

# *Regulation des Mannose-Operons in Bacillus subtilis*

Dissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften

**Tianqi SUN**  
Stuttgart 2010



# Regulation des Mannose-Operons in *Bacillus subtilis*

---

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

vorgelegt von

**Tianqi Sun**

aus Harbin, V. R. China

Hauptberichter:

Prof. Dr. Ralf Mattes

Mitberichter:

Prof. Dr. Dieter Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung:

16. 04. 2010

Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart

2010



## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. R. Mattes danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, des Arbeitsplatzes und für die Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. D. Jendrossek danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Josef Altenbuchner danke ich ganz besonders für die intensive wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die zahlreichen Diskussionen, Ratschläge und Anregungen, die diese Arbeit so umfangreich gemacht haben.

Meinen Kolleginnen und Exkolleginnen aus Labor 1 danke ich für die gute Zusammenarbeit, das abwechslungsreiche Arbeitsklima sowie die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche, welche die Arbeit immer spannend gestalteten.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem IIG danke ich für ihre Hilfsbereitschaft sowie viele wertvolle Tipps und aufmunternde Gespräche.

Meiner Schwiegermutter danke ich für das volle Verständnis und die großmütige Unterstützung in den letzten vier Jahren.

Youye Chen und Emily Chen danke ich für ihre Liebe und moralische Unterstützung während der ganzen Zeit.



# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassungen .....	1
1.1	Zusammenfassung .....	1
1.2	Summary .....	3
2	Einleitung .....	5
2.1	Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (PTS) .....	6
2.1.1	Die allgemeinen PTS-Proteine EI und HPr .....	8
2.1.2	Die zuckerspezifischen Enzyme II .....	10
2.2	Regulation des Kohlenhydratmetabolismus .....	11
2.2.1	Induktion der katabolischen Operons .....	11
2.2.2	Katabolitrepession .....	15
2.2.2.1	Die Katabolitrepession bei Gram-negativen Enterobakterien .....	15
2.2.2.2	Die Katabolitrepession bei Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt .....	17
2.2.3	Mehrfache Regulation bei Genen und Operons für den Kohlenhydratabbau .....	22
2.3	Das Mannose-Operon in <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
2.4	Modulare Organisation der PRD-haltigen Transkriptionsregulatoren .....	25
2.4.1	Die Effektordomäne .....	26
2.4.2	PRD-Domänen .....	27
2.4.3	EIIA- und EIIB-Domänen in Transkriptionsaktivatoren .....	30
2.5	Zielsetzungen dieser Arbeit .....	30
3	Material und Methoden .....	31
3.1	Bakterienstämme und Plasmide .....	31
3.2	Nährmedien und Antibiotika .....	36
3.2.1	LB <sub>0</sub> (Luria-Bertani)-Medium: .....	36
3.2.2	Trypton15-Medium .....	36
3.2.3	Minimalmedium für Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	37
3.2.3.1	MG-Minimalmedium (Spizizen's Medium) .....	37
3.2.3.2	Medium I .....	37
3.2.3.3	Medium II .....	37
3.2.4	CMM-Minimalmedium .....	37
3.2.5	Medium für Elektroporation von <i>B. subtilis</i> .....	39
3.2.6	Antibiotika-Zusätze .....	39
3.3	Materialien .....	39
3.3.1	Lösungen und Puffer .....	39
3.3.2	Chemikalien und Enzyme .....	42
3.3.3	Geräte .....	43
3.3.4	Oligonukleotide (Eurofins MWG, Ebersberg) .....	43
3.4	Kultivierungsbedingungen der Bakterien .....	47
3.4.1	Anzucht und Induktion von <i>E. coli</i> : .....	47
3.4.2	Anzucht und Induktion von <i>B. subtilis</i> : .....	47
3.5	Arbeiten mit DNA .....	48
3.5.1	Isolierung der DNA .....	48
3.5.1.1	Biofeedback-Plasmidisolierung: .....	48
3.5.1.2	Plasmidisolierung mit dem QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit .....	48
3.5.1.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i> mit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) .....	48
3.5.2	PCR .....	49
3.5.2.1	Amplifikation von DNA .....	49
3.5.2.2	Fusions-PCR .....	50
3.5.2.3	Kolonie-PCR .....	50
3.5.2.4	Reinigung von PCR-Fragmenten .....	51

3.5.3	Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA.....	51
3.5.4	Isopropanol-Fällung von DNA.....	51
3.5.5	Agarosegelelektrophorese .....	51
3.5.6	Reinigung von Genfragmenten über Gelelution .....	52
3.5.7	Ligation .....	52
3.5.8	Hybridisierung der Oligonukleotide.....	52
3.5.9	Behandlung mit alkalischer Phosphatase .....	52
3.5.10	DNA-Sequenzierung .....	53
3.6	Arbeiten mit RNA .....	53
3.6.1	RNase-freie Arbeit .....	53
3.6.2	Isolierung der RNA .....	54
3.6.3	Formaldehyd-Agarosegel (FA)-Elektrophorese.....	54
3.6.4	Isopropanolfällung der RNA .....	54
3.6.5	Primer Extension .....	55
3.7	Transformation .....	55
3.7.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	55
3.7.2	Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	56
3.7.3	Elektroporation von <i>B. subtilis</i> .....	56
3.8	Proteinanalytische Methoden .....	57
3.8.1	Herstellung von Zellextrakten .....	57
3.8.2	SDS-PAGE.....	57
3.8.3	Nativ-Gelelektrophorese .....	58
3.8.4	Proteinbestimmung.....	58
3.8.5	Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Säule .....	59
3.8.6	Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin-Säulen.....	59
3.8.7	$\beta$ -Galaktosidase Assay (Miller's assay) .....	59
3.8.8	Mobility-Shift-Assay.....	60
3.8.9	Gelfiltration .....	61
3.8.10	Aufkonzentrierung der Proteine .....	61
3.8.11	Pufferaustausch durch PD MidiTrap-Säule.....	61
3.9	Bioinformatik .....	61
4	Ergebnisse .....	62
4.1	Identifizierung der Promotoren des Mannose-Operons .....	62
4.1.1	Konstruktion eines Reportersystems und Insertion der vermuteten Mannosepromotoren.....	62
4.1.2	Expression von <i>lacZ</i> durch die Mannose-Promotoren .....	64
4.2	Ermittlung des Transkriptionsstarts von <i>P<sub>manR</sub></i> und <i>P<sub>manP</sub></i> .....	67
4.2.1	Konstruktion des Vektors pSUN178.4 für die mRNA-Isolierung .....	67
4.2.2	Bestimmung des Transkriptionsstart von <i>P<sub>manP</sub></i> .....	67
4.2.3	Bestimmung des Transkriptionsstarts von <i>P<sub>manR</sub></i> .....	69
4.3	Deletionsanalyse der <i>manP</i> - und <i>manR</i> -Promotoren .....	71
4.3.1	Konstruktion der Expressionsvektoren für die Deletionsanalyse des <i>manP</i> - Promotors .....	71
4.3.2	Veränderung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch 5'-Verkürzung der <i>manP</i> - Promotorsequenz .....	72
4.3.3	Konstruktion der Expressionsvektoren für die Deletionsanalyse des <i>manR</i> - Promotors .....	74
4.3.4	Veränderung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch 5'-Verkürzung der <i>manR</i> - Promotorsequenz .....	74
4.4	Deletion der Mannose-Gene <i>manR</i> , <i>manP</i> , <i>manA</i> und <i>yjdF</i> .....	76
4.4.1	Isolierung von <i>B. subtilis</i> Deletionsmutanten für <i>manR</i> , <i>manP</i> , <i>manA</i> und <i>yjdF</i> ....	76



4.4.2	Sequenzunterschiede bei den von uns isolierten und sequenzierten Genen des Mannose-Operons und den Einträgen in der Datenbank.....	78
4.4.3	Charakterisierung der $\Delta manR$ -Mutante.....	79
4.4.3.1	Phänotypische Veränderung.....	79
4.4.3.2	Regulation von $P_{manR}$ und $P_{manP}$ in der $\Delta manR$ -Mutante.....	80
4.4.4	Charakterisierung der $\Delta manP$ -Mutante.....	82
4.4.5	Charakterisierung der $\Delta manA$ -Mutante.....	83
4.5	Domänen-Deletion von ManR.....	86
4.5.1	Deletion der PTS-EIIA ähnlichen Domäne von ManR.....	86
4.5.2	Deletion der PTS-EIIB und PTS-EIIA ähnlichen Domänen.....	87
4.6	Die Rolle von HPr-His15 in der Aktivierung des Mannose-Operons.....	89
4.7	Auswirkungen von Mutationen in <i>ccpA</i> , <i>crh</i> , <i>ptsH</i> und <i>hprK</i> auf die Katabolitrepression des Mannose-Operons.....	92
4.7.1	HPr-Ser46-Mutante.....	92
4.7.2	Crh-Knockout-Mutante.....	93
4.7.3	Katabolitrepression in der <i>B. subtilis ptsH-S46A Δcrh</i> -Doppelmutante.....	94
4.7.4	CcpA-Knockout-Mutante.....	95
4.7.5	Mutation der <i>cre</i> -Sequenz im <i>manR</i> -Promotor.....	97
4.7.5.1	Basenaustausch in der vermuteten <i>cre</i> -Sequenz des <i>manR</i> -Promotors.....	97
4.7.5.2	Integration von <i>cre*</i> - <i>manR</i> ins Chromosom.....	98
4.7.5.3	Katabolitrepression des <i>manP</i> - und <i>manR</i> -Promotors in TQ361.....	98
4.7.6	Einfluß einer <i>hprK</i> -Knockout-Mutante auf die Mannosepromotoren.....	99
4.8	Untersuchung der Bindung des Regulators ManR an den Operator im <i>manP</i> -Promotor.....	102
4.8.1	Expression und Aufreinigung von <i>manR</i> .....	102
4.8.2	Ermittlung der Dimerbildung durch Gelfiltration.....	106
4.8.3	Mobility-Shift-Analyse zur Identifizierung der <i>in vitro</i> Bindung.....	110
4.9	Entwicklung eines Hybridsystems von Mannose- und Mannitol-Promotor.....	114
4.9.1	Fusion von ManR und MtlR Domänen.....	114
4.9.2	Austausch der Operatorsequenz von $P_{manP}$ durch den $P_{mtlA}$ Operator.....	117
5	Diskussion.....	121
5.1	Charakterisierung der Promotoren von <i>manPA-yjdF</i> und <i>manR</i> .....	121
5.2	Die Rolle der <i>manR</i> , <i>manP</i> und <i>manA</i> -Gene bei der Regulation des Mannose-Operons.....	123
5.3	Die Katabolitrepression ist ein weiterer wichtiger Regulator des Mannose-Operons.....	128
5.4	Hybride aus Mannose- und Mannitol-Promotoren und Regulatoren.....	131
6	Literaturverzeichnis.....	134
7	Anhang: Plasmidkarten einiger in dieser Arbeit konstruierten wichtigen Plasmide.....	144
8	Lebenslauf.....	147

# 1 Zusammenfassungen

## 1.1 Zusammenfassung

Das Mannose-Operon in *B. subtilis* besteht aus drei Genen, *manP*, *manA* und *yjdF*, von denen aber nur *manP* und *manA* für die Verwertung der Mannose notwendig sind. Stromaufwärts und in derselben Orientierung wie das Mannose-Operon liegt das regulatorische Gen *manR*. Dieses codiert den Transkriptionsaktivator für die Expression des Mannose-Operons und des eigenen Gens, die beide durch Mannose induzierbar sind. Mit *lacZ* als Reportergen verursachte die Zugabe von Mannose eine 4-7-fache Erhöhung der Transkriptionsrate des *manP*-Promotors ( $P_{manP}$ ), und eine circa 3-fache Erhöhung des *manR*-Promotors ( $P_{manR}$ ). Durch „Primer Extension“-Experimente wurde der Transkriptionsstart von *manPA-yjdF* und *manR* identifiziert. Die aus diesem Transkriptionsstart abgeleiteten -35- und -10-Regionen der beiden Promotoren stimmen mit der Konsensussequenz von vegetativen  $\sigma^A$  abhängigen Promotoren überein. Eine Deletion von *manR* bewirkte ein nahezu vollständiges Abschalten beider Promotoren. Durch Deletionsanalyse wurde die Lage der Operatorsequenz von ManR zwischen den Basenpaaren -79 und -35 bezüglich des Transkriptionsstarts von *manPA-yjdF* und zwischen -81 und -35 bezüglich des Transkriptionsstarts von *manR* bestimmt. Ein Austausch dieser Region gegen eine entsprechende Region eines Mannitol-Operons führte dazu, dass die entsprechenden Hybridpromotoren nun durch Mannitol regulierbar wurden. Eine Deletion von *manP* (Mannose-Transporter) hatte eine konstitutive Expression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  zur Folge. Dagegen führte eine Deletion von *manA* (Mannose-6-Phosphat-Isomerase) zur Sensitivität gegen Mannose.

Anhand von Aminosäuresequenz-Vergleichen wurden in ManR fünf Domänen postuliert, nämlich eine N-terminale DNA-Bindedomäne, zwei PRDs, eine PTS-EIIA- und eine PTS-EIIB-ähnliche Domäne am C-Terminus. Die Deletion der EIIA- und EIIB-ähnlichen Domänen führte zu einer konstitutiven Expression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$ . Da die Deletion des Gens für den Mannose-Transporter ebenfalls zur Konstitutivität führte, wurde gefolgert, dass es eine Phosphatübertragung zwischen Transporter und Regulator gibt, die die Aktivität von ManR beeinflusst. In Analogie zu anderen PRD-Regulatoren sollte die PRDI in Abwesenheit von Mannose phosphoryliert vorliegen und in Anwesenheit von Mannose durch den Mannosetransporter dephosphoryliert werden. Tatsächlich spielt wie auch bei anderen PRD-Regulatoren die PEP-abhängige Phosphorylierung an His15 von HPr eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$ . Außerdem unterliegen sowohl  $P_{manP}$  als auch  $P_{manR}$  der

Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR). Aufgrund der Homologie von ManR zu anderen PRD-haltigen Transkriptionsaktivatoren kann man davon ausgehen, dass die PRDII in Abwesenheit von Glucose phosphoryliert und in Anwesenheit von Glucose dephosphoryliert ist. Der Mannose-Regulator ist demnach nur aktiv, wenn PRDI dephosphoryliert und PRDII phosphoryliert ist, also wenn nur Mannose ohne Glucose im Medium vorliegt. Genau dieses Verhalten wurde an den beiden Mannose-Promotoren beobachtet. Dies überlappt mit einem zweiten, für *B. subtilis* bekannten Mechanismus der Katabolitrepression, dessen zentrale Bestandteile der Repressor CcpA, HPr und HPr-Kinase sind. Bei einem Überschuss an Intermediaten der Glykolyse, insbesondere Fruktose-1,6-bisphosphat wird die HPr-Kinase stimuliert, die ATP-abhängig HPr an Ser46 phosphoryliert. Dieses bindet an CcpA und der Komplex bindet schließlich an sogenannte *cre*-Sequenzen in entsprechenden CCR-regulierten Promotoren. Tatsächlich konnte eine *cre*-Sequenz im *manR*-Promotor identifiziert werden. Eine Mutation der Sequenz führte zu einer Erniedrigung der Katabolitrepression der Mannose-Promotoren. Eine geringe Erniedrigung der CCR wurde auch in der *ptsH-S46A*-Mutante und einer Deletionsmutante des zu HPr homologen *crh* beobachtet, aber erst in der *ptsH-S46A Δcrh* Doppelmutante war die CCR auf  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$  stark reduziert. Dies zeigte, dass die beiden Proteine sich offensichtlich in der Funktion komplementieren.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass durch diese Arbeit ein autoregulatorisches System für die Mannose-Verwertung in *Bacillus subtilis* bezüglich Induktion und Katabolitrepression weitgehend aufgeklärt wurde und aufgrund des starken *manP* Promotors eine Anwendung in der Konstruktion von Expressionsvektoren finden sollte.

## 1.2 Summary

The mannose operon of *B. subtilis* consists of three genes: *manP*, *manA* and *yjdF*, among which only *manP* and *manA* are responsible for the utilization of mannose. Upstream and in the same orientation as the mannose operon a regulatory gene *manR* codes for a transcription activator of the mannose operon. Both mannose operon and *manR* transcription are inducible by mannose regulated by ManR. With *lacZ* as reporter gene the presence of mannose resulted in a 4-7-fold increase of expression rate from *manP*-promoter ( $P_{manP}$ ) and 3-fold increase from *manR*-promoter ( $P_{manR}$ ). The transcription start points of *manPA-yjdF* and *manR* were determined at a single **A** and at a single **G** respectively, preceded by -35 and -10 boxes resembling a vegetative  $\sigma^A$  promoter structure. A deletion of *manR* caused almost a complete shutdown of both promoters. Through deletion analysis the target sequences of ManR were identified between bp -79 and -35 with respect to the transcription start of *manPA-yjdF* and between bp -81 and -35 with respect to the transcription start of *manR*, respectively. An exchange of this area against another equivalent area of a mannitol operon caused that those hybrid promoters were inducible by mannitol. The deletion of *manP* (mannose transporter) resulted in a constitutive expression from both  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$ . In contrast the deletion of *manA* (mannose-6-phosphate isomerase) led to mannose sensitivity.

By protein sequence alignments a DNA binding motif at the N-terminal end, two PRDs and an EIIA- and EIIB-like domain at the C-terminal end were identified in the ManR sequence, indicating that ManR is a PRD-containing transcription activator. The deletion of EIIA- and EIIB-like domains led to a constitutive expression from both  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$ . Since the deletion of the gene for the mannose transporter led also to a constitutive expression it was concluded that there is a phosphoryl transfer between transporter and regulator, which affects the activity of ManR. In analogy to other PRD-regulators, the PRDI should be in a phosphorylated state in absence of mannose and be dephosphorylated by the mannose transporter in presence of mannose. In fact the PEP-dependent phosphorylation by HPr via His15 plays an essential role in transcriptional activation of  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$ . Moreover, both  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$  are subject to carbon catabolite repression (CCR). Due to the homology of ManR to other PRD-regulators it's assumed that the PRDII is dephosphorylated in presence of glucose and phosphorylated in absence of glucose. According to that the mannose regulator is active only if PRDI is dephosphorylated and PRDII is phosphorylated, that means, when mannose is present and glucose is absent from culture media. Exactly this behaviour was observed for both promoters. This type of CCR overlaps with another well known mechanism

of carbon catabolite repression in *B. subtilis*, whose central elements are CcpA, HPr and HPr-kinase. With an excess of intermediates of glycolysis, such as fructose-1,6-bisphosphate, the HPr-kinase is activated, in order to phosphorylate the serine 46 of HPr. The P-Ser-HPr binds to CcpA and this complex binds consequently the so-called *cre* sequence in those CCR regulated promoters. Actually one *cre* sequence was identified in  $P_{manR}$ . The mutation of this *cre* site resulted in a great relief of CCR on  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$ . A slight decrease in CCR on  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$  was also observed in the mutant bearing the HPr-Ser46Ala exchange and in the knockout-mutant of the HPr homologue Crh. Only in the double mutant with HPr-Ser46Ala mutation and *crh*-knockout the CCR on  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$  was less distinctive. It indicates apparently that the both proteins could complement each other.

Summarized, in this work an auto-regulatory system for mannose utilization in *B. subtilis* was elucidated extensively in respect of induction and catabolite repression. In future, the strong *manR*-promoter will be useful for the construction of *B. subtilis* expression vectors.

## 2 Einleitung

Bei *Bacillus subtilis* handelt es sich um Gram-positive, stäbchenförmige und begeißelte Bakterien. Die Art ist weit verbreitet in Wasser, Luft und Boden und läßt sich im Heuaufguss (Heubazillus) problemlos anreichern. Taxonomisch zählt man *B. subtilis* zu der Abteilung Firmicutes, die sich aus den Klassen Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichi und Thermolithobacteria zusammensetzt. Der Klasse Bacilli untergeordnet ist die Ordnung Bacilliales (niedriger GC-Gehalt), welche unter anderem die Familie Bacillaceae mit der Gattung Bacillus (ca. 150 Arten) einschließt. Wie alle Bakterien der Gattung *Bacillus* ist *B. subtilis* ein aerob wachsender Endosporenbildner.

Phylogenetisch liegt die Art zwar in der Nähe zu pathogenen Organismen wie Staphylokokken, Listerien, Mykobakterien und Mykoplasmen, ist aber selbst nicht pathogen. Diese Bakterien werden deswegen als GRAS Organismen (generally regarded as safe) bezeichnet. Dies macht *B. subtilis* besonders wertvoll in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung. Z. B. stößt man in der Roten Liste<sup>®</sup> der in Deutschland verfügbaren Fertigarzneimittel von 1997 (Rote Liste<sup>®</sup>, 1997) auf die Präparate Utilin<sup>®</sup>, Utilin N<sup>®</sup> und Bactisubtil<sup>®</sup>. Diese Präparate enthalten die Zellen oder Sporen von *B. subtilis* als Lyophilisate oder Suspensionen und werden zur Behandlung von chronischen Dermatosen bzw. von Durchfall, Gärungs- und Fäulnisdyspepsien, Enteritis, Enterocolitis oder von intestinalen Störungen chemo- oder strahlentherapierter Krebspatienten angewendet. Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, dass *B. subtilis* keine deutliche Neigung bzgl. seiner „codon usage“ hat. Dies erweitert das Anwendungsspektrum für die Produktion heterologer Proteine. Schließlich können Gram-positive Bakterien Proteine direkt ins Kulturmedium sezernieren. Diese Fähigkeit vereinfacht die Verarbeitung und Aufreinigung der in *B. subtilis* produzierten heterologen Proteine. Darum wird *B. subtilis* insbesondere für die Herstellung von Waschmittelenzymen in der biotechnologischen Industrie genutzt. Heutzutage werden 60% der käuflichen Enzyme mit *Bacillus* produziert.

Wegen seiner vielfältigen Anwendungen und seiner Rolle als das am besten charakterisierte Gram-positive Bakterium, wurde 1990 mit der Sequenzierung des gesamten *B. subtilis*-Genoms begonnen. Das Ergebnis wurde 1997 vorgestellt und umfasste einen 4 214 814 Basenpaare langen, zirkulären DNA-Doppelstrang mit einem niedrigen GC-Gehalt. Die Angaben zur Anzahl der theoretisch ermittelten offenen Leserahmen betrug knapp 4100. Desweiteren wurden Gene für 88 tRNAs und 30 rRNAs gefunden (Kunst et al. 1997). Im Jahr 2009 wurde das *B. subtilis* 168-Genom erneut sequenziert und annotiert. Bis dato (April 2009)

beträgt die Anzahl der Protein-codierenden Gene 4244 (Barbe et al. 2009). Die Funktion dieser Gene im Stoffwechsel, in der Morphologie und in der Differenzierung war und ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Untersuchungen. Besonderes Interesse finden aber die Regulationsmechanismen, die in Zellwachstum und Teilung, Morphologie, Motilität, Kompetenz, Biofilmbildung und Sporulation involviert sind. Da diese Differenzierungsvorgänge sehr stark von dem Angebot an Sauerstoff, Stickstoff, Spurenelementen und insbesondere an Kohlenstoffquellen abhängen, ist der Kohlenstoffmetabolismus und dessen Regulation ebenfalls von starkem Interesse.

Als typisches Bodenbakterium ernährt sich *B. subtilis* chemoorganoheterotroph. Die Bakterien haben aufgrund ihrer saprophytischen Lebensweise Anteil an der Mobilisierung und Mineralisierung organischer Stoffe und deren Rückführung in die Nahrungskreisläufe. Sie besitzen eine Reihe von Enzymen wie Glucanasen, Proteasen und Nukleasen, die bei Bedarf aus der Zelle exportiert werden, um zahlreiche Polymere im Boden zu degradieren und die Monomere als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden. Die depolymerisierten Monosaccharide wie Glucose, Fructose und Mannose werden dann entweder durch ABC-Transporter, aktive Transporter, erleichterte Diffusion, insbesondere aber durch PTS-Systeme (phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system) in die Zelle aufgenommen. In *B. subtilis* sind alle diese vier Transportwege der Monosaccharide vorhanden, dabei ist das PTS-System von zentraler Bedeutung im Kohlenstoffmetabolismus.

## **2.1 Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (PTS)**

Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (PTS) wurde vor 45 Jahren erstmalig in *E. coli* als ein System entdeckt, dass über Phosphoenolpyruvat (PEP) eine Serie von Hexosen, einschließlich Glucose, Mannose, Glucosamin, *N*-Acetylmannosamin und *N*-Acetylglucosamin phosphoryliert (Kundig, Ghosh & Rosenman 1964). Es besteht aus zwei Energie-gekoppelten allgemeinen zytoplasmatischen Proteinen, dem Enzym I (EI) und dem Histidin-haltigen Phosphorprotein (HPr) sowie dem Enzym II Membranprotein (EII). Die EII-Komplexe sind zuckerspezifische Permeasen, die sich aus drei (EIIABC) oder vier (EIIABCD) Untereinheiten zusammensetzen, die entweder zu einem Multidomänen-Protein verschmelzen oder als separate Polypeptide vorliegen (Deutscher, Francke & Postma 2006; Postma, Lengeler & Jacobson 1993). Die elementaren Komponenten des PTS-Systems

kommen in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vor und sind in allen untersuchten Spezies ähnlich. In *E. coli* wurden bisher 21 und in *B. subtilis* 15 unterschiedliche PTS-Transporter beschrieben (Saier, Jr. et al. 2002; Tchieu et al. 2001).

Das PTS-System hat zwei unterschiedliche Aufgaben im Kohlenstoffkatabolismus. Einerseits übernimmt es die Aufgabe der Wahrnehmung und Aufnahme von Zuckern. Diese Funktion erfolgt durch die von dem PTS-System ausgebildete Phosphorylierungskaskade (Abbildung 2-1). Die Phosphorylierungskaskade beginnt mit der PEP-abhängigen Autophosphorylierung von Enzym I, und wird fortgeführt durch die Übertragung der Phosphorylgruppe von EI zu HPr, das an dem Histidinrest an Position 15 (His15) phosphoryliert wird. EI und HPr versorgen alle PTS-Transporter mit Phosphaten, sie sind unspezifisch bezüglich der Zucker. Dagegen sind die EII-Komponenten spezifisch für die jeweiligen Zucker und werden erst durch das Vorhandensein der jeweiligen Kohlenhydrate induziert (Eisermann et al. 1988). Von HPr-His15 wird das Phosphat weiter auf EIIA und EIIB übertragen, zwei zytoplasmatische phosphorylierbare Domänen des EII-Komplexes, und schließlich auf den entsprechenden Zucker, der von der EIIC- bzw. EIID-Domäne erkannt und während des Transports ins Zytoplasma phosphoryliert wird.

Andererseits fungiert das PTS-System auch als Signalüberträger bei der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus. Während der Phosphorylierung und Aufnahme der Substrate misst und koordiniert das PTS-System auch die katabolischen Informationen und reagiert dadurch, indem es in Abhängigkeit von der jeweiligen Verfügbarkeit von Kohlenhydraten die Transportaktivität der spezifischen EII und somit den Phosphorylierungsstatus aller PTS-Komponenten beeinflusst. In Abwesenheit von PTS-Zuckern bleiben die PTS-Proteine in einem phosphorylierten Zustand, und in Anwesenheit von PTS-Zuckern wird die Phosphorylgruppe auf Substrate übertragen. Diese Umschaltung durch Veränderung des Phosphorylierungszustands reguliert die Expression der Gene für Kohlenhydratstoffwechsel.



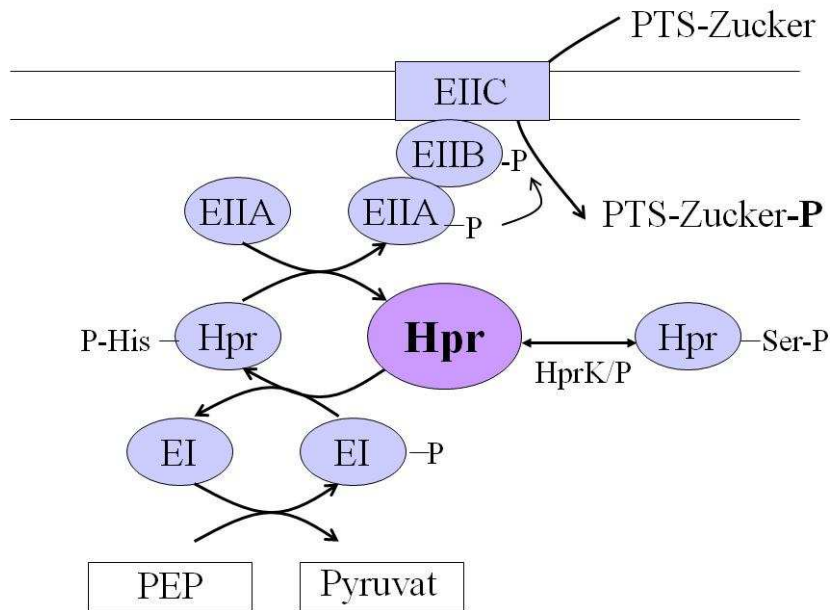


Abbildung 2-1. Die vom PTS-System ausgebildete Phosphorylierungskaskade.

### 2.1.1 Die allgemeinen PTS-Proteine EI und HPr

Die allgemeinen PTS-Proteine EI und HPr werden jeweils von den Genen *ptsI* und *ptsH* codiert, die gemeinsam in einem Operon liegen und konstitutiv exprimiert werden. Sie konnten bereits aus einer Reihe von Gram-positiven und Gram-negativen Organismen isoliert und biochemisch charakterisiert werden (Deutscher, Francke & Postma 2006; Ginsburg & Peterkofsky 2002; Luesink et al. 1999; Postma, Lengeler & Jacobson 1993).

Die Proteinkinase Enzym I (ca. 63 kD) ist die erste Komponente in der Phosphorylierungskaskade des PTS. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die EI Enzyme aus verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien eine hohe Identität auf Aminosäureebene besitzen (Hu & Saier, Jr. 2002; Postma, Lengeler & Jacobson 1993). Das EI besteht aus zwei Domänen, nämlich der N-terminalen Domäne (EI-N) und der C-terminalen Domäne (EI-C). Die EI-N Domäne enthält das aktive Zentrum der Phosphorylierung und die HPr-Bindestelle. EI ist in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und PEP an der N-3-Position des Imidazolrings eines konservierten Histidins (His189 in *E. coli*) im aktiven Zentrum des Enzyms autophosphoryliert. Die EI-N Domäne allein nimmt die Phosphorylgruppe nur von P-His-HPr an, aber nicht von PEP. Eine Voraussetzung für diese PEP abhängige Autophosphorylierung ist die Bildung eines Homodimers (Weigel et al. 1982). Die EI-C

Domäne ist für die Dimerisierung und die PEP-Bindung verantwortlich. Erst wenn beide Domänen zusammen sind und sich Dimere ausbilden, wird EI durch PEP in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  phosphoryliert (Patel et al. 2006).

Das Histidin-haltige Protein HPr ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von nur 9-10 kDa. Seine Struktur ist mittlerweile mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie für Vertreter aus *E. coli*, *B. subtilis* sowie einigen anderen Spezies aufgeklärt worden (Chen, Fairbrother & Wright 1993;Waygood 1998). Das HPr-Molekül bildet ein sog. „open-faced  $\beta$ -sandwich“ aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, dem zwei lange und eine kurze  $\alpha$ -Helix aufgelagert sind. Das aktive Zentrum für Phosphatübertragung befindet sich am N-Terminus der ersten langen  $\alpha$ -Helix. Der Aminosäuresequenzvergleich zeigt, dass die Homologie der HPr-Proteine der meisten Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien auf den Bereich um das Histidin an Position 15 im aktiven Zentrum beschränkt ist, wobei Vertreter aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien untereinander eine noch höhere Ähnlichkeit aufweisen (Postma, Lengeler & Jacobson 1993;Reizer et al. 1993). Diese Tatsache erklärt auch, warum die HPr-Proteine aus Gram-positiven Bakterien nur begrenzt in der Lage sind, den PTS-Transport bei Gram-negativen Bakterien und umgekehrt zu komplementieren (Reichenbach et al. 2007;Reizer et al. 1999). Die Phosphorylgruppe wird vom P-EI auf das His15 von HPr übertragen. Vom HPr ausgehend erfolgt der Transfer der Phosphorylgruppe weiter auf ein konserviertes Histidin der zuckerspezifischen Komponenten EIIA. Die Strukturen der Komplexe von HPr und EI-N sowie von HPr und EIIA<sup>Glc</sup> von *E. coli* wurden bereits aufgeklärt (Garrett et al. 1997). EI und EIIA<sup>Glc</sup> interagieren mit der gleichen Region vom HPr. Eine ähnliche Wechselwirkungsoberfläche wurde auch bei *E. coli*-HPr, gebunden mit EIIA<sup>Mtl</sup> oder EIIA<sup>Man</sup> und bei *B. subtilis*-HPr, gebunden mit EIIA<sup>Glc</sup> gefunden (Chen, Fairbrother & Wright 1993;Cornilescu et al. 2002;van Tilbeurgh, Le & Declerck 2001;Williams, Jr. et al. 2005). Neben Histidin 15 ist auch das Serin-46 in allen HPr-Proteinen hochkonserviert. Bei den meisten Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt und einigen Gram-negativen Bakterien ist eine ATP-abhängige Phosphorylierung durch die HPr-Kinase/Phosphatase möglich (Deutscher, Kessler & Hengstenberg 1985). Die Phosphorylierung von Serin-46 ist nicht an dem Phosphattransfer auf PTS-Zucker beteiligt, aber verlangsamt den Phosphattransfer vom P-EI zu HPr zumindest 100-fach. Dies dient der Regulation des PTS-Transportes und vermittelt eine Katabolitrepression bzw. -aktivierung, da die Bildung von P-Ser-HPr den Phosphattransfer auf His15 vom HPr deutlich reduziert (Deutscher et al. 1994;Deutscher & Saier, Jr. 1983;Reizer et al. 1989) (siehe auch 2.2.2). Das

*E. coli*-HPr besitzt auch einen Ser46-Rest, jedoch wurde keine HPr-Kinase in *E. coli* gefunden. Gleichwohl reduzierte ein Austausch vom Ser46 gegen Aspartat im *E. coli*-HPr die Affinität vom P-EI für HPr ca. 1000-fach. Dieser Effekt wird wahrscheinlich von der elektrostatischen Repulsion verursacht, da der Austausch vom Ser46 gegen Asp nur zur schwachen strukturellen Veränderung führt (Wittekind et al. 1989).

### 2.1.2 Die zuckerspezifischen Enzyme II

Die Spezifität des PTS-Systems für Zucker liegt in den EII Transportern, die Spezies-unabhängig aus einem integralen Membranprotein EIIC bzw. EIICD und zwei zytoplasmatischen Proteinen EIIA und EIIB bestehen. Aufgrund der Phylogenie können die EII-Proteine aus allen Arten in folgende vier Familien/Superfamilien eingeordnet werden: die Glucose-Fructose-Laktose-Superfamilie, die Ascorbat-Galactitol-Superfamilie, die Mannose-Familie und die Dihydroxyaceton-Familie. Die Mitglieder einer Familie weisen untereinander mindestens 25% Identität in ihrer Aminosäuresequenz auf, die Ähnlichkeit zwischen den Familien beschränkt sich dagegen auf einzelne Motive (Deutscher, Francke & Postma 2006; Postma, Lengeler & Jacobson 1993). Die am meisten diskutierten PTS-Transporter wie *E. coli*-EII<sup>Glc</sup> und *B. subtilis*-EII<sup>Glc</sup> gehören zu der ersten Superfamilie, die wieder aus drei Familien, der Glucose-, der Fructose- und der Laktose-Familie, besteht. Die zweite Superfamilie, die Ascorbat-Galactitol-Superfamilie, wird in zwei Familien, die Ascorbat- und die Galactitol-Familie, eingeteilt.

Bei der Phosphatübertragung wird die hydrophile Domäne EIIA vom P-His15-HPr an einem konservierten Histidin phosphoryliert. Von hier aus erfolgt der Phosphattransfer auf ein Histidin (Mannose-Familie) oder Cystein (andere Familien) der ebenfalls hydrophilen Domäne EIIB (Pas & Robillard 1988). Vom P-EIIB wird die Phosphorylgruppe direkt auf das ins Zytoplasma translozierte Substrat übertragen. Die Erkennung, Bindung und Translokation der Substrate werden von der membrandurchspannenden Komponente EIIC bereitgestellt. Bei dem EII der Mannose-Familie existiert neben dem EIIC noch eine weitere transmembrane Komponente EIID (Postma, Lengeler & Jacobson 1993; Robillard & Broos 1999).

Von den vier Domänen der EII-Proteine ist die Domäne EIIA bislang am besten charakterisiert. In den verschiedenen Familien und Organismen zeigen sich Variationen sowohl hinsichtlich der Struktur als auch des Oligomerisierungszustands. Das EIIA<sup>Glc</sup> von *E. coli* liegt als Monomer vor (Hurley et al. 1993), während das EIICB<sup>Glc</sup> durch Proteomanalyse als Oligomer in der Membran identifiziert wurde (Spelbrink et al. 2005). Dennoch wurde eine Multimer-Form von EIIA<sup>Glc</sup> durch Gelfiltration und Kristallanalyse *in*

*vitro* beobachtet (Feese et al. 1997; Scholte, Schuitema & Postma 1982). Desweiteren wurde berichtet, dass vier Moleküle von EIIA<sup>Glc</sup> in *Salmonella typhimurium* mit einem Homodimer von EIICB<sup>Glc</sup> assoziieren (Erni 1986).

Außerdem hat EIIA<sup>Glc</sup> von *E. coli* ähnlich dem HPr von *B. subtilis* neben ihrer Funktion beim Phosphorylgruppentransfer noch eine regulatorische Aufgabe, wobei ihr Phosphorylierungszustand der Zelle die Verfügbarkeit verschiedener Kohlenhydrate signalisiert. Dieser Teil wird noch in 2.2 erklärt.

## 2.2 Regulation des Kohlenhydratmetabolismus

Das Nährstoffangebot für Bakterien in der Umgebung ist manchmal reichlich und manchmal limitiert. Manche Bakterien haben dann Vorteile, wenn sie die vorhandene Energiequelle effizienter als die anderen Bakterien ausnutzen oder eine schnell metabolisierbare Kohlenstoffquelle aus einem Substratgemisch auswählen können. 1942 wurde das Diauxie-Phänomen erstmals im Wachstum von *E. coli* entdeckt (Monod 1942). Seitdem wurde und wird immer noch der grundlegende Mechanismus intensiv erforscht.

### 2.2.1 Induktion der katabolischen Operons

Die Gene und Operons, die Enzyme für die Verwertung der Kohlenhydrate codieren, sind normalerweise nicht konstitutiv exprimiert, sondern werden erst exprimiert, wenn die entsprechenden Substrate im Medium vorliegen. Dieser Prozess, auch Induktion genannt, kann bei verschiedenen Phasen der Genexpression reguliert werden.

Der allererste Schritt der Genexpression ist die Transkriptionsinitiation, an der auch die meisten Regulationsmechanismen ansetzen. Hier wird die generelle Entscheidung gefällt, ob das Gen exprimiert wird oder nicht, und zum Teil auch schon, wie viele mRNA-Moleküle entstehen sollen. Diese Entscheidung wird an den regulatorischen Sequenzen (Operatoren) der Promotoren gefällt. Es handelt sich um Bereiche der DNA, an die die Transkriptionsregulatoren binden. Handelt es sich um ein positiv kontrolliertes System, aktiviert ein Transkriptionsaktivator durch seine Bindung die Transkription, während bei einem negativ regulierten System ein Repressor durch seine Bindung die Transkription hemmt. Ist ein Repressor im Grundzustand, d.h. ohne Effektormolekül, aktiv bzw. ein Aktivator inaktiv, spricht man von Induktion, da erst durch die Bindung eines

Effektormoleküls die Transkription von einem Promotor möglich wird. Bei der Repression ist die Situation genau umgekehrt. Anstelle eines Effektormoleküls kann ein Regulator auch durch eine Modifizierung wie z. B. Phosphorylierung in seiner Aktivität verändert werden.

Nach der Bindung eines Transkriptionsaktivators an den Operator kommt es entweder zu einer Konformationsänderung der DNA, die die RNA-Polymerase den Promotor erkennen lässt, und/oder es kommt durch die Wechselwirkung des Regulators mit der RNA-Polymerase zur Bindung an den Promotor, sodass die Transkription des Gens gestartet werden kann. Bindet ein Repressor an die Operator-Bereiche, verhindert er, dass sich weitere Transkriptionsfaktoren bzw. die RNA-Polymerase anlagern, und behindert so eine Transkription des Gens. Die Effizienz der Transkription hängt im Wesentlichen von der Sequenz des Promotors an. RNA-Polymerasen haben eine hohe Affinität zu „starken“ Promotoren, deren Struktur der Standard- oder Konsensussequenz nahe kommt, und eine geringe Affinität zu „schwachen“ Promotoren, die entsprechend seltener transkribiert werden. Eine weitere Form der Repression ist die sogenannte transkriptionelle Interferenz. Hierbei befindet sich vor dem Promotor des Gens ein zweiter Promotor. Ist dieser aktiv, lagert sich an diesen die RNA-Polymerase an und synthetisiert nicht-codierende RNA. Durch diese Transkription wird die Transkription des eigentlichen Gens verhindert (Conte, Dastugue & Vaury 2002).

Bei der Termination der Transkription unterscheidet man bei Prokaryoten die Rho-unabhängige und die Rho-abhängige Termination. Die Rho-unabhängige oder einfache Termination nutzt Terminationssequenzen am "Ende" des Gens bzw. des Transkripts, die aus einem GC-reichen Abschnitt und einer Folge von Uridinresten bestehen, die zusammen eine Haarnadelstruktur bilden. Wenn die RNA-Polymerase mit dieser Haarnadelstruktur in Wechselwirkung tritt, hält sie an und fällt vom DNA-Strang ab. Die Rho-abhängige Termination ist seltener und benutzt ein weiteres Protein, den Rho-Faktor. Unter Verbrauch von ATP bewegt sich der Rho-Faktor an der RNA entlang, bis er auf die RNA-Polymerase trifft und das DNA-RNA-Hybrid, das die RNA-Polymerase herstellt, auftrennt. Dadurch fällt die RNA-Polymerase ab und die Transkription ist beendet. Außerdem gibt es noch einen Mechanismus, bei dem die RNA-Polymerase kurz nach Transkriptionsbeginn wieder von der DNA abfällt, die Attenuation. Dieser Mechanismus wurde erstmals 1981 beim *trp*-Operon in *E. coli* gefunden (Yanofsky 1981). Dabei wird die Ablesung und Übersetzung der DNA in mRNA während der Transkription bei der Proteinbiosynthese verzögert. Dies geschieht durch die alternative Faltung der mRNA in einer sog. „Leader Region“ stromaufwärts von der

codierenden Sequenz. Die Attenuation in *trp*-Operon in *E. coli* ist eine typische Ribosomenvermittelte Transkriptionsattenuation. In Anwesenheit von Tryptophan bewegt sich das Ribosom schnell, um die Ausbildung eines Transkriptionsterminators anzutreiben, und in Abwesenheit von Tryptophan wird das Ribosom angehalten, um die Antiterminatorstruktur auszubilden, die ein Durchlesen der RNA-Polymerase über die Attenuatorsequenz hinaus erlaubt. Ein anderer Typ von Transkriptionsattenuation/Antitermination ist durch RNA-Bindeproteine (Antiterminatoren) vermittelt. Beispiele sind das *bgl*-Operon in *E. coli* sowie das *sacB* und *bglG*-Gen in *B. subtilis* (Krüger & Hecker 1995; Schnetz, Toloczyki & Rak 1987; Steinmetz, Le & Aymerich 1989). Zwischen dem Promotor und dem ersten Gen liegt eine sog. „Leader Region“ wie bei dem *trp*-Operon in *E. coli*. Die RNA-Sequenz in dieser „Leader Region“ enthält zwei überlappende Stamm-Schleife-Strukturen mit dem jeweiligen unvollständigen Palindrom. Die Transkription der Gene oder Operons ist konstitutiv. In Abwesenheit eines Induktors endet die Transkription an einem Terminator, einer Stamm-Schleife-Struktur nahe der codierenden Sequenz (Abbildung 2-2). In Anwesenheit vom Induktor wird ein in *trans* wirkendes Protein (Antiterminator) aktiviert. Es bindet an die andere Stamm-Schleife-Struktur und verhindert die Ausbildung der Terminatorstruktur und damit die frühzeitige Transkriptionstermination. Die Bindestelle für den Antiterminator wird RAT (ribonucleic antiterminator) genannt und die RNA-Bindedomäne in den Antiterminatoren CAT (Co-Antiterminator) (Aymerich & Steinmetz 1992). In den vergangenen 30 Jahren wurden eine Vielzahl von Attenuations- und Antiterminationsmechanismen erforscht, z. B. die Antitermination in rRNA-Operons und Attenuation mit Antisense-RNAs und tRNAs (Brantl 2004).

