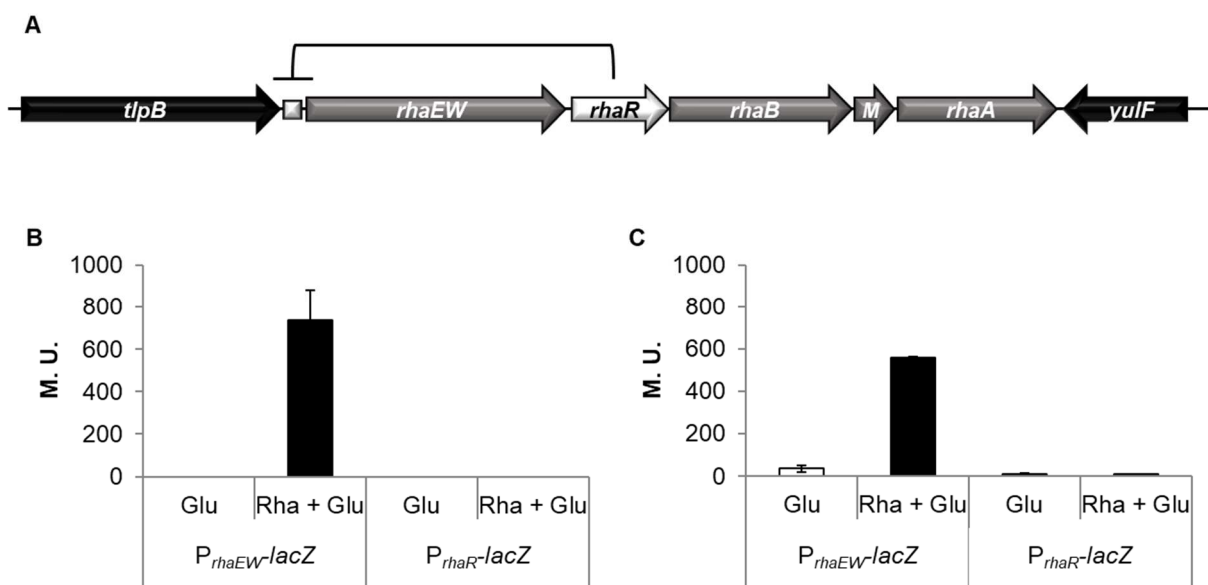


Abbildung 4.2 Die Gene für den Abbau von L-Rhamnose sind als Operon organisiert. A) Schematische Darstellung des Rhamnose-Operons (*rhaEWRBMA*) und der beiden benachbarten Gene. Das regulatorische Gen *rhaR* kodiert für ein DNA-Bindeprotein mit einer postulierten Bindestelle (Leyn *et al.*, 2013) stromaufwärts des Strukturgens *rhaEW* (Kasten). **B-C)** Messung der Promotoraktivität der Sequenzen stromaufwärts von *rhaEW* (SH28) bzw. *rhaR* (SH45) mittels Miller Assay während des Wachstums in SMM ohne Citrat (versetzt mit 0,2 % Kalium-Glutamat) bei 37 °C. Als einzige Kohlenstoffquelle(n) wurde(n) je 0,2 % L-Rhamnose und D-Glucitol (Rha + Glu) bzw. nur 0,2 % D-Glucitol (Glu) zugefügt. **B)** Messung nach 6 h Wachstum (exponentielle Wachstumsphase). **C)** Messung nach 30 h Wachstum (stationäre Wachstumsphase). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte aus mindestens drei, voneinander unabhängigen Experimenten an.

Das Vorhandensein einer Promotoraktivität wurde während des Wachstumsverlaufs in SMM ohne Citrat (supplementiert mit 0,2 % Kalium-Glutamat) überprüft. Als einzige Kohlenhydratquelle(n) wurde(n) je 0,2 % L-Rhamnose und D-Glucitol bzw.

als Negativkontrolle D-Glucitol zum Medium hinzugefügt. D-Glucitol beeinflusst die Verwertung anderer Zucker nur in einem vergleichsweise geringen Ausmaß (Singh *et al.*, 2008).

Die Übernachtskulturen wurden in dem oben beschriebenen Minimalmedium mit 0,5 % D-Glucitol angezogen. Nach dem die Zellen mit Minimalmedium ohne Zucker gewaschen wurden (Heraeus Megafuge, 5 min, 5.000 rpm), wurde die Hauptkultur 1:20 aus der Übernachtskultur angeimpft.

Im Gegensatz zu der Promotorsequenz stromaufwärts von *rhaEW* konnte für die Sequenz vor dem Regulatorgen *rhaR* weder während der exponentiellen (Messung nach 6 h Wachstum bei 37 °C) noch während der stationären Wachstumsphase (Messung nach 30 h Wachstum bei 37 °C) im Miller Assay eine LacZ-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 4.2 B).

4.1.3 Kinetik der Expression

Um die Regulation des Rhamnose-Promotors genauer zu untersuchen, wurde die Wildtyp-Sequenz in den folgenden Versuchen durch genetische Manipulationen wie sukzessive Verkürzung des 5'-Endes und Basensubstitutionen verändert und die Auswirkungen auf die Promotoraktivität untersucht. Daher wurde zunächst die Kinetik der Promotoraktivität des Stammes SH28, der das *lacZ*-Reporter gen unter der Kontrolle des *rhaEW*-Promotors exprimiert, in LB-Nährmedium untersucht. Die LacZ-Aktivität wurde mittels Miller Assay 2 h (späte exponentielle Phase), 6 h (frühe stationäre Phase) und 22 h (späte stationäre Phase) nach der Induktion von exponentiell wachsenden Zellen mit 0,2 % L-Rhamnose bestimmt.

Die P_{rhaEW} -Aktivität stieg nur langsam an und erreichte ihren höchsten Messwert erst beim letzten Messzeitpunkt (406 ± 55 M. U.) (Abbildung 4.3 A). Die Zugabe von Rhamnose führte nach 6 h und nach 22 h zu einer ca. 7-fachen Induktion des Promotors. Im Gegensatz dazu wurde im nicht-induzierten Zustand nur eine geringe LacZ-Aktivität erhalten (Abbildung 4.3 B).

Bei den darauffolgenden Versuchen, bei denen die Sequenz von P_{rhaEW} genetisch manipuliert wurde, wurde die Messung der Promotoraktivität 22 h nach Induktion durchgeführt.

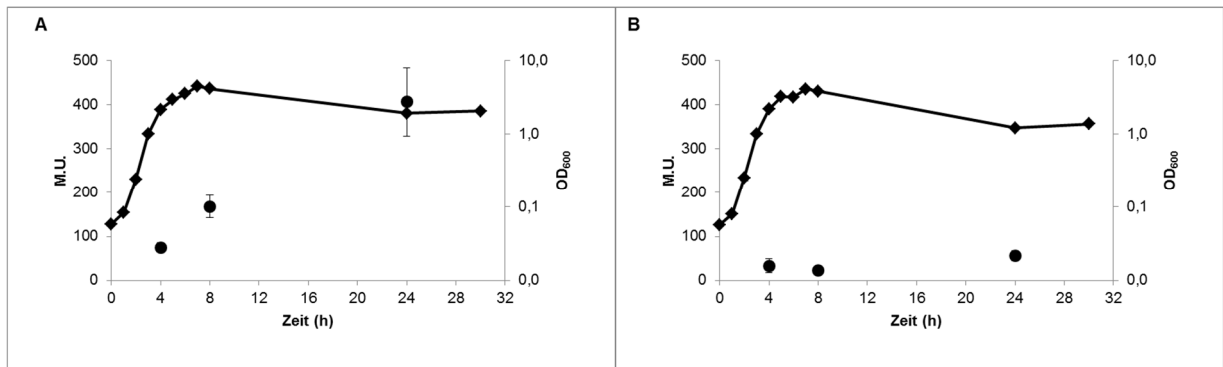


Abbildung 4.3 Bestimmung der Aktivität des *rhaEW*-Promotors (Kreis) im Wachstumsverlauf (Raute) mittels Miller Assay. Die Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose erfolgte nach 2 h Wachstum in LB-Medium bei 37 °C (A). Eine nicht-induzierte Kontrolle wurde jeweils mitgeführt (B). Mittelwerte und Standardabweichung (Fehlerbalken) wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

4.1.4 Negative Regulation durch das DNA-Bindeprotein RhaR und Kohlenstoff-Katabolitrepression

Die Anpassung der Genexpression an die in der Umgebung verfügbaren Kohlenstoffquellen wird in Prokaryoten im Allgemeinen durch spezifische Transkriptionsfaktoren und den Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR, engl. *carbon catabolite repression*) vermittelt. Bei letzterem führen bevorzugte Kohlenhydrate wie Glucose und Intermediate des Glucose-Abbaus zu einer Repression von Genen, die dem Abbau von sekundären Kohlenstoffquellen dienen.

Das Rhamnose-Operon enthält ein regulatorisches Gen *rhaR*, dessen abgeleitetes Protein eine Sequenzähnlichkeit zu Transkriptionsregulatoren der DeoR-Familie aufweist. Um den Regulationsmechanismus durch dieses DNA-Bindeprotein zu untersuchen, wurde das Gen *rhaR* deletiert. Hierzu wurden die beiden flankierenden Regionen von *rhaR* mit den Primerpaaren s9462/s9528 bzw. s10454/s9526, ausgehend von chromosomaler DNA des Laborstamms *B. subtilis* 168, amplifiziert.

Bei der Wahl der zu amplifizierenden Sequenzen wurde beachtet, dass sowohl das Start- als auch das Stopcodon von *rhaR* sowie das ursprüngliche Leseraster beibehalten wurden. Der Abstand zwischen *rhaR* und dem stromabwärts folgenden Gen *rhaB* beträgt nur 4 bp, so dass in diesem Fall zusätzlich darauf geachtet wurde, die ribosomale Bindestelle von *rhaB* unberührt zu lassen.

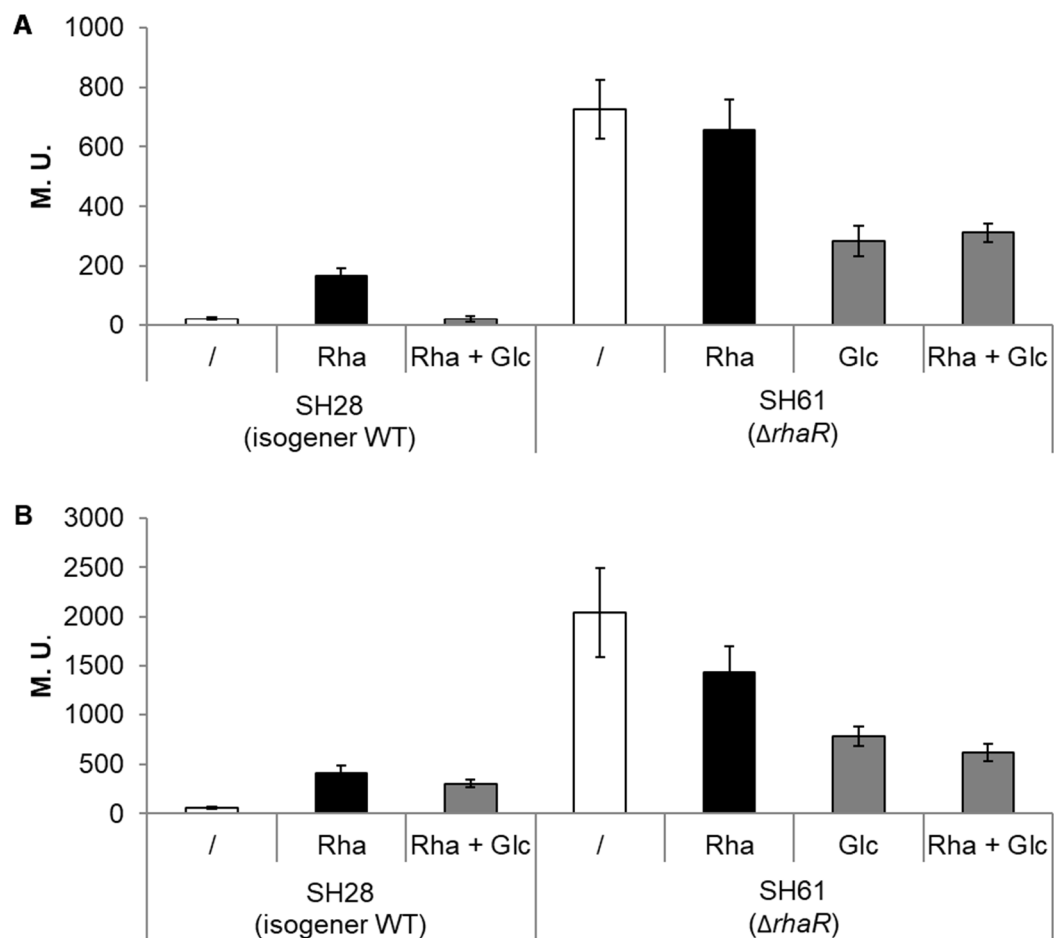


Abbildung 4.4 Nachweis der negativen Regulation des *rhaEW*-Promotors durch das Regulatorprotein RhaR und Katabolitrepression mittels Miller Assay. Nach 2 h Wachstum in LB-Medium wurden je 0,2 % L-Rhamnose (Rha) bzw. L-Rhamnose und D-Glucose (Rha + Glc) zugefügt. Die Promotoraktivität wurde 6 h (**A**) und 22 h (**B**) nach der Induktion bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten an.

Die beiden PCR-Fragmente wurden mittels 3-Fragment-Ligation über die eingeführten *Bam*HI/*Sal*I-Restriktionsschnittstellen miteinander fusioniert und mit dem 6 kb-*Bam*HI-Fragment des Vektors pJOE6743.1 ligiert. Mit dem hieraus entstandenen Deletionsvektor pSTH85 wurde der *B. subtilis* Ausgangstamm IIG-Bs168-4 transformiert. Das Genom von *B. subtilis* wurde auch hier durch die Anwendung einer markerlosen Deletions-Methode (Wenzel & Altenbuchner, 2015) verändert, die auf der homologen Rekombination basiert. In den neu erzeugten, RhaR-defizienten Stamm SH60 ($\Delta rhaR$) wurde anschließend durch eine weitere

Transformation mit dem *amyE*-Integrationsvektor pSTH22 das P_{rhaEW} -*lacZ*-Fusionskonstrukt eingebracht, wodurch der Reporterstamm SH61 erhalten wurde.

Die Deletion des postulierten Regulatorgens des Rhamnose-Operons führte zu einer konstitutiven Aktivität des Promotors, die auf einen negativen Regulationsmechanismus durch das Regulatorprotein RhaR schließen lässt (Abbildung 4.4). Auffallend ist, dass sowohl 6 h als auch 22 h nach Wachstum mit und ohne 0,2 % L-Rhamnose eine ca. 4-fach höhere LacZ-Aktivität erzielt wurde als im isogenen Wildtypstamm SH28 nach Induktion.

Die gleichzeitige Anwesenheit von 0,2 % D-Glucose in Gegenwart von 0,2 % L-Rhamnose führte zur Katabolitrepression. Allerdings konnte im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem nur noch eine Basalaktivität gemessen wurde, im Repressor-defizienten Stamm keine vollständige Repression durch Glucose beobachtet werden.

4.1.5 Transkriptionsstart-Bestimmung

Um den Promotor des Rhamnose-Operons zu lokalisieren, wurde der Transkriptionsstart mittels *Primer Extension* bestimmt (Abbildung 4.5). Bei dieser Methode wird ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA eine sequenzspezifische cDNA-Transkriptionsreaktion unter Verwendung einer reversen Transkriptase und eines fluoreszenzmarkierten Primers durchgeführt. Das erhaltene cDNA-Produkt wird zusammen mit der bekannten, zugehörigen DNA, die einer nach Sanger durchgeführten Sequenzierungsreaktion unterzogen worden war, elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Die DNA aus der Sequenzierungsreaktion, bei welcher derselbe Primer eingesetzt wird, dient hierbei als Größenstandard für die Ermittlung der unbekanntenen Länge des mRNA-Transkripts.

Um eine für das *Primer Extension*-Experiment ausreichend hohe Menge an cDNA zu erhalten, wurde die mRNA aus dem Regulator-defizienten *B. subtilis* Stamm SH61 ($\Delta rhaR$) isoliert. In diesem Stamm wird P_{rhaEW} -*lacZ*, das in den *amyE*-Locus integriert wurde, konstitutiv transkribiert. Die RNA-Isolation erfolgte nach 25 h Wachstum in LB-Medium bei 37 °C. Die Promotoraktivität wurde mittels Miller Assay kontrolliert. Für die reverse Transkription wurde das Cy5-markierte Oligonukleotid s10620 eingesetzt, welches revers komplementär zum verwendeten *lacZ*-Reporter gen ist und 128 bp stromabwärts des *lacZ*-Startcodons bindet. Die Sequenz des cDNA-

Fragments wurde anhand der Sequenzierungsreaktion des Integrationsvektors pSTH22 abgelesen, der das P_{rhaEW} - $lacZ$ -Fusionskonstrukt enthält und zur Erzeugung des Stammes SH61 verwendet wurde.

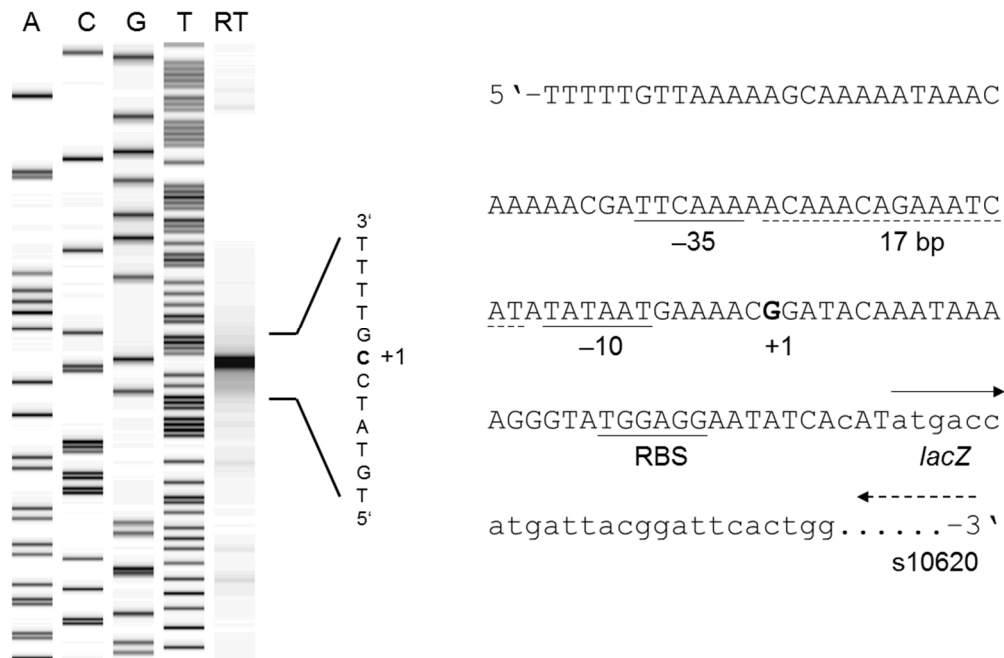


Abbildung 4.5 Bestimmung des Transkriptionsstarts des Rhamnose-Promotors P_{rhaEW} mittels Primer Extension. Die cDNA-Synthese erfolgte ausgehend von RNA aus dem Regulator-defizienten Stamm SH61 ($\Delta rhaR$, $\Delta amyE::P_{rhaEW}$ - $lacZ$, spc^R) mit Hilfe des Cy5-markierten Primers s10620 (gestrichelter Pfeil), der revers komplementär zum $lacZ$ -Reportergen ist. Das Produkt der reversen Transkriptase-Reaktion (RT) wurde zusammen mit DNA aus einer Sequenzierungsreaktion des $amyE$ -Integrationsvektors pSTH22 (mit dem gleichen Primer) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger wurde in vier verschiedenen Reaktionen jeweils zusätzlich zum dNTP-Gemisch je ein ddNTP eingesetzt (A, ddATP; C, ddCTP; G, ddGTP; T, ddTTP). Der relevante Ausschnitt von pSTH22 ist rechts abgebildet. Die von der Wildtyp-Sequenz abweichenden Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Der ermittelte Transkriptionsstart ist fett markiert. Die postulierten Kernelemente des σ^A -Promotors und die postulierte ribosomale Bindestelle (RBS) sind unterstrichen. Die Länge des *Spacers* zwischen der -35 und der -10 Region beträgt 17 bp (gestrichelte Linie).

Der durch *Primer Extension* bestimmte Transkriptionsstart wurde durch eine weitere Methode (ARF-TSS, für *Adapter- and radioactivity-free identification of transcription start sites*; Wang *et al.*, 2012) bestätigt. Bei diesem Verfahren wird das 5'-Ende des RNA-Transkripts durch cDNA-Synthese, anschließender Selbstligation, PCR-Amplifikation und Sequenzierung bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Durch die Bestimmung des Transkriptionsstarts konnten die allgemeinen Promotorelemente des mutmaßlichen σ^A -Promotors festgelegt werden (Abbildung 4.5). Der Promotor stromaufwärts von *rhaEW* besitzt eine perfekte –10 Region, da sie nicht von der Konsensussequenz (TATAAT) abweicht. Die für die –35 Region bestimmte Sequenz (TTCAA) weicht an zwei Positionen von der Konsensussequenz (TTGACA) ab und besitzt einen optimalen Abstand von 17 bp zur *Pribnow-Box* (Moran et al., 1982).

4.1.5.1 Promotor-Optimierung durch Basensubstitution

Promotoren die von dem Haupt-Sigma-Faktor A (σ^A) erkannt werden besitzen eine –35 Region mit der Konsensussequenz 5'-TTGACA-3'. Des Weiteren beträgt der optimale Abstand zur –10 Region 17 bp (Moran et al., 1982). Die regulatorische Sequenz vor *rhaEW* sollte durch die Substitutionen von zwei Basen (C-33G und A-31C) zu einem optimalen σ^A -Promotor umgewandelt werden können. Die gewünschte Veränderung wurde mittels einer Abwandlung des von NEB entwickelten Q5® *Site-Directed Mutagenesis*-Verfahrens eingebracht. Diese Methode beruht auf einer inversen PCR-Amplifikation mit Primern, die die gewünschte Mutation enthalten, anschließendem *DpnI*-Verdau und Phosphorylierung durch die T4-Polynukleotidkinase sowie zuletzt Ligation und Transformation von Zellen mit diesem Produkt. Als Template für die PCR mit dem Primerpaar s10095/s10096 wurde der *amyE*-Integrationsvektor pSTH22 (P_{rhaEW} -*lacZ*) verwendet. Durch die Transformation des *B. subtilis* Ausgangsstamms IIG-Bs168-4 und des Regulator-defizienten Stamms SH60 ($\Delta rhaR$) mit dem mutierten Plasmid pSTH78 wurden die Stämme SH50 und SH67 mit einer optimierten –35 Region erzeugt.

Die Mutation der P_{rhaEW} -Sequenz hin zur Konsensussequenz zeigte eine Steigerung der Promotoraktivität um das ca. 12-Fache im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (SH28) (Abbildung 4.6). Gleichzeitig führten die Substitutionen zu einer konstitutiven Aktivität des Promotors. Dies weist darauf hin, dass durch die Mutation möglicherweise die Operatorsequenz des DNA-Bindeproteins RhaR beeinträchtigt wurde. Im RhaR-negativen Hintergrund konnte dennoch ebenfalls eine Zunahme der LacZ-Aktivität beobachtet werden, jedoch nur noch um das ca. 3-Fache.

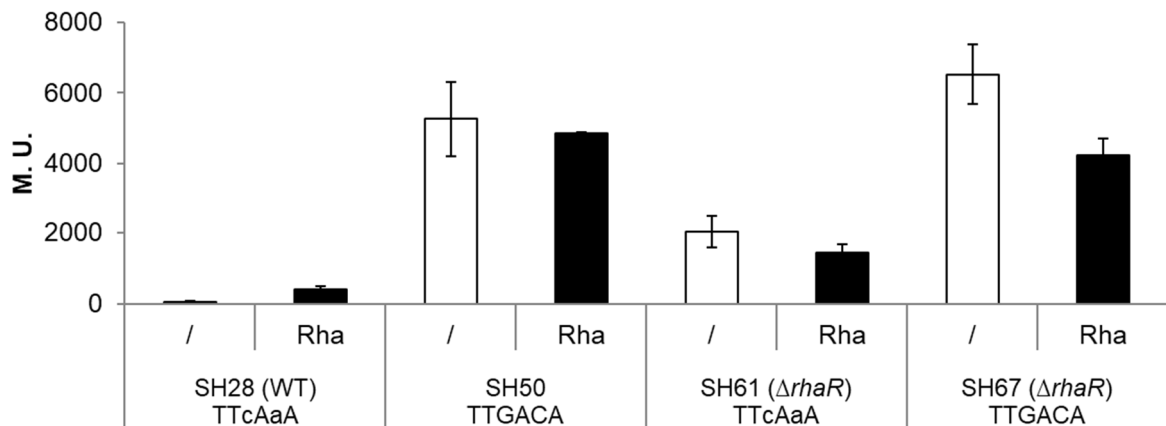


Abbildung 4.6 Promotor-Optimierung durch Basensubstitution. In den Stämmen SH50 und SH67 wurde die -35 Sequenz TTcAaA des Wildtyps durch die Konsensussequenz TTGACA ersetzt. Als Ausgangsstamm diente der isogene Wildtypstamm SH28 bzw. der Regulator-defiziente Stamm SH61 ($\Delta rhaR$). Die LacZ-Aktivität wurde 22 h nach der Induktion durch die Zugabe von 0,2 % L-Rhamnose (Rha) zum LB-Kulturmedium gemessen. Eine nicht-induzierte Kontrolle (/) wurde jeweils mitgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

4.1.6 Deletionsanalyse

Um den Beginn der regulatorischen Sequenz stromaufwärts des Rhamnose-Operons (P_{rhaEW}) zu lokalisieren, wurde P_{rhaEW} vom 5'-Ende ausgehend sukzessiv verkürzt. In vier verschiedenen PCR-Ansätzen wurde der Rückwärts-Primer s9242 zusammen mit jeweils einem der Vorwärts-Primer s10090, s10091, 10092 bzw. s10691 eingesetzt. Als Template diente chromosomale DNA von *B. subtilis* 168. Die PCR-Fragmente wurden über die eingebrachten *NheI*- und *NdeI*-Schnittstellen mit dem 10,7 kb-Fragment des *amyE*-Integrationsvektors pKAM243 ligiert und dabei mit dem *lacZ*-Reporter des Vektors fusioniert. Mit den neu generierten Vektoren (pSTH82, pSTH83, pSTH84 bzw. pSTH87) wurde der *B. subtilis* Stamm IIG-Bs168-4 transformiert. Die Integration der Reporterengenkassette durch ein Doppelcrossover-Ereignis wurde durch Selektion auf Spectinomycin-Resistenz und Test auf Verlust der Erythromycin-Resistenz und der Amylase-Aktivität überprüft und anschließend mittels Kolonie-PCR verifiziert (s7406/s9242).

Die Induzierbarkeit des verkürzten P_{rhaEW} -*lacZ*-Reporterkonstrukts in den neu generierten Stämmen (SH54, SH55, SH56 bzw. SH65) wurde anschließend mittels Miller Assay untersucht und mit dem isogenen Wildtyp (SH28) verglichen. Dazu

wurde die LacZ-Aktivität 22 h nach der Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose der LacZ-Aktivität der nicht-induzierten Kontrolle gegenübergestellt (Abbildung 4.7 A). Eine deutliche Auswirkung auf die Induzierbarkeit konnte bei einer 5'-Verkürzung bis zur Position -60 (relativ zur Startstelle der Transkription) beobachtet werden. Hier war die Regulierbarkeit von einer ursprünglich ca. 7-fachen auf eine ca. 2-fache Induktion reduziert. Daher kann angenommen werden, dass die Operatorsequenz von RhaR in diesem Bereich beginnt. Die nächste Verkürzung des Promotor-Reporterkonstrukts um weitere 5 nt, bis kurz vor der in bioinformatischen Studien vorhergesagten RhaR-Bindestelle (Leyn *et al.*, 2013), führte zu keiner weiteren Beeinträchtigung bezüglich der Regulierbarkeit. Erst der nächste Schritt, bei dem die angenommene Bindestelle größtenteils deletiert wurde, führte zu einem vollständigen Verlust der Regulierbarkeit. Zusätzlich hatte die Verkürzung auch generell einen stark negativen Einfluss auf die Promotoraktivität (Rückgang von 406 ± 78 M. U. auf 185 ± 3 M. U.).

Die Auswirkungen der Promotor-Verkürzungen im 5'-terminalen Bereich wurden zur Kontrolle ebenfalls im Hintergrund der *rhaR*-Deletion untersucht. Dazu wurde der Stamm SH60 ($\Delta rhaR$) mit den weiter oben beschriebenen Vektoren transformiert (SH62, SH63, SH64 bzw. SH68). Als Referenz diente der Stamm SH61, der durch Transformation von SH60 mit dem Ausgangsvektor pSTH22 generiert wurde und das ungekürzte P_{rhaEW} -lacZ-Fusionskonstrukt chromosomal integriert hat. Es konnte gezeigt werden, dass die sukzessive Verkürzung Änderungen der Promotoraktivität bewirkt, die unabhängig von der Bindung des Repressors RhaR auftreten (Abbildung 4.7 B).

Die regulatorische Sequenz bis Nukleotid -79 war ausreichend, um die maximale Promotoraktivität zu vermitteln. Eine Deletion der stromabwärts angrenzenden, T-reichen Sequenzabfolge (bis zur Position -61) führte bereits zu einer Verringerung der Promotoraktivität. Eine weitere Verkürzung des Promotors bis zur Position -38 führte auch im Regulator-defizienten Hintergrund zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Promotoraktivität. Diese war, verglichen mit der ursprünglichen Aktivität, ungefähr um den Faktor 10 verringert. Der hier deletierte, A-reiche Sequenzabschnitt, welcher in direkter Nachbarschaft zur -35 Region liegt und mit der postulierten GmuR-Operatorsequenz überlappt, könnte ein UP-Element enthalten.

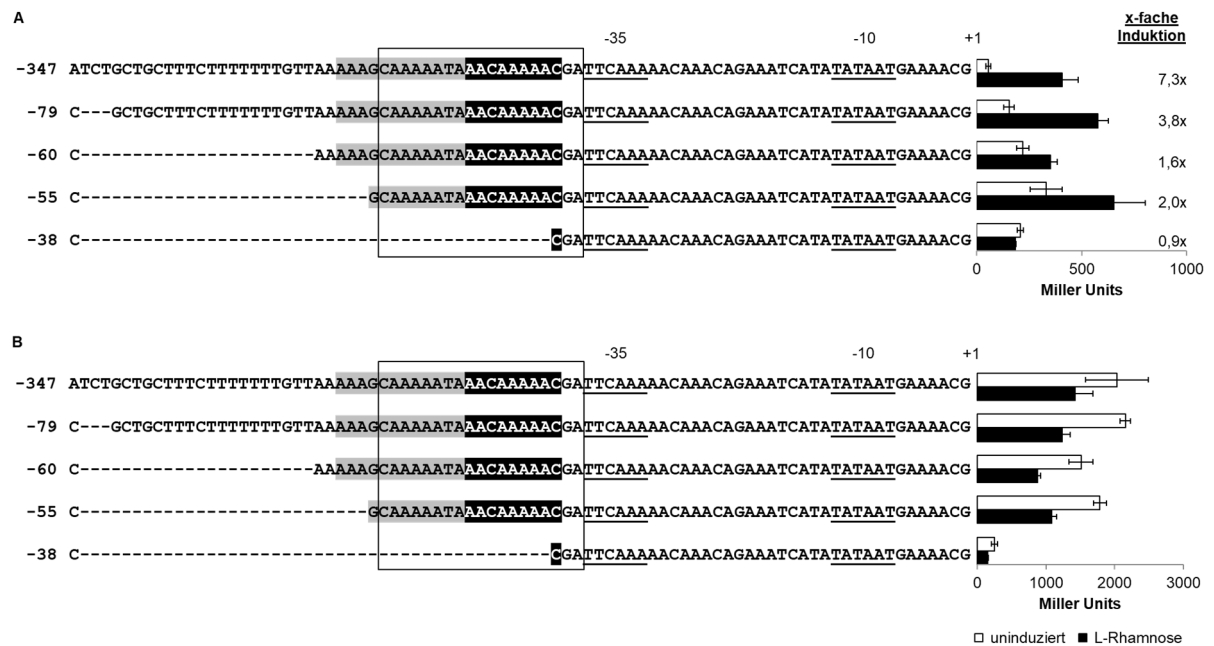


Abbildung 4.7 Deletionsanalyse zur Ermittlung der regulatorischen Regionen stromaufwärts des Rhamnose-Operons. Die in vorherigen bioinformatischen Studien von Leyn *et al.* (2013) vorhergesagte RhaR-Bindestelle wird durch einen Kasten hervorgehoben. Innerhalb des *rhaEW*-Promotors wird ein UP-Element vermutet. Diese Sequenz kann anhand von anderen UP-Elementen, die in *B. subtilis* Promotoren vorschlagen wurden (Murayama *et al.*, 2015), in einen Promotor-distalen (grau unterlegt) und einen Promotor-proximalen (schwarz unterlegt) Bereich unterteilt werden. Das *P_{rhaEW}-lacZ*-Reporterkonstrukt wurde schrittweise am 5'-Ende bis zu der jeweils angegebenen Position (relativ zur Transkriptionsstartstelle) verkürzt. Die geänderten Konstrukte wurden in den *amyE*-Locus des Stammes IIG-Bs168-4 (**A**) bzw. des Regulator-defizienten Stammes SH60 ($\Delta rhaR$). (**B**) integriert. Anschließend wurde die LacZ-Aktivität in LB-Medium 22 h nach Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose mittels Miller Assay ermittelt. Die hier dargestellten Ergebnisse stammen aus jeweils mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

4.1.7 Expression von *rhaR-strep* in *E. coli*

Um den Operator des Regulatorproteins RhaR zu identifizieren und den molekularen Mechanismus der Regulation des Rhamnose-Operons genauer zu charakterisieren, wurde RhaR in *E. coli* JM109 überexprimiert. Das *rhaR*-Gen wurde mit dem Primerpaar s9306/s9307 ausgehend von chromosomaler DNA aus *B. subtilis* 168 ohne Stopcodon amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die eingeführten *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen mit dem 3,6 kb-Fragment von pJOE6089.4 ligiert, wodurch *rhaR* für die darauffolgende Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie C-terminal mit einem Strep-Tag II fusioniert wurde (pSTH59). Das 819 bp-Fragment

wurde anschließend über *NdeI/PstI* unter die Kontrolle des Pm-Promotors des Vektors pNG418.3 (Graf & Altenbuchner, 2013) gebracht. Dieser Expressionsvektor basiert auf dem *XylS/Pm*-System, das ursprünglich aus *Pseudomonas putida* stammt und durch Benzoesäurederivate induziert werden kann (Winther-Larsen *et al.*, 2000). Neben der Pm-Promotorregion enthält dieser Vektor das benachbarte regulatorische Gen *xyIS*, das für den zugehörigen Transkriptionsaktivator kodiert. Durch die Verwendung dieses Expressionssystems wurde die Zugabe eines Zuckers zum Wachstumsmedium vermieden. Dies wäre zum Beispiel bei der Verwendung des durch L-Rhamnose-induzierbaren Expressionssystems - mit dem zwar häufig hohe Ausbeuten an aktivem Enzym erzielt werden können - notwendig gewesen.

Mit dem neu erzeugten Expressionsplasmid pSTH63 wurde der *E. coli* Stamm JM109 transformiert (TSS-Methode). Der plasmidtragende Stamm wurde bei 37 °C in LB-Medium (50 ml) kultiviert. Die Expression von *rhaR* wurde durch die Zugabe von 2 mM *m*-Toluylsäure während der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Um eine mögliche Bildung von unlöslichen RhaR-Agglomeraten (*Inclusion Bodies*) zu vermeiden, erfolgte das weitere Wachstum bei 30 °C. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet (ca. 67 OD₆₀₀ Zellen), im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und die lösliche Fraktion des Lysats im Anschluss über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule gereinigt.

Das Monomer von RhaR besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 29 kDa. Bei der Analyse der Reinigung mittels SDS-PAGE zeigte sich nach Induktion eine entsprechend große Bande in der löslichen Zellfraktion (Abbildung 4.8). Das heterolog exprimierte Protein konnte anschließend - in für die darauffolgenden Versuche ausreichender Menge - über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Durch eine Gelanalyse mit ImageJ wurde die Reinheit des rekombinanten Proteins geschätzt, die ungefähr 80 % betrug. Die dritte Fraktion des Eluats wies die höchste Proteinkonzentration auf (658 ng/µl) und wurde daher für die folgenden Experimente verwendet.

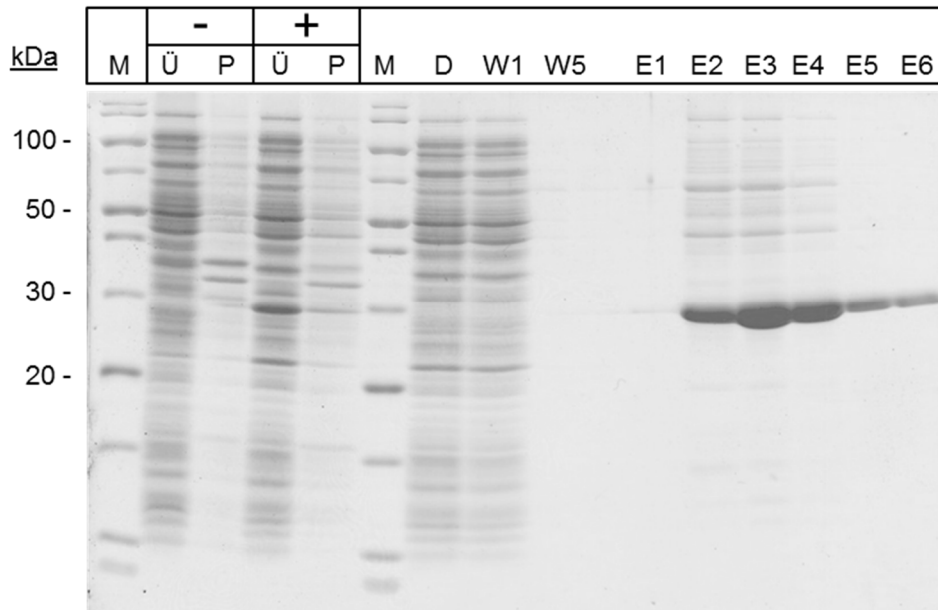


Abbildung 4.8 SDS-PAGE-Analyse (15 %) der Proteinaufreinigung von *B. subtilis* RhaR-Strep-Tag (29 kDa) mittels Affinitätschromatographie. Als Wirtsstamm für die Genexpression diente JM109 pSTH63 (50 ml LB-Kultur). Die Zellernte erfolgte 4 h nach der Induktion des Pm-Promotors mit 2 mM *m*-Toluylsäure bei 30 °C. Spurbelegung: **M**, Proteinmarker (PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific); **Ü**, Überstand (lösliche Zellfraktion); **P**, Pellet (unlösliche Zellfraktion); **-**, Proben der nicht-induzierten Kultur; **+**, Proben der induzierten Kultur; **D**, Durchfluss; **W1/W5**, Waschfraktion 1 bzw. 5; **E1-E6**, Elutionsschritte 1 bis 6.

4.1.8 Molekulargewichtsbestimmung durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Um Aufschluss darüber zu erhalten, in welchem Oligomerisierungsgrad der Regulator RhaR in seiner nativen, aktiven Konformation vorliegt, wurde das Molekulargewicht des aufgereinigten Fusionsproteins RhaR-Strep-Tag mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) analysiert. Die Trennung erfolgte in zwei hintereinandergeschalteten TSKgel® G3000SW_{XL} Säulen (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Deutschland). Zunächst wurde anhand von Standardproteinen mit bekannten Molekulargewichten eine Eichgerade erstellt (Tabelle 4.1; Abbildung 4.9 A).

Tabelle 4.1 Standardproteine für die Kalibrierung der TSKgel® G3000SW_{XL} Trennsäule und deren Molekulargewichte (MW).

Protein	MW (kDa)	Elution (min)	Elutionsvolumen (ml)	V _e /V ₀
Ribonuklease A	13,7	41,05	20,53	1,94
Myoglobin	17	39,95	19,98	1,89
Carboanhydrase	29	38,75	19,38	1,83
Ovalbumin	44	36,55	18,28	1,73
Conalbumin	75	34,37	17,19	1,63
γ-Globulin	158	31,25	15,63	1,48
Dextran Blau	2.000	21,15	10,58	1,00

Bei der anschließenden chromatographischen Trennung des Eluats, das aus der Reinigung von RhaR-Strep-Tag gewonnen wurde, diente 300 mM KPP (pH 7,0) als Laufmittel (Abbildung 4.9 B). Es wurden ca. 50 µg Protein eingespritzt.

Der erste Peak mit der Retentionszeit 38,12 min wurde dem rekombinanten RhaR-Protein zugeordnet, dessen theoretisches Molekulargewicht von 29 kDa mittels SDS-PAGE-Analyse bestätigt wurde (Abbildung 4.8). Die anhand der Eichgeraden abgeschätzte Größe von RhaR (ca. 30 kDa, Tabelle 4.2) lässt darauf schließen, dass das Repressorprotein als Monomer vorliegt.

Tabelle 4.2 Bestimmung der Molekulargewichte (MW) anhand der GPC-Daten aus der Analyse des Eluats der affinitätschromatographischen Reinigung von RhaR-Strep-Tag.

Peak	Retentionszeit (min)	Elutionsvolumen (V _e)	V _e /V ₀	MW (kDa)
1	38,12	19,06	1,80	30,07
2	41,96	20,98	1,98	11,45
3	47,21	23,61	2,23	3,06

Das Elutionsprofil zeigte zwei zusätzliche Peaks, die einer Größe von ca. 11 kDa bzw. 3 kDa entsprachen. Der Ursprung dieser Peaks ist unklar. Bei der SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von RhaR (Abbildung 4.8) wurden bei der verwendeten dritten Fraktion des Eluats keine Proteinbanden in diesem Größenbereich beobachtet. Bei einer Verunreinigung des Eluats durch unspezifisch gebundene

Proteine dieser Größenordnung sollten diese aufgrund der hohen Intensität der Peaks durch die Coomassie-Färbung detektierbar gewesen sein. Möglicherweise handelte es sich um degradierte RhaR-Proteine, die während der Trennung in der GPC-Säule (die bei Raumtemperatur durchgeführt wurde) entstanden sind.

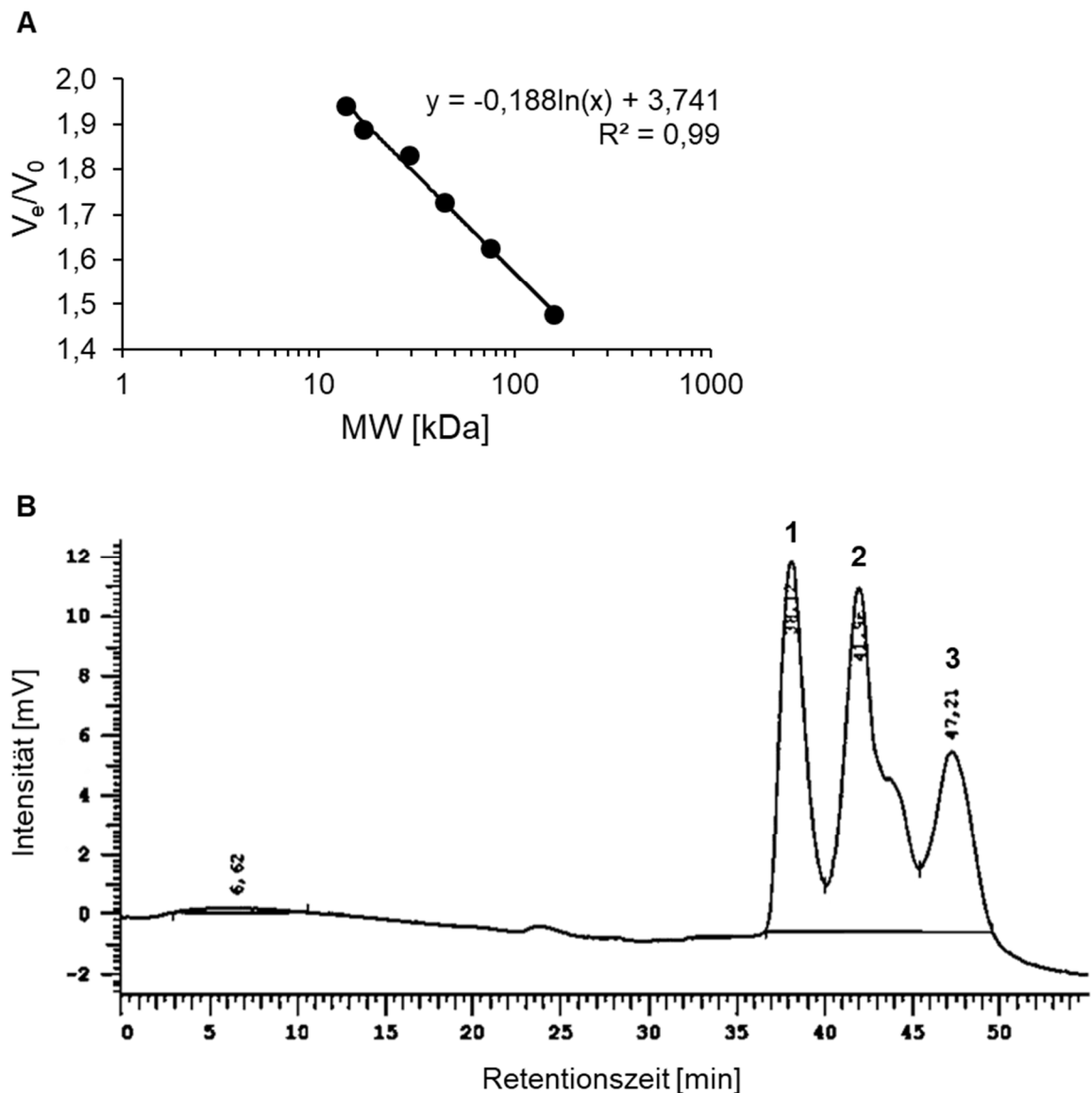


Abbildung 4.9 Bestimmung des Molekulargewichts (MW) von nativem RhaR-Strep-Tag mittels Gel-Permeations-Chromatographie (TSKgel® G3000SW_{XL} Säule). **A)** Die Eichgerade wurde mit den Größenstandards Ribonuklease A (13,7 kDa), Myoglobin (17 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Conalbumin (75 kDa) und γ -Globulin (158 kDa) erstellt. **B)** Chromatogramm der Trennung des Eluats der Aufreinigung von RhaR. Als Laufmittel wurden 300 mM KPP (pH 7,0) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eingesetzt. Peak 1: RhaR (ca. 30 kDa); Peak 2 und 3: unbekanntem Ursprungs (ca. 11 kDa bzw. ca. 3 kDa).

4.1.9 Identifizierung der Operatorsequenz von RhaR

4.1.9.1 Komplementäre Basensubstitutionen innerhalb von P_{rhaEW}

Nachdem der Beginn der regulatorischen Sequenz stromaufwärts des Rhamnose-Operons durch eine Deletionsanalyse auf den Bereich bis ungefähr zur Position -60 (relativ zur Transkriptionsstartstelle) eingegrenzt wurde, wurden in dieser Region komplementäre Basensubstitutionen von jeweils 5-6 aufeinanderfolgenden Basen durchgeführt. Diese Vorgehensweise sollte zur Identifizierung der Operatorsequenz des Regulators RhaR beitragen. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mittels einer Abwandlung der Q5[®] *Site-Directed Mutagenesis*-Methode von NEB durchgeführt (Kapitel 4.1.5.1). Als Template für die Mutagenese-PCR diente der Ausgangsvektor von pSTH22, pSTH16 (P_{rhaEW}). Die mutierten Promotorsequenzen wurden nach der Sequenzierung über *NheI/NdeI* in das 10,7 kb-Fragment von pKAM243 eingebracht. Die jeweils eingesetzten Primerpaare, die daraus resultierten Derivate des *amyE*-Integrationsvektors pSTH22 (*amyE'*-*ter*- P_{rhaEW} -*lacZ*-*spc'*-*amyE*), sowie die damit durch Transformation des *B. subtilis* Stamms IIG-Bs168-4 neu erzeugten Stämme sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3 Erzeugung von komplementären Basensubstitutionen (BS) innerhalb von P_{rhaEW} . Angegeben sind die verwendeten Primerpaare und die daraus neu erzeugten *amyE*-Integrationsvektoren, die für die Herstellung des entsprechenden LacZ-Reporterstamms eingesetzt wurden.

BS	Stamm	Vektor	Primer
-68 bis -63	SH71	pSTH101	s10919/s10920
-60 bis -55	SH74	pSTH107	s10921/s10922
-54 bis -49	SH73	pSTH106	s10923/s10924
-47 bis -43	SH72	pSTH104	s10925/s10926
-41 bis -36	SH76	pSTH109	s10976/s10977
-33 bis -28	SH70	pSTH98	s10929/s10930
-26 bis -22	SH66	pSTH88	s10692/s10693
-21 bis -16	SH77	pSTH99	s10931/s10932
-6 bis -2	SH78	pSTH103	s10933/s10934
+5 bis +10	SH75	pSTH108	s10937/s10938
+12 bis +17	SH88	pSTH100	s10935/s10936

Mittels Miller Assay wurden die Promotoraktivitäten ohne und nach Zugabe von 0,2 % L-Rhamnose zum LB-Wachstumsmedium miteinander verglichen (Abbildung 4.10). Die Messungen wurden 22 h nach der Induktion von exponentiell wachsenden Zellen durchgeführt.

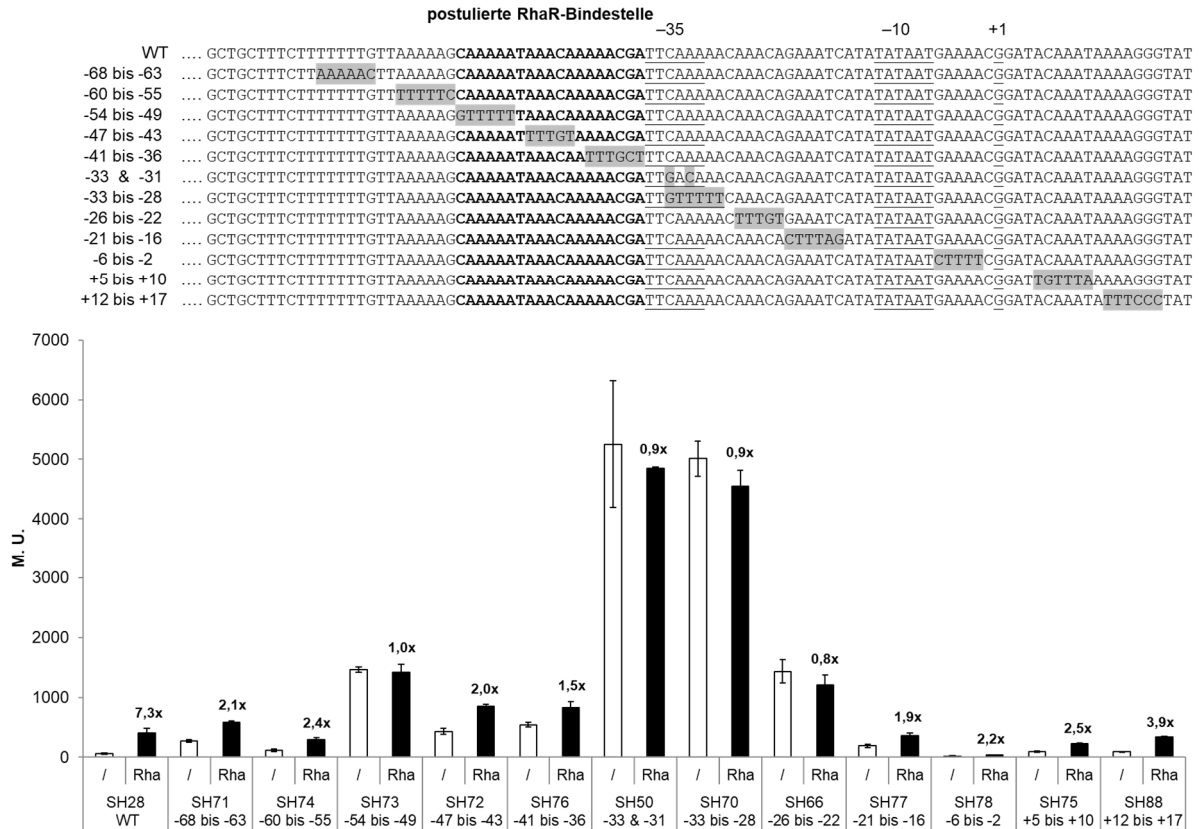


Abbildung 4.10 Eingrenzung der Operatorsequenz des regulatorischen Proteins RhaR mittels komplementärer Basensubstitutionen. Hier dargestellt ist der Sequenzausschnitt von P_{rhaEW} , in den die Mutationen (grau unterlegt) eingebracht wurden. Die allgemeinen Promotorelemente (–35 Region und –10 Region) sowie der Transkriptionsstart sind unterstrichen. In bioinformatischen Studien von Leyn *et al.* (2013) wurde die durch Fettdruck gezeichnete Sequenzabfolge als vermutliche RhaR-Operatorsequenz bestimmt. Die Promotoraktivität (M. U., Miller Units) der mutierten $P_{rhaEW-lacZ}$ -Fusionskonstrukte (in LB-Medium) wurde mittels Miller Assay bestimmt. Dazu wurden die Reporterstämme, bei denen das jeweilige Konstrukt in den *amyE*-Locus integriert war, in der exponentiellen Wachstumsphase mit 0,2 % L-Rhamnose (Rha) induziert. Der Enzymtest erfolgte 22 h nach der Induktion. Als Vergleich wurden nicht-induzierte Zellen (/) mitgeführt. Die x-fache Induktion ist über den entsprechenden Balken angegeben. Die Mittelwerte beruhen auf mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (Anm.: Die Optimierung der –35 Region durch nicht-komplementäre Basensubstitutionen im Stamm SH50 führte gleichzeitig zu einer konstitutiven Aktivität des Promotors und ist daher hier ebenfalls dargestellt.)

Die Basensubstitutionen im Bereich von -68 bis +17 verursachten alle eine deutliche Verminderung der Regulierbarkeit des Rhamnose-Promotors, die auf eine beeinträchtigte DNA-Bindungsfähigkeit des Regulatorproteins RhaR hindeutet. Diese gingen jedoch mit Veränderungen in der Promotoraktivität einher. Die komplementären Basensubstitutionen der Positionen -54 bis -49, -33 bis -28 bzw. -26 bis -22 führten jeweils zu einer konstitutiven Aktivität des Rhamnose-Promotors. Dies weist daraufhin, dass der Repressor hier nicht mehr an seine Operatorsequenz binden kann. Die Basensubstitutionen im Bereich -33 bis -28 führten, verglichen mit dem Wildtyp, außerdem zu einer ca. 11-fach höheren LacZ-Aktivität. Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine gleichzeitige Optimierung der -35 Region zurückzuführen, deren Sequenzabfolge von TTCAAA zu TTGTTT abgeändert wurde.

Die Ergebnisse sind aufgrund der zusätzlichen, unbekanntenen Effekte, die hier offenbar einen wesentlichen Einfluss auf die Promotoraktivität nehmen, nicht eindeutig. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich die Operatorsequenz über den Sequenzabschnitt von -54 bis -22 erstreckt.

4.1.9.2 DNase I-Footprinting-Assay

Durch einen DNase I-Footprinting-Assay sollte die genaue Lage der Operatorsequenz von RhaR aufgedeckt werden. Dieses Experiment beruht auf der spezifischen Bindung des Regulators an seine Erkennungssequenzen, die dazu führt, dass der entsprechende DNA-Bereich nicht mehr für die endonukleolytisch wirkende DNase I zugänglich ist.

Ein 328 bp großes, fluoreszenzmarkiertes DNA-Fragment der Promotorregion stromaufwärts von *rhaEW* wurde mit dem Cy5-markierten Vorwärts-Primer s10729 und dem unmarkierten Rückwärts-Primer s10089 in einer PCR generiert (PCR 149). Der nicht-codierende Strang der P_{rhaEW} -Promotorregion wurde mit dem Cy5-markierten Rückwärts-Primer s5959 bzw. s10620 untersucht. Die 278 bp (PCR 135) bzw. 320 bp (PCR 136) großen, markierten DNA-Fragmente wurden jeweils durch eine PCR mit dem unmarkierten Vorwärts-Primer s9943 hergestellt. Als Template wurde in allen drei PCRs der *amyE*-Integrationsvektor pSTH22 eingesetzt.

Um sicherzustellen, dass möglichst alle DNA-Fragmente mit RhaR besetzt sind, wurde das über Strep-Tactin aufgereinigte Protein im molaren Überschuss

zugegeben. Die Mengenverhältnisse, die für einen vollständigen Shift der DNA-Bande (d. h. eine vollständige Besetzung aller DNA-Fragmente mit Protein) benötigt wurden, wurden daher berücksichtigt (Kapitel 4.1.9.3). Als Negativkontrolle diente das Bandenmuster des jeweiligen DNA-Fragments, das durch einen DNase I-Verdau in Abwesenheit des Regulators erhalten wurde.

Die DNase I-Menge (Aktivität), bei der das Enzym das entsprechende DNA-Fragment unter den gegebenen Reaktionsbedingungen möglichst nur einmal schneidet, wurde jeweils in Vorversuchen experimentell ermittelt (hier je 1,3 U). Um die Sequenz der endolytisch abgebauten, 5'-terminal fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente ablesen zu können, wurde eine Dideoxy-Kettenabbruch-Sequenzierung von pSTH22 mit dem jeweils entsprechenden Cy5-markierten Primer durchgeführt und die DNA parallel auf einem Acrylamid-Auftrennungsgel der Größe nach aufgetrennt.

Im DNase I-*Footprinting*-Experiment wurde durch die Bindung des Regulatorproteins RhaR-Strep-Tag ein Bereich von etwa 38-45 bp geschützt (Abbildung 4.11). An diesen Bereich schließt sich ein zusätzlicher kleinerer (ca. 22 bp großer) Bereich an, der ebenfalls nicht durch die DNase I angegriffen werden konnte. Die in bioinformatischen Studien identifizierte Operatorsequenz (Leyn *et al.*, 2013) wird - in abgewandelter Form - um zwei Wiederholungen der RhaR-Erkennungssequenz erweitert. Der größere Abschnitt umfasst eine direkte Sequenzwiederholung (*direct repeat*) aus zwei 17 bp langen Sequenzen CAAAAA(T/C)AAACA(A/G)AAA(C/T), die durch 4 bp voneinander getrennt sind. Auf diese folgt innerhalb des kleineren geschützten Sequenzabschnitts eine weitere, direkte Wiederholung des Sequenzmotivs mit 6 Abweichungen (tgAAAACggAtAcAAAT; Abweichungen sind durch Kleinbuchstaben dargestellt). Da durch das verwendete PCR-Fragment 135 die untere Grenze der geschützten Region nicht bestimmt werden konnte, wurde ein weiterer Cy5-markierter Primer ausgewählt, der 42 nt stromabwärts an das *lacZ*-Reporter gen bindet (PCR136). Die obere Grenze wurde jedoch mittels PCR 135 bestimmt, da hier hingegen dieses Ende deutlich zu erkennen war. Die Thyminreiche Region war hier, im Vergleich mit dem Ergebnis, welches das PCR-Produkt 136 lieferte, nicht mehr geschützt. Vermutlich besitzen die beiden ausgewählten DNA-Ausschnitte eine unterschiedliche Struktur, die ihre Zugänglichkeit für die DNase I beeinflusst. Innerhalb der geschützten DNA-Bereiche

konnten vier hypersensitive Stellen beobachtet werden. Außerdem befindet sich zwischen den beiden durch RhaR gebundenen Regionen (Position -14 bis -7) ein weiterer hypersensitiver Bereich.

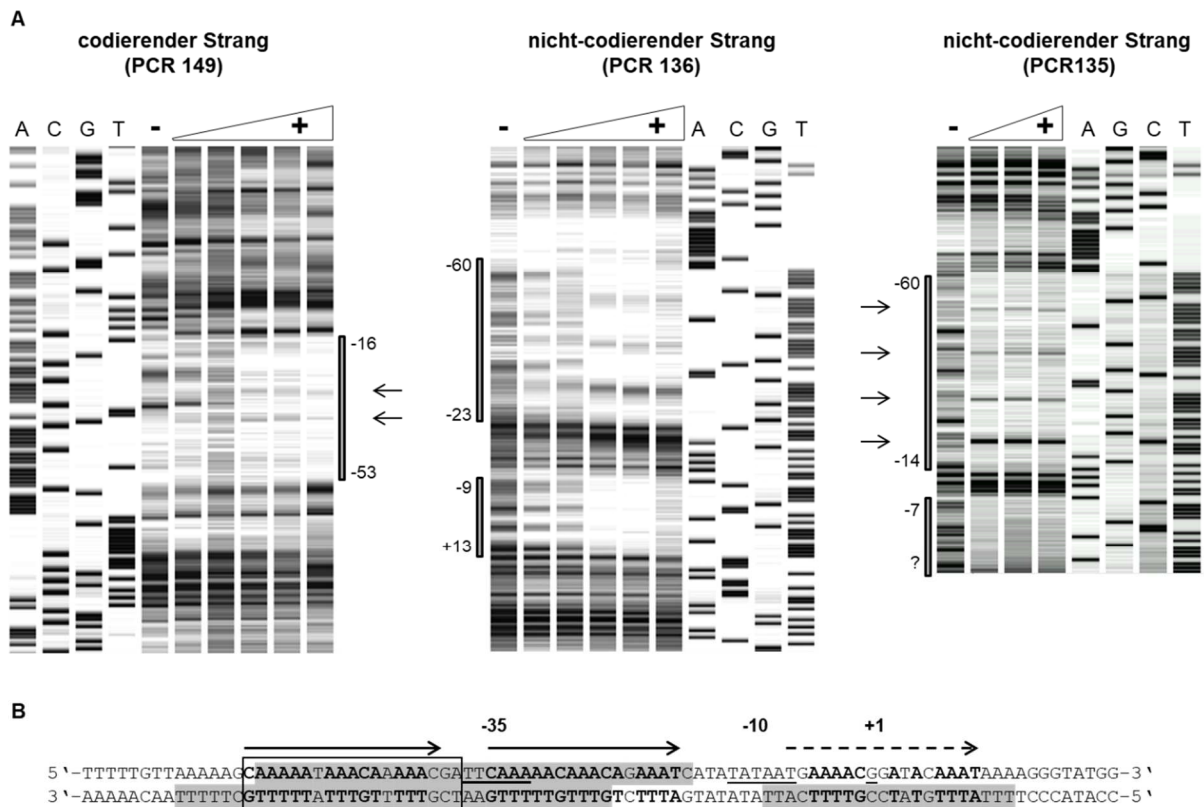


Abbildung 4.11 Identifizierung der Operatorsequenz von RhaR mittels DNase I-Footprinting-Assay. **A)** Die Promotorregion stromaufwärts des Rhamnose-Operons wurde in drei verschiedenen PCRs mit jeweils einem Cy5-markierten Primer so amplifiziert, dass entweder der codierende (PCR 149, 328 bp) oder der nicht-codierende DNA-Strang (PCR 135, 278 bp und PCR 136, 320 bp) an seinem 5'-Ende markiert wurde. In die Bindungsreaktion wurden 600 fmol des jeweiligen doppelsträngigen DNA-Fragments und aufsteigende Mengen des gereinigten Regulatorproteins RhaR (+, PCR149/PCR136: 5,5 pmol; 11,2 pmol; 22,4 pmol; 44,8 pmol; 89,6 pmol bzw. PCR135: 41,4 pmol; 82,8 pmol; 210,3 pmol) eingesetzt. Anschließend wurde der DNA-Protein-Komplex 1,3 U DNase I ausgesetzt (1 min bei RT). Die Kontrolle (-) zeigt das Bandenmuster der ungeschützten DNA, bei der kein RhaR zugegeben wurde. Die Lage der geschützten Bereiche kann anhand des Profils der zusätzlich aufgetragenen DNA-Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruchverfahren) abgelesen werden (A, ddATP; C, ddCTP; G, ddGTP; T, ddTTP). DNase I hypersensitive Stellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. **B)** Nukleotidsequenz des RhaR-Operators (unterstrichen, allgemeine Promotorelemente und Transkriptionsstartpunkt). Die für die DNase I nicht zugänglichen Sequenzen (grau unterlegt) schließen die von Leyn *et al.* (2013) vorhergesagte Operatorsequenz (Kasten) ein. Sie umfassen aber einen größeren Bereich, der eine direkte Wiederholung der Erkennungssequenz (Pfeile) enthält, auf welche sich zusätzlich eine zweite unvollständige direkte Wiederholung dieser Sequenz anschließt (gestrichelter Pfeil).

4.1.9.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die spezifische Interaktion von RhaR mit seiner Operatorsequenz innerhalb der Promotorregion stromaufwärts von *rhaEW* wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) genauer charakterisiert.

Bei dieser Methode wird die Bindung eines Proteins an ein DNA-Fragment durch eine elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Komponenten in einem nativen Polyacrylamid-Gel nachgewiesen. Die Interaktion wird durch eine verlangsamte Laufgeschwindigkeit des Protein-DNA-Komplexes im Vergleich zur freien, ungebundenen DNA sichtbar. Durch eine quantitative Analyse wurde außerdem die DNA-Bindungsaffinität des Regulators (Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D) bestimmt.

Für die Experimente wurden ein 240 bp großes P_{rhaEW} -Fragment und das Regulatorprotein RhaR in gereinigter Form eingesetzt. Das P_{rhaEW} -Fragment wurde in einer PCR mit dem Primerpaar s9943/5'-Cy5-s5960 amplifiziert, bei welcher der *amyE*-Integrationsvektor pSTH22 als Template diente. Nach der Zugabe des DNA-Bindeproteins RhaR konnten zwei unterschiedlich große Protein-DNA-Komplexe detektiert werden (Abbildung 4.12 A). Die DNA-Bande, die dem kleineren der beiden Protein-DNA-Komplexe entsprach, wies eine deutlich geringere Intensität auf und verschwand bei höheren Proteinkonzentrationen vollständig.

Aufgrund technischer Probleme musste von dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5, der mit rotem Licht angeregt wird, auf den Fluoreszenzfarbstoff FITC umgestiegen werden, welcher mit blauem Licht angeregt werden kann. Daher wurde das P_{rhaEW} -Fragment erneut mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide, 5'-FITC-s10318 und 5'-FITC-s10180, besaßen die gleichen Sequenzen wie die ursprünglichen Primer. In Gegenwart von gereinigtem RhaR konnte hier nur eine DNA-Bande, die dem RhaR-DNA-Komplex entsprach, detektiert werden. Die Zugabe von aufsteigenden Proteinmengen in die Bindungsreaktion führte zu einer Abnahme der Intensität der unteren, ungebundenen DNA-Bande und einer Zunahme der Intensität der oberen Bande des DNA-Protein-Komplexes (Abbildung 4.12 B).

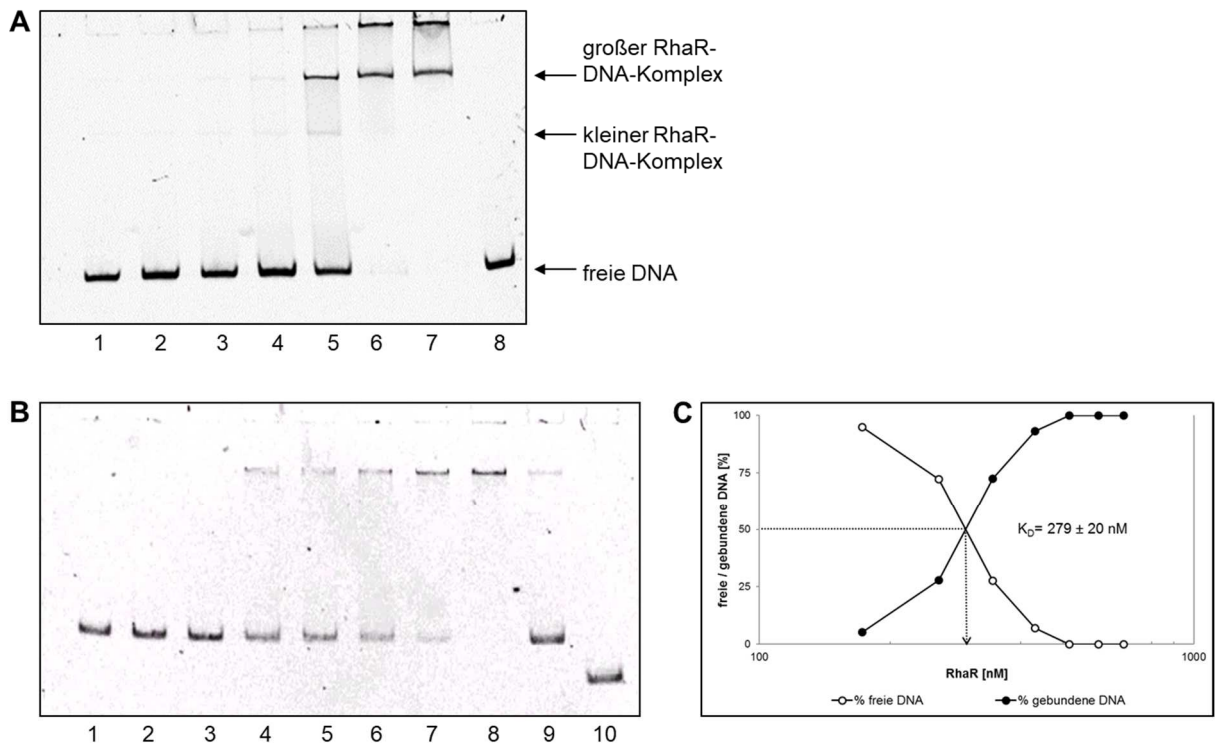


Abbildung 4.12 Nachweis der spezifischen Interaktion von RhaR mit der *rhaEW*-Promotorregion und Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mittels EMSA.

A) Interaktion des gereinigten RhaR-Proteins mit ca. 40 fmol eines 240 bp großen P_{rhaEW} -DNA-Fragments (s9943/5'-Cy5-s5960, mit pSTH22 als Template). In den Spuren **1-7** wurde RhaR in aufsteigenden Mengen zugefügt: 7,3 ng (0,25 pmol; Spur **1**), 14,6 ng (0,5 pmol; Spur **2**), 36,5 ng (1,25 pmol; Spur **3**), 73 ng (2,5 pmol; Spur **4**), 146 ng (5 pmol; Spur **5**), 365 ng (12,5 pmol; Spur **6**), 730 ng (25 pmol; Spur **7**). Spur **8** zeigt die Negativkontrolle ohne Proteinzugabe. **B)** EMSA mit einem 240 bp großen, FITC markierten P_{rhaEW} -DNA-Fragment, das in einer PCR (5'-FITC-s10318/5'-FITC-s10180) mit dem Template pSTH22 generiert wurde. In der Bindungsreaktion befanden sich 100 fmol des PCR-Produkts (Spur **1-9**) und aufsteigende Mengen an gereinigtem RhaR-Strep-Tag (Spur **1**: 0 ng; Spur **2**: 25 ng bzw. 862 fmol; Spur **3**: 50 ng bzw. 1,7 pmol; Spur **4**: 75 ng bzw. 2,6 pmol; Spur **5**: 100 ng bzw. 3,5 pmol; Spur **6**: 125 ng bzw. 4,3 pmol; Spur **7**: 150 ng bzw. 5,2 pmol; Spur **8**: 175 ng bzw. 6 pmol). In den Spuren **9-10** wurden jeweils 175 ng (6 pmol) Protein eingesetzt. Bei Spur **9** wurden zusätzlich 2,5 pmol einer unmarkierten Kompetitor-DNA (s9943/s10089) eingesetzt. Spur **10** zeigt eine Kontrolle mit 100 fmol eines unspezifischen DNA-Fragments des Mannitol-Promotors aus *Pseudomonas fluorescens* (176 bp). **C)** Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D aus drei unabhängigen Versuchen analog zu der Beschreibung zu B.

Die Spezifität der hier untersuchten DNA-Protein-Interaktion wurde durch zwei Kontrollen bestätigt. Zum einen diente ein 176 bp großes DNA-Fragment des Mannitol-Promotors aus *Pseudomonas fluorescens* als Negativkontrolle (Abbildung 4.12 B, Spur 10). Das PCR-Produkt wurde mit dem Primer s8485 und dem am

5'-Ende FITC-markierten Primer s10272 unter Verwendung von pJH253.7 als Template generiert (Hoffmann & Altenbuchner, 2015). Zum anderen wurde in die Bindungsreaktion zusätzlich eine nicht-markierte Kompetitor-DNA (s9943/s10089) hinzugefügt, welche die gleiche Sequenz wie das markierte P_{rhaEW} -Fragment besitzt und mit diesem um die Bindung von RhaR-Molekülen konkurriert. Die Zugabe der Kompetitor-DNA in einem 25-fachen molaren Überschuss führte zu einer deutlichen Abnahme der Intensität der oberen Protein-DNA-Bande, während gleichzeitig die Intensität der unteren Bande (freie DNA) zunahm (Abbildung 4.12 B, Spur 9).

Um die Bindungsreaktion quantitativ zu analysieren, wurde die eingesetzte Proteinkonzentration gegen den prozentualen Anteil der freien bzw. der gebundenen DNA aufgetragen (Abbildung 4.12 C). Die Gleichgewichtskonstante entspricht der Proteinkonzentration, bei der 50 % der DNA gebunden worden sind. Unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen wurde für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) ein Wert von 279 ± 20 nM erhalten. Der sigmoidale Verlauf der Kurve deutet darauf hin, dass der RhaR- P_{rhaEW} -Interaktion ein kooperativer Mechanismus zugrunde liegt, bei dem die Bindung eines RhaR-Monomers die Bindung weiterer RhaR-Monomere begünstigt.

Zusätzlich wurde die DNA-Bindungsfähigkeit des Regulators an die einzelnen der insgesamt drei direkt wiederholten Sequenzen in der zuvor identifizierten Operatorsequenz überprüft. Dazu wurden kurze, zueinander komplementäre Oligonukleotide, die jeweils nur einen Teil des Operators enthalten, miteinander hybridisiert (Abbildung 4.13 A). Ein 29 bp langes DNA-Fragment (5'-FITC-s10284/5'-FITC-s10317) umfasste nur die in bioinformatischen Studien von Leyn *et al.* (2013) postulierte Bindestelle des Transkriptionsfaktors (5'-ttttCAAATAAACA AAAA CGAAaatt-3'). Die 5 zusätzlichen Basenpaare am 5'- und am 3'-Ende, die von der Wildtyp-Sequenz abweichen, sollten eine generell ausreichende Größe für die Bindung des Proteins an das doppelsträngige Oligonukleotid gewährleisten.

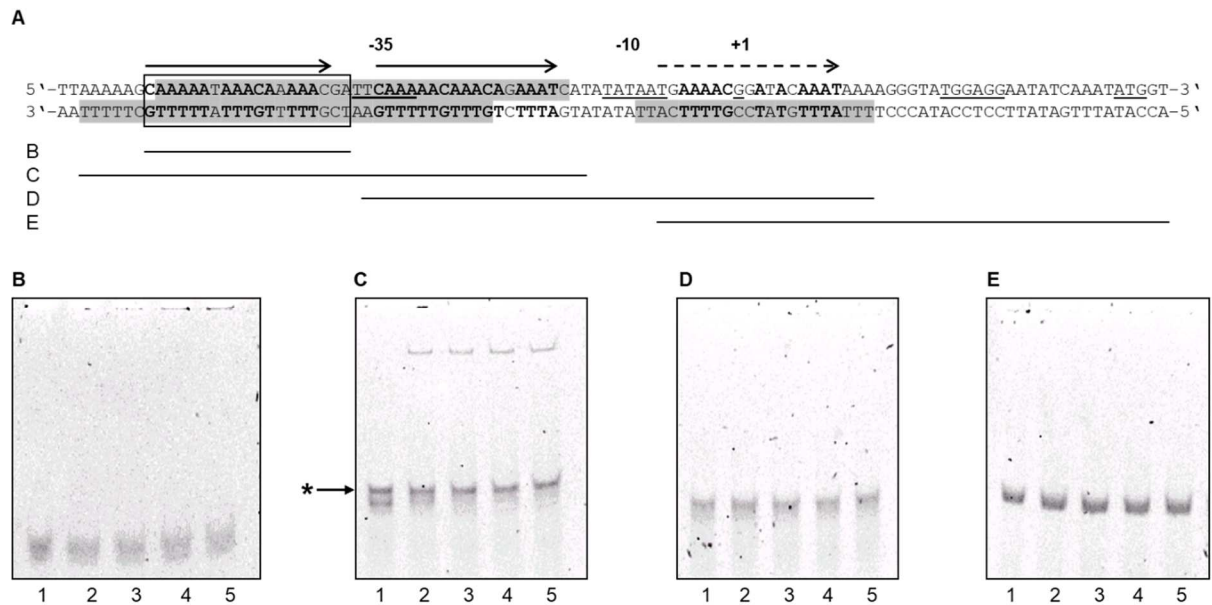


Abbildung 4.13 Untersuchung der RhaR-Bindung an die direkt wiederholten Sequenzen innerhalb der RhaR-Bindestelle mittels EMSA mit verschiedenen, doppelsträngigen (ds) Oligonukleotiden. A) Nukleotidsequenz der mittels DNase I *Footprinting* Assay identifizierte RhaR-Operatorsequenz (grau unterlegt, geschützte Bereiche). Die –35 Region, die –10 Region, der TSS, die mutmaßliche ribosomale Bindestelle und das *rhaEW*-Startcodon sind unterstrichen. Die DNA-Abschnitte, die die verschiedenen Oligonukleotide in den Experimenten B-E abdecken, sind durch die jeweilige Linie gekennzeichnet. **B-E)** Im EMSA wurden in den Spuren 1-5 je 50 fmol verschiedener dsOligonukleotide eingesetzt (**B**: 5'-FITC-s10284/5'-FITC-s10317, 19 bp + je 5 nt am 5'- und am 3'-Ende ohne Übereinstimmung mit der ursprünglichen Sequenz; **C**: 5'-FITC-s10663/5'-FITC-s10664, 47 bp (Sternchen, einzelsträngiges Oligonukleotid s10664); **D**: 5'-FITC-s10668/ 5'-FITC-s10667, 47 bp; **E**: 5'-FITC-s10666/5'-FITC-s10665, 47 bp). In den Spuren 2-5 wurden zusätzlich aufsteigende Proteinmengen zur Bindungsreaktion hinzugefügt: 100 ng (3,5 pmol; Spur 2), 200 ng (7 pmol; Spur 3), 300 ng (10 pmol; Spur 4), 400 ng (14 pmol, Spur 5) RhaR-Strep-Tag. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Nach Proteinzugabe (3,5–14 pmol) konnte jedoch keine veränderte Laufgeschwindigkeit des dsOligonukleotids (50 fmol) beobachtet werden, die auf eine Interaktion hinweisen würde (Abbildung 4.13 B). Auch die beiden je 47 bp großen DNA-Fragmente (FITC-s10668/5'-FITC-s10667 bzw. 5'-FITC-s10666/5'-FITC-s10665), die die letzten beiden direkt wiederholten Sequenzen bzw. nur die letzte, unvollständige Wiederholung der Sequenz enthielten, zeigten in Gegenwart des Repressors kein verändertes Laufverhalten (Abbildung 4.13 D-E). Eine DNA-Bindung des Regulators konnte nur mit einem DNA-Fragment (5'-FITC-s10663/5'-FITC-s10664) nachgewiesen werden, das die ersten beiden direkt wiederholten

Sequenzen umfasste (Abbildung 4.13 C). Das dsOligonukleotid wurde nach Proteinzugabe vollständig gebunden. Die Kontrolle ohne Proteinzugabe (C, Spur 1) wies eine zweite DNA-Bande auf, die auch nach Proteinzugabe erhalten blieb. Durch einen Vergleich des Laufverhaltens der einzelsträngigen Oligonukleotide s10663 bzw. s10664 sowie der Probe nach der Hybridisierungsreaktion (dsOligonukleotid) konnte gezeigt werden, dass es sich bei der zusätzlichen DNA-Bande um das einzelsträngige Oligonukleotid s10664 handelte (Daten nicht gezeigt).

4.1.10 Identifizierung des Effektormoleküls von RhaR

Der Abbau von Rhamnose erfolgt über 5 enzymatisch katalysierte Schritte, an denen die Produkte der Rhamnose-Abbaugene *rhaM*, *rhaA*, *rhaB* und *rhaEW* beteiligt sind (Abbildung 4.14 A). Dabei wird das Rhamnose-Monomer zunächst durch die Mutarotase RhaM in seine β -Form überführt und durch RhaA zu Keto-L-Rhamnulose isomerisiert. Die Kinase RhaB ist verantwortlich für die anschließende Phosphorylierung zu L-Rhamnulose-1-Phosphat. Im letzten Schritt wird das phosphorylierte Substrat durch die bifunktionelle L-Rhamnulose-Phosphat-Aldolase/L-Lactaldehyd-Dehydrogenase RhaEW in Dihydroxyacetonphosphat und L-Lactat gespalten.

Die Identifikation des Effektormoleküls von RhaR, das innerhalb dieses Abbauweges vermutet wurde, erfolgte zunächst *in vivo* durch die Erzeugung von Deletionsstämmen der Rhamnose-Abbaugene. Die Signalwirkung des Effektormoleküls wurde zusätzlich *in vitro* durch einen *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) bestätigt.

4.1.10.1 Identifizierung des Effektormoleküls mittels Rhamnose-Stoffwechselmutanten

Um das Effektormolekül zu identifizieren, das die Anwesenheit von Rhamnose signalisiert und zu einer Induktion des Rhamnose-Operons führt, wurden die Rhamnose-Abbaugene einzeln deletiert.

Dazu wurden jeweils die 5'- und 3'-flankierenden Genregionen in zwei getrennten PCRs, in denen chromosomale DNA von *B. subtilis* 168 als Template diente,

amplifiziert. Diese beiden homologen DNA-Fragmente wurden über die eingeführten Restriktionssequenzen miteinander fusioniert und in die *Multiple Cloning Site* des *B. subtilis* Suizidplasmids pJOE6743.1 integriert. Für die Deletion von *rhaEW* wurden die Primerpaare s9697/s9696 und s9937/s9938 verwendet, die Primerpaare s9750/s9749 und s9748/s9747 für *rhaB*, s9754/s9753 und s9752/s9751 für *rhaM* sowie s9748/s9747 und s9695/s9694 für *rhaA*. Mit den auf diese Weise generierten Vektoren, welche die entsprechende Deletionskassette enthalten (pSTH66 $\Delta rhaEW$, pSTH61 $\Delta rhaB$, pSTH58 $\Delta rhaM$ bzw. pSTH60 $\Delta rhaA$) wurde der Ausgangsstamm IIG-Bs168-4 ($\Delta manPA$) transformiert. Dieser Stamm ermöglicht aufgrund seines Genotyps die Anwendung eines markerlosen Deletionssystems (Wenzel & Altenbuchner, 2015), welches auf der homologen Rekombination basiert.

Die erhaltenen Stämme SH44 ($\Delta rhaEW$), SH36 ($\Delta rhaB$), SH32 ($\Delta rhaM$) und SH35 ($\Delta rhaA$) wurden mit dem *amyE*-Integrationsvektor pSTH22 transformiert. Hieraus resultierten die Reporterstämme SH46, SH39, SH42 bzw. SH43. Die Aktivität des chromosomal integrierten P_{rhaEW} -*lacZ*-Fusionskonstrukts wurde 22 h nach Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose mittels Miller Assay analysiert (Abbildung 4.14 B). Als Vergleich wurde der isogene Wildtypstamm SH28 herangezogen. Die Deletion des Gens *rhaM* (SH42), welches für die Rhamnose-Mutarotase RhaM kodiert, hatte keine Auswirkungen auf die *rhaEW*-Promotoraktivität. Eine mutmaßliche intrazelluläre Akkumulation von L-Rhamnulose-1-Phosphat (R1P), bedingt durch das Fehlen des letzten Enzyms dieser Kette, die bifunktionelle Aldolase/Dehydrogenase RhaEW (SH46), führte zu einer ca. 2,4-fach höheren Induktion. Dagegen führte die Blockade der beiden vorausgehenden katabolischen Schritte (SH43 und SH39) zu einem nahezu vollständigen Verlust der Induktion. Es wurde nur noch eine LacZ-Aktivität erhalten, die der Basalaktivität des Promotors entsprach. Aus den übereinstimmenden Ergebnissen wurde abgeleitet, dass der Effektor des Regulatorproteins RhaR sehr wahrscheinlich R1P ist.