Neben der Transkription spielt auch die Initiation der Translation eine große Rolle, die darüber entscheidet, wieviel Protein von einer mRNA gemacht wird. Verantwortlich dafür sind einmal die Qualität und Entfernung der Ribosomenbindestelle vom Startcodon sowie Sekundärstrukturen in der mRNA, die die Ribosomenbindestelle und Startcodon maskieren können. Bei einigen Genen schließlich bildet die Stabilität der mRNA einen wichtigen Regulationsprozess. Die Konzentration einer mRNA hängt davon ab, wie häufig ein Gen transkribiert wird und wie schnell die mRNA wieder abgebaut wird. Wenn eine mRNA sehr stabil ist, kann die Proteinproduktion auch noch lange nach dem Abschalten des Gens stattfinden. Ein Beispiel ist das GsiB-Protein, ein durch Glucose-Mangel induzierbares Stressprotein in *B. subtilis*, dessen mRNA aufgrund einer optimalen Ribosomen-Bindestelle sehr effizient translatiert wird. Diese effiziente Translation bietet gleichzeitig einen Schutz der mRNA vor Abbau, sodass sich auch die Halbwertszeit der mRNA erhöht und folglich GsiB

stärker als alle anderen Stressproteine akkumuliert (Jürgen, Schweder & Hecker 1998). Dabei spielt auch die Codon Usage eine Rolle, da durch Verzögerungen bei der Translation aufgrund eines Mangels an beladener tRNA mRNA-Bereiche für Nukleasen zugänglich werden. Für Proteine, die im Bedarfsfall schnell "ausgeschaltet" sein müssen, also nicht mehr vorhanden sein dürfen, ist deshalb eine kurzlebige mRNA von Vorteil (Knippers 2001). Weiterhin entscheiden natürlich auch Faktoren wie die Halbwertszeit eines Proteins darüber, wieviel von einem Protein sich tatsächlich in oder außerhalb einer Zelle befindet.

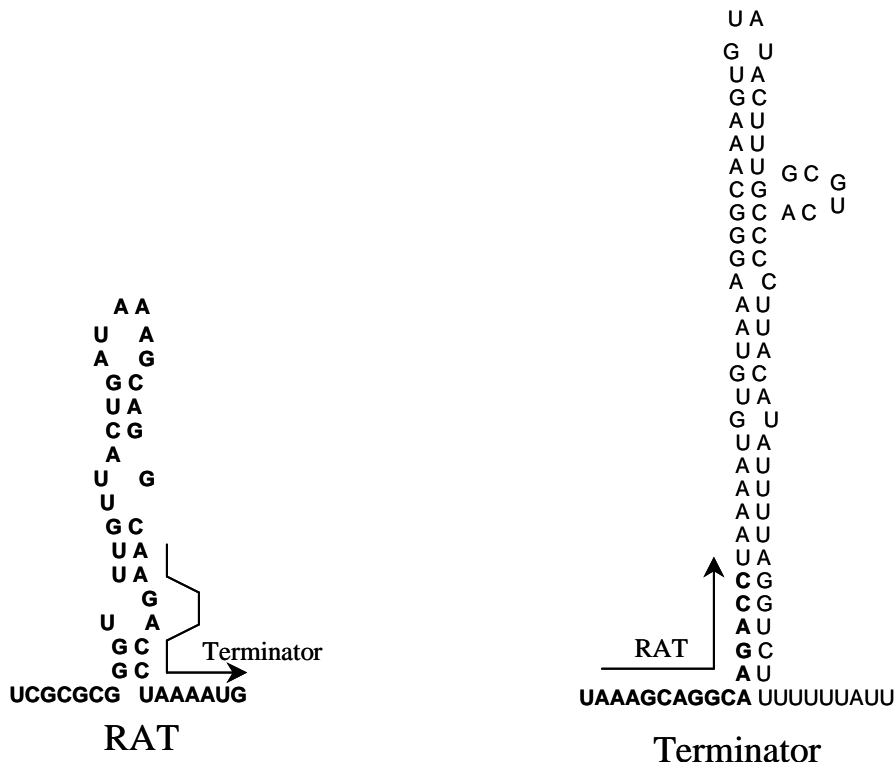
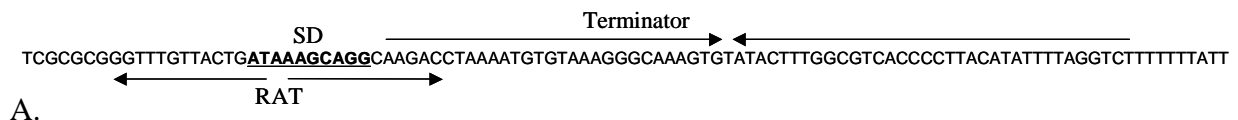


Abbildung 2-2. RAT-Sequenz und Transkriptionsterminator des *sacB*-Operons von *B. subtilis*. A: Die RAT- und die Terminatorsequenz liegen überlappend in dem Transkriptionsstart-Bereich von *sacB*. B: Die RAT-Struktur besitzt gegenüber der Antiterminatorstruktur nur eine sehr geringe Stabilität. Sie kann sich nur ausbilden, wenn nach der Induktion ein aktivierter Antiterminator sie stabilisiert. Ansonsten bildet sich die Terminatorstruktur aus. C: Transkriptionsterminatorstruktur des *sacB*-Gens. (SD: Shine-Dalgarno-Sequenz)

### 2.2.2 Katabolitrepression

Die Diauxie, ein wichtiges Phänomen in der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus, wurde 1942 von Monod entdeckt (Monod 1942). Dieses Auftreten eines zweiphasigen Wachstums findet man in Nährlösungen, in denen Gemische von Nährstoffen vorliegen. Bei einem Gemisch aus Glucose und Sorbit wird von *E. coli* zuerst die Glucose genutzt. Die für die Glucoseverwertung wichtigen Enzyme sind konstitutiv vorhanden, während die für die Sorbitverwertung notwendigen Gene zunächst reprimiert sind und auch in Anwesenheit von Sorbit durch die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose nicht induzierbar sind. Nach Verbrauch der Glucose stoppt zunächst das Wachstum, bis die Gene für die Verwertung der zweiten C-Quelle Sorbit exprimiert sind und das Wachstum nach dieser kurzen Verzögerungszeit (lag Phase) fortgesetzt werden kann. Dieses Phänomen kann durch einen zweiten Regulationsmechanismus des Kohlenhydratmetabolismus erklärt werden, der die Substrat-spezifische Induktion überlagert, nämlich die Kohlenstoff-Katabolitrepression (CR, carbon catabolite repression).

Im Folgenden wird die **Katabolitrepression** mit CR abgekürzt. In kurzen Worten kann man die Katabolitrepression so zusammenfassen: in Anwesenheit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen benutzen Bakterien gewöhnlich eine davon bevorzugt, während die Verstoffwechslung der anderen Kohlenstoffquellen solange unterdrückt wird.

Über den Mechanismus der Katabolitrepression wurden in den letzten 60 Jahren umfangreiche und intensive Forschungen durchgeführt. Es gibt verschiedene Mechanismen, innerhalb eines Bakteriums und verschiedene Bakterien nutzen verschiedene Mechanismen. Allerdings scheint bei den am besten untersuchten Bakterien *E. coli* und *B. subtilis* der Prozess der Katabolitrepression hauptsächlich auf dem PTS-System zu beruhen. Interessant ist, dass sich die zentralen regulatorischen Proteine bei Gram-negativen Enterobakterien und Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt unterscheiden, obwohl viele PTS-Komponenten bzw. einige regulatorische Proteine in sowohl Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien hoch konserviert sind.

#### 2.2.2.1 Die Katabolitrepression bei Gram-negativen Enterobakterien

In Enterobakterien ist Glucose eine bevorzugte Kohlenstoffquelle. Der Glucose-spezifische zytoplasmatische Faktor EIIA<sup>Glc</sup> ist einerseits Teil des Transporters für Glucose und andererseits der Sensor für die Verfügbarkeit der Glucose, und spielt die Hauptrolle in der



Katabolitrepression. Die Veränderungen der Struktur und Ladung, verursacht durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, entscheiden über die regulatorischen Funktionen von  $EIIA^{Glc}$ .

In Abwesenheit von Glucose findet kein Transport über die korrespondierenden EII Transporter statt, so dass das  $EIIA^{Glc}$  phosphoryliert bleibt. In dieser Form interagiert  $P-EIIA^{Glc}$  mit der Adenylatcyclase und stimuliert die Bildung von cAMP, das Effektor-Molekül des CAPs (Catabolite Activator Protein) (Kolb et al. 1993). Das CAP, auch CRP (für cAMP Receptor Protein) genannt, ist eines der wichtigsten regulatorischen Proteine im Kohlenhydratstoffwechsel, da es die Expression zahlreicher Gene und Operons reguliert, darunter etwa 100 Gene und Operons für zuckerverwertende Enzyme bei *E. coli*, wie z.B. das Laktose-Operon. Ein CAP-Protein besteht aus zwei Untereinheiten. Jede Untereinheit kann ein Molekül cAMP binden. Das CAP wird erst durch die Bindung von cAMP aktiviert. Die Bindung verändert die Konformation des Proteins, das nun in der Lage ist, an einen DNA-Abschnitt zu binden. Im Fall vom *lac*-Operon in *E. coli* agiert der Komplex CAP/cAMP als Transkriptionsaktivator. Er lagert sich an die DNA direkt 5' vor dem Promotor an und induziert eine kräftige Beugung der DNA mit einem Winkel, der zwischen 90° und 130° liegen kann. Diese Beugung der DNA fördert die Kontaktaufnahme des CAP-Proteins mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase. Dadurch wird die Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor deutlich erhöht (Schultz, Shields & Steitz 1991). Alle Operons, die der Katabolitrepression unterworfen sind, enthalten eine oder auch mehrere CAP-Bindestellen, meist in enger Nähe zur -35-Region ihrer Promotoren (Knippers 2001). Zudem wird eine unterschiedliche Konzentration vom CAP/cAMP-Komplex für die volle Expression der unterschiedlichen Gene benötigt, da der CAP/cAMP-Komplex mehrere aktive Konformationen einnehmen kann und die Affinität zwischen dem CAP/cAMP-Komplex und der DNA-Bindestelle variiert (Deutscher, Francke & Postma 2006).

In Anwesenheit von Glucose wird dagegen das  $EIIA^{Glc}$  während des Transportvorgangs dephosphoryliert. Die Stimulation der Adenylatcyclase durch  $P-EIIA^{Glc}$  wird aufgehoben und die intrazelluläre Konzentration an cAMP fällt. Somit wird die Induktion der Gene und Operons für andere Zuckerverwertungen aufgehoben. Außerdem bindet das unphosphorylierte  $EIIA^{Glc}$  auch an die Transportproteine der Nicht-PTS Zucker wie Laktose, Glycerin und Maltose, und hemmt ihre Aufnahme (Inducer Exclusion) (Magasanik 1970). Auf die gleiche Weise kann die Überexpression des Transportproteins wie GlpK für einen Nicht-PTS Zucker auch die verfügbare Menge an  $EIIA^{Glc}$  verringern. Dies führt zu einer Verringerung der

Glucose-Aufnahme und verhindert sogar die Inducer Exclusion. Dieses Phänomen wird dann als „reverse inducer exclusion“ oder „escape from inducer exclusion“ genannt (Deutscher, Francke & Postma 2006; Nelson, Scholte & Postma 1982; Saier, Jr., Keeler & Feucht 1982).

Mlc ist ein anderer allgemeiner Regulator für die Expression von Genen des katabolischen Stoffwechsels. Als Repressor reguliert Mlc die Expression von *ptsHI*, *ptsG*, *manXYZ*, *malT*, *sgrS* und seines eigenen Gens (Deutscher 2008). In *E. coli* verursacht die Bindung an die Membran eine Inaktivierung vom Mlc (Tanaka et al. 2004). Neben CAP und Mlc gibt es in *E. coli* noch einige andere Regulatoren wie MtfA, AcrA/B, Cra und Fnr, die den Glucose-Metabolismus bzw. die Glucose-vermittelte Katabolitrepression beeinflussen (Becker et al. 2006; Deutscher, Francke & Postma 2006).

#### 2.2.2.2 Die Katabolitrepression bei Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt

In Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt sind die PTS-Komponenten ähnlich denen der Enterobakterien, aber die Hauptrolle in der CR wird von HPr statt von EIIA<sup>Glc</sup> wie in *E. coli* gespielt (Martin-Verstraete et al. 1998).

Wie beim EIIA<sup>Glc</sup> in *E. coli* dient der Phosphorylierungszustand des HPr in den Gram-positiven Bakterien als Sensor für den metabolischen Zustand. HPr hat zwei phosphorylierbare Aminosäurereste, nämlich Histidin-15 und Serin-46, die unterschiedliche Rollen in der Regulation von Genen bei Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt spielen: Das Histidin-15 beteiligt sich an der Phosphatübertragung von EI auf den Zuckerspezifischen EII Transporter (Gassner et al. 1977), während das durch die ATP-abhängige Phosphorylierung durch HPr-Kinase entstandene P-Ser-HPr als Corepressor bei der Katabolitrepression fungiert (Hanson et al. 2002; Lorca et al. 2005).

Die HPr-Kinase ist ein bifunktionelles Enzym, das die reversible Reaktion Phosphorylierung/Dephosphorylierung von (P)-Ser-HPr katalysiert. Demnach wird die HPr-Kinase auch HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P) genannt. Die erste HPr-Kinase wurde 1984 in *Streptococcus pyogenes* identifiziert, obwohl damals nur ihre Kinaseaktivität festgestellt und die Funktion der Phosphorylierung übersehen wurde (Deutscher, Kessler & Hengstenberg 1985; Reizer et al. 1984). In *B. subtilis* wird HPrK/P von *hprK* (früher *ptsK*)-Gen codiert, das 1998 erstmalig beschrieben wurde (Reizer et al. 1998). Die Kristallstrukturen mehrerer HPrK/P aus Gram-positiven Bakterien sind inzwischen bekannt (Fieulaine et al.

2001;Marquez et al. 2002;Ramstrom et al. 2003). Die *B. subtilis* HPrK/P bildet ein Hexamer bei neutralem pH und ein Monomer bzw. Dimer bei pH 9,5. Die Mutationsanalyse von *hprK* in *B. subtilis* zeigte, dass die Defizienz der Kinase- und Phosphatase-Aktivität zum Verlust der Katabolitrepression vieler Gene führte (Hanson et al. 2002).

Der Phosphorylierungszustand vom Serin-46 in HPr spiegelt die Ernährungssituation der Zelle wider. Wenn ein PTS-Substrat wie Glucose verstoffwechselt wird, d. h. in einer energiereichen Umgebung, steigt der Spiegel der glykolytischen Zwischenprodukte (Glucose-6-P, Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) und ATP). In der Phosphorylierungsreaktion sind FBP und ATP die Coeffektoren für HPr-Kinase. Diese stimulieren die HPr-Kinase, Serin-46 zu phosphorylieren (Galiniere et al. 1998). Das Pyrophosphat  $PP_i$  sowie das anorganische Phosphat sind dagegen Inhibitoren für diese ATP-abhängige Phosphorylierung und stimulieren die Dephosphorylierungsreaktion (Deutscher, Kessler & Hengstenberg 1985). Durch die Zunahme und Abnahme solcher metabolischen Zwischenprodukte wird die Funktion von HPrK/P zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung hin und her geschaltet. Somit entspricht der Phosphorylierungszustand von Ser-46 in HPr auch dem Energiestatus der Zelle.

Das am Serin-46 phosphorylierte HPr (P-Ser-HPr) bildet einen Komplex mit dem Catabolite Control Protein CcpA (Deutscher et al. 1995). Dieser Komplex bindet an Operator-Sequenzen (Catabolite Responsive Element, *cre*) in Promotoren vieler Gene und Operons und reprimiert die Transkription (Deutscher, Francke & Postma 2006;Henkin 1996;Lorca et al. 2005;Tobisch et al. 1999;Warner & Lolkema 2003) (Abbildung 2-3).

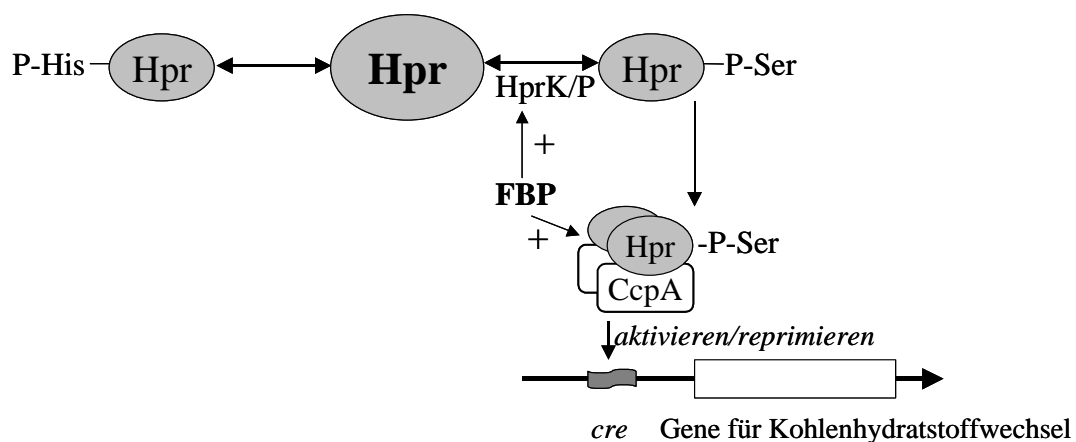


Abbildung 2-3. Die HPr vermittelte Katabolitrepression in Gram-positiven Bakterien

CcpA (**C**atabolite **C**ontrol **P**rotein **A**) ist ein Transkriptionsfaktor aus der LacI-GalR-Familie, die durch ihre stark konservierte „Helix-Turn-Helix“-DNA-Bindedomäne am N-Terminus sowie weiteren Motiven für Oligomerisierung und Effektorbindung identifiziert werden können (Weickert & Adhya 1992). CcpA bildet ein Dimer, seine DNA-Bindungsaktivität wird aber erst durch Komplexbildung mit P-Ser-HPr, dem allosterischen Corepressor für die Repression von Genen bzw. durch Komplexbildung mit P-Ser-Crh, einem HPr homologen Protein, aktiviert. Die Komplexe binden dann an *cre*-Sequenzen, stimuliert durch glycolytische Zwischenprodukte wie FBP. Die dreidimensionale Struktur eines Dreifach-Komplexes CcpA/P-Ser-HPr/*cre* aus *Bacillus megaterium* wurde bereits vor Jahren bestimmt (Schumacher et al. 2004). Die Beteiligung von CcpA an der Transkriptionskontrolle und die Existenz der Operatorsequenz *cre* wurde erstmals in der Studie des *amyE*-Gens ( $\alpha$ -Amylase) von *B. subtilis* nachgewiesen (Henkin et al. 1991; Weickert & Chambliss 1990). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Konsensussequenz von *cre* stetig durch die Analyse neuer, der Katabolitrepression unterliegender Gene modifiziert. Mit der Konsensussequenz WTGNAANCGNWNWCW (N = beliebige Base, W = A/T) wurden 126 potenzielle und bekannte *cre*-Sequenzen in *B. subtilis* gefunden (Miwa et al. 2000). Das Alignment mit 22 funktionellen *cre*-Sequenzen implizierte eine noch stärker konservierte Sequenz WWTGNAARCGNWWCAWW (N = beliebige Base, W = A/T, R = G/A), die auch in dieser Arbeit als Suchanfrage in den Datenbanken verwendet wurde.

Die neueren Studien über die Rolle von CcpA beruhen vor allem auf Proteom- und Transkriptomanalysen. Durch Transkriptomanalyse wurde die Anzahl der von CcpA beeinflussten Gene ausgeweitet. In einer Studie wurden 311 putative *cre*-Sequenzen in *B. subtilis* 168 gefunden (Lulko et al. 2007; Yoshida et al. 2001). Die vermutlich über 300 von CcpA regulierten Gene in *B. subtilis* codieren für zahlreiche Zuckertransportproteine und Enzyme für den Abbau der aufgenommenen Zucker, für Proteine involviert in der Atmungskette, der Aminosäurebiosynthese, des Stickstoffmetabolismus und der Sporulation (Blencke et al. 2003; Tobisch et al. 1999). Die Gene kann man auch in zwei Gruppen unterteilen, nämlich die, die durch CcpA aktiviert werden und die, die von CcpA reprimiert werden. Hierbei entscheidet im Wesentlichen die Lage der *cre*-Sequenz bezüglich des Transkriptionsstarts, ob die Bindung von CcpA zur Aktivierung oder zur Repression des Zielgens führt (Stülke & Hillen 2000).

Befinden sich die *cre*-Sequenzen stromaufwärts der entsprechenden Promotoren, z. B. bei *pta*-, *ackA*- und *ilv-leu*-Genen, die jeweils für Phosphotransacetylase, Acetatkinase und für Enzyme aus der Biosynthese verzweigter Aminosäuren codieren, fungiert CcpA als

Transkriptionsaktivator. Die CcpA-Bindung an diese *cre*-Sequenzen stabilisiert den RNA-Polymerase-Promotor-Komplex (Henkin 1996; Martin-Verstraete et al. 1995; Tojo et al. 2005). Allerdings ist der Mechanismus der CcpA vermittelten Genaktivierung noch relativ wenig verstanden, denn manchmal fehlt die *cre*-Sequenz bei einigen von CcpA aktivierten Promotoren [Titgemeyer und Hillen 2002].

Die meisten Gene des Citratzyklus und der Gene für den Abbau von Zuckern, wie die aus den *xyl*-, *ara*-, *gnt*- und *bglPH*-Operons, werden von Glucose reprimiert. Ihre *cre*-Sequenzen überlappen die Promotorregionen. Die CcpA-Bindung an solche *cre*-Sequenzen behindert die RNA-Polymerase und somit die Transkriptionsinitiation. Eine Ausnahme gibt es im *lev*-Operon von *B. subtilis*. Stromaufwärts von dem *levD*-Promotor, der durch eine  $\sigma^L$ -haltige RNA-Polymerase erkannt wird, befindet sich eine *cre*-Sequenz. Noch weiter stromaufwärts von der *cre*-Sequenz liegt die Bindestelle von LevR, ein PRD-Regulator, der die Transkription des *lev*-Operons aktiviert. Die Komplexbildung von CcpA/P-Ser-HPr/*cre* verhindert die Wechselwirkung von LevR mit der RNA-Polymerase, somit wird *levD* negativ reguliert (Martin-Verstraete et al. 1995).

In einer Reihe von Genen und Operons liegen die durch Sequenzanalyse identifizierten *cre*-Sequenzen nicht in den Promotorsequenzen, sondern z.T auch in den regulierten Genen. Ob und wie dies zur Regulation der Gene beiträgt, ist noch nicht verstanden.

In neueren Studien wurde ein HPr-homologes Protein Crh (catabolite repression HPr-like HPr) in *B. subtilis* entdeckt, das eine ähnliche Rolle in der Katabolitrepression spielt wie HPr. Crh weist 45% Sequenzidentität mit HPr auf, aber das aktive Zentrum von HPr, His-15, ist in Crh durch ein Glutamin ersetzt. Deswegen ist Crh nicht an der Phosphatübertragung von EI auf PTS-Zucker beteiligt, sondern kann nur von der HPr-Kinase am Serin phosphoryliert werden. P-Ser-Crh wirkt mit CcpA als Corepressor auf gleiche Weise wie P-Ser-HPr und nimmt an der CR teil (Galinier et al. 1997; Schumacher et al. 2006).

Die oben beschriebene Katabolitrepression braucht in der Regel die Beteiligung von CcpA und die Existenz von *cre*-Sequenzen in den zu regulierenden Promotoren. In Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt gibt es aber auch einige Gene, die einer CcpA-unabhängigen Katabolitrepression unterliegen.

Eine CcpA-unabhängige Katabolitrepression beruht auf HPr selbst. Wenn bevorzugte PTS-Zucker wie Glucose umgesetzt werden, häufen sich die glykolytischen Zwischenprodukte wie Fructose-1,6-Bisphosphat in der Zelle an. Das stimuliert die ATP-abhängige HPr-Kinase, die das Serin-46 von HPr phosphoryliert. Da P-Ser-HPr kein Substrat für EI ist [Deutscher et al.,

1994], verringert sich die Anzahl von P-His-HPr, das für die PEP-abhängige Aufnahme und Phosphorylierung von Zuckern notwendig ist. Diese Konkurrenz um HPr führt dazu, dass die Verstoffwechslung des PTS-Zuckers verlangsamt wird (Stülke & Hillen 1998). Sobald der Spiegel der glykolytischen Zwischenprodukte sinkt und der Spiegel des anorganischen Phosphats steigt, katalysiert die bifunktionelle HPr-Kinase/Phosphatase die umgekehrte Reaktion, die Dephosphorylierung von P-Ser-HPr, dass dann wiederum den PTS-abhängigen Transport erhöht (Titgemeyer & Hillen 2002).

Weiterhin wurde eine durch PRD-haltige Antiterminatoren oder Transkriptionsaktivatoren vermittelte Katabolitrepession nachgewiesen. P-His-HPr kann neben den EII Transportern auch die PRD-haltigen Regulatoren phosphorylieren und damit deren Funktion als Antiterminatoren oder Aktivatoren aktivieren. Dies geschieht allerdings nur in Abwesenheit von schnell umsetzbaren Kohlenstoff-Quellen wie Glucose, denn dann wird nach einer gängigen Hypothese das Phosphat hauptsächlich auf den Glucosetransporter übertragen und steht nicht mehr für die Aktivierung der PRD-haltigen Aktivatoren zur Verfügung, die damit inaktiv bleiben (Deutscher, Francke & Postma 2006). Dies wurde unter anderem beim *lev*-Operon nachgewiesen, bei dem *in vitro* die Phosphorylierung von LevR, dem PRD-Regulator des *lev*-Operons, durch EI und HPr gezeigt wurde (Stülke et al. 1995).

Eine weitere Art der Katabolitrepession ist die Übertragung der Phosphorylgruppe von P-His-HPr direkt auf die Glycerin-Kinase, deren Aktivität damit stimuliert wird. Wenn Glucose neben Glycerin als C-Quelle vorhanden ist, nimmt die Konzentration von P-His-HPr ab. Auf diese Weise wird der erste Schritt im Glycerin-Metabolismus nach Aufnahme in die Zelle durch Glucose unterdrückt (Darbon et al. 2002).

Weitere CcpA-unabhängige CR wird durch andere Regulatoren wie CcpB (Chauvaux, Paulsen & Saier, Jr. 1998), CcpC (Jourlin-Castelli et al. 2000), CcpN (Servant, Le & Aymerich 2005), CggR (Doan & Aymerich 2003), AbrK und GerE vermittelt. Die Inaktivierung dieser Gene zeigte, dass sie an der Katabolitrepession beteiligt sind. Aber die DNA-Zielsequenzen dieser Proteine und ihre Bindungsspezifitäten sind bis jetzt noch unklar. Es scheint jedoch, dass ihre Beiträge zur globalen Kohlenstoff-Regulation sich auf einige spezifische Wachstumsbedingungen beschränken werden, die noch weiter aufgeklärt werden müssen (Moreno et al. 2001; Titgemeyer & Hillen 2002).

Eine weit verbreitete Art der CcpA-unabhängigen Katabolitrepession ist schließlich die sogenannte „Inducer exclusion“. Ähnlich wie EIIA<sup>Glc</sup> in Enterobakterien übernimmt HPr diese Aufgabe in Firmicutes. Einige ABC-Transporter für Nicht-PTS-Zucker wie Maltose und Ribose in *Lactobacillus casei* werden sofort durch Zugabe von Glucose gehemmt, während in

einer *ptsH*-Mutante Glucose diese repressive Wirkung verloren ging (Monedero et al. 2007). Die Repression scheint durch eine direkte Wechselwirkung von P-Ser-HPr mit dem ABC-Transporter erzielt zu werden (Deutscher 2008).

### 2.2.3 Mehrfache Regulation bei Genen und Operons für den Kohlenhydratabbau

Unter Katabolitrepression werden Mechanismen verstanden, durch die die Zelle den Kohlenstoff- und Energie-Metabolismus koordiniert und die Effizienz maximiert. In so einem fein koordinierten Netzwerk ist es nicht überraschend, dass ein Gen oder Operon durch mehrere Regulationssysteme reguliert wird.

So wird die Expression von PTS-Genen in *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien hauptsächlich durch Veränderung des Phosphorylierungszustands reguliert und das über zwei verschiedene Wege: (a) durch allgemeine Katabolitrepression oder Geninaktivierung über einen Komplex aus P-Ser-HPr mit CcpA und (b) durch Phosphortransfer zu PRD-Transkriptionsregulatoren (Stülke & Hillen 1998). Ein Beispiel ist das *lev*-Operon von *B. subtilis*. Dieses muss durch sein Substrat Fructose induziert werden. Daneben wirken beide oben genannten Mechanismen auf das *lev*-Operon ein und führen zur Katabolitrepression. Eine Art der Katabolitrepression ist durch CcpA/P-Ser-HPr/*cre* vermittelt. Zwischen Basenpaar -50 und -36 stromaufwärts vom *lev*-Transkriptionsstart liegt eine *cre*-Sequenz, die Zielsequenz einer CcpA-abhängigen Katabolitrepression. Aber sowohl in einer *ccpA*-Mutante als auch in einer *ptsH*-Mutante ist die Katabolitrepression nicht vollständig aufgehoben (Martin-Verstraete et al. 1995). Diese CcpA unabhängige Katabolitrepression bezieht sich auf die Phosphorylierung von LevR. Die Aufnahme und der Abbau von Glucose neben dem Substrat des *lev*-Operons verursachen eine Konkurrenz um HPr und weiter eine Verringerung von P-His-HPr, das das His585 in LevR phosphoryliert. Die Phosphorylierung von His585 ist notwendig für die vollständige Aktivierung des *lev*-Operons. Somit wird die Aktivierung von LevR durch Glucose gehemmt (Martin-Verstraete et al. 1998).

Das *B. subtilis*-*glpFK*-Operon codiert für ein Facilitatorprotein für die Glycerin-Aufnahme (*glpF*) und eine Glycerin-Kinase (*glpK*). Das *glpFK*-Operon kann durch Glycerin-3-Phosphat induziert und durch Glucose reprimiert werden. Stromaufwärts von *glpFK* befindet sich eine *cre*-Sequenz, die für die CcpA-abhängige Katabolitrepression verantwortlich ist. Aber weder in einer *ccpA*-Mutante noch in einer *hprK*-Mutante ist die Katabolitrepression vollständig aufgehoben. Das *glpP*-Gen stromaufwärts von *glpFK* codiert für einen Transkriptionsantiterminator des *glpFK*-Operons. Gewöhnlich bricht die Transkription des

*glpFK*-Operons kurz hinter der Transkriptionsinitiationsregion an einem Transkriptionsterminator ( $t_{glpFK}$ ) ab. Die Bindung von GlpP mit Glycerin-3-Phosphat als Induktor an einer sogenannten RAT-Sequenz unmittelbar neben bzw. mit der Terminatorsequenz überlappend führt dazu, dass sich die Terminatorstruktur nicht ausbilden kann. Somit wird das *glpFK*-Operon aktiviert und vollständig transkribiert. Aber auch in einer  $\Delta t_{glpFK}$ -Mutante ist die Katabolitrepression nur zum Teil aufgehoben. Diese CcpA-unabhängige Katabolitrepression wird durch Glycerin-Kinase und P-His-HPr vermittelt, indem das P-His-HPr die Glycerin-Kinase direkt aktiviert, die dann das Glycerin-3-Phosphat für die *glpFK*-Induktion produziert. Denn die Anwesenheit von Glucose verursacht eine Konkurrenz um HPr, was wiederum zur Verringerung von P-His-HPr und damit zur Verringerung der Glycerin-Kinase-Aktivität führt (Darbon et al. 2002).

Ein weiteres wichtiges Operon für die Glykolyse ist das *gapA*-Operon in *B. subtilis*. Das *gapA*-Operon besteht aus sechs Genen *cggR-gapA-pgk-tpi-pgm-eno* (Ludwig et al. 2001). Das erste Gen *cggR* codiert einen Repressor CggR, der die Transkription der anderen fünf Gene reprimiert (Doan & Aymerich 2003). Die Genprodukte der anderen fünf Gene sind wichtige Enzyme in der Glykolyse, der Einführung der Triosephosphate in den Citratzyklus und der Oxidation dort. Zwei Regulatoren, CcpA und CggR, sowie die mRNA-Prozessierung sind an seiner Regulation beteiligt. In Anwesenheit von Glucose werden die sechs Gene in Form einer polycistronischen mRNA transkribiert. Durch die Deletionsanalyse von *ccpA* wurde bestätigt, dass die Induktion des *gapA*-Operons durch Glucose eine CcpA-abhängige Aktivierung ist, obwohl keine funktionsfähige *cre*-Sequenz im *gapA*-Operon gefunden wurde (Ludwig et al. 2002). Durch eine endoribonukleolytische Spaltung wird dann das hexacistronische Primärtranskript zwischen *cggR* und *gapA* in zwei Transkripte geteilt. Das Transkript *gapA-pgk-tpi-pgm-eno*, das die glykolytischen Gene codiert, bleibt relativ stabil, während die abgespaltene monocistronische *cggR*-mRNA schnell abgebaut wird. Dieser Unterschied in der mRNA-Stabilität gewährleistet die Synthese einer großen Menge an glykolytischen Enzyme gegenüber dem Repressorprotein CggR. Zwischen *cggR* und *gapA* liegt ein zweiter Promotor des Operons, wo sich auch die Operatorsequenz für CggR befindet (Doan & Aymerich 2003). CggR bindet an diesen Operator und hemmt die Transkription von *gapA-pgk-tpi-pgm-eno*. In Anwesenheit von schnell umsetzbaren Zuckern wie Glucose ist FBP in hoher Konzentration in der Zelle vorhanden. FBP ist ein Inhibitor für die Bindung zwischen CggR und dem Operator des *gapA*-Operons. Daher wird CggR aufgrund der hohen Konzentration von FBP von dem Operator abgelöst, und damit die Transkription des *gapA*-Operons weiter gesteigert.



## 2.3 Das Mannose-Operon in *Bacillus subtilis*

D-Mannose ist ein 2-Epimer von Glucose und kommt in Mannan und Heteromannan-Polysacchariden, Glykoproteinen und vielen anderen Glykokonjugaten vor. In *B. subtilis* tritt Mannose in zwei Schritten in die Glykolyse ein: Zunächst wird es während der Aufnahme durch ein Mannose-spezifisches PTS-Transportsystem phosphoryliert. Dann wird das Mannose-6-Phosphat durch Mannose-6-Phosphat-Isomerase zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt. In dem 1997 sequenzierten *B. subtilis*-Genom (Kunst et al. 1997) wurden aufgrund von Sequenzvergleichen drei Gene für die Verwertung der Mannose identifiziert, die zu einem Operon zusammengefasst sind (Reizer et al. 1999). Das erste Gen *manP* codiert eine putative Mannose-spezifische PTS-Enzym EIIBCA Komponente (Transporter), die eine deutliche Sequenzähnlichkeit mit Fructose-spezifischen Permeasen hat (Reizer & Reizer 1996) und daher der Fru-Permease-Familie zugeordnet wurde. Das zweite Gen *manA* codiert eine Mannose-6-Phosphat-Isomerase, während die Funktion des dritten Gens *yjdF* unbekannt ist. Stromaufwärts von dem Mannose-Operon liegt mit derselben Orientierung ein regulatorisches Gen *manR*, von dem man annahm, dass es den Transkriptionsaktivator des Mannose-Operons codiert (Abbildung 2-4). Durch Sequenz-Alignment mit bekannten Transkriptionsaktivatoren wurden ein DNA-Bindemotiv am N-Terminus, zwei PRD-Domänen und jeweils eine EIIB und EIIA ähnliche Domäne am C-Terminus identifiziert, die darauf hinweisen, dass es sich bei ManR um einen PRD-haltigen Transkriptionsaktivator handelt, ähnlich zu LicR von *B. subtilis* und MtlR von *B. stearothermophilus*.

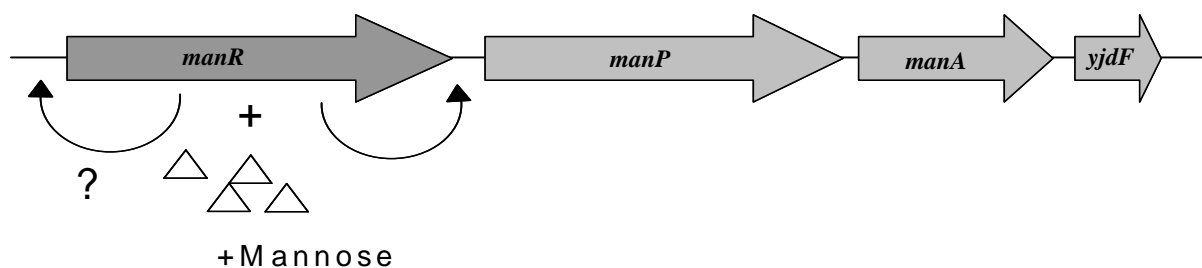


Abbildung 2-4. Organisation des Mannose-Operons und des Regulatorgens *manR*

## 2.4 Modulare Organisation der PRD-haltigen Transkriptionsregulatoren

Der Begriff PRD wurde 1998 geprägt und bezeichnet die „PTS regulation domain“ (Stülke et al. 1998). Diese konservierten PRDs wurden bislang entweder in Antiterminatoren wie BglG in *E. coli* und LicT in *B. subtilis*, oder in einigen Transkriptionsaktivatoren der Gram-positiven Bakterien gefunden. Das Hauptmerkmal eines PRD-haltigen Regulators ist die Teilnahme an PTS-abhängiger Induktion und Katabolitrepression von Genen aus dem Zuckerstoffwechsel. Dies erfolgt durch die PTS abhängige Phosphorylierung und Dephosphorylierung der PRDs, sowie evtl. auch anderer Domänen des PRD-Regulators, die je nach Phosphorylierungsstatus zu aktiven und inaktiven Regulatoren führen.

Alle PRD-haltigen Regulatoren enthalten unabhängig von ihrer Größe und Funktion eine oder zwei N-terminale Effektor-domänen, die an RNA (bei Antiterminatoren) oder DNA (bei Transkriptionsaktivatoren) binden, sowie zwei regulatorische PRD-Domänen. In einigen PRD-Transkriptionsaktivatoren gibt es noch zusätzlich EIIA und EIIB ähnliche Domänen. So zeigt z. B. der C-Terminus des Transkriptionsaktivators MtlR von *Bacillus stearothermophilus* Sequenzähnlichkeit mit der EIIA-Domäne des Mannitol-Transporters (Henstra et al. 1999; Henstra, Duurkens & Robillard 2000). In LevR von *B. subtilis* sind die zwei PRDs nicht zusammenhängend, sondern durch eine NifA ähnliche Domäne getrennt, die mit dem  $\sigma^{54}$ -Faktor der RNA-Polymerase wechselwirkt und die Transkription des *lev*-Operons aktiviert (Martin-Verstraete et al. 1994). In der Abbildung 2-5 ist die Organisation von PRD-haltigen Antiterminatoren und Transkriptionsaktivatoren gezeigt.

### Antiterminator wie SacY, BglG, GlcT und LicT



### Transkriptionsaktivator wie LevR



### Transkriptionsaktivator wie LicR und MtlR

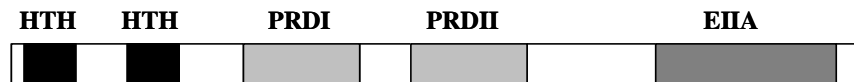


Abbildung 2-5. Organisation einiger PRD-Regulatoren. CAT: Co-Antiterminator; HTH: helix-turn-helix-Domäne; EIIA: EIIA ähnliche Domäne, NifA: NifA ähnliche Domäne.

#### 2.4.1 Die Effektdomäne

Alle PRD-Antiterminatoren gehören zu der BglG/SacY-Familie (Amster-Choder, Houman & Wright 1989; Schnetz, Toloczyki & Rak 1987). Die Proteine in dieser Familie haben eine typische RNA-Bindedomäne, die die sogenannte RAT-Sequenz (siehe auch 2.2.1) vor dem zu aktivierenden Gen erkennt, bindet und dadurch die Transkriptionstermination verhindert (Abbildung 2-2) (Aymerich & Steinmetz 1992). Diese RNA-Bindedomäne wird CAT (Co-Antiterminator) genannt. Bei der Bindung an eine RAT-Sequenz bilden zwei CAT-Domänen ein Dimer aus und stabilisieren die Faltung der RAT-Sequenz, die damit die Ausbildung des Transkriptionsterminators verhindert. Diese Dimerbildung und Bindung an RAT wurde bereits durch NMR-Spektroskopie von LicT und SacY bestätigt (van Tilbeurgh et al. 1997; Yang et al. 2002).

Die DNA-Bindedomäne in PRD-Transkriptionsaktivatoren enthält ein oder zwei HTH (helix-turn-helix)-Motive, die meist verwandt zu Transkriptionsregulatoren der DeoR-Familie sind (van Tilbeurgh & Declerck 2001). Die Mitglieder der DeoR-Familie fungieren meist als Transkriptionsregulatoren für Gene des Zucker- und Nukleotidmetabolismus von Bakterien und zeichnen sich durch das N-terminale HTH-Bindemotiv und der C-terminalen Cofaktor-Bindedomäne aus. Die Bindung eines Cofaktors an DeoR-Typ-Proteine verändert entweder die Konformation oder die Oligomerisierung des Proteins und damit die DNA-Bindeaktivität

des HTH Motivs, so dass in Folge das Zielgen aktiviert oder reprimiert wird. Bei *E. coli*-DeoR z. B. ist eine Oktamerbildung am Operator nötig, damit es die Transkription des *deo*-Operons reprimiert (Henikoff et al. 1988; Mortensen, Dandanell & Hammer 1989).

### 2.4.2 PRD-Domänen

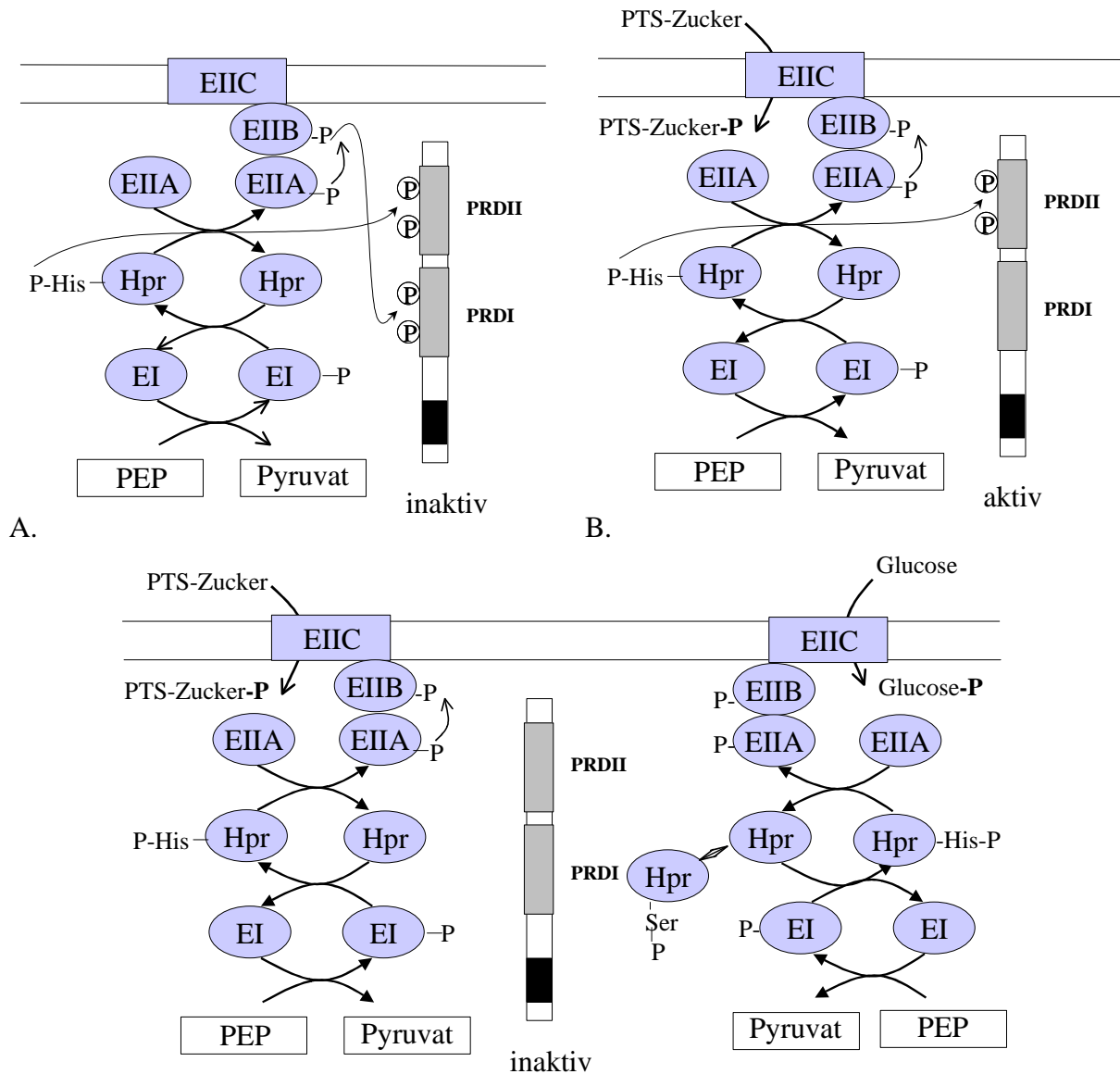
Die PRD-Domänen kommen in einer duplizierten Form in jedem PRD-Regulator vor und in jeder PRD befinden sich zwei konservierte Histidine als Phosphorylierungsstellen. Nach bisherigen Studien hat eine der beiden PRDs nach der Phosphorylierung eine stimulierende (in dieser Arbeit als PRDII definiert) und die zweite Domäne eine hemmende Wirkung (in dieser Arbeit als PRDI definiert) auf die Funktion des Transkriptionsregulators. Aus der Proteinsequenz allein lässt sich bisher nicht vorhersagen, welcher Domäne welche Funktion zuzuordnen ist.

Der PRD-haltige Regulator wird über den entsprechenden PTS-abhängigen Transporter kontrolliert. Wird zum Beispiel der  $EII^{Mtl}$  Transporter in *B. stearothermophilus* deletiert, kommt es zur konstitutiven Expression des von MtlR kontrollierten *mtl*-Operons (Martin-Verstraete et al. 1990; Tobisch, Stülke & Hecker 1999). Für diesen aktiven Zustand des Regulators muss die PRDI dephosphoryliert sein. Dies ist dann der Fall, wenn entweder Mannitol vorhanden ist und die Phosphatgruppe von  $EII^{Mtl}$  auf Mannitol übertragen wird statt auf die PRDI des Regulators, oder wenn eben der Transporter deletiert ist (Abbildung 2-6 B). Gleichzeitig muss PRDII phosphoryliert sein. Dies geschieht nach der gängigen Vorstellung durch HPr. Ist aber gleichzeitig noch Glucose vorhanden, tritt eine Katabolitrepession auf. Das Phosphat wird bei Zugabe von Glucose aus P-His-HPr direkt auf das  $EII^{Glc}$  übertragen und steht somit für die Phosphorylierung der PRDII nicht mehr zur Verfügung. So ist der PRD-Regulator inaktiv (Abbildung 2-6 C). Es ist allerdings bisher nicht endgültig geklärt, welches Enzym welche PRDs und EIIA und EIIB Domänen der Regulatoren phosphoryliert. *In vitro* Experimente zeigten jedoch, dass HPr in der Lage ist, die PRD-Regulatoren zu phosphorylieren, wobei nicht klar ist, ob nur PRDII von HPr phosphoryliert und dephosphoryliert wird. So könnten PRDI und PRDII von HPr phosphoryliert werden und von den jeweiligen Transportern wieder dephosphoryliert werden. Dagegen spricht, dass eine Transportermutante konstitutiv wird. Es ist daher davon auszugehen, dass die PRDI nur durch den jeweiligen Transporter aktiviert und deaktiviert wird. Im Falle der PRDII könnte HPr phosphorylieren und der Glucosetransporter dephosphorylieren (Gorke & Rak 1999; Martin-Verstraete et al. 1998).

Anstelle des Glucosetransporters könnte aber auch HPr allein für die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von PRDII verantwortlich sein. In Anwesenheit von PTS-Zucker und Glucose kommt es gleichzeitig zur Anhäufung von FBP in der Zelle. Dies führt zur Aktivierung der HPr-Kinase und schließlich zur Bildung von P-Ser-HPr. Dadurch verringert sich die Anzahl von P-His-HPr, das gleichzeitig auch noch die Phosphate über den Glucosetransporter auf Glucose übertragen muss. Somit stünde nicht mehr genügend Phosphat für die PRDII zur Verfügung und damit bliebe der Regulator im inaktiven Zustand (Stülke et al. 1998). Ausnahmen bilden hier SacY und GlcT von *B. subtilis*. So ist bei SacY von *B. subtilis* die Aktivierung des Antiterminators nicht HPr abhängig, obwohl die Phosphorylierung durch PEP, EI und HPr bereits *in vitro* an drei Histidine bestätigt wurde (Tortosa et al. 1997).

Zusammengefasst beteiligt sich der PRD-haltige Regulator an der Regulation des katabolischen Operons in zweierlei Weise: i) Induktion durch das eigene Substrat und ii) Katabolitrepression durch andere schnell verstoffwechselbare Zucker wie Glucose. Diese zwei Aspekte überschneiden sich und lassen sich schwer trennen. In Abbildung 2-6 ist die Regulation eines PRD-haltigen Regulators dargestellt.

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der zwei PRDs reguliert die DNA/RNA-Bindeaktivität der Effektordomäne und damit die Funktion des PRD-Regulators. Diese modulare Organisation von PRD-haltigen Regulatoren ist ähnlich wie die Organisation von Zweikomponenten-Systemen, indem der PRD-Regulator dem Antwortregulator und die PTS-Komponenten (HPr, EI oder EIIA, EIIBC) dem Sensor, d.h. der Histidinkinase im Zweikomponenten-System ähneln (Stock, Robinson & Goudreau 2000). Aber wie die Phosphorylierung/Dephosphorylierung die Aktivierung oder Inaktivierung des PRD-Regulators verursacht, ist noch nicht ganz geklärt. Die durch Phosphorylierung induzierten Konformationsveränderungen sind bisher nur für Eukaryontenproteine intensiv erforscht. In Bakterien wurde erstmals 2001 die 3D-Struktur einer PRD aufgeklärt und ein Model zur Regulation durch den Transkriptionsaktivator LicT vorgestellt (Graille et al. 2005; van Tilbeurgh, Le & Declerck 2001). In dem LicT-Model bleibt das inaktive LicT in einem lockeren und instabilen Dimer-Zustand. Die Phosphorylierung der Histidine an PRDII und die Dephosphorylierung an PRDI führen zu einer starken Konformationsveränderung, die das Dimer stabilisiert (Declerck et al. 2001). Danach fördert oder destabilisiert die Phosphorylierung/Dephosphorylierung der PRDs die Dimerbildung, die wiederum für die DNA/RNA-Bindung notwendig ist. Das könnte eine generelle Regel für die PRD-Regulatoren sein und wurde inzwischen bei *E. coli*-BglG bestätigt (Amster-Choder & Wright 1992).



C.

Abbildung 2-6. Aktiver und inaktiver Zustand eines PRD-Regulators

A. In Abwesenheit von Glucose und einem weiteren PTS-Zucker dominiert die Phosphorylierung der PRDs durch EIIA und EIIB des entsprechenden PTS-Zuckertransporters und HPr, daher ist der Regulator inaktiv. B. In Anwesenheit des PTS-Zuckers überträgt der Transporter die Phosphorylgruppe auf das Substrat. PRDI, die für einen aktiven Regulator dephosphoryliert sein muss, wird dann dephosphoryliert und PRDII, die für den aktiven Zustand phosphoryliert sein muss, bleibt weiter phosphoryliert. Unter diesen Umständen ist der Regulator aktiviert und es kommt nun zur Induktion des Zieloperons. C. In Anwesenheit von Induktor und Glucose befinden sich die beiden PRDs wegen Mangel an P-His-HPr im unphosphorylierten Zustand, da das Phosphat von P-His-HPr hauptsächlich auf EII<sup>Glc</sup> übertragen wird und ein Teil von HPr durch die ATP-abhängige Phosphorylierung am Serin-46 nicht an der Phosphatübertragung teilnehmen kann. Somit wird der PRD-haltige Regulator inaktiv.

### 2.4.3 EIIA- und EIIB-Domänen in Transkriptionsaktivatoren

In PRD-haltigen Transkriptionsaktivatoren wie *B. subtilis*-LicR und *B. stearothermophilus* - MltR folgen noch eine EIIA und eine EIIB ähnliche Domäne auf die zwei PRDs. Die EIIB-Domäne enthält ein Cystein und die EIIA-Domäne ein Histidin als potentielle Phosphorylierungsstelle. In beiden Regulatoren hatte die EIIA-Domäne eine hemmende Wirkung auf die Aktivität des Regulators, da der Austausch von Histidin in EIIA gegen ein nicht phosphorylierbares Alanin eine konstitutive Expression der entsprechenden Operons verursacht (Henstra, Duurkens & Robillard 2000; Tobisch, Stülke & Hecker 1999). Das Histidin in der EIIA-Domäne des Regulators wird experimentellen Befunden zu Folge durch entsprechende EIIA- bzw. EIICB-Komponenten des jeweiligen Transporters phosphoryliert.

In *B. subtilis* wurden bis jetzt vier PRD-Antiterminatoren (SacY, SacT, GlcT und LicT) und drei PRD-Transkriptionsaktivatoren (LicR, LevR, und MltR) identifiziert und experimentell bestätigt. Der Transkriptionsregulator ManR für das Mannose-Operon wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz dieser Familie zugeordnet.

## 2.5 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die Gene *manPA-yjdF* und *manR* in *B. subtilis* wurden bisher nur aufgrund ihrer Homologie zu anderen, im Mannoseabbau und Regulation involvierten Genen identifiziert. Ein experimenteller Nachweis stand bisher aus. In dieser Arbeit sollten daher die Funktion dieser Gene durch Deletionsanalyse bestätigt werden. Um die Regulation genauer untersuchen zu können, sollte ein Plasmid mit einem Reportergen konstruiert werden, in das die Promotoren von *manR* und *manPA-yjdF* inseriert wurden. Die Induktion des Reportergens sollte unter verschiedenen Induktionsbedingungen und in verschiedenen Stämmen mit Mutationen in Genen für Katabolitrepression und Mannosestoffwechsel untersucht werden.

ManR ist entsprechend seiner Aminosäuresequenz ein PRD-haltiger Transkriptionsregulator, der das Mannose-Operon reguliert. Es stellte sich zudem die Frage, ob ManR auch gleichzeitig ein Autorregulator ist, der seine eigene Transkription regulieren kann. Um dies zu untersuchen, sollten die beiden Promotoren auch molekularbiologisch näher untersucht werden. Insbesondere sollte der Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden sowie die Bindestelle des Regulators definiert werden. Weiterhin war eine potentielle *cre*-Sequenz im Promotor für *manR* als Ziel der Katabolitrepression von Interesse.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 3-1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i>		
K12 JM109	<i>mcrA recA1 supE44 endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]</i>	(Yanisch-Perron, Vieira & Messing 1985)
<i>B. subtilis</i>		
3NA	<i>spo0A3</i>	(Michel & Millet 1970)
QB5223	<i>trpC ptsH1</i>	von Prof. Stülke zur Verfügung gestellt (Martin-Verstraete et al. 1995)
QB5350	<i>trpC ptsH-H15A amyE::(levD'-lacZ aphA3)</i>	von Prof. Stülke zur Verfügung gestellt (Stülke et al. 1995)
TQ276	<i>spo0A3, ΔmanR::erm</i>	3NA transformiert mit pSUN276
TQ276_30	<i>spo0A3, ΔmanR::erm, hisI::spc</i>	TQ276 transformiert mit pHM30
TQ303	<i>spo0A3, ΔccpA::erm</i>	3NA transformiert mit pSUN303.3
TQ308	<i>spo0A3, ΔhprK::erm</i>	3NA transformiert mit pSUN308.3
TQ338	<i>spo0A3, Δcrh::erm</i>	3NA transformiert mit pSUN338.3
TQ338_S46	<i>trpC ptsH Δcrh::erm</i>	QB5223 transformiert mit pSUN338.3
TQ356	<i>spo0A3, ΔmanP::(erm)</i>	3NA transformiert mit pSUN356.7
TQ361	<i>spo0A3, cre-manR</i>	TQ276 transformiert mit pSUN361.3
TQ366	<i>spo0A3, ΔmanA::(erm)</i>	3NA transformiert mit pSUN366.1

Tabelle 3-2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Relevanter Genotyp	Referenz
pLA2	<i>araBp7-lacZ, tL3, attL, oriRg, kan</i>	(Haldimann & Wanner 2001)
pJOE4786.1	<i>amp</i>	Derivat von pJOE773 (Altenbuchner, Viell & Pelletier 1992)
pJOE5531.1	<i>rhaP-eGFP-tufA-ter, bla</i>	Derivat von pWA21 (Wegerer, Sun & Altenbuchner 2008)
pJOE6087.3	<i>rhaP-eGFP-6His, bla</i>	Derivat von pWA21 (Wegerer, Sun & Altenbuchner 2008)
pDG1730	<i>amyE'-spc-amyE', bla, erm</i>	(Guerout-Fleury, Frandsen & Stragier 1996)
pJOE6235.1	<i>rhaP-eGFP, tet, cat</i>	unveröffentlichte Arbeit von J. Altenbuchner
pMTLBS72	<i>repA, cmR, bla</i>	(Lagodich et al. 2005)
pHM174.1	<i>orf3'-repA, spc, amp</i>	unveröffentlichte Arbeit von H. Motejaded



pHM95	<i>orf2-repA-orf3'</i> , <i>cm</i> , <i>bla</i>	unveröffentlichte Arbeit von H. Motejadded
pKM1	<i>spc</i> , <i>ter-mtlR-PmtlA-lacZ-ter</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	unveröffentlichte Arbeit von Kambiz Morabbi Heravi

Tabelle 3-3 In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Relevanter Genotyp	Ursprungsvektor /Restriktionsenzym	Insertvektor /Restriktionsenzym
pSUN063.11	<i>manR</i> , <i>amy-lip</i> , <i>bla</i>	pJOE5533.2/ <i>MluI/XbaI</i>	PCRs4693/s4694 / <i>MluI/XbaI</i>
pSUN076.7	<i>manR-P<sub>manP</sub></i> , <i>amy-lip</i> , <i>bla</i> , <i>spc</i>	pHM174.1/ <i>PmeI</i>	pSUN063.11/ <i>PmeI</i>
pSUN151.1	<i>amp</i> , <i>cm</i>	pHM107.10/ <i>PmeI</i>	pMTLBs72/ <i>AflIII/NheI</i>
pSUN162.5	<i>amp</i> , <i>spc</i> , <i>cm</i>	pSUN151.1/ <i>EcoRI/SnaBI</i>	PCRs4833/s4835/ <i>EcoRI</i>
pSUN178.4	<i>manR</i> , <i>lys</i> , <i>kan</i>	pHM114.1/ <i>PmeI</i>	PSUN108.1/ <i>PmeI</i>
pSUN178.10	<i>manR</i> , <i>lys</i> , <i>kan</i>	pHM114.1/ <i>PmeI</i>	pSUN108.1/ <i>PmeI</i> (Insert in der anderen Orientierung)
pSUN228.1	<i>rhaP</i> , <i>lacZ</i> , <i>ter</i> , <i>bla</i>	pJOE5531.1/ <i>XmaI/NdeI</i>	pLA2/ <i>XmaI/NdeI</i>
pSUN235.1	<i>pT7</i> , <i>ter-lacZ-ter</i> , <i>bla</i>	pSUN228.2/ <i>MunI/AflIII</i>	Oligonukleotide s4956/4957/ <i>MunI/AflIII</i>
pSUN252.1	<i>spc</i> , <i>ter-lacZ-ter</i> , <i>amp</i>	pSUN235.1/ <i>MunI/Klenow</i>	pSUN162.5/ <i>PmeI/NotI</i>
pSUN259.4	<i>erm</i> , <i>amp</i>	pJOE4786-1/ <i>SmaI</i>	PCR s5069/s5070
pSUN263.1	<i>yjdB</i> , <i>amp</i>	pJOE4786-1/ <i>SmaI</i>	PCR s5077/s5078
pSUN264.4	<i>manP</i> , <i>amp</i>	pJOE4786-1/ <i>SmaI</i>	PCR s5079/s5080
pSUN269.4	<i>yjdB-erm</i> , <i>amp</i>	pSUN263.1/ <i>EcoRI</i>	pSUN259.4/ <i>EcoRI/MunI</i>
pSUN271.1	<i>spc</i> , <i>ter-lacZ-ter</i>	pSUN252.1/ <i>BspHI/HindIII</i>	
pSUN272.1	<i>spc</i> , <i>ter-lacZ-ter</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN271/ <i>MunI/SphI</i>	pHM95/ <i>EcoRI/SphI</i>
pSUN276.2	<i>yjdB'-erm-manP'</i> , <i>amp</i>	pSUN269.4/ <i>MluI/EcoRI</i>	pSUN264.4/ <i>MluI/EcoRI</i>
pSUN279.2	<i>spc</i> , <i>ter-manR-P<sub>manP</sub>-lacZ-ter</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN272.1/ <i>AflIII/NheI</i>	pSUN178.10/ <i>AflIII/NheI</i>
pSUN281	$\Delta$ <i>manA-lacZ-erm-yjdB</i> , <i>amp</i> , <i>spc</i>	pSUN277.1/ <i>BamHI/Klenow</i>	pDG1730/ <i>EcoRI/EcoRV/Klenow</i>
pSUN282	<i>manA'-lacZ-erm-yjdB</i> , <i>amp</i> , <i>spc</i>	pSUN278.3/ <i>BamHI</i>	pDG1730/ <i>EcoRI/EcoRV/Klenow</i>
pSUN284.1	<i>spc</i> , <i>ter-<math>\Delta</math>manR-P<sub>manP</sub>-lacZ-ter</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>NruI/SfoI/Klenow</i>	

pSUN286.3	<i>P<sub>manPΔ1</sub>-lacZ, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs4801/5203
pSUN287.6	<i>P<sub>manPΔ3</sub>-lacZ, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs4802/s5203
pSUN288.9	<i>P<sub>manR</sub>, spc, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCR s5208/s5209
pSUN289.3	<i>spc, ter-P<sub>manPΔ1</sub> lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>EcoRV/Nhe</i> I	pSUN286.3/ <i>EcoRV/Spe</i> I
pSUN290	<i>spc, ter-P<sub>manPΔ3</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>EcoRV/Nhe</i> I	pSUN287.6/ <i>Spe</i> I/ <i>EcoRV</i>
pSUN291	<i>spc, ter- P<sub>manR</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN272.1/ <i>Kpn</i> I/ <i>Afl</i> III	pSUN288.9/ <i>Kpn</i> I/ <i>Afl</i> III
pSUN295.3	<i>P<sub>manPΔ4</sub>-lacZ, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5262/s5203
pSUN296.1	<i>P<sub>manPΔ2</sub>-lacZ, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5263/s5203
pSUN297.5	<i>spc, ter-P<sub>manPΔ4</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>Nhe</i> I/ <i>EcoRV</i>	pSUN295.3/ <i>Nhe</i> I/ <i>EcoRV</i>
pSUN298.1	<i>spc, ter-P<sub>manPΔ2</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>Nhe</i> I/ <i>EcoRV</i>	pSUN296.1/ <i>Nhe</i> I/ <i>EcoRV</i>
pSUN299.1	<i>aroA, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5335/s5342
pSUN300.3	<i>ytxD, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5337/s5338
pSUN301.1	<i>aroA, erm, amp</i>	pSUN259.4/ <i>EcoRI/Bgl</i> III	pSUN299.1/ <i>Mun</i> I/ <i>Bg</i> III
pSUN302.1	<i>ytxD, spc, amp</i>	pSUN282/ <i>EcoRI/Kas</i> I	pSUN300.3/ <i>Mun</i> I/ <i>Kas</i> I
pSUN303.3	<i>aroA-erm-ytxD, amp, spc</i>	pSUN302.1/ <i>Bam</i> HI	pSUN301.1/ <i>Bam</i> HI
pSUN304.8	<i>nagA, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5343/s5344
pSUN305.1	<i>lgt, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5345/s5346
pSUN306.1	<i>nagA, spc, amp</i>	pSUN282/ <i>EcoRI/Kas</i> I	pSUN304.8/ <i>EcoRI/Kas</i> I
pSUN307.1	<i>lgt, erm, amp</i>	pSUN259.4/ <i>EcoRI/Bgl</i> III	pSUN305.1/ <i>EcoRI/Bgl</i> III
pSUN308.3	<i>nagA-erm-lgt, spc, amp</i>	pSUN306/ <i>Bam</i> HI	pSUN307.1/ <i>Bam</i> HI
pSUN311.1	<i>P<sub>manP</sub>-Strep-manR, amp, kan</i>	pSUN245.1/ <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III	pSUN309.1/ <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III
pSUN322.2	<i>manR', lys, kan</i>	pSUN178.10/ <i>Pvu</i> II	
pSUN324.2	<i>spc, ter-manR'-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>Afl</i> III/ <i>Nhe</i> I	pSUN322.2/ <i>Afl</i> III/ <i>Nhe</i> I
pSUN325.8	<i>yvcL, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5444/5445
pSUN326.17	<i>yvcN, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>Sma</i> I	PCRs5446/5447
pSUN330.1	<i>yvcL-erm-aroA, amp, spc</i>	pSUN303.3/ <i>Kas</i> I/ <i>Mun</i> I/	pSUN325.8/ <i>Kas</i> I/ <i>EcoRI</i>

pSUN338.3	<i>yvcL-erm-yvcN, amp, spc</i>	pSUN330.1 <i>MluI/BamHI</i>	pSUN326.17/ <i>MluI/BamHI</i>
pSUN345.1	<i>manR-lacZ-erm-manA, amp, spc</i>	pSUN282/ <i>KasI/EcoRI</i>	pSUN321.10/ <i>KasI/EcoRI</i>
pSUN350.1	<i>manR<sub>ΔEIIA</sub>-manP, amp</i>	pSUN264.4/ <i>MluI/BglII</i>	pSUN324.2/ <i>MluI/BglII</i>
pSUN351.3	<i>yjdB-manR<sub>ΔEIIA</sub>-manP, amp</i>	pSUN350.1/ <i>PmeI</i>	pSUN263.1/ <i>BamHI/EcoRI/Klenow</i>
pSUN353.4	<i>cre-manR, amp</i>	pJOE4786-1/ <i>SmaI</i>	PCRs5616/s4694
pSUN356.7	<i>manR' erm-manA', amp, spc</i>	pSUN345.1/ <i>XcmI/AflIII/Klenow</i>	
pSUN357.3	<i>cre-manR, amy-lip, bla</i>	pSUN063.11/ <i>BstBI/PsiI</i>	pSUN353.4/ <i>BstBI/PsiI</i>
pSUN359.1	<i>P<sub>manR</sub>-manR-Strep, kan, amp</i>	pSUN178.4/ <i>BstBI/XmaI</i>	pSUN246.1/ <i>BstBI/XmaI</i>
pSUN361.3	<i>yjdB'-cre-manR-manP', amp</i>	pSUN351.3/ <i>BglII/PsiI</i>	pSUN357.3/ <i>BglII/PsiI</i>
pSUN366.1	<i>ΔmanA-erm-yjdB, amp, spc</i>	pSUN281/ <i>XcmI/AflIII/Klenow</i>	
pSUN367.3	<i>manR<sub>ΔEIIBA</sub>, amyE-lip, bla, spc, repA</i>	pSUN076.7/ <i>XcmI/PvuII Klenow</i>	
pSUN368.2	<i>spc, ter-manR<sub>ΔEIIBA</sub>-P<sub>manP</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>AflIII/AgeI</i>	pSUN367.3/ <i>AflIII/AgeI</i>
pSUN369.2	<i>manR-mltR1, amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Fusionsregulator1 PCRs4693/s5835-1 (mit Fehler an <i>PmeI</i> )
pSUN370.1	<i>manR-mltR2, amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Fusionsregulator2 PCRs4693/s5835-2
pSUN371.11	<i>spc'-cre-P<sub>manR</sub>, amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	PCRs5208/s5209 (das linearisierte pSUN360.1 als Template)
pSUN372.3	<i>P<sub>manPΔ5</sub>-lacZ', amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	PCRs5861/s5203
pSUN373.2	<i>P<sub>manPΔ6</sub>-lacZ', amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	PCRs5862/s5203
pSUN377	<i>spc, ter-cre*-P<sub>manR</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2 / <i>KpnI/AflIII</i>	pSUN371.11/ <i>KpnI/AflIII</i>
pSUN379.4	<i>spc, manR-mltR2-P<sub>manP</sub>-lacZ, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN298.1/ <i>PmlI/NheI</i>	pSUN370.1/ <i>PmeI/SpeI</i>
pSUN380.1	<i>spc, ter-</i>	pSUN279.2/ <i>NheI/EcoRV</i>	pSUN372.3/ <i>SpeI/EcoRV</i>

	<i>P<sub>manPΔ5</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>		
pSUN381.1	<i>spc, ter-P<sub>manPΔ6</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>NheI/EcoRV</i>	pSUN373.2/ <i>SpeI/EcoRV</i>
pSUN382.10	<i>spc, manR-mtlR1-P<sub>manP</sub>-lacZ, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN298.1/ <i>PmlI/NheI</i>	pSUN388.1/ <i>PmeI/SpeI</i>
pSUN383.1	<i>spc, P<sub>manR</sub>-manR-Strep, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>MunI/XmaI</i>	pSUN359.1/ <i>MunI/XmaI</i>
pSUN384.1	<i>spc, ter-P<sub>manRΔ1</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>SacI/NheI</i>	PCRs5931/s5934/ <i>SacI/NheI</i>
pSUN385.2	<i>spc, ter-P<sub>manRΔ2</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>SacI/NheI</i>	PCRs5932/s5934/ <i>SacI/NheI</i>
pSUN386.9	<i>spc, ter-P<sub>manRΔ3</sub>-lacZ-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>SacI/NheI</i>	PCRs5933/s5934/ <i>SacI/NheI</i>
pSUN388.1	<i>manR-mtlR1, amp</i>	pSUN370.1/ <i>NheI/BsgI</i>	pSUN369.3/ <i>NheI/BsgI</i>
pSUN389.1	<i>rhaP-6His-manR, amp</i>	pJOE5751.1/ <i>BamHI/HindIII</i>	pSUN245.1/ <i>BamHI/HindIII</i>
pSUN390.1	<i>rhaP-manR-6His, amp</i>	pJOE6087.3/ <i>BamHI/NdeI</i>	pSUN246.1/ <i>BamHI/NdeI</i>
pSUN391	<i>spc, ter-P<sub>manR</sub>-manR-6His-ter, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>MunI/SmaI</i>	pSUN390.1/ <i>MunI/EcoRV</i>
pSUN392.16	<i>manR-mtlR3, amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Fusionsregulator3 PCRs4693/s5835-3
pSUN393.7	<i>manR-mtlR4, amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Fusionsregulator4 PCRs4693/s5835-4
pSUN396.5	<i>spc, manR-mtlR4-P<sub>manP</sub>-lacZ, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN298.1/ <i>NheI/PmlI</i>	pSUN393.7/ <i>SpeI/PmeI</i>
pSUN402.13	<i>spc, manR-mtlR3-P<sub>manP</sub>-lacZ, orf2-repA-orf3'</i>	pSUN298.1/ <i>NheI/PmlI</i>	pSUN392.16/ <i>SpeI/PmeI</i>
pSUN409.5	<i>spc'-P<sub>HPI</sub>-lacZ', amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Hybridpromotor-1 PCRs5208/s5203-1
pSUN410.30	<i>spc'-P<sub>HP2</sub>-</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Hybridpromotor-2

	<i>lacZ'</i> , <i>amp</i>		PCRs5208/s5203-2
pSUN411.1	<i>P<sub>HP1</sub>-lacZ</i> , <i>spc</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>KpnI/EcoRV</i>	pSUN409.5/ <i>KpnI/EcoRV</i>
pSUN412.1	<i>P<sub>HP2</sub>-lacZ</i> , <i>spc</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>KpnI/EcoRV</i>	pSUN410.30/ <i>KpnI/EcoRV</i>
pSUN413.1	<i>spc'</i> - <i>P<sub>HP3</sub>-lacZ'</i> , <i>amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Hybridpromotor-3 PCRs5208/s5203-3
pSUN414.22	<i>spc'</i> - <i>P<sub>HP4</sub>-lacZ'</i> , <i>amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Hybridpromotor-4 PCRs5208/s5203-4
pSUN416.2	<i>P<sub>HP3</sub>-lacZ</i> , <i>spc</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>KpnI/EcoRV</i>	pSUN413.1/ <i>KpnI/EcoRV</i>
pSUN417.1	<i>P<sub>HP4</sub>-lacZ</i> , <i>spc</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>KpnI/EcoRV</i>	pSUN414.22/ <i>KpnI/EcoRV</i>
pSUN418.1	<i>rhaP-manR<sub>1</sub></i> . <i>264-Strep</i> , <i>amp</i>	pJOE6615.1/ <i>BamHI/BglII</i>	
pSUN419.1	<i>rhaP-manR<sub>1</sub></i> . <i>1215-Strep</i> , <i>amp</i>	pJOE6628.2/ <i>BamHI/BglII</i>	
pSUN420.1	<i>spc'</i> - <i>P<sub>HP5</sub>-lacZ'</i> , <i>amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Hybridpromotor-5 PCRs5208/s5203-5
pSUN421.38	<i>spc'</i> - <i>P<sub>HP6</sub>-lacZ'</i> , <i>amp</i>	pJOE4786.1/ <i>SmaI</i>	Hybridpromotor-6 PCRs5208/s5203-6
pSUN422.1	<i>P<sub>HP5</sub>-lacZ</i> , <i>spc</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>KpnI/EcoRV</i>	pSUN420.1/ <i>KpnI/EcoRV</i>
pSUN423.2	<i>P<sub>HP6</sub>-lacZ</i> , <i>spc</i> , <i>orf2-repA-orf3'</i>	pSUN279.2/ <i>KpnI/EcoRV</i>	pSUN421.38/ <i>KpnI/EcoRV</i>
pSUN427.1	<i>rhaP-manR<sub>1</sub></i> . <i>534-Strep</i> , <i>amp</i>	pJOE6625.2/ <i>BamHI/BglII</i>	

## 3.2 Nährmedien und Antibiotika

### 3.2.1 LB<sub>0</sub> (Luria-Bertani)-Medium:

(LURIA, DAMS & TING 1960)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Wert auf 7,2 einstellen, autoklavieren

#### LB-Agar

LB-Medium wurde mit 1,6% (w/v) Agar versetzt und autoklaviert.

### 3.2.2 Trypton15-Medium

Trypton	15 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Wert auf 7,2 einstellen, autoklavieren

### 3.2.3 Minimalmedium für Transformation von *B. subtilis*

#### 3.2.3.1 MG-Minimalmedium (Spizizen's Medium)

(Harwood & Archibald 1990; Spizizen 1958)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g/l
Na-Citrat·2H <sub>2</sub> O	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
Glucose	5 g/l

Die anorganischen Substanzen wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 60°C wurde die steril filtrierte Glucose zugegeben.

#### 3.2.3.2 Medium I

Medium I wurde durch Zugabe von Casaminsäure zu 0,02 % und MgSO<sub>4</sub> zu 5 mM Endkonzentration zu MG hergestellt. Casaminsäure- (1 %) und MgSO<sub>4</sub>-Stocklösung (1 M) wurden bereits vorher steril filtriert.

#### 3.2.3.3 Medium II

Medium II wurde durch Zugabe von Casaminsäure zu 0,01 % und MgSO<sub>4</sub> zu 5 mM Endkonzentration in MG hergestellt. Casaminsäure- (1 %) und MgSO<sub>4</sub>-Stocklösung (1 M) wurden bereits vorher steril filtriert.

### 3.2.4 CMM-Minimalmedium

#### CMM-Salz (5 fach)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20,5 g
1 M MgSO <sub>4</sub> -Stocklösung	2,5 ml

Die vier Substanzen wurden in 1 l H<sub>2</sub>O gemischt, aufgelöst und autoklaviert.

CMM\*-flüssiges Medium

C-MM-Salz	20 ml
10 $\mu$ M MnSO <sub>4</sub>	0,1 ml
2,2 g/l Ammoniumeisencitrat	0,1 ml
1% Casaminsäure	5 ml
1% Hefeextrakt	2 ml
20% C-Quelle	2,5 ml

Die oben genannten Zutaten wurden getrennt autoklaviert oder steril filtriert, zusammengemischt und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt (\* steht für: mit Casaminsäure und Hefeextrakt.)

CSK\*-flüssiges Medium

C-MM-Salz	20 ml
10 $\mu$ M MnSO <sub>4</sub>	0,1 ml
2,2 g/l Ammoniumeisencitrat	0,1 ml
1% Casaminsäure	5 ml
1% Hefeextrakt	2 ml
20% Succinat-Na	3 ml
20% Glutamat-K	4 ml

Die oben genannten Zutaten wurden getrennt autoklaviert oder steril filtriert, zusammengemischt und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt (\* steht für: mit Casaminsäure und Hefeextrakt.)

CMM-Agarplatten

(für 400 ml-Platten)

Euro-Agar	6 g
H <sub>2</sub> O	310 ml

wurden autoklaviert und auf 60°C abgekühlt, dann wurden folgende sterile Zusätze (55°C) zur Agarlösung zugegeben.

C-MM-Salz	80 ml
10 $\mu$ M MnSO <sub>4</sub>	0,4 $\mu$ l
2,2 g/l Ammoniumeisencitrat	0,4 $\mu$ l
20% Mannose/Glucose	10 ml

### 3.2.5 Medium für Elektroporation von *B. subtilis*

#### LB-Sorbitol

	(für 100 ml)
Trypton	1 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O	75 ml

wurden gemischt, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde dann autoklaviert. Nach Abkühlen wurden 25 ml 2 M Sorbitol (steril filtriert) zugegeben.

#### Recovery-Medium

	(für 100 ml)
Trypton	1 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O	37 ml

wurden gemischt, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde dann autoklaviert. Nach Abkühlen wurden folgende sterile Zutaten zugegeben.

2 M Sorbitol	25 ml
1 M Mannitol	38 ml

### 3.2.6 Antibiotika-Zusätze

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 50% EtOH	100 µg/ml
Erythromycin	10 mg/ml in 50% EtOH	5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in 0,1 M NaOH	10 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml

Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach dem Autoklavieren der Medien.

## 3.3 Materialien

### 3.3.1 Lösungen und Puffer

TE 10.01 :	1 M Tris/HCl pH 8	10 ml
	0,5 M EDTA pH 8	0,2 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
TAE (50x)	Tris Base	242 g
	Eisessig	57,1 g



	EDTA	18,6 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
		pH auf 8,0 einstellen
TBE (50x)	Tris·Base	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA, pH 8,0	40 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Puffer G (Lysepuffer für Zellaufschluss)	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5	500 ml
	2 M NaCl	150 ml
	TritonX-100 (100%)	1 ml
	Glycerin (100%)	100 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
	1 M β-Mecarptoethanol (vor Gebrauch frisch zugegeben)	1 ml
Puffer H (Zur Bewahrung des Proteins)	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5	500 ml
	2 M NaCl	150 ml
	Glycerin (100%)	100 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
	1 M DTT (vor Gebrauch frisch zugegeben)	1 ml
Mobility-Shift-Puffer (2x)	1 M Tris-HCl, pH 7,5	4 µl
	1 M MgCl <sub>2</sub>	2 µl
	0,02 M EDTA	20 µl
	0,1 M DTT	10 µl
	Glycerin (100%)	40 µl
	10 mg/ml BSA	10 µl
	10 mg/ml Herring Sperm DNA	10 µl
	H <sub>2</sub> O	ad 1 ml
		bei -20°C gelagert
DNA-Probenauftragspuffer für Agarosegele (10x)	Bromphenolblau	0,025 g
	Xylencyanol FF	0,025 g
	Glycerin (100%)	3 ml
	H <sub>2</sub> O	7 ml
TSS	LB <sub>0</sub> (pH 6,5)	82,5 ml
	PEG 6000	10 g
	DMSO	5 ml
	2 M MgCl <sub>2</sub>	2,5 ml
		Autoklavieren und bei 4°C lagern
Lysepuffer für Biofeedback-Plasmid -Isolierung	Glucose·H <sub>2</sub> O	9,9 g
	1 M Tris/HCl pH 8,0	25 ml
	EDTA	3,72 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

	RNAse	10 µg/ml (vor Gebrauch frisch zugegeben)
Lysepuffer für Isolierung der chromosomalen DNA aus <i>B. subtilis</i>	1 M Tris HCl, pH8,0 EDTA Saccharose 10 mM Glycin H <sub>2</sub> O Lysozym (frisch zugegeben)	2,5 ml 0,372 g 10 g 5 ml ad 100 ml 20 mg/ml
10 x Formaldehyd-Agarosegel-Puffer	1 M MOPS, pH 7,0 3 M Natriumacetat 0,5 M (pH 8,0) H <sub>2</sub> O mit DEPC behandeln und autoklavieren	200 ml 16,5 ml 20 ml ad 1000 ml
Formaldehyd-Agarosegel-Laufpuffer	10 x Formaldehyd-Agarosegel-Puffer 37% (12,3 M) Formaldehyd H <sub>2</sub> O, DEPC behandelt	50 ml 10 ml ad 500 ml
RNA-Auftragspuffer (5 x)	Gesättigte Bromphenolblau-wässrige Lösung 0,5 M EDTA, pH 8,0 37% Formaldehyd 100% Glycerin Formamid 10 x Formaldehyd-Agarosegel-Puffer	20 µl 8 µl 72 µl 200 µl 300 µl 400 µl
Z-Puffer für Miller's Assay	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 M KCl 1 M MgSO <sub>4</sub> β-Mercaptoethanol H <sub>2</sub> O	60 ml 40 ml 5 ml 1 ml 2,7 ml ad 1000 ml bei 4°C lagern
10xSDS-PAGE-Laufpuffer:	Tris Base SDS Glycin H <sub>2</sub> O	30,2 g 10 g 188 g ad 1000 ml
5xSDS-PAGE-: Auftragspuffer	2 M Tris/HCl pH 6,8 20%SDS EDTA Bromphenolblau β-Mercaptoethanol 100% Glycerin H <sub>2</sub> O	6,25 ml 12,5 ml 0,146 g 0,05 g 2,5 ml 25 ml ad 50 ml bei -20°C lagern

5 x Auftragspuffer für natives Gel:	2 M Tris/HCl pH 6,8	6,25 ml
	EDTA	0,146 g
	Bromphenolblau	0,05 g
	β-Mercaptoethanol	2,5 ml
	100% Glycerin	25 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
		bei -20°C lagern
Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE:	Coomassie Brilliant Blue R250	2 g
	Methanol	50 ml
	Ethanol	425 ml
	Eisessig	100 ml
	H <sub>2</sub> O	425 ml
Entfärbelösung für SDS-PAGE	Ethanol (100%)	450 ml
	Eisessig (100%)	100 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
EP-Puffer für <i>B. subtilis</i> -Elektroporation	Glycerin (100%)	10 ml
	Sorbitol (2 M)	25 ml
	Mannitol (1 M)	50 ml
	Steriles H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### 3.3.2 Chemikalien und Enzyme

Amersham Bioscience (GE-Healthcare), Freiburg	Sequenzierungskit Superdex75
Biomaster, Windeck	Taq-DNA Polymerase
Bio-Rad-Laboratories, München	APS, TEMED, SDS-Längenstandard für Proteine, Bradford-Reagenzien
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Agar, Euro-Agar, Trypton
Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot	High-Fidelity DNA Polymerase
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz	DMSO, EDTA, Feinchemikalien
GE-Healthcare, Uppasala, Schweden	PD MidiTrap G-25 Gelfiltrationssäule
Millipore, Schwalbach	Amicon <sup>®</sup> Ultra-4 Ultrafiltrationssäule
Merck, Darmstadt	Feinchemikalien
New England Biolabs, Frankfurt am Main	Restriktionsendonukleasen, DNA-1kb-Marker
Promega, Mannheim	RNasin <sup>®</sup> -RNase Inhibitor, Pfu-DNA-Polymerase
Qiagen, Hilden	QIAquick PCR-Reinigungskit QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit DNeasy Blood & Tissue Kit RNeasy-Mini-Kit, Ni-NTA-Matrix
Roche Diagnostics, Mannheim	PCR and Gel Band Purification Kit, T4-DNA-Ligase, Restriktionsendonukleasen, Reverse Transkriptase (AMV), T7-DNA-Polymerase
Roth GmbH, Karlsruhe	Ampicillin, 30 % Acrylamid-, 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30), Ethanol p.a., Isopropanol, IPTG, Tris, Sucrose, dNTPs für PCR, Proteinstandard, RNase AWAY <sup>®</sup>

IBA GmbH, Göttingen	Strep-Tactin-Säule
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen	Feinchemikalien, Spectinomycin

### 3.3.3 Geräte

Amersham Bioscience (GE-Healthcare)	ALFexpress-Sequenzierer
Biometra	SDS-Gelkammern
Biozym	MiniCycler für PCR
Eppendorf	Zentrifuge für Eppendorfcups Thermomixer
Heat Sytem & Ultrasonics Inc., New York, USA	Sonicator W385
Hereaus	Sepatech Megafuge 1.0 Biofuge A
Molecular Dynamics	Phosphoimager
Pharmacia (GE-Healthcare).	SMART-Anlage
Renner GmbH	Gelkammern für Agarosegelelektrophorese
Thermo Scientific	GeneSys 10vis - Photometer

### 3.3.4 Oligonukleotide

hergestellt in Eurofins MWG (Ebersberg):