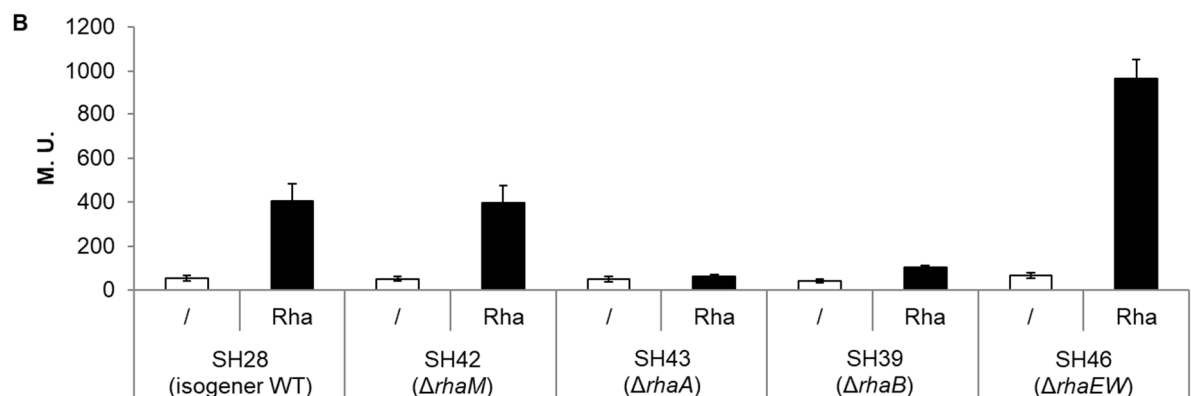
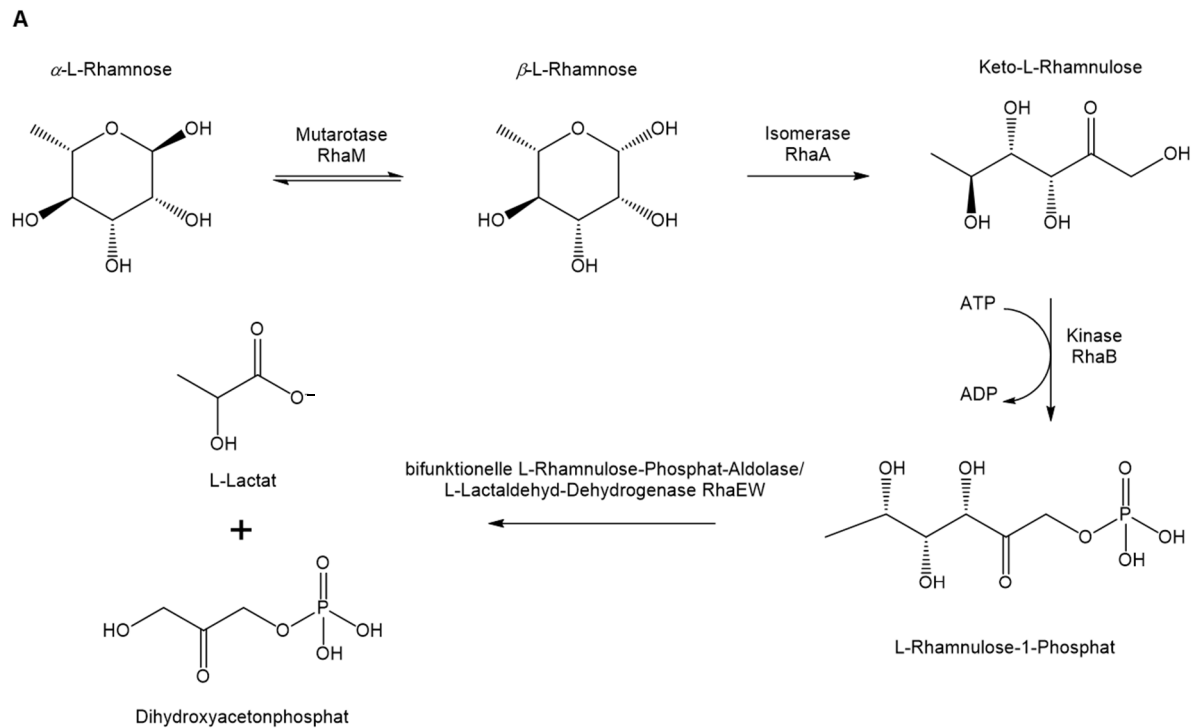


Abbildung 4.14 Identifizierung des Effektormoleküls von RhaR mittels Stoffwechselmutanten.

A) Schematische Darstellung des postulierten Abbauwegs von Rhamnose. **B)** Miller Assay mit Deletionsstämmen der Rhamnose-Abbaugene. Die Gene, die für die 5 enzymatisch katalysierten Abbauschritte von L-Rhamnose zu L-Lactat und Dihydroxyacetonphosphat kodieren, wurden einzeln deletiert. Nach der chromosomalen Integration des P_{rhaEW} - $lacZ$ -Fusionskonstrukts in den $amyE$ -Locus ($pSTH22$) wurde die Promotoraktivität 22 h nach der Zugabe von 0,2 %L-Rhamnose (Rha) zum LB-Medium der exponentiell wachsenden Kultur ermittelt (/ , Basalaktivität des Promotors unter nicht-induzierten Bedingungen). Dargestellt sind die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung, die aus jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen erhalten wurden.

4.1.10.2 Gewinnung des vermuteten Effektors von RhaR (Rhamnulose-1-Phosphat)

In vivo-Studien mit Deletionsstämmen, bei denen der Abbau von Rhamnose an jeweils einem (bzw. den letzten beiden) der 5 enzymatisch katalysierten Schritte durch das Fehlen des entsprechenden Enzyms unterbrochen wurde, legten nahe, dass es sich bei dem Effektormolekül des Repressors RhaR um Rhamnulose-1-Phosphat (R1P) handelt. Dies sollte *in vitro* durch einen *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) bestätigt werden. Dazu musste zunächst der nicht käufliche Metabolit R1P ausgehend von L-Rhamnulose synthetisiert und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (DC) isoliert werden.

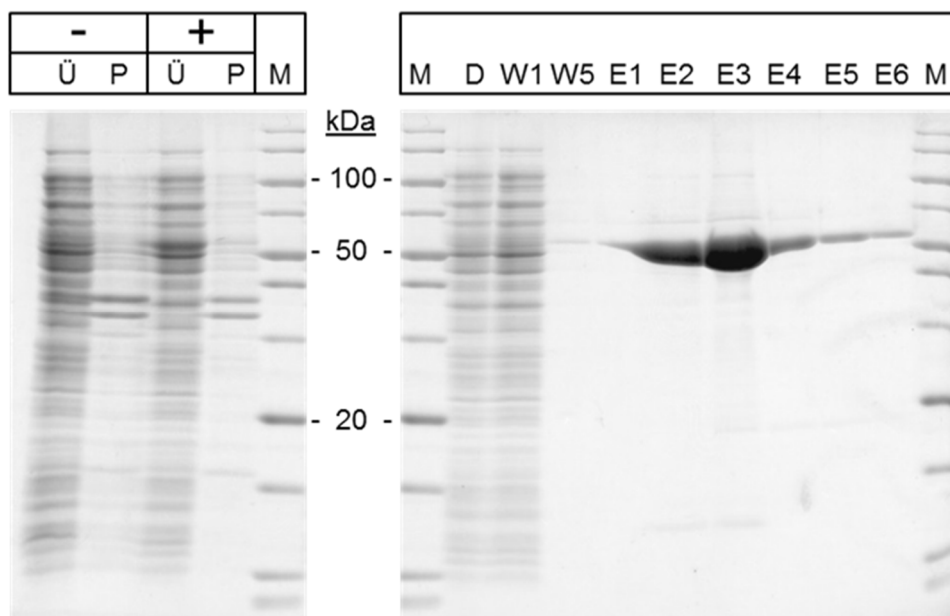


Abbildung 4.15 Visualisierung der Überexpression von *E. coli* RhaB-Strep-Tag (54 kDa) in *E. coli* JM109 und der anschließenden Reinigung mittels Affinitätschromatographie (15%iges SDS-PAGE). Die *rhaB*-Genexpression wurde in exponentiell wachsenden Zellen des Stamms JM109 pSTH76 durch Zugabe von 2 mM *m*-Toluylsäure zum LB-Medium induziert. Nach weiteren 4 h Wachstum bei 30 °C wurden die Zellen geerntet. Spurbelegung: **M**, Marker (PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific); **Ü**, Überstand (lösliche Zellfraktion); **P**, Pellet (unlösliche Zellfraktion); **-**, Proben der nicht-induzierten Kultur; **+**, Proben der induzierten Kultur; **D**, Durchfluss; **W1/W5**, Waschschrift 1 bzw. 5; **E1-E6**, Elutionsschritte 1 bis 6.

Für die *in vitro*-Phosphorylierung von L-Rhamnulose wurde die ATP-abhängige L-Rhamnulokinase RhaB von *E. coli* K12 eingesetzt. Das entsprechende Gen wurde ohne Stopcodon mit dem Primerpaar s10087/s10088 unter Verwendung von

chromosomaler DNA aus *E. coli* JM109 als Template amplifiziert. Das 1,5 kb große PCR-Produkt wurde über die an den Enden eingeführten Restriktionssequenzen *NdeI/BamHI* mit dem 3,6 kb-Fragment von pJOE6089.4 ligiert, wodurch *rhaB* C-terminal mit einem Strep-Tag II fusioniert wurde (pSTH74). Durch die Umklonierung über *NdeI/PstI* in das 5,1 kb-Fragment von pNG418.3 entstand der Expressionsvektor pSTH76, bei dem das *rhaB-strep*-Fragment unter die Kontrolle des *Pseudomonas putida* Promotors Pm gebracht wurde. Der *E. coli* Stamm JM109 wurde mit diesem Plasmid transformiert (TSS-Methode) und der Pm-Promotor in der exponentiellen Phase mit 2 mM *m*-Toluylsäure induziert. Nach 4-stündigem Wachstum in LB-Medium bei 30 °C konnte bei der anschließenden SDS-Gelanalyse in der löslichen Zellfraktion der induzierten Probe eine zusätzliche Bande bei ca. 54 kDa beobachtet werden, die dem theoretischen Molekulargewicht von RhaB entspricht (Abbildung 4.15). Insgesamt wurden aus einer 50 ml Kultur ca. 97 OD₆₀₀ Zellen geerntet, durch einen Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und die lösliche Zellfraktion anschließend über eine Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. Das Eluat 3 enthielt mit einer Proteinkonzentration von ca. 560 ng/μl den größten Anteil an gereinigtem RhaB-Strep-Tag und wurde für die *in vitro*-Phosphorylierung von Rhamnulose zu R1P verwendet (s. Kapitel 3.2.4.1).

Die Abtrennung und der Nachweis des gewünschten Produkts aus dem Reaktionsansatz erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (DC, Kapitel 3.2.4.2) mit Hilfe des Laufmittels Butanol-Ethanol-Wasser 5:3:2 (v/v/v) und anschließender Molybdän-Färbung. Eine zunächst durchgeführte Kinetik der Phosphorylierungsreaktion bei 37 °C zeigte, dass die Umsetzung von Rhamnulose zum phosphorylierten Produkt, R1P, sehr schnell, d.h. bereits unmittelbar nach der Zugabe des Enzyms, erfolgte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Im Folgenden wurde der Reaktionsansatz für die Gewinnung von R1P (s. Kapitel 3.2.4.1) 2 h bei 37 °C inkubiert (Abbildung 4.16). Als Negativkontrollen dienten die einzelnen Komponenten der Reaktionsansätze (Spur 1 und Spur 3-5), 5 mM Rhamnose als Substrat anstelle von Rhamnulose (Spur 2) sowie unvollständige Ansätze (Spur 6-8). Außerdem diente ein vollständiger Reaktionsansatz mit zuvor Hitze-inaktiviertem Enzym als Kontrolle (Spur 9), bei welcher ebenfalls keine Bildung von R1P beobachtet werden konnte.

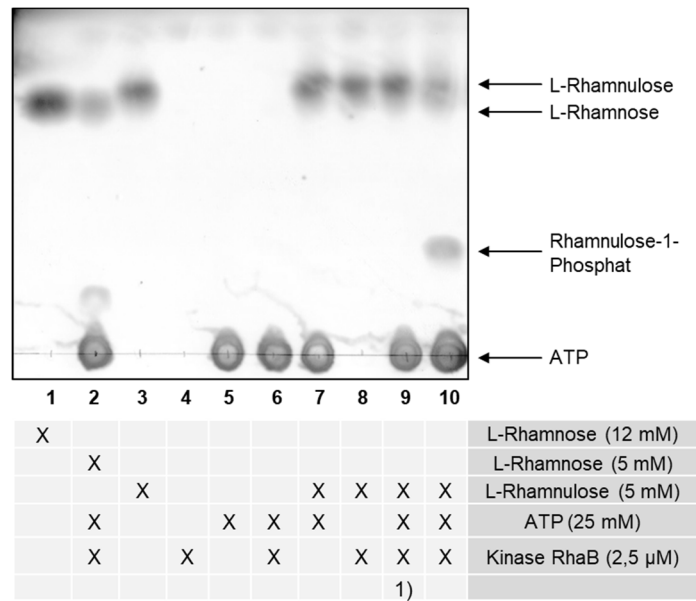


Abbildung 4.16 *In vitro*-Phosphorylierung von L-Rhamnulose zu L-Rhamnulose-1-Phosphat mit Hilfe der *E. coli* Kinase RhaB. Darstellung mittels Dünnschichtchromatographie. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Abgebildet sind die einzelnen Negativkontrollen (Spuren 1-9) sowie die eigentliche Phosphorylierungsreaktion (Spur 10). Die in der Tabelle mit Kreuzen markierten Komponenten waren in der angegebenen Konzentration im jeweiligen Reaktionsansatz enthalten. ¹⁾ das Enzym RhaB wurde durch eine Vorbehandlung (10 min Erhitzen bei 99 °C) inaktiviert.

Das Produkt der Phosphorylierung von Rhamnulose konnte anschließend durch eine präparative DC gereinigt und isoliert werden (Abbildung 4.17). Durch die Umkehrreaktion mittels alkalischer Phosphatase wurde nachgewiesen, dass das gereinigte Produkt phosphoryliert vorlag.

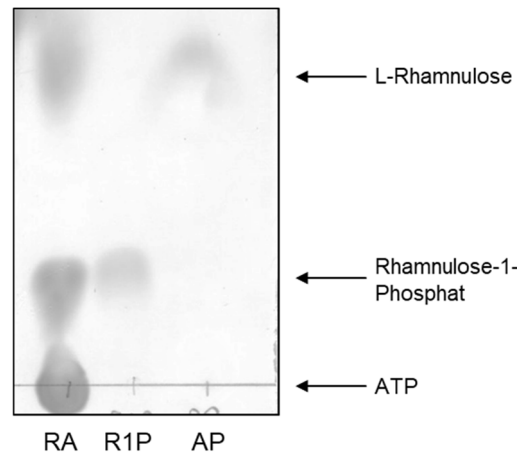


Abbildung 4.17 Verfolgung der Isolation von Rhamnulose-1-Phosphat (R1P) mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (DC). Nach der *in vitro*-Phosphorylierung von Rhamnulose (RA, Reaktionsansatz) wurde das erhaltene Produkt (R1P) mittels DC abgetrennt, aus der ungefärbten DC-Platte ausgeschnitten und aus dem Trägermaterial eluiert. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte über die durch die alkalische Phosphatase (AP) katalysierte Umkehrreaktion. Zur Überwachung der präparativen DC wurden der verwendete Reaktionsansatz (RA), das eluierte Produkt (R1P) sowie das dephosphorylierte Produkt (AP) erneut auf die hier dargestellte DC-Platte aufgetragen.

4.1.10.3 *In vitro*-Nachweis der Effektorbindung von RhaR mittels EMSA

In vivo-Studien mit Rhamnose-Stoffwechselmutanten, bei denen die Verwertung von Rhamnose durch eine genetische Blockade von jeweils einem (bzw. der letzten beiden) der insgesamt 5 Abbauschritte unterbunden ist, lieferten bereits den Hinweis darauf, dass das Intermediat Rhamnulose-1-Phosphat (R1P) das Effektormolekül von RhaR ist. Um diese Annahme *in vitro* zu bestätigen wurde ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) mit dem mutmaßlichen Effektormolekül durchgeführt. Da dieses nicht käuflich erwerblich ist, wurde es zunächst durch eine *in vitro*-Phosphorylierung ausgehend von L-Rhamnulose synthetisiert (vorheriges Kapitel, 4.1.10.2). Die spezifische Interaktion des Repressors RhaR mit der Promotorregion vor *rhaEW* wurde bereits zuvor nachgewiesen (Kapitel 4.1.9.3). Durch die zusätzliche Zugabe von R1P in die Bindungsreaktion konnte gezeigt werden, dass aufsteigende Mengen R1P die Affinität von RhaR für das P_{rhaEW} -DNA-Fragment zunehmend beeinträchtigten. Der Protein-DNA-Komplex zerfiel wieder und setzte das Cy5-markierte DNA-Fragment (s9943/5'-Cy5-s5960, Template pSTH22) frei (Abbildung 4.18 Spur 7 und 8). Bei einer zunehmenden Menge an R1P (doppelte

Menge) nahm die Intensität der freien, unteren DNA-Banden zu, während die der gebundenen, oberen DNA-Bande gleichzeitig abnahm. Die Zugabe von L-Rhamnose bzw. L-RhamnULOse hingegen beeinträchtigte die Bindung von RhaR an dieses DNA-Fragment nicht (Spur 3-6).

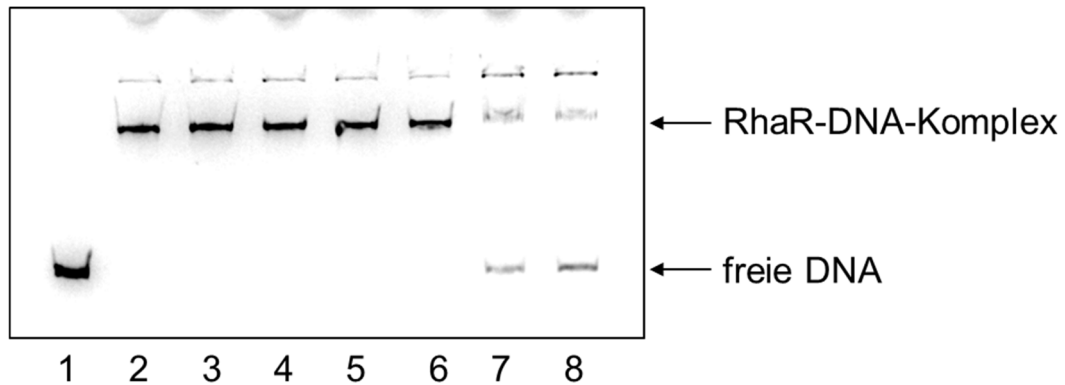


Abbildung 4.18 Untersuchung der Auswirkungen von Rhamnose und den Stoffwechselintermediaten RhamnULOse und RhamnULOse-1-Phosphat (R1P) auf die spezifische Wechselwirkung zwischen RhaR-Strep-Tag und der *rhaEW*-Promotorregion mittels EMSA. Für den EMSA wurden 240 bp der Promotorregion vor *rhaEW* in einer PCR (s9943/5'-Cy5-s5960) mit pSTH22 als Template amplifiziert. In die Bindungsreaktion wurden jeweils 100 fmol dieses DNA-Fragments eingesetzt. (Spuren 1-8). Spur 1 zeigt die Negativkontrolle ohne Protein. In den Spuren 2-8 wurden ca. 14 pmol gereinigtes RhaR-Strep-Tag-Protein zugefügt. Die Spuren 3 und 4 zeigen das Verhalten bei der zusätzlichen Zugabe von 125 μ M bzw. 5 mM L-Rhamnose. In Spur 5 und 6 befanden sich 125 μ M bzw. 5 mM L-RhamnULOse. Die Freisetzung des PCR-Fragments aus dem DNA-Protein-Komplex wurde in den Spuren 7-8 durch die Zugabe von aufsteigenden Mengen R1P nachgewiesen. Verwendet wurden 0,25 μ l (7) und 0,5 μ l (8) einer R1P-Lösung mit unbekannter Konzentration, welche zuvor durch *in vitro*-Phosphorylierung hergestellt wurde (Kapitel 4.1.10.2). In die Bindungsreaktion wurden maximal (d. h. 100 % Ausbeute bei der *in vitro*-Synthese) 125 μ M bzw. 250 μ M eingesetzt.

4.1.11 Kohlenstoff-Katabolitrepression – Nachweis der Funktionalität der *cre*-Sequenz

Stehen dem Bodenbakterium *B. subtilis* in seiner Umgebung verschiedene Kohlenstoff-Quellen zur Verfügung, so wird das energetisch günstigere Substrat, wie z. B. Glucose, vorrangig verwertet. Dieses Phänomen wird als Kohlenstoff-Katabolitrepression bezeichnet und wird durch den globalen Transkriptionsregulator CcpA vermittelt. CcpA kann in einem Komplex mit einem seiner beiden Corepressoren, HPr oder Crh, an die Operatorsequenz, die als *cre* (*catabolite responsive element*)-Sequenz bezeichnet wird, binden. Die 16 bp langen *cre*-Boxen mit der Konsensussequenz WTGNNARCGNWWCAW sind nur in einem geringen Maße konserviert (hochkonservierte Basen sind unterstrichen) (Schumacher *et al.*, 2011; Weickert & Chambliss, 1990).

Durch die Verwendung des Reporterstamms SH28 ($\Delta amyE::P_{rhaEW-lacZ}$, spc^R) konnte mittels Miller Assay gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Zugabe von 0,2 % Glucose zum Wachstumsmedium während der Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose zu einer deutlichen Repression der *rhaEW*-Promotoraktivität führt (Abbildung 4.19 B). Durch eine Analyse der Sequenz des Rhamnose-Promotors konnte eine mögliche *cre*-Sequenz (ATGAAAACGGATACAA) identifiziert werden, die mit der –10 Region überlappt und den TSS beinhaltet (Abbildung 4.19 A). Um die Funktionalität dieser Sequenz nachzuweisen, wurde sie zu der Basenabfolge ATtAAcACGcgTcacA mutiert (von der ursprünglichen Sequenz abweichende Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt). Bei den Substitutionen wurde beachtet, dass die ausgetauschten Basen nicht nur von der ursprünglichen DNA-Sequenz abwichen (7 Basenaustausche), sondern sich insbesondere auch von der *cre*-Konsensussequenz (6 Basenaustausche) unterschieden. Außerdem wurde die –10 Region unangetastet gelassen. Zur Identifizierung positiver Klone, die die mutierte Sequenz enthalten, wurde gleichzeitig eine *Mlu*I-Schnittstelle eingeführt. Die zielgerichteten Nukleotidaustausche wurden auch hier durch eine nach der Q5[®] *Site-Directed Mutagenesis* von NEB abgeänderten Methode durchgeführt (Kapitel 4.1.5.1). Als Template für die Mutagenese-PCR (s10093/s10094) wurde der Ausgangsvektor pSTH22 ($amyE'$ - ter - $P_{rhaEW-lacZ}$ - spc' - $amyE$) verwendet. Mit dem neu generierten *amyE*-Integrationsvektor pSTH77 wurde der *B. subtilis* Stamm IIG-Bs168-4 transformiert (SH49). Die anschließende Untersuchung der

Promotoraktivität mittels Miller Assay zeigte, dass die CCR durch die Mutation der angenommenen *cre*-Sequenz aufgehoben wurde (Abbildung 4.19 B). Die gleichzeitige Zugabe von Rhamnose und Glucose zum Wachstumsmedium führte, im Gegensatz zum Wildtyp-Kontrollstamm mit intakter *cre*-Sequenz (SH28), nicht zu einer Repression der P_{rhaEW} -Aktivität.

Die vergleichsweise geringere Rhamnose-induzierte Promotoraktivität ist vermutlich auf die Mutation des schwach konservierten G-Rests an Position 7 der –10 Region (Rosenberg & Court, 1979) (TATAAT**G** zu TATAAT**T**) zurückzuführen.

Zusätzlich konnte auch eine deutlich höhere Basalaktivität beobachtet werden. Da die *cre*-Box von *rhaEW* sowohl mit der –10 Region als auch mit der Bindestelle des Transkriptionsregulators RhaR überlappt, wurde durch die eingebrachten Punktmutationen gleichzeitig auch die dritte, unvollständige direkte Wiederholung des 17 bp langen Sequenzmotivs innerhalb der RhaR-Bindestelle mutiert. Dies hat sehr wahrscheinlich trotz Abwesenheit von Rhamnose eine verminderte Bindungsaffinität des Repressors zur Folge.

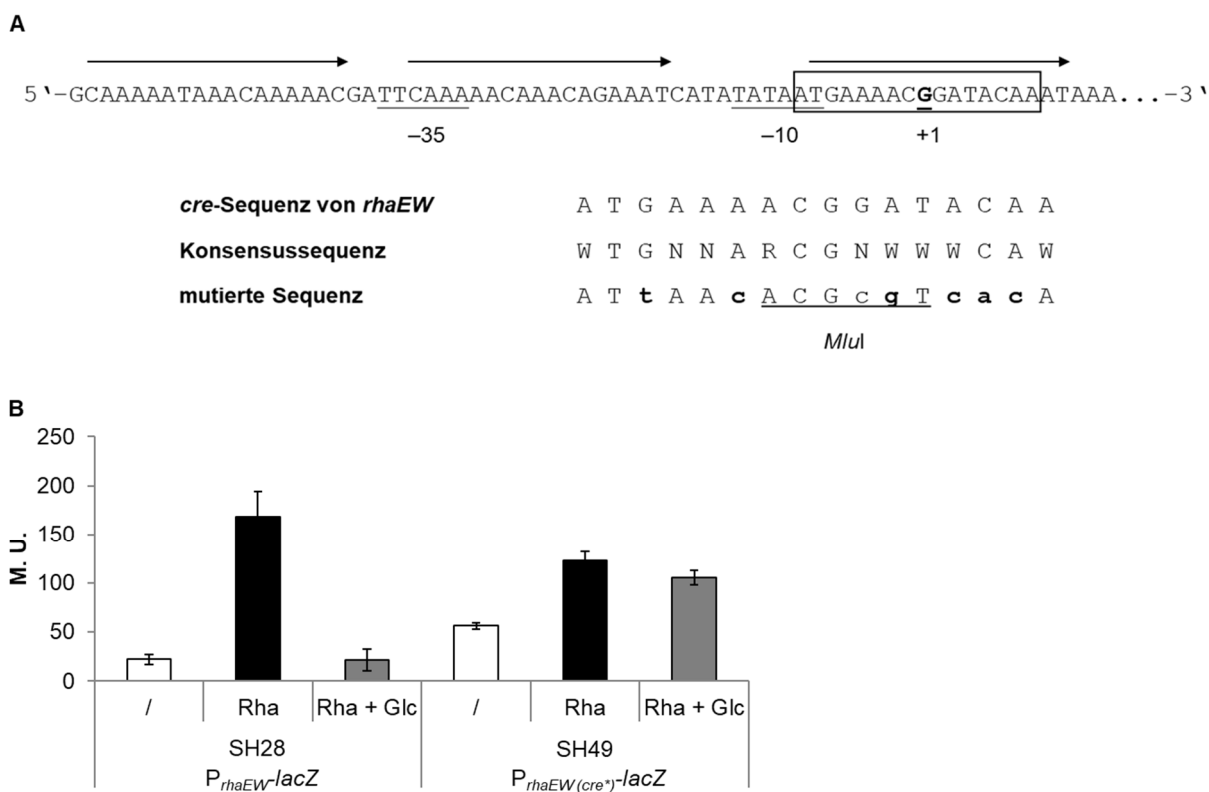


Abbildung 4.19 Überprüfung der Funktionalität der *cre* (*catabolite responsive element*)-Sequenz von *rhaEW* durch Mutation der Basensequenz. A) Anhand der Konsensussequenz für *cre*-Boxen konnte eine entsprechende Nukleotidabfolge stromaufwärts von *rhaEW* identifiziert werden (Kasten). Der Transkriptionsstartpunkt sowie die -10 und -35 Regionen sind unterstrichen. In Abwesenheit von Rhamnose bindet der Regulator RhaR an seine Operatorsequenzen (Pfeile). Zum Nachweis der Funktionalität der *cre*-Sequenz wurde diese durch Nukleotidaustausche mutiert (Kleinbuchstaben, Abweichung von der Ursprungssequenz; fett markierte Kleinbuchstaben, Abweichung von der Ursprungs- und der Konsensussequenz). **B)** Die Veränderung der Promotoraktivität durch Mutation der vermuteten *cre*-Sequenz ($P_{rhaEW(cre*)}$, SH49) wurde in LB-Medium mittels Miller Assay untersucht und mit der der Wildtyp-Sequenz (SH28) verglichen. Die Basalaktivität (/, nicht-induziert) und die LacZ-Aktivität (M. U., Miller Units) 6 h nach Induktion mit je 0,2 % L-Rhamnose (Rha) bzw. L-Rhamnose und D-Glucose (Rha + Glc) wurden in jeweils drei unabhängigen Versuchen gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.2 Regulation des Glucomannan-Stoffwechsels in *Bacillus subtilis*

Zusätzlich zu der Regulation des Rhamnose-Operons wurde in dieser Arbeit die Regulation eines weiteren Operons, das ebenfalls der Verwertung von Zellwandkohlenhydraten dient, untersucht. Entsprechend seiner Funktion wird das Operon als Glucomannan-Operon (*gmuBACDREFG*) bezeichnet (Sadaie *et al.*, 2008).

4.2.1 Galactomannan-Verwertung

Glucomannane sind verzweigte Polysaccharidketten, deren β -1,4-verknüpfte Hauptkette aus sich abwechselnden Einheiten von D-Glucose- und D-Mannose-Monomeren zusammengesetzt ist. Neben den Glucomannanen handelt es sich auch bei Galactomannanen um Heteromannane, in deren homopolymeren Hauptkette die Mannose-Einheiten ebenfalls über eine β -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Die lineare Mannankette verzweigt sich hier in unregelmäßigen Abständen über α -1,6-gebundene D-Galactose-Monomere. Da es sich bei Gluco- und Galactomannanen um ähnliche Verbindungsklassen handelt, wurde vermutet, dass nicht nur Glucomannan sondern auch Galactomannan durch die Genprodukte des *gmu*-Operons verwertet werden kann. In diesem Fall sollten die Gene des Operons auch durch Galactomannan induziert werden können. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst 498 bp der Sequenz stromaufwärts des ersten Gens, *gmuB*, mittels PCR (s11020/s11021) amplifiziert. Als Template wurde genomische DNA von *B. subtilis* 168 eingesetzt. In einer anschließenden *Gibson Assembly*-Reaktion wurde das PCR-Fragment mittels der überlappenden Sequenzen mit dem *lacZ*-Reporter des *NheI/NdeI*-verdauten 10,7 kb-Fragments des *amyE*-Integrationsvektors pKAM243 ligiert. Mit dem neu generierten Vektor pSTH111 wurde ein Tryptophan-prototrophes Derivat von *B. subtilis* 168, KM0 (*trpC*⁺), transformiert. Bei Transformanten mit dem Phänotyp AmyE⁻ Erm^S Spc^R sollte die Promotor-*lacZ*-Expressionskassette in den chromosomalen *amyE*-Locus integriert worden sein. Dies wurde zusätzlich mittels Kolonie-PCR (s7406/s11021) überprüft. Der erhaltene Reporterstamm wurde als SH90 ($\Delta amyE::P_{gmuB-lacZ}$, *spc*^R) bezeichnet.

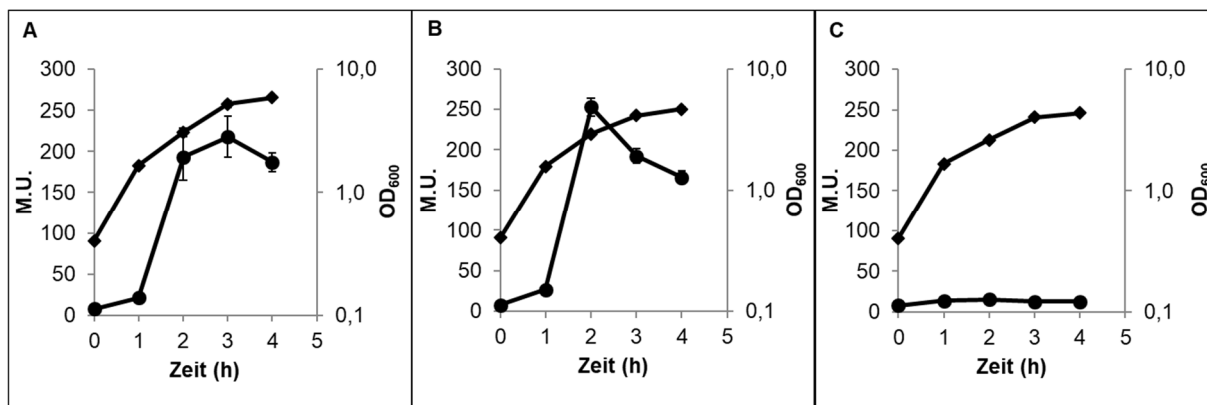


Abbildung 4.20 LacZ-Aktivität (in Miller Units, M. U., Kreis) des Stamms SH90 ($\Delta amyE::P_{gmuB-lacZ}$) im Wachstumsverlauf (Raute) nach der Induktion zum Zeitpunkt $t=0$ h. Die Zugabe von 0,2 % Konjak-Glucomannan (A) bzw. 0,2 % des Galactomannans *Locust Bean Gum* (B) erfolgte nach 2 h Wachstum in LB-Medium bei 37 °C. C) Dargestellt ist die nicht-induzierte Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Messungen an.

Im Anschluss wurde die *gmuB*-Promotoraktivität in Gegenwart von Konjak-Glucomannan (GM) bzw. des Galactomannans *Locust Bean Gum* (LBG) untersucht (Abbildung 4.20). Dazu wurde SH90 in LB-Medium angezogen und nach 2 h Wachstum während der exponentiellen Phase mit 0,2 % des jeweiligen Zuckers induziert. Das Wachstum und die Aktivität des LacZ-Reportergens wurden anschließend stündlich verfolgt. Nach einer Zugabe von GM wurde die maximale Aktivität erst nach 3 h Induktion erreicht. Auch die Anwesenheit von LBG im Nährmedium führte zu einer Induktion des *gmuB*-Promotors. Die höchste Aktivität konnte hier bereits nach 2 h Induktion detektiert werden. Die nicht-induzierte Kultur wies dagegen nur eine geringe Basalaktivität auf.

Bei weiteren Untersuchungen zur Regulation des *gmuB*-Promotors wurde die Promotoraktivität daher nur noch 2 h (LBG) bzw. 3 h (GM) nach der Induktion ermittelt. Die jeweils darauffolgende kontinuierliche Abnahme der Promotoraktivität sollte zum einen auf den Verbrauch von GM bzw. LBG zurückgehen. Zum anderen könnte auch die vermutliche Freisetzung von Glucose-Monomeren aus GM zur Kohlenstoff-Katabolitrepression führen, die eine Hemmung der Promotoraktivität verursachen sollte.

4.2.2 Heterologe Expression von *gmuR-strep* in *E. coli* und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Innerhalb des *gmu*-Operons befindet sich an fünfter Position das regulatorische Gen *gmuR*, das für einen Transkriptionsfaktor der GntR-Familie kodiert (Kunst *et al.*, 1997). Um die spezifische Bindung von GmuR an seinen Operator nachzuweisen und die zugehörige DNA-Sequenz zu identifizieren, wurde *gmuR* zunächst in *E. coli* JM109 exprimiert.

Das *gmuR*-Gen von *B. subtilis* 168 wurde mittels PCR (s11052/s11053) ohne sein Stopcodon amplifiziert und über die eingeführten *NdeI/BamHI*-Restriktionsschnittstellen in das 3,6 kb-Fragment des Vektors pSTH59 integriert. Durch diesen Klonierungsschritt wurde *gmuR* C-terminal mit einem Strep-Tag II fusioniert. Der neu erzeugte Vektor, pSTH110, diente als Template für eine weitere PCR (s11054/s11055), bei der Fragmentenden erzeugt wurden, die mit dem *NdeI/PstI*-verdauten RhaR-Expressionsplasmid pSTH63 überlappen. Dies ermöglichte die Umklonierung des zuvor PCR-amplifizierten *gmuR-strep*-Konstrukts in dieses Plasmid mittels *Gibson Assembly* (pSTH114). Bei dem Expressionsplasmid pSTH63 handelt es sich um ein Derivat des Vektors pNG418.3, der auf dem XylS/Pm-System aus *Pseudomonas putida* basiert. Dieses Expressionssystem wird durch Benzoesäurederivate induziert. Als Wirtstamm für die Expression von *gmuR* diente der *E. coli* Stamm JM109, der mit dem Expressionsvektor pSTH114 transformiert wurde. Die *gmuR*-Expression wurde durch Zugabe von 2 mM *m*-Toluylsäure zu einer 50 ml LB-Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Nach 4 h Wachstum bei 37 °C wurden die Zellen geerntet (ca. 63 OD₆₀₀ Zellen) und mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen. Das GmuR-Strep-Tag-Protein wurde anschließend durch eine Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepharose aus der löslichen Fraktion des Rohextraktes isoliert.

GmuR-Strep-Tag besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 28 kDa. Eine entsprechende Bande konnte bei der anschließenden SDS-Analyse in der Spur detektiert werden, in der die Probe der löslichen Zellfraktion der induzierten Kultur aufgetragen wurde (Abbildung 4.21). Die mittels Bradford-Test bestimmte Proteinkonzentration der zweiten Fraktion des Eluats, welche den höchsten Proteingehalt besaß, betrug 329 ng/µl. Diese Konzentration war ausreichend für die

geplanten Versuche, in denen daher das Eluat 2 verwendet wurde. Die Reinheit des rekombinanten GmuR-Proteins wurde durch Analyse des Gels mit ImageJ kalkuliert und betrug etwa 95 %.

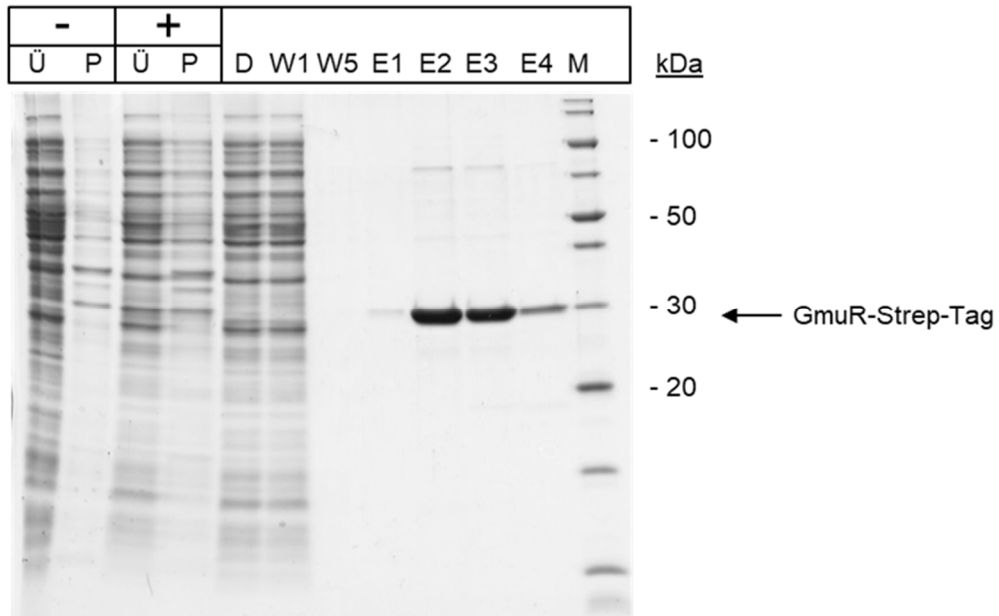


Abbildung 4.21 Nachweis der heterologen Expression und affinitätschromatographischen Aufreinigung von *B. subtilis* GmuR-Strep-Tag (28 kDa) mittels SDS-PAGE (15 %). Das Fusionskonstrukt *gmuR-strep* wurde in *E. coli* JM109 pSTH114 exprimiert. Die Genexpression (unter der Kontrolle des Pm-Promotors aus *Pseudomonas putida*) wurde während des exponentiellen Wachstums mit 2 mM *m*-Toluylsäure induziert. Nach 4 h Wachstum in LB-Medium bei 37 °C erfolgte die Zelleernte. Spurbelegung: **M**, Proteinmarker (PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific); **Ü**, Überstand (lösliche Zellfraktion); **P**, Pellet (unlösliche Zellfraktion); **-**, Proben der nicht-induzierten Kultur; **+**, Proben der induzierten Kultur; **D**, Durchfluss; **W1/W5**, Waschfraktion 1 bzw. 5; **E1-E4**, Elutionsfraktionen 1 bis 4.

4.2.3 Die Organisation des *gmu*-Operons

Die 7 Strukturgene, von denen man annimmt, dass sie allesamt am Abbau von Mannanen beteiligt sind, liegen in einem Operon vor, welches auch das regulatorische Gen *gmuR* umfasst (Kunst *et al.*, 1997; Sadaie *et al.*, 1997; Sadaie *et al.*, 2008). In einer vorausgegangenen Studie wurden bei einer Northern Blot Analyse allerdings neben dem ca. 8,0 kb langen Transkript, das die gesamte kodierende Region ausgehend vom *gmuB*-Startcodon bis zum *gmuG*-Stopcodon (7238 bp) abdeckt, zwei weitere, 2 und 1 kb große Banden detektiert (Sadaie *et al.*, 2008). Ob

diese möglicherweise durch eine RNA-Prozessierung entstehen oder ausgehend von einem zweiten Promotor transkribiert werden, wurde nicht untersucht. Des Weiteren legten bioinformatische Daten (DBTBS-Datenbank, Sierro *et al.*, 2008) und Ergebnisse einer Transkriptom-Analyse (Nicolas *et al.*, 2012) die Vermutung nahe, dass sich weitere Promotorsequenzen vor den Genen *gmuC* bzw. *gmuR* befinden könnten (Abbildung 4.23 A).

Um dieser Annahme nachzugehen, wurden 501 bp bzw. 406 bp der stromaufwärts von *gmuC* bzw. *gmuR* gelegenen Sequenzen über PCR (s11022/s11023 bzw. s11018/s11051) amplifiziert. Mit Hilfe der *Gibson Assembly*-Klonierungsmethode wurden die DNA-Fragmente im Anschluss mit dem *lacZ*-Reporter des Vektors pKAM243 fusioniert. Dieser war zuvor mit *NheI/NdeI* linearisiert worden. Mit den neu erzeugten Vektoren pSTH112 bzw. pSTH113 wurde ein *trpC⁺* Derivat von *B. subtilis* 168 (KM0) transformiert (SH91 bzw. SH92).

Der Miller Assay wurde herangezogen, um eine eventuell vorhandene Promotoraktivität zu detektieren (Abbildung 4.22). Dazu wurden die Stämme SH90 ($\Delta amyE::P_{gmuB-lacZ}$, spc^R), SH91 ($\Delta amyE::P_{gmuC-lacZ}$, spc^R) und SH92 ($\Delta amyE::P_{gmuR-lacZ}$, spc^R) in SMM ohne Citrat (supplementiert mit 0,2 % Kalium-Glutamat, SEL und 5 mM $MgSO_4$) mit 0,5 % D-Glucose angezogen. Die Zellen der Übernackkultur (ÜNK) wurden zweimal in dem wie oben beschrieben zusammengesetzten Minimalmedium ohne Glucose gewaschen (Heraeus Megafuge, 5.000 rpm, 5 min, RT). Im Anschluss wurden die Hauptkulturen mit dem entsprechenden Volumen aus der ÜNK so angeimpft, dass die Start-OD₆₀₀ einem Wert von 0,1 entsprach. Die LacZ-Aktivität wurde nach 2 h (Anlaufphase), 7 h (exponentielle Phase) und 24 h (über Nacht) Wachstum bei 37 °C in Anwesenheit von je 0,1 % D-Glucitol (als Kontrolle), Glucomannan (GM) bzw. *Locust Bean Gum* (LBG) ermittelt. Nur für das $P_{gmuB-lacZ}$ -Fusionskonstrukt (SH90) konnte – sowohl nach 7 h (227 ± 16 M. U. mit GM bzw. 214 ± 30 M. U. mit LBG) als auch nach 24 h (114 ± 19 M. U. mit GM bzw. 86 ± 7 M. U. mit LBG) – eine nennenswerte Promotoraktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerlegt die Vermutung, dass sich innerhalb des Operons weitere Promotoren befinden.

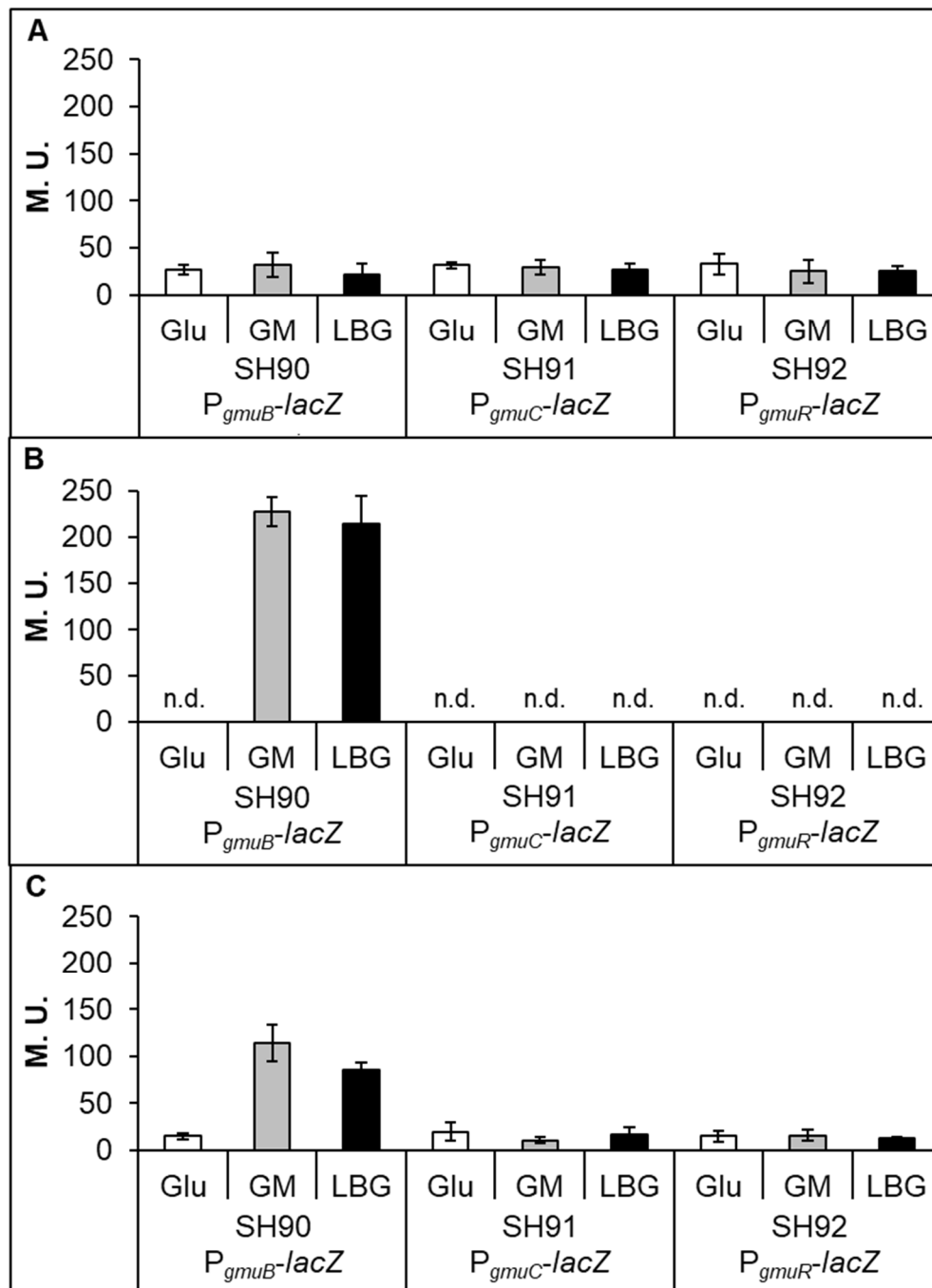


Abbildung 4.22 Ermittlung der *lacZ*-Expression ausgehend von P_{gmuB} und den vermuteten zusätzlichen internen Promotorsequenzen stromaufwärts von *gmuC* bzw. *gmuR* in Minimalmedium mittels Miller Assay. Die Promotor-*lacZ*-Fusionskonstrukte wurden in den *amyE*-Locus von *B. subtilis* KM0 integriert. Die erhaltenen Stämme SH90 ($\Delta amyE::P_{gmuB}$ -lacZ), SH91 ($\Delta amyE::P_{gmuC}$ -lacZ) bzw. SH92 ($\Delta amyE::P_{gmuR}$ -lacZ) wurden in SMM ohne Citrat (supplementiert mit 0,2 % K-Glutamat, SEL und 5 mM $MgSO_4$) in Gegenwart von 0,1 % Glucomannan (GM) bzw. des Galactomannans *Locust Bean Gum* (LBG) angezogen. Als Negativkontrolle diente 0,1 % D-Glucitol (Glu). Nach 2 h (**A**, lag-Phase), 7 h (**B**, exponentielle Phase) und 24 h (**C**, Übernachtskultur) Wachstum bei 37 °C wurde die Promotoraktivität ermittelt (n. d., nicht detektierbar). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar, der aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen gebildet wurde.

Eine weitere Methode wurde angewendet, um das hier erhaltene Ergebnis abzusichern. Das DNA-Bindeprotein, welches durch das Gen *gmuR* kodiert wird, reguliert die Transkription des *gmu*-Operons negativ (Sadaie *et al.*, 2008). Mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) wurde überprüft, ob sich stromaufwärts von *gmuB*, *gmuC* bzw. *gmuR* eine Operatorsequenz befindet, an die der Repressor GmuR bindet.

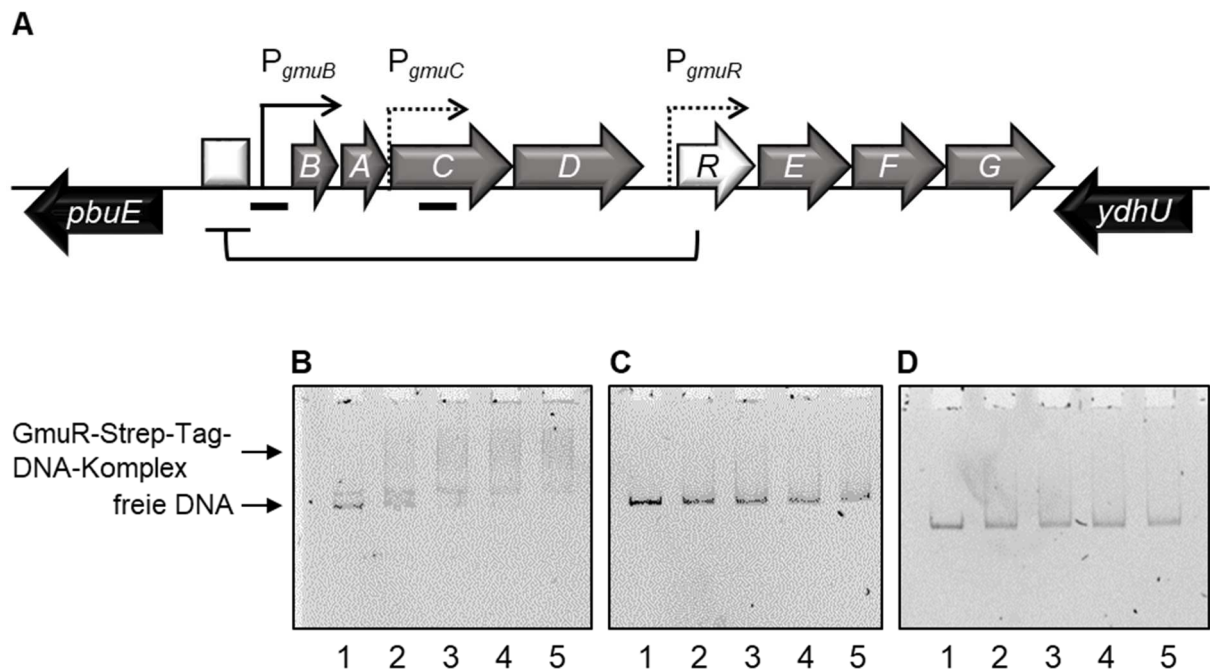


Abbildung 4.23 Untersuchung der *in vitro*-Bindung des Transkriptionsfaktors GmuR an mögliche Promotoren vor und innerhalb des Glucomannan-Operons mittels EMSA. **A)** Modell der Regulation des Glucomannan-Operons *gmuBACDREFG*. Zusätzlich zu dem Promotor von *gmuB* (P_{gmuB} , Pfeil) befinden sich möglicherweise weitere Promotoren vor *gmuC* und *gmuR* (P_{gmuC} , P_{gmuR} , gestrichelte Pfeile) (Nicolas *et al.*, 2012; Sierro *et al.*, 2008). Stromaufwärts von *gmuB* liegt eine für den Repressor GmuR postulierte Bindestelle (Leyn *et al.*, 2013). Die funktionelle *cre*-Box stromaufwärts von *gmuB* (Marciniak *et al.*, 2012) sowie die funktionelle *cre*-Box innerhalb des *gmuC*-Gens (Miwa *et al.*, 2000) sind durch dicke Linien markiert. **B-D)** In der Bindungsreaktion befanden sich jeweils 200 fmol des markierten DNA-Fragments (**B**, P_{gmuB} , 582 bp; **C**, P_{gmuC} , 585 bp; **D**, P_{gmuR} , 486 bp). Spur 1 zeigt das Laufverhalten der ungebundenen DNA ohne Proteinzugabe. In den Spuren 2-5 wurden jeweils aufsteigende Mengen an GmuR-Strep-Tag zugefügt (2, 125 ng bzw. 4,3 pmol; 3, 250 ng bzw. 8,6 pmol; 4, 375 ng bzw. 12,9 pmol; 5, 500 ng bzw. 17,2 pmol).

In drei verschiedenen PCRs wurden kurze, einseitig markierte DNA-Fragmente, die die Promotorsequenz stromaufwärts von *gmuB* (P_{gmuB} , 582 bp, s11020/5'-FITC-

s10180) bzw. die intergenen Sequenzen stromaufwärts von *gmuC* (P_{gmuC} , 585 bp, s11022/5'-FITC-s10180) bzw. *gmuR* (P_{gmuR} , 486 bp, s11018/5'-FITC-s10180) abbilden, generiert. Als Template dienten die *amyE*-Integrationsvektoren pSTH111, pSTH112 bzw. pSTH113. Um eine mögliche Wechselwirkung mit dem Regulator nachzuweisen, wurden in die Bindungsreaktion zu je 200 fmol des jeweiligen PCR-Produkts aufsteigende Mengen an gereinigtem GmuR-Strep-Tag-Protein zugefügt. Das erhaltene Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus dem Miller Assay. Es konnte lediglich zwischen dem P_{gmuB} -DNA-Fragment und dem Regulatorprotein GmuR eine Interaktion festgestellt werden (Abbildung 4.23 B; siehe auch Abbildung 4.26). Innerhalb der intergenen Regionen stromaufwärts von *gmuC* sowie *gmuR* befinden sich demnach keine regulatorischen Sequenzen, an die GmuR binden kann (Abbildung 4.23 C+D).

4.2.4 Deletionsanalyse des Glucomannan-Promotors P_{gmuB}

Um funktionelle Elemente innerhalb der Promotorregion des Glucomannan-Operons zu ermitteln, wurde der Sequenzabschnitt stromaufwärts von *gmuB* an seinem 5'-Ende schrittweise verkürzt.

Als Ausgangspunkt diente die P_{gmuB} -*lacZ*-Reporterengenkassette, die in dem *amyE*-Integrationsvektor pSTH111 enthalten ist. In verschiedenen PCRs mit pSTH111 als Template und dem Rückwärts-Primer s11376 wurde je einer der Vorwärtsprimer s11369-s11375 bzw. s11531 eingesetzt. Die erhaltenen ca. 1,9 kb großen PCR-Fragmente wurden anschließend über *NheI*/*AfeI* mit dem 8,9 kb-Fragment des ursprünglichen *amyE*-Integrationsvektors pKAM243 ligiert. Durch Transformation des *B. subtilis* Stamms KM0 mit den neu erzeugten Plasmiden wurden die verkürzten Promotor-*lacZ*-Konstrukte via homologer Rekombination in den *amyE*-Locus eingebracht. Die verwendeten Primerpaare sowie die daraus hervorgegangenen Plasmide und Stämme sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Die neuen Reporterstämme wurden mittels Kolonie-PCR (s7406/s9589) verifiziert.

Tabelle 4.4 Erzeugung der *B. subtilis* Stämme für die Deletionsanalyse von P_{gmuB} mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens. Die hierfür verwendeten Primerpaare, sowie die daraus resultierten *amyE*-Integrationsvektoren mit denen die Ausgangsstämme KM0 bzw. SH95 ($\Delta gmuR::loxP$) transformiert wurden, sind aufgeführt.

Deletion bis	Reporterstamm	Ausgangsstamm	Vektor	Primer
-60	SH117	KM0	pSTH126	s11372/s11376
	SH126	SH95		
-58	SH119	KM0	pSTH125	s11373/s11376
	SH125	SH95		
-57	SH116	KM0	pSTH124	s11369/s11376
	SH124	SH95		
-52	SH118	KM0	pSTH123	s11370/s11376
	SH123	SH95		
-46	SH115	KM0	pSTH122	s11374/s11376
	SH122	SH95		
-44	SH114	KM0	pSTH121	s11375/s11376
	SH121	SH95		
-36	SH131	KM0	pSTH129	s11531/s11376
	SH132	SH95		

Um festzustellen, ob eine veränderte Promotoraktivität durch eine Störung der Bindung von GmuR an die postulierte Operatorsequenz verursacht wird oder allgemein durch eine veränderte Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor, wurde die Deletionsanalyse auch in einem Regulator-defizienten Hintergrund durchgeführt. Dazu wurde als Ausgangsstamm BKE05850 (*trpC2* $\Delta gmuR::loxP$ -*ermC*-*loxP*) verwendet, bei dem das Zielgen, *gmuR*, durch eine Erythromycin-Kassette ersetzt wurde. Durch eine Transformation mit dem instabilen Plasmid pJOE6732.1, welches das Gen für die *cre*-Rekombinase trägt, wurde das Erythromycin-Resistenzgen, das an seinem 5'- und 3'-Ende von *loxP*-Sequenzen flankiert wird, wieder aus dem Genom ausgeschnitten. Der Stamm KM719 hatte sowohl das Erythromycin-Resistenzgen deletiert und war auch von dem Plasmid pJOE6732.1 wieder kuriert.

Anschließend wurde das defekte *trpC2*-Allel durch das Wildtyp-Allel ersetzt, indem KM719 mit dem Plasmid pKAM041 transformiert wurde und die Transformanten durch Wachstum auf Minimalmedium (SMM) ohne Tryptophan selektiert wurden (SH95 $\Delta gmuR::loxP$). Zuletzt wurden die verkürzten P_{gmuB} -*lacZ*-Konstrukte durch die

Verwendung der weiter oben beschriebenen *amyE*-Integrationsvektoren ebenfalls in das Genom von SH95 eingebracht (Tabelle 4.4).

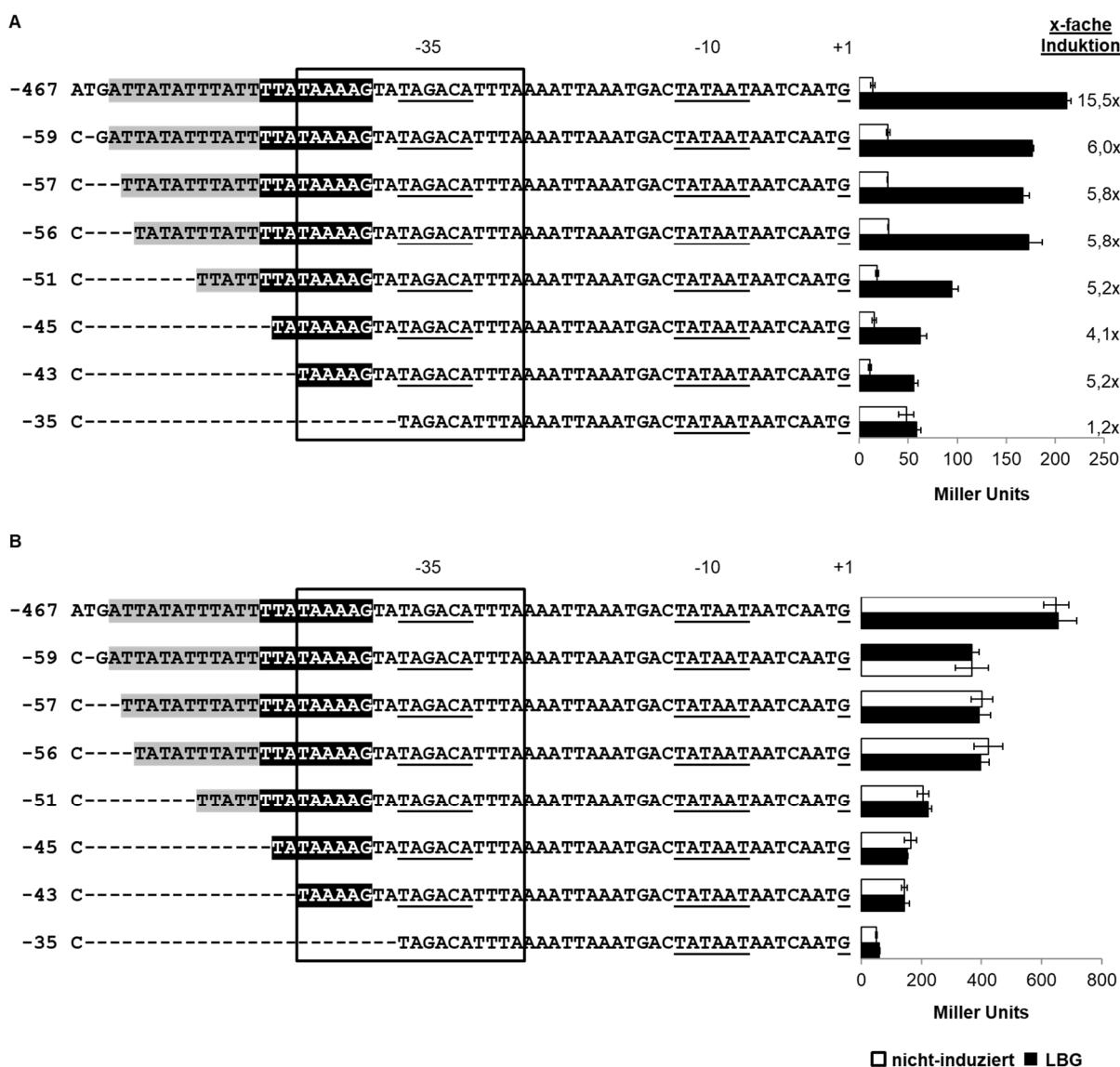


Abbildung 4.24 Analyse von Deletionskonstrukten des *gmuB*-Promotors mittels Miller-Assay.

Die Position des letzten, am 5'-Ende noch vorhandenen Nukleotids (in Bezug auf den Transkriptionsstart) ist links neben der Sequenz angegeben. Die -35 und -10 Region sowie der Transkriptionsstartpunkt sind unterstrichen. Die Position der postulierten GmuR-Bindestelle (Leyn *et al.*, 2013) ist durch einen Kasten gekennzeichnet. Innerhalb des *gmuB*-Promotors wurde ein mögliches UP-Element ermittelt (Murayama *et al.*, 2015), dessen vermutete Lage in eine Promotor-distale (grau unterlegt) und eine Promotor-proximale Region (schwarz unterlegt) unterteilt wird. Die verkürzten Promotor-*lacZ*-Konstrukte wurden in den *amyE*-Locus des Chromosoms von KM0 (**A**) bzw. des Regulator-defizienten Stamms SH95 ($\Delta gmuR::loxP$) (**B**) integriert. Die LacZ-Aktivität wurde nach 2 h Wachstum in LB-Medium ohne (nicht-induziert) und mit 0,2 % *Locust Bean Gum* (LBG) ermittelt.

Die Auswirkungen der Deletionen auf die Promotoraktivität wurden nach 2 h Wachstum in LB-Medium ohne und mit Zugabe von 0,2 % des Induktors *Locust Bean Gum* (kurz LBG) mittels Miller Assay untersucht (Abbildung 4.24). Als Referenz dienten SH90 bzw. SH98, die durch Transformation von KM0 bzw. SH95 mit dem Ausgangsvektor pSTH111 generiert wurden und das ungekürzte P_{gmuB} -*lacZ*-Fusionskonstrukt (bis Position -467 relativ zur Transkriptionsstartstelle) chromosomal integriert haben.

Durch das Ausknocken von *gmuR* im Stamm SH98 wurde hierbei zunächst die bereits in der Literatur beschriebene negative Regulation des *gmu*-Operons durch das DNA-Bindeprotein GmuR (Sadaie *et al.*, 2008) bestätigt. Der Verlust des Transkriptionsfaktors führte zu einer konstitutiven Promotoraktivität (vergleiche Abbildung 4.24 A und B).

Im Wildtyp-Hintergrund führte eine Verkürzung des Promotors bis zur Position -59 bereits zu einer ca. 2-fach erhöhten Basalaktivität, die auf eine verringerte Repression von P_{gmuB} schließen lässt (Abbildung 4.24 A). Dementsprechend nahm auch die Regulierbarkeit ab. Die Zugabe von LBG erhöhte die *LacZ*-Aktivität nur noch um das ca. 6-Fache, während ursprünglich mit der noch ungekürzten Promotorsequenz eine ca. 15,5-fache Induktion erreicht wurde. Allerdings war auch die LBG-induzierte Promotoraktivität beeinträchtigt (Abnahme von 212 ± 5 M. U. auf 176 ± 2 M. U). Nach der Deletion weiterer 8 bp wurde nach Zugabe von LBG nur noch eine *LacZ*-Aktivität von 94 ± 7 M. U erreicht, die durch eine Verkürzung bis zur Position -45 weiter auf 62 ± 7 M. U sank. Erst eine Deletion, die bis zur Position -36 reichte und die vermutete GmuR-Bindestelle etwa um die Hälfte verkürzte, verursachte eine konstitutive Aktivität von P_{gmuB} .

Es konnte gezeigt werden, dass die mit der sukzessiven Verkürzung einhergehende Abnahme der Promotoraktivität unabhängig von der Bindung des Repressors GmuR auftritt (Abbildung 4.24 B). Eine Verkürzung bis zur Position -59 verursachte auch hier bereits einer Verringerung der Promotoraktivität (Abnahme von ursprünglich 649 ± 41 M. U. auf 368 ± 25 M. U). Im Genom folgt stromaufwärts eine (7 bp lange) A-reiche Sequenzabfolge, die von Position -69 bis -63 reicht. Nach einer weiteren Deletion bis zur Position -52 nahm die Promotoraktivität weiter ab (206 ± 19 M. U). Bei dieser Deletion wurde die distale Region des mutmaßlichen UP-Elements von P_{gmuB} (Murayama *et al.*, 2015) um 5 bp verkürzt. Eine weitere nennenswerte

Beeinträchtigung der P_{gmuB} -Stärke (50 ± 3 M. U) trat nach der Deletion der nächsten 16 bp ein (Deletion bis zur Position -36). Während die -35 noch vollständig erhalten blieb, wurde das vermutlich angrenzende UP-Element (Murayama *et al.*, 2015) vollständig entfernt.

4.2.5 Struktur des *gmuB*-Promotors

In einer vorherigen Studie wurde der Transkriptionsstart von *gmuB* bereits durch die *Primer Extension*-Methode ermittelt (Sadaie *et al.*, 2008). Daher konnte durch Sequenzbetrachtung die mutmaßliche Lage der Kernelemente des σ^A -Promotors ausgemacht werden. Die Sequenz TAGACA-N₁₆-TATAAT-N₇-G weicht am geringsten von der Konsensussequenz eines typischen σ^A -abhängigen Promotors ab. Die Sequenz TATAGA-N₁₈-TATAAT-N₇-G wurde aber ebenfalls in Betracht gezogen. Um die -35 Region von P_{gmuB} zu bestimmen, wurden Mutationen in den Bereich des Minimalpromotors eingeführt, die jeweils eine der zwei denkbaren Varianten optimieren sollten.

Tabelle 4.5 Herstellung der *lacZ*-Reporterstämme mit mutiertem *gmuB*-Promotor. Aufgelistet sind die Primerpaare, die verwendet wurden, um die angegebenen Vektoren und Reporterstämme zu erzeugen. Als Ausgangsstamm diente der Regulator-defiziente Stamm SH95 ($\Delta gmuR::loxP$), der mit den *amyE*-Integrationsvektoren transformiert wurde.

Reporter-Stamm	<i>amyE</i> -Integrationsvektor	Subklonierungsvektor	Primer
SH139	pSTH143	pSTH136	s11529/s11530
SH141	pSTH147	pSTH132	s11537/s11538
SH142	pSTH148	pSTH133	s11539/s11540
SH143	pSTH152	pSTH139	s11527/s11528

Als Ausgangsvektor für die Generierung von Mutationen in P_{gmuB} wurde zunächst der Vektor pSTH130 erzeugt. Die Promotorsequenz stromaufwärts des Glucomannan-Operons wurde in einer PCR (s11020/s11549) amplifiziert, bei der genomische DNA aus *B. subtilis* 168 als Template verwendet wurde. Über die eingebrachten *NheI/NdeI*-Schnittstellen wurde das 497 bp große PCR-Fragment anschließend mit dem 2,5 kb-Fragment des Klonierungsvektors pJOE4786.1 ligiert. Im Anschluss

wurde die PCR-basierte Mutagenese nach NEB durchgeführt (nähere Erläuterungen siehe Kapitel 4.1.5.1), bei welcher der erhaltene Vektor (pSTH130) als Template diente. Die verwendeten Primerpaare sowie die daraus hervorgegangenen Vektoren sind in Tabelle 4.5 verzeichnet. Die mutierten ca. 500 bp großen DNA-Fragmente wurden anschließend über *NheI/NdeI* in den *amyE*-Integrationsvektor pKAM243 subkloniert und dabei mit *lacZ* fusioniert. Mit dem Ausgangsvektor pSTH130 wurde analog verfahren (pSTH146). Mit den neu erzeugten Vektoren wurde der Repressordefiziente Stamm SH95 ($\Delta gmur::loxP$) transformiert. Die daraus hervorgegangenen Reporterstämme mit dem Phänotyp $AmyE^-$ Erm^S Spc^R wurden durch Kolonie-PCR (s7406/s9589) überprüft.

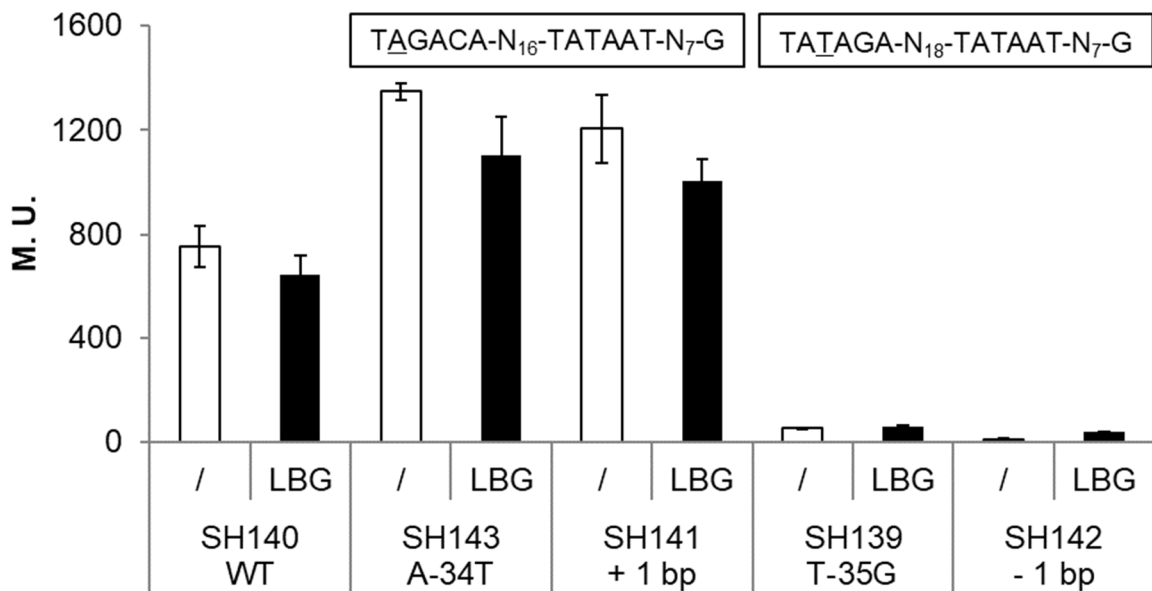


Abbildung 4.25 Optimierung des Promotors von *gmuB*. Neben der optimalen -10 Region TATAAT besitzt der Promotor eine -35 Region mit entweder der Sequenz TAGACA oder TATAGA. Die möglichen Promotorerkennungssequenzen (Kasten) wurden durch Basenaustausche (entsprechende Positionen sind unterstrichen) oder die Insertion (+ 1bp) bzw. Deletion (-1 bp) eines einzelnen Nukleotids innerhalb des Sequenzabschnitts zwischen der -35 und der -10 Region an die Konsensussequenz angenähert. Die Bestimmung der LacZ-Aktivität der mutierten P_{gmuB} -*lacZ*-Reporterkonstrukte, welche in den chromosomalen *amyE*-Locus integriert wurden, erfolgte in dem *GmuR*-defizienten Hintergrund des Ausgangsstamm SH95 ($\Delta gmur::loxP$). Der Miller Assay wurde nach 2 h Wachstum in LB-Medium ohne (/) und mit 0,2 % *Locust Bean Gum* (LBG) durchgeführt. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Mittelwerte ($n=3$).

Die Auswirkungen der Mutationen auf die *gmuB*-Promotoraktivität wurden im Anschluss mittels Miller Assay untersucht. Als Referenz diente der Stamm SH140, der durch die Transformation von SH95 mit pSTH146 generiert wurde und die unveränderte Sequenz von P_{gmuB} enthält. Die LacZ-Aktivität wurde 2 h nach dem Wachstum in LB-Medium mit und ohne 0,2 % LBG gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Substitution des Nukleotids A durch ein T an Position -34 bezüglich des Transkriptionsstarts (SH143, TtGACA-N₁₆-TATAAT-N₇-G) zu einer gegenüber dem Wildtyp (SH140) ca. 1,8-fach erhöhten Promotoraktivität führte (Abbildung 4.25). Die Verlängerung der *Spacer*-Sequenz durch die Insertion einer Base zwischen die -35 und die -10 Region bewirkte eine ca. 1,6-fach höhere LacZ-Aktivität (SH141).

Sowohl die Deletion einer Base innerhalb des *Spacer*-Bereichs (SH142) als auch eine T→G-Substitution an Nukleotid -35 (SH139, TAgAGA-N₁₈-TATAAT-N₇-G) machten den Promotor hingegen funktionsunfähig. Diese Ergebnisse belegten die Annahme, dass das σ^A -Holoenzym der RNA-Polymerase an die Sequenz TAGACA-N₁₆-TATAAT-N₇ des *gmuB*-Promotors bindet.

4.2.6 Nachweis der Interaktion von GmuR mit der P_{gmuB} -Promotorregion mittels EMSA

Die Bindung des Regulatorproteins GmuR an seine Operatorsequenz in der Promotorregion stromaufwärts von *gmuB* wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) genauer untersucht. Dazu wurde die Promotorsequenz des Glucomannan-Operons zunächst in einer PCR mit den Primern 5'-FITC-s11115/5'-FITC-s10669 und dem Plasmid pSTH111 als Template, welches die P_{gmuB} -*lacZ*-Kassette trägt, amplifiziert. Der Ansatz der Bindungsreaktion enthielt 100 fmol dieses 297 bp langen, beidseitig markierten DNA-Fragments und aufsteigende Mengen an über Affinitätschromatographie gereinigtem GmuR-Strep-Tag-Protein. Nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel konnte nach Proteinzugabe eine in der Wanderung reduzierte DNA-Bande beobachtet werden, die auf die Ausbildung eines GmuR-DNA-Komplexes hinwies (Abbildung 4.26, Spur 2-3). Bei höheren Mengen an Regulatorprotein kam es zu einer weiteren, noch langsamer wandernden Bande, die auf die Bindung eines weiteren GmuR-Proteins hinwies. Dieser größere GmuR-DNA-Komplex ersetzte den ersten, kleineren Komplex zunehmend (Spur 4-10). Trotz

eines ca. 400-fachen Überschusses an GmuR wurden nicht alle DNA-Fragmente gebunden. Das Auftreten von zwei in der Wanderung verschieden beeinträchtigten DNA-Banden könnte durch zwei GmuR-Bindestellen innerhalb des Operators begründet sein, an die jeweils ein Monomer bindet. Denkbar ist auch, dass GmuR sowohl als Monomer als auch (bei höheren Konzentrationen) als Dimer an den Operator bindet. Da die Banden in Abbildung 4.26 nach oben zur Auftragstasche hin schmieren, ist es wahrscheinlich, dass bei hohem Überschuss an GmuR weitere Moleküle unspezifisch an die DNA binden. Da diese Bindung wahrscheinlich auch instabil ist, kommt es dann zur Dissoziation während der Elektrophorese.

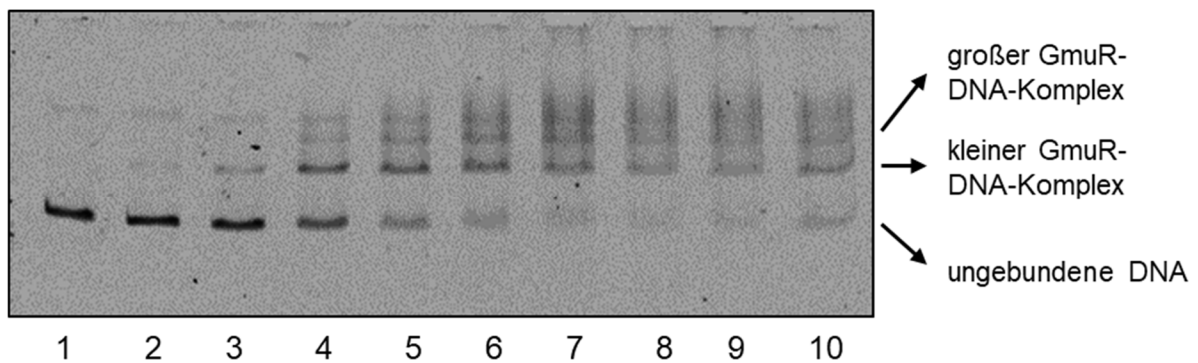


Abbildung 4.26 EMSA zur Untersuchung des DNA-Bindeverhaltens des Repressors GmuR.

GmuR-Strep-Tag wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Kontrolle in Spur 1 zeigt das Laufverhalten der freien P_{gmuB} -DNA in Abwesenheit des Regulatorproteins. Eingesetzt wurden je 100 fmol des P_{gmuB} -DNA-Fragments (5'-FITC-s11115/5'-FITC-s10669) zusammen mit zunehmenden Proteinmengen (**2**, 25 ng bzw. 0,9 pmol; **3**, 50 ng bzw. 1,8 pmol; **4**, 100 ng bzw. 3,6 pmol; **5**, 250 ng bzw. 8,9 pmol; **6**, 375 ng bzw. 13,4 pmol; **7**, 500 ng bzw. 17,9 pmol; **8**, 650 ng bzw. 23,2 pmol; **9**, 875 ng bzw. 31,3 pmol; **10**, 1180 ng bzw. 42,1 pmol GmuR-Strep-Tag).

Um zu überprüfen, ob GmuR nach Aufreinigung als Monomer, Dimer oder Oligomer vorliegt, wurde versucht, sein Molekulargewicht unter nativen Bedingung zu bestimmen. Allerdings blieb sowohl eine chromatographische Auftrennung (Gel-Permeations-Chromatographie) von ca. 20 μ g bzw. 130 μ g Protein – mit 100 mM TRIS/HCl (pH 7,5) und 150 mM NaCl bzw. mit 300 mM KPP (pH 7,6) als Laufmittel – als auch eine Auftrennung über ein natives Gradientengel (5-20 %) mit 1x TAE (pH 8,0) als Laufpuffer erfolglos (Daten nicht gezeigt).

4.2.7 Identifizierung der Operatorsequenz von GmuR

4.2.7.1 DNase I-Footprinting-Assay

Die *in vitro*-Bindung von GmuR an den Glucomannan-Promotor (P_{gmuB}) wurde bereits durch ein verzögertes Laufverhalten des FITC-markierten P_{gmuB} -DNA-Fragments im *Mobility Shift Assay* nachgewiesen. Um die Operatorsequenz des Regulators innerhalb von P_{gmuB} zu lokalisieren, wurde ein DNase I-*Footprinting*-Experiment durchgeführt.

Dieses *in vitro*-Analyseverfahren beruht darauf, dass DNA-Sequenzen, die durch Proteine besetzt werden, vor einem Verdau durch die Endonuklease DNase I geschützt sind. Der DNA-Abschnitt von Interesse wird in einer PCR amplifiziert, bei welcher der zu untersuchende DNA-Strang durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers markiert wird. Die Auswertung erfolgt über eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze. Ein Vergleich der Peak-Muster der mit DNase I behandelten DNA-Fragmente, die in An- und Abwesenheit des DNA-Bindeproteins erhalten wurden, ermöglicht es, die geschützten DNA-Bereiche zu identifizieren. Im Peak-Muster entsteht eine Lücke, die als Fußabdruck (engl. *footprint*) bezeichnet wird. Anhand des Profils einer mitgeführten Sequenzierungsreaktion, die mit dem gleichen fluoreszenzmarkierten Primer durchgeführt wurde, kann der ermittelte Bereich innerhalb der DNA-Sequenz lokalisiert werden.

Die *gmuB*-Promotorregion wurde in einer PCR mit dem Vorwärts-Primer s11116 und dem Cy5-markierten Rückwärts-Primer s10620 amplifiziert. Als Template wurde der Vektor pSTH111 verwendet, welcher das P_{gmuB} -*lacZ*-Fusionskonstrukt trägt. Das 297 bp große DNA-Fragment wurde – in An- und Abwesenheit eines ca. 55-fachen Überschusses an gereinigtem GmuR-Strep-Tag-Protein – einem DNase I-Verdau (1 U) ausgesetzt.

Die Überlagerung der Elektropherogramme von mit DNase I behandelter freier DNA und DNA, die durch GmuR gebunden wurde, offenbarte, dass der Repressor zwei Bereiche innerhalb des Promotors schützte, wodurch die beiden Kernpromotorelemente besetzt wurden (Abbildung 4.27).

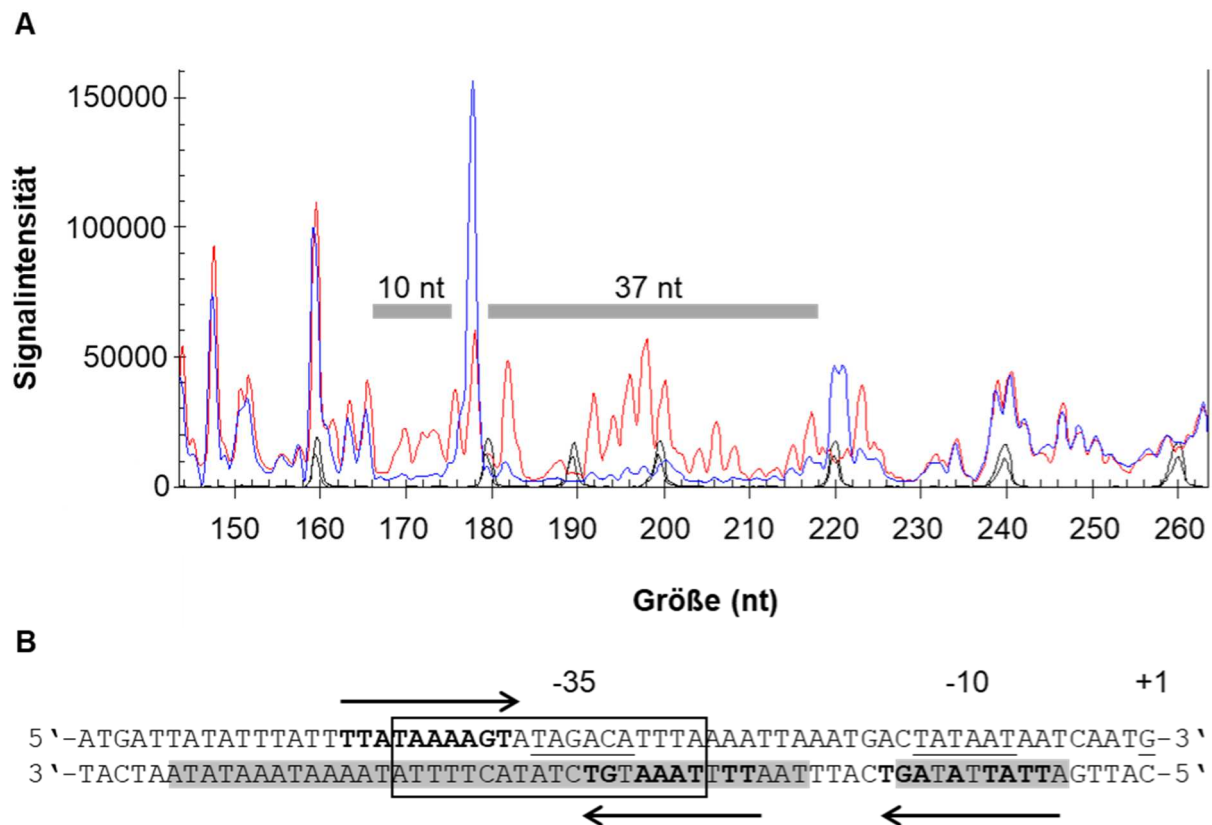


Abbildung 4.27 DNase I-Fußabdruck von GmuR im Promotorbereich von *gmuB* (nicht-codierender Strang). In Anwesenheit des Repressors GmuR wurden zwei DNA-Bereiche geschützt (graue Kästen). **A)** Dargestellt sind die überlagerten Elektropherogramme von mit DNase I behandelter freier DNA (rote Linie) und DNA, die durch GmuR gebunden wurde (blaue Linie) sowie der DNA-Größenstandard (schwarze Linie). Im Ansatz der Bindungsreaktion befanden sich 4,5 pmol des 297 bp langen PCR-Fragments (s11116/5'-Cy5-s10620, Template pSTH111 *amyE*'-ter-*P_{gmuB}*-*lacZ*-*spc*'-*amyE*), das den *gmuB*-Promotor abbildet, und ca. 250 pmol gereinigtes GmuR-Strep-Tag-Protein. Die Ansätze wurde anschließend mit 1 U DNase I verdaut (1 min, RT). Die zugehörige Sequenzierung kann dem Anhang entnommen werden (s. Kapitel 7.3). **B)** Nukleotidsequenz des *gmuB*-Promotors (unterstrichen, Kernpromotorelemente und Transkriptionsstartpunkt). Die zuvor - basierend auf Sequenzanalysen - postulierte unvollständig palindromische Operatorsequenz (Leyn *et al.*, 2013) ist von einem schwarzen Kasten umrahmt. Anhand des durch GmuR geschützten Bereichs konnte ein weiteres mögliches Sequenzmotiv identifiziert werden (durch Pfeile gekennzeichnet, übereinstimmende Basen sind fett markiert). Auf eine invertierte Sequenzwiederholung folgt eine zweite Wiederholung der invertierten Sequenz.