Oligo-nukleotid	Sequenz	Zweck
s4693	5'-AAA AAA ACG CGT GTT TAA ACT GAA TTT CTG CTG AAT ATA CA-3'	Amplifikation von <i>manR</i> aus Chromosom
s4694	5'-AAA AAA TCT AGA AAG TGT GAA TAA TAA GAT CTT G-3'	Amplifikation von <i>manR</i> aus Chromosom
s4801	5'-AAA AAA ACT AGT GTT TAA ACG ACA TTT TTA TCT CAT TTG GAT-3'	Amplifikation von $P_{manPA1}$
s4802	5'-AAA AAA ACT AGT GTT TAA ACA GGG AAA AAT GCC TTT ATT AC-3'	Amplifikation von $P_{manPA1}$
s4833	5'-AAA AAA GTT TAA ACC CCT GGC GAA TGG CGA T-3'	Amplifikation von <i>spc</i> aus plasmid pDG1730
s4835	5'-AAA AAA GAA TTC ATT AGA ATG AAT ATT TCC CAA AT-3'	Amplifikation von <i>spc</i> aus plasmid pDG1730
s4956	5'-AAT TGC GTC GAG ACC CCT GTG GGT CTC GTT TTT TGG ATC CGG CGC CCA CGT GGC TAG CC-3'	Insertion von <i>tufA</i> -Terminator
s4957	5'-TTA AGG CTA GCC ACG TGG GCG CCG GAT CCA AAA AAC GAG ACC CAC AGG GGT CTC GAC GC-3'	Insertion von <i>tufA</i> -Terminator
s5006	5'-Cy5-TAG CCT TTT TTA TAG TTG TTC AGC CAC TGT-3'	markierter Primer für Primer Extension
s5007	5'-Cy5-ATC CAC GCC ATA ATG CAT GCC GCC ATT AAT-3'	markierter Primer für Primer Extension
s5069	5'-AAA AAA GAA TTC GAT ATC AGA TCT ACG CGT TAA CCC GGG C-3'	Amplifikation von <i>erm</i> aus plasmid pDG1730

s5070	5'-AAA AAA CAA TTG AAT CGA TTC ACA AAA AAT AGG-3'	Amplifikation von <i>erm</i> aus plasmid pDG1730
s5071	5'-AAA AAA AGA TCT CAT GGC AGG GCT TGA GAA-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequence ( <i>yjdF</i> ) von <i>manA</i>
s5072	5'-AAA AAA GAA TTC TTA TTT ACC TCT GTG CTT CTT-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz ( <i>yjdF</i> ) von <i>manA</i>
s5073	5'-AAA AAA GGC GCC AAG CTA ATG GAT GAC AAT TAT A-3'	Amplifikation eines Teil von <i>manA</i> für partielle Deletion von <i>manA</i>
s5074	5'-AAA AAA CTT AAG CTT TTC CAA TCG CAT GAA CA-3'	Amplifikation eines Teil von <i>manA</i> für partielle Deletion von <i>manA</i>
s5077	5'-AGA TTA ATA AAC CGT TAC ATA TA- 3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>yjdB</i> ) von <i>manR</i>
s5078	5'-AAA AAA GAA TTC AAA ATA CTC CAA TTC TTC ACC-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>yjdB</i> ) von <i>manR</i>
s5079	5'-AAA AAA ACG CGT CAT TTT TAT CTC ATT TGG ATT AT-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz von <i>manR</i> (ein Teil von <i>manP</i> )
s5080	5'-AAA AAA GAA TTC CAG AAG GAA TCA TCC G-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz von <i>manR</i> (ein Teil von <i>manP</i> )
s5097	5'- <b>Cy5</b> -CAC TGT ACC CTA TCT GCG AAA-3'	markierter Primer für Primer Extension
s5098	5'- <b>Cy5</b> -ATT GAG ATA ATC CTC GAT CAC TT-3'	markierter Primer für Primer Extension
s5203	5'-GAT ATC CTG CAC CAT CGT C-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manP</sub>-lacZ'</i> zur Deletionsanalyse
s5208	5'-GGT ACC ATT TCT TGC TGA ATA-3'	Amplifikation von <i>P<sub>manR</sub></i> -Region aus pSUN279.2
s5209	5'-CTT AAG CCT GTC AGT ATC TAC TTG AG-3'	Amplifikation von <i>P<sub>manR</sub></i> -Region aus pSUN279.2
s5262	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACA AAA AGC GAT TTT AAT GAG CTG-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manP</sub>-lacZ'</i>
s5263	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACC TTG CTT TTT TTG TTA TAG GGA-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manP</sub>-lacZ'</i>
s5335	5'-AAA AAA CAA TTG GAT ATC CGT GAA AAA GCC AGT GC-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>aroA</i> ) von <i>ccpA</i>
s5337	5'-AAA AAA CAA TTG GGA TCC AAA GAG CAA GCT TCA CCT-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz ( <i>ytxD</i> ) von <i>ccpA</i>
s5338	5'-AAA AAA GGC GCC AGC ATA TGC GGG TCG TTT A-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz ( <i>ytxD</i> ) von <i>ccpA</i>
s5342	5'-AAA AAA AGA TCT CCT AAA ACC ACT CCT TTT AC-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>aroA</i> ) von <i>ccpA</i>
s5343	5'-GGC GCC TGC TGC CAC TTT TTG AAA-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>nagA</i> ) von <i>hprK</i>
s5344	5'-GAA TTC GGA TCC AAA CAC GAT ATG TTC CTC CT-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>nagA</i> ) von <i>hprK</i>
s5345	5'-AAA AAA AGA TCT ACG CGT TAG	Amplifikation der stromabwärts

	GAG TTG GCG TTA AAT GA-3'	Sequenz ( <i>lgt</i> ) von <i>hprK</i>
s5346	5'-AAA AAA GAA TTC GAT ATC GTC AGT CCG CAT TCC TTC A-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz ( <i>lgt</i> ) von <i>hprK</i>
s5362	5'-ACT AGT GAA TTC CTT TTC CAA TCG CA-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz von <i>manP</i> (ein Teil von <i>manA</i> )
s5363	5'-ACTAGTGAATTCCTTTTCCAATCGCA- 3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz von <i>manP</i> (ein Teil von <i>manA</i> )
s5444	5'-AAA AAA GGC GCC GAA GTA TTT CGA AAG AGC T-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>yvcL</i> ) von <i>crh</i>
s5445	5'-AAA AAA GAA TTC ATA AGA TCT CCC CTT TTC TTT-3'	Amplifikation der stromaufwärts Sequenz ( <i>yvcL</i> ) von <i>crh</i>
s5446	5'-AAA AAA ACG CGT GTG ATA AAA ATG AGT GAC TTT-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz ( <i>yvcN</i> ) von <i>crh</i>
s5447	5'-AAA AAA GGA TCC TTC ACG TTA CAA AAA ATG AGT-3'	Amplifikation der stromabwärts Sequenz ( <i>yvcN</i> ) von <i>crh</i>
s5616	5'-TTA TAA TG CTA TAG G TGT ACA ATA TAG TAT ACT TAT ACT ATC AAT-3'	Amplifikation von <i>manR</i> aus Chromosom mit Mutation an <i>cre</i> - Sequenz
s5833	5'-TTC TTT GAG CTG AAA TAA GAT GCG-TTC TTT CGT CAC AAA GTC TA-3'	Amplifikation vom ersten Teil des Fusionsregulators 1
s5834	5'-GAA GTA GAC TTT GTG ACG AAA GAA-CGC ATC TTA TTT CAG CTC AA-3'	Amplifikation vom zweiten Teil des Fusionsregulators 1
s5835	5'-AAAAAA ACT AGT TTA CAG TAT GTT TTT TTC TTT CA-3'	Amplifikation vom zweiten Teil des Fusionsregulators 1
s5836	5'-TTT GCT TCT TCT TTT TTG ATT TCA AGCGC TGC CTG AAA ATG CAA T-3'	Amplifikation vom ersten Teil des Fusionsregulators 2
s5837	5'-GAC ATT GCA TTT TCA GGC AGC G- CTT GAA ATC AAA AAA GAA GAA G-3'	Amplifikation vom zweiten Teil des Fusionsregulators 2
s5861	5'-ACT AGT GTT TAA ACT TTA TTA CCG GAA CCT ATG-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manP</sub>-lacZ'</i>
s5862	5'-ACT AGT GTT TAA ACC TAT GGT AAA AAA AGC GA-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manP</sub>-lacZ'</i>
s5931	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACA TAG CAA ACT CAA AGA GTA-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manR</sub>-lacZ'</i>
s5932	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACA GTA TAA AAA TCG CTT TTT TCC-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manR</sub>-lacZ'</i>
s5933	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACC GGA AGC TTC GGT AAA AA-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manR</sub>-lacZ'</i>
s5934	5'-GTG CAG GAG CTC GTT ATC-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>P<sub>manR</sub>-lacZ'</i>
s6037	5'-AAA AAA GGA TCC CAT ATG GCA CAA AAA ACA TTT AAA G-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>ptsHI</i> aus Chromosom
s6038	5'-AAA AAA CCC GGG GGA TCC TTA CTT GAA TGT TTC TTT TAC G-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>ptsHI</i> aus Chromosom
s6214	5'-T CAT TAA AAT CGC TTG AAA GTA AAG AGG ACT TTG-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>spc'-mtl-</i>

		<i>Operator (P<sub>HP1</sub>-1)</i>
s6215	5'-T CTT TAC TTT CAA GCG ATT TTA ATG AGC TGA TTT-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>manP</i> - <i>Promotor-lacZ'</i> ( <i>P<sub>HP1</sub>-2</i> )
s6216	5'-CA GCT CAT TAA AAT TTG AAA GTA AAG AGG ACT TTG-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>spc'-mtl</i> - <i>Operator (P<sub>HP2</sub>-1)</i>
s6217	5'-CTT TAC TTT CAA ATT TTA ATG AGC TGA TTT CGG T-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>manP</i> - <i>Promotor-lacZ'</i> ( <i>P<sub>HP2</sub>-2</i> )
s6244	5'- <b>Cy5</b> -AGG GAA AAA TGC CTT TAT TAC CGG AAC CTA TGG TAA AAA AAG CGA TTT TA-3'	DNA für Mobility-Shift
s6245	5'-TAA AAT CGC TTT TTT TAC CAT AGG TTC CGG TAA TAA AGG CAT TTT TCC CT-3'	DNA für Mobility-Shift
s6268	5'-AG CTC ATT AAA ATC TTG AAA GTA AAG AGG ACT TTG-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>spc'-mtl</i> - <i>Operator (P<sub>HP3</sub>-1)</i>
s6269	5'-T CTT TAC TTT CAA GAT TTT AAT GAG CTG ATT TCG-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>manP</i> - <i>Promotor-lacZ'</i> ( <i>P<sub>HP3</sub>-2</i> )
s6270	5'- ATC AGC TCA TTA AAA TTG AAA GTA AAG AGG ACT TTG-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>spc'-mtl</i> - <i>Operator (P<sub>HP4</sub>-1)</i>
s6271	5'-CTT TAC TTT CAA TTT TAA TGA GCT GAT TTC GGT A-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>manP</i> - <i>Promotor-lacZ'</i> ( <i>P<sub>HP4</sub>-2</i> )
s6339	5'- T CAG CTC ATT AAA TTG AAA GTA AAG AGG ACT TTG-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>spc'-mtl</i> - <i>Operator (P<sub>HP5</sub>-1)</i>
s6340	5'-T CTT TAC TTT CAA TTT AAT GAG CTG ATT TCG GTA T-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>manP</i> - <i>Promotor-lacZ'</i> ( <i>P<sub>HP5</sub>-2</i> )
s6341	5'- A TCA GCT CAT TAA TTG AAA GTA AAG AGG ACT TTG-3'	rückwärts Primer für Amplifikation von <i>spc'-mtl</i> - <i>Operator (P<sub>HP6</sub>-1)</i>
s6342	5'-T CTT TAC TTT CAA TTA ATG AGC TGA TTT CGG TAT A-3'	vorwärts Primer für Amplifikation von <i>manP</i> - <i>Promotor-lacZ'</i> ( <i>P<sub>HP6</sub>-2</i> )

## 3.4 Kultivierungsbedingungen der Bakterien

### 3.4.1 Anzucht und Induktion von *E. coli*:

Für Plasmidisolierungen und Vorkulturen wurden Übernachtkulturen in Glasröhrchen mit LB-Medium angelegt (2 ml oder 5 ml, je nach Methode), die mit Einzelkolonien beimpft und bei 37°C im Roller inkubiert wurden. Für Experimente zur Genexpression wurden dann die Vorkulturen in einer 1:100 Verdünnung überimpft in Erlenmeyerkolben. Bei plasmidtragenden Derivaten wurde zur Selektion ein Antibiotikum zugegeben. Die Hauptkulturen wurden dann, wenn nicht anders angegeben, nach dem Beimpfen bei 37°C im Brutraum auf dem Schüttler (180-200 rpm) angezogen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,2% Rhamnose (für Rhamnose induzierbare Vektoren) in früher exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ). Nach der Induktion wurden die Kulturen je nach Stamm entweder bei 30°C oder bei 22°C weiter geschüttelt. Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte bei 37°C.

### 3.4.2 Anzucht und Induktion von *B. subtilis*:

Die *B. subtilis*-Stämme wurden für Plasmidisolierungen oder Vorkulturen in Glasröhrchen mit 5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C ÜN im Roller inkubiert. Für Genexpression in Vollmedium wurden die Vorkulturen in 10 ml LB-Medium in einer 1:100 Verdünnung überimpft. Bei plasmidtragenden Derivaten wurde zur Selektion ein Antibiotikum zugegeben. Die Hauptkulturen wurden in Schüttelkolben mit Schikanen bei 37°C auf dem Schüttler (200 rpm) angezogen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,2 % Mannose (für Mannose induzierbare Vektoren) oder 0,2 % Mannitol (für Mannitol induzierbare Vektoren) in früher exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ). Nach der Induktion wurden die Kulturen weiter bei 37°C geschüttelt.

Für die Wachstumskinetik in Minimalmedium mit verschiedenen Zuckern als einzige C-Quelle wurde zuerst eine Vorkultur mit Einzelkolonien in 5 ml CSK\*-Medium angeimpft und ÜN bei 37° im Roller inkubiert. Die Übernachtkultur wurde dann abzentrifugiert und das Pellet mit CMM-Medium ohne C-Quelle gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in CMM-Medium resuspendiert und in verschiedenen CMM\*-Medien (jeweils mit 0,5% Zucker als C-Quelle) überimpft, damit alle Hauptkulturen die gleiche anfängliche optische Dichte hatten.



Die Anzucht auf LB-Agarplatten erfolgte bei 37°C für einen Tag und die Anzucht auf Minimal-Agarplatten wurde zwei Tage bei 37°C durchgeführt.

## 3.5 Arbeiten mit DNA

### 3.5.1 Isolierung der DNA

#### 3.5.1.1 Biofeedback-Plasmidisolierung:

Diese Methode ist nach Lee und Rasheed's Methode modifiziert (Lee & Rasheed 1990). Eine *E. coli*-Übernachtskultur in 2 ml LB-Medium wurde 5 min bei 4.500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Lysepuffer auf dem Vortex resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte eine alkalische Lyse durch Zugabe von 300 µl 0,2 M NaOH / 1 % SDS. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 400 µl gekühltes 7,5 M Ammoniumacetat, pH 7,5 zugesetzt, erneut gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde wiederum abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm) und einmal mit 50 µl 100% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl TE10.01 aufgenommen.

#### 3.5.1.2 Plasmidisolierung mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit

Für die Klonierung, Sequenzierung und Lagerung der DNA (-20°C) erfolgte die DNA-Isolierung mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit nach den Anweisungen des Herstellers. Für Plasmidisolierung aus *B. subtilis* wurden die Zellen zuerst mit 4 mg/ml Lysozym in Puffer 1 30 min bei 37°C behandelt und dann wurden die weiteren Schritten nach den Anweisungen durchgeführt.

#### 3.5.1.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis* mit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

Die Isolierung der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (QIAGEN). Hierzu wurde eine 4 OD<sub>600</sub> entsprechende in LB gewachsene Übernachtskultur 5 min bei 4.500 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in

180 µl Lysepuffer (mit 20 mg/ml Lysosym) resuspendiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

### 3.5.2 PCR

#### 3.5.2.1 Amplifikation von DNA

Um Gene aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* zu amplifizieren sowie Gene mit neuen Restriktionsschnittstellen zu versehen, wurde die Polymerase Chain Reaction (PCR) durchgeführt. Dazu wurden die PfuUltra High Fidelity Polymerase von Promega oder High Fidelity Polymerase von Fermentas verwendet. Die PCR-Ansätze setzten sich für 100 µl Reaktionsvolumen wie folgt zusammen.

Reaktionsansätze	H <sub>2</sub> O	ad 100 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
	DNA-Polymerase	1 µl
	10x- Reaktionspuffer (mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 µl
	Template-DNA (je nach Konzentration verdünnen)	1 µl
	DMSO	0-10 µl
	Primer 1 (100 pmol/µl)	1 µl
	Primer 2 (100 pmol/µl)	1 µl

Die Zusätze wurden gemischt und die PCR im Minicycler™ gestartet. Zunächst wurde die dsDNA bei 100 °C für 3 min denaturiert. Dann folgten 30 Zyklen, die mit dem Annealing der Oligonukleotide startet. Die Annealing-Temperatur hängt von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide ab und liegt circa 5°C niedriger als diese. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Ansätze noch 10 min bei 72 °C inkubiert, um noch unvollständige Doppelstränge aufzufüllen.

Programm:	1x	3 min	100°C hot start
	30x	1 min	Annealingtemperatur
		1 min	72°C Extension
		1 min	92°C Denaturierung
	1x	10 min	72°C Endpolymerisation

Als Kontrollen dienten Reaktionsansätze mit jeweils einem einzelnen Primer. Nach der PCR-Reaktion wurden 5 µl jedes Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und die Amplifikation mit Gelelektrophorese überprüft.

### 3.5.2.2 Fusions-PCR

Um zwei amplifizierte Gene ohne Veränderung der originalen Sequenz zu fusionieren, wurden Fusions-PCRs durchgeführt. Zuerst wurden die zwei zu fusionierenden Fragmente jeweils durch PCR amplifiziert, wobei der rückwärts Primer eines zu amplifizierenden Fragmentes (Fragment 1) zu dem vorwärts Primer des anderen zu amplifizierenden Fragmentes (Fragment 2) zum Teil komplementär ist (Abbildung 3-1). Die zwei PCR-Produkte wurden durch Agarose-Elektrophorese aufgereinigt im Verhältnis 1 zu 1 zusammengemischt. Es folgten 10 Zyklen Amplifikationsreaktionen, bei der keine weiteren Primer zugesetzt wurden und die Fragmente aufgrund der Überlappung durch die DNA-Polymerase verlängert wurden. Die Annealingtemperatur dafür wurde aus der Schmelztemperatur der überlappenden Region der beiden Fragmente berechnet. Danach wurden der vorwärts Primer des Fragmentes 1 und der rückwärts Primer des Fragmentes 2 zu dem PCR-Ansatz zupipettiert und 20 Zyklus Amplifikationsreaktionen gestartet, in den die Annealingtemperatur für die zugegebenen Primer eingestellt wurde und die zwei bereits hybridisierten und verlängerten PCR-Fragmente als PCR-Template dienten.

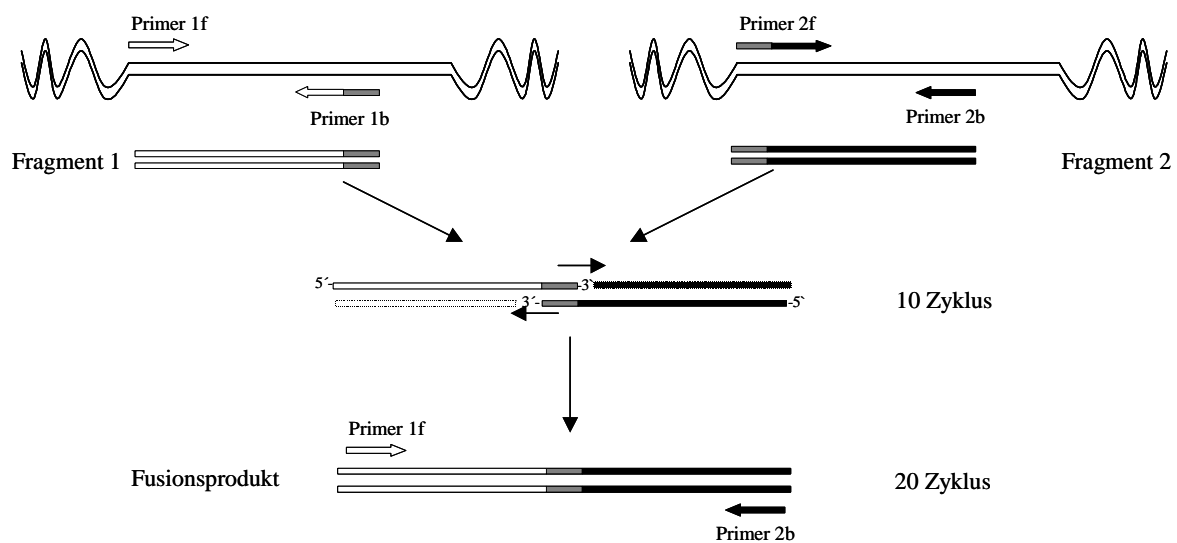


Abbildung 3-1 Fusion-PCR

### 3.5.2.3 Kolonie-PCR

Das *B. subtilis* Chromosom wurde durch Insertionen und Deletionen verändert. Um diese chromosomalen Veränderungen schnell zu überprüfen, wurde die PCR mit der aus Einzelkolonien isolierten DNA als Template durchgeführt. Zur Durchführung der PCR wurde wenig Zellmaterial von Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher direkt in 30 µl steriles

Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann nacheinander bei 105°C 15 min, 4°C 1 min, 105°C 1 min und 4°C 1 min abwechselnd im Minicycler™ erhitzt und abgekühlt. Danach wurde die Suspension bei 13.000 rpm 5 min abzentrifugiert. 10 µl des Überstands wurde im PCR-Ansatz als Template eingesetzt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und der Ablauf waren ähnlich wie in 3.5.2.1. Für die Kolonie-PCR wurde die robustere Taq-Polymerase anstatt der HF-Polymerase verwendet. Das PCR-Produkt wurde durch die Agarose-Elektrophorese analysiert.

#### 3.5.2.4 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des Qiaquick-Kits über eine Säule laut Herstellerangaben gereinigt.

#### 3.5.3 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA

Jeweils 2 µl der isolierten Plasmid-DNA, bzw. PCR-DNA (ca. 0,5 µg), wurden mit 1 µl des 10x konzentrierten Restriktionspuffers und 1 µl Restriktionsenzym (3-5 U) mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und bei den vorgeschriebenen Temperaturen für 1-2 Stunden inkubiert. War der Restriktionsverdau mit zwei Enzymen notwendig, wurde die DNA zwischen den einzelnen Verdaus mit Isopropanol gefällt.

#### 3.5.4 Isopropanol-Fällung von DNA

10 µl des Restriktionsansatzes wurden dazu mit 1 µl 3 M NaAc-Puffer (pH 6,2) und 10 µl Isopropanol versetzt, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 13000 rpm in der Eppendorffzentrifuge bei RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 µl 100% EtOH gewaschen. Das Pellet wurde 10 min bei 37°C getrocknet und in TE 10.01 aufgenommen.

#### 3.5.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese handelt es sich um eine Methode, mit der man DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennt. In dieser Arbeit wurde die DNA in 0,7-1,4%iger Agarose aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in 1xTAE aufgeköcht, nach leichtem Abkühlen wurden 2 µl (für kleine 50 ml-Gele) bzw. 4 µl (für große 100 ml-Gele) Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, und die Lösung in eine Gelkammer gegossen bis die Agarose erstarrte. Die DNA wurde mit 10x Auftragspuffer versetzt und in 1xTAE-Laufpuffer mit Ethidiumbromid aufgetrennt. 5 µl 1kb-DNA-Leiter wurde immer als

Größenstandard mit aufgetragen. Lange Gele liefen bei einer Spannung von 100-120 mV, kurze mit 80 mV. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht.

### **3.5.6 Reinigung von Genfragmenten über Gelelution**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel (es ist wichtig, frischen Laufpuffer zu verwenden) wurden die interessierenden Banden unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells knapp ausgeschnitten. Mit dem "PCR and Gel Band Purification Kit" der Firma GFX oder Roche wurden die DNA-Fragmente nach den Anweisungen des Herstellers aus dem Gel eluiert.

### **3.5.7 Ligation**

Zur Klonierung wurden jeweils die geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente mit 2 µl 10 fach Ligasepuffer (mit ATP), 1 µl T4-Ligase und Wasser auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht inkubiert. Bei überstehenden Enden wurde die Inkubation bei 4°C durchgeführt, bei glatten Enden bei RT.

### **3.5.8 Hybridisierung der Oligonukleotide**

Zur Insertion von kurzen DNA-Sequenzen in Plasmide wurden die zwei komplementären Oligonukleotide zuerst nach der Anweisung des Herstellers gelöst (100 pmol/µl). Vor der Ligation wurden die zwei komplementären Oligonukleotide im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach 3 Minuten Kochen wurde das Gemisch zuerst für 10 Minuten bei 65°C, dann für 10 Minuten bei 37°C und schließlich für 30 Minuten auf RT abgekühlt. 1 µl des Gemisches wurde zur Ligation eingesetzt.

### **3.5.9 Behandlung mit alkalischer Phosphatase**

Die verwendete alkalische Phosphatase stammt aus Kälber (Roche). Das Enzym verbessert die Klonierungseffizienz, da durch eine Behandlung des linearisierten doppelsträngigen Vektors die 5'-Phosphatgruppe entfernt und somit eine Religation des Vektors verhindert wird.

Die Vektor-DNA wurde nach Restriktionsverdau mit Isopropanol gefällt und in 8 µl TE10.01 Puffer resuspendiert. Dann wurde die DNA mit 1 µl der hochkonzentrierten alkalischen Phosphatase (20U/µl) und 1 µl 10xPhosphatasepuffer versetzt, gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die behandelte DNA wurde für die Ligation mit einem Fragment durch Agarose-Eletrophorese gereinigt.

### 3.5.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach Sanger's Methode (Sanger, Nicklen & Coulson 1977) mit am 5'-Ende Cy5 markierten Primern auf ALFexpress-Sequenzierautomat (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Pro Sequenzierreaktion wurde 5-10 µg Plasmid-DNA nach Isopropanolfällung in 10 µl destilliertes Wasser aufgenommen und mit 2 µl am 5'-Ende Cy5 markierten Sequenzierprimer (10 µM) und 1,5µl 1 M NaOH versetzt. Das Gemisch wurde 5 min bei 65°C inkubiert und kurz im 37°C-Wasserbad abgekühlt. Danach wurden 1,5 µl 1 M HCl und 2 µl Annealing Buffer aus dem AutoRead Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben und 10 min bei 37°C und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Folgend wurden 1 µl Extension Buffer und 3,5 µl DMSO zum Gemisch pipettiert. Je 5,4 µl dieses Gemisches wurden auf vier Reaktionsgefäße verteilt, in denen je 2 µl Enzymmix (1 µl T7-DNA-Polymerase von 4 U/µl + 1 µl Puffer) und 3 µl ddNTP-Mixes (jeweils ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP mit anderen drei dNTPs) vorgelegt und vor Reaktionsanfang mindestens 30-60 sec bei 37°C inkubiert wurden. Alle Reaktionsansätze wurden 5 min bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 6 µl Stopplösung zugegeben und 3 min bei 80°C erhitzt. Die Aufbewahrung der Proben vor Analyse erfolgte auf Eis.

Das Sequenziergel wurde nach Angaben der Firma Amersham Pharmacia (heute GE-Healthcare) gegossen. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Je 5 µl von jeder Sequenzierreaktion wurden auf das Sequenziergel aufgetragen und auf ALFexpress-Sequenzierautomaten (Amersham Pharmacia, Freiburg) analysiert.

## 3.6 Arbeiten mit RNA

### 3.6.1 RNase-freie Arbeit

Bei Umgang mit RNA ist darauf zu achten, dass die Umgebung und alle verwendeten Materialien RNase frei sind. Alle Schritte wurden mit Handschuhen durchgeführt. Alle Lösungen und Glaswaren, die im Arbeiten mit RNA gebraucht wurden, wurden vorher mit 0,1% DEPC versetzt und bei 37°C ÜN behandelt, dann autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Geräte, Gefäße und Arbeitsflächen wurden mit RNase AWAY<sup>®</sup> gewischt, um eine RNase-freie Umgebung zu garantieren.

### 3.6.2 Isolierung der RNA

2 x 10 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin wurden mit Übernachtskultur 3NA pSUN178.4 1:50 angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 wurde eine der beiden Kulturen mit 0,2% Mannose induziert, die andere Kultur blieb ohne Induktor. Die beiden Kulturen wurden weiter 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die OD<sub>600</sub> von beiden Kulturen bestimmt. Die ca. 1 OD<sub>600</sub> entsprechende Menge an Zellen wurde jeweils aus beiden Kulturen abgenommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Pipette abgeführt, damit das Restvolumen vom Pellet nicht 80 µl überschritt. Anschließend wurden 100 µl TE 10.01 mit 4 mg/ml Lysozym zum Pellet zugegeben und bei 37°C 15 min auf einem Hitzblock geschüttelt. Die gesamte RNA wurde dann mit QIAGEN-RNeasy-Mini-Kit isoliert. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

### 3.6.3 Formaldehyd-Agarosegel (FA)-Elektrophorese

Die mit dem RNeasy-Mini-Kit isolierte RNA wurde auf ein 1,2 %-iges Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen, um die Qualität der RNA zu überprüfen. Dazu wurde 0,6 g Agarose in 45 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 5 ml FA-Puffer (10 x) aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Danach wurde 0,9 ml 37% Formaldehyd zugesetzt und die Lösung in eine Gelkammer gegossen, bis die Agarose erstarrte. Das Gel wurde zuerst in FA-Laufpuffer 30 min equilibriert. Dann wurden ca. 3 µg RNA mit 5x RNA-Auftragspuffer versetzt, bei 65°C 15 min erhitzt, danach sofort auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Das kleine FA-Gel wurde zuerst 5 min bei 100 V, danach bei 60 V aufgetrennt, bis die Front ca. zwei Drittel der Gellänge erreichte. Die Färbung des FA-Gels erfolgte 1 h bei RT in 200 ml FA-Laufpuffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid auf dem Schüttler. Dann wurde das FA-Gel unter UV fotografiert.

### 3.6.4 Isopropanolfällung der RNA

Eine bestimmte Menge RNA wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und dazu 10 µl 3 M NaAc pH 6,3 und 220 µl 100% EtOH zugegeben. Das Gemisch wurde dann 2 h (oder ÜN) bei -20°C inkubiert und danach 10 min bei 13200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig mit der Pipette abgenommen und das Pellet 2 x mit 100 µl EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde zum Schluss in 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.6.5 Primer Extension

Vier am 5'-Ende mit Cy5 markierte Primer wurden nach der Sequenz des Plasmids pSUN178.4 entworfen. Die Primer wurden jeweils auf 100 pmol/ $\mu$ l in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und dann auf 10 pmol/ $\mu$ l verdünnt. Die Gesamt-RNA wurde aus *B. subtilis*-Stamm 3NA pSUN178.4 wie in 3.6.1 beschrieben isoliert und für jede Reaktion wurden ca. 30  $\mu$ g RNA mit Isopropanol wie in 3.6.4 gefällt und in 5  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die 5  $\mu$ l RNA wurde mit 0,5  $\mu$ l RNasin® (Promega, 40 U/ $\mu$ l) versetzt und 3 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur Hybridisierung wurden 0,5  $\mu$ l Primer (10 pmol/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l 5-fach AMV-RT-Puffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 20 min bei der Primerspezifischen Hybridisierungstemperatur (in dieser Arbeit 56°C). Danach wurden die entstandenen DNA-RNA-Hybride langsam auf RT abgekühlt. Zu den DNA-RNA-Hybriden wurden 1  $\mu$ l dNTP (10 mM) und 1  $\mu$ l AMV-Reverse Transcriptase (20 U/ $\mu$ l) zupipettiert und 1 h bei 42 °C inkubiert. Zum Stoppen der reversen Transkription wurden die Reaktionsansätze mit 5  $\mu$ l Stopplösung aus dem AutoRead Sequencing Kit (Amershan Pharmacia Biotech) versetzt und bei 80°C 3 min gekocht. Die Reaktionsansätze wurden vor der Analyse bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt. Für die Analyse auf einem Sequenziergel mit dem ALFexpress Sequenzierer wurden 5  $\mu$ l pro Reaktion aufgetragen. Als Grössenstandard dienten jeweils die Sequenzierreaktionen, die mit Plasmid-DNA pSUN178.4 und mit denselben Primern durchgeführt wurden, die auch im Primer-Extension Experiment ihre Anwendung fanden.

## 3.7 Transformation

### 3.7.1 Transformation von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde immer der Stamm *E. coli* K12 JM109 zur Transformation verwendet. Je nach Bedarf wurden 20 oder 40 ml LB-Medium 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 erreicht war. Die Zellen wurden 10 min bei 4500 rpm und 4°C in einer Sorvall-Kühlzentrifuge im SS34 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml (für 40 ml LB) eiskaltem TSS aufgenommen. 200  $\mu$ l dieser Zellen wurden dann jeweils zu den Ligationsansätzen gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min auf Eis wurden die Ansätze 90 sec bei 42°C inkubiert und zu je 2 ml LB gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde im Roller bei 37°C. Nach der erfolgten Inkubation wurden je 100  $\mu$ l jedes Ansatzes auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert. Die Reste wurden abzentrifugiert (5 min, 4500 rpm), das Pellet in dem beim Dekantieren des Überstandes verbleibenden Tropfen



resuspendiert und vollständig auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert. Als positive Kontrolle diente pUC18 (0,25 ng/ $\mu$ l). Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz gemacht, der lediglich kompetente Zellen ohne zugegebene DNA enthielt.

### **3.7.2 Transformation von *B. subtilis***

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur natürlichen Transformation wurde von der Paris-Methode (Bron 1990; Spizizen 1958) abgeleitet. Der zu transformierende Stamm wurde am Vortag von einer Einzelkolonie in 5 ml Medium I angeimpft und bei 37°C inkubiert. Am Tag der Transformation wurde 1 ml aus der Übernachtskultur in 20 ml Medium I überimpft und ca. 6 h bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Zeit war eine OD<sub>600</sub> von ca. 1 erreicht. Dann wurden die Zellen bei 10.000 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml MG-Medium aufgenommen (zur Lagerung der kompetenten Zellen wurde die Zellsuspension unter Zusatz von 10% Glycerin schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt).

1 ml der Zellsuspension wurde in 8 ml Medium II überführt und weiter bei 37°C 85 min geschüttelt. Anschließend wurde zu 1 ml dieser Kultur DNA gegeben und 60 min bei 37°C gerollert. 100  $\mu$ l der transformierten Zellsuspension und der Rest wurden jeweils auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

### **3.7.3 Elektroporation von *B. subtilis***

Für die Elektroporation von *B. subtilis* wurde ähnlich verfahren wie von G. Xue (Xue, Johnson & Dalrymple 1999) beschrieben. Eine Vorkultur des gewünschten Stammes wurde mit einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Sorbitol angeimpft und unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Am zweiten Tag wurde die Vorkultur in 60 ml LB-Sorbitol 1:20 verdünnt überimpft und weiter bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,85-0,95 geschüttelt. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation (7300 rpm, 10 min, 4°C, SS34 Rotor) wurde das Zellpellet viermal mit eiskaltem EP-Puffer gewaschen. Schließlich wurde der Zellniederschlag in 1 ml EP-Puffer resuspendiert, um eine hohe Zellkonzentration von ca. 50-56 OD<sub>600</sub>/ml zu erhalten. Zur Aufbewahrung der kompetenten Zellen wurden 200  $\mu$ l Portionen so präparierter Zellen schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden 60  $\mu$ l kompetente Zellen mit 50 ng DNA (ca. 5  $\mu$ l) in eine 1 mm eisgekühlte Elektroporationsküvette eingefüllt. Die Elektroporation wurde bei 2 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$  durchgeführt. Anschließend wurden 1 ml Recovery-Medium zu den Zellen pipettiert und diese bei 37°C 3 h inkubiert, bevor sie auf entsprechendem Selektionsmedium ausgebracht wurden.

## 3.8 Proteinanalytische Methoden

### 3.8.1 Herstellung von Zellextrakten

Vor der Herstellung von Zellextrakten wurden zuerst die optischen Dichten der Bakterienkulturen bei 600 nm im Photometer bestimmt. Anschließend wurden den Ansätzen 10 OD Zellen entnommen und die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge, 5.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet dann in 1 ml Puffer G aufgenommen (10 OD<sub>600</sub>/1 ml). Die Ultraschallbehandlung erfolgte in Eiswasser mit 50% „Duty cycle“ für 2 x 25 sec mit 30 sec Pause zwischen den zwei Behandlungen. Nach dem Aufschluss erfolgte eine Trennung von löslicher und unlöslicher Fraktion durch einen Zentrifugationsschritt bei 4°C mit der Eppendorfzentrifuge (10 min, 14000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet erneut in 1 ml Puffer G aufgenommen. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

### 3.8.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. So konnte nach erfolgter Induktion eines Gens die Bildung und die Menge des entsprechenden Proteins überprüft werden. Des Weiteren lässt sich eine grobe Abschätzung des Molekulargewichts eines Proteins machen, da ein charakterisierter Standard mit aufgetrennt wird. Das Sammelgel machte etwa  $\frac{1}{4}$  der Laufstrecke aus, das Trenngel  $\frac{3}{4}$ . Die Proben wurden mit 5xSDS-Auftragspuffer versetzt, kurz (3 min) in kochendem Wasser denaturiert und aufgetragen. Es wurde eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt, bis sich die Blaufront an der Grenze zum Trenngel befand. Dann wurde 20 mA pro Gel eingestellt und dieser Wert durch Nachregelung gehalten, bis der Gellauf abgeschlossen war. In dieser Arbeit wurden zur Proteintrennung die 12- oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die angegebenen Mengen reichen für zwei Gele.

	15%iges Trenngel	12%iges Trenngel	4%iges Sammelgel
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	10 ml	8 ml	0,67 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5 ml	5 ml	---
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	---	---	1,25 ml
10 % SDS	200 µl	200 µl	50 µl
H <sub>2</sub> O	4,7 ml	6,7 ml	3 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl

Die Gele wurden etwa 30 min in Coomassie-Färbelösung bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Entfärbung wurde zunächst für 30 min in Entfärberlösung und dann ÜN in 7,5%iger Essiglösung durchgeführt.

### 3.8.3 Nativ-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen geht es darum, die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zu erhalten und die noch gefalteten Proteine im elektrischen Feld durch das Molekularsieb eines Polyacrylamidgels aufzutrennen. Die Nativ-Gelelektrophorese kann mehreren Zwecken dienen, z. B. um Proteine aufzutrennen, die unterschiedlich modifiziert sind, wie phosphorylierte und nicht phosphorylierte Varianten desselben Proteins; um biologisch relevante Konformationen der Proteine wie ihre Quatärstruktur aufzuzeigen oder, um Protein-Protein-Komplexbildung oder Protein-DNA/RNA-Komplexbildung nachzuweisen.

Für die Auftrennung von freiem DNA-Fragment von 50 bp bis zu 400 bp und einem DNA-Protein-Komplex davon eignet sich ein 6%iges Polyacrylamidgel. Die Zusammensetzung des 6%igen Polyacrylamidgels ist wie folgt:

	für zwei Gele - 20 ml
30 % Acrylamid (37,5 Acrylamid : 1 Bisacrylamid)	4 ml
10 x TBE	2 ml
10 % APS	140 µl
TEMED	7 µl
H <sub>2</sub> O	13,9 ml

Die Proben wurden mit 5 x Nativ-Auftragspuffer versetzt und nach dem Vorlauf des Gels von 15 min bei 50 V wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Es wurden zuerst 200 V pro Gel für 5 min angelegt. Nachdem alle Proben schnell in die Taschen eingewandert waren, wurden 100 V pro Gel eingestellt, bis die Farbfront ca. zwei Drittel des Gels erreichte.

### 3.8.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit Hilfe des BIORAD-Reagenz. Je 10 µl zu bestimmende Probe wurde in 800 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 200 µl BIORAD-Reagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm im Photometer gegen H<sub>2</sub>O bestimmt. Zunächst wurde eine Eichgerade erstellt, die aus einer Verdünnungsreihe (0-1,45 mg/ml) einer BSA-Lösung angefertigt wurde. Aus der Eichgeraden wurde die Abhängigkeit der OD<sub>595</sub> von der

Proteinkonzentration der zugegebenen Probe nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = (\text{OD}_{595, \text{Probe}} - \text{OD}_{595, \text{Blank}} + 0,0233) / 0,621$$

### **3.8.5 Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Säule**

Zur Reinigung von Proteinen mit His-Tag (Hochuli, Dobeli & Schacher 1987) wurde ca. 1 ml Ni-NTA-Agarose von QIAGEN in eine 3 ml-Säule gepackt und vor Verwendung nach Angaben des Herstellers mit Puffer G mit 20 mM Imidazol vorbereitet. Die Säule wurde mit ca. 6 ml des löslichen Rohextrakts aus den mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen, die ca. 60 OD<sub>600</sub> entsprachen, befüllt. Der Durchfluss wurde in einem frischen Eppendorfgefäß gesammelt und danach erfolgten 5 Waschschrirte mit je 1 ml Puffer G mit 20 mM Imidazol. Die Elution erfolgte in 5 Schritten mit jeweils 0,5 ml Elutionspuffer (Puffer G mit 200 mM Imidazol). Die Proteinreinigung wurde durch SDS-Gel-Analyse der gesammelten Fraktionen verfolgt.

### **3.8.6 Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin-Säulen**

Eine 3 ml-Säule mit 1 ml Strep-Tactin-Sepharose (IBA) wurde durch Durchtropfen von der Lagerflüssigkeit befreit und zweimal mit je 4 ml Puffer G gewaschen. Ca. 6 ml des löslichen Rohextrakts aus den mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen, die ca. 60 OD<sub>600</sub> entsprachen, wurden auf die Säule aufgetragen. Nach fünf Waschschrirten mit je 1 ml Puffer G wurden die Proteine in sechs Fraktionen mit je 500 µl Elutionspuffer (Puffer G mit 3 mM Desthiobiotin) eluiert. Die Proteinreinigung wurde durch die SDS-Gel-Analyse verfolgt. Die Säulen wurden anschließend nach Angaben des Herstellers mit Puffer R (1 mM HABA in Puffer G) regeneriert.

### **3.8.7 β-Galaktosidase Assay (Miller's assay)**

Eine Hauptkultur wurde aus einer ÜN-Kultur des zu testenden Stammes in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum 1:50 angeimpft und bei OD<sub>600</sub> = 0,4 wurde die Kultur mit 0,2% D-Mannose induziert und weiter 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurde die OD<sub>600</sub> der Kultur bestimmt. 0,1 ml Zellsuspension (ggf. 1:10 mit LB-Medium verdünnt) wurden mit 0,9 ml Z-Puffer gemischt. Danach wurden 10 µl Toluol zugegeben. Das Gemisch wurde bei 37°C 30 min gerollert. Zur Messung der Enzymaktivität wurde 0,2 ml 20 mM oNPG (in Z-Puffer gelöst) zu dem Gemisch gegeben und die Zeit bestimmt bis die Lösung eine eindeutige

Gelbfärbung zeigte. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Anschließend wurden sofort die OD<sub>420</sub> und OD<sub>550</sub> der Reaktionsansätze gemessen. Die Berechnung der Miller Units erfolgte mit folgender Gleichung:

$$1 \text{ Miller Unit} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t = Zeit (min), v = 0,1 ml

Alle Stämme wurden zumindest dreimal gemessen. Bei den in den Abbildungen gezeigten Meßwerten lag die Standardabweichung in der Regel unter 10% (Ausnahme: bei Meßwerten unter 200 Miller Units betrug die Standardabweichung bis zu 25 %).

### 3.8.8 Mobility-Shift-Assay

Der elektrophoretische Mobility-Shift-Assay (EMSA) dient zum Nachweis der Komplexbildung zwischen DNA/RNA und DNA/RNA-bindenden Proteinen, beispielsweise Transkriptionsfaktoren. Hierbei werden Proteine mit einem DNA-Fragment bekannter Sequenz inkubiert. Die Probe wird dann auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels eines elektrischen Feldes werden die Protein-DNA-Komplexe von freier DNA entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Protein-DNA-Komplexe wandern langsamer als freie DNA. Durch Markierung der DNA (beispielsweise radioaktiv oder mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs) können die Banden im Gel sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden zwei komplementäre Oligonukleotide eingesetzt, von denen eines mit Cy5 am 5'-Ende markiert war. Die zwei Oligonukleotide s6244(5'-Cy5) und s6245 wurden wie in 3.5.8 beschrieben hybridisiert und auf 0,1 µM verdünnt. In einem 10 µl Ansatz wurden 2 µl markierte DNA, 5 µl 2-fach Mobility-Shift-Puffer und Proteinlösung in gewünschter Verdünnung gemischt. Der Ansatz wurde 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 2,5 µl 5 x Auftragspuffer versetzt und direkt auf das native Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in einem nativen 6%igen Polyacrylamidgel. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde ein Vorlauf des nativen Gels mit 50 V für 15 min bei 4°C durchgeführt. Der Auftrennung der Proben erfolgte zuerst bei 200 V 5 min, dann bei 100 V 1 h bei 4°C. Die Auswertung der Cy5 markierten Proben erfolgte mit dem Phosphoimager (Molecular Dynamics).

### **3.8.9 Gelfiltration**

Die analytische Gelfiltration erfolgte an einer SMART-Anlage (Pharmacia/GE-Healthcare). Als Trennsäule wurde eine Superdex75 (HR10/30) verwendet. Bei jeder Analyse wurde 100 µl Probe in Puffer H eingespritzt. Die Flussrate des Puffers (Puffer H) betrug 40 µl/min. Eine Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm. Als Größenstandard wurden das Ovalbumin (44,3 kDa), Trypsin aus Schweinpankreas (23,8 kDa) und Lysozym aus Eiern (14,3 kDa) benutzt.

### **3.8.10 Aufkonzentrierung der Proteine**

Die Proteinaufkonzentrierung erfolgte über eine Amicon-Ultra4-Säule (Millipore), wobei die Proteinmoleküle durch die Ultrafiltration mit einer Zellulosemembrane von den kleinen Molekülen in der Lösung getrennt und gleichzeitig das Lösungsvolumen auch reduziert wurde. Die Probe (max. 4 ml) wurde auf die Säule aufgetragen. Nach der Zentrifugation bei 5500 rpm für 5 min bei RT wurde die Proteinlösung zu ca. 0,5 ml aufkonzentriert und sorgfältig in ein Eppendorfgefäß überführt

### **3.8.11 Pufferaustausch durch PD MidiTrap-Säule**

Die PD MidiTrap-Säule (GE-Healthcare) wird oft für Entsalzung, Pufferaustausch und Probenreinigung verwendet. Sie ist eine kleine Gelfiltrationssäule, durch die große Moleküle wie Proteine von kleinen Molekülen wie Salz getrennt werden. In dieser Arbeit wurden die durch Ni-NTA-Agarose-Säule oder durch Strep-Tactin-Säule aufgereinigten Proteine auf die PD MidiTrap G-25-Säule aufgetragen, bevor sie in weiteren Assays wie Mobility-Shift und Gelfiltration-Analyse eingesetzt wurden, um das Imidazol oder Desthiobiotin im Eluat zu entfernen und den Probenpuffer gegen einen für weitere Assays geeigneten Puffer auszutauschen. Die PD MidiTrap G-25 wurde zuerst 3 mal mit 5 ml Puffer H equilibriert. Dann wurde 1 ml Proteinlösung auf die Säule aufgetragen. Nach dem Durchlauf der Flüssigkeit erfolgte die Elution mit 1,5 ml Puffer H.

## **3.9 Bioinformatik**

Multiple Alignments von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalX erstellt. Zum Abfragen homologer Aminosäuresequenzen wurde das Online-Programm BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung der Promotoren des Mannose-Operons

#### 4.1.1 Konstruktion eines Reportersystems und Insertion der vermuteten Mannosepromotoren

Um die Stärke eines Promotors zu beurteilen und seine Regulation zu untersuchen, ist ein gutes Reportersystem unentbehrlich. Diesem sollten einfache und schnelle Messungen zugrunde liegen und es sollte genau die Expression bzw. das Transkriptionsniveau widerspiegeln. In diesem Sinne wurde *lacZ* als das Reportergen ausgewählt und in eine Serie von Shuttlevektoren für *E. coli* und *B. subtilis* eingesetzt. Das *lacZ*-Gen wurde zuerst mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XmaI* aus pLA2 (Haldimann & Wanner 2001) ausgeschnitten und in pJOE5531.1 ligiert, ein Derivat des Rhamnose induzierbaren Expressionsvektors pWA21 (Wegerer, Sun & Altenbuchner 2008), das den *B. subtilis*-Transkriptionsterminator von *tufA* enthält. Nach der Insertion befand sich der Terminator am 3'-Ende von *lacZ* (Plasmid pSUN228.1). Um den *tufA*-Transkriptionsterminator auch stromaufwärts von *lacZ* hinzuzufügen, wurde ein Paar komplementärer Oligonukleotide s4956/s4957 in pSUN228.1 zwischen den *AfIII/MunI* Restriktionsstellen inseriert. In diesem neuen Plasmid pSUN235.1 sollte das Durchlesen von anderen Promotoren aus dem Plasmid ins *lacZ*-Gen sowie nach Insertion von Promotoren vor das *lacZ* Gen über das *lacZ* Gen hinaus in die flankierenden Plasmidsequenzen vermieden werden. Ein in *E. coli* als auch in *B. subtilis* funktionierendes Spektinomycin-Resistenzgen *spc* wurde aus dem Plasmid pDG1730 (Guerout-Fleury, Frandsen & Stragier 1996) mit den Oligonukleotiden s4833/s4835 amplifiziert. Das PCR-Produkt s4833/s4835 wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und mit dem mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SnaBI* verdauten Vektor pSUN151.1 ligiert (pSUN162.5). Dann wurde pSUN162.5 mit den Restriktionsenzymen *PmeI* und *NotI* verdaut, mit dem Klenow-Enzym behandelt und das kleine Fragment in den Vektor pSUN235.1 inseriert, der vorher mit dem Restriktionsenzym *MunI* verdaut und auch mit dem Klenow-Enzym behandelt worden war. Aus dem entstandenen Plasmid pSUN252.1 wurde noch der *E. coli* Vektorteil durch Deletion eines *BspHI/HindIII*-Fragments verkürzt (pSUN271.1). Anschließend wurde ein *EcoRI/SphI*-Fragment mit der Replikationsregion des Plasmids pMTLBS72 (Lagodich et al. 2005), einem *B. subtilis* Plasmid mit niedriger Kopienzahl, über die Schnittstellen *MunI*

und *SphI* in pSUN271.1 inseriert. Dieses neue Plasmid pSUN272.1 mit dem promotorlosen *lacZ* wurde ausnahmslos in dieser Arbeit für die Promotorstudien verwendet.

In das Reporterplasmid pSUN271.1 wurde ein Fragment von 2,3 kb inseriert, das das vollständige *manR*-Gen einschließlich 191 bp stromaufwärts vom *manR*-Startcodon und der intergenischen Region zwischen *manR*-Gen und *manP* (132 bp stromabwärts von *manR*-Stopp-Codon) enthielt. Dieses war mit den Primern s4693/s4694 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* 168 amplifiziert worden. Durch Restriktionsverdau von Vektor und Fragment mit *AflIII* und *NheI* und anschließender Ligation wurde das Plasmid pSUN279.2 generiert.

Das Plasmid pSUN284.1 kam durch Deletion des *SfoI-NruI*-Fragmentes aus pSUN279.2 zustande. Dabei wurde die stromaufwärts von *manR* gelegene Sequenz einschließlich eines Großteils von *manR* deletiert, sodass im Wesentlichen die intercistronische Region zwischen *manR* and *manP* erhalten blieb.

Für die Studie des *manR*-Promotors wurde ein Fragment von ca. 700 bp einschließlich des mutmaßlichen *manR*-Promotors und eines Teils des *spc*-Gens mit den Primern s5208/s5209 aus dem linearisierten Plasmid pSUN279.2 über PCR amplifiziert. Durch Restriktionsverdau von Fragment und Vektor mit *KpnI* and *AflIII* und anschließender Ligation wurde das PCR-Produkt dann vor *lacZ* in das Plasmid pSUN279.2 inseriert und gleichzeitig das vorhandene *manR*-Gen deletiert (pSUN291). Die drei Expressionsvektoren pSUN279.2 ( $P_{manR}$ -*manR*- $P_{manP}$ -*lacZ*), pSUN284.1 ( $P_{manP}$ -*lacZ*) und pSUN291( $P_{manR}$ -*lacZ*) sind in Abbildung 4-1 dargestellt.



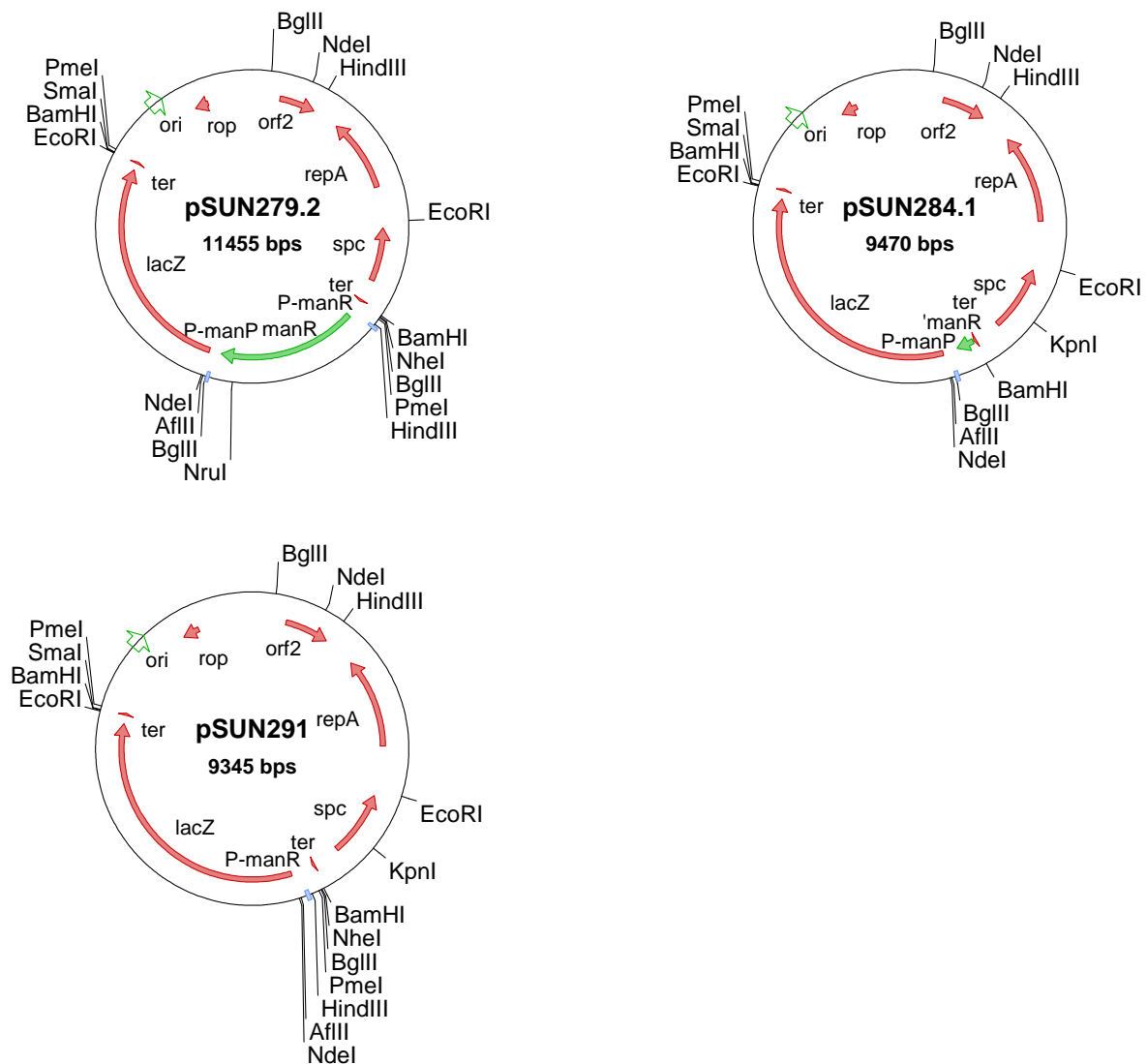


Abbildung 4-1. Plasmidkarten der Shuttlevektoren pSUN279.2, pSUN284.1 und pSUN291 mit den vermuteten Promotoren (P-manP und P-manR) und dem Regulatorgen aus dem *B. subtilis* Mannose-Operon.

#### 4.1.2 Expression von *lacZ* durch die Mannose-Promotoren

*B. subtilis* 3NA (in dieser Arbeit der Wildtyp in Bezug auf das Mannose-Operon) wurde mit den oben beschriebenen Plasmiden pSUN279.2, pSUN284.1 und pSUN291 transformiert. Die Expression von *lacZ* in diesen Vektoren wurde dann durch einen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest (Miller's Assay) bestimmt. Die Stämme 3NA pSUN279.2 und 3NA pSUN272.1 (als Hintergrundkontrolle) wurden in LB-Medium mit Spektinomycin angezogen. In der

exponentiellen Wachstumsphase wurden entweder 0,2% (w/v) Mannose, 0,2% Mannose mit 0,2% (w/v) Glucose oder keines von beiden (uninduzierte Kontrolle) zur Kultur gegeben. Nach 1 h Induktion wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Zellen mittels Miller's Assay gemessen.

Die nicht induzierte Kultur von 3NA pSUN279.2 zeigte einen relativ hohen Basalspiegel an  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Abbildung 4-2). Die Zugabe von Mannose verursachte eine 4-fache Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, während mit Mannose und Glucose die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nur 2,8-fach erhöht wurde. Diese durch Mannose induzierte *lacZ*-Expression könnte von der Region zwischen *manR* und *manP*, von der Region stromaufwärts von *manR* oder von beiden stammen. Darum wurde die Region stromaufwärts von *manR* sowie der größte Teil von *manR* aus pSUN279.2 deletiert (Plasmid pSUN284.1). Im Stamm 3NA pSUN284.1 wurde *lacZ* uninduziert nur noch halb so stark exprimiert wie im Stamm 3NA pSUN279.2. Dagegen erhöhte sich die maximale  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in 3NA pSUN284.1 nach Induktion mit Mannose, während Glucose die Induktion durch Mannose stärker reprimierte. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass sich ein Promotor ( $P_{manP}$ ) zwischen *manR* und *manP* befinden muss, welcher der Katabolitrepression durch Glucose unterliegt, und zum anderen, dass die chromosomale Kopie von *manR* auch für die Regulation der  $P_{manP}$  Kopien auf den „low copy“ Plasmiden ausreichend ist. Dies könnte auf eine Autoregulation von ManR hinweisen.

Die Transkriptionsaktivität des *manR*-Promotors ( $P_{manR}$ ) wurde mit Hilfe des Plasmids pSUN291 getestet, das den mutmaßlichen *manR*-Promotor stromaufwärts von *lacZ* enthält. Die Abbildung 4-2 zeigt, dass dieser Stamm ebenfalls einen hohen Basalspiegel an  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aufweist, die durch Zugabe von 0,2 % Mannose um das 3-fache zunimmt. Die Zugabe von 0,2% Glucose neben 0,2% Mannose führt zu einer Senkung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf ein Niveau nahe dem Basalspiegel. Dies deutet an, dass der *manR*-Promotor nicht nur ein relativ schwacher Promotor ist, sondern auch der CR unterliegt. Durch die oben beschriebenen Versuche konnte festgestellt werden, dass sowohl der Promotor des Mannose-Operons (*manPA-yjdF*) als auch der Promotor des Regulators *manR* durch Mannose induziert werden können und der Katabolitrepression durch Glucose unterliegen.

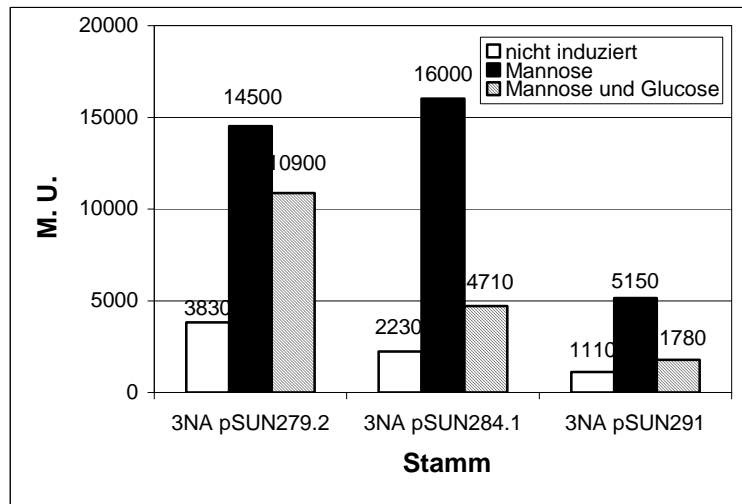


Abbildung 4-2.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in *B. subtilis* 3NA mit verschiedenen Expressionsvektoren. pSUN279.2:  $P_{manR}$ - $manR$ - $P_{manP}$ - $lacZ$ ; pSUN284.1:  $P_{manP}$ - $lacZ$ ; pSUN291:  $P_{manR}$ - $lacZ$ . Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist angegeben in Miller Unit per  $OD_{600}$  (M. U.) und wurde von Zellen bestimmt, die in LB-Medium mit Spektinomycin gewachsen und 1 h mit 0,2% Mannose bzw. 0,2% Glucose induziert worden waren (siehe 3.8.7).

## 4.2 Ermittlung des Transkriptionsstarts von $P_{manR}$ und $P_{manP}$

Der Transkriptionsstart von  $P_{manR}$  und  $P_{manP}$  wurde durch Primer-Extension-Experimente bestimmt. Bei dieser Methode wird ein markierter Primer an die komplementäre Region der RNA hybridisiert. Dieser Primer wird dann verwendet, um durch Reverse Transkriptase einen komplementären DNA-Strang (cDNA) zu synthetisieren, wobei die RNA als Matrize dient. Im Allgemeinen läuft die Analyse so, dass der cDNA aus dem Primer-Extension-Ansatz ein Sequenzierungs-Ansatz mit der entsprechenden DNA gegenüber gestellt wird. Die Sequenzierreaktionen werden mit dem gleichen Primer durchgeführt wie die cDNA-Synthese. Die Primer-Extension-Produkte, die cDNA, und die Reaktionsansätze der DNA-Sequenzierung werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Die Länge der cDNA spiegelt die Anzahl der Basen zwischen den markierten Nukleotiden und dem 5'-Ende der RNA wider. Anhand des Vergleichs der DNA-Fragmentlängen mit der sequenzierten DNA kann der Transkriptionsstartpunkt ermittelt werden.

### 4.2.1 Konstruktion des Vektors pSUN178.4 für die mRNA-Isolierung

Für die Primer-Extension wird normalerweise eine hohe Menge an mRNA benötigt. Deshalb wurde der Expressionsvektor pSUN178.4 konstruiert, der eine höhere Kopiezahl als der vorher beschriebene Vektor pSUN279.2 hat. Der Vektor pSUN178.4 hat den *E. coli*-Teil von pIC20HE (Altenbuchner, Viell & Pelletier 1992) und den *B. subtilis*-Teil von pUB110 (McKenzie et al. 1986). Als Reportergen wurde das *lss*-Gen, das für die reife Form von Lysostaphin aus *Staphylococcus simulans* (Recsei, Gruss & Novick 1987) codiert, hinter der Shine-Dalgarno-Sequenz der Expressionskassette  $P_{manR}$ -*manR*- $P_{manP}$  eingefügt. Mit pSUN178.4 wurde dann *B. subtilis* 3NA transformiert. Aus einer Übernachtskultur von *B. subtilis* 3NA pSUN178.4 wurde eine Hauptkultur für die Isolierung der mRNA angeimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Kultur mit 0,2% Mannose für 1 h induziert. Danach wurde die gesamte RNA aus dieser induzierten Kultur, und zur Kontrolle auch aus einer nicht induzierten Kultur, wie unter 3.6.2 beschrieben, isoliert.

### 4.2.2 Bestimmung des Transkriptionsstart von $P_{manP}$

Zwei mit Cy5 am 5'-Ende markierte Primer, s5006 und s5007, wurden für die Bestimmung des Transkriptionsstarts von *manPA-yjdF* mit Plasmid pSUN178.4 als Vorlage entworfen. Die

Primer s5006 und s5007 hybridisieren jeweils von +21 bis +50 und von +76 bis +105 stromabwärts vom Startcodon des *lss*-Gens. Die gleichen Primer wurden auch für die Sequenzierung des Plasmids pSUN178.4 verwendet. Die Vorgehensweise der Primer-Extension und der DNA-Sequenzierung ist unter 3.6.5 und 3.5.10 beschrieben. Die Ansätze aus beiden Reaktionen wurden dann gemeinsam auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert.

Wie in Abbildung 4-3 (mit Primer s5006) dargestellt, verstärkte sich die Transkription von  $P_{manP}$  nach Induktion durch Mannose. Dies stimmte auch mit den Ergebnissen im  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest überein. Der Transkriptionsstart von *manPA-yjdB* wurde als ein **A** identifiziert. Die nach diesem Transkriptionsstart abgeleiteten –35- und –10-Regionen von *manPA-yjdB* haben eine relativ niedrige Identität mit der Konsensussequenz von vegetativen  $\sigma^A$  abhängigen Promotoren (TTGACA für –35- und TATAAT für –10-Region) von *B. subtilis* (Moran, Jr. et al. 1982). Das Primer-Extension-Experiment mit dem Primer s5007 zeigte das gleiche Ergebnis, das hier nicht dargestellt wurde.

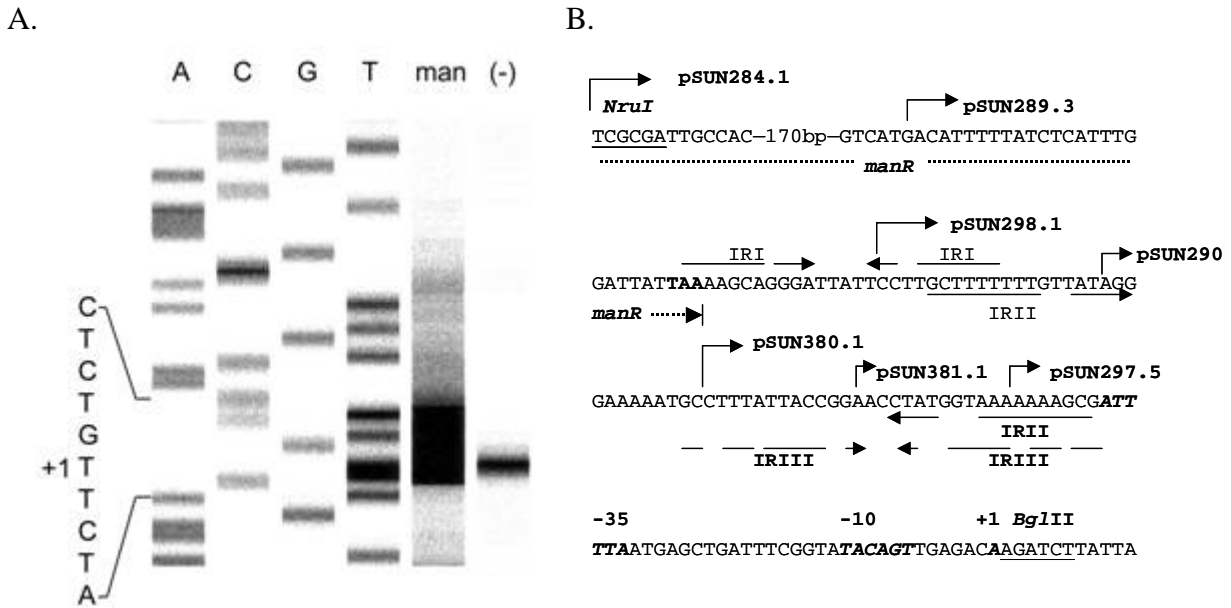


Abbildung 4-3. Kartierung des Transkriptionsstarts von  $P_{manP}$  mit dem Primer s5006. A: Reverse Transkription von mRNA aus Mannose-induzierten Zellen (man) oder Zellen ohne Induktor (-). Die Sequenzierungsreaktionen (ACGT) wurden parallel mit Plasmid DNA von pSUN178.4 und dem gleichen Primer durchgeführt. B: DNA-Sequenz des  $manP$ -Promotors. Der Transkriptionsstart wurde als A (kursiv und fett) identifiziert, die davon abgeleiteten -35- und -10-Regionen sind auch kursiv und fett gezeichnet. Drei längere invers wiederholte Sequenzwiederholungen (IR) sind mit Pfeilen gekennzeichnet, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Das Ende von  $manR$  ist ebenfalls durch einen Pfeil markiert.

#### 4.2.3 Bestimmung des Transkriptionsstarts von $P_{manR}$

Auf die gleiche Weise wurde die Bestimmung des Transkriptionsstarts von  $P_{manR}$  mit den Cy5 markierten Primern s5097 und s5098 durchgeführt, die jeweils mit der Sequenz von +81 bis +101 und von +131 bis +153 stromabwärts vom Startcodon von  $manR$  hybridisieren. Das Ergebnis von Primer-Extension und Sequenzierung mit Primer s5098 ist in Abbildung 4-4 dargestellt. Das Transkriptionsniveau von  $P_{manR}$  nimmt zu, wenn die Zellen mit Mannose induziert wurden. Jedoch ist die Zunahme der Transkription nach Induktion viel geringer als beim  $manP$ -Promotor. Diesen Unterschied zwischen den beiden Promotoren sieht man auch im  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest. Der Transkriptionsstart von  $P_{manR}$  wurde als ein G identifiziert. Die daraus abgeleiteten -10- und -35-Regionen ähneln dem *B. subtilis* vegetativen  $\sigma^A$  abhängigen Promotor (Moran, Jr. et al. 1982). Das Experiment wurde noch mit dem Primer s5097 wiederholt und zeigte das gleiche Ergebnis (Daten nicht dargestellt).

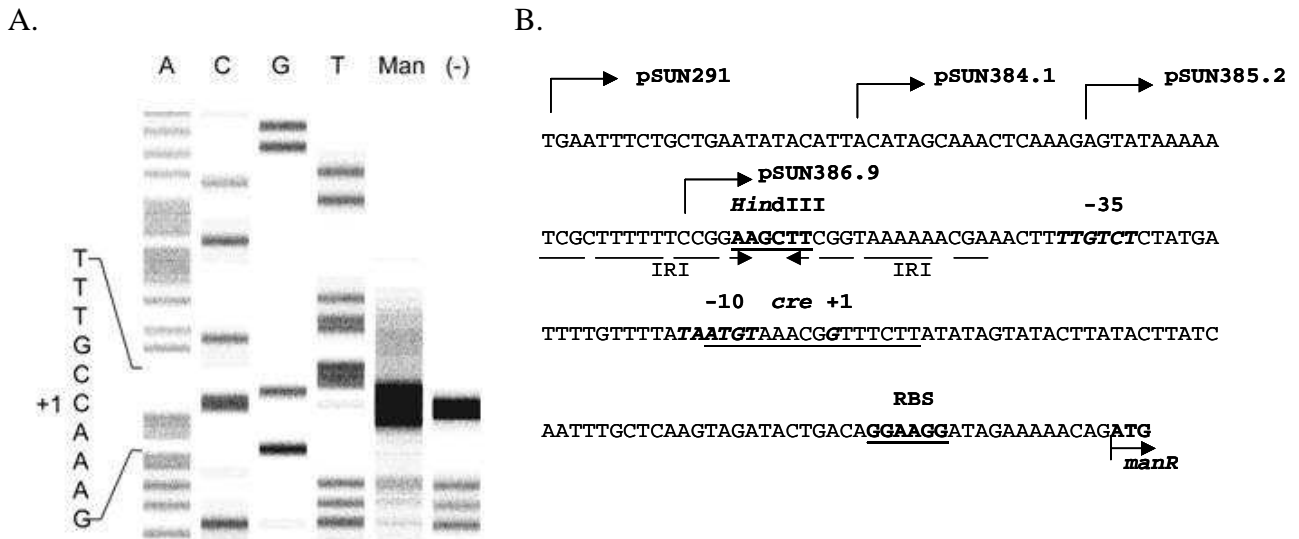


Abbildung 4-4. Kartierung des Transkriptionsstart von *manR* mit Primer s5098. A: Reverse Transkription von mRNA aus Mannose-induzierten Zellen (Man) oder Zellen ohne Induktor (-). Die Sequenzierungsreaktionen (ACGT) wurden parallel mit Plasmid DNA von pSUN178.4 und dem gleichen Primer durchgeführt. B: Die Promotor Region von *manR*-Promotor. Der Transkriptionsstart wurde als G (kursiv und fett) identifiziert und die davon abgeleitete -35- und -10-Regionen wurden auch kursiv und fett gezeichnet. Die unterstrichene Sequenz hat hohe Identität mit der Konsensussequenz von *cre*, der Bindestelle von CcpA. Ebenfalls unterstrichen sind die *HindIII* Restriktiosschnittstelle und die vermutliche Ribosomenbindestelle (RBS).

### 4.3 Deletionsanalyse der *manP*- und *manR*-Promotoren

Durch die Primer-Extension-Experimente wurde der Transkriptionsstart von *manP* bzw. von *manR* bestimmt. Bei den hier verwendeten DNA-Fragmenten liegen noch etwa 300 bp stromaufwärts von den abgeleiteten -10- und -35-Regionen des *manP*-Promotors einschließlich des 3'-Endes von *manR* und 85 bp vor den abgeleiteten -10- und -35-Regionen des *manR*-Promotors. In diesen Regionen sollten die Operatorsequenzen von ManR liegen, an die ManR für die Aktivierung der Transkription von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  bindet. Um die Operatorsequenzen von ManR genauer zu lokalisieren, wurden die *manP*- bzw. *manR*-Promotor-Region Schritt für Schritt verkürzt, indem vom 5'-Ende her immer kürzere Promotorsegmente durch PCR amplifiziert und wieder in den gleichen Expressionsvektor inseriert wurden. Der Effekt dieser Verkürzung wurde anhand von  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstests analysiert.

#### 4.3.1 Konstruktion der Expressionsvektoren für die Deletionsanalyse des *manP*-Promotors

Der erste Vektor für die Deletionsanalyse des *manP*-Promotors war pSUN284.1, der durch eine *NruI/HindIII*-Deletion in pSUN279.2 zustanden gekommen war. Dann wurde ein 1,3 kb-Fragment mit den Primern s4801 und s5203 aus dem Plasmid pSUN279.2 amplifiziert, bei dem die *manP* Promotorsequenz im Vergleich zu pSUN284.1 am 5'-Ende 175 bp verkürzt war und das 5'-Ende von *lacZ* bis zur *EcoRV* Schnittstelle enthielt. Das Amplifikat wurde dann via Restriktionsverdau mit *EcoRV* und *NheI* wieder in pSUN279.2 eingebracht (Plasmid pSUN289.3). Die anderen Expressionsvektoren (pSUN290, pSUN297.5, pSUN298.1, pSUN380.1 und pSUN381.1) mit weiter verkürzten potentiellen Operatorsequenzen wurden auf ähnliche Weise konstruiert, indem die PCR-Produkte (jeweils mit Primern s4801/s5203, s4802/s5203, s5262/s5203, s5263/s5203, s5861/s5203 und s5862/s5203 amplifiziert) via Restriktionsverdau mit *EcoRV* und *NheI* in pSUN279.2 inseriert wurden. In Abbildung 4-5 ist anhand der Promotorsequenz von pSUN284.1 dargestellt, welche Bereiche des Promotors noch in den genannten Expressionsvektoren vorhanden sind.



### 4.3.2 Veränderung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch 5'-Verkürzung der *manP*-Promotorsequenz

Die oben beschriebenen Vektoren wurden in *B. subtilis* 3NA eingebracht und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den mit Mannose induzierten und nicht induzierten Kulturen gemessen. Der Stamm *B. subtilis* 3NA pSUN289.3 ergab keinen Unterschied im Vergleich zu 3NA pSUN284.1 in Bezug auf die Induktion durch Mannose (Abbildung 4-5). Unmittelbar nach dem Stoppcodon von *manR* wurde eine Stamm-Schleife-Struktur identifiziert, die als Transkriptionsterminator von *manR* fungieren könnte (IRI, Abbildung 4-5). Die nächste Deletion (pSUN298.1) entfernte *manR* vollständig und auch die Hälfte dieser Stamm-Schleife-Struktur. Der Stamm 3NA pSUN298.1 zeigte wieder keinen deutlichen Unterschied in der Induktion zu den beiden früheren Stämmen. Die weitere Deletion von 17 bp (pSUN290) führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung, obwohl diese Deletion einen Teil einer weiteren Stamm-Schleife-Struktur (IRII, Abbildung 4-5) entfernte. Nach einer weiteren Deletion von 12 bp (pSUN380.1) sank die Induktion von *lacZ* durch Mannose dagegen auf die Hälfte von der in 3NA pSUN290. Die letzten zwei Deletionen endeten jeweils 20 bp und 8 bp vor der abgeleiteten -35-Region (pSUN381.1 und pSUN297.5). In den beiden Stämme 3NA pSUN381.1 und 3NA pSUN297.5 fand keine Induktion durch Mannose mehr statt und die basale Expression lag im Bereich einer  $\Delta$ *manR*-Mutante (siehe 4.4.2). Das deutete darauf hin, dass die Operatorsequenz von ManR vermutlich zwischen -79 und -35 bp bezüglich des Transkriptionsstarts von *manPA-yjdF* liegt. Nach genauer Beobachtung dieser Sequenz wurden eine andere Stamm-Schleife-Struktur (IRIII, Abbildung 4-5) gefunden, die wahrscheinlich die richtige Operatorsequenz ist.



### 4.3.3 Konstruktion der Expressionsvektoren für die Deletionsanalyse des *manR*-Promotors

Um die Operatorsequenz des *manR*-Promotors zu lokalisieren, wurde die 85 bp lange Sequenz vor der putativen -35 Box des *manR*-Promotors Schritt für Schritt verkürzt. Diese Verkürzung erfolgte durch Amplifikation mit den Primern s5863, s5864 und s5865 in Verbindung mit Primer s5934, wobei das Plasmid pSUN291 als Vorlage diente, das den *manR* Promotor vor dem *lacZ*-Gen inseriert hatte. Die drei PCR-Produkte wurden dann jeweils durch Restriktionsverdau mit *SacI* und *NheI* und anschließende Ligation wieder in pSUN279.2 eingebracht. Dabei wurden die Plasmide pSUN384.1, pSUN385.2 und pSUN386.9 erhalten. In Abbildung 4-6 sind die in diesen Vektoren enthaltenen Promotorsegmente dargestellt.

### 4.3.4 Veränderung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch 5'-Verkürzung der *manR*-Promotorsequenz

*B. subtilis* 3NA wurde mit den Expressionsvektoren pSUN291, pSUN384.1, pSUN385.2 und pSUN386.9 transformiert. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den mit Mannose induzierten und nicht induzierten Kulturen gemessen.

Die Stämme *B. subtilis* 3NA pSUN384.1 und 3NA pSUN385.2 zeigten nur einen leichten Unterschied zu 3NA pSUN291 in Bezug auf die Induktion von *lacZ* durch Mannose (Abbildung 4-6). Bei der anderen Deletion (pSUN386.9) konnte weder eine Induktion durch Mannose noch eine Basalexpression des *manR*-Promotors festgestellt werden. Daraus ließ sich folgern, dass der Operator von ManR vor dem *manR*-Promotor wahrscheinlich zwischen -81 und -35 bp stromaufwärts des *manR*-Transkriptionsstartpunkts liegt, wo auch eine Stamm-Schleife-Struktur (IRI, Abbildung 4-6) gefunden wurde.



## 4.4 Deletion der Mannose-Gene *manR*, *manP*, *manA* und *yjdB*

Die Funktion der vom Mannose-Operon codierten Enzyme wurde bislang nur durch die Homologie zu verwandten Enzymen prognostiziert. Um die postulierte Funktion der Enzyme zu bestätigen, wurde zuerst jedes einzelne Gen in dem *B. subtilis* Chromosom deletiert. In die Mutanten wurden die Plasmide mit dem *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle des Promotors  $P_{manP}$  bzw.  $P_{manR}$  gebracht, um den Einfluss der Deletionen auf die Regulation des Mannose-Operons zu untersuchen.

### 4.4.1 Isolierung von *B. subtilis* Deletionsmutanten für *manR*, *manP*, *manA* und *yjdB*

Für die chromosomalen Deletionen wurden zuerst drei Integrationsvektoren konstruiert, die die jeweiligen Nachbarsequenzen des Zielgens sowie einen positiven und eventuell auch einen negativen Selektionsmarker enthielten.

Zwei DNA-Fragmente, die *manR* flankieren, wurden zuerst aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* 168 amplifiziert. Die Sequenz zwischen -708 bis -194 stromaufwärts des *manR*-Startcodons wurde mit den Primern s5077/s5078 amplifiziert und durch Restriktionsverdau mit *SmaI* in den Zwischenvektor pJOE4786.1 kloniert, der nicht in *B. subtilis* replizieren kann (pSUN263.1). Die Sequenz zwischen der Position -26 stromaufwärts und +650 stromabwärts vom *manR*-Stoppcodon wurde mit den Primern s5079/s5080 amplifiziert und via *SmaI* in pJOE4786.1 eingefügt (Plasmid pSUN264.4). Als positiver Selektionsmarker diente das Erythromycin-Resistenzgen *erm*, das mit den Primern s5069/s5070 aus dem linearisierten Plasmid pDG1730 amplifiziert und via *EcoRI/MunI* ins Plasmid pSUN263.1 inseriert wurde (pSUN269.4). Zum Schluss wurde die bereits klonierte Sequenz stromabwärts von *manR* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/MluI* aus pSUN264.4 ausgeschnitten und mit dem auf die gleiche Weise verdauten pSUN269.4 ligiert. Das entstandene Plasmid pSUN276.2 enthält eine *yjdB-erm-manP'* Kasette, wobei *yjdB* und *manP'* jeweils für die *manR* flankierende Sequenz steht. Nach der Transformation des WT-Stamms 3NA mit pSUN276.2 sollte das *manR*-Gen im Chromosom durch das *erm*-Gen ersetzt werden (Abbildung 4-7). Die drei anderen Integrationsvektoren für die Gendeletion im *B. subtilis*-Chromosom (pSUN356.7 für *manP*-Deletion, pSUN366.1 für *manA*-Deletion und pSUN431.1 für die *yjdB*-Deletion) wurden auf ähnliche Weise konstruiert. Im Unterschied dazu war in die drei weiteren Vektoren noch ein Spektinomycin-Resistenzgen *spc* aus pDG1730 via *EcoRI/EcoRV*-Schnittstellen als weiterer Selektionsmarker eingefügt, der es erlaubte, Transformanten mit Einzel- und Doppelcrossover zu unterscheiden.

Die vier Integrationsvektoren wurden getrennt in *B. subtilis* 3NA eingebracht. Die Transformanten wurden auf LB-Platten mit 5 µg/ml Erythromycin selektiert. Um Einzelcrossover auszuschließen, wurden die Erythromycin-resistenten Transformanten auf LB-Platten mit 100 µg/ml Spektinomycin überprüft. Die Erthromycin-resistenten und Spektinomycin-sensitiven Transformanten wurden jeweils TQ276 ( $\Delta manR$ ), TQ356 ( $\Delta manP$ ), TQ366 ( $\Delta manA$ ) und TQ431 ( $\Delta yjdB$ ) benannt. Die chromosomalen Veränderungen der jeweiligen Mutanten wurden durch PCR-Analyse bestätigt.

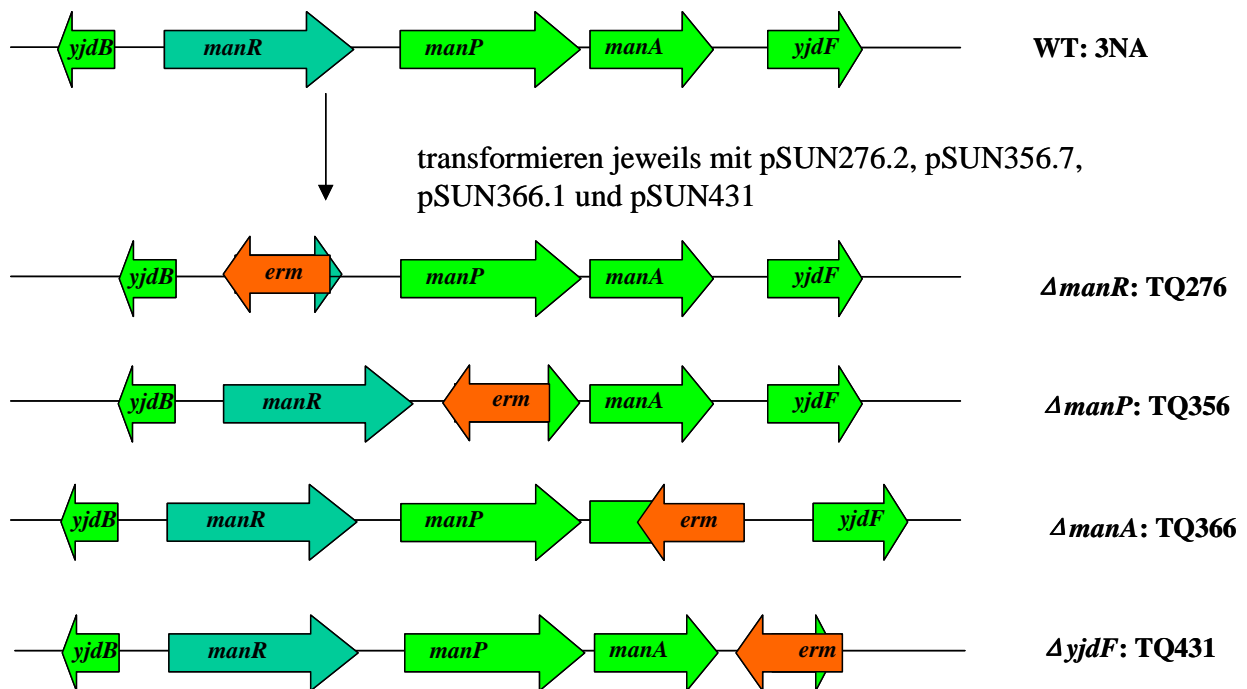


Abbildung 4-7. Deletionen der Mannose-Gene: Durch Transformation mit den Plasmiden pSUN276.2, pSUN356.7, pSUN366.1 und pSUN431.1 wurden die *manR*-, *manP*-, *manA*- und *yjdB*-Gene im Chromosom von *B. subtilis* WT 3NA jeweils durch das *erm*-Gen ersetzt.

Die Mutante TQ431 ( $\Delta yjdB$ ) wuchs auf Mannose als die einzige C-Quelle gleich wie der WT-Stamm 3NA und die *lacZ*-Expression unter dem *manP*- oder *manR*-Promotor in dieser Mutante blieb auch unverändert. Dies bedeutet, dass die Deletion von *yjdB* keinen Effekt auf den Mannose-Stoffwechsel und die *manP*- und *manR*-Promotoren ausübte. Deswegen wurden hier die Ergebnisse über *yjdB*-Deletion nicht im Detail gezeigt.

#### 4.4.2 Sequenzunterschiede bei den von uns isolierten und sequenzierten Genen des Mannose-Operons und den Einträgen in der Datenbank

Während der Konstruktion der Expressions- und Integrationsvektoren mit Mannosepromotoren und anderen Bestandteilen des Mannoseoperons wurden die aus *B. subtilis* 168 amplifizierte codierende Sequenzen von *manR* und *manPA-yjdF* sequenziert und mit den Sequenzen aus der SubtiList-Datenbank (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>) verglichen. Dadurch wurden einige Sequenzunterschiede für die Gene *manR* und *manP* im Vergleich zur Datenbank gefunden, während die Sequenzen der Gene *manA* und *yjdF* mit den Sequenzen der Datenbank völlig identisch waren. Bei *manR* waren zwei Nukleotide in dem codierenden Bereich ausgetauscht (316G und 317C entsprechend der Datenbank zu 316T und 317T), wodurch anstelle von Alanin-106 ein Leucin tritt. Bei *manP* wurden sieben Nukleotidveränderungen gefunden, aus denen drei Aminosäure-Austausche resultierten (Abbildung 4-8).