Der erste Bereich, der durch GmuR bedeckt wurde (37 nt), erstreckte sich ungefähr von Position -56 bis -20 (in Bezug auf den Transkriptionsstart) und überlappte mit der -35 Region des Promotors. Darauf folgte ein weiterer, kleinerer geschützter Abschnitt (10 nt) der ungefähr von den Nukleotiden an den Positionen -14 bis -5

reichte und die *Pribnow-Box* überlagerte. Dieses Ergebnis deckt sich zum Teil mit der in den bioinformatischen Studien von Leyn *et al.* (2013) vorhergesagten GmuR-Bindestelle, die sich im Bereich der –35 Region des *gmuB*-Promotors befindet. Aus den hier erhaltenen Ergebnissen wurde die Abfolge TTATAAAAGT als mögliches Sequenzmotiv abgeleitet. Auf dieses folgen die zwei invertierten Wiederholungen N₄-TTT[–]TAAAT[–]GT und N₇-TTATT[–]AT[–]AGT mit jeweils zwei Abweichungen von diesem Motiv (unterstrichen). Weitere DNase I-*Footprinting*-Experimente mit dem codierenden DNA-Strang (Primer 5'-Cy5-s11298/s10089, 339 bp) lieferten keine verwertbaren Ergebnisse.

4.2.7.2 Komplementäre Basensubstitutionen innerhalb des P_{*gmuB*}-Promotors

Durch eine vorausgegangene Deletionsanalyse (Kapitel 4.2.4) konnte der Beginn der Operatorsequenz von P_{*gmuB*} auf die Region stromabwärts der Position -44 eingegrenzt werden. Der DNase I-*Footprinting*-Assay zeigte, dass in Anwesenheit des Regulators GmuR zwei Sequenzabschnitte innerhalb des Promotorbereichs vor einem DNase I-Verdau geschützt werden. Die beiden 37 nt und 10 nt umfassenden Bereiche decken die –35 Region bzw. die –10 Region ab.

Um das GmuR-Bindungsmotiv zu ermitteln, wurden blockweise komplementäre Basenaustausche in P_{*gmuB*} eingeführt. Da sich an die –35 Region stromaufwärts offenbar ein UP-Element anschließt (Murayama *et al.*, 2015), wurden die Basenaustausche auf den Bereich nach der –35 Region beschränkt. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach einem Protokoll durchgeführt, welches auf dem Q5[®] *Site-Directed Mutagenesis*-Verfahren der Firma NEB beruht (Kapitel 3.2.2.12). Als Template für die PCR mit den für die Mutationen bestimmten Primern diente der Vektor pSTH130, der die ursprüngliche Sequenz von P_{*gmuB*} trägt.

Die veränderten *gmuB*-Promotorsequenzen der pSTH130-Derivate wurden über *NheI/NdeI* mit dem *lacZ*-Reporter gen des linearisierten *amyE*-Integrationsvektors pKAM243 fusioniert. Mit den auf diese Weise neu erzeugten Vektoren wurde der *B. subtilis* Stamm KM0 transformiert. Bei Transformanten, die den Genotyp *amyE[–] spc^R erm^S* aufwiesen, sollte ein Doppelcrossover-Ereignis stattgefunden haben. D. h., dass das Plasmid-Rückgrat des in *B. subtilis* nicht-replikativen Plasmids wieder aus dem Genom ausgeschnitten wurde und nur noch die Integrationskassette

(*amyE'*-*ter*- P_{gmuB} -*lacZ*-*spc'*-*amyE*) zurückblieb. Dies wurde zusätzlich mittels Kolonie-PCR bestätigt (s7406/s9589). Die erhaltenen Reporterstämme sowie die zu ihrer Generierung verwendeten Vektoren und Primerpaare können der Tabelle 4.6 entnommen werden.

Tabelle 4.6 Um die Auswirkungen komplementärer Basensubstitutionen (BS) innerhalb von P_{gmuB} zu untersuchen, wurden die folgenden Primerpaare und die daraus jeweils hervorgegangenen Vektoren und Stämme verwendet.

BS	Reporter- Stamm	<i>amyE</i> - Integrationsvektor	Subklonierungs- vektor	Primer
WT	SH136	pSTH146	pSTH130	
-29 bis -26	SH138	pSTH151	pSTH138	s11515/s11516
-24 bis -23	SH144	pSTH149	pSTH134	s11517/s11518
-19 bis -18	SH145	pSTH153	pSTH140	s11519/s11520
-17 bis -14	SH134	pSTH142	pSTH131	s11521/s11522
-7 und -5	SH135	pSTH144	pSTH141	s11523/s11524
-4 bis -2	SH137	pSTH150	pSTH135	s11525/s11526

Mit dem Ausgangsvektor pSTH130 wurde analog vorgegangen. Der erhaltene Vektor wurde als pSTH146 bezeichnet und für die Transformation von KM0 eingesetzt (SH136). Die Reporterstämme wurden nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase 2 h in An- bzw. Abwesenheit von 0,2 % des Induktors *Locust Bean Gum* (kurz LBG) in LB-Medium kultiviert. Im Anschluss wurde die LacZ-Aktivität mittels Miller Assay bestimmt (Abbildung 4.28).

Der komplementäre Austausch von 4 Basen am 3'-Ende der in bioinformatischen Studien postulierte GmuR-Bindestelle (Positionen -29 bis -26 bezüglich des Transkriptionsstarts) verringerte die Regulierbarkeit des *gmuB*-Promotors. Durch die Zugabe von LBG konnte hier nur noch eine 5,1-fach höhere Promotoraktivität erzielt werden, während ursprünglich mit der unveränderten Sequenz von P_{gmuB} eine 18,3-fache Induktion erreicht wurde (Stamm SH136). Die Mutationen reduzierten auch die Repression von P_{gmuB} . Es wurde sowohl eine erhöhte Basalaktivität als auch eine höhere LBG-induzierte Promotoraktivität festgestellt.

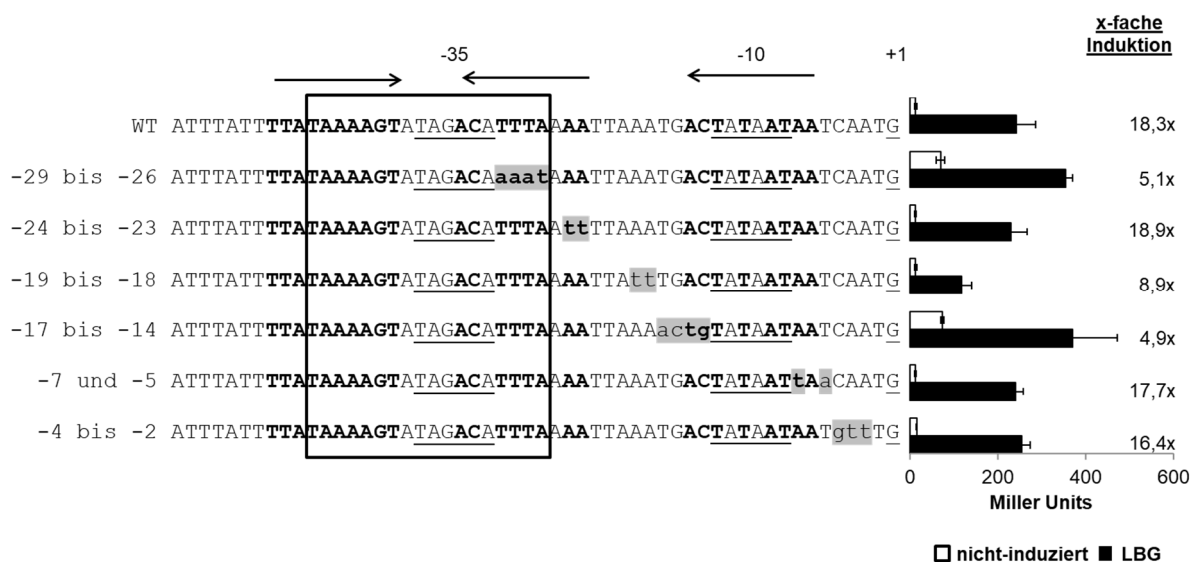


Abbildung 4.28 Analyse der Auswirkung komplementärer Basensubstitutionen (grau unterlegt, Kleinbuchstaben) auf die Repression des *gmuB*-Promotors mittels Miller Assay. Die allgemeinen Promotorelemente und der Startpunkt der Transkription sind unterstrichen. Die in einer früheren Studie durch Sequenzanalysen postulierte unvollständig palindromische Bindestelle des Repressors GmuR (Leyn *et al.*, 2013) ist durch einen Kasten hervorgehoben. Es wurde ein weiteres, denkbares Sequenzmotiv (Pfeile) ausgemacht, dessen invertierte Sequenz innerhalb des *gmuB*-Promotors zweimal wiederholt wird. Die mutierten P_{gmuB} -*lacZ*-Konstrukte wurden in den chromosomalen *amyE*-Locus des *B. subtilis* Stamms KM0 integriert. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der LacZ-Aktivität (in Miller Units) nach 2 h Wachstum in LB-Medium ohne (nicht-induziert) und mit 0,2 % *Locust Bean Gum* (LBG).

Ein ähnliches Ergebnis wurde durch die Substitution von 4 Basen unmittelbar stromaufwärts der -10 Region (Positionen -17 bis -14) erhalten. Auch diese Mutationen senkten die Repression von P_{gmuB} . Dementsprechend war die Induzierbarkeit ebenfalls eingeschränkt (4,9-fache Induktion). Weitere komplementäre Basensubstitutionen hatten keine nennenswerten Auswirkungen auf die Hemmung von P_{gmuB} .

Diese Ergebnisse bestätigen zusammen mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse in etwa die Lage der in einer vorausgegangenen Studie vorhergesagten GmuR-Bindestelle. Allerdings ist davon auszugehen, dass die invertierte Sequenz dieses Motivs im Bereich der -10 Region wiederholt wird und ebenfalls eine Rolle in der Bindung von GmuR spielt.

4.2.8 Identifizierung des Effektors des Regulatorproteins GmuR

Das Glucomannan-Operon kann durch die Zugabe von Konjak-Glucomannan, Cellobiose, Mannobiose (Sadaie *et al.*, 2008) sowie des Galactomannans *Locust Bean Gum* (LBG) zum Wachstumsmedium induziert werden. Unklar ist jedoch, welcher (vermutlich gemeinsame) Metabolit die Anwesenheit dieser Zuckerverbindungen signalisiert.

Um das Effektormolekül ausfindig zu machen, wurden sowohl *in vivo*-Studien mit Deletionsstämmen der Glucomannan-Abbaugene als auch *in vitro*-Studien (EMSA, *Thermal Shift Assay*) mit Intermediaten des Gluco- und des Galactomannan-Abbaus durchgeführt.

4.2.8.1 Identifizierung des vermutlichen GmuR-Effektormoleküls mittels Stoffwechselmutanten der Glucomannan-Verwertung

Um das Effektormolekül des Transkriptionsregulators GmuR zu ermitteln, wurden die vier Gene (*gmuG*, *gmuD*, *gmuE* und *gmuF*), von denen man annimmt, dass sie am Abbau von Glucomannan bzw. Galactomannan beteiligt sind, einzeln deletiert.

Zunächst wurde die chromosomale DNA aus BKE-Stämmen isoliert, in denen die Zielgene durch eine Erythromycin-Kassette ersetzt waren. Anschließend wurde *B. subtilis* KM0 mit dieser DNA transformiert. Die Deletion des jeweiligen Gens in den Erythromycin-resistenten Transformanten wurde mittels Kolonie-PCR verifiziert.

Ein Teil der verwendeten Deletionsstämmen wurde durch eine hiervon abweichende Vorgehensweise erhalten. Das defekte *trpC2*-Allel des BKE-Ausgangsstamms wurde hier über eine Transformation mit dem Plasmid pKAM041 (Rahmer *et al.*, 2015) durch das *trpC*-Wildtyp-Allel ersetzt.

Durch eine anschließende Transformation der Trp⁺-Stämme mit dem instabilen Plasmid pJOE6732.1 wurde das von zwei gleich orientierten *loxP*-Sequenzen flankierte Erythromycin-Resistenzgen durch die Aktivität der transient exprimierten, Plasmid-kodierten *cre*-Rekombinase wieder aus dem Genom entfernt.

Genauere Angaben über die Entstehung der einzelnen Deletionsstämmen sind dem Material und Methoden-Teil zu entnehmen (Tabelle 3.13 und Tabelle 3.14). Zuletzt wurden die aus den BKE-Stämmen hervorgegangenen Deletionsstämmen mit dem

amyE-Integrationsvektor pSTH111 transformiert, der das P_{gmuB} -*lacZ*-Fusionskonstrukt trägt.

Hieraus resultierten die Reporterstämme SH99 ($\Delta gmuG::loxP$), SH101 ($\Delta gmuD::loxP$), SH102 ($\Delta gmuE::loxP$) und SH100 ($\Delta gmuF::loxP$). Die LacZ-Aktivität dieser Stämme wurde in An- und Abwesenheit von je 0,2 % Galactomannan (LBG) bzw. Glucomannan bestimmt (Abbildung 4.29). Die Messung erfolgte 2 h bzw. 3 h nach Zugabe des Induktors zum LB-Wachstumsmedium. Als Vergleich diente der isogene Wildtypstamm SH90.

Das *gmuG*-Gen kodiert für eine extrazelluläre β -1,4-Mannanase, die Gluco- und Galactomannane endolytisch in kürzere Manno-Oligosaccharide spaltet (Tailford *et al.*, 2009). Nach der Deletion von *gmuG* (SH99) konnte der *gmuB*-Promotor nicht mehr durch die Zugabe von LBG zum Kulturmedium induziert werden. In Abwesenheit der annotierten Phospho- β -Mannosidase GmuD (SH101) konnte, verglichen mit dem Wildtyp, nach Induktion mit LBG eine ca. 4-fach höhere LacZ-Aktivität gemessen werden. Die leicht erhöhte Basalexpression ist höchstwahrscheinlich auf die geringfügige Menge an Glucomannan im Hefeextrakt (Kessler & Nickerson, 1959) zurückzuführen, welches zur Herstellung des LB-Mediums verwendet wurde. Die Deletion des *gmuE*-Gens, das für eine mutmaßliche Mannose-Kinase kodiert, beeinflusste die Promotoraktivität nicht (SH102). Ein Fehlen der Mannose-6-Phosphat-Isomerase GmuF (Yeom *et al.*, 2009) hingegen verursachte eine leicht verringerte LBG-induzierte Promotoraktivität (SH100). Hiermit übereinstimmende Ergebnisse wurden auch 3 h nach Induktion mit Glucomannan erhalten.

Die deutlich erhöhte induzierte Promotoraktivität des *gmuD*-Deletionsstamms ist höchstwahrscheinlich auf eine Akkumulation des Effektormoleküls zurückzuführen. Demzufolge wird dieses im Wildtyp durch die Phospho- β -Mannosidase abgebaut. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass es sich bei dem Effektormolekül um ein Hydrolyseprodukt der extrazellulären Mannanase GmuG handelt, welches anschließend durch das Glucomannan-PTS-System importiert wird.

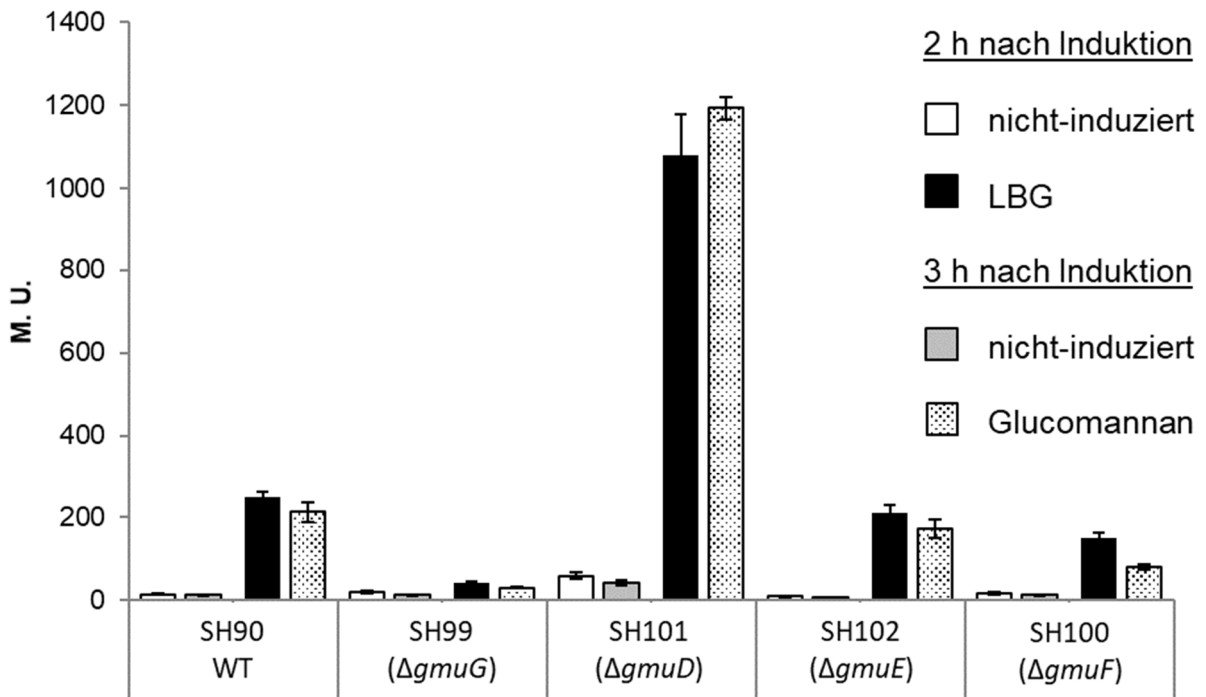


Abbildung 4.29 Analyse der Auswirkungen der Deletion der einzelnen Glucomannan-Abbaugene auf die *gmuB*-Promotoraktivität mittels Miller Assay. Die Gene, deren Produkte (vermutlich) am extrazellulären (GmuG) und am weiteren intrazellulären Abbau (GmuDEF) von Gluco- bzw. Galactomannanen beteiligt sind, wurden einzeln deletiert. Nach der Integration der *P_{gmuB}-lacZ*-Reporter-kassette in das Chromosom der Deletionsstämme (*amyE*-Locus) wurde die *P_{gmuB}*-Aktivität mittels Miller Assay ermittelt. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von je 0,2 % des Galactomannans LBG bzw. Konjak-Glucomannan zum LB-Wachstumsmedium. Aufgetragen sind die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

4.2.8.2 EMSA mit potenziellen Effektormolekülen von GmuR

Die Wechselwirkung des Transkriptionsregulators GmuR mit seiner Operatorsequenz im Glucomannan-Promotor (*P_{gmuB}*) wurde bereits mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) nachgewiesen (Kapitel 4.2.6). Hierbei handelt es sich um einen *in vitro*-Assay für den Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Da es sich bei GmuR um einen Repressor handelt, sollte die Zugabe des Effektors zu einem Abfallen des Regulators von der DNA führen.

Aufgrund vorheriger Ergebnisse mit Stoffwechselmutanten des Glucomannan-Abbaus wurde angenommen, dass es sich bei dem Effektor von GmuR um ein Abbauprodukt der extrazellulären β -1,4-Mannanase GmuG handelt. Um dieser

Hypothese nachzugehen, wurden LBG-Oligosaccharide verwendet, die bereits zur Verfügung standen. Diese wurden durch eine enzymatische Spaltung von LBG mit gereinigtem GmuG-His₆ erhalten. Anschließend wurden die Produkte durch Größenausschlusschromatographie (Bio-Gel P-2 Säule, Bio-Rad Laboratories) aufgetrennt. Die isolierten Oligosaccharid-Fractionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie detektiert und durch HPLC überprüft. Fraktionen von Penta-, Tetra-, Tri- und Di-Sacchariden wurden vereinigt und ihr Molekulargewicht mittels *Quadrupol-Time-of-Flight*-(QToF)-Massenspektrometrie bestätigt (H. Watzlawick, unveröffentlichte Daten).

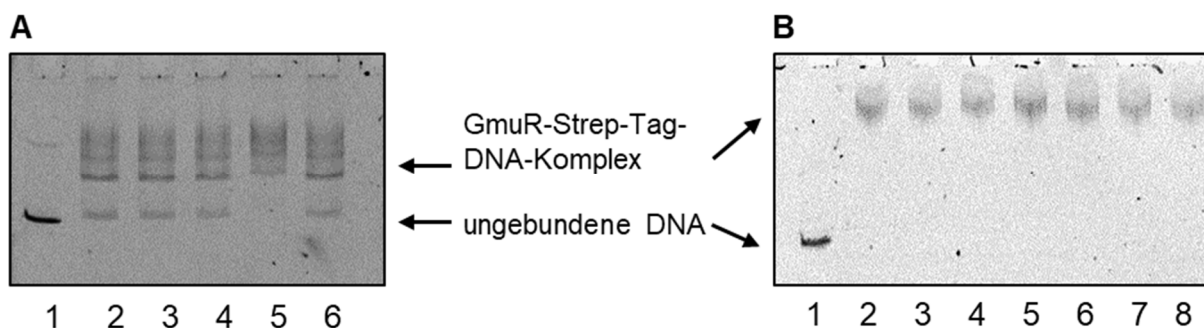


Abbildung 4.30 Untersuchung des Einflusses möglicher Effektoren auf den Komplex aus GmuR-Repressor und DNA (P_{gmuB}) mittels EMSA. In den Reaktionsansätzen befanden sich je 100 fmol des 297 bp großen DNA-Fragments (5'-FITC-s11115/5'-FITC-s10669, Template pSTH111), das den Promotorbereich von *gmuB* abbildet. In Spur 1 wurde jeweils nur das freie DNA-Fragment ohne Proteinzugabe aufgetragen. In allen anderen Spuren befanden sich zusätzlich je ca. 40 pmol (**A**) bzw. ca. 10 pmol (**B**) des gereinigten Proteins (GmuR-Strep-Tag) in der Bindungsreaktion. **A**) Das Laufverhalten des Cy5-markierten DNA-Fragments wurde in Anwesenheit von je 5 mM der folgenden Zucker getestet: **3**, Mannobiose; **4**, D-Mannose; **5**, Mannose-6-Phosphat; **6**, Cellobiose. **B**) Außerdem wurden LBG-Oligosaccharide (je 5 mM) überprüft, die aus einem Verdau von LBG mit der *B. subtilis* β -1,4-Mannanase GmuG stammten: **3**, Penta-; **4**, Tetra-; **5**, Tri-; **6**, Disaccharid; **7**, D-Galactose; **8**, D-Mannose. (Anm. zu B: Das verwendete GmuR-Protein wurde in 300 mM KPP pH 7,6 gelöst. Daher ist das veränderte Bandenmuster wahrscheinlich auf die veränderten Versuchsbedingungen zurückzuführen, die offenbar die Bildung des größeren Komplexes während der Bindungsreaktion fördern.)

Die Zugabe je eines der gereinigten LBG-Oligosaccharide mit unterschiedlicher Kettenlänge (Di- bis Pentasaccharid) zur Bindungsreaktion bewirkte nicht, dass die

freie DNA-Bande ohne gebundenes GmuR-Protein wieder sichtbar wurde (Abbildung 4.30 B).

Auch die Zugabe je eines weiteren (vermuteten) Abbauprodukts von Gluco- (Mannobiose, Cellobiose, Mannose-6-Phosphat bzw. D-Mannose) bzw. Galactomannan (Mannobiose, Mannose-6-Phosphat sowie die Monomere D-Galactose bzw. D-Mannose) führte nicht zu einer Destabilisierung des P_{gmuB} -GmuR-Komplexes (Abbildung 4.30 A+B).

4.2.8.3 Thermostabilität des Repressors GmuR in An- und Abwesenheit möglicher Effektoren

Eine weitere biochemische Methode, mit der die Bindung eines Effektormoleküls an ein Regulatorprotein nachgewiesen werden kann, ist der *Thermal Shift Assay*. Bei diesem Experiment wird die temperaturabhängige Entfaltung eines Proteins mit Hilfe der unspezifischen Interaktion des fluoreszierenden Proteinfarbstoffs SYPRO Orange mit exponierten, hydrophoben Seitenketten aus dem Molekülinneren dargestellt.

Die Schmelzkurve des Komplexes aus SYPRO Orange und gereinigtem GmuR-Strep-Tag-Protein wurde in Gegenwart verschieden langer LBG-Oligosaccharide (Di- bis Pentasaccharid), D-Mannose bzw. D-Galactose aufgezeichnet (Abbildung 4.31). Als Kontrollen dienten die Schmelzkurven des Fluoreszenzfarbstoffs ohne und nach Proteinzugabe. Die Anwesenheit der vermuteten Effektoren führte jedoch nicht zu einer nennenswerten Erhöhung der Schmelztemperatur von GmuR.

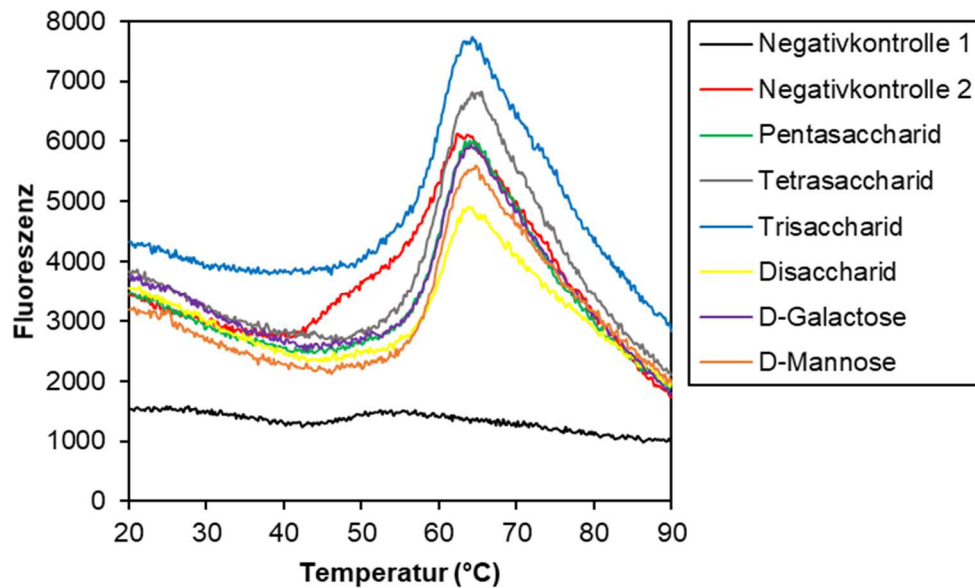


Abbildung 4.31 Thermische Denaturierungskurve von GmuR-Strep-Tag (8 µg) in der Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffs SYPRO Orange mit und ohne potenziellen Effektoren (je 1 mM). Als Negativkontrollen dienten SYPRO Orange ohne Protein (Kontrolle 1) und SYPRO Orange mit Protein aber ohne Effektor (Kontrolle 2). Die Schmelzkurve wurde in Intervallen von 0,2 °C aufgezeichnet. Die eingesetzten Penta- bis Disaccharide wurden durch einen Verdau von LBG mit der *B. subtilis* β -1,4-Mannanase GmuG erhalten.

4.2.9 Aufklärung des Abbauweges von Gluco- und Galactomannan

4.2.9.1 Entstehung von freier Mannose

Es wurde angenommen, dass - durch die Aktivität der mutmaßlichen Phospho- β -Mannosidase GmuD - während des Abbaus von Gluco- bzw. Galactomannan die in der Hauptkette enthaltene Mannose als Monomer freigesetzt wird.

Die Aufnahme und die gleichzeitige Phosphorylierung von freier Mannose wird in *B. subtilis* durch das Mannose-PTS-System katalysiert (Reizer *et al.*, 1999). Der Eintritt in die Glykolyse erfolgt über die sich anschließende Umsetzung von Mannose-6-Phosphat (M6P) zu Fructose-6-Phosphat (F6P) durch die Isomerase ManA.

Während des Abbauweges von Gluco- bzw. Galactomannan hingegen werden die (bereits intrazellulär vorliegenden) Mannose-Einheiten wahrscheinlich durch die annotierte Kinase GmuE phosphoryliert. Analog wird M6P anschließend vermutlich durch die Aktivität des zu ManA homologen Enzyms GmuF zu F6P isomerisiert.

Um nachzuweisen, dass während des intrazellulären Abbaus der Heteromannane Mannose-Monomere entstehen, wurde das *gmuE*-Gen deletiert. Dies sollte theoretisch dazu führen, dass die freie Mannose aus der Zelle transportiert werden muss, um während der erneuten Aufnahme über das Mannose-PTS-System (*manP*) zu M6P phosphoryliert zu werden. Durch diese genetische Manipulation sollte freie intrazelluläre Mannose, falls vorhanden, durch die nun notwendige Induktion des Mannose-Operons *manPA-yjdF* detektiert werden können.

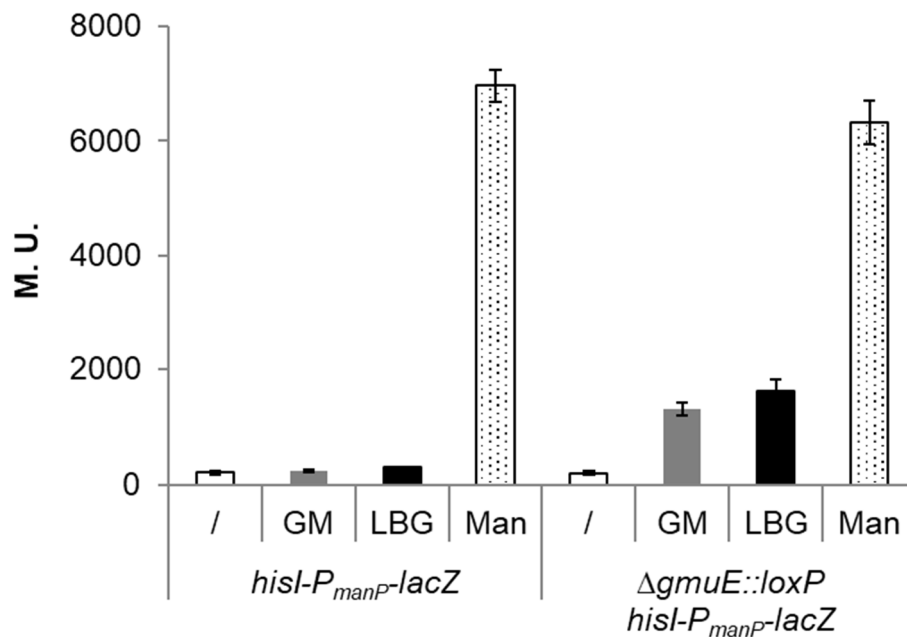


Abbildung 4.32 Induktion des Mannose-Operons *manPA-yjdF* durch D-Mannose (Man), Gluco- (GM) bzw. Galactomannan (*Locust Bean Gum*, LBG) in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit der postulierten Mannose-Kinase *GmuE*. In den *B. subtilis* Stämmen SH107 (*hisl-P_{manP}-lacZ*) und SH112 ($\Delta gmuE::loxP$ *hisl-P_{manP}-lacZ*) wurde das *lacZ*-Reporterogen, das unter der Kontrolle des Mannose-Promotors *P_{manP}* stand, stromabwärts des *hisI*-Gens in das Genom von KM0 bzw. SH97 ($\Delta gmuE::loxP$) eingebracht. Das *gmuE*-Gen kodiert eine vermutete Mannose-Kinase, die zu der für den Eintritt in die Glykolyse notwendigen Phosphorylierung von Mannose(-Einheiten) führt. Es wurde angenommen, dass ein Fehlen der *GmuE*-Aktivität durch einen Umweg über den Mannose-Abbauweg ausgeglichen werden kann. Die Stämme wurden in LB-Medium kultiviert. Die Promotoraktivität (in Miller Units, M. U.) wurde nach 2 h Induktion mit je 0,2 % GM, LBG bzw. D-Mannose (Man) durch den Miller Assay bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht-induzierte Zellen (/). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Der *B. subtilis* Stamm KM0 wurde mit genomischer DNA transformiert, die aus dem Stamm BKE05860 (*trpC2 ΔgmuE::loxP-ermC-loxP*) isoliert wurde. Anschließend wurde der neue Stamm SH94 mit dem Plasmid pJOE6732.1 transformiert, um das Erythromycin-Resistenzgen, das durch *loxP*-Sequenzen flankiert wird, mittels der Plasmid-kodierten *cre*-Rekombinase zu entfernen (SH97 $\Delta gmuE::loxP$).

Ein Reporter-genkonstrukt mit dem Promotor des Mannose-Operons *manPA-yjdF* ($P_{manP-lacZ}$) wurde durch den Einsatz des pHM30/pHM31-Systems (Motejadded & Altenbuchner, 2007) stromabwärts des *hisI*-Gens markerlos in das Chromosom von KM0 bzw. SH97 ($\Delta gmuE::loxP$) integriert.

Mittels der auf diese Weise neu erzeugten Stämme, SH107 und SH112, konnte die Induktion des Mannose-Promotors P_{manP} durch den Miller Assay überprüft werden. Die LacZ-Aktivität wurde nach 2 h Wachstum in LB-Medium ohne und mit je 0,2 % Glucomannan (GM), Galactomannan (*Locust Bean Gum*, LBG) bzw. D-Mannose gemessen. Erst durch die Deletion des Gens *gmuE*, welches für eine vermutete Mannose-Kinase kodiert, konnte eine (ca. 6,5- bzw. 8,1-fache) Induktion von P_{manP} durch GM bzw. LBG festgestellt werden (Abbildung 4.32). Im Vergleich zu der Mannose-induzierten P_{manP} -Aktivität war diese allerdings um das ca. 5- (GM) bzw. 4-Fache (LBG) geringer.

4.2.9.2 Auswirkungen einer Blockade der einzelnen Schritte des intrazellulären Abbauweges auf das Wachstum

Die meisten Zucker werden während ihres Katabolismus zunächst phosphoryliert. Die Phosphatgruppe dient zum einen als Energieträger für die darauffolgenden endothermen Umwandlungen. Zum anderen hält sie die importierten Metabolite in der Zelle zurück, indem sie die Rückdiffusion des Zuckers durch seinen Transporter verhindert. Eine Akkumulation von Zuckerphosphaten führt häufig zu einer Wachstumsinhibition (Chai *et al.*, 2012; Heravi *et al.*, 2011; Wenzel *et al.*, 2011).

Während des Abbaus von Gluco- und Galactomannan findet wahrscheinlich bei zwei Schritten eine Phosphorylierung statt. Da die Manno-Oligosaccharide über das PTS-System transportiert werden, ist davon auszugehen, dass die erste Phosphatgruppe während der Translokation durch die Membran auf das Substrat übertragen wird. Anschließend phosphoryliert vermutlich die angenommene Mannose-Kinase GmuE

die durch die Aktivität der postulierten Phospho- β -Mannosidase GmuD aus der phosphorylierten Hauptkette freigesetzten Mannose-Monomere zu Mannose-6-Phosphat (M6P). Zuletzt wird M6P höchstwahrscheinlich durch die M6P-Isomerase GmuF (Yeom *et al.*, 2009) in Fructose-6-Phosphat umgewandelt.

Um zu untersuchen, ob das Fehlen der Enzyme GmuD, GmuE bzw. GmuF zu einer Akkumulation von toxisch wirkenden Intermediaten führt, wurde das Wachstum von Stämmen verfolgt, in denen die entsprechenden Gene einzeln deletiert waren (Abbildung 4.33). Als Kontrolle diente der isogene Wildtypstamm KM0. Die Erzeugung der Stämme SH97 ($\Delta gmuE::loxP$), SH96 ($\Delta gmuD::loxP$) und KM692 ($\Delta gmuF::loxP$) wurde in Kapitel 4.2.8.1 beschrieben (Tabelle 3.13 und Tabelle 3.14).

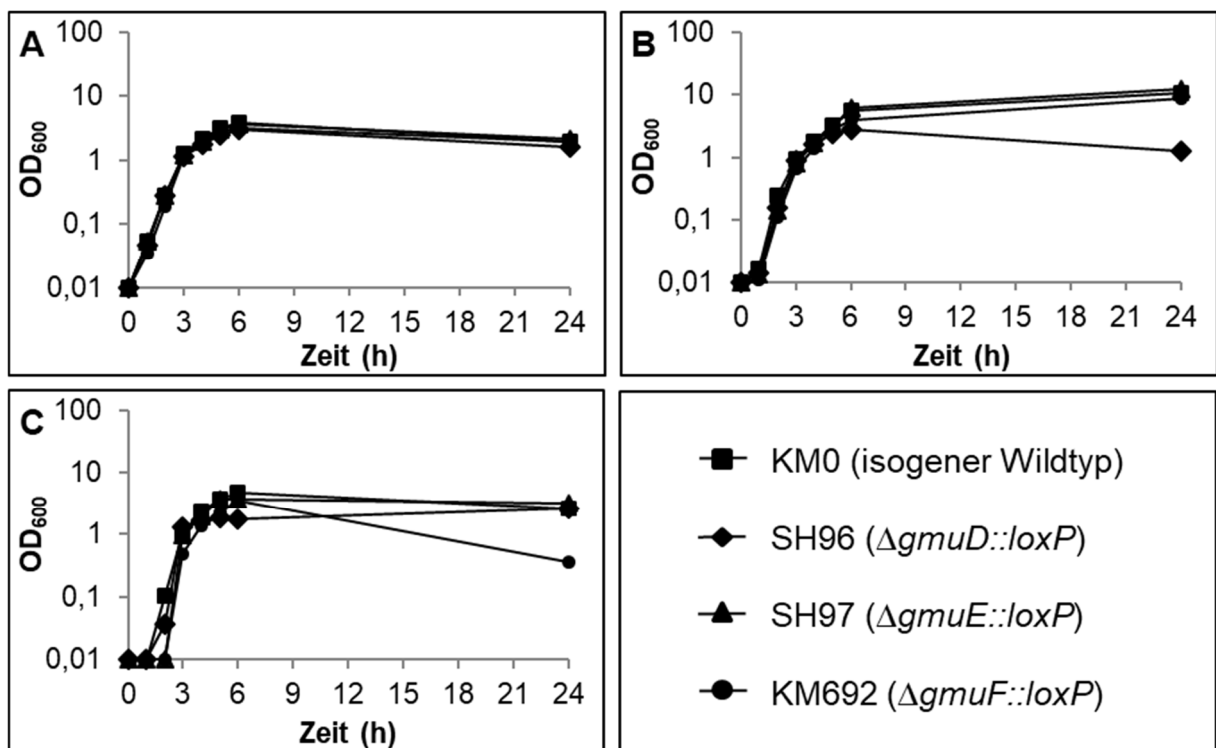


Abbildung 4.33 Auswirkungen der einzelnen Deletion der Abbaugene *gmuD*, *gmuE* und *gmuF* auf das Wachstumsverhalten. Wachstumskurven des isogenen Wildtyp-Kontrollstamms und der $\Delta gmuD$ -, $\Delta gmuE$ - bzw. $\Delta gmuF$ -Mutanten in LB-Medium ohne Zucker (A) und in Gegenwart von 0,5 % Glucomannan (B) bzw. 0,5 % des Galactomannans *Locust Bean Gum* (C).

Die Wachstumskurve der einzelnen Stämme wurde in LB-Medium ohne und mit je 0,5 % Glucomannan (GM) bzw. Galactomannan (*Locust Bean Gum*, LBG)

aufgenommen. Dazu wurden die Übernachtskulturen, die in LB-Medium (ohne Zuckerzusatz) angezogen worden waren, 1:100 in der Hauptkultur verdünnt.

Während der exponentiellen Wachstumsphase konnte jedoch bei keinem der Deletionsstämmen eine deutliche Hemmung des Wachstums beobachtet werden (Abbildung 4.33). Auch unter dem Mikroskop konnten keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden (nicht gezeigt). Der Stamm SH96 ($\Delta gmuD::loxP$), dem das Gen für die Phospho- β -Mannosidase fehlt, erreichte beim Wachstum mit GM bzw. LBG die stationäre Phase jedoch früher als der Wildtyp (Abbildung 4.33 B+C). Die Deletion des Gens *gmuF*, das für die Mannose-6-Phosphat-Isomerase kodiert, im Stamm KM692 wirkte sich nach 24 h Wachstum auf LBG in einer gegenüber dem Wildtyp (OD_{600} von ca. 2,6) deutlich verringerten Zelldichte aus (OD_{600} von ca. 0,4), die auf Zellyse hindeutet (Abbildung 4.33 C).

Die Deletionsstämmen wurden zusätzlich auch auf LB-Platten mit je 0,5 % GM bzw. LBG ausgestrichen und 16 h bei 37°C inkubiert (Abbildung 4.34). Ein Vergleich mit dem isogenen Wildtyp KM0 und dem Wachstum auf LB-Platten ohne Zucker deutete hier auf ein mögliches Wachstumsdefizit der Stämme SH96 ($\Delta gmuD::loxP$) und KM692 ($\Delta gmuF::loxP$) sowohl in Gegenwart von GM als auch von LBG hin.