In Juli 2009 wurde das Genom vom *B. subtilis* 168 durch Barbe *et al.* neu sequenziert und annotiert (Barbe *et al.* 2009). Die neu annotierten Sequenzen stimmten mit den in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen überein. Interessanterweise wurde in dem von uns nicht sequenzierten Bereich, 5 bp vor dem in der SubtiList-Datenbank angegebenen *manP*-Stoppcodon, durch die erneute Sequenzierung eine Base weniger gefunden, wodurch sich der Leserahmen von *manP* um 184 bp verlängert. Da das *manP*-Gen mit den Primern s5366/s5367 bis zum ursprünglich angegebenen Stoppcodon amplifiziert wurde, konnte dieser Fehler nicht detektiert werden. Dieser veränderte Leserahmen sollte aber keine Auswirkungen auf die hier dargestellten Experimente haben.





0,03 bei 600 nm verdünnt und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Das Wachstum wurde anhand von Trübungsmessungen bei 600 nm verfolgt. In Abbildung 4-9 ist zu sehen, dass das Wachstum von TQ276 nach 6 h bei einer  $OD_{600}$  von 0,15 aufhörte, während der Wildtyp 3NA in den ersten 8 Stunden ein exponentielles Wachstum zeigte und danach langsam in die stationäre Phase eintrat (nach 11 h  $OD_{600} = 3,5$ ). Obwohl die  $OD_{600}$  zu Anfang bei 0,03 war und die  $\Delta manR$ -Mutante kein Mannose verwerten sollte, war TQ276 bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,15 gewachsen. Dies kann vermutlich auf die geringe Menge an Casamino Acids und Hefeextrakt im Medium zurückgeführt werden, die von Bakterien notfalls auch als Energiequelle verwertet werden können.

Die Tatsache, dass das Wachstum der  $\Delta manR$ -Mutante TQ276 auf Mannose als einzige C-Quelle stark beeinträchtigt wurde, bestätigt, dass ManR für die Expression des Mannose-Operons essentiell ist, wobei die Funktion sowohl die eines Antiterminators als auch die eines Transkriptionsaktivators sein könnte.

#### 4.4.3.2 Regulation von $P_{manR}$ und $P_{manP}$ in der $\Delta manR$ -Mutante

Um die Regulation von  $P_{manR}$  und  $P_{manP}$  zu untersuchen, wurde die  $\Delta manR$ -Mutante TQ276 jeweils mit den Plasmiden pSUN279.2 ( $manR$ - $P_{manP}$ - $lacZ$ ), pSUN284.1 ( $P_{manP}$ - $lacZ$ ) und pSUN291 ( $P_{manR}$ - $lacZ$ ) transformiert. Die Transkription von  $lacZ$  wurde anschließend durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität festgestellt.

In der  $\Delta manR$ -Mutante TQ276 ließ sich  $lacZ$  unter der Kontrolle des  $manP$ -Promotors auf dem Plasmid pSUN284.1 nicht exprimieren. Unter der Kontrolle des  $manR$ -Promotors wurde das  $lacZ$ -Gen in pSUN291 konstitutiv, aber in sehr geringen Mengen exprimiert. Die gleichen Plasmide zeigten im WT nach Induktion mit Mannose sehr hohe Expressionsraten (Abbildung 4-10). Befand sich zusätzlich  $manR$  auf dem Plasmid (TQ276 pSUN279.2), so wurde die Regulation des Mannose-Operons durch das episomal exprimierte  $manR$  in der Mutante wiederhergestellt und ergab ähnlich hohe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wie im WT-Stamm mit dem gleichen Plasmid (3NA pSUN279.2) (Abbildung 4-10). Auch die Wachstumsdefizienz mit Mannose als C-Quelle wurde durch  $manR$  auf dem Plasmid pSUN279.2 komplementiert (Abbildung 4-9), im Gegensatz zu den Plasmiden pSUN284.1 und pSUN291, die kein  $manR$ -Gen enthalten.

Durch diese Mutante konnte gezeigt werden, dass ManR ein in *trans*-wirkender Regulator sowohl für das Mannose-Operon ( $manPA$ - $yjdB$ ) als auch für  $manR$  ist. ManR ist demnach

gleichzeitig ein Autoregulator. Da weder vor dem *manR*- noch dem *manP*-Gen RAT-Sequenzen als Bindestelle für einen Antiterminator nachweisbar waren, kann man davon ausgehen, dass ManR ein Transkriptionsaktivator ist. Zudem zeigt der geringe Basalspiegel der Transkription des *manR*-Promotors im Vergleich zum *manP*-Promotor, dessen Transkription in der *manR* Mutante gar nicht nachgewiesen werden konnte, dass der *manR*-Promotor weniger auf die Transkriptionsaktivierung durch ManR angewiesen ist als der *manP*-Promotor.

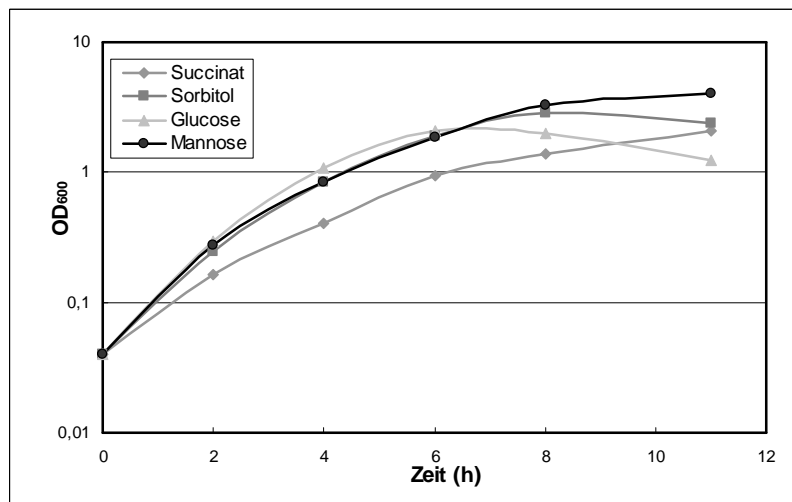


Abbildung 4-9. Wachstum der Stämme 3NA, TQ276 und TQ276 pSUN279.2 in Minimalmedium mit Mannose als einziger C-Quelle. Die drei Stämme wurden mit gleicher Anfangskonzentration in CMM\* mit 0,5 Mannose angeimpft, das Wachstum bei 37°C wurde durch Messen der OD<sub>600</sub> verfolgt.

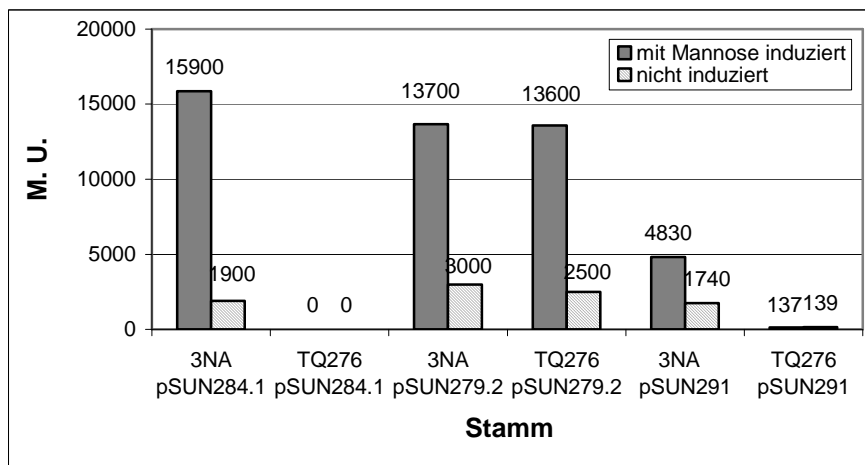


Abbildung 4-10.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Stämmen 3NA pSUN284.1, 3NA pSUN279.2, 3NA pSUN291, sowie in den *manR*-Mutanten TQ276 pSUN284.1, TQ276 pSUN279.2 und TQ276 pSUN291 mit und ohne Induktion durch 0,2 % Mannose. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mittels Miller's Assay bestimmt, die Zellen waren in LB-Medium angezogen und für 1 h induziert worden.

#### 4.4.4 Charakterisierung der *ΔmanP*-Mutante

Das Wachstum auf Mannose der *ΔmanP*-Mutante TQ356 wurde getestet, indem diese auf Minimal-Agarplatten (CMM) mit 0,5% Mannose als einziger C-Quelle ausgestrichen wurde. Nach 48 h Inkubation bei 37°C war keine Koloniebildung zu sehen. Dies zeigte, wie erwartet, dass das *manP*-Gen ein für die Verwertung der Mannose essentielles Gen ist und keine weiteren Gene diese Funktion komplementieren.

Der Einfluss der Deletion von *manP* auf den *manR*- und den *manP*-Promotor wurde anhand der beiden Plasmide pSUN284.1 und pSUN291 getestet. Diese Vektoren wurden jeweils in die *ΔmanP*-Mutante TQ356 eingebracht. Sowohl die Transformante TQ356 pSUN284.1 als auch TQ356 pSUN291 zeigten eine konstitutive *lacZ*-Expression. Bei dem *manP* Promotor war die maximale  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Mutante etwas niedriger als in dem mit Mannose induzierten Wildtyp, bei dem *manR* Promotor war es dagegen umgekehrt (Abbildung 4-11). D. h., ManP hat neben seiner Transporter-Funktion auch noch einen Einfluß auf die Regulation des Mannose-Operons, denn die Inaktivierung von *manP* führte zu einer konstitutiven Expression. Ungeachtet der konstitutiven Expression unterlagen die beiden Promotoren immer noch der Katabolitrepression durch Glucose. Die Zugabe von Glucose neben Mannose führte zu einer etwa zweifachen Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

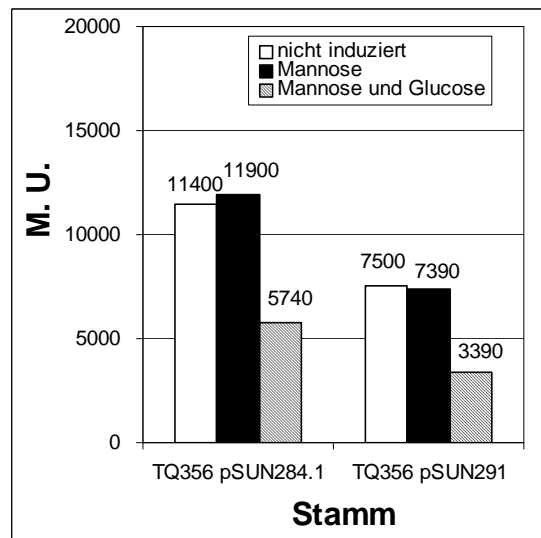


Abbildung 4-11. Verhalten des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in der *ΔmanP*-Mutante TQ356 mit und ohne Induktion durch Mannose und Glucose. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde in LB-Medium mit Spektinomycin, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

#### 4.4.5 Charakterisierung der *ΔmanA*-Mutante

Das Gen *manA* codiert für die Mannose-6-Phosphat-Isomerase, die Mannose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat umwandelt. Die *ΔmanA*-Mutante TQ366 wurde auf Minimal-Agarplatten (CMM) mit 0,5% Mannose als einziger C-Quelle ausgestrichen. Auch nach 48 h Inkubation bei 37 °C zeigte sie kein Wachstum auf Mannose, da Mannose-6-Phosphat wegen der Deletion von *manA* nicht weiter von der Zelle verwertet werden sollte. Außerdem könnte die Inaktivierung von *manA* noch eine intrazelluläre Akkumulation von Mannose-6-Phosphat verursachen. Diese Akkumulation eines metabolischen Zwischenprodukts könnte für die Zelle wachstumshemmend oder letal sein. Diese Prognose wurde durch eine Wachstumskinetik in LB-Medium unter Zugabe von Mannose nachgewiesen. Wie in Abbildung 4-12 dargestellt, verlangsamte sich das Wachstum von TQ366 deutlich nach 1 h Zugabe von 0,2% Mannose. Nach 2 h Inkubation mit Mannose stagnierte das Wachstum schließlich. D. h., die Mutante TQ366 ist wegen der Deletion von *manA* Mannose sensitiv geworden. Darüber hinaus wuchs TQ366 bereits ohne Zugabe von Mannose langsamer als der WT 3NA. Dies könnte an etwas Mannose im LB-Medium liegen, da LB-Medium 0,5% Hefeextrakt enthält, der wiederum zahlreiche mannosylierte Proteine enthält. Offensichtlich ist *B. subtilis* in der Lage, diese Mannosereste abzuspalten.

Um den Einfluss der Deletion von *manA* auf den *manR*- und den *manP*-Promotor zu untersuchen, wurden die zwei Expressionsvektoren pSUN284.1 und pSUN291 jeweils in die *ΔmanA*-Mutante TQ366 eingebracht. Sowohl die Transformante TQ366 pSUN284.1 als auch TQ366 pSUN291 zeigten eine sehr hohe *lacZ*-Expression (Abbildung 4-13), die in etwa einem voll induzierten Wildtyp mit diesen Plasmiden entsprach. Durch Zugabe von Induktor verstärkte sich die Expression von *lacZ* noch weiter und lag damit deutlich über der Expressionsrate im Wildtyp. Die Katabolitrepression durch Glucose in der *ΔmanA*-Mutante war noch vorhanden, insbesondere bei dem *manR*-Promotor, dessen Aktivität 2-fach reduziert wurde, während die Aktivität des *manP* Promotors sich durch Glucosezugabe lediglich um 20% reduzierte (Abbildung 4-13). Warum sich die beiden Promotoren unterschiedlich bezüglich der Katabolitrepression verhalten, könnte an der postulierten *cre*-Sequenz liegen, die im *manR*-, aber nicht im *manP*-Promotor vorhanden ist und damit den *manR* Promotor über CcpA einem zweiten Mechanismus der Katabolitrepression unterwirft.

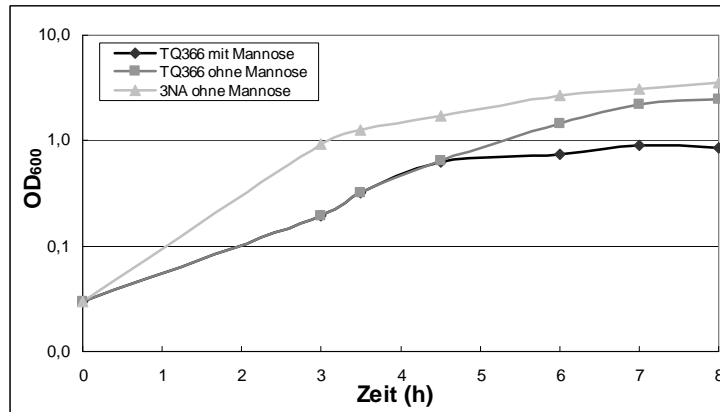


Abbildung 4-12. Wachstumskinetik von TQ366 und der WT-Kontrolle 3NA. Die Stämme wurden ausgehend von einer Übernachtskultur in LB-Medium mit (für TQ366) oder ohne (für 3NA) Erythromycin angezogen. Nach 3,5 h Inkubation bei 37°C wurde 0,2% Mannose zu TQ366 zugegeben und das Wachstum weiter durch die optische Messung verfolgt.

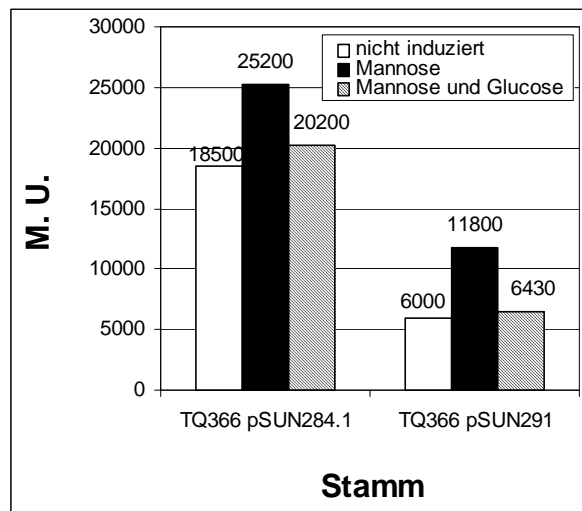


Abbildung 4-13. Verhalten des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in der  $\Delta$ *manA*-Mutante TQ366 mit und ohne Induktion durch 0,2% Mannose und 0,2% Glucose in LB-Medium mit Spektinomycin. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

Da der hohe Basalspiegel und die erhöhte Induktion durch die Existenz von Mannose in Hefeextrakt verursacht sein könnte, wurde die *lacZ*-Expression der Transformante TQ366 pSUN284.1 und TQ366 pSUN291 sowie der Wildtyp-Stämme mit den gleichen Expressionsvektoren 3NA pSUN284.1 und 3NA pSUN291 in einem Vollmedium ohne Hefeextrakt (Trypton15-Medium) bestimmt (Abbildung 4-14). Der Basalspiegel der beiden Promotoren sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante war nun stark reduziert. Dies bestätigt, dass die Herkunft des hohen Basalspiegels am Hefeextrakt liegt. Gleichzeitig war die Induktion der *manP*- und *manR*-Promotoren in der Mutante TQ366 im Vergleich zu dem WT auch erniedrigt. Diese schwächere Induktion liegt wahrscheinlich an dem defekten *manA*-

Gen. Wenn die Mannose-6-Phosphat-Isomerase defekt ist, sollte sich Mannose-6-Phosphat in der Zelle anhäufen, und dieses Produkt des Transportprozesses sollte schließlich den Mannose-Transporter hemmen, Mannose weiter zu phosphorylieren und zu transportieren. Infolgedessen bleibt der Mannose-Transporter mehr in dem phosphorylierten Zustand und phosphoryliert daher die PRDI von ManR. Dies führt zur Inaktivierung von ManR. Deswegen wurde die volle Induktion von beiden Promotoren in der *ΔmanA*-Mutante TQ366 im Trypton15-Medium nicht erreicht. Aber warum sich die beiden Promotoren in der *ΔmanA*-Mutante TQ366 im LB-Medium zu einer extrem hohen Expression im Vergleich zum WT-Stamm induzieren ließen, ist noch eine offene Frage.

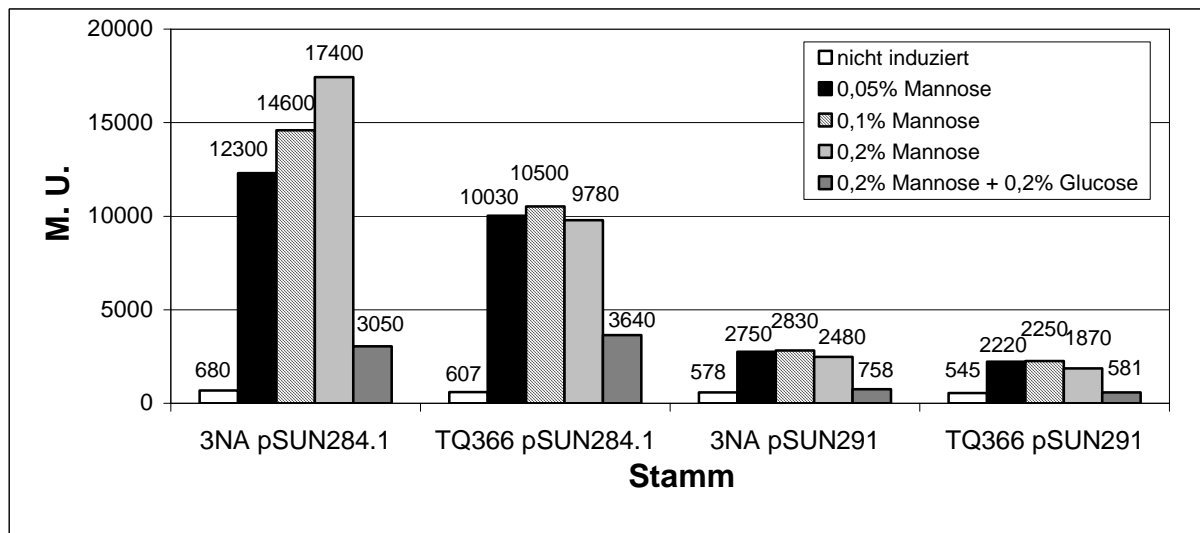


Abbildung 4-14. Verhalten des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in der *ΔmanA*-Mutante TQ366 mit und ohne Induktion durch Mannose und Glucose in Trypton15-Medium mit Spektinomycin. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

## 4.5 Domänen-Deletion von ManR

Anhand von Alignments über die Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) wurden fünf Domänen in ManR postuliert. Vier Domänen davon haben eine hohe Ähnlichkeit mit bekannten Motiven. Dies sind die N-terminale DNA-Bindedomäne (HTH, Aminosäure 7-67), zwei PRDs (Aminosäure 197-285 und 307-397) und die C-terminale PTS-EIIA ähnliche Domäne (Aminosäure 510-646). Eine weitere Region (Aminosäure 410-492) zeigte nur geringe Ähnlichkeit mit PTS-EIIB Domänen. In der Abbildung 4-15 sind die fünf Domänen in ManR im Vergleich zu *B. subtilis* LicR (Tobisch et al. 1997) und *B. subtilis* MtlR (Watanabe et al. 2003) dargestellt, die über die gesamte Länge der Proteine jeweils 26% und 27% Identität in der Aminosäuresequenz mit ManR haben.

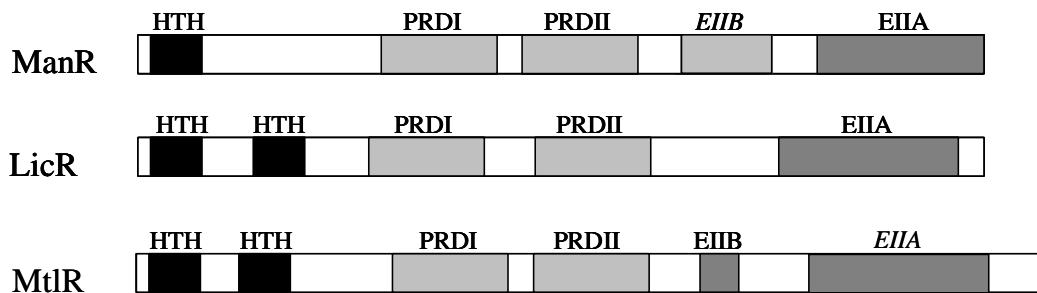


Abbildung 4-15. Vergleich der Domänen in ManR, LicR und MtlR aus *B. subtilis*. HTH: Helix-Turn-Helix, DNA-Bindedomäne; PRDI: eine durch Phosphorylierung aktivierte PRD; PRDII: eine durch Dephosphorylierung aktivierte PRD; EIIA: PTS-EIIA ähnliche Domäne; EIIB: PTS-EIIB ähnliche Domäne.

In Tobisch *et al.*'s Studie über LicR (Tobisch, Stülke & Hecker 1999) wurde festgestellt, dass die PTS-EIIA ähnliche Domäne eine reprimierende Wirkung auf die Transkription des *lic*-Operons hat. Um mehr über die Funktion der in ManR postulierten Domänen zu erfahren, wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt.

### 4.5.1 Deletion der PTS-EIIA ähnlichen Domäne von ManR

Um die PTS-EIIA Domäne in ManR zu deletieren, wurde zunächst das Plasmid pSUN178.10 mit dem *manR*-Gen und *manP*-Promotor mit *PvuII* verdaut und das entstandene größere Fragment mit sich ligiert. Dabei entstand das Plasmid pSUN322, in dem die Sequenz für die PTS-EIIA ähnliche Domäne zum großen Teil deletiert und als  $\Delta EIIA$ -*manR* bezeichnet wurde. Das  $\Delta EIIA$ -*manR*-Gen wurde dann weiter via *AflIII* und *NheI* in pSUN279.2 inseriert

(pSUN324.2). Mit diesem Plasmid wurde dann die  $\Delta manR$ -Mutante TQ276 transformiert. Durch das Plasmid pSUN324.2 konnte TQ276 nun wieder auf Minimalmedium mit 0,5% Mannose als einziger C-Quelle wachsen. Das zeigte, dass ManR trotz Deletion der EIIA-Domäne noch die Transkription des Mannose-Operons aktivieren konnte. Der Basalspiegel der *lacZ*-Expression mit  $\Delta EIIA$ -ManR (TQ276 pSUN324.2) war um das ca. 4-fache erhöht im Vergleich zum WT-ManR (TQ276 pSUN279.2) (Abbildung 4-16). Erstaunlicherweise wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in TQ276 pSUN324.2 durch die Zugabe des Induktors Mannose erniedrigt. Eine weitere Erniedrigung um den Faktor 3,7 gab es durch die Glucosezugabe. Die Katabolitrepression wirkte sich damit wesentlich stärker aus als bei TQ276 pSUN279.2 mit dem WT-ManR, bei dem die  $\beta$ -Galaktoseaktivität nur um das 1,6-fache abnahm (Tabelle 4-1, Abbildung 4-16). Die geringe Katabolitrepression bei TQ276 pSUN279.2 wurde bereits zuvor mit der Überexpression von *manR* durch die Lage auf dem Plasmid erklärt. Dies sollte natürlich auf das EIIA-deletierte *manR*-Gen in pSUN324.2 zutreffen. Möglicherweise ist jedoch das verkürzte ManR wesentlich instabiler und anfälliger gegen Proteasen, so dass die Menge an aktivem ManR in der Zelle dem des Wildtyps auf dem Chromosom gleich kommt.

#### 4.5.2 Deletion der PTS-EIIB und PTS-EIIA ähnlichen Domänen

Zusätzlich zu der PTS-EIIA ähnlichen Domäne am C-Terminus hat ManR noch eine PTS-EIIB ähnliche Domäne, deren Homologie zur Konsensussequenz von EIIB allerdings relativ niedrig ist. Im Gegensatz dazu trägt der homologe PRD-Regulator MtlR aus *B. subtilis* eine PTS-EIIB ähnliche Domäne mit hoher Identität zur Konsensussequenz von EIIB Domänen, allerdings fehlt hier die EIIA Domäne. Durch die Deletion der PTS-EIIB zusammen mit der EIIA-ähnlichen Domäne sollte untersucht werden, ob diese Domäne auch bei der Induktion und Katabolitrepression des Mannose-Operons eine Rolle spielt.

Zuerst wurde ein Fragment von 454 bp aus pSUN076.7 durch partiellen Verdau mit *XcmI* und *PvuII* deletiert. Ein Fragment aus dem religierten Plasmid pSUN367.3 wurde dann via *AgeI* und *AflIII* in pSUN279.2 inseriert, wodurch die Expressionskassette  $\Delta EIIA$ -*manR*-*P<sub>manP</sub>*-*lacZ* in dem neu konstruierten Plasmid pSUN368.2 zustande kam. Die  $\Delta manR$ -Mutante TQ276 wurde dann mit pSUN368.2 transformiert. Durch das Plasmid pSUN368.2 konnte nun die Mutante TQ276 ebenfalls wieder auf Minimalmedium mit 0,5% Mannose wachsen, das Expressionsprofil ähnelte dem von TQ276 pSUN324.2, bei dem nur die EIIA Domäne deletiert war. Allerdings war die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität sowohl uninduziert als auch



induziert etwa 20% geringer als in der  $\Delta EIIA$ -Mutante TQ276 pSUN324.2 (Abbildung 4-16). Dies wies auf ähnliche Funktionen der EIIB- und EIIA-Domänen hin, wobei die weitere Verkürzung offensichtlich auch eine weitere Verringerung der Transkriptionsaktivierung durch ManR mit sich brachte.

Tabelle 4-1. Genotyp der Stämme mit dem ManR-Wildtyp-Aktivator und den EIIA- und EIIB-Deletionsderivaten und die damit verbundene Rate der Katabolitrepession. (Rate der Katabolitrepession = durch Mannose induzierte *lacZ*-Aktivität/durch Mannose und Glucose induzierte *lacZ*-Aktivität).

Genotyp (Chromosom)	Genotyp (Plasmid)	Stamm	Katabolitrepession
$\Delta manR$	$\Delta EIIA-manR-P_{manP}-lacZ$	TQ276 pSUN368.2	3.6
$\Delta manR$	$\Delta EIIA-manR-P_{manP}-lacZ$	TQ276 pSUN324.2	3.7
$\Delta manR$	$manR-P_{manP}-lacZ$	TQ276 pSUN279.2	1.6

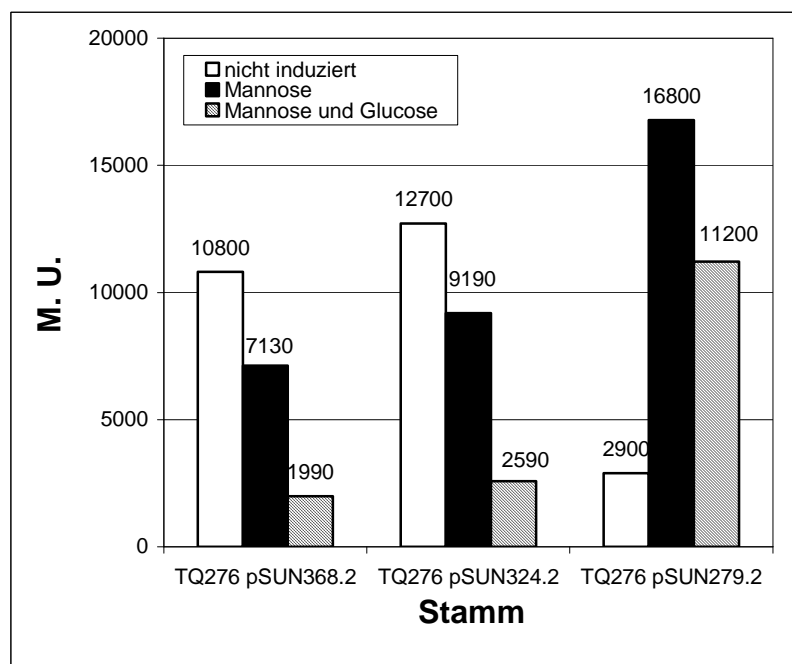


Abbildung 4-16. *LacZ*-Expression durch  $P_{manP}$  in TQ276 unter der Regulation des ManR Wildtyp Aktivators und der EIIA und EIIB Deletionsderivate. Die drei Stämme wurden in LB-Medium inkubiert und mit 0,2% Mannose bzw. mit 0,2% Mannose und 0,2% Glucose induziert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wie unter 3.8.7 beschrieben gemessen.

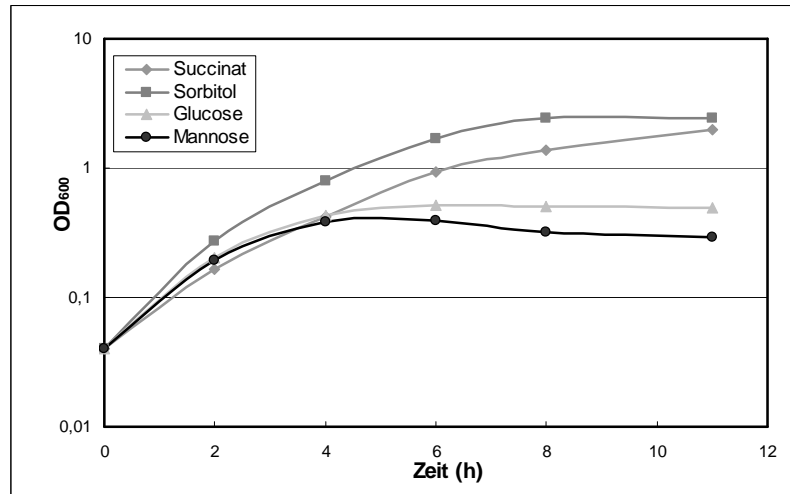
## 4.6 Die Rolle von HPr-His15 in der Aktivierung des Mannose-Operons

Das HPr-Protein in *B. subtilis* hat im Wesentlichen zwei Funktionen, nämlich die Phosphatübertragung von EI auf EII und als Koeffektor bei der Katabolitrepression. Diese zwei Funktionen werden durch zwei verschiedene phosphorylierbare Aminosäuren realisiert, nämlich das Histidin15 (His15) und das Serin46 (Ser46). In *B. subtilis* wird HPr vom *ptsH*-Gen codiert. Im folgenden Versuch wurde die Regulation des *manP*- und *manR*-Promotors in der *B. subtilis*-Mutante QB5350 untersucht, in der das His15 von HPr gegen Alanin ausgetauscht wurde. Der Austausch von Ser46 wird in dem folgenden Kapitel diskutiert.

Zunächst wurde das Wachstum der Mutante QB5350 auf verschiedenen C-Quellen beobachtet. Als positive Kontrolle diente *B. subtilis* 3NA, der das WT-*ptsH*-Gen besitzt. In der Abbildung 4-17 sieht man, dass das Wachstum von QB5350 im Vergleich zu 3NA auf den PTS-Zuckern Glucose und Mannose aufgrund der *ptsH-H15A*-Mutation stark beeinträchtigt ist. Das Wachstum von QB5350 auf Mannose war dabei noch etwas stärker betroffen als das auf Glucose. Dies läßt sich durch alternative Transportwege für Glucose neben dem PTS-System erklären, z. B. über den GlcP-Hexose: H<sup>+</sup>-Transporter (Paulsen et al. 1998). Das Wachstum auf Succinat und einem nicht-PTS-Substrat Sorbitol, wurde hingegen nicht beeinflusst. Durch dieses Wachstumverhalten wurde bestätigt, dass His15 von HPr für die Aufnahme von PTS-Zuckern, einschließlich Mannose, eine große Rolle spielt.

Danach wurde QB5350 mit den Expressionsvektoren pSUN284.1 bzw. pSUN291 transformiert, die jeweils die Expressionskassetten *P<sub>manP</sub>-lacZ* bzw. *P<sub>manR</sub>-lacZ* enthalten. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der beiden Stämme wurde mit und ohne Induktion durch Mannose gemessen (Abbildung 4-18). Dabei konnte durch Zugabe von Mannose keine Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in QB5350 pSUN284.1 und QB5350 pSUN291 beobachtet werden. In beiden Stämmen war außerdem der Basalspiegel stark abgesenkt im Vergleich zu dem WT-HPr-haltigen Stamm 3NA mit den gleichen Plasmiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PEP-abhängige Phosphorylierung an His15 von HPr eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von *P<sub>manP</sub>* und *P<sub>manR</sub>* spielt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch beim *B. subtilis* Levanase-Operon beobachtet (Stülke et al. 1995).

A.



B.

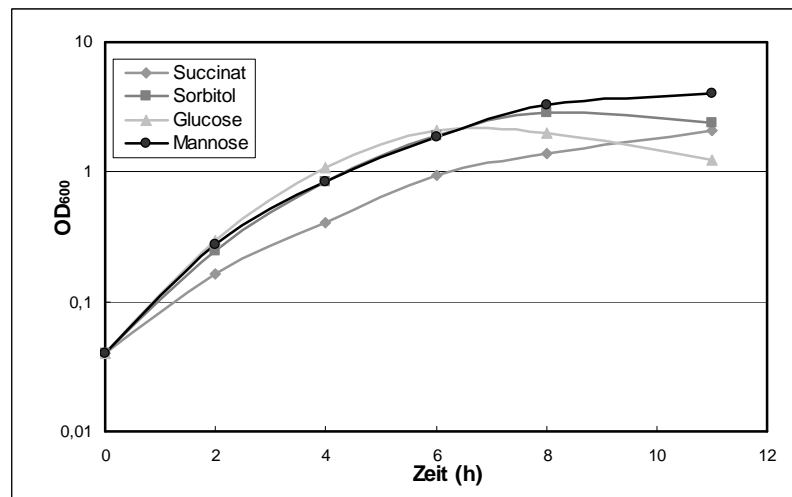


Abbildung 4-17. Wachstum von QB5350 (A) und 3NA (B) auf den PTS-Substraten Glucose und Mannose sowie auf Succinat und Sorbitol. Von frisch angelegten Einzelkolonien auf LB-Agarplatten wurden Übernachtskulturen von beiden Stämmen in CSK\*-Minimalmedium angelegt. Die beiden Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert und mit CMM-Medium (ohne C-Quelle) gewaschen. Anschließend wurden mit beiden Stämmen jeweils die Hauptkulturen in CMM-Minimalmedium mit verschiedenen PTS-Substraten bzw. Succinat oder den nicht-PTS-Polyol Sorbitol angeimpft. Das Wachstum wurde durch optische Messung bei 600 nm verfolgt.

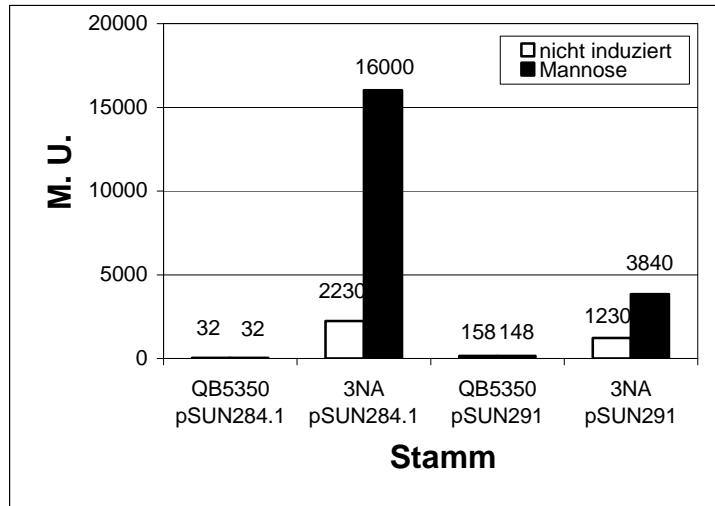


Abbildung 4-18. Beteiligung von HPr-His15 bei der Aktivierung des Mannose-Operons. Die Vektoren pSUN284.1 und pSUN291 wurden jeweils in QB5350 (*ptsH-H15A*) und 3NA (WT) eingeführt. Die Expression von *lacZ* in diesen Stämmen wurde, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

## 4.7 Auswirkungen von Mutationen in *ccpA*, *crh*, *ptsH* und *hprK* auf die Katabolitrepression des Mannose-Operons

Die meisten Operons für PTS-Zucker unterliegen einer CcpA-abhängigen Katabolitrepression und eventuell noch einigen weiteren CcpA-unabhängigen Mechanismen der Katabolitrepression. Wie das Mannose-Operon durch Katabolitrepression reguliert wird, war auch ein wichtiger Gegenstand dieser Arbeit. In diesem Abschnitt wurden die Wirkungen bekannter Faktoren wie HPr, Crh, HprK und CcpA auf das Mannose-Operon durch Mutationsanalyse untersucht.

### 4.7.1 HPr-Ser46-Mutante

HPr spielt eine zentrale Rolle im PTS-System in *B. subtilis*. Außer als Phosphatüberträger auf die PTS-Zuckertransporter vermittelt es sowohl eine CcpA-abhängige als auch die CcpA-unabhängige Katabolitrepression. Die beiden Arten der Katabolitrepression sind eng mit der zweiten Phosphorylierungsstelle von HPr, dem Ser46 von HPr, verknüpft, da diese ATP abhängige Phosphorylierung durch die beiden Zwischenprodukte der Glykolyse, Glucose-6-P und FBP, stimuliert wird. Daraus wurde gefolgert, dass die Katabolitrepression aufgehoben sein müsste, wenn die Phosphorylierung an HPr-Ser46 nicht stattfinden kann. Die *ptsH-S46A* (auch *ptsH1*) Mutante QB5223 wurde uns freundlicherweise von Herrn Professor Stülke aus Göttingen zur Verfügung gestellt (Martin-Verstraete et al. 1995). Die zwei Expressionsvektoren pSUN284.1 und pSUN291 wurden durch Elektroporation in QB5223 eingebracht und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unter Zugabe von Mannose sowie von Mannose und Glucose gemessen. Die Katabolitrepression des *manP*-Promotors (QB5223 pSUN284.1) und auch des *manR*-Promotors (QB5223 pSUN291) war im Vergleich zum WT etwas verringert (Abbildung 4-19), aber nicht aufgehoben. Außerdem war die Induktion des *manP*-Promotors (QB5223 pSUN284.1) geringer als die beim WT (3NA pSUN284.1). Der geringe Effekt der HPr-Ser46 Mutation auf die Expression des Mannose-Operons bedeutet, dass die Phosphorylierung an HPr-Ser46 für die Katabolitrepression der beiden Promotoren nur zum Teil relevant ist. Daraus folgt, dass es noch andere HPr-Ser46 unabhängige Mechanismen der Katabolitrepression geben muss, die auf das Mannose-Operon einwirken. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von LevR berichtet (Martin-Verstraete et al. 1995).

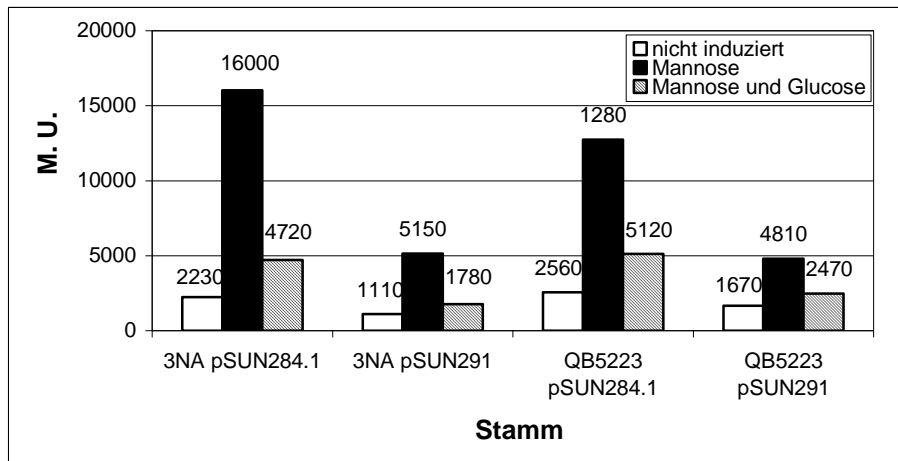


Abbildung 4-19. Katabolitrepression des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in *B. subtilis*-WT 3NA und in der *ptsH-S46A*-Mutante QB5223.

#### 4.7.2 Crh-Knockout-Mutante

In *B. subtilis* gibt es außer HPr noch das HPr homologe Protein Crh, das auch an der Katabolitrepression beteiligt ist. Da die Katabolitrepression in der *ptsH-S46A*-Mutante nicht aufgehoben wurde, musste auch die Wirkung von Crh auf die Expression des Mannose-Operons untersucht werden. Dies geschah durch Deletion des *crh*-Gens.

Zuerst wurde ein Integrationsvektor für die chromosomale Deletion von *crh* konstruiert. Chromosomale Abschnitte, die *crh* flankieren, wurden jeweils mit den Primern s5444/s5445 und s5446/s5447 aus der Gesamt-DNA von *B. subtilis* 168 amplifiziert und zwischen die *SmaI*-Schnittstellen des positiven Selektionsvektors pJOE4786.1 inseriert (pSUN325.8 und pSUN326.17). Das stromaufwärts von *crh* liegende Fragment mit Gen *yvcL* wurde dann aus dem Plasmid pSUN325.8 über *EcoRI* und *KasI* ausgeschnitten und in das über *MunI* und *KasI* geschnittene Plasmid pSUN303.3 inseriert. Das entstandene Plasmid pSUN330.1 wurde dann nochmals mit *BamHI* und *MluI* geschnitten und mit dem, das Gen *yvcN* enthaltende, *BamHI/MunI* Fragment von pSUN326.17 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pSUN338.3 enthält das Erythromycinresistenzgen *erm* zur Selektion der Integration des Plasmids in das *B. subtilis* Chromosom, das Spektinomycinresistenzgen *spc* für das Screenen nach Doppelcrossover und einen Selektionsmarker *amp* für die Klonierungen in *E. coli*. Durch Doppelcrossover während der Transformation mit pSUN338.3 sollte das Erythromycin-Resistenzgen *erm* das *crh* im Chromosom ersetzen, während die restliche Plasmid-DNA verloren gehen sollte.

Die Stämme 3NA pSUN284.1 und 3NA pSUN291 wurden jeweils mit pSUN338.3 transformiert und Erythromycin-resistente Kolonien selektioniert. Diese wurden dann auf Agarplatten mit Spektinomycin nach Spektinomycin-sensitiven Kolonien gescreent. Durch PCR der chromosomalen DNA mit den Primern s5444/s5069 wurden Einzelcrossover ausgeschlossen und die richtigen Mutanten bestätigt. Die erhaltenen Mutanten wurden TQ338 pSUN284.1 und TQ338 pSUN291 genannt, wobei TQ338 für den Genotyp *spo0A3 Δcrh::erm* steht.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in beiden Stämmen wurde unter Zugabe von Mannose sowie Mannose und Glucose gemessen. Wie Abbildung 4-20 zeigt, wurde die Katabolitrepresion nicht durch die Deletion von *crh* aufgehoben. Dies impliziert, dass P-Ser-Crh anscheinend keine oder nur eine geringe Rolle bei der Katabolitrepresion des Mannose-Operon spielt, oder dass HPr die Aufgabe von Crh übernehmen kann.

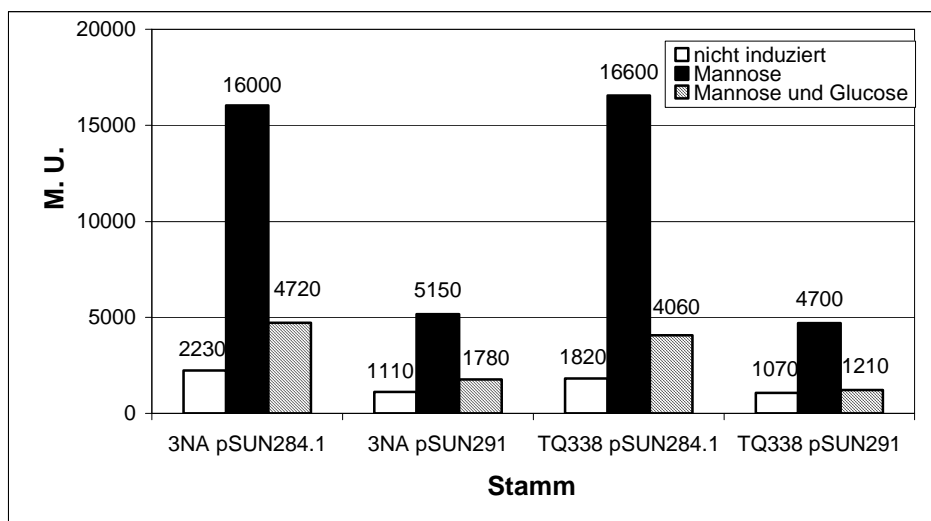


Abbildung 4-20. Katabolitrepresion des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in *B. subtilis*-WT 3NA und der  $\Delta crh$ -Mutante TQ338.

#### 4.7.3 Katabolitrepresion in der *B. subtilis ptsH-S46A Δcrh*-Doppelmutante

Weder die *crh*-Deletion noch die *ptsH-S46A*-Mutation konnten allein die Katabolitrepresion durch Glucose verhindern. Deshalb wurde eine *ptsH/crh* Doppelmutante hergestellt, um den Einfluß dieser beiden Proteine auf die Katabolitrepresion der Mannosepromotoren weiter zu untersuchen.

Zur Herstellung der Doppelmutante wurde die *ptsH-S46A*-Mutante QB5223 mit pSUN338.3 (der Integrationsvektor für die *crh*-Deletion) transformiert und auf Erythromycin-resistente

Kolonien selektiert. Durch Nachttesten der Kolonien auf Agarplatten mit Spektinomycin wurden Transformanten mit Einzelcrossover ausgeschlossen und die richtige Mutante nochmals durch Kolonie-PCR mit den Primern s5444/s5069 bestätigt. Die erhaltene Mutante wurde TQ338\_S46 genannt. Anschließend wurde diese mit pSUN284.1 bzw. pSUN291 transformiert.

In dieser Doppelmutante war die Katabolitrepression stärker reduziert als bei der *ptsH-S46A*-Mutation (Abbildung 4-21), obwohl die Deletion von *crh* allein keinen Effekt auf die Katabolitrepression der Mannose-Promotoren ausübte. Das läßt sich damit erklären, dass HPr im Wesentlichen für die postulierte CcpA-abhängige Katabolitrepression verantwortlich ist. Diese Funktion kann bei Ausfall von HPr von Crh zum Teil übernommen werden. Die verbliebene Hemmung deutet auf eine zweite Art der Katabolitrepression hin, die nicht von HPr/Crh/CcpA/*cre* vermittelt wird.

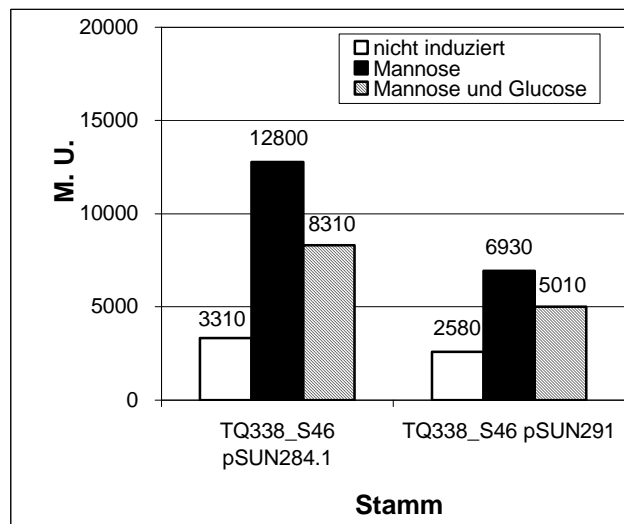


Abbildung 4-21 Katabolitrepression des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in *B. subtilis* WT 3NA und der *ptsH-S46A*&*Δcrh*-Doppelmutante TQ338\_S46.

#### 4.7.4 CcpA-Knockout-Mutante

In den oberen Abschnitten wurde bestätigt, dass die Katabolitrepression der Mannose-Promotoren zum Teil auf HPr und Crh beruhen. Nach der gängigen Vorstellung über Katabolitrepression von *B. subtilis* sollte diese auch CcpA-abhängig sein. Dies wurde mit einer *ΔccpA*-Mutante untersucht. Die *ΔccpA*-Mutante wurde auf folgende Weise konstruiert.

Die chromosomalen Bereiche, die *ccpA* flankieren, wurden aus der Gesamt-DNA von *B. subtilis* 168 jeweils mit den Primern s5335/s5442 und s5337/s5338 amplifiziert und via *SmaI*



in den Zwischenvektor pJOE4786.1 kloniert (jeweils zu pSUN299.1 und pSUN300.1). Das stromaufwärts liegende Fragment mit dem Gen *aroA* wurde dann mit *MunI* und *BglIII* aus pSUN299.1 ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* und *BglIII* geschnittenen Vektor pSUN259.4 ligiert (pSUN301.1). Das stromabwärts liegende Fragment mit dem Gen *ytxD* wurde dann mit *MunI* und *KasI* aus pSUN300.1 ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* und *KasI* geschnittenen Vektor pSUN282 inseriert (pSUN302.1). Schließlich wurde das Plasmid pSUN303.3 aus jeweils einem *BamHI*-Fragment von pSUN301.1 und pSUN302.1 zusammengesetzt. Das entstandene Plasmid pSUN303.3 enthält ein Erythromycinresistenzgen zur Selektion auf chromosomale Integration in *B. subtilis*, ein Spektinomycinresistenzgen zum Ausschluss von Transformanten mit Einzelcrossover und ein Ampicillinresistenzgen für die Selektion der Transformanten in *E. coli*. Durch ein Doppelcrossover während der Transformation mit pSUN303.3 sollte das Erythromycin-Resistenzgen *erm* das *ccpA* im Chromosom ersetzen.

Erythromycin-resistente, Spektinomycin-sensitive Transformanten von *B. subtilis* 3NA mit pSUN303.3 wurden durch PCR der chromosomalen DNA mit den Primern s5335/s5070 weiter auf den erwarteten Genaustausch untersucht. Die dabei erhaltenen *ccpA* Deletionsmutante wurde TQ303 genannt.

Die  $\Delta$ *ccpA*-Mutante TQ303 wurde mit den Plasmiden pSUN284.1 und pSUN291 transformiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Transformanten mit und ohne Induktion durch Mannose bzw. durch gleichzeitige Gabe von Mannose und Glucose in LB-Medium gemessen (Abbildung 4-22). Überraschenderweise wurde durch die Deletion die Induktion durch Mannose aufgehoben, die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war für beide Promotoren mit und ohne Mannose etwa gleich hoch und entsprach der Basalexpression des Wildtyps. Dagegen wurde die Katabolitrepression nicht aufgehoben, sondern eher noch verstärkt, sodass die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der *ccpA*-Mutante in etwa der *manR*-Deletionsmutante entsprach. CcpA reprimiert eine Vielzahl von Genen und Operons in *B. subtilis*. Gleichzeitig kann CcpA aber auch die Transkription von Genen aktivieren. Es gibt in *B. subtilis* einige von CcpA aktivierte Gene wie *ackA* und *gapA*, bei denen die CcpA-Bindestelle *cre* stromaufwärts von der -35 Sequenz der Promotoren liegt (Fujita 2009), während sie bei CcpA reprimierten Genen meist innerhalb der Promotoren oder auch stromabwärts der -10 Sequenz liegt. Bei den Mannose-Genen wurde nur eine passende *cre*-Sequenz im *manR* Promotor identifiziert, die der Lage entsprechend zur Reprimierung durch CcpA führen müsste (Miwa et al. 2000). In diesem Sinne sollte CcpA auf keinen Fall ein direkter Aktivator für das Mannose-Operon sein, sondern die beobachtete Wirkung auf einer Interaktion von CcpA mit anderen Genen von *B. subtilis* beruhen.

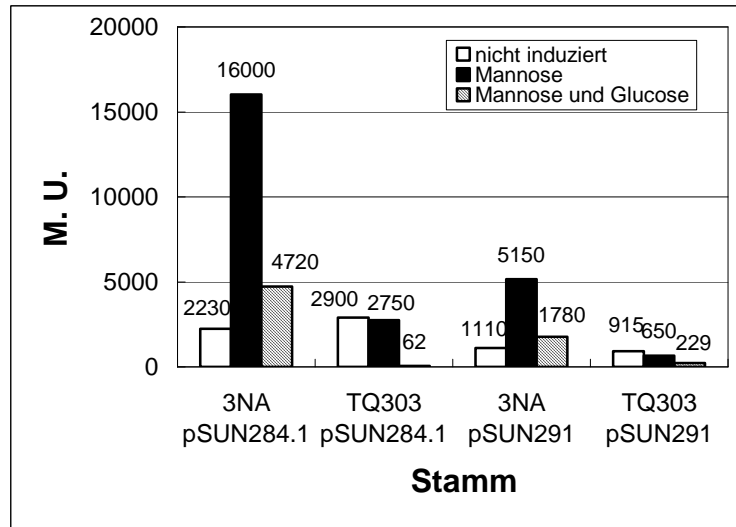


Abbildung 4-22. Katabolitrepresseion des *manP*-Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in der *ΔccpA*-Mutante TQ303 im Vergleich zum WT-Stamm 3NA.

#### 4.7.5 Mutation der *cre*-Sequenz im *manR*-Promotor

Zwei mutmaßliche *cre*-Sequenzen wurden durch die Suche mit der Konsensussequenz WWTGNAARCGNWWCAWW (W = A/T, R = G/A, N = beliebiges Nukleotid) (Miwa et al. 2000) im Mannose-Operon gefunden. Die erste überlappt mit dem Transkriptionsstart von *manR*. Die zweite befindet sich kurz nach dem *manP*-Startcodon, allerdings weist diese zwei Diskrepanzen mit der Konsensussequenz auf. Die zweite mutmaßliche *cre*-Sequenz wurde bereits durch Transkriptionsanalyse als funktionslos nachgewiesen (Miwa et al. 2000). Daher wurde in dieser Arbeit nur die erste *cre*-Sequenz um den *manR*-Transkriptionsstart mutiert, um den Einfluß auf der Regulation der Mannosegene zu sehen.

##### 4.7.5.1 Basenaustausch in der vermuteten *cre*-Sequenz des *manR*-Promotors

Die Mutationen in der *cre*-Sequenz des *manR*-Promotors wurden durch PCR-Amplifikation mit den Primern s5616/s4694 eingebracht. Durch Primer s5616 wurden 8 Nukleotide ausgetauscht, wodurch 6 Veränderungen gegenüber der Konsensussequenz von *cre* entstanden, ohne aber die  $-10$ -Region zu berühren und zu verändern. Dabei entstanden auch zwei neue Restriktionsstellen *SfcI* und *BsrGI*, mit denen die Mutationen überprüft werden konnten. Das PCR-Produkt s5616/s4694 wurde über die Schnittstellen *BstBI* und *PsiI* in pSUN063.11 kloniert (pSUN357.3). Das *manR*-Gen mit mutierter *cre*-Sequenz im Promotor

wurde als „*cre*\*-*manR*“ bezeichnet. In Abbildung 4-23 ist die abgeänderte *cre*-Sequenz von pSUN357.3 dargestellt.

<i>cre</i> -Konsensussequenz	W W T G N A A R C G N W W W C A W W
	<i>Psi</i> I +1
originale Sequenz	<u>T T A T A A</u> T G T A A A C G G T T T C T T A
	<i>Sfc</i> I <i>Bsr</i> GI
mutierte Sequenz	T T A T A A T G <u>C T A T A</u> G G T <u>G T A C A</u> A

Abbildung 4-23 Vergleich der mutierten und originalen *cre*-Sequenz um den *manR*-Transkriptionsstart. Sechs Nukleotid-Austausche (schattiert, fett) verursachen Abweichungen von der Konsensussequenz. An den zwei kursiv und schattiert geschriebenen Nukleotiden wurde die Konsensussequenz trotz Nukleotid-Austausch beibehalten. W = A/T, R = G/A, N = beliebiges Nukleotid. Restriktionsschnittstellen für *Psi*I, *Sfc*I und *Bsr*GI sind unterstrichen, der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert.

#### 4.7.5.2 Integration von *cre*\*-*manR* ins Chromosom

Um *cre*\*-*manR* ins Chromosom einzubringen und die ursprüngliche Sequenz zu ersetzen, wurde ein neuer Vektor konstruiert. Zuerst wurde pSUN357.3 mit *Psi*I/*Bgl*II geschnitten und das kleine Fragment mit dem gleich geschnittenen Plasmid pSUN351.3 ligiert, das die flankierenden Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts von *manR* enthielt. Mit dem entstandenen Plasmid pSUN361.3 wurde die  $\Delta$ *manR*-Mutante TQ276 transformiert. Die Transformanten wurden auf CMM-Platte mit Mannose als einziger C-Quelle selektiert, in der Annahme, dass das *manR*-Gen trotz veränderter *cre*-Sequenz den Zellen das Wachstum auf Mannose wieder erlaubt. Die Mannose-positiven Transformanten wurden anschließend auf Erythromycin-Resistenz überprüft. Die Integration von *cre*\*-*manR* in TQ276, der ein *erm*-Gen statt *manR* enthielt, sollte neben dem Wachstum auf Mannose auch das Erythromycin-Resistenzgen ersetzen. Eine Transformante, die diese Bedingungen erfüllte, wurde ausgewählt und TQ361 genannt. Um die Richtigkeit der Mutationen in TQ361 zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern s5464/s5077 durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung des Produkts bestätigte, dass die genomische Sequenz in TQ361 mit der geplanten *cre*\*-Sequenz übereinstimmte.

#### 4.7.5.3 Katabolitrepression des *manP*- und *manR*-Promotors in TQ361

In die *cre*\*-*manR*-Mutante TQ361 wurden die Expressionsvektoren pSUN284.1 bzw. pSUN291 eingebracht, die  $P_{manP}$  bzw.  $P_{manR}$  enthielten. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität dieser Stämme wurde unter Zugabe von Mannose, Mannose und Glucose bzw. ohne Zugabe, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

Durch die Mutation der *cre*-Sequenz vor *manR* wurde die Katabolitrepression von  $P_{manP}$  in TQ361 pSUN284.1 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm reduziert (Abbildung 4-24). Die Repressionsrate (M. U. mit Mannose: M. U. mit Mannose und Glucose) sank von 3,4 auf 1,6 bei  $P_{manP}$ . Die Katabolitrepression von  $P_{manR}$  (pSUN291) hingegen verringerte sich aufgrund dieser Mutation überhaupt nicht. Dies könnte daran liegen, dass die *cre*-Sequenz vor  $P_{manR-lacZ}$  auf pSUN291 noch vorhanden ist. Daher wurde ein neuer Vektor pSUN377 konstruiert, bei dem die *cre*-Sequenz vor  $P_{manR-lacZ}$  auch auf die gleiche Weise mutiert wurde. Sowohl *B. subtilis* WT 3NA als auch die *cre*\*-*manR*-Mutante TQ361 wurden mit pSUN377 transformiert. Die Mutation in *cre* vor  $P_{manR-lacZ}$  im Plasmid pSUN377 führte nun sowohl im Wildtypstamm 3NA als auch in TQ361 zu einer Erhöhung sowohl der Induktion als auch des Basalspiegels. Gleichzeitig wurde die Katabolitrepression stark reduziert. Dies beweist, dass die Katabolitrepression von *manP*- und *manR*-Promotor in einem großen Ausmaß ein CcpA/*cre*-abhängiges Ereignis ist, obwohl die Deletion von *ccpA* im Chromosom die Katabolitrepression nicht aufheben konnte.

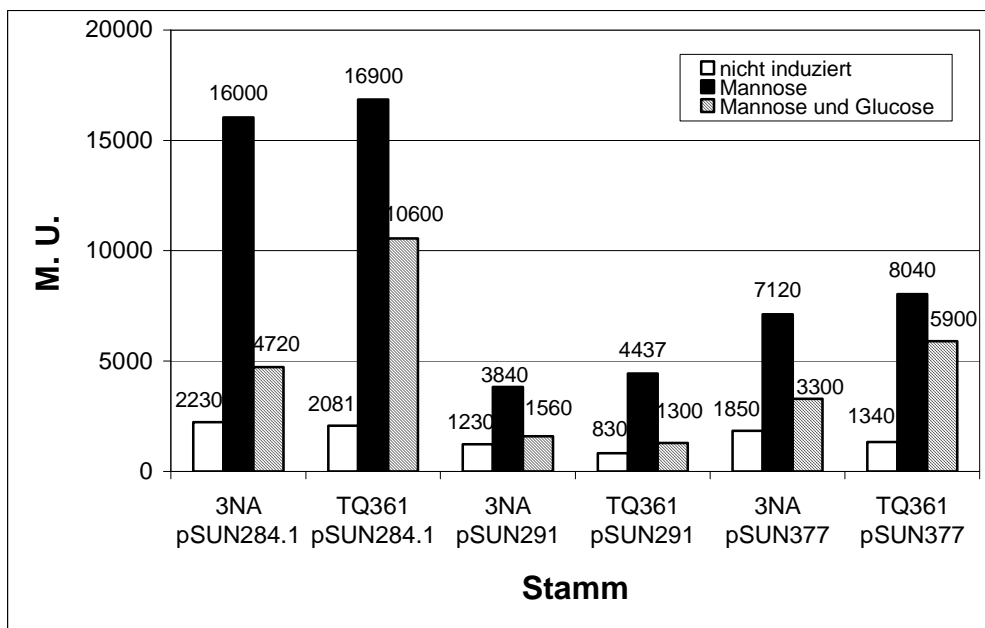


Abbildung 4-24. Einfluss der *cre*-Mutation auf den *manP*-Promotor (pSUN284.1) und den *manR*-Promotor (pSUN291). TQ361 enthält die *cre*-Mutation im *manR*-Promotor im Chromosom. Das Plasmid pSUN377 enthält die Expressionskassette *cre*\*- $P_{manR-lacZ}$  auf dem Plasmid. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

#### 4.7.6 Einfluß einer *hprK*-Knockout-Mutante auf die Mannosepromotoren

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird HPr durch HPr-Kinase phosphoryliert, sobald eine schnell umsetzbare Energiequelle wie Glucose in ausreichender Menge vorhanden ist.

Dadurch wird die Katabolitrepression angeschaltet. Daher wurde hier eine  $\Delta hprK$ -Mutante hergestellt, um die Funktion der HPr-Kinase bei der Katabolitrepression des Mannose-Operons zu erfahren.

Die chromosomalen Regionen, die *hprK* flankieren, wurden aus der Gesamt-DNA von *B. subtilis* 168 jeweils mit den Primern s5543/s5544 bzw. s5545/s5546 amplifiziert und jeweils in den Zwischenvektor pJOE4786.1 kloniert (pSUN304.8 bzw. pSUN305.1). Das stromaufwärts von *hprK* liegende Fragment mit dem Gen *nagA* wurde dann aus dem Plasmid pSUN304.8 mit den Restriktionsenzymen *KasI* und *EcoRI* ausgeschnitten und mit dem gleich behandelten Vektor pSUN282 zum Plasmid pSUN306.1 ligiert. Das stromabwärts liegende Fragment mit dem Gen *lgt* wurde mit *EcoRI* und *BglII* aus dem Plasmid pSUN305.1 ausgeschnitten und in den gleich geschnittenen Vektor pSUN259.4 mit einem Erythromycinresistenzgen *erm* zum Plasmid pSUN307.1 ligiert. Anschließend wurde jeweils ein *BamHI* Fragment von pSUN306.1 und pSUN307.1 zusammen zu dem Plasmid pSUN308.1 ligiert. Dieses entgültige Plasmid pSUN308.3 enthält wieder eine Erythromycinresistenz zur Selektion der Integration des Plasmids in das *B. subtilis* Chromosom, eine Spektinomycinresistenz, um Einzel- von Doppelcrossover zu unterscheiden, und eine Ampicilliresistenz als Selektionsmarker für *E. coli*. Durch Doppelcrossover nach der Transformation des WT-Stamms mit pSUN308.3 sollte das Erythromycin-Resistenzgen *erm* das *hprK*-Gen im Chromosom ersetzen (Abbildung 4-25).

*B. subtilis* 3NA wurde mit pSUN308.3 transformiert, die Transformanten auf Agarplatten mit Erythromycin selektiert und auf Agar mit Spektinomycin nachgetestet. Eine Erythromycin-resistente, Spektinomycin-sensitive Kolonie wurde ausgewählt und der erwartete Genaustausch durch PCR mit den Primern s5343/s5069 bestätigt. Die Mutante wurde mit TQ308 bezeichnet (Genotyp *spo0A3 ΔhprK::erm*). Um den Effekt der Deletion von *hprK* auf den *manR*- und den *manP*-Promotor zu beobachten, sollten die Plasmide pSUN284.1 und pSUN291 in TQ308 eingebracht werden. Aber wegen des schlechten Wachstums von TQ308 auf Glucose konnte der Stamm mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht transformiert werden. Deshalb wurden die Stämme 3NA pSUN284.1 und 3NA pSUN291 mit pSUN308.3 transformiert und Erythromycin-resistente, Spektinomycin-sensitive Kolonien selektiert. Durch PCR der chromosomalen DNA dieser Kolonien mit den Primern s5343/s5069 wurde der Genaustausch in den Mutanten bestätigt. Die erhaltenen Mutanten wurden jeweils als TQ308 pSUN284.1 und TQ308 pSUN291 bezeichnet.

Das Wachstum der Mutante TQ308 auf Glucose mit oder ohne Expressionsvektoren war durch die Deletion von *hprK* stark beeinträchtigt. Das führte dazu, dass sich die

Generationszeit von TQ308 im Minimalmedium mit 0,5% Glucose als einziger C-Quelle im Vergleich zu der von 3NA verdoppelte. Auch waren die Kolonien von TQ308 auf LB-Agarplatten mit 0,5% Glucose viel kleiner als die Kolonien auf LB-Agarplatten ohne Glucose. Das deutete darauf hin, dass die Deletion von *hprK* den Glucose-Metabolismus stark beeinträchtigte und eventuell gar zur toxischen Anhäufung von Metaboliten führte.

Die Expression von *lacZ* unter dem *manR*- und dem *manP*-Promotor in TQ308 wurde mittels Miller's Assay gemessen. Sowohl der Basalspiegel als auch die Induktion wurden so gravierend erniedrigt, dass die Veränderung der Katabolitrepression der beiden Promotoren in dieser Mutante nicht mehr sicher beurteilt werden konnte (Abbildung 4-26).

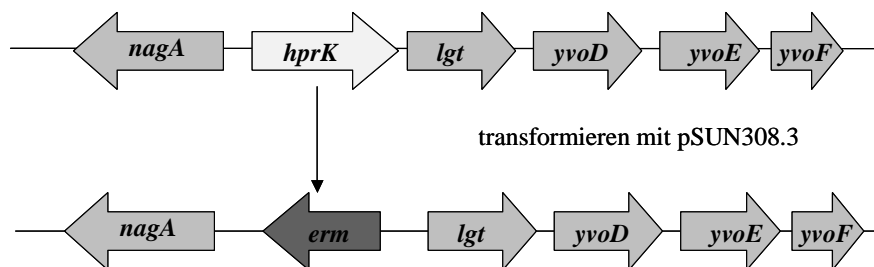


Abbildung 4-25. Konstruktion der  $\Delta hprK$ -Mutante TQ308: Durch Transformation mit dem Plasmid pSUN308.3 wurde das *hprK*-Gen im Chromosom von *B. subtilis* WT 3NA durch das *erm*-Gen ersetzt.

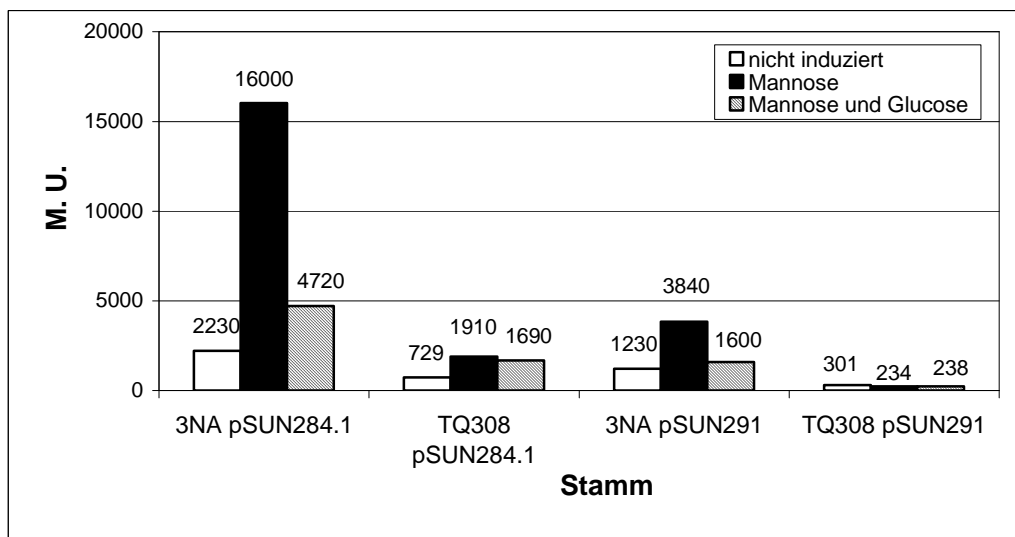


Abbildung 4-26. Regulation des *manP*- Promotors (pSUN284.1) und *manR*-Promotors (pSUN291) in der  $\Delta hprK$ -Mutante im Vergleich zum WT. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mittels Miller's Assay, wie unter 3.8.7 beschrieben, gemessen.

## 4.8 Untersuchung der Bindung des Regulators ManR an den Operator im manP-Promotor

Durch die Deletionsanalyse wurde der Operator im *manP*-Promotor auf eine Sequenz von 55 bp begrenzt. Um den Regulationsmechanismus des Mannose-Operons detaillierter zu erfassen, wurden die Bindungen zwischen Regulator und Operator bzw. die notwendigen Bedingungen dafür *in vitro* untersucht.

### 4.8.1 Expression und Aufreinigung von *manR*

Zuerst wurde versucht, *manR*, fusioniert mit einer Strep-Tag-Sequenz, in *B. subtilis* zu exprimieren, um eine für den aktiven Zustand notwendige Phosphorylierung zu erhalten. Darum wurden zwei pUB110-Derivate pSUN311.1 (*P<sub>manP</sub>-Strep-manR*) und pSUN359.1 (*P<sub>manR</sub>-manR-Strep*) konstruiert. Aber leider konnten die beiden Plasmide nicht in *B. subtilis* durch Transformation oder Elektroporation eingebracht werden, da möglicherweise die Überexpression von *manR* aufgrund der hohen Kopienzahl toxisch für die Zellen war. Darum wurde die Kasette *P<sub>manR</sub>-manR-Strep* in einen pBS72-Vektor mit wesentlich niedrigerer Kopienzahl umklontiert. Der entstandene Vektor pSUN383.1 wurde in die  $\Delta$ *manR*-Mutante TQ276 eingebracht. Das Strep-getagte ManR führte zum Wachstum von TQ276 pSUN383.1 auf Minimal-Agarplatten mit 0,5% Mannose (CMM-Man), was zeigte, dass der Regulator trotz Modifikation am C-Terminus *in vivo* funktionsfähig war.

Der *manR* exprimierende Stamm TQ276 pSUN383.1 wurde in LB-Medium kultiviert und mit 0,2% Mannose 16 h lang induziert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand mit Hilfe einer Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. Auf dem SDS-Gel konnte man nur eine schwach induzierte Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht erkennen, nach der Reinigung war dagegen im Eluat keine Proteinbande zu sehen. Mit dieser geringen Expression und Aufreinigung ließen sich die geplanten Experimente nicht durchführen. Daher wurde versucht, *manR* in *E. coli* zu exprimieren.

Bei den ersten zwei konstruierten Expressionsvektoren von *E. coli* liegt *manR* unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors und ist mit einem His-Tag entweder am N-Terminus (pSUN389.1) oder am C-Terminus (pSUN390.1) fusioniert. Die Stämme JM109 pSUN389.1 und JM109 pSUN390.1 wurden mit 0,2% Rhamnose in LB-Medium 24 h bei 22°C induziert. Nach dem Zellaufschluss wurde der Rohextrakt durch Zentrifugation in

Überstand und Pellet getrennt. Der Überstand wurde mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Expression bzw. die Aufreinigung wurde mittels eines 12%igen oder 15%igen SDS-PAGE ausgewertet. In Abbildung 4-27 sieht man jeweils eine Bande von ca. 65 kDa im löslichen Rohextrakt (Ü) der induzierten Kulturen. Diese Banden sollten das von *manR-6His* codierte Protein aus JM109 pSUN390.1 bzw. das *6His-manR* codierte Protein aus JM109 pSUN389.1 sein, obwohl das nach DNA-Sequenz berechnete Molekulargewicht ca. 76 kDa beträgt. Der Grund für die Abweichung ist unklar. Da die His-Tag-Reinigung sowohl bei dem am N-Terminus getagten ManR als auch bei dem am C-Terminus getagten ManR möglich war, kann es nicht sein, dass dies auf Proteolyse zurückgeht. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die Proteine in diesem Versuch, so wie viele hydrophobe Proteine oder Proteine mit sehr rigider Struktur, in SDS-Gelen nicht gemäß ihrem Molekulargewicht wandern, sondern sich schneller durch das Gel bewegen.

In Abbildung 4-28 ist deutlich zu sehen, dass das unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors in *E. coli* exprimierte *manR-6His* sich gut mit Ni-NTA-Agarose aufreinigen ließ, auch wenn einige weitere Proteine als Verunreinigungen noch vorhanden waren. Dies liegt wohl daran, dass die Expression von *manR-6His* zwar hoch war, aber fast 50 % als Inclusion bodies produziert wurden und man somit aus einer großen Menge Rohextrakt aufreinigen musste. Die Aufreinigung des Rohextrakts von JM109 pSUN389.1 zeigte das gleiche Ergebnis und wurde hier nicht dargestellt.

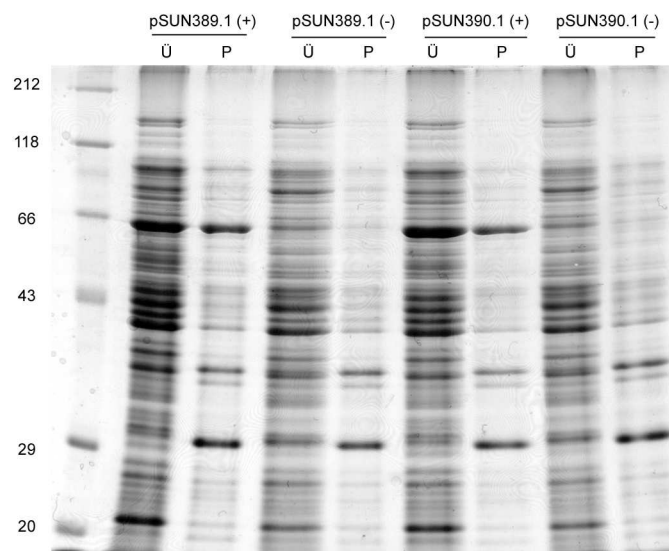


Abbildung 4-27. Expression von *6His-manR* (pSUN389.1) und *manR-6His* (pSUN390.1) in *E. coli* JM109. (+): mit 0,2% Rhamnose bei 22°C 24 h induziert. (-): unter gleichen Bedingungen nicht induziert. Ü: Überstand. P: Pellet.



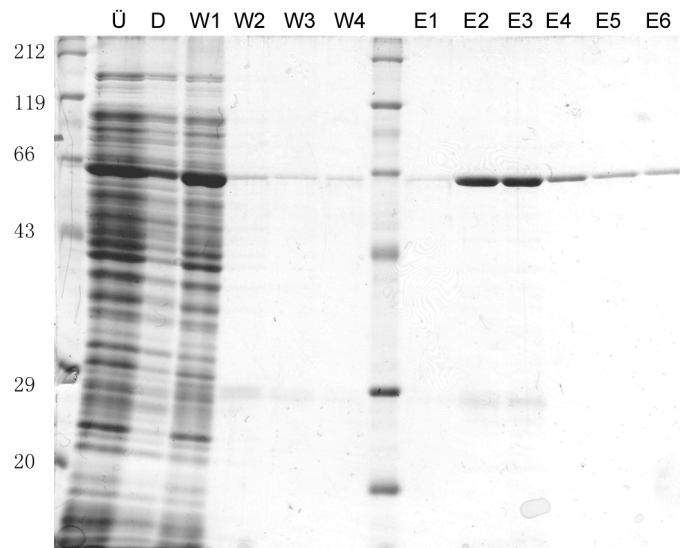


Abbildung 4-28. Aufreinigung des Rohextrakts von JM109 pSUN390.1 mit der Ni-NTA-Agarose-Säule (siehe 3.8.5). Ü: Überstand, D: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluat.

Es wurden dann drei weitere Expressionsvektoren konstruiert, pSUN418.1, pSUN427.1 und pSUN419.1, die ebenfalls den Rhamnose-Promotor trugen, aber eine Strep-Tag-Sequenz am C-Terminus hatten und kein vollständiges *manR*-Gen enthielten. Das Plasmid pSUN418.1 enthielt nur die DNA-Bindedomäne codierende Sequenz (*manR*<sub>1-264</sub>). Das Plasmid pSUN427.1 enthielt die Sequenz vom Startcodon bis kurz vor der ersten PRD von ManR (*manR*<sub>1-534</sub>), und pSUN419.1 die DNA-Bindedomäne und die zwei PRDs codierende Sequenz (*manR*<sub>1-1215</sub>). Das 3'- stark verkürzte *manR*<sub>1-264</sub>, das nur die DNA-Bindedomäne codiert, wurde in *E. coli* JM109 gut exprimiert und konnte durch die Strep-Tactin-Säule aufgereinigt werden (Abbildung 4-29). Die in der dritten Fraktion des Eluats vorhandene Proteinbande entsprach dem von *manR*<sub>1-264</sub> exprimierten ca. 12 kDa großen Protein und wurde weiter verwendet. Das *manR*<sub>1-534</sub> ließ sich in *E. coli* JM109 gut exprimieren, aber die Affinität dieses 23 kDa großen Proteins an die Strep-Tactin-Säule war nicht befriedigend. Das Strep-getagte Protein band zwar an die Säule, aber ließ sich auch sehr leicht abwaschen (Abbildung 4-30A). Das Gen *manR*<sub>1-1215</sub>, das die DNA-Bindedomäne und zwei PRDs codiert, ließ sich nur zum Teil löslich in *E. coli* exprimieren, zeigte aber eine etwas höhere Affinität zur Matrix der Strep-Tactin-Säule (Abbildung 4-31). Die Fraktionen von W2 bis E4 der beiden Aufreinigungen aus JM109 pSUN427.1 und JM109 pSUN419.1 wurden jeweils vereinigt. Durch eine Gelfiltrationssäule (PD Midi Trap G-25 von GE-Healthcare) wurde der Elutionspuffer der Probe gegen Puffer H ausgetauscht und durch eine Amicon-Säule (Amicon-Ultra4) wurde das Probevolumen von 4 ml zu 0,4 ml aufkonzentriert. Zum Überprüfen dieser Aufarbeitung wurden 10 µl des konzentrierten Proteins aus JM109 pSUN427.1 auch mit SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4-30 B).

Die drei aufgereinigten ManR-Varianten aus JM109 pSUN390.1, JM109 pSUN418.1, JM109 pSUN427.1 und JM109 pSUN419.1 wurden weiter in Mobility-Shift-Assay und Gelfiltration verwendet.

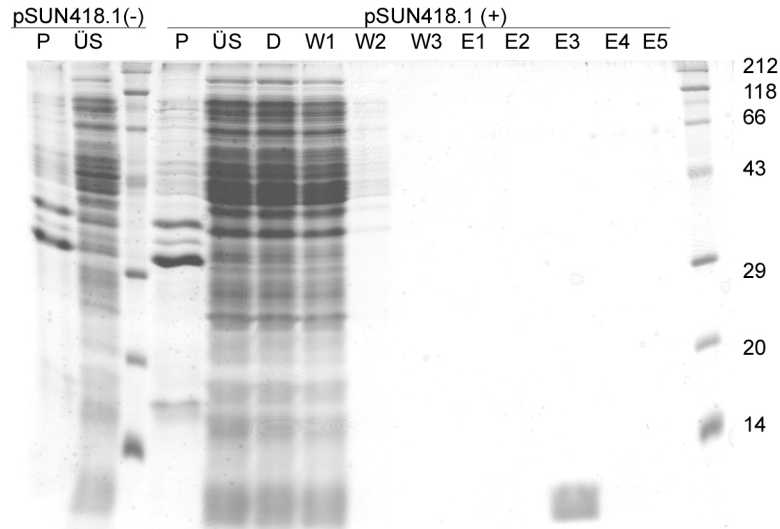


Abbildung 4-29. Aufreinigung des Zellaufschluss-Überstands von JM109 pSUN418.1 mit der Strep-Tactin-Säule (siehe 3.8.6). P: Pellet, ÜS: Überstand, D: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluat. Von jeder Probe wurde 10 µl auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen

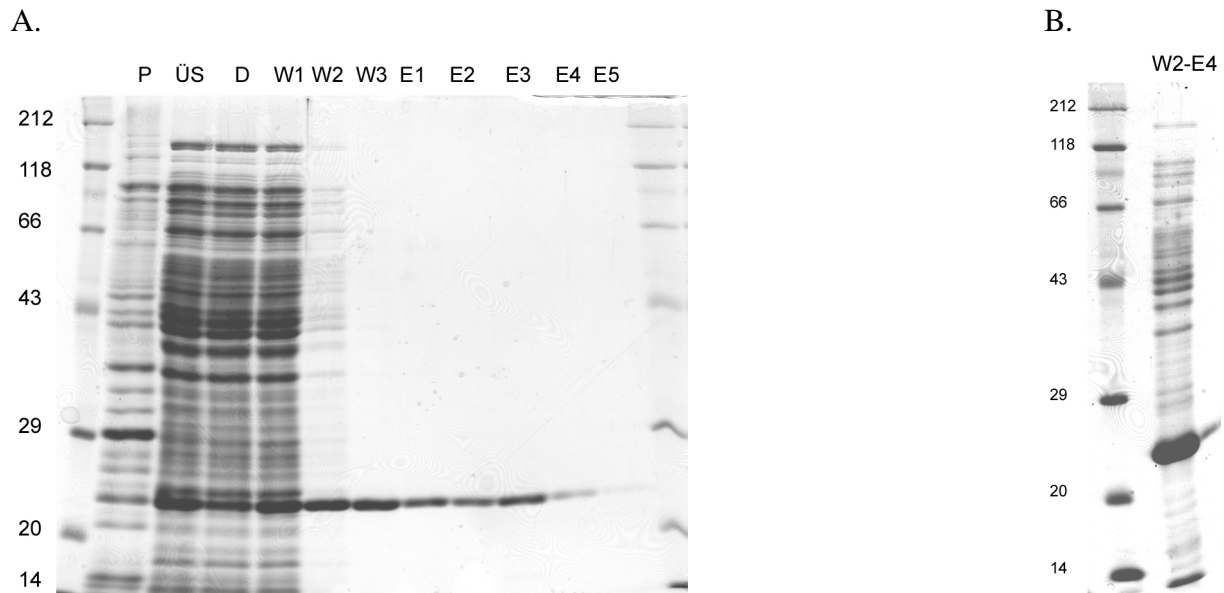


Abbildung 4-30. (A) Aufreinigung des Zellaufschluss-Überstands von JM109 pSUN427.1 mit der Strep-Tactin-Säule (siehe 3.8.6). P: Pellet, ÜS: Überstand, D: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluat. Die Fraktionen von W2 bis E4 wurden vereinigt und mit einer Amicon-Säule zu 0,4 ml aufkonzentriert. Von jeder Probe wurde 10 µl auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. (B) Vereinigte und aufkonzentrierte Fraktionen von W2-E4.

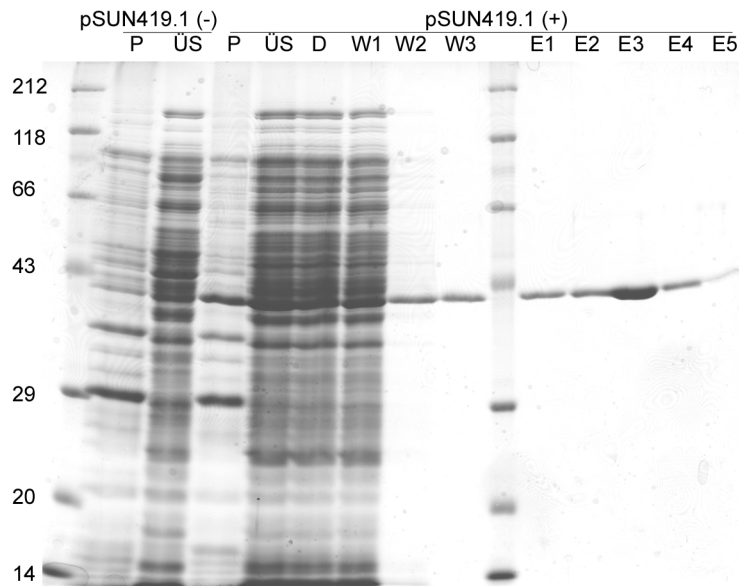


Abbildung 4-31. Aufreinigung des Rohextrakts aus JM109 pSUN419.1 mit der Strep-Tactin-Säule (siehe 3.8.6). (-): nicht induziert, (+): mit 0,2% Rhamnose induziert. P: Pellet, ÜS: Überstand, D: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluat

#### 4.8.2 Ermittlung der Dimerbildung durch Gelfiltration

Gelfiltration ist eine Methode der Flüssigchromatographie, womit Moleküle in Lösung aufgrund ihrer Größe getrennt werden können. In dieser Arbeit wurde die Trennsäule Superdex75 (HR10/30) verwendet, um die Molekülgröße der ManR-Varianten unter nativen Bedingungen festzustellen. Der Trennungsbereich der Superdex75-Säule liegt zwischen 3 und 70 kDa. Daher wurden nur die drei verkürzten Varianten ManR<sub>1-264</sub>, ManR<sub>1-534</sub> und ManR<sub>1-1215</sub> mit dieser Methode untersucht. Die tiefgestellten Zahlen der ManR-Varianten geben dabei jeweils die Länge der codierenden Nukleotidsequenzen an, dazu kommen nochmals die 24 Nukleotide der Strep-Tag Sequenz an den C-Termini. Die Gelfiltration erfolgte auf einer SMART-Anlage (Pharmacia/GE-Healthcare). Zuerst wurde die Säule mit Standardproteinen kalibriert (Tabelle 4-2, Abbildung 4-33 A-C). Mit Hilfe der Kalibrierkurve wurden die Molekülmassen der Proben ermittelt (Tabelle 4-3, Abbildung 4-32).

Bei dem durch eine Strep-Tactin-Säule aufgereinigten ManR<sub>1-264</sub> trat ein großer Peak beim Elutionsvolumen 1,61 ml auf (Abbildung 4-33 D), das einem Protein von 25,2 kDa und wahrscheinlich dem Dimer von ManR<sub>1-264</sub> entsprach. Die zwei kleinen Peaks in dem Chromogramm von ManR<sub>1-264</sub> wurden vermutlich von Verunreinigungen in der Probe verursacht. Bei ManR<sub>1-534</sub> trat ein Peak beim Elutionsvolumen 1,30 ml auf (Abbildung 4-33 E), das einem Protein von ca. 61,8 kDa entsprach. Das theoretische Molekulargewicht von ManR<sub>1-534</sub> beträgt ca. 23 kDa und bei der Auswertung seiner Expression und Aufreinigung auf dem SDS-Gel war auch eine Bande von 23 kDa zu sehen (Abbildung 4-30 Tabelle 4-3). Daher

sollte es sich bei diesem 61,8 kDa großen Protein wahrscheinlich um ein Dimer oder ein Trimer von ManR<sub>1-534</sub> handeln, obwohl die Bildung eines Trimers bei DNA-bindenden Proteinen ungewöhnlich wäre. Bei dem gereinigten ManR<sub>1-1215</sub>, dessen Monomer ein kalkuliertes Molekulargewicht von 49 kDa hat, war nur ein Proteinpeak von ca. 36 kDa zu beobachten (Abbildung 4-33 F). Das theoretische Molekulargewicht von ManR<sub>1-1215</sub> beträgt ca. 49 kDa. Demnach entsprach dieses Peak eher dem Monomer als einem Multimer von ManR<sub>1-1215</sub>. Die Analyse der Expression und Aufreinigung von *manR*<sub>1-1215</sub> auf dem SDS-Gel zeigte eine Bande von ca. 40 kDa statt 49 kDa (Abbildung 4-31). Diese Abweichung zwischen dem theoretischen Molekulargewicht und dem mit SDS-PAGE oder Gelfiltration ermittelten Molekulargewicht könnte daran liegen, dass dieses ManR<sub>1-1215</sub> eine ungewöhnliche Struktur hat, so dass es sowohl in SDS-PAGE, als auch in der Gelfiltration sich anders als Standardproteine verhält. Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen durch Gelfiltration setzt globuläre Proteine voraus. Eine Abweichung der Proteine von einer idealen kugelförmigen Struktur könnte zu Abweichungen bei der Ermittlung des Molekulargewichts führen. Eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts sollte daher mit Hilfe von Massenspektrometrie überprüft werden.

Tabelle 4-2. Standardproteine zur Kalibrierung der Trennsäule Superdex75

Protein	Elutionsvolumen (ml)	Molekulargewicht (kDa)
Ovalbumin	1,41	44,3
Trypsin aus Schweinpankreas	1,63	23,8
Lysozym aus Eier	1,80	14,3

Tabelle 4-3. Vergleich der mit verschiedenen Methoden bestimmten Molekulargewichte der ManR-Varianten

Protein	ManR <sub>1-264</sub>	ManR <sub>1-534</sub>	ManR <sub>1-1215</sub>
Domäne in ManR	DNA-Bindedomäne	DNA-Bindedomäne + Zwischenregion vor der ersten PRD	DNA-Bindedomäne + 2 PRDs
theoretisches Mr (kDa) - Monomer	11,8	22,6	49,2
theoretisches Mr (kDa) - Dimer	23,6	45,2	98,4
nach SDS-PAGE geschätztes Mr (kDa)	12	23	40
Elutionsvolumen (ml) bei Gelfiltration	1,61	1,30	1,48
durch Gelfiltration ermitteltes Mr (kDa)	25,2	61,8	36,0

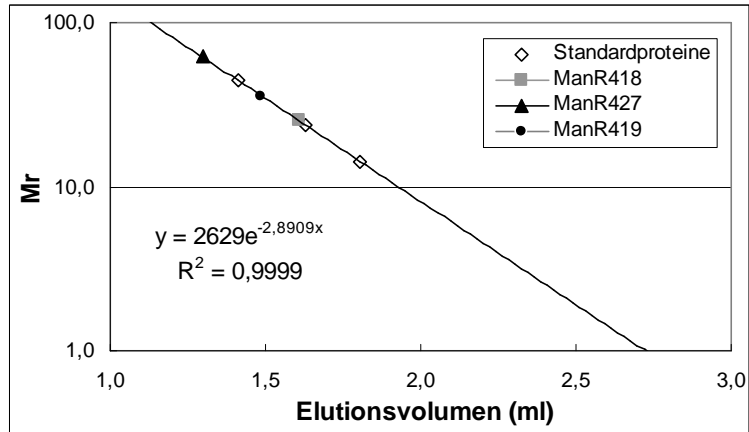
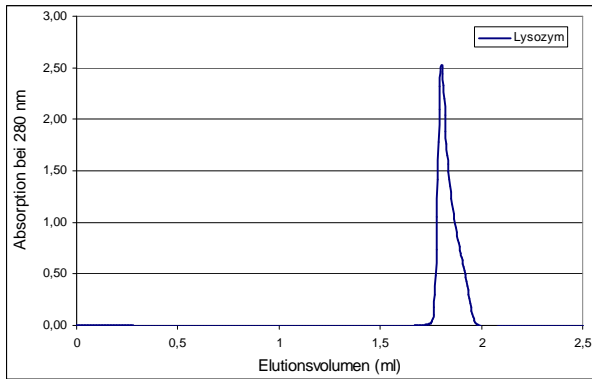
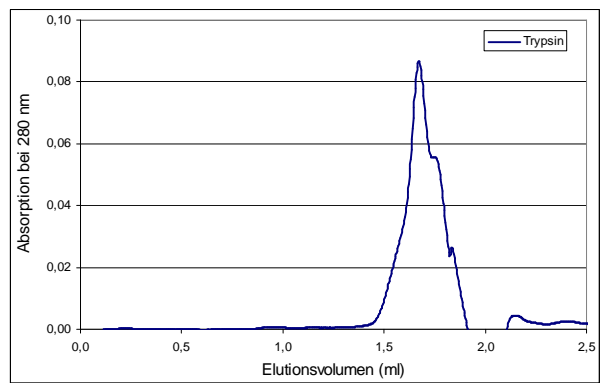


Abbildung 4-32. Gelfiltrationsanalyse der ManR-Varianten. Die von der Trennsäule Superdex75 eluierten Volumina von Standardproteinen wurden gegen deren Molekulargewichte zur Ermittlung der Kalibrierkurve aufgetragen. In die Kalibrierkurve wurden die jeweiligen Elutionsvolumina der Proben eingetragen und das Molekulargewicht berechnet.

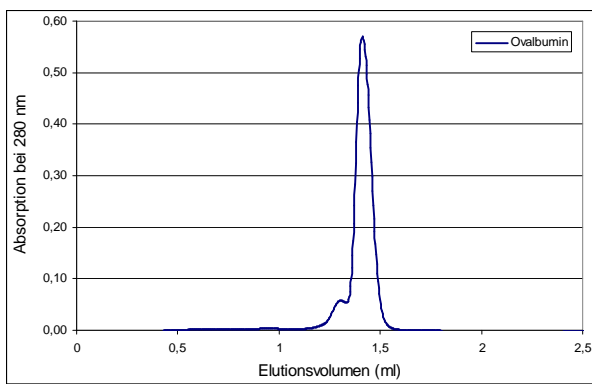
A.



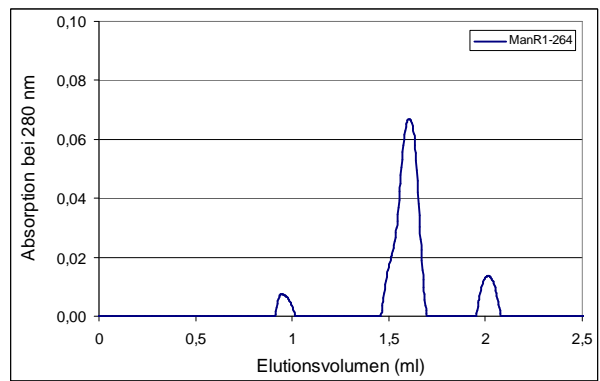
B.



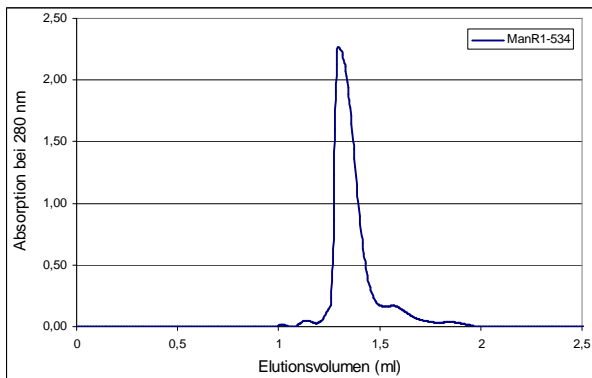
C.



D.



E.



F.

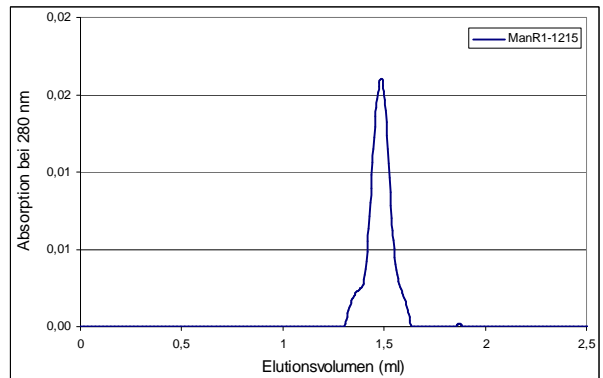


Abbildung 4-33. Gelfiltration-Chromatogramm der Standardproteine: Lysozym (A), Trypsin (B) und Ovalbumin (C) und der ManR-Varianten: ManR<sub>1-264</sub> (D), ManR<sub>1-534</sub> (E) und ManR<sub>1-1215</sub> (F). Die Basallinie wurde auf Null nominiert.

### 4.8.3 Mobility-Shift-Analyse zur Identifizierung der *in vitro* Bindung

Um die Bindung des Regulators ManR an den Operator *in vitro* zu analysieren, sollten Mobility-Shift-Analysen durchgeführt werden. Als Bindungsziel von ManR wurde ein am 5'-Ende mit Cy5 markiertes Oligonukleotid s6244 synthetisiert, das der Sequenz von -79 bis -30 des *manP*-Promotors entspricht (Abbildung 4-34). Das komplementäre Oligonukleotid s6245 wurde ohne Cy5-Markierung hergestellt. Die zwei Oligonukleotide wurden, wie in 3.5.8 beschrieben, hybridisiert und auf 0,1  $\mu$ M verdünnt im Shift-Assay eingesetzt.

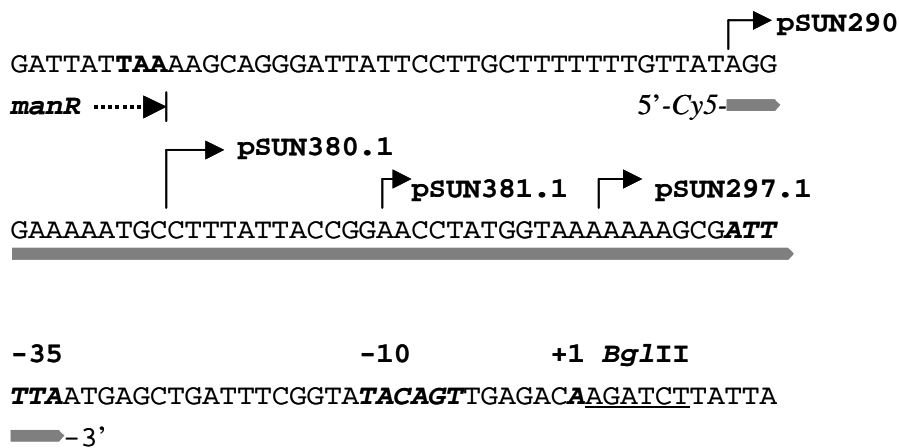


Abbildung 4-34. Ausschnitt aus der Sequenz des *manP*-Promotors. Die Sequenz des mit Cy5 markierten Oligonukleotids s6244 ist mit einem grauen Balken unterstrichen und entspricht der Sequenz von -79 bis -30 bp des *manP*-Promotors.

Zuerst wurde das vollständige, über Strep-Tactin-Säule aufgereinigte und mit einer Strep-Tag-Sequenz am C-Terminus fusionierte ManR aus JM109 pSUN390.1 in die Bindungsreaktion in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt (siehe 3.8.7). Dabei konnte keine deutliche Bindung vom Protein an DNA anhand einer veränderten Wanderung des markierten DNA-Fragments festgestellt werden. Allerdings blieb bei der Erhöhung der Proteinmenge schließlich die gesamte markierte DNA in der Geltasche (Abbildung 4-35). Um die Assaybedingungen zu optimieren, wurden viele Faktoren wie Puffer, pH-Wert, Salzkonzentration,  $MgCl_2$ - und EDTA-Konzentration, unspezifischer Kompetitor und Elektrophorese-Bedingungen untersucht, die einen Einfluß auf die Bindungsreaktion haben könnten. Trotzdem blieb das oben beschriebene Ergebnis nach all den Optimierungsversuchen etwa das gleiche. Eine mögliche Erklärung für das Ergebnis könnte in der Größe des ManR liegen. Das ManR-Monomer ist ca. 75 kDa groß. Wenn es wie zu vermuten ein Dimer oder evtl. Tetramer bildet, dann bindet ein Protein von mindestens 150 kDa an die DNA, sodass der Komplex eventuell nicht mehr in das verwendete 6%ige native Gel einwandern kann.

Deswegen wurden die verkürzten Varianten ManR<sub>1-264</sub>, ManR<sub>1-534</sub> und ManR<sub>1-1215</sub> nach der Aufreinigung und Aufkonzentrierung in den Mobility-Shift-Assay eingesetzt.

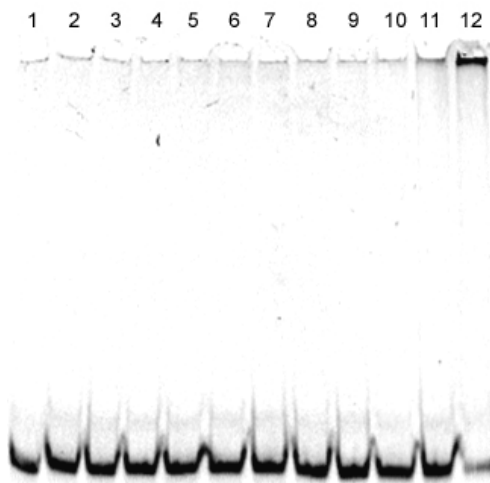


Abbildung 4-35. Mobility-Shift-Assay mit ManR aus JM109 pSUN390.1 und hybridisierten Oligonukleotiden s6244(5'-Cy5)/s6245. Der Assay wurde wie in 3.8.7 beschrieben durchgeführt. In jeder Reaktion wurden 0,1 pMol DNA und verschiedene Mengen von Protein (Spur 1: Kontrolle, kein Protein; Spur 2-12: 0,1; 0,125; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,65; 2,5; 5 pMol ManR Monomer) eingesetzt



In Abbildung 4-36 ist das Ergebnis des Mobility-Shift-Assays mit verschiedenen Mengen von ManR<sub>1-1215</sub> (DNA-Bindedomäne mit zwei PRDs) und 0,1 pMol DNA dargestellt. Erst wenn 0,4 µg (ca. 8 pMol) Protein in die Reaktion eingesetzt wurde, konnte eine sehr schwache Bande mit verzögerter Wanderung beobachtet werden, obwohl nun bereits ein 80-facher Überschuß von Protein zu DNA vorlag. Wenn noch mehr Protein (Abbildung 4-36, Spur 6) zugegeben wurde, wurde die Bande nicht verstärkt, sondern schmierte bis zu der Tasche.

Der Mobility-Shift-Assay mit gereinigtem ManR<sub>1-534</sub> (DNA-Bindedomäne alleine) und der gleichen DNA ergab etwas deutlichere Ergebnisse im Vergleich zu ManR<sub>1-1215</sub>. Mit einer Proteinmenge von 0,075 µg (Abbildung 4-37, Spur 3, ca. 3 pMol) trat bereits eine in der Wanderung verzögerte Bande auf. Mit steigender Proteinmenge wurde die Bande intensiver. Allerdings gab es auch hier das Problem, dass mit einem großen Überschuß an Protein (Spur 5, 30 pMol) noch immer freie DNA vorhanden war und ein großer Teil über die Spur verschmierte oder in der Tasche liegen blieb. Offensichtlich ist die Dissoziationskonstante der verschiedenen ManR-Varianten zur verwendeten DNA sehr hoch, sodass das Protein während der Trennung im Gel bereits abdissoziiert. Möglicherweise wären andere Methoden zur Untersuchung dieser Protein-DNA-Bindung, wie z. B. DNaseI-Footprinting-Assays erfolgreicher.

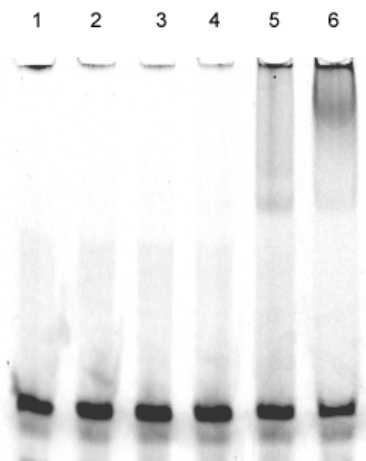


Abbildung 4-36. Mobility-Shift-Assay mit ManR<sub>1-1215</sub> und hybridisierten Oligonukleotiden s6244(5'-Cy5)/s6245. Der Assay wurde wie in 3.8.7 beschrieben durchgeführt. In jeder Reaktion wurden 0,1 pMol DNA und verschiedene Mengen von Protein (Spur 1: Kontrolle, kein Protein; Spur 2-6: 0,075; 0,15; 0,75; 7,5; 22,5 pMol ManR Monomer) eingesetzt.

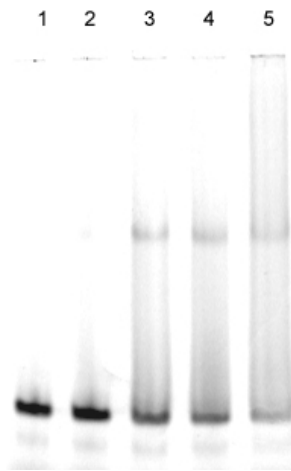


Abbildung 4-37. Mobility-Shift-Assay mit  $\text{ManR}_{1-534}$  und den hybridisierten Oligonukleotiden s6244(5'-Cy5)/s6245. Der Assay wurde wie in 3.8.7 beschrieben durchgeführt. In jeder Reaktion wurden 0,1 pMol DNA und verschiedene Mengen von Protein (Spur 1: Kontrolle, kein Protein; Spur 2-5: 0,1; 2,8; 5,6; 28 pMol ManR Monomer) eingesetzt.

## 4.9 Entwicklung eines Hybridsystems von Mannose- und Mannitol-Promotor

Der Mannose induzierbare Promotor  $P_{manP}$  ist ein vergleichsweise starker Promotor, obwohl seine  $-35$ -Region von der Konsensussequenz eines  $\sigma^A$  Promotors weit entfernt ist. Mannitol ist der von Mannose abgeleitete Zuckeralkohol. In *B. subtilis* wird Mannitol ebenfalls durch ein PTS-System in Form von Mannitol-1-Phosphat aufgenommen und durch Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt, zu dem auch Mannose nach Aufnahme in die Zelle als Mannose-6-Phosphat durch eine Isomerase umgewandelt wird. In *B. subtilis* besteht das Mannitol-Operon aus zwei Genen, nämlich das *mtlA*-Gen für den EIICBA Transporter und das *mtlD*-Gen für die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase. Ein *mtlR*-Gen, das 14,4 kb stromabwärts von *mtlAD* liegt, codiert für den mutmaßlichen PRD-haltigen Transkriptionsregulator des Mannitol-Operons (Kunst et al. 1997; Watanabe et al. 2003). In Hinblick auf ihre Homologie in DNA- und Aminosäuresequenz, die ähnlichen Funktionen von Regulator und Transporter sowie Metabolismus und Gen-Anordnung wurde versucht, ein Hybridsystem aus diesen Abbauwegen zu entwickeln, insbesondere aus den beiden Regulatoren, um zu sehen, wieweit ein Austausch der verschiedenen Domänen möglich ist sowie der beiden Promotoren, um die Operatoren bezüglich ihrer minimalen Sequenz und Lage zur  $-35$ -Sequenz zu bestimmen.

### 4.9.1 Fusion von ManR und MtlR Domänen

Der Transkriptionsregulator MtlR des Mannitol-Operons von *B. subtilis* ist nach der Homologie-Analyse auch ein PRD-Regulator. Er hat auf ähnliche Weise wie ManR zwei HTH-Domänen am N-terminalen Ende, gefolgt von zwei PRD-Domänen sowie eine EIIB und eine EIIA ähnliche Domäne. Über die Gesamtsequenz weisen ManR und MtlR eine Identität von 26% in der Aminosäure-Sequenz auf, die jedoch innerhalb der Domänen wesentlich höher liegt. Es wurde nun versucht, an die ManR-DNA-Bindedomäne verschieden lange Bereiche von MtlR zu fusionieren, mit denen es möglich sein sollte, den *manP*-Promotor durch Mannitol zu aktivieren.

Zunächst wurden zwei Versionen von Hybridregulatoren konstruiert. Das erste Hybrid-Gen (Fusionsregulator 1; *manR*<sub>1-199</sub>-*mtlR*<sub>206-694</sub>) bestand aus einer Fusion der *manR*-Sequenz vom Startcodon bis zu Beginn der ersten PRD-Domäne und der *mtlR*-Sequenz von der ersten PRD-

Domäne bis zum Stoppcodon. Das zweite Hybrid-Gen (Fusionsregulator F2) bestand aus der *manR*-Sequenz vom Startcodon bis einschließlich der zwei PRD-Domänen und der EIIB-Domäne von *mtlR*. Die Fusionen wurden durch Fusions-PCR mit überlappenden Primern realisiert. Die Fusionsstellen und entsprechenden Primer sind in Abbildung 4-38 dargestellt:

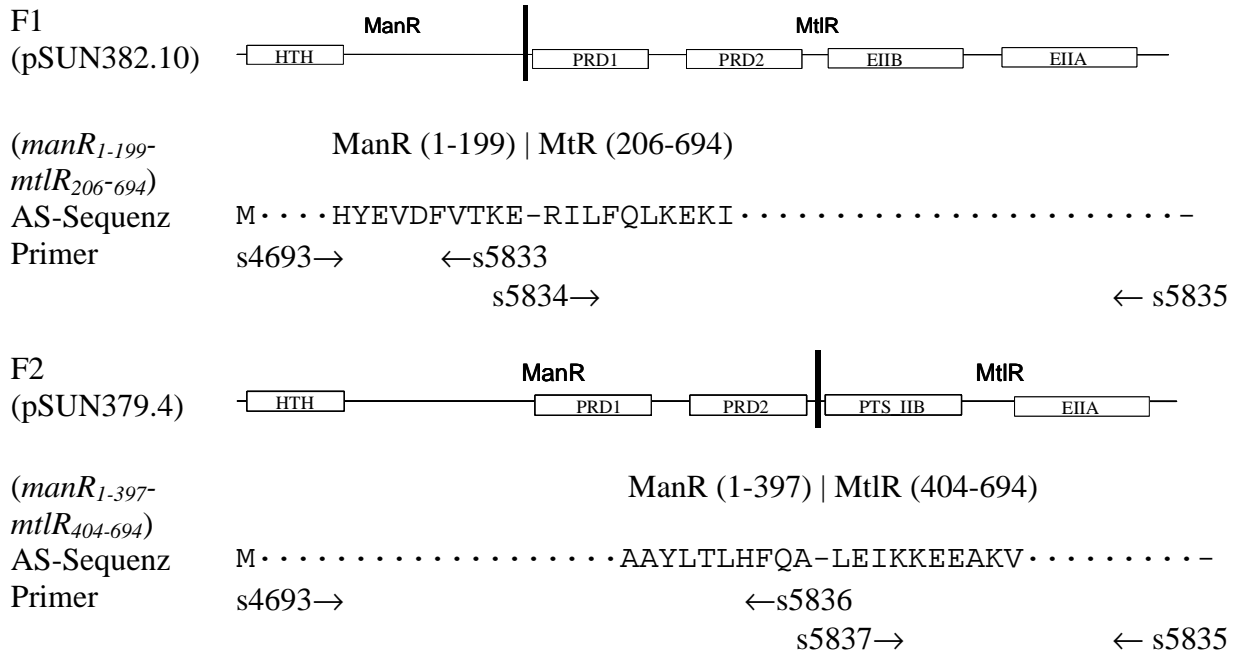


Abbildung 4-38. Schematische Darstellung der Fusionsregulatoren F1 und F2, ihrer Übergangssequenzen und der für die Fusion benutzten Primer. (AS = Aminosäure)

In dem Fall von Fusionsregulator F2 wurden zuerst das 5'-Ende von *manR* mit den Primern s4693/s5836 und das 3'-Ende von *mtlR* mit den Primern s5837/s5835 aus dem *B. subtilis* 168-Chromosom amplifiziert. Dann wurde eine Fusions-PCR mit den Primern s4693 und s5835 durchgeführt, in dem die vorherigen PCR-Produkte s4693/s5836 und s5837/s5835 aufgrund der Überlappungen in den Primern s5836 und s5837 hybridisiert und damit verlängert wurden. Diese verlängerten Fragmente dienten dann als Matrize für die weitere Amplifikation mit den beiden äußeren Primern. Die Vorgehensweise in der Fusions-PCR wurde unter 3.5.2.2 erklärt. Das fusionierte DNA-Fragment wurde dann in den positiven Selektionsvektor pJOE4786.1 zwischenkloniert. Aus dem entstandenen Plasmid pSUN370.1 wurde das Fragment erneut mit *PmeI* und *SpeI* ausgeschnitten und zwischen die *PmlI* und *NheI* Schnittstellen des Vektors pSUN298.1 inseriert (pSUN379.4). Der Shuttlevektor pSUN379.4 enthielt nun das Hybridgen *manR<sub>1-397</sub>-mtlR<sub>404-694</sub>* zusammen mit dem *manP*-Promotor vor *lacZ*. Dieses Plasmid wurde in die  $\Delta$ *manR*-Mutante TQ276 eingebracht. Über eine ähnliche

Vorgehensweise wurde das Plasmid pSUN382.10 mit dem Hybridgen *manR*<sub>1-199</sub>-*mtlR*<sub>206-694</sub> konstruiert, das ebenfalls in TQ276 eingebracht wurde.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der beiden Stämme wurde mittels Miller's Assay gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4-4 zusammengestellt. Daraus ist zu sehen, dass das *lacZ*-Gen in TQ276 pSUN382.10 (F1) und TQ276 pSUN379.4 (F2) sehr schwach transkribiert wurde, zwar deutlich höher als in TQ276 ohne *manR*-Gen, aber auch deutlicher niedriger als in TQ276 mit intaktem *manR*-Gen auf dem Plasmid. Weder durch Mannose noch durch Mannitol kam es zu einer Induktion. Da bisher keine 3D-Strukturdaten für die beiden Regulatoren bekannt sind, waren die hier konstruierten Fusionen notgedrungen relativ willkürlich. Daher wurde vermutet, dass vielleicht nur ein sehr geringer Anteil an Fusionsregulator überhaupt aktiv war und das Ausbleiben einer Induktion auf das Fehlen einer Wechselwirkung zwischen den PRD- bzw. EIIA/EIIB Domänen und der DNA-Bindedomäne zurückgeht. Um die Chancen für einen funktionierenden Hybridregulator zu erhöhen, wurden daher zwei weitere Hybridgene konstruiert, in denen Regionen für andere konservierte Aminosäuren als Fusionsstellen gewählt wurden. In Fusion F3 wurde der ManR-Anteil auf die ersten 79 Aminosäuren (AS1-79) verkürzt, d.h. auf die minimale HTH-Domäne und der C-terminale Anteil wurde durch AS78-697 von MtlR ersetzt. In F4 waren die ersten 163 AS von ManR mit den letzten 537 AS von MtlR fusioniert. Die für die beiden Fusionsregulatoren codierenden Gene wurden wie zuvor für die Hybridgene *manR*<sub>1-397</sub>-*mtlR*<sub>404-694</sub> und *manR*<sub>1-199</sub>-*mtlR*<sub>206-694</sub> beschrieben, konstruiert und in den Shuttlevektor pSUN298.1 kloniert. Die entstandenen Plasmide pSUN402.13 (F3) und pSUN396.5 (F4) wurden auch in TQ276 eingebracht.

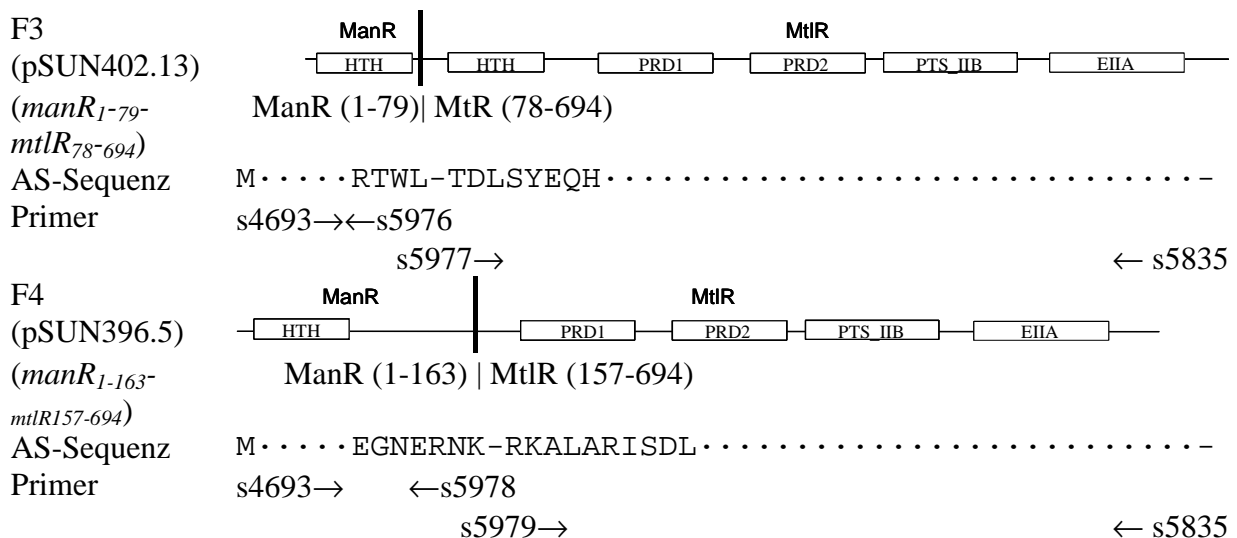


Abbildung 4-39. Schematische Darstellung der Fusionsregulatoren F1 und F2, ihrer Übergangssequenzen und der für die Fusion benutzten Primer. (AS = Aminosäure).

Wie bereits mit den zwei Hybridgenen zuvor zeigten auch Transformanten von TQ276 mit den Plasmiden pSUN396.5 und pSUN402.13 nur eine geringe Expression von *lacZ* (siehe Tabelle 4-1, S.88) und keine Induzierbarkeit durch Mannose oder Mannitol. Offensichtlich wurde bisher keine geeignete Fusionsstelle gefunden oder aber die beiden Regulatoren sind in ihrer Struktur doch zuweit voneinander entfernt, um ein funktionsfähiges Protein bilden zu können.

Tabelle 4-4 Induktion des *lacZ*-Gens unter der Kontrolle von  $P_{manP}$  im Stamm TQ276 durch Mannose oder Mannitol mit verschiedenen Fusionsregulatoren

Hybridgen	Stamm	M. U.		
		nicht induziert	0,2% Mannose	0,2% Mannitol
F1 <i>manR</i> <sub>1-199</sub> - <i>mtlR</i> <sub>206-694</sub>	TQ276 pSUN382.10	252	214	116
F2 <i>manR</i> <sub>1-397</sub> - <i>mtlR</i> <sub>404-694</sub>	TQ276 pSUN379.4	712	738	274
F3 <i>manR</i> <sub>1-79</sub> - <i>mtlR</i> <sub>78-694</sub>	TQ276 pSUN402.13	402	441	237
F4 <i>manR</i> <sub>1-163</sub> - <i>mtlR</i> <sub>157-694</sub>	TQ276 pSUN396.5	400	367	239
Kontrolle				
Kein Regulator	TQ276 pSUN284.1	0	0	0
<i>manR</i> - $P_{manP}$	TQ276 pSUN279.2	3826	14512	4002

#### 4.9.2 Austausch der Operatorsequenz von $P_{manP}$ durch den $P_{mtlA}$ Operator

Als weitere Hybride aus den zwei Regulationssystemen wurden Sequenzen aus den  $P_{manP}$  und  $P_{mtlA}$  Promotoren fusioniert. Die neuen Hybridpromotoren sollten die -35- und -10-Region des *manP*-Promotors behalten, aber durch den Austausch der Operatorregion durch Mannitol induzierbar werden. Die -10 und -35 Sequenz des *manP*-Promotors wurde bereits durch die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts definiert und die Operatorsequenz durch Deletionsanalyse auf die Region -80 bis -35 bp stromaufwärts vom *manP*-Transkriptionsstart beschränkt. Die -35- und -10-Region des *mtlA*-Promotors war ebenfalls auch durch Primer-Extension-Experimente ermittelt worden (unveröffentlichte Arbeit von Kambiz Morabbi Heravi). Als Operator wurde eine 37 bp lange Sequenz zwischen -85 und -49 bezüglich des Transkriptionsstarts von *mtlA* (5'-TAT TTT TAA AAA ATT GTC ACA GTC ATG TGC

CAA AGT C-3') vorgeschlagen aufgrund der Homologie zu einer experimentell bestimmten Operatorsequenz des Mannitol-Operons in *B. stearothermophilus* (Watanabe et al. 2003).

Um eine optimale Fusionsstelle zwischen den beiden Promotoren zu erhalten, wurden in dieser Arbeit sechs Hybridpromotoren mittels Fusions-PCR konstruiert. Jeder Hybridpromotor setzte sich aus der gleichen Operatorsequenz von *mtlA*, der Basensequenz von -89 bis zu -35 bp bezüglich des *mtlA*-Transkriptionsstarts und einer in der Länge variablen Sequenz des *manP*-Promotors zusammen. Die *manP*-Promotorsequenzen hatten unterschiedliche Ausdehnungen um die -35 Sequenz und reichten immer bis +20 bezüglich des *manP*-Transkriptionsstarts (Abbildung 4-40). Als PCR-Template dienten die Plasmide pSUN279.2 und pKM1, die *manR-P<sub>manP</sub>* bzw. *P<sub>mtlA</sub>* vor *lacZ* inseriert hatten und ansonsten identisch waren.

Für die erste Fusion wurde zuerst aus pKM1 ein ca. 700 bp-Fragment amplifiziert, das vom 3'-Ende des Spektinomycinresistenzgens bis zur Position -36 bezüglich des *mtlA*-Transkriptionsstarts reichte und damit die *mtlA*-Operatorsequenz einschloß. Für die PCR wurden die Primern s5208 und s6214 verwendet. Aus Plasmid pSUN279.2 wurde mit den Primern s6215 und s5203 ein ca. 1200 bp-Fragment amplifiziert, das die Region von der Position -38 bezüglich des *manP*-Transkriptionsstarts bis zu etwa einem Drittel von *lacZ* beinhaltete. Durch die Überlappung der Primer s6214 und s6215 konnten beide PCR-Fragmente hybridisiert und verlängert werden und das Fusionsfragment schließlich mit den Primern s4693 und s5835 hochamplifiziert werden. Das Fusion-PCR-Produkt (HP1) wurde dann in den positiven Selektionsvektor pJOE4786.1 inseriert (pSUN409.5). Aus dem Plasmid pSUN409.5 wurde diese Fusionsregion dann mit *KpnI* und *EcoRV* ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *KpnI* und *EcoRV* behandelten Vektor pSUN279.2 inseriert (pSUN411.1). Der Shuttlevektor pSUN411.1 enthielt somit den als *P<sub>HP1</sub>* bezeichneten Hybridpromotor vor *lacZ*. Die anderen Hybridpromotoren *P<sub>HP2</sub>* bis *P<sub>HP6</sub>*, die im *manP*-Promotor-Segment jeweils 1-2 bp kürzer als der jeweils vorherige waren (siehe unten), wurden über die gleiche Vorgehensweise konstruiert, die Endkonstruktionen wurden als pSUN412.1 (*P<sub>HP2</sub>*), pSUN416.2 (*P<sub>HP3</sub>*), pSUN417.1 (*P<sub>HP4</sub>*), pSUN422.1 (*P<sub>HP5</sub>*) und pSUN423.1 (*P<sub>HP6</sub>*) bezeichnet. Die sechs Expressionsvektoren wurden anschließend jeweils in den *B. subtilis*-Stamm 3NA eingebracht, und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten dieser Transformanten wurden jeweils mit und ohne Zugabe von Mannose oder Mannitol bestimmt.

GGCTCCTGAAACCAGGAGCCTTTTTATTTTTAAAAAATTGTCACAGTCATGTGCCAAAGT  
 .....  
 CCTCTTTACTTTCAAGCG**ATTTTA**ATGAGCTGATTT**CGGTATACAGTTGAGACAAGATCT**  
 .....*mtlA-Operator* | *manP-Promotor*.....  $P_{HP1}$

CCTCTTTACTTTCAAG**ATTTTA**ATGAGCTGATTT**CGGTATACAGTTGAGACAAGATCT**  
 .....  $P_{HP3}$

CCTCTTTACTTTCAA**ATTTTA**ATGAGCTGATTT**CGGTATACAGTTGAGACAAGATCT**  
 .....  $P_{HP2}$

CCTCTTTACTTTCAA**TTTTA**ATGAGCTGATTT**CGGTATACAGTTGAGACAAGATCT**  
 .....  $P_{HP4}$

CCTCTTTACTTTCAA**TTTA**ATGAGCTGATTT**CGGTATACAGTTGAGACAAGATCT**  
 .....  $P_{HP5}$

CCTCTTTACTTTCAA**TTA**ATGAGCTGATTT**CGGTATACAGTTGAGACAAGATCT**  
 .....  $P_{HP6}$

TA TTATTACACTTTTCTAGAAATAATTTTCTTAAGAAGGAGATATACATATGA  
 ..... | *lacZ*→

*Xba*I                      *Af*III                      *Nde*I

Abbildung 4-40. Sequenzvergleich der verschiedenen Hybridpromotoren ( $P_{HP}$ ). Rot dargestellt sind –35 und –10 Sequenzen des *manP*-Promotors, fett die Basensequenz aus dem *manP*-Promotor, mit grauer Schrift die Sequenzen aus dem *mtlA*-Promotor. Die gesamte Länge der *mtlA*-Sequenz ist nur im Hybridpromotor  $P_{HP1}$  dargestellt, die Region zwischen der *Bgl*II-Schnittstelle und dem *lacZ*-Startcodon nur für den Hybridpromotor  $P_{HP6}$ . Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und kursiv geschrieben.



In der Abbildung 4-41 sieht man, dass Expression von *lacZ* ohne Induktion in allen Stämmen mit Hybridpromotoren fast gegen Null geht, während der Basalspiegel der  $\beta$ -Galaktosidase bei dem WT *manP*-Promotor um 2000 M. U. und bei dem WT *mtlA*-Promotor um 600 M. U. liegt. Nach Zugabe von Mannose bleibt die Expression von *lacZ* in allen Stämmen mit Hybridpromotoren auf dem Niveau des Basalspiegels. D. h., diese Hybridpromotoren konnten wie erwartet nicht mehr durch Mannose induziert werden, da ja die *manP*-Operatorsequenz fehlt. Dagegen nahm die Expression von *lacZ* in den Stämmen mit  $P_{HP2}$  oder  $P_{HP4}$  nach Zugabe von Mannitol stark zu (32-35-fach). In den Stämmen mit  $P_{HP3}$  oder  $P_{HP5}$  gab es dagegen nur eine leichte Induktion (3-6 fach erhöht), während bei den anderen zwei Hybridpromotoren  $P_{HP1}$  und  $P_{HP6}$  keine signifikante Veränderung meßbar war. Aus den Ergebnissen ist offensichtlich, dass einmal der Abstand von Promotorsequenz und Operatorsequenz für das Funktionieren der Transkriptionsaktivierung eine entscheidende Rolle spielt. Zum anderen könnte auch die Verkürzung der  $-35$  Sequenz im Falle von  $P_{HP5}$  und  $P_{HP6}$  eine Rolle für die geringe Expression bei diesen Promotoren spielen. Im Vergleich zum *mtlA*-Promotor (ca. 14500 M. U. unter induzierten Bedingungen) und *manP*-Promotor (ca.16000 M. U. unter induzierten Bedingungen) sind die Hybridpromotoren (ca. 2500 M. U. bei  $P_{HP2}$  und  $P_{HP5}$  unter induzierten Bedingungen) viel schwächer, während die Induzierbarkeit der Hybridpromotors deutlich erhöht wurde (ca. 35 fach höher als der Basalspiegel). Bei den *mtlA*- und *manP*-Promotoren betrug die maximale Steigerung jeweils das 25-fache und 7-fache des Basalspiegels.

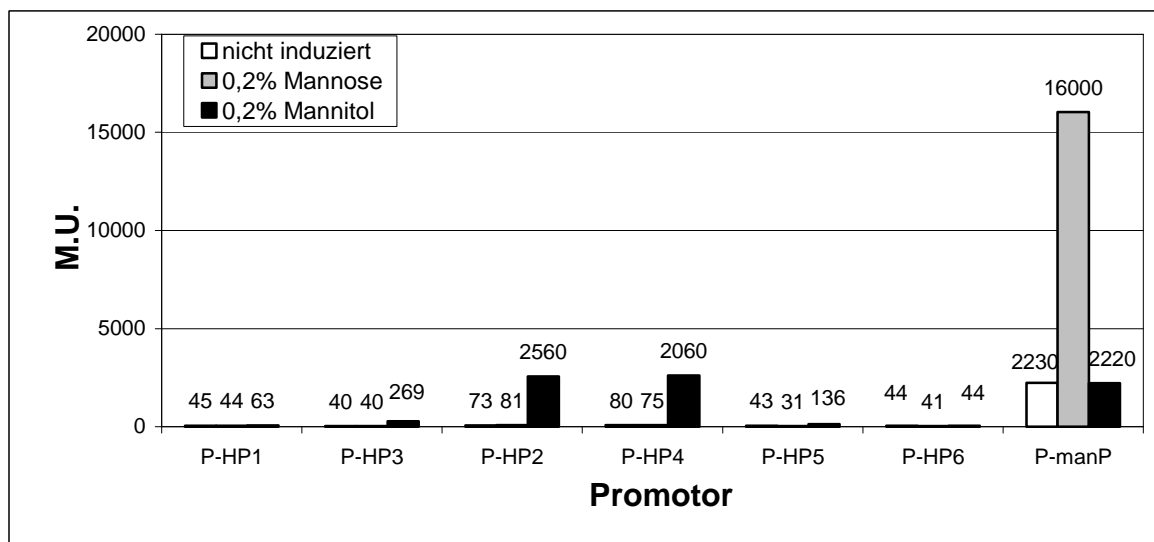