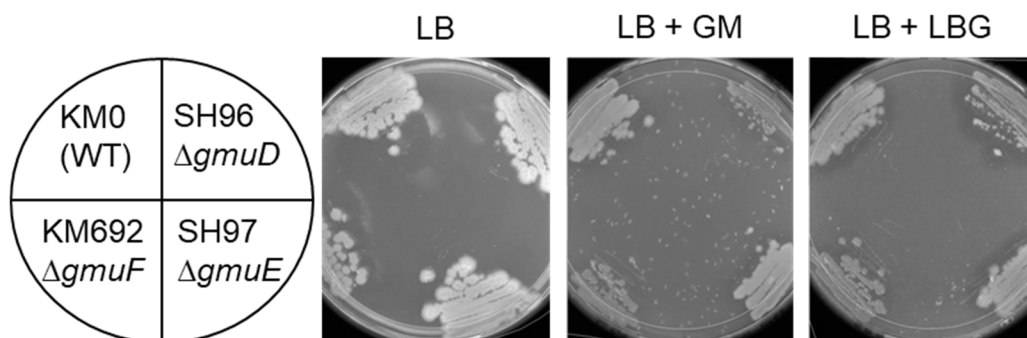


Abbildung 4.34 Wachstumsverhalten der $\Delta gmuD$ - und der $\Delta gmuF$ -Mutanten auf LB-Agarnährböden mit 0,5 % Glucomannan (GM) bzw. 0,5 % *Locust Bean Gum* (LBG) im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die Stämme KM0 (isogener Wildtyp), SH96 ($\Delta gmuD::loxP$), SH97 ($\Delta gmuE::loxP$) und KM692 ($\Delta gmuF::loxP$) wurden auf LB-Platten in An- und Abwesenheit der Substrate Gluco- bzw. Galactomannan ausgestrichen und 16 h bei 37 °C inkubiert. Die LB-Agarplatten wurden mit dem Kolonienzähler *flash & go* (IUL Instruments, Barcelona, Spanien) fotografiert.

5 Diskussion

5.1 Regulation des Rhamnose-Stoffwechsels

Zum Beginn der vorliegenden Doktorarbeit war die Regulation des mutmaßlichen Rhamnose-Operons *rhaEWRBMA* nur aufgrund bioinformatischer Analysen postuliert worden. Aus diesem Grund sollte der genaue Regulationsmechanismus experimentell untersucht werden. Das aus fünf Genen bestehende Operon schließt ein internes Regulatorgen *rhaR* ein. Es wurde angenommen, dass der DeoR-ähnliche Transkriptionsfaktor RhaR die Transkription des Rhamnose-Operons reprimiert, indem er mit seiner *in silico* postulierten Operatorsequenz stromaufwärts des ersten Gens interagiert (Leyn *et al.*, 2013).

5.1.1 Negative Regulation des Rhamnose-Operons durch den Repressor RhaR

Um die Regulation des *rhaEW*-Promotors zu untersuchen, wurden *in vivo*-Studien mit *Bacillus subtilis* Stämmen durchgeführt, welche eine *rhaEW*-Promotor-*lacZ*-Fusion chromosomal integriert hatten.

Es wurde gezeigt, dass der Promotor durch die Zugabe von Rhamnose zu diesen Zellen induziert werden kann. Durch die Deletion des *rhaR*-Gens konnte nachgewiesen werden, dass der *rhaEW*-Promotor durch den Transkriptionsfaktor RhaR negativ reguliert wird. Im RhaR-defizienten Stamm war der Rhamnose-Promotor konstitutiv aktiv. Die Zugabe von Rhamnose zum Wachstumsmedium führte in $\Delta rhaR$ -Zellen hingegen zu einer geringfügigen Abnahme der konstitutiven Promotoraktivität. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer negativen Autoregulation durch den generellen Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR), welcher dazu dient, den metabolischen Zustand der Zelle zu messen und im Gleichgewicht zu halten (Brückner & Titgemeyer, 2002). Auffällig war, dass in Abwesenheit von RhaR (ohne und mit Zugabe von Rhamnose) eine LacZ-Aktivität gemessen wurde, die etwa 4-fach höher war als die durch Rhamnose induzierte Aktivität im Wildtyp. Diese Beobachtung deutet auf einen limitierenden Faktor bei der Expression des Rhamnose-Operons im Wildtyp hin.

Um die postulierte Funktion von RhaR als Repressor zu bestätigen, wurde die direkte Interaktion mit dem Rhamnose-Promotor *in vitro* durch den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) nachgewiesen. Ein 240 bp langes P_{rhaEW} -DNA-Fragment wurde mit dem gereinigten, rekombinanten RhaR-Protein inkubiert. Aufsteigende Konzentrationen an Regulatorprotein führten zur Ausbildung von zwei unterschiedlich großen RhaR-DNA-Komplexen. Mögliche Erklärungen hierfür wären das Vorhandensein von zwei RhaR-Bindestellen, eine Bindung sowohl als Monomer als auch als Dimer oder eine kooperative Bindung von RhaR-Monomeren. Die deutlich höhere Intensität der DNA-Bande des größeren RhaR-DNA-Komplexes deutet eine kooperative Bindung an. Der ermittelte sigmoidale Kurvenverlauf der Bindungsreaktion unterstützt diese Annahme zusätzlich.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindungsreaktion (K_D) mit dem P_{rhaEW} -Fragment betrug für eine angenommene identische Bindungsaffinität von RhaR-Monomeren (ohne Kooperativität) 279 ± 20 nM. Das bedeutet, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine relativ hohe Menge an RhaR notwendig war, damit sich der RhaR-DNA-Komplex ausbilden konnte. Im Vergleich hierzu wurde für den *B. subtilis* DeoR-Repressor YcnK, der die Kupfer-Aufnahme reguliert, ein K_D -Wert von ca. 8 nM für die spezifische Bindung des YcnK-Dimers an das *ycnK*-Promotorfragment ermittelt (Hirooka *et al.*, 2012). Hirooka *et al.* (2016), die das Rhamnose-Operon zeitgleich untersuchten, ermittelten unter abweichenden Versuchsbedingungen auch eine deutlich höhere Affinität von RhaR für die Bindung an seinen Ziel-Operator (K_D von 31 nM für ein angenommenes RhaR-Dimer), die in einem ähnlichen Bereich liegt, wie der für YcnK ermittelte Wert.

Im Rahmen einer vorausgegangenen Transkriptom-Analyse unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurden zwei Transkriptionseinheiten innerhalb des Rhamnose-Operons detektiert, denen jeweils ein SigA-abhängiger Promotor vorausgeht (Nicolas *et al.*, 2012). An eine hierbei ermittelte 3,4 kb große Transkriptionseinheit, bestehend aus *rhaEW-rhaR-rhaB'*, schließt sich hiernach eine 3,7 kb große Transkriptionseinheit aus *rhaR-rhaB-rhaM-rhaA* an. Mittels *lacZ*-Fusionskonstrukten wurde jedoch die Annahme widerlegt, dass die intergene Region zwischen *rhaEW* und *rhaR* einen zusätzlichen Promotor enthält. Nur die Sequenz stromaufwärts von *rhaEW* vermittelte nach der Induktion mit L-Rhamnose eine

deutliche Promotoraktivität, während ausgehend von der vermuteten Promotorregion stromaufwärts von *rhaR* keine signifikante LacZ-Aktivität gemessen werden konnte.

Übereinstimmend hiermit bestätigte eine von Hirooka *et al.* (2016) durchgeführte Transkriptionsanalyse der einzelnen Gene mittels Northern Blot, dass die Gene *rhaEWRBMA* tatsächlich ein Operon bilden. Ein 6 kb großes, durch Rhamnose induziertes RNA-Transkript konnte nachgewiesen werden, welches die Sequenz aller fünf Gene enthielt.

5.1.2 Identifizierung der RhaR-Operatorsequenz

Die Deletionsanalyse des *rhaEW*-Promotors (P_{rhaEW}) offenbarte, dass die Sequenz stromabwärts der Position -79 (hier und im Folgenden in Bezug auf den Transkriptionsstart) notwendig für die Regulation des Rhamnose-Operons ist. Nach der nahezu vollständigen Deletion der *in silico* postulierten RhaR-Bindestelle (Deletion bis zur Position -39) war der Promotor nicht mehr durch Rhamnose induzierbar. Zusätzlich konnte im Regulator-defizienten Hintergrund gezeigt werden, dass der Sequenzabschnitt bis zur Position -79 ausreichend für die vollständige Promotoraktivität ist. Weitere Verkürzungen verursachten eine von der Bindung des Repressors RhaR unabhängige Abnahme der LacZ-Aktivität. Demnach trägt die stromabwärts der Position -80 gelegene Sequenz offenbar zur Promotorstärke bei.

Ein DNase I-*Footprinting*-Experiment zeigte, dass durch die Bindung des rekombinant produzierten Repressors RhaR an das P_{rhaEW} -Fragment die Region etwa von Position -60 bis -16 vor dem Abbau durch die DNase I geschützt ist. Zusätzlich war auf dem nicht-codierenden DNA-Strang ein weiterer, kleinerer Bereich etwa von Position -9 bis +13 unzugänglich für die Endonuklease. Der größere geschützte DNA-Abschnitt enthält eine direkte Sequenzwiederholung. Diese setzt sich aus zwei relativ hoch konservierten, 17 bp langen Sequenzen (CAAAAACAAACANAAAT mit N = A/C/G/T) zusammen (DR1 und DR2), welche durch 4 bp voneinander getrennt sind (Abbildung 5.1 A). DR1 entspricht der am 3'-Ende um 2 bp abgekürzten RhaR-Operatorsequenz, die ursprünglich aufgrund bioinformatischer Untersuchungen von Leyn *et al.* (2013) für die Ordnung Bacillales postuliert wurde. Innerhalb des weiter stromabwärts liegenden, kleineren geschützten Bereichs konnte eine zusätzliche, unvollständige direkte Wiederholung

des DNA-Motivs (DR3) ausgemacht werden, die in 5 Basen von der abgeleiteten Konsensussequenz abweicht (tgAAAACggAtAcAAAT; Abweichungen sind durch Kleinbuchstaben dargestellt).

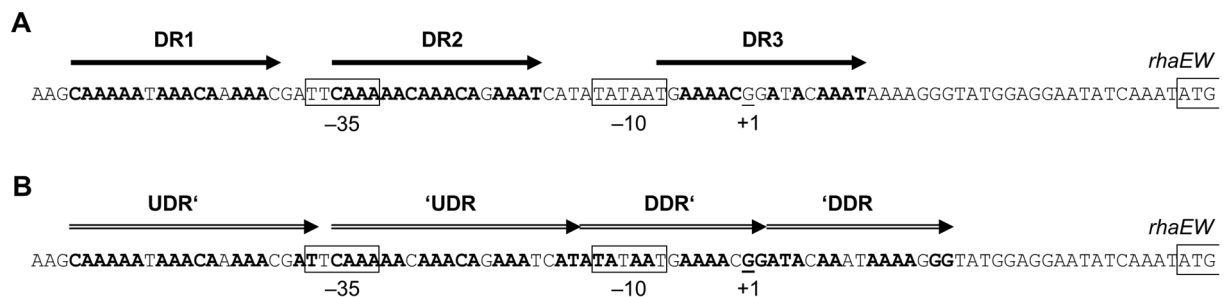


Abbildung 5.1 Direkte Sequenzwiederholungen (engl. *direct repeat*, DR) im *rhaEW*-Promotor. **A)** Dargestellt ist das basierend auf den experimentellen Ergebnissen dieser Arbeit abgeleitete 17 bp lange Sequenzmotiv, welches mit geringen Nukleotidabweichungen dreimal wiederholt wird. **B)** Basierend auf abweichenden Ergebnissen, die in einem DNase I-*Footprinting*-Experiment von P_{rhaEW} mit RhaR erhalten wurden, identifizierten Hirooka *et al.* (2016) eine 20 bp lange direkte Sequenzwiederholung (UDR, für engl. *upstream direct repeat*) auf die eine zweite 15 bp lange direkte Sequenzwiederholung folgt (DDR, für engl. *downstream direct repeat*).

Das Muster der durch RhaR geschützten Regionen, das Hirooka *et al.* (2016) in einem vergleichbaren DNase I-*Footprinting*-Experiment erhielten, ist ähnlich zu dem hier diskutierten Ergebnis. Auf der Grundlage einer größeren geschützten Region auf dem codierenden Strang postulierte die Arbeitsgruppe von Hirooka *et al.* (2016) jedoch zwei direkte Sequenzwiederholungen innerhalb des *rhaEW*-Promotors (Abbildung 5.1 B).

Mittels β -Galactosidase als Reporter konnte gezeigt werden, dass eine komplementäre Substitution der ersten 6 vollständig konservierten Basen am Anfang der Konsensussequenz (CAAAAA) in DR1 bzw. in DR2 die Repression des *rhaEW*-Promotors jeweils vollständig verhindert. Eine Mutation der darauffolgenden ebenso vollständig konservierten Basenabfolge AAACA in DR2 hob die Repression ebenso vollständig auf. Bereits die Substitution von 2 Basen am Anfang der direkten Wiederholung der ursprünglich *in silico* postulierten RhaR-Bindestelle (CAA zu GAC in DR2) führte zu einer konstitutiven Aktivität. Demzufolge ist davon auszugehen,

dass der entsprechende Sequenzabschnitt (-54 bis -22), welcher die direkte Sequenzwiederholung DR1 und DR2 beinhaltet, unerlässlich für die spezifische Bindung von RhaR ist.

Durch ESMA mit kurzen, synthetischen DNA-Fragmenten wurde gezeigt, dass sich der RhaR-DNA-Komplex *in vitro* nur bilden kann, wenn die beiden Sequenzen DR1 und DR2 gleichzeitig vorhanden sind. War nur je eine dieser beiden Sequenzen in dem FITC-markierten Oligonukleotid enthalten (DR1 bzw. DR2 zusammen mit DR3), konnte keine Komplexbildung mit RhaR beobachtet werden.

Auch Hirooka *et al.* (2016) beobachteten, dass durch die Deletion des Sequenzabschnitts von Position -54 bis -14 im P_{rhaEW} -Fragment, welcher die Sequenzwiederholung DR1 und DR2 umfasst, die *in vitro*-Interaktion mit RhaR unterbunden wird. Eine Deletion der Region von Position -13 bis +17, welche die stromabwärts folgende Sequenzwiederholung DR3 enthält, veränderte die Bindungsaffinität von RhaR hingegen nicht, führte jedoch zu einer höheren Mobilität der gebundenen P_{rhaEW} -DNA-Bande.

Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Daten zeigen daher, dass eine Repression durch RhaR nur dann möglich ist, wenn beide Sequenzwiederholungen DR1 und DR2 intakt sind.

5.1.3 Oligomerisierungsgrad von RhaR

Das rekombinante RhaR-Protein wurde bei der Gelfiltration bei einem Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa von der Säule eluiert. Dieses entspricht dem theoretischen Molekulargewicht der monomeren Form (29 kDa).

Gegensätzlich hierzu ermittelten Hirooka *et al.* (2016), dass RhaR in Lösung als Dimer vorliegt. Dies ist erstaunlich, da sie die Gelfiltration bei einer niedrigeren Salz- und Ionenstärke (0,1 M NaCl) durchführten. Da Kalium-Kationen intrazellulär in hohen Konzentrationen vorliegen, spiegelt der in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzte Kaliumphosphatpuffer (0,3 M) die Situation in der Zelle wahrscheinlich besser wider. Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass der hier für die Reinigung eingesetzte C-terminale Strep-Tag anschließend nicht entfernt wurde, da angenommen wurde, dass er das Verhalten des Enzyms nicht beeinträchtigt. Hirooka *et al.* (2016) verwendeten hingegen ein rekombinantes RhaR-Protein ohne

Tag, welches durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt wurde. In DeoR-verwandten Regulatoren wird die Oligomerisierung von Proteinuntereinheiten vermutlich durch ihre C-terminale Domäne vermittelt (Anantharaman & Aravind, 2006). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der angefügte Strep-Tag die Interaktion zwischen den monomeren Proteinen störte.

DNA-bindende Proteine mit einem Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv interagieren über die sogenannte Erkennungshelix sequenzspezifisch mit den Basenpaaren in der großen Furche der DNA. Die Aminosäuren der zweiten α -Helix legen sich als Stabilisator im rechten Winkel zur ersten quer über die große Furche und interagieren sequenzunabhängig mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Regulatoren mit einer HTH-Domäne benötigen gewöhnlich zwei Proteineinheiten für die Interaktion mit ihrem in der Regel symmetrischen Operator. Innerhalb der experimentell identifizierten Operatorsequenz von RhaR im *rhaEW*-Promotor konnte jedoch keine Spiegelsymmetrie festgestellt werden. Zusammen mit der Tatsache, dass der Spacer (4 nt) für eine mögliche Schleifenbildung der DNA zu kurz erscheint, ist eine Bindung als Monomer schlüssig.

5.1.4 Effektormolekül

Wie gezeigt wurde, kann der *rhaEW*-Promotor durch die Zugabe von L-Rhamnose zum Nährmedium induziert werden. Um nachzuweisen, welches Molekül tatsächlich die Anwesenheit des Zuckers signalisiert, wurde untersucht, ob nach der Deletion von *rhaM*, *rhaA*, *rhaB* bzw. *rhaEW* in Gegenwart von L-Rhamnose noch eine Induktion des *rhaEW*-Promotors stattfindet. Die Abwesenheit der Mutarotase RhaM, welche die Umwandlung der α -Form von L-Rhamnose in das β -Anomer katalysiert, führte zu keiner signifikanten Änderung der LacZ-Aktivität gegenüber dem Wildtyp. Dies ist nicht verwunderlich, da eine Umwandlung der L-Rhamnopyranose, die in Lösung bevorzugt als α -Anomer vorliegt (56,4 %) (Ryu *et al.*, 2004), auch spontan stattfindet, wenn auch langsam. Ähnlich zu dem hier erhaltenen Ergebnis konnte auch in *Escherichia coli* erst bei einer sehr geringen Rhamnose-Konzentration (0,03 %) eine effizientere Verwertung von Rhamnose durch die Aktivität der Mutarotase beobachtet werden (Ryu *et al.*, 2005).

Das Ausschalten des Gens für die L-Rhamnose-Isomerase RhaA unterbindet den Abbau von Rhamnose vollständig. Die Deletion von *rhaB* verhindert die nachgeschaltete Reaktion, bei der durch die Aktivität der Rhamnulokinase L-Rhamnulose-1-Phosphat (R1P) entsteht (Hirooka *et al.*, 2016). Weder im $\Delta rhaA$ - noch im $\Delta rhaB$ -Deletionsstamm konnte der *rhaEW*-Promotor durch die Zugabe von Rhamnose zum Wachstumsmedium induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei R1P um den eigentlichen Induktor handelt. Hirooka *et al.* (2016) wiesen die Entstehung des Effektors R1P durch die aufeinanderfolgende Aktivität der *B. subtilis* Enzyme RhaA und RhaB biochemisch nach. RhaA und RhaB katalysieren, analog zu *E. coli*, die Isomerisierung und anschließende Phosphorylierung von Rhamnose (Hirooka *et al.*, 2016). Ein Fehlen des letzten Enzyms des Abbauwegs, der bifunktionellen L-Rhamnulose-Phosphat-Aldolase/L-Lactaldehyd-Dehydrogenase RhaEW, die R1P spaltet, verursacht daher sehr wahrscheinlich eine Akkumulation von R1P. Übereinstimmend mit der Annahme, dass es sich hierbei um das Effektormolekül handelt, wurde in Abwesenheit von RhaEW eine deutliche Steigerung der Rhamnose-induzierten Promotoraktivität beobachtet.

Die Dissoziation des RhaR-DNA-Komplexes durch die allosterische Interaktion von R1P mit RhaR wurde *in vitro* mittels EMSA nachgewiesen. R1P wurde zunächst durch Phosphorylierung von L-Rhamnulose mit *E. coli* RhaB-Strep-Tag und ATP *in vitro* synthetisiert und gereinigt. Unter den zuvor getesteten Bedingungen, die ausreichend waren, damit die DNA vollständig durch RhaR gebunden werden konnte, wurde nach Zugabe von R1P die freie DNA-Bande wieder sichtbar. L-Rhamnose bzw. L-Rhamnulose hingegen beeinträchtigten auch bei aufsteigenden Konzentrationen (125 μ M bis 5 mM) unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Bindung von RhaR an das P_{rhaEW} -Fragment nicht.

5.1.5 CcpA-vermittelte Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR)

Neben der spezifischen, Effektor-abhängigen Regulation, die durch RhaR vermittelt wird, unterliegt das Rhamnose-Operon offenbar zusätzlich der durch CcpA-vermittelten Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR). Im Rhamnose-Promotor befindet sich neben den RhaR-Bindestellen auch eine potentielle Operatorsequenz für den Repressorkomplex aus CcpA und einem der beiden Serin-Phosphoproteine HPr oder

Crh. Die sogenannte *cre*-Sequenz liegt innerhalb der zweiten durch RhaR geschützten Region im DNase I-Fußabdruck des *rhaEW*-Promotors. Ihre Funktionalität konnte durch Mutation der hoch konservierten Basen der *cre*-Sequenz bestätigt werden. Durch die Basensubstitutionen wurde die starke Repression der Transkription durch Glucose nahezu vollständig aufgehoben. Im Wildtyp fand eine Derepression der *rhaEW*-Promotoraktivität erst in der stationären Wachstumsphase statt, nachdem die Glucose verbraucht wurde. Darüber hinaus wiesen Hirooka *et al.* (2016) die Bindung des CcpA-(P-Ser46-HPr)-Komplexes an die mutmaßliche *cre*-Sequenz an dieser Position *in vitro* durch den Schutz vor einem DNase I-Verdau nach. Eine Deletion von *ccpA* befreite den *rhaEW*-Promotor ebenfalls von der Repression durch Glucose (Hirooka *et al.*, 2016).

Da die *cre*-Sequenz mit der –10 Region überlappt und den Transkriptionsstartpunkt beinhaltet, verhindert die Bindung des Proteinkomplexes an diesen Abschnitt die Genaktivierung wahrscheinlich, indem sie die Ausbildung des Transkriptionskomplexes blockiert.

5.1.6 Regulation durch die C-terminalen Domänen der α -Untereinheiten der RNA-Polymerase

In *B. subtilis* werden einige Gene offenbar zusätzlich durch die CTD-Domänen der beiden α -Untereinheiten (α -CTD) der RNA-Polymerase (RNAP) reguliert. Zu den betroffenen Genen zählen u. a. an der Verwertung von sekundären Kohlenstoffquellen beteiligte Gene (Murayama *et al.*, 2015). Die α -CTD stimuliert die Transkription spezifischer Promotoren entweder durch eine Interaktion mit Transkriptionsaktivatoren oder sogenannten *upstream* (UP) Elementen. Als UP-Elemente bezeichnet man etwa 20 bp lange AT-reiche Sequenzabschnitte, die in einem Abstand von bis zu 80 Nukleotiden stromaufwärts der –35 Region liegen (van Hijum *et al.*, 2009). Die Sequenzen der UP-Elemente sind in *B. subtilis* nur partiell konserviert (Murayama *et al.*, 2015).

Bei der *in vivo*-Deletionsanalyse des *rhaEW*-Promotors in *B. subtilis* konnte in Abwesenheit von RhaR bei einer Deletion bis zur Position -39 eine erhebliche Abnahme der LacZ-Aktivität beobachtet werden. Daher könnte es sein, dass auch

die AT-reiche Sequenz stromaufwärts der -35 Region des *rhaEW*-Promotors für die Rekrutierung der RNAP benötigt wird.

Da auch RhaR in diesem Bereich bindet, konkurriert die α -CTD vermutlich mit dem Regulator um die Aktivierung bzw. die Repression der Genexpression. Allerdings muss angemerkt werden, dass bei einer genomweiten Untersuchung der biologischen Rolle der α -CTD in *B. subtilis* (Murayama *et al.*, 2015) das Rhamnose-Operon nicht als Kandidat für eine Regulation durch die α -CTD identifiziert wurde.

Ein EMSA-Experiment mit einer rekombinanten α -CTD und dem P_{rhaEW} -Fragment könnte hierüber genaueren Aufschluss geben.

5.1.7 Modell der Regulation des Rhamnose-Operons

Im EMSA wurden mit einer DNA-Probe, die DR1-3 enthielt, zwei verschieden große RhaR- P_{rhaEW} -Komplexe beobachtet, die sich nacheinander bildeten. RhaR konnte jedoch nicht an eine DNA-Probe binden, die nur DR1, DR3 bzw. DR2 und DR3 umfasste. Dies zeigte, dass DR1 und DR2 für eine stabile Bindung von RhaR unerlässlich sind. Die beiden Hälften der direkten Sequenzwiederholung (DR1 und DR2) welche die -35 Region umrahmen, werden vermutlich nacheinander durch zwei RhaR-Monomere gebunden. Jedes Monomer kontaktiert dabei eine der beiden 17 bp langen Sequenzen über die beiden α -Helices seiner HTH-Domäne.

Möglich ist auch, dass zunächst frei diffundierende RhaR-Monomere zuerst unspezifisch, „locker“ an das DNA-Rückgrat binden und dieses nach ihrer Erkennungssequenz absuchen. Gelangen sie jeweils an eine Hälfte des Operators (DR1 oder DR2) dimerisieren die Monomere über ihre C-terminalen Domänen miteinander und bewirken eine stramme DNA-Bindung durch spezifische Interaktionen mit den Nukleotiden innerhalb der RhaR-Bindestelle. Dieser Mechanismus könnte eine Kooperativität der Bindung bedingen.

Die Auswertung der DNase I-*Footprinting*-Experimente offenbarte eine weitere, stromabwärts gelegene RhaR-Bindestelle (DR3), welche mit der -10 Region überlappt. Ungewöhnlicherweise wurde durch die Bindung von RhaR an diese Region offenbar nur der nicht-codierende DNA-Strang geschützt, welcher während der Transkription durch die RNA-Polymerase gebunden wird.

Die Zentren von DR1 und DR2 sind durch 20 bp voneinander getrennt. Dies entspricht zwei vollständigen Helix-Windungen, sodass sich die Erkennungshelix des HTH-Motivs des zweiten Monomers wahrscheinlich in die übernächste große Furche auf derselben Seite der DNA legt. Die Erkennungshelix des dritten Monomers bettet sich hingegen vermutlich in die große Furche auf der gegenüberliegenden Seite der DNA ein, da die Zentren von DR2 und DR3 26 bp voneinander entfernt sind.

Durch die Bindung von RhaR wird offenbar eine Krümmung im Bereich der -10 Region verursacht, die zu den beobachteten DNase I hypersensitiven Bereichen auf beiden DNA-Strängen stromabwärts von DR2 geführt haben könnten.

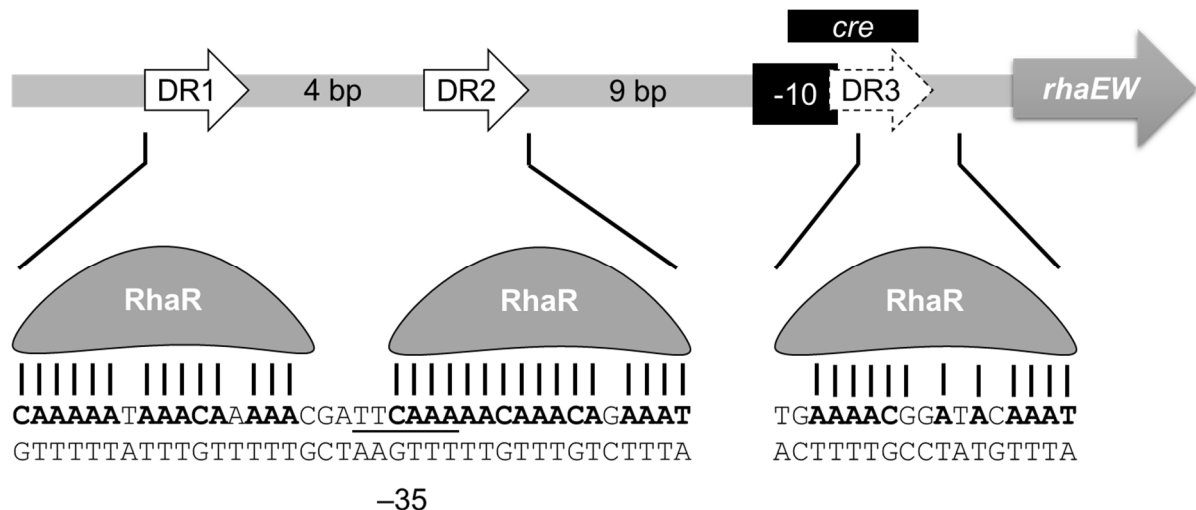


Abbildung 5.2 Modell der Regulation des Rhamnose-Promotors (P_{rhaEW}). Der Repressor RhaR bindet in Abwesenheit seines Effektors, Rhamnulose-1-Phosphat, an seinen Operator, der die -35 Region (unterstrichen) des Promotors überdeckt, und blockiert dadurch die Transkription des Rhamnose-Operons. Die RhaR-Bindestelle beinhaltet eine direkte Sequenzwiederholung aus zwei 17 bp langen Sequenzen (DR1 und DR2), die vermutlich von je einem RhaR-Monomer gebunden werden. Auf diese folgt eine weitere, unvollständige direkte Wiederholung dieser Sequenz (DR3). In Gegenwart des bevorzugten PTS-Zuckers Glucose bindet der CcpA-Phosphoprotein-Komplex an eine *cre*-Sequenz stromaufwärts von *rhaEW*, welche mit der -10 Region und DR3 überlappt und den Transkriptionsstartpunkt enthält.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wird das folgende Modell für die Regulation des Rhamnose-Operons vorgeschlagen (Abbildung 5.2).

In Abwesenheit von Rhamnose und einer bevorzugten C-Quelle wie Glucose binden zwei RhaR-Monomere an die –35 Region (DR1 und DR2) und ein zusätzliches RhaR-Monomer (mit geringerer Affinität) an die –10 Region (DR3) des Rhamnose-Promotors. Hierdurch wird die Bindung der RNAP sterisch blockiert.

Steht Rhamnose zur Verfügung, bindet das Intermediat des Rhamnose-Abbauwegs, L-Rhamnulose-1-Phosphat, an RhaR. Aufgrund allosterischer Effekte dissoziieren daraufhin die RhaR-Monomere von der DNA, wodurch die Repression der Rhamnose-Abbaugene aufgehoben wird.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und Rhamnose wird der *rhaEW*-Promotor durch den CcpA-(P-Ser46-HPr)-Repressorkomplex reprimiert. Dieser bindet an die funktionelle *cre*-Sequenz innerhalb des Rhamnose-Promotors, die mit der –10 Region überlappt.

Steht nur Glucose zur Verfügung, wird das schwach an DR3 bindende RhaR-Monomer durch den CcpA-(P-Ser46-HPr)-Repressorkomplex abgelöst, da die *cre*-Sequenz sowohl mit der –10 Region als auch mit DR3 überlappt. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von DNase I-*Footprinting*-Experimenten, bei denen zusätzlich der CcpA-(P-Ser46-HPr)-Repressorkomplex (alleine und in Kombination mit RhaR) eingesetzt wurde, unterstützt (Hirooka *et al.*, 2016).

Für eine vollständige Repression des Rhamnose-Operons in Abwesenheit des Induktors R1P wird der Regulator CcpA nicht benötigt (Hirooka *et al.*, 2016). Gegensätzlich dazu wird im Regulator-defizienten Stamm in Gegenwart von Glucose die Transkription ausgehend von P_{rhaEW} nicht vollständig reprimiert. Daher unterstützt wahrscheinlich in Abwesenheit von Glucose und Rhamnose die im DNase I-Fußabdruck von RhaR beobachtete schwache Bindung eines dritten Monomers an DR3 die sterische Hinderung der RNAP zusätzlich, indem es die Wirkung des CcpA-(P-Ser46-HPr)-Repressorkomplexes ersetzt.

5.1.8 DeoR-Regulatoren

Das Genom von *B. subtilis* kodiert neben RhaR für 5 weitere DeoR-ähnliche Regulatorproteine (DctR, FruR, GlcR, IolR, YcnK) (Leyn *et al.*, 2013). Diese sind hauptsächlich an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels (C4-Dicarbonsäuren, Fructose, Inositol) beteiligt (Leyn *et al.*, 2013), aber auch an der

Metallhomöostase durch Kontrolle der Kupfer-Aufnahme durch YcnK (Hirooka *et al.*, 2012).

Vielen Mitgliedern der zwei bei Bakterien weitverbreiteten Transkriptionsfaktor-Familien DeoR und SorC ist gemein, dass sie auf verschiedene Zucker oder auf Nukleoside (DeoR) ansprechen. Ihre N-terminale HTH-DNA-Bindedomäne ist an eine hochkonservierte Region (ISOCOT-Domäne) gekoppelt, die eine ähnliche Faltungsstruktur wie die *E. coli* D-Ribose-5-Phosphat-Isomerase aufweist und daher sehr wahrscheinlich der Effektor-Erkennung und -Bindung dient (Anantharaman & Aravind, 2006). Die C-terminale Domäne von RhaR lässt sich innerhalb der ISOCOT Superfamilie der DeoR-Familie zuordnen. Neben ihrer Sensorfunktion vermittelt die C-terminale DeoR-Domäne vermutlich die Oligomerisierung der Proteinuntereinheiten (Anantharaman & Aravind, 2006).

Die meisten der bisher beschriebenen Mitglieder der DeoR-Proteinfamilie wirken als Transkriptionsrepressoren und binden häufig als Homo-Oligomere an die DNA wie z. B. *B. subtilis* YcnK (Dimer), *E. coli* DeoR (Oktamer), *E. coli* UlaR (Tetramer) und *E. coli* GlpR (Tetramer) (Garces *et al.*, 2008; Hirooka *et al.*, 2012; Larson *et al.*, 1987; Mortensen *et al.*, 1989).

Die Identifizierung von R1P als Effektor passt zu der Beobachtung, dass üblicherweise die phosphorylierten Zucker-Intermediate der katabolischen Stoffwechselwege, welche durch die DeoR-verwandten Regulatoren unterdrückt werden, die DNA-Bindung aufheben. Dies ist der Fall bei 2-Desoxy-5-Keto-D-Gluconat-6-Phosphat (*B. subtilis* IolR), Desoxyribose-5-Phosphat (*E. coli* DeoR), Glycerin-3-Phosphat (*E. coli* GlpR) und Fructose-1-Phosphat (*Lactococcus lactis* FruR) (Barrière *et al.*, 2005; Larson *et al.*, 1987; Mortensen *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 2008).

Während einige DeoR-Transkriptionsfaktoren palindromische Sequenzen erkennen, enthalten die Bindestellen der *B. subtilis* DeoR-Regulatoren IolR und YcnK ähnlich zu RhaR eine direkte Sequenzwiederholung, die sich aus zwei (relativ) konservierten 11 bp bzw. 8 bp langen Sequenzen zusammensetzt (Hirooka *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 1999). Auch diese Tandemwiederholungen liegen in direkter Nachbarschaft zur –35 Region bzw. decken diese ab und sind für die Bindung des zugehörigen Repressors unerlässlich (Hirooka *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 1999).

Beim DNase I-*Footprinting*-Experiment traten innerhalb der durch RhaR geschützten Bereiche vier DNase I-hypersensitive Bereiche in Intervallen von 10–11 bp auf, was der Ganghöhe der DNA-Helix entspricht. Die DNase I-Schnittstellen fallen alle mit dem dritten Nukleotid der innerhalb der direkten Sequenzwiederholung tandemartig 4-fach wiederholten CARAAA-Sequenz (R = A/G) zusammen. Möglicherweise nimmt dieses Hexamer während der RhaR-DNA-Interaktion eine spezifische Struktur an und stellt daher wahrscheinlich ein entscheidendes Element in der DNA-Sequenz für die spezifische Bindung von RhaR dar. Ähnliches wurde für den *B. subtilis* IolR-Regulator beobachtet (Yoshida *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2002).

Bei der Periodizität von 10–11 bp handelt es sich offenbar um eine intrinsische Eigenschaft der Bindestellen der RhaR-Regulatoren aus der DeoR-Familie. Neben der Ordnung Bacillales weisen drei weitere taxonomische Gruppen strukturell ähnliche Konsensussequenzen für die Bindung des RhaR-Regulators aus der DeoR-Familie auf. Trotz unterschiedlicher Sequenzen ist ihnen gemein, dass eine konservierte Sequenzabfolge nach 10–11 bp unvollständig direkt wiederholt wird (Rodionova *et al.*, 2013).

5.1.9 Vergleich des Rhamnose-Verwertungssystems von *B. subtilis* mit *E. coli*

Der Abbauweg von Rhamnose läuft in *B. subtilis* und *E. coli* nahezu analog ab. Eine Ausnahme stellt der letzte katalytische Schritt dar, bei welchem in *E. coli* die Aldolase RhaD das Intermediat R1P in L-Lactaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) spaltet. In *B. subtilis* hingegen ist durch eine Fusion von RhaE und RhaW zu einem bifunktionellen Enzym die Aldolspaltung an eine darauffolgende Dehydrierung gekoppelt, sodass als Endprodukte des Abbaus L-Lactat und DHAP entstehen (Rodionova *et al.*, 2013). Trotz der überwiegenden Gemeinsamkeiten beim Katabolismus von Rhamnose ist die Regulation der Abbaugene in *B. subtilis* und *E. coli* grundverschieden.

Die *E. coli* Regulatoren RhaS und RhaR sind beide Mitglieder der AraC/XylS-Familie der Transkriptionsaktivatoren, welche die DNA über ihre konservierte C-terminale Domäne binden und eine N-Terminale Dimerisierungs- und/oder Effektorbindungsdomäne tragen. Die Bindung des Effektors Rhamnose bewirkt allosterische Konformationsänderungen der beiden Regulatoren, die es den RhaR-

und RhaS-Dimeren erlauben, an die DNA zu binden und die Genexpression durch direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase zu aktivieren (Kolin *et al.*, 2008). In *E. coli* unterliegt die Verwertung von Rhamnose ebenfalls der CCR, die in gramnegativen Bakterien durch das cAMP-Rezeptorprotein (CRP) vermittelt wird. Als Coaktivator bindet das dimere CRP in der Anwesenheit von cAMP gemeinsam mit RhaS bzw. RhaR an die jeweiligen regulatorischen Regionen (Vía *et al.*, 1996; Wickstrum *et al.*, 2005).

5.1.10 Aufnahme von Rhamnose in die Zelle

In *E. coli* wird Rhamnose durch den Protonen-Symporter RhaT in die Zelle aufgenommen, der durch ein monocistronisches Gen stromaufwärts des Operons der Strukturgene *rhaBAD(M)* kodiert wird (Muiry *et al.*, 1993).

Innerhalb des *B. subtilis* Rhamnose-Operons ist kein Gen mit Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Transportproteinen enthalten. Hirooka *et al.* (2016) postulierten, dass *B. subtilis* 168 dennoch Rhamnose assimilieren kann, da sie in einem synthetischen Minimalmedium (S6) mit 0,02 % Hefeextrakt nach der Zugabe von 25 mM (0,4 %) Rhamnose Wachstum beobachten konnten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Wachstumsverhaltens von *B. subtilis* in Spizizens Minimalmedium (ohne Citrat) hingegen unterstützt jedoch die Annahme, dass sein Genom nicht für ein Rhamnose-spezifisches Aufnahmesystem kodiert. Dementsprechend konnte *B. subtilis* hier mit L-Rhamnose (0,2 %) als einzige Kohlenstoffquelle (C-Quelle) nicht effizient wachsen. Die Deletion des regulatorischen Gens *rhaR* führte zu einer relativ hohen, konstitutiven *lacZ*-Expression, die (in Gegenwart von Rhamnose) ungefähr 4-fach höher war als die Expression von *lacZ* im Wildtyp nach extrazellulärer Zugabe von L-Rhamnose. Auch dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass Rhamnose nicht effizient aufgenommen werden kann und der Rhamnose-Import daher den limitierenden Faktor bei der Verwertung dieses Zuckers darstellt.

Das postulierte Rhamnose-Operon des Tiefseebakteriums *Oceanobacillus iheyensis* (s. Kapitel 7.1) kodiert für ein Transportprotein aus der *Major-Facilitator*-Superfamilie (Takami *et al.*, 2002). Die heterologe Expression des entsprechenden Gens (*rhaY*) für die vermutete Rhamnose-spezifische Permease ermöglichte das Wachstum mit Rhamnose als einzige C-Quelle. Allerdings zeigten die Zellen, bei denen *rhaY* unter

der Kontrolle von P_{rhaEW} stand, in den ersten 8 Stunden zunächst wie der Wildtyp kein Wachstum. Daher könnte das Erlangen der Fähigkeit zur Verwertung von Rhamnose von einer spontanen (Sekundär-)Mutation innerhalb eines der Abbaugene oder des heterologen *rhaY*-Gens abhängen. Denkbar ist jedoch auch, dass ein anderer Transporter, der nicht-induziert ist, den Rhamnose-Transport übernimmt, indem sein Regulator mutiert. In diesem Fall würde man jedoch erwarten, dass die Mutation auch in einem *rhaY*-negativen Stamm auftritt.

Im natürlichen Habitat des Pflanzen-assoziierten Bodenbakteriums tritt Rhamnose häufig als ein Bestandteil von pflanzlichen Heteropolysacchariden und Glykosiden (z. B. Flavonoide) auf (Giraud & Naismith, 2000; Yadav *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass *B. subtilis* auf dem Rhamnose-haltigen Pektin Rhamnogalacturonan I (RGI) wachsen kann, wenn auch nur langsam (Ochiai *et al.*, 2007). Die am Abbau von RGI beteiligten Enzyme werden durch drei getrennte Gencluster (*yesOPQRSTUVWXYZ*, *ytePRSTU* und *ytcPQ*) kodiert. Das Rückgrat von RGI wird zunächst extrazellulär durch die synergistische Aktivität der RGI-Endolyase YesW und der Exolyase YesX in ein Disaccharid aus Rhamnose und ungesättigter D-Galacturonsäure zerlegt (Ochiai *et al.*, 2007). Nach der Aufnahme durch einen der beiden vermuteten Rhamnose-Oligosaccharid-spezifischen ABC-Transporter (*yesOPQ* und *ytcPQ-yteP*) spalten die Hydrolasen RhiN (früher YesR) und YteR die α -1,2-glykosidische Bindung, wodurch intrazellulär Rhamnose freigesetzt wird (Itoh *et al.*, 2006). Daher ist es vorstellbar, dass der Rhamnose-Abbauweg von *B. subtilis* der weiteren Verwertung von intrazellulär freigesetzten Rhamnose-Monomeren dient, die über Rhamnose-haltige Verbindungen in die Zelle gelangen.

Denkbar ist auch, dass Rhamnose während des Wachstums auf komplexen Polysacchariden zusammen mit ähnlichen Monosacchariden über die Arabinose-Permease AraE in die Zelle transportiert wird. *B. subtilis* setzt aus der pflanzlichen Zellwand neben Rhamnose-haltigen Oligosacchariden gleichzeitig auch Arabinose-Oligomere sowie L-Arabinose frei (Inácio & Sá-Nogueira, 2008; Inácio *et al.*, 2008). Die Anwesenheit von L-Arabinose führt zur Induktion des monocistronischen *araE*-Gens mit Sequenzähnlichkeit zu prokaryotischen Protonen-Symport-Proteinen für Monosaccharide (Sá-Nogueira & Ramos, 1997). Das Transportprotein AraE weist eine breite Substratspezifität auf und nimmt mindestens drei verschiedene Zucker - Arabinose, Galactose und Xylose - auf (Krispin & Allmansberger, 1998a), die alle in

den Seitenketten von RGI auftreten. Analog zu Rhamnose werden die vollständigen Abbaupfade für Galactose und Xylose durch das Genom von *B. subtilis* kodiert, jedoch kann *B. subtilis* auch diese beiden Zucker nicht als einzige C-Quelle verwerten, da ebenfalls ein spezifischer Transporter fehlt (Krispin & Allmansberger, 1998b; Schmiedel & Hillen, 1996). Dennoch kann die Expression des *B. subtilis xyl*-Operons ähnlich zum Rhamnose-System durch die Zugabe von Xylose während des Wachstums in SMM induziert werden (Gärtner *et al.*, 1988).

Es ist eher unwahrscheinlich, dass *B. subtilis* unter natürlichen Bedingungen außerhalb des Labors nur eines dieser Monosaccharide einzeln vorfindet. Vielmehr ist davon auszugehen, dass beim Abbau von pflanzlichem Material ein Gemisch dieser Zucker vorliegt und Arabinose die Anwesenheit dieses signalisiert.

5.2 Regulation des Glucomannan-Stoffwechsels

Sadaie *et al.* (2008) wiesen in einer vorausgegangenen Studie nach, dass das aus acht Genen bestehende *gmuBACDREFG*-Operon von *B. subtilis* in Gegenwart von Konjak-Glucomannan transkribiert und durch den Regulator GmuR negativ reguliert wird.

Um die Regulation des *gmuB*-Promotors genauer zu untersuchen, wurde dieser mit *lacZ* fusioniert und das Konstrukt ektopisch in das Chromosom von *B. subtilis* integriert. Der *gmuB*-Promotor konnte sowohl durch Konjak-Glucomannan als auch durch das Galactomannan *Locust Bean Gum* (LBG) induziert werden. Folglich ist das Glucomannan-Operon sehr wahrscheinlich auch an der Verwertung der strukturell ähnlich aufgebauten Galactomannane beteiligt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Heteromannane, die wie Glucomannan aus β -1,4-verknüpften Mannanketten bestehen. Während bei Glucomannanen zusätzlich D-Glucose-Einheiten über eine β -1,4-glykosidische Bindung in die Hauptkette integriert sind, ist die homogene Hauptkette von Galactomannanen mit α -1,6-gebundenen Galactose-Seitenketten substituiert.

Da die extrazelluläre β -Mannanase GmuG auch β -1,4-verknüpftes Homomannan hydrolysiert (Tailford 2009), kann das *gmu*-Operon sehr wahrscheinlich auch durch die oligomeren Abbauprodukte dieses Substrats induziert werden. Dies ist jedoch nicht untersucht worden. Sadaie *et al.* (2008) konnten keine Induktion durch die Zugabe von Hefe-Mannan beobachten. Das aus diesem Organismus isolierte Polysaccharid ist allerdings aus α -1,6-verknüpften Mannose-Einheiten aufgebaut und wird deshalb sehr wahrscheinlich nicht durch die Mannanase GmuG gespalten. Daher ist davon auszugehen, dass das als „Glucomannan ut*ilization operon*“ (*gmu*) bezeichnete Operon der Verwertung von β -1,4-verknüpften (Hetero-)Mannan-Verbindungen dient.

In Abwesenheit des Repressors GmuR wurde eine LacZ-Aktivität erzielt, die ca. 3-fach höher war als die LBG-induzierte Promotoraktivität im Wildtyp. Dies könnte durch die komplexe Struktur des heterogenen Polysaccharids bedingt sein, die vermutlich dazu führt, dass der Abbauprozess und der davon abhängige Induktionsprozess einige Zeit benötigen. Gegensätzlich hierzu beobachteten Sadaie *et al.* (2008) nach der Unterbrechung von *gmuR* durch den Integrationsvektor

pMUTIN2 eine geringere Induktion durch das Abbauprodukt Cellobiose. Hieraus schlossen sie eine Beteiligung von GmuR an der Induktion des Operons durch Cellobiose.

Sadaie *et al.* (2008) wiesen im Northern Blot durch Hybridisierung mit einer *gmuG*-Sonde ein 8 kb langes mRNA-Transkript nach, welches das gesamte *gmu*-Operon abdeckt. Zusätzlich wurden zwei weitere, 2 kb und 1 kb große Banden detektiert. Basierend auf den Daten einer Analyse des Transkriptoms von *B. subtilis* unter verschiedenen Bedingungen wurde innerhalb des Operons ein weiterer, ebenfalls SigA-abhängiger Promotor stromaufwärts von *gmuR* vermutet (Nicolas *et al.*, 2012). Überdies wurde in der DBTBS-Datenbank ein Promotor in der intergenen Region zwischen *gmuA* und *gmuC* annotiert (Sierro *et al.*, 2008).

Die entsprechenden intergenen Regionen wurden mit *lacZ* fusioniert und ektopisch in das Chromosom von *B. subtilis* integriert. *In vivo* konnte jedoch keine signifikante Promotoraktivität gemessen werden, wenn Glucomannan oder Galactomannan als einzige C-Quelle zur Verfügung standen. Darüber hinaus konnte auch *in vitro* mittels EMSA keine Interaktion zwischen dem rekombinanten GmuR-Protein und den DNA-Fragmenten, welche die beiden intergenen Regionen repräsentieren, festgestellt werden. Zusammen mit der Transkriptionsanalyse von Sadaie *et al.* (2008) bestätigen die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse, dass die Gene *gmuBACDREFG* tatsächlich ein Operon bilden.

Die Interaktion von GmuR mit dem P_{*gmuB*}-Fragment bestätigte seine Funktion als Repressor, der die Expression des *gmu*-Operons direkt reguliert. Abhängig von der Konzentration von GmuR bildeten sich zwei unterschiedlich große GmuR-DNA-Komplexe aus. Die DNA-Bande, die dem kleineren Protein-P_{*gmuB*}-Komplex entsprach, wies bei vergleichsweise geringeren GmuR-Konzentrationen eine höhere Intensität auf. Dies spricht gegen eine mögliche kooperative Bindung von GmuR-Monomeren. Bei steigenden Proteinkonzentrationen wurde der kleinere Komplex zunehmend durch den größeren ersetzt, welcher allerdings offenbar weniger stabil war. Um die Struktur der GmuR-DNA-Komplexe genauer aufzuklären, wurde versucht, das Molekulargewicht der nativen Konformation von GmuR zu bestimmen. Jedoch war dies weder bei einer Trennung durch Größenausschluss-

chromatographie noch durch eine Trennung im nativen Polyacrylamid-Gradientengel möglich. Daher können keine Aussagen über den Oligomerisierungszustand von GmuR getroffen werden.

Trotz eines ca. 400-fachen Überschusses an GmuR konnte die freie DNA-Bande nicht vollständig gebunden werden. Sadaie *et al.* (2008) beobachteten nach der Unterbrechung des *gmuA*-Gens eine verringerte Repression des *gmu*-Operons in Abwesenheit eines Induktors. Daher mutmaßten sie, dass GmuR durch das zytoplasmatische GmuA-Protein (EIIA^{Gmu}) als Repressor aktiviert wird, wenn das spezifische PTS-Substrat nicht vorhanden ist. Da GmuR keine PTS-Regulationsdomäne trägt (wie z. B. der Mannitol-Regulator MtlR) (Fujita, 2009; Reizer *et al.*, 1999), ist eine PTS-Phosphorylierung unwahrscheinlich. Möglicherweise wird GmuR jedoch durch eine Interaktion mit phosphoryliertem EIIA^{Gmu} als Repressor aktiviert. Dies könnte die oben beschriebene geringe Bindungsaktivität des Repressors im EMSA erklären.

Um regulatorische Elemente innerhalb des *gmuB*-Promotors zu identifizieren, wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Diese offenbarte, dass die Regulierbarkeit des *gmuB*-Promotors erst dann deutlich eingeschränkt war, wenn die *in silico* postulierte Bindestelle durch die fortschreitende Promotorverkürzung angegriffen wurde. Das 18 bp lange unvollständige Palindrom, welches von Leyn *et al.* (2013) als DNA-Motiv für die Bindung von GmuR vorhergesagt wurde, überdeckt die -35 Region des *gmuB*-Promotors. Eine bereits zuvor aufgetretene leichte Beeinträchtigung der Regulierbarkeit ging mit einer Abnahme der Promotorstärke einher, wie durch die GmuR negative Kontrolle (Δ *gmuR*-Stamm) gezeigt werden konnte. Die angrenzende Region stromaufwärts der entsprechenden Deletion bis zu Position -60 beinhaltet eine A-reiche Sequenzabfolge, bei der es sich um einen Teil eines UP-Elements handeln könnte.

In einem DNase I-*Footprinting*-Experiment schützte GmuR zwei aufeinanderfolgende Bereiche auf dem nicht-codierenden DNA-Strang vor dem Abbau durch die Endonuklease. Versuche, bei denen der komplementäre Strang markiert wurde, lieferten keine auswertbaren Ergebnisse. Eine größere Lücke auf dem untersuchten Strang umfasste den DNA-Abschnitt von ungefähr der Position -56 bis zur

Position -20 (37 nt). Stromabwärts schloss sich ein kleinerer geschützter Abschnitt an, der etwa von der Position -14 bis zur Position -5 (10 nt) reichte. Die identifizierten GmuR-Bindestellen erfassen getrennt voneinander die -35 bzw. die -10 Region und überdecken somit die beiden Kernpromotorelemente. Der durch GmuR geschützte Bereich enthielt die ursprünglich in bioinformatischen Studien ermittelte GmuR-Operatorsequenz. Eine Sequenzanalyse offenbarte eine andere invertierte Sequenzwiederholung mit kleinen Abweichungen (IR1: 5'-TTATAAAAGT-N₄-ACaTTTAaAA-3'; Abweichungen sind in Kleinbuchstaben dargestellt) innerhalb dieser DNA-Region, die ebenfalls als GmuR-Bindestelle dienen könnte. Das Sequenzmotiv wird mit zwei Abweichungen in dem zweiten geschützten Bereich erneut invertiert wiederholt ('IR2: 5'-ACTaTaATAA-3').

Um das DNA-Motiv von GmuR weiter abzuklären, wurden stromabwärts der -35 Region des *gmuB*-Promotors (außerhalb der -10 Region) komplementäre Basensubstitutionen durchgeführt. Die anschließende Analyse mittels β -Galactosidase-Messungen (Miller Assay) zeigte, dass eine Mutation innerhalb der *in silico* postulierten Bindestelle die Regulierbarkeit des Promotors deutlich beeinträchtigte. War ausschließlich die aus den Ergebnissen des DNase I-*Footprinting*-Experiments abgeleitete invertierte Sequenzwiederholung (IR1) betroffen (Mutation am 5'-Ende des Motivs), konnten hingegen keine nennenswerten Auswirkungen auf die Promotoraktivität beobachtet werden. Jedoch verursachte eine Basensubstitution in der zweiten invertierten Wiederholung der Sequenzabfolge im Bereich der -10 Region ('IR2; Mutation am 3'-Ende des Motivs) eine deutlich verringerte Repression des P_{*gmuB*}-Promotors in Abwesenheit des Induktors. Daher ist anzunehmen, dass die 7 bp lange Nukleotidabfolge TAAAAGT und die zwei invertierten Wiederholungen dieser Sequenz eine entscheidende Rolle bei der GmuR-Bindung besitzen.

Bei einem Sequenzvergleich innerhalb der Ordnung Bacillales zeigte sich, dass das gut konservierte DNA-Motiv TAAWWGT auch bei *Bacillus licheniformis* und *Bacillus amyloliquefaciens* außerhalb der *in silico* postulierten GmuR-Bindestelle im *gmuB*-Promotor wiederholt wird (Abbildung 5.3). Die zusätzlichen halben Bindestellen zu einer oder beiden Seiten der eigentlichen Bindestelle haben zu deren Zentrum einen Abstand von 14-26 nt. In *B. licheniformis* überlappt die 7 bp lange Wiederholung ähnlich zu *B. subtilis* ebenfalls mit der mutmaßlichen -10 Region.



Abbildung 5.3 Vergleich der *gmuB*-Promotorsequenzen in der Ordnung Bacillales. Das 7 bp lange konservierte Sequenzmotiv ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das ebenfalls gut konservierte Zentrum der Bindestellen von GntR-ähnlichen Repressoren der HutC-Unterfamilie (GTNTANAC) im Bereich der mutmaßlichen –35 Region ist unterstrichen.

Die Mitglieder der HutC-Unterfamilie der GntR-ähnlichen Repressoren teilen sich ein konserviertes Zentrum innerhalb des Operators mit der Konsensussequenz 5'-GTN₀₋₂taN₀₋₂AC-3', welche von unterschiedlich langen palindromischen Sequenzen umgeben ist (Rigali *et al.*, 2002). Auch die hier innerhalb der GmuR-Bindestelle identifizierte invertierte Sequenzwiederholung IR1 enthält dieses DNA-Motiv. Es überlappt mit der –35 Region und den stromaufwärts vermuteten zusätzlichen positiven regulatorischen Elementen des *gmuB*-Promotors (wird im nächsten Abschnitt genauer erläutert). Daher wurden im Rahmen der Promotorstudien keine Basensubstitutionen in diesen Abschnitt eingebracht. Mittels EMSA-Experimenten mit P_{*gmuB*}-Fragmenten, bei denen diese konservierten Nukleotide mutiert sind, könnte eine Erfordernis dieser Sequenzabfolge für die GmuR-Bindung möglicherweise *in vitro* nachgewiesen werden. Eine Bedeutung der konservierten Basen in der Mitte der Operatorsequenz für die Bindung wurde für den *B. subtilis* HutC/GntR-Repressor FrIR nachgewiesen (Deppe *et al.*, 2011). Für die Bindung des *B. subtilis* Repressors TreR (GntR/HutC-Familie) ist das Vorhandensein von mindestens einer von zwei ähnlichen palindromischen Operatorsequenzen innerhalb des Promotors unerlässlich (Bürklen *et al.*, 1998). Diese beiden Operatoren weisen ebenfalls das konservierte DNA-Motiv auf.

Bei der Deletionsanalyse des *gmuB*-Promotors wurde durch die sukzessive Verkürzung eine kontinuierliche Abnahme der Promotoraktivität beobachtet, die unabhängig von der Bindung des Regulators auftrat. Im *GmuR*-defizienten Stamm nahm die Expressionshöhe nach den zwei Deletionen bis zu den Positionen -52 und -36 jeweils deutlich ab. Dies deutet auf zusätzliche positive regulatorische Elemente stromaufwärts der -35 Region hin und könnte auf das Vorhandensein eines UP-Elements zurückzuführen sein. Murayama *et al.* (2015) führten eine genomweite Studie durch, in welcher sie den Einfluss der α -CTD auf die Genexpression und die RNAP-Rekrutierung untersuchten. In Abwesenheit der α -CTD wurde auch hier eine verringerte Expression von *gmuB*, *gmuA*, *gmuC*, *gmuD* und *gmuF* beobachtet. Bei einem Vergleich der Sequenz stromaufwärts von *gmuB* (Positionen -41 bis -57) mit der Konsensussequenz AAAWWTWTTTTNAAAA wurde ein mutmaßliches UP-Element identifiziert (Murayama *et al.*, 2015).

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die *gmuB*-Expression (zusätzlich) durch die Deletion einer (noch unbekannt)en Bindestelle für *AbrB* beeinträchtigt wurde. Der globale Transkriptionsregulator der Übergangsphase *AbrB* reprimiert während der exponentiellen Wachstumsphase die Expression vieler Gene. Bei der Erstellung eines genomweiten Transkriptionsprofils in der exponentiellen Wachstumsphase wurden aber auch fünf Operons - darunter das *gmu*-Operon – ermittelt, die an der Verwertung von Kohlenhydraten beteiligt sind und durch *AbrB* aktiviert werden (Chumsakul *et al.*, 2011). Daher wird die Expression des *gmu*-Operons möglicherweise ähnlich zu der Ribose-Aufnahme (*rbs*) in *B. subtilis* direkt durch *AbrB* positiv reguliert. Im *rbs*-Promotor bindet *AbrB* an zwei Bereiche, welche die -10 und die -35 Region flankieren, und konkurriert offenbar mit dem *CcpA*-Repressorkomplex um die Bindung an eine überlappende *cre*-Sequenz (Strauch, 1995).

Es war bereits bekannt, dass das *gmu*-Operon in Abwesenheit der extrazellulären Mannanase *GmuG* nur noch durch die mutmaßlichen Abbauprodukte von (Gluco-)Mannan, Mannobiose (D-Mannosyl- β -1,4-D-Mannose) und Cellobiose (D-Glucosyl- β -1,4-D-Glucose) induziert werden kann (Sadaie *et al.*, 2008). Um zu klären, welches Intermediat tatsächlich die Anwesenheit der beiden strukturell ähnlichen Polysaccharide Gluco- und Galactomannan signalisiert, wurden Promotorstudien mit Stoffwechselmutanten durchgeführt.

Die Aktivität von GmuG ist sowohl für die Induktion des *gmuB*-Promotors durch Glucomannan als auch durch LBG notwendig. Die Abbauprodukte der extrazellulären Mannanase werden vermutlich durch ein spezifisches PTS-System aufgenommen, welches ebenfalls durch das Glucomannan-Operon kodiert wird. Der weitere Abbauweg der Produkte von GmuG ist noch nicht genauer untersucht worden. Wahrscheinlich setzt GmuD aus den importierten, vermutlich phosphorylierten β -1,4-Manno-Oligosacchariden endständige D-Mannose (und D-Glucose) frei, die darauffolgend durch GmuE und GmuF zu Mannose-6-Phosphat (M6P) phosphoryliert und dann zu Fructose-6-Phosphat isomerisiert wird. Weder die Deletion des Gens für die postulierte Mannose-Kinase GmuE noch die des Gens für die M6P-Isomerase GmuF wirkten sich auf die Glucomannan- bzw. LBG-induzierte Promotoraktivität aus. In Abwesenheit der angenommenen Phospho- β -Mannosidase GmuD konnte jedoch nach Induktion mit den Heteromannanen jeweils eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte LacZ-Aktivität beobachtet werden.

Demnach handelt es sich bei dem Effektormolekül sehr wahrscheinlich um eines der nach der Aufnahme in die Zelle phosphoryliert vorliegenden Abbauprodukte von GmuG. Diese können nach einer Deletion von GmuD intrazellulär nicht mehr weiter hydrolysiert werden und akkumulieren daher vermutlich. GmuG setzt aus der Glucomannan-Kette vor allem Mannose-Disaccharide frei, in geringen Mengen aber auch Disaccharide aus Glucose und Mannose (Tailford *et al.*, 2009).

Um aufzuklären, ob die potentiellen Effektormoleküle tatsächlich die DNA-Bindfähigkeit von GmuR beeinträchtigen, wurden außerdem erneut EMSA-Experimente mit dem P_{gmuB} -Fragment durchgeführt. Die beiden induzierenden Disaccharide Cellobiose und Mannobiose wirkten der DNA-Bindung nicht entgegen. Übereinstimmend mit den *in vivo* erhaltenen Ergebnissen konnte auch nach Zugabe des mutmaßlichen Reaktionsprodukts der Kinase GmuE, M6P, zur Bindungsreaktion keine Dissoziation der GmuR-DNA-Komplexe beobachtet werden.

Die Hydrolyseprodukte von LBG wurden durch die Verwendung einer rekombinanten *B. subtilis* Mannanase GmuG-His₆ *in vitro* gewonnen und durch Größenausschlusschromatographie (Bio-Gel P-2 Säule, Bio-Rad Laboratories) fraktioniert. Eine *Quadrupol-Time-of-Flight*-(QToF)-Massenspektrometrie-Analyse der Reaktionsprodukte ergab, dass hierbei neben Mannose Oligosaccharide mit einer Kettenlänge von 2-5 erhalten wurden (H. Watzlawick, unveröffentlichte Daten).

Basierend auf den Ergebnissen der *in vivo* Studien wurde angenommen, dass es sich bei dem eigentlichen Induktor um ein GmuG-Hydrolysat von Gluco- bzw. Galactomannan handelt. Daher wurden die gereinigten LBG-Oligosaccharide (Di- bis Pentasaccharid) getestet. Entgegen den Erwartungen beeinflussten auch diese die Bildung des Regulator-DNA-Komplexes nicht. Im Einklang hiermit verursachten diese potentiellen Liganden auch in einem *Thermal Shift Assay* keine veränderte Thermostabilität von GmuR. Darüber hinaus bewirkten auch die monomeren Bausteine von LBG, D-Mannose und D-Galactose, keine Verschiebung der Schmelzkurve von GmuR.

Da die Aufnahme von Zuckern durch das PTS-Transportsystem gewöhnlich nur dann stattfindet, wenn das Substrat gleichzeitig phosphoryliert wird (Postma *et al.*, 1993), liegen die Manno-Oligosaccharide intrazellulär sehr wahrscheinlich phosphoryliert vor. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten daher dadurch zustande kommen, dass eine PTS-Phosphorylierung des Effektors für die Induktion der Genexpression notwendig ist. Aufgrund der Tatsache, dass das Glucomannan-Operon auch durch das Mannose-Disaccharid Mannobiose noch induziert werden kann (Sadaie *et al.*, 2008) und dieses beim Abbau von Glucomannan als Hauptprodukt entsteht (Tailford *et al.*, 2009), handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um das eigentliche Effektormolekül. Der Mannose-Rest am nicht-reduzierenden Ende von Mannobiose wird mutmaßlich während des PTS-Transports analog zum Mannose-System an seinem C6-Atom phosphoryliert (Reizer *et al.*, 1999).

Interessanterweise beobachteten Sadaie *et al.* (2008) zusätzlich auch eine deutliche Induktion durch Cellobiose. Daher ist anzunehmen, dass phosphorylierte Cellobiose ebenfalls als allosterischer Ligand an GmuR bindet. Widersprüchlich zu der Induktion des *gmu*-Operons durch Cellobiose, wird diese offenbar nicht durch die Aktivität von GmuG aus Glucomannan freigesetzt (Tailford *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass GmuG die Zuckersequenz Mannose-Mannose-Mannose/Glucose-Mannose spezifisch erkennt und diese zwischen dem zweiten und dritten Zuckermolekül spaltet (Tailford *et al.*, 2009). Cellobiose könnte jedoch auch bei einer partiellen Zerlegung von Glucomannan durch die beiden extrazellulären *B. subtilis* Enzyme BglC (Cellulase bzw. *Endo*-1,4- β -Glucanase) und LicS/BglS (*Endo*- β -1,3-1,4-Glucanase) (Voigt *et al.*, 2009) entstehen. Es wurde gezeigt, dass manche *Endo*-1,4- β -Glucanasen neben D-Glucose auch D-Mannose in ihrem aktiven Zentrum binden

können und dadurch eine partielle Hydrolyse von Glucomannan bewirken (McCleary *et al.*, 2012).

Die Glucanase LicS zerlegt das β -1,3-1,4-Glucan Lichenin bis zu Penta-, Tetra- und Trisacchariden (Schnetz *et al.*, 1996; Tobisch *et al.*, 1997). Diese werden dann nach einem PTS-katalysierten Transport intrazellulär vermutlich durch eine angenommene 6-Phospho- β -Glucosidase LicH weiter hydrolysiert (Tobisch *et al.*, 1997). Das zugehörige *licBCAH*-Operon, welches unter der Kontrolle des Transkriptionsaktivators LicR steht, kann ebenfalls noch durch das Abbauprodukt Cellobiose induziert werden (Tobisch *et al.*, 1997; Tobisch *et al.*, 1999). Daher ist Cellobiose vermutlich eigentlich ein Intermediat des gleichzeitig induzierten, analogen Abbauwegs von β -Glucanen, das sowohl durch LicR als auch durch GmuR erkannt wird.

Übereinstimmend mit der zuvor aufgestellten Hypothese wird die Aktivität von Mitgliedern der HutC/GntR-Familie häufig durch ein Effektormolekül reguliert, welches ein Phosphat trägt (wie z. B. die phosphorylierten PTS-Zucker Glucosamin-6-Phosphat, N-Acetylglucosamin-6-Phosphat und Trehalose-6-Phosphat) (Gaugué *et al.*, 2014; Resch *et al.*, 2010; Schöck & Dahl, 1996). Es wird vermutet, dass die negative Ladung der Phosphatgruppe des Effektors die Konformationsänderung des Regulators auslöst und dadurch dessen DNA-Bindfähigkeit beeinträchtigt (Resch *et al.*, 2010).

Basierend auf der Kristallstruktur des *B. subtilis* HutC/GntR-Repressors NagR wurde ein Modell für den molekularen Mechanismus der Induktion vorgeschlagen. In diesem induziert der Effektor eine veränderte räumliche Anordnung, durch welche die Distanz zwischen den beiden DNA-Bindedomänen des Homodimers deutlich vergrößert wird. Dies führt dazu, dass die DNA-Bindedomänen nicht mehr gleichzeitig eine DNA-Bindung eingehen können, wodurch die Affinität zur DNA stark (Faktor 10^{-3}) herabgesetzt wird (Fillenberg *et al.*, 2015; Resch *et al.*, 2010).

Die meisten bisher beschriebenen GntR/HutC-Repressoren bilden durch die Interaktion ihrer C-terminalen Domänen Homodimere aus (Jain, 2015). Eine Ausnahme bildet der Regulator TreR, welcher in Lösung Dimere ausbildet, die vermutlich kooperativ an zwei mutmaßliche, 32 bp auseinanderliegende Operatoren binden (Bürklen *et al.*, 1998). Durch die Kristallstruktur konnte eine angenommene Interaktion zwischen zwei Dimeren zum Tetramer bestätigt werden (Rezacova *et al.*, 2007). TreR ist

außerdem Ziel einer CcpA-unabhängigen Katabolitrepression des *tre*-Operons durch Induktor-Ausschluss. Während der Effektor Trehalose-6-Phosphat die DNA-Bindung des Repressor unterbindet, wirkt die gleichzeitige Anwesenheit des Anti-Induktors Glucose-6-Phosphat diesem Mechanismus *in vitro* entgegen (Bürklen *et al.*, 1998). Da Sadaie *et al.* (2008) nach Unterbrechung von *gmuR* eine verminderte Repression durch Glucose beobachteten, könnte die Aktivität von GmuR durch einen ähnlichen Mechanismus reguliert werden. Jedoch führte eine Unterbrechung von *ccpA* offenbar zu einer vollständigen Aufhebung der Repression des *gmuB*-Promotors durch Glucose (Sadaie *et al.*, 2008), was gegen das Vorhandensein eines CcpA-unabhängigen CCR-Mechanismus spricht.

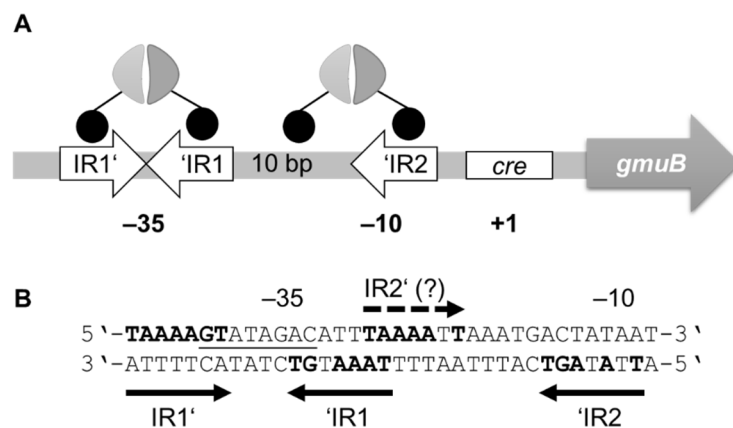


Abbildung 5.4 Modell der Regulation des *gmu*-Operons durch den Repressor GmuR. A) GmuR-Monomere dimerisieren über ihre C-terminalen Effektor- und Oligomerisierungsdomänen (hell- und dunkelgrau für die beiden Untereinheiten) und binden über die zwei N-terminalen DNA-Bindedomänen (schwarz) an die Operatorsequenzen im *gmuB*-Promotor. **B)** Eine 18 bp lange Sequenz (IR1), bestehend aus zwei inversen 7 bp langen Wiederholungen mit geringen Nukleotidabweichungen, überdeckt die -35 Region. In ihrem Zentrum enthält IR1 das konservierte DNA-Motiv der HutC-Familie (GTNTANAC, unterstrichen). Stromabwärts folgt im Bereich der -10 Region eine weitere Wiederholung ('IR2) des 7 bp langen Motivs aus IR1. Es könnte sein, dass 'IR2 zusammen mit der Sequenz TAAAATT (IR2') eine zweite invertierte Sequenzwiederholung bildet. Allerdings variiert der Abstand (5 bp) und die Zentralsequenz fehlt.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und den Eigenschaften der HutC/-GntR-Mitglieder kann ein Modell für die Regulation des *gmu*-Operons aufgestellt werden (Abbildung 5.4). In Abwesenheit eines Induktors unterdrückt GmuR die Expression des Glucomannan-Operons. Das DNase I-Footprinting-Experiment

zeigte, dass durch GmuR ein ausgedehnter Bereich von insgesamt ca. 52 bp innerhalb des Promotors besetzt wird. Demnach bindet GmuR wahrscheinlich entweder als Dimer oder als Tetramer an die DNA. Die invertierte Sequenzwiederholung innerhalb der GmuR-Bindestelle deutet darauf hin, dass es sich bei der gebundenen Form des Transkriptionsfaktors wahrscheinlich um ein Dimer handelt.

Das GmuR-Dimer bindet wahrscheinlich mit hoher Affinität an die IR1-Operatorsequenz, die von beiden DNA-Bindedomänen gebunden wird. Bei eintretender Sättigung des Operators bindet vermutlich ein weiteres GmuR-Dimer mit nur einer DNA-Bindedomäne (und deutlich geringerer Affinität) an den stromabwärts gelegenen halben Operator (IR2), welcher nur die invertierte Sequenzabfolge enthält. Dies würde die Bildung von zwei verschiedenen Komplexen mit unterschiedlicher Mobilität während der Elektrophorese erklären, die bei der Titration der DNA mit dem Repressorprotein entstanden. Da der Regulator auf diese Weise sowohl die -35 als auch die -10 Region abdeckt, ist davon auszugehen, dass die Expression durch sterische Hinderung der RNAP-Bindung unterdrückt wird. Die zusätzliche halbe Bindestelle erlaubt möglicherweise eine Feinabstimmung der Genregulation.

Polysaccharid-Substrate wie Gluco- und Galactomannan können nicht in die Zelle transportiert werden. Bedingt durch eine basale Hintergrundexpression des Operons werden jedoch beständig geringe Mengen der β -Mannanase GmuG in die Umgebung sekretiert. Stehen die Heteromannane zur Verfügung werden diese (zunächst in geringen Mengen) durch Hydrolyse depolymerisiert und über das PTS-System in die Zelle aufgenommen. Phosphorylierte β -Manno-Oligosaccharide mit der richtigen Länge (mutmaßlich Disaccharide) interagieren mit der C-terminalen Effektor-Bindedomäne von GmuR und wirken der DNA-Bindung des Regulators entgegen.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose bindet der CcpA-(P-Ser46-HPr)-Komplex an die *cre*-Sequenz, welche den Transkriptionsstart des ersten Gens (*gmuB*) überdeckt (Marciniak *et al.*, 2012), und verhindert die Expression des Operons (Sadaie *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse einer genetischen Analyse lassen darauf schließen, dass beim Abbau von GM und LBG intrazellulär freie Mannose entsteht. Da Mannose zunächst durch eine Hexokinase phosphoryliert werden muss, um in die Glykolyse eintreten zu können, sollte eine Deletion der mutmaßlichen Mannose-Kinase *GmuE* die Aktivierung des Mannose-Aufnahmesystems forcieren. Hierbei wurde zugrunde gelegt, dass nicht phosphorylierte Mannose durch die Membran diffundieren und dann durch das Mannose-PTS-System erneut aufgenommen und gleichzeitig phosphoryliert werden kann. Es wurde gezeigt, dass der Mannose-Promotor (P_{manP}) tatsächlich nach der Deletion des *gmuE*-Gens durch die Zugabe von Glucomannan oder LBG induziert werden kann.

B. subtilis verwertet D-Galactose über den Leloir-Weg (*galK*, *galT*, *galE*) (Krispin & Allmansberger, 1998b). Die mutmaßlich durch die Aktivität einer noch unbekanntes α -Galactosidase (oder Pullulanase) aus Galactomannan freigesetzten Galactose-Monomere werden daher sehr wahrscheinlich anschließend durch die drei Schlüsselenzyme dieses Abbauweges (Galactokinase *GalK*, Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase *GalT* und UDP-Galactose-4-Epimerase *GalE*) in Glucose-1-Phosphat überführt, welche dann durch Umwandlung zu Glucose-6-Phosphat in die Glykolyse eintreten kann.

Welches Enzym die Galactose-Seitenketten abspaltet, mit denen die Mannan-Hauptketten von Galactomannan über eine α -1,6-glykosidische Bindung substituiert sind, ist bisher jedoch unklar. Je nach Typ spalten α -Galactosidasen vom nichtreduzierenden Kettenende α -1,6-verknüpfte terminale oder interne Galactose-Reste ab (Gilbert *et al.*, 2008). Als Substrate können sowohl Galactose-haltige Oligosaccharide (z. B. Melibiose und Raffinose) als auch hochmolekulare Polysaccharide wie Galactomannan dienen (Anggraeni *et al.*, 2008; Jindou *et al.*, 2002).

Das Genom von *B. subtilis* kodiert für eine angenommene zytoplasmatische NAD⁺-abhängige α -Galactosidase *MelA* (Lapidus *et al.*, 1997). Das Gen liegt in einem Operon, welches auch Gene für ein vermutetes Aufnahmesystem für Melibiose (D-Galactose- α -1,6-D-Glucose) enthält. Möglicherweise ist dieses Enzym auch für die Hydrolyse der Galactose-Seitenketten von Galactomannanen verantwortlich.

Es könnte auch sein, dass eine Pullulanase (*Endo*-1,6- α -Glucosidase) für die Entzweigung von LBG verantwortlich ist, welche eigentlich aktiv gegenüber

Glykogen, Pullulan und/oder Amylopektin ist. Im Chromosom von *B. subtilis* kodieren zwei benachbarte Gene *ytIQ* (gemäß Uniprot-Datenbank www.uniprot.org Ähnlichkeiten zu Pullulanase) und *amyX* für (mutmaßliche) Pullulanasen. Tatsächlich wurde von einer unspezifischen Aktivität der Pullulanase von *Bacillus acidopullulyticus* berichtet, welche die Galactose-Seitenketten von Galactomannan entfernt (Shobha & Tharanathan, 2008).

Angesichts der Genprodukte des *gmu*-Operons und deren Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen mit bekannter Funktion wurde ein Abbauweg von Heteromannanen in *B. subtilis* vorgeschlagen, welcher zwei Phosphorylierungsschritte enthält. Die erste Phosphorylierung des Substrats ist an den PTS-Transport gekoppelt. Nach der intrazellulären Hydrolyse der Manno-Oligosaccharide werden freigesetzte Mannose-Reste dann durch die Mannose-Kinase GmuE an ihrem C6-Atom phosphoryliert.

Die intrazellulären Enzyme, welche die phosphorylierten Intermediate abbauen, wurden einzeln deletiert. Da eine Akkumulation von phosphorylierten Zuckern häufig toxisch wirkt, wurde angenommen, dass eine Abwesenheit der Enzyme GmuD bzw. GmuF geschwollene Zellen (bedingt durch osmotischen Stress) und Zelllyse hervorruft.

Nach der Deletion des Gens für die angenommene Phospho- β -Mannosidase (*gmuD*), welche für die Hydrolyse der Manno-Oligosaccharide verantwortlich ist, konnten moderate Wachstumsdefizite in LB-Flüssigmedium mit Gluco- bzw. Galactomannan beobachtet werden. Es könnte sein, dass eine andere Glykosid-Hydrolase von *B. subtilis* (wie z. B. die Phospho- β -Glucosidase LicH) die importierten Oligosaccharide weiter spalten kann.

Ein Fehlen der Isomerase GmuF, die im Wildtyp M6P umwandelt (Yeom *et al.*, 2009), führte in späteren Phasen des Wachstums mit dem Galactomannan LBG offenbar zur Zelllyse. In Bezug auf das Substrat Glucomannan ist anzumerken, dass negative Auswirkungen der Mutationen auf das Wachstum durch die Freisetzung von Glucose aus diesem sehr wahrscheinlich abgeschwächt werden. Das *gmu*-Operon unterliegt der Katabolitrepression und wird in Gegenwart von Glucose reprimiert (Sadaie *et al.*, 2008).

Wenn die Stämme SH96 ($\Delta gmuD::loxP$) und KM692 ($\Delta gmuF::loxP$) auf LB-Agarplatten angezogen wurden, wurde sowohl in Anwesenheit von Glucomannan als auch von LBG eine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet. Die Deletion des

Gens für die vermutete Mannose-Kinase GmuE hatte, übereinstimmend mit dem zuvor beschriebenen Nebenweg über das Mannose-Aufnahmesystem, keine erkennbaren Auswirkungen auf das Wachstum.

Die Ergebnisse sind nicht eindeutig in Bezug auf die Entstehung von Intermediaten, die aufgrund ihrer Phosphorylierung intrazellulär akkumulieren und toxisch wirken. Da Auswirkungen der eingebrachten Mutationen möglicherweise durch die Nutzung des Mannose-Verwertungssystems umgangen werden können, sollten die Untersuchungen zum Zuckerstress zusätzlich in einem Mannose-negativen Hintergrund durchgeführt werden.

5.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen detaillierten Aufschluss über die beiden Regulationsmechanismen, welche die Verwertung von L-Rhamnose und Glucomannan in *B. subtilis* steuern. Damit schließen sie zwei der wenigen noch übrig gebliebenen Lücken in der Kenntnis über die Funktion und Regulation von Aufnahme- und Verwertungssystemen für PTS- und nicht-PTS Zucker in *B. subtilis*. Innerhalb des Genoms von *B. subtilis* wurden 15 verschiedene zuckerspezifische PTS-Permeasen identifiziert. Experimentelle Daten fehlen nun nur noch für das angenommene N-Acetylmuraminsäure-spezifische PTS-System (*murP*) und das postulierte Fructose-spezifische PTS-System (*fruA*).

6 Literaturverzeichnis

- Alonso-Sande M.**, Teijeiro-Osorio D., Remuñán-López C., Alonso M. J. (2009): Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **72** (2), S. 453–462.
- Altenbuchner J.** (2016): Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. *Applied and environmental microbiology* **82** (17), S. 5421–5427.
- Anagnostopoulos C.**, Spizizen J. (1961): Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81** (5), S. 741–746.
- Anantharaman V.**, Aravind L. (2006): Diversification of catalytic activities and ligand interactions in the protein fold shared by the sugar isomerases, eIF2B, DeoR transcription factors, acyl-CoA transferases and methenyltetrahydrofolate synthetase. *Journal of molecular biology* **356** (3), S. 823–842.
- Anggraeni A. A.**, Sakka M., Kimura T., Ratanakhaokchai K., Kitaoka M., Sakka K. (2008): Characterization of *Bacillus halodurans* alpha-galactosidase Mel4A encoded by the *mel4A* gene (BH2228). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72** (9), S. 2459–2462.
- Aravind L.**, Anantharaman V. (2003): HutC/FarR-like bacterial transcription factors of the GntR family contain a small molecule-binding domain of the chorismate lyase fold. *FEMS microbiology letters* **222** (1), S. 17–23.
- Bais H. P.**, Fall R., Vivanco J. M. (2004): Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology* **134** (1), S. 307–319.
- Baldomà L.**, Aguilar J. (1988): Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *J. Bacteriol.* **170** (1), S. 416–421.
- Baneyx F.**, Mujacic M. (2004): Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology* **22** (11), S. 1399–1408.
- Barbe V.**, Cruveiller S., Kunst F., Lenoble P., Meurice G., Sekowska A., Vallenet D., Wang T., Moszer I., Médigue C., Danchin A. (2009): From a consortium sequence

- to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155** (6), S. 1758–1775.
- Barrière C.**, Veiga-da-Cunha M., Pons N., Guédon E., van Hijum S. A., Kok J., Kuipers O. P., Ehrlich D. S., Renault P. (2005): Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low-GC gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site. *J. Bacteriol.* **187** (11), S. 3752–3761.
- Boer A. S. de**, Diderichsen B. (1991): On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied microbiology and biotechnology* **36** (1), S. 1–4.
- Bradford M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, S. 248–254.
- Branda S. S.**, González-Pastor J. E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. (2001): Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (20), S. 11621–11626.
- Brantl S.**, Licht A. (2010): Characterisation of *Bacillus subtilis* transcriptional regulators involved in metabolic processes. *Current protein & peptide science* **11** (4), S. 274–291.
- Brett C. T.**, Waldron K. W. (1990): Physiology and biochemistry of plant cell walls. *Chapman & Hall, Auflage 1, London.*
- Brückner R.**, Titgemeyer F. (2002): Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS microbiology letters* **209** (2), S. 141–148.
- Burbulys D.**, Trach K. A., Hoch J. A. (1991): Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64** (3), S. 545–552.
- Burkholder P. R.**, Giles N. H. (1947): Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *American journal of botany* **34** (6), S. 345–348.
- Bürklen L.**, Schöck F., Dahl M. K. (1998): Molecular analysis of the interaction between the *Bacillus subtilis* trehalose repressor TreR and the *tre* operator. *Mol. Gen. Genet.* **260** (1), S. 48–55.

- Canosi U.**, Morelli G., Trautner T. A. (1978): The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **166** (3), S. 259–267.
- Chai Y.**, Beaugerard P. B., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. (2012): Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *mBio* **3**(4):e00184-12.
- Chen I.**, Dubnau D. (2004): DNA uptake during bacterial transformation. *Nature reviews. Microbiology* **2** (3), S. 241–249.
- Chiu T. H.**, Feingold D. S. (1964): The purification and properties of L-rhamnulokinase. *Biochimica et biophysica acta* **92** (3), S. 489–497.
- Chumsakul O.**, Takahashi H., Oshima T., Hishimoto T., Kanaya S., Ogasawara N., Ishikawa S. (2011): Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic acids research* **39** (2), S. 414–428.
- Chung C. T.**, Niemela S. L., Miller R. H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** (7), S. 2172–2175.
- Claverys J.-P.**, Martin B., Polard P. (2009): The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS microbiology reviews* **33** (3), S. 643–656.
- Cohn F.** (1872): Untersuchungen über Bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **1**, S. 127–224.
- Cohn F.** (1876): Untersuchungen über Bakterien: IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **2**, S. 249–277.
- Compton S. J.**, Jones C. G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry* **151** (2), S. 369–374.
- Cutting S. M.** (2011): *Bacillus* probiotics. *Food microbiology* **28** (2), S. 214–220.
- Darbon E.**, Servant P., Poncet S., Deutscher J. (2002): Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* *glpFK* expression. *Molecular microbiology* **43** (4), S. 1039–1052.

- Davies G.**, Henrissat B. (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3** (9), S. 853–859.
- Deppe V. M.**, Klatte S., Bongaerts J., Maurer K.-H., O'Connell T., Meinhardt F. (2011): Genetic control of amadori product degradation in *Bacillus subtilis* via regulation of *frlBONMD* expression by FrIR. *Applied and environmental microbiology* **77** (9), S. 2839–2846.
- Deutscher J.**, Saier M. H. (1983): ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80** (22), S. 6790–6794.
- Deutscher J.**, Küster E., Bergstedt U., Charrier V., Hillen W. (1995): Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Molecular microbiology* **15** (6), S. 1049–1053.
- Deutscher J.**, Galinier A., Martin-Verstraete I. (2002): Carbohydrate uptake and metabolism. In: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. (Hrsg.), *ASM Press, Washington, D.C.*, S. 129–150.
- Deutscher J.**, Francke C., Postma P. W. (2006): How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** (4), S. 939–1031.
- Djordjevic G. M.**, Tchieu J. H., Saier M. H. (2001): Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183** (10), S. 3224–3236.
- Dong H.**, Zhang D. (2014): Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species. *Microbial cell factories* **13:63**.
- Dubnau D.** (1999): DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology* **53**, S. 217–244.
- Earl A. M.**, Losick R., Kolter R. (2008): Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology* **16** (6), S. 269–275.
- Egan S. M.**, Schleif R. F. (1993): A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*. *Journal of molecular biology* **234** (1), S. 87–98.

- Ehrenberg C. G. (1835):** Dritter Beitrag zur Erkenntnis großer Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Physikalische Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833-1835*, S. 143–336.
- Ellermeier C. D., Hobbs E. C., Gonzalez-Pastor J. E., Losick R. (2006):** A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell* **124** (3), S. 549–559.
- Fabret C., Feher V. A., Hoch J. A. (1999):** Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *Journal of bacteriology* **181** (7), S. 1975–1983.
- Fehér T., Papp B., Pal C., Pósfai G. (2007):** Systematic genome reductions: theoretical and experimental approaches. *Chemical reviews* **107** (8), S. 3498–3513.
- Fillenberg S. B., Grau F. C., Seidel G., Muller Y. A. (2015):** Structural insight into operator *dre*-sites recognition and effector binding in the GntR/HutC transcription regulator NagR. *Nucleic acids research* **43** (2), S. 1283–1296.
- Frischauf A. M., Lehrach H., Poustka A., Murray N. (1983):** Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *Journal of molecular biology* **170** (4), S. 827–842.
- Fuchs, G., H. G. Schlegel (Hrsg.) (2007):** Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme, Auflage 8, Stuttgart*.
- Fujita M., González-Pastor J. E., Losick R. (2005):** High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **187** (4), S. 1357–1368.
- Fujita Y. (2009):** Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **73** (2), S. 245–259.
- Galinier A., Haiech J., Kilhoffer M. C., Jaquinod M., Stülke J., Deutscher J., Martin-Verstraete I. (1997):** The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94** (16), S. 8439–8444.
- Garces F., Fernández F. J., Gómez A. M., Pérez-Luque R., Campos E., Prohens R., Aguilar J., Baldomà L., Coll M., Badía J., Vega M. C. (2008):** Quaternary structural

- transitions in the DeoR-type repressor UlaR control transcriptional readout from the L-ascorbate utilization regulon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **47** (44), S. 11424–11433.
- Gärtner D.**, Geissendörfer M., Hillen W. (1988): Expression of the *Bacillus subtilis* xyl operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J. Bacteriol.* **170** (7), S. 3102–3109.
- Gaugué I.**, Oberto J., Plumbridge J. (2014): Regulation of amino sugar utilization in *Bacillus subtilis* by the GntR family regulators, NagR and GamR. *Molecular microbiology* **92** (1), S. 100–115.
- Gibson D. G.**, Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6** (5), S. 343–345.
- Gilbert H. J.**, Stålbrand H., Brumer H. (2008): How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Current opinion in plant biology* **11** (3), S. 338–348.
- Giraud M. F.**, Naismith J. H. (2000): The rhamnose pathway. *Current opinion in structural biology* **10** (6), S. 687–696.
- González-Pastor J. E.**, Hobbs E. C., Losick R. (2003): Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301** (5632), S. 510–513.
- Görke B.**, Fraysse L., Galinier A. (2004): Drastic differences in Crh and HPr synthesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **186** (10), S. 2992–2995.
- Graf N.**, Altenbuchner J. (2013): Functional characterization and application of a tightly regulated MekR/P_{mekA} expression system in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (18), S. 8239–8251.
- Greenberg D. B.**, Stülke J., Saier M. H. (2002): Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Research in microbiology* **153** (8), S. 519–526.
- Grossman A. D.** (1995): Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics* **29**, S. 477–508.

- Grueninger D.**, Schulz G. E. (2007): Substrate spectrum of L-rhamnulose kinase related to models derived from two ternary complex structures. *FEBS letters* **581** (16), S. 3127–3130.
- Haldenwang W. G.**, Banner C. D., Ollington J. F., Losick R., Hoch J. A., O'Connor M. B., Sonenshein A. L. (1980): Mapping a cloned gene under sporulation control by insertion of a drug resistance marker into the *Bacillus subtilis* chromosome. *Journal of bacteriology* **142** (1), S. 90–98.
- Hamoen L. W.**, Venema G., Kuipers O. P. (2003): Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149** (1), S. 9–17.
- Harwood C. R.** (1992): *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in biotechnology* **10** (7), S. 247–256.
- Haydon D. J.**, Guest J. R. (1991): A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS microbiology letters* **63** (2-3), S. 291–295.
- Henkin T. M.**, Grundy F. J., Nicholson W. L., Chambliss G. H. (1991): Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Molecular microbiology* **5** (3), S. 575–584.
- Henrissat B.** (1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal* **280** (2), S. 309–316.
- Heravi K. M.**, Wenzel M., Altenbuchner J. (2011): Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: Requirements of its use in expression vectors. *Microbial cell factories* **10**:83.
- Hirooka K.**, Edahiro T., Kimura K., Fujita Y. (2012): Direct and indirect regulation of the *ycnKJI* operon involved in copper uptake through two transcriptional repressors, YcnK and CsoR, in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **194** (20), S. 5675–5687.
- Hirooka K.**, Kodoi Y., Satomura T., Fujita Y. (2016): Regulation of the *rhaEWRBMA* operon involved in L-rhamnose catabolism through two transcriptional factors, RhaR and CcpA, in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **198** (5), S. 830–845.
- Hoffmann J.**, Bóna-Lovász J., Beuttler H., Altenbuchner J. (2012): *In vivo* and *in vitro* studies on the carotenoid cleavage oxygenases from *Sphingopyxis alaskensis*

- RB2256 and *Plesiocystis pacifica* SIR-1 revealed their substrate specificities and non-retinal-forming cleavage activities. *The FEBS journal* **279** (20), S. 3911–3924.
- Hoffmann J.**, Altenbuchner J. (2015): Functional characterization of the mannitol promoter of *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 and its application for a mannitol-inducible expression system for *Pseudomonas putida* KT2440. *PloS one* **10(7):e0133248**.
- Hong H. A.**, Khaneja R., Tam N. M., Cazzato A., Tan S., Urdaci M., Brisson A., Gasbarrini A., Barnes I., Cutting S. M. (2009): *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology* **160** (2), S. 134–143.
- Hu J.**, Zhao L., Yang M. (2015): A GntR family transcription factor positively regulates mycobacterial isoniazid resistance by controlling the expression of a putative permease. *BMC microbiology* **15:214**.
- Inácio J. M.**, Sá-Nogueira I. de (2007): *Trans*-acting factors and *cis* elements involved in glucose repression of arabinan degradation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189** (22), S. 8371–8376.
- Inácio J. M.**, Sá-Nogueira I. de (2008): Characterization of *abn2* (*yxiA*), encoding a *Bacillus subtilis* GH43 arabinanase, Abn2, and its role in arabino-polysaccharide degradation. *J. Bacteriol.* **190** (12), S. 4272–4280.
- Inácio J. M.**, Correia I. L., Sá-Nogueira I. de (2008): Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **154** (9), S. 2719–2729.
- Itoh T.**, Ochiai A., Mikami B., Hashimoto W., Murata K. (2006): A novel glycoside hydrolase family 105: the structure of family 105 unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with a disaccharide in comparison with family 88 enzyme complexed with the disaccharide. *Journal of molecular biology* **360** (3), S. 573–585.
- Jain D.** (2015): Allosteric control of transcription in GntR family of transcription regulators: a structural overview. *IUBMB life* **67** (7), S. 556–563.
- Jeske M.**, Altenbuchner J. (2010): The *Escherichia coli* rhamnose promoter *rhaP_{BAD}* is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85** (6), S. 1923–1933.

- Jiang M.**, Shao W., Perego M., Hoch J. A. (2000): Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* **38** (3), S. 535–542.
- Jindou S.**, Karita S., Fujino E., Fujino T., Hayashi H., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (2002): Alpha-Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *J. Bacteriol.* **184** (2), S. 600–604.
- Joyet P.**, Derkaoui M., Poncet S., Deutscher J. (2010): Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Molecular microbiology* **76** (5), S. 1279–1294.
- Katsuraya K.**, Okuyama K., Hatanaka K., Oshima R., Sato T., Matsuzaki K. (2003): Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **53** (2), S. 183–189.
- Kessler G.**, Nickerson W. J. (1959): Glucomannan-protein complexes from cell walls of yeasts. *The Journal of biological chemistry* **234**, S. 2281–2285.
- Kolin A.**, Balasubramaniam V., Skredenske J. M., Wickstrum J. R., Egan S. M. (2008): Differences in the mechanism of the allosteric L-rhamnose responses of the AraC/XylS family transcription activators RhaS and RhaR. *Molecular microbiology* **68** (2), S. 448–461.
- Koo B.-M.**, Kritikos G., Farelli J. D., Todor H., Tong K., Kimsey H., Wapinski I., Galardini M., Cabal A., Peters J. M., Hachmann A.-B., Rudner D. Z., Allen K. N., Typas A., Gross C. A. (2017): Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell systems* **4** (3), S. 291-305.
- Krispin O.**, Allmansberger R. (1998a): The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. *Journal of bacteriology* **180** (12), S. 3250–3252.
- Krispin O.**, Allmansberger R. (1998b): The *Bacillus subtilis* *galE* gene is essential in the presence of glucose and galactose. *Journal of bacteriology* **180** (8), S. 2265–2270.
- Kroemer M.**, Merkel I., Schulz G. E. (2003): Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry* **42** (36), S. 10560–10568.

Krüger S., Gertz S., Hecker M. (1996): Transcriptional analysis of *bgIPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **178** (9), S. 2637–2644.

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C. V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S. K., Cordani J. J., Connerton I. F., Cummings N. J., Daniel R. A., Denziot F., Devine K. M., Düsterhöft A., Ehrlich S. D., Emmerson P. T., Entian K. D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S. Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E. J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B. J., Haga K., Haiech J., Harwood C. R., Hènaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M. F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S. M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mauël C., Médigue C., Medina N., Mellado R. P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S. H., Parro V., Pohl T. M., Portelle D., Porwollik S., Prescott A. M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S. J., Serror P., Shin B. S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Togoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandebol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H. F., Zumstein E., Yoshikawa H., Danchin A. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390** (6657), S. 249–256.

Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), S. 680–685.

Laniel M. A., Béliveau A., Guérin S. L. (2001): Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* **148**, S. 13–30.

- Lapidus A.**, Galleron N., Sorokin A., Ehrlich S. D. (1997): Sequencing and functional annotation of the *Bacillus subtilis* genes in the 200 kb *rrnB-dnaB* region. *Microbiology* **143**(11), S. 3431–3441.
- Larson T. J.**, Ye S., Weissenborn D. L., Hoffmann H. J., Schweizer H. (1987): Purification and characterization of the repressor for the *sn*-glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K12. *The Journal of biological chemistry* **262** (33), S. 15869–15874.
- Lee S. Y.**, Rasheed S. (1990): A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *BioTechniques* **9** (6), S. 676–679.
- Leyn S. A.**, Kazanov M. D., Sernova N. V., Ermakova E. O., Novichkov P. S., Rodionov D. A. (2013): Genomic reconstruction of the transcriptional regulatory network in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **195** (11), S. 2463–2473.
- Lindner C.**, Galinier A., Hecker M., Deutscher J. (1999): Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. *Molecular microbiology* **31** (3), S. 995–1006.
- Liu L.**, Liu Y., Shin H.-D., Chen R. R., Wang N. S., Li J., Du G., Chen J. (2013): Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (14), S. 6113–6127.
- Liu S.**, Endo K., Ara K., Ozaki K., Ogasawara N. (2008): Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the AraR repressor and the *ara* promoter. *Microbiology* **154** (9), S. 2562–2570.
- Li W.**, Zhou X., Lu P. (2004): Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Research in microbiology* **155** (8), S. 605–610.
- López D.**, Vlamakis H., Losick R., Kolter R. (2009a): Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & development* **23** (14), S. 1631–1638.
- López D.**, Fischbach M. A., Chu F., Losick R., Kolter R. (2009b): Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** (1), S. 280–285.

- Maeda M.**, Shimahara H., Sugiyama N. (1980): Detailed examination of the branched structure of konjac glucomannan. *Agricultural and Biological Chemistry* **44** (2), S. 245–252.
- Magnuson R.**, Solomon J., Grossman A. D. (1994): Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* **77** (2), S. 207–216.
- Marciniak B. C.**, Pabijaniak M., Jong A. de, Dühring R., Seidel G., Hillen W., Kuipers O. P. (2012): High- and low-affinity *cre* boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics* **13:401**.
- McCleary B. V.**, Clark A. H., Dea I. C.M., Rees D. A. (1985): The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research* **139**, S. 237–260.
- McCleary B. V.**, McKie V., Draga A. (2012): Measurement of *endo*-1,4- β -glucanase. *Methods in enzymology* **510**, S. 1–17.
- Meyer D.**, Schneider-Fresenius C., Horlacher R., Peist R., Boos W. (1997): Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **179** (4), S. 1298–1306.
- Michna R. H.**, Zhu B., Mäder U., Stülke J. (2016): SubtiWiki 2.0--an integrated database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* **44** (D1), S. D654-62.
- Miller J. H.** (1972): Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Mistou M. Y.**, Sutcliffe I. C., van Sorge, N. M. (2016): Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews* **40**, S. 464–479.
- Miwa Y.**, Saikawa M., Fujita Y. (1994): Possible function and some properties of the CcpA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140** (10), S. 2567–2575.
- Miwa Y.**, Nakata A., Ogiwara A., Yamamoto M., Fujita Y. (2000): Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* **28** (5), S. 1206–1210.
- Mohamed H. I.**, Gomaa E. Z. (2012): Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of

- radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica* **50** (2), S. 263–272.
- Monedero V.**, Poncet S., Mijakovic I., Fieulaine S., Dossonnet V., Martin-Verstraete I., Nessler S., Deutscher J. (2001): Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *The EMBO journal* **20** (15), S. 3928–3937.
- Moralejo P.**, Egan S. M., Hidalgo E., Aguilar J. (1993): Sequencing and characterization of a gene cluster encoding the enzymes for L-rhamnose metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175** (17), S. 5585–5594.
- Moreira L. R.**, Filho E. X. (2008): An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology* **79** (2), S. 165–178.
- Moreno M. S.**, Schneider B. L., Maile R. R., Weyler W., Saier M. H. (2001): Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: Novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Molecular microbiology* **39** (5), S. 1366–1381.
- Mortensen L.**, Dandanell G., Hammer K. (1989): Purification and characterization of the *deoR* repressor of *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **8** (1), S. 325–331.
- Motejadded H.**, Altenbuchner J. (2007): Integration of a lipase gene into the *Bacillus subtilis* chromosome: recombinant strains without antibiotic resistance marker. *IJB* **5** (2), S. 105–109.
- Muiry J. A.**, Gunn T. C., McDonald T. P., Bradley S. A., Tate C. G., Henderson P. J. (1993): Proton-linked L-rhamnose transport, and its comparison with L-fucose transport in Enterobacteriaceae. *The Biochemical journal* **290** (3), S. 833–842.
- Murayama S.**, Ishikawa S., Chumsakul O., Ogasawara N., Oshima T. (2015): The role of α -CTD in the genome-wide transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* cells. *PLoS one* **10**(7):e0131588.
- Nakano M. M.**, Zuber P. (1998): Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual review of microbiology* **52**, S. 165–190.
- Niaudet B.**, Goze A., Ehrlich S. D. (1982): Insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis*: mechanism and use in gene cloning. *Gene* **19** (3), S. 277–284.

- Nicholson W. L.**, Munakata N., Horneck G., Melosh H. J., Setlow P. (2000): Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (3), S. 548–572.
- Nicolas P.**, Mäder U., Dervyn E., Rochat T., Leduc A., Pigeonneau N., Bidnenko E., Marchadier E., Hoebeke M., Aymerich S., Becher D., Bisicchia P., Botella E., Delumeau O., Doherty G., Denham E. L., Fogg M. J., Fromion V., Goelzer A., Hansen A., Härtig E., Harwood C. R., Homuth G., Jarmer H., Jules M., Klipp E., Le Chat L., Lecointe F., Lewis P., Liebermeister W., March A., Mars R. A., Nannapaneni P., Noone D., Pohl S., Rinn B., Rügheimer F., Sappa P. K., Samson F., Schaffer M., Schwikowski B., Steil L., Stülke J., Wiegert T., Devine K. M., Wilkinson A. J., van Dijl J. M., Hecker M., Völker U., Bessières P., Noirot P. (2012): Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335** (6072), S. 1103–1106.
- Nishinari K.**, Williams P. A., Phillips G. O. (1992): Review of the physico-chemical characteristics and properties of konjac mannan. *Food Hydrocolloids* **6** (2), S. 199–222.
- Nocek B.**, Stein A. J., Jedrzejczak R., Cuff M. E., Li H., Volkart L., Joachimiak A. (2011): Structural studies of ROK fructokinase YdhR from *Bacillus subtilis*: insights into substrate binding and fructose specificity. *Journal of molecular biology* **406** (2), S. 325–342.
- Novichkov P. S.**, Laikova O. N., Novichkova E. S., Gelfand M. S., Arkin A. P., Dubchak I., Rodionov D. A. (2010): RegPrecise: a database of curated genomic inferences of transcriptional regulatory interactions in prokaryotes. *Nucleic acids research* **38**, S. D111-8.
- Ochiai A.**, Itoh T., Kawamata A., Hashimoto W., Murata K. (2007): Plant cell wall degradation by saprophytic *Bacillus subtilis* strains: gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Applied and environmental microbiology* **73** (12), S. 3803–3813.
- Ongena M.**, Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.-L., Thonart P. (2007): Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology* **9** (4), S. 1084–1090.

- Peypoux F.**, Bonmatin J. M., Wallach J. (1999): Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied microbiology and biotechnology* **51** (5), S. 553–563.
- Poolman B.**, Knol J., Mollet B., Nieuwenhuis B., Sulter G. (1995): Regulation of bacterial sugar-H⁺ symport by phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I/HPr-mediated phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (3), S. 778–782.
- Postma P. W.**, Lengeler J. W., Jacobson G. R. (1993): Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews* **57** (3), S. 543–594.
- Power J.** (1967): The L-rhamnose genetic system in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **55** (3), S. 557–568.
- Provvedi R.**, Dubnau D. (1999): ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* **31** (1), S. 271–280.
- Provvedi R.**, Chen I., Dubnau D. (2001): NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* **40** (3), S. 634–644.
- Rahmer R.**, Morabbi Heravi K., Altenbuchner J. (2015): Construction of a super-competent *Bacillus subtilis* 168 using the P_{mtlA}-comKS inducible cassette. *Front Microbiol* **6**:1431.
- Ramström H.**, Sanglier S., Leize-Wagner E., Philippe C., van Dorsselaer A., Haiech J. (2003): Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **278** (2), S. 1174–1185.
- Reizer J.**, Hoischen C., Titgemeyer F., Rivolta C., Rabus R., Stülke J., Karamata D., Saier M. H., Hillen W. (1998): A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular microbiology* **27** (6), S. 1157–1169.
- Reizer J.**, Bachem S., Reizer A., Arnaud M., Saier M. H., Stülke J. (1999): Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145** (12), S. 3419–3429.
- Resch M.**, Schiltz E., Titgemeyer F., Muller Y. A. (2010): Insight into the induction mechanism of the GntR/HutC bacterial transcription regulator YvoA. *Nucleic acids research* **38** (7), S. 2485–2497.

- Rezacova P.**, Krejcirikova V., Borek D., Moy S. F., Joachimiak A., Otwinowski Z. (2007): The crystal structure of the effector-binding domain of the trehalose repressor TreR from *Bacillus subtilis* 168 reveals a unique quarternary assembly. *Proteins* **69** (3), S. 679–682.
- Ridley B. L.**, O'Neill M. A., Mohnen D. (2001): Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57** (6), S. 929–967.
- Rigali S.**, Derouaux A., Giannotta F., Dusart J. (2002): Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *The Journal of biological chemistry* **277** (15), S. 12507–12515.
- Rodionova I. A.**, Li X., Thiel V., Stolyar S., Stanton K., Fredrickson J. K., Bryant D. A., Osterman A. L., Best A. A., Rodionov D. A. (2013): Comparative genomics and functional analysis of rhamnose catabolic pathways and regulons in bacteria. *Front Microbiol* **4:407**.
- Rosenberg M.**, Court D. (1979): Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annual review of genetics* **13**, S. 319–353.
- Rudrappa T.**, Czymmek K. J., Paré P. W., Bais H. P. (2008): Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology* **148** (3), S. 1547–1556.
- Ryu K.-S.**, Kim C., Kim I., Yoo S., Choi B.-S., Park C. (2004): NMR application probes a novel and ubiquitous family of enzymes that alter monosaccharide configuration. *The Journal of biological chemistry* **279** (24), S. 25544–25548.
- Ryu K.-S.**, Kim J.-I., Cho S.-J., Park D., Park C., Cheong H.-K., Lee J.-O., Choi B.-S. (2005): Structural insights into the monosaccharide specificity of *Escherichia coli* rhamnose mutarotase. *Journal of molecular biology* **349** (1), S. 153–162.
- Sadaie Y.**, Yata K., Fujita M., Sagai H., Itaya M., Kasahara Y., Ogasawara N. (1997): Nucleotide sequence and analysis of the *phoB-rrnE-groESL* region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiology* **143** (6), S. 1861–1866.
- Sadaie Y.**, Nakadate H., Fukui R., Yee L. M., Asai K. (2008): Glucomannan utilization operon of *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology letters* **279** (1), S. 103–109.

- Sá-Nogueira I., Ramos S. S. (1997):** Cloning, functional analysis, and transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *araE* gene involved in L-arabinose utilization. *Journal of bacteriology* **179** (24), S. 7705–7711.
- Schmidt T. G., Skerra A. (2007):** The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2** (6), S. 1528–1535.
- Schmiedel D., Hillen W. (1996):** A *Bacillus subtilis* 168 mutant with increased xylose uptake can utilize xylose as sole carbon source. *FEMS microbiology letters* **135** (2-3), S. 175–178.
- Schnetzer K., Stülke J., Gertz S., Krüger S., Krieg M., Hecker M., Rak B. (1996):** LicT, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator protein of the BglG family. *J. Bacteriol.* **178** (7), S. 1971–1979.
- Schöck F., Dahl M. K. (1996):** Expression of the *tre* operon of *Bacillus subtilis* 168 is regulated by the repressor TreR. *Journal of bacteriology* **178** (15), S. 4576–4581.
- Schumacher M. A., Seidel G., Hillen W., Brennan R. G. (2006):** Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation. *The Journal of biological chemistry* **281** (10), S. 6793–6800.
- Schumacher M. A., Seidel G., Hillen W., Brennan R. G. (2007):** Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *Journal of molecular biology* **368** (4), S. 1042–1050.
- Schumacher M. A., Sprehe M., Bartholomae M., Hillen W., Brennan R. G. (2011):** Structures of carbon catabolite protein A-(HPr-Ser46-P) bound to diverse catabolite response element sites reveal the basis for high-affinity binding to degenerate DNA operators. *Nucleic acids research* **39** (7), S. 2931–2942.
- Seidel G., Diel M., Fuchsbaumer N., Hillen W. (2005):** Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *The FEBS journal* **272** (10), S. 2566–2577.
- Setlow B., Cabrera-Hernandez A., Cabrera-Martinez R. M., Setlow P. (2004):** Identification of aryl-phospho-beta-D-glucosidases in *Bacillus subtilis*. *Archives of microbiology* **181** (1), S. 60–67.

- Shimotsu H.**, Henner D. J. (1986): Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the *trp* operon of *Bacillus subtilis*. *Gene* **43** (1-2), S. 85–94.
- Shobha M. S.**, Tharanathan R. N. (2008): Nonspecific activity of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase on debranching of guar galactomannan. *Journal of agricultural and food chemistry* **56** (22), S. 10858–10864.
- Siala A.**, Hill I. R., Gray T. R. (1974): Populations of spore-forming bacteria in an acid forest soil, with special reference to *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* **81** (1), S. 183–190.
- Sierro N.**, Makita Y., Hoon M. de, Nakai K. (2008): DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. *Nucleic acids research* **36**, S. D93-6.
- Silveira J. L.**, Bresolin T. M. (2011): Pharmaceutical use of galactomannans. *Quím. Nova* **34** (2), S. 292–299.
- Singh K. D.**, Schmalisch M. H., Stülke J., Görke B. (2008): Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J. Bacteriol.* **190** (21), S. 7275–7284.
- Skarlatos P.**, Dahl M. K. (1998): The glucose kinase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180** (12), S. 3222–3226.
- Sonenshein A. L.** (2007): Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews. Microbiology* **5** (12), S. 917–927.
- Spizizen J.** (1958): Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **44** (10), S. 1072–1078.
- Srivastava M.**, Kapoor V. P. (2005): Seed galactomannans: an overview. *Chemistry & biodiversity* **2** (3), S. 295–317.
- Srivastava P. K.**, Panwar D., Prashanth K. V., Kapoor M. (2017): Structural characterization and *in vitro* fermentation of β -mannooligosaccharides produced from locust bean gum by GH-26 *endo*- β -1,4-mannanase (ManB-1601). *Journal of agricultural and food chemistry* **65** (13), S. 2827–2838.
- Stragier P.**, Losick R. (1996): Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics* **30**, S. 297-41.

- Strauch M. A. (1995):** AbrB modulates expression and catabolite repression of a *Bacillus subtilis* ribose transport operon. *J. Bacteriol.* **177** (23), S. 6727–6731.
- Stülke J., Hillen W. (2000):** Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annual review of microbiology* **54**, S. 849–880.
- Stülke J. (2002):** Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Archives of microbiology* **177** (6), S. 433–440.
- Sun T., Altenbuchner J. (2010):** Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192** (8), S. 2128–2139.
- Sun T. (2010):** Regulation des Mannose-Operons in *Bacillus subtilis*. Dissertation am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart.
- Swint-Kruse L., Matthews K. S. (2009):** Allostery in the LacI/GalR family: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.* **12** (2), S. 129–137.
- Tailford L. E., Ducros V. M.-A., Flint J. E., Roberts S. M., Morland C., Zechel D. L., Smith N., Bjørnvad M. E., Borchert T. V., Wilson K. S., Davies G. J., Gilbert H. J. (2009):** Understanding how diverse beta-mannanases recognize heterogeneous substrates. *Biochemistry* **48** (29), S. 7009–7018.
- Takami H., Takaki Y., Uchiyama I. (2002):** Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic acids research* **30** (18), S. 3927–3935.
- Tam N. K., Uyen N. Q., Hong H. A., Le Duc H., Hoa T. T., Serra C. R., Henriques A. O., Cutting S. M. (2006):** The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.* **188** (7), S. 2692–2700.
- Tate C. G., Muiry J. A., Henderson P. J. (1992):** Mapping, cloning, expression, and sequencing of the *rhaT* gene, which encodes a novel L-rhamnose-H⁺ transport protein in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **267** (10), S. 6923–6932.
- Terpe K. (2006):** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* **72** (2), S. 211–222.

- Tobin J. F., Schleif R. F. (1987):** Positive regulation of the *Escherichia coli* L-rhamnose operon is mediated by the products of tandemly repeated regulatory genes. *Journal of molecular biology* **196** (4), S. 789–799.
- Tobin J. F., Schleif R. F. (1990):** Transcription from the *rha* operon p_{sr} promoter. *Journal of molecular biology* **211** (1), S. 1–4.
- Tobisch S., Glaser P., Krüger S., Hecker M. (1997):** Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179** (2), S. 496–506.
- Tobisch S., Stülke J., Hecker M. (1999):** Regulation of the *lic* operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis. *Journal of bacteriology* **181** (16), S. 4995–5003.
- van Hijum S. A., Medema M. H., Kuipers O. P. (2009):** Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73** (3), S. 481-509.
- Vía P., Badía J., Baldomà L., Obradors N., Aguilar J. (1996):** Transcriptional regulation of the *Escherichia coli rhaT* gene. *Microbiology* **142(7)**, S. 1833–1840.
- Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R., Kolter R. (2013):** Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature reviews. Microbiology* **11** (3), S. 157–168.
- Voigt B., Antelmann H., Albrecht D., Ehrenreich A., Maurer K.-H., Evers S., Gottschalk G., van Dijl J. M., Schweder T., Hecker M. (2009):** Cell physiology and protein secretion of *Bacillus licheniformis* compared to *Bacillus subtilis*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **16** (1-2), S. 53–68.
- Vos W. M. de, Venema G., Canosi U., Trautner T. A. (1981):** Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **181** (4), S. 424–433.
- Wang C., Lee J., Deng Y., Tao F., Zhang L.-H. (2012):** ARF-TSS: an alternative method for identification of transcription start site in bacteria. *BioTechniques* **52** (4).
- Warner J. B., Lolkema J. S. (2003):** A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology letters* **220** (2), S. 277–280.

- Warth L.**, Altenbuchner J. (2013): A new site-specific recombinase-mediated system for targeted multiple genomic deletions employing chimeric *loxP* and *mvpS* sites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (15), S. 6845–6856.
- Weickert M. J.**, Chambliss G. H. (1990): Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (16), S. 6238–6242.
- Wenzel M.**, Müller A., Siemann-Herzberg M., Altenbuchner J. (2011): Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Applied and environmental microbiology* **77** (18), S. 6419–6425.
- Wenzel M.**, Altenbuchner J. (2013): The *Bacillus subtilis* mannose regulator, ManR, a DNA-binding protein regulated by HPr and its cognate PTS transporter ManP. *Molecular microbiology* **88** (3), S. 562–576.
- Wenzel M.**, Altenbuchner J. (2015): Development of a markerless gene deletion system for *Bacillus subtilis* based on the mannose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Microbiology* **161** (10), S. 1942–1949.
- Westbrook A. W.**, Moo-Young M., Chou C. P. (2016): Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* **82** (16), S. 4876–4895.
- Wickstrum J. R.**, Santangelo T. J., Egan S. M. (2005): Cyclic AMP receptor protein and RhaR synergistically activate transcription from the L-rhamnose-responsive *rhaSR* promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187** (19), S. 6708–6718.
- Wilson D. M.**, Aji S. (1957): Metabolism of L-rhamnose by *Escherichia coli*: II. The phosphorylation of L-rhamnulose. *J. Bacteriol.* **73** (3), S. 415–420.
- Winther-Larsen H. C.**, Josefsen K. D., Brautaset T., Valla S. (2000): Parameters affecting gene expression from the *P_m* promoter in gram-negative bacteria. *Metabolic engineering* **2** (2), S. 79–91.
- Yadav T.**, Carrasco B., Myers A. R., George N. P., Keck J. L., Alonso J. C. (2012): Genetic recombination in *Bacillus subtilis*: a division of labor between two single-strand DNA-binding proteins. *Nucleic acids research* **40** (12), S. 5546–5559.

- Yadav T.**, Carrasco B., Serrano E., Alonso J. C. (2014): Roles of *Bacillus subtilis* DprA and SsbA in RecA-mediated genetic recombination. *The Journal of biological chemistry* **289** (40), S. 27640–27652.
- Yadav V.**, Yadav P. K., Yadav S., Yadav K.D.S. (2010): α -L-Rhamnosidase: a review. *Process Biochemistry* **45** (8), S. 1226–1235.
- Yamane K.**, Bunai K., Kakeshita H. (2004): Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **68** (10), S. 2007–2023.
- Yanisch-Perron C.**, Vieira J., Messing J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1), S. 103–119.
- Yano K.**, Mien Y. L., Sadaie Y., Asai K. (2011): *Bacillus subtilis* RNA polymerase incorporates digoxigenin-labeled nucleotide *in vitro*. *The Journal of general and applied microbiology* **57** (3), S. 153–157.
- Yeom S.-J.**, Ji J.-H., Kim N.-H., Park C.-S., Oh D.-K. (2009): Substrate specificity of a mannose-6-phosphate isomerase from *Bacillus subtilis* and its application in the production of L-ribose. *Applied and environmental microbiology* **75** (14), S. 4705–4710.
- Yoshida H.**, Yoshihara A., Teraoka M., Yamashita S., Izumori K., Kamitori S. (2013): Structure of L-rhamnose isomerase in complex with L-rhamnopyranose demonstrates the sugar-ring opening mechanism and the role of a substrate sub-binding site. *FEBS open bio* **3**, S. 35–40.
- Yoshida K. I.**, Shibayama T., Aoyama D., Fujita Y. (1999): Interaction of a repressor and its binding sites for regulation of the *Bacillus subtilis* *iol* divergon. *Journal of molecular biology* **285** (3), S. 917–929.
- Yoshida K. I.**, Yamamoto Y., Omae K., Yamamoto M., Fujita Y. (2002): Identification of two *myo*-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184** (4), S. 983–991.
- Yoshida K. I.**, Yamaguchi M., Morinaga T., Kinehara M., Ikeuchi M., Ashida H., Fujita Y. (2008): *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **283** (16), S. 10415–10424.

7 Anhang

7.1 Postuliertes Rhamnose-Operon von *Oceanobacillus iheyensis*

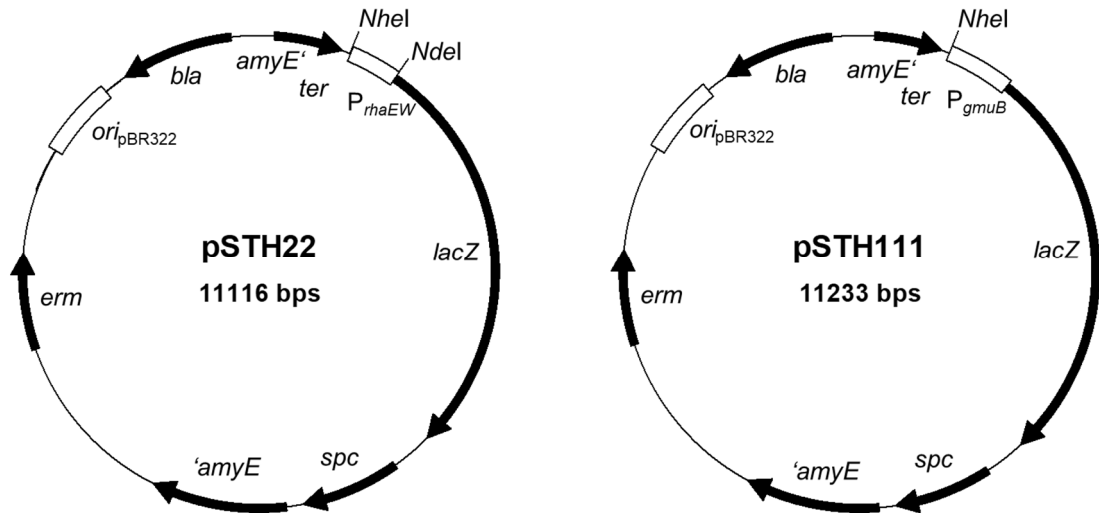


Locus	Name	Funktion
OB0493	<i>rhaM</i>	L-Rhamnose-Mutarotase
OB0494	<i>rhaY</i>	postulierte L-Rhamnose-Permease RhaY
OB0495	<i>rhaB</i>	Rhamnulokinase (EC 2.7.1.5)
OB0496		L-Rhamnose-Isomerase (EC 5.3.1.14)
OB0497	<i>rhaD</i>	Rhamnulose-1-Phosphat-Aldolase (EC 4.1.2.19)
OB0498		Transkriptionsregulator der Rhamnose-Verwertung, DeoR-Familie

Abbildung 7.1 Organisation des angenommenen Rhamnose-Operons von *O. iheyensis*, welches vermutlich unter der Kontrolle des stromaufwärts bindenden (Kreis) DeoR-ähnlichen Transkriptionsfaktors RhaR steht (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/>; Novichkov *et al.*, 2010). An zweiter Position befindet sich das Gen für eine Computer-gestützt vorhergesagte Rhamnose-Permease (RhaY).

7.2 Plasmidkarten

Integrationsvektoren



Expressionsvektoren

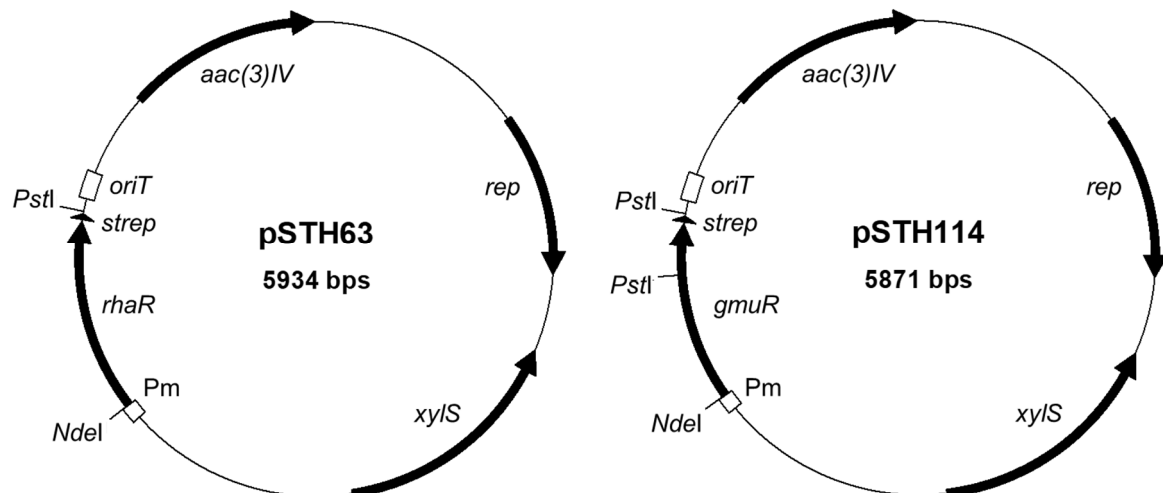
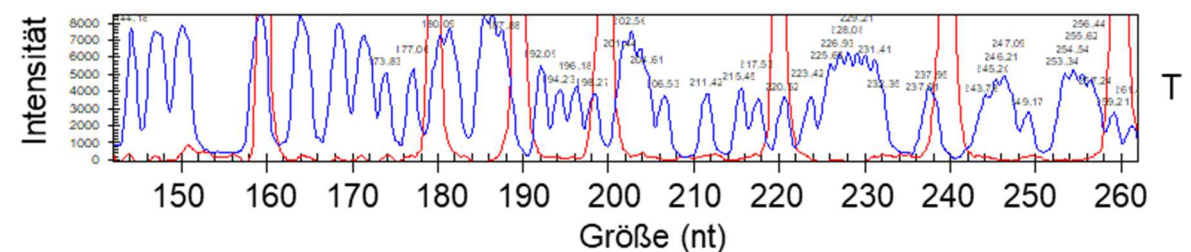
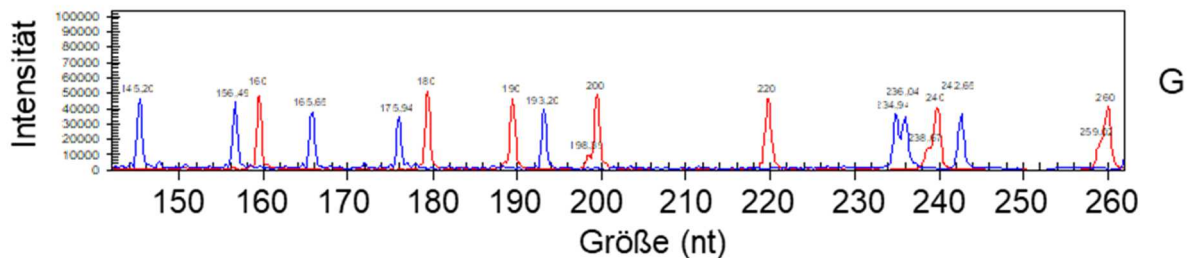
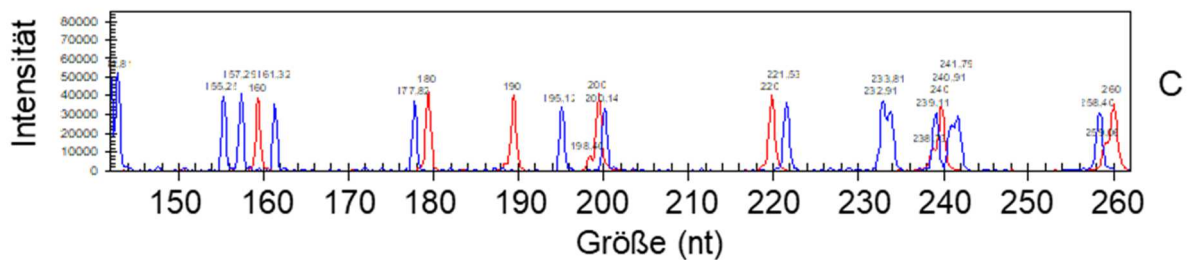
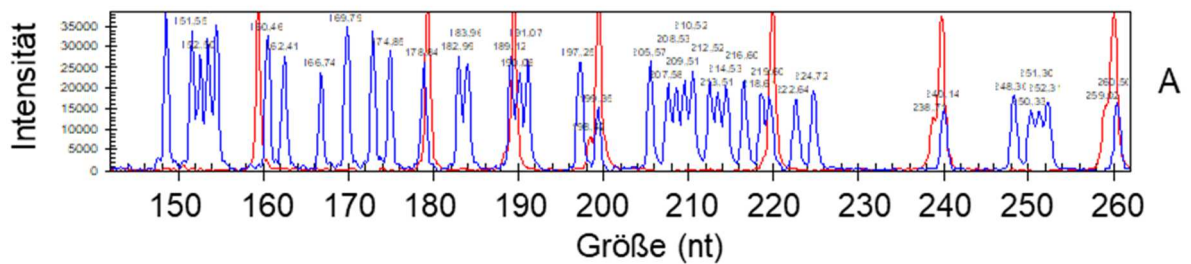


Abbildung 7.2 Plasmidkarten der in dieser Arbeit verwendeten Integrationsvektoren pSTH22 und pSTH111 sowie der Expressionsvektoren pSTH63 und pSTH114. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

7.3 DNA-Sequenzierung zugehörig zum DNase I-Footprinting-Experiment mit dem Regulator GmuR

Das Plasmid pSTH111 wurde mit dem Primer 5'-Cy5-s10620 mittels Kapillarelektrophorese (CEQ8000, Beckman Coulter) sequenziert (siehe Kapitel 3.2.2.21 und 3.2.2.23).



blaue Linie – Cy5-markierte DNA-Fragmente: Sequenzierung pSTH111 mit ddATP (A), ddCTP (C), ddGTP (G) bzw. ddTTP(T)

rote Linie – Größenstandard „GenomeLab™ DNA Size Standard 600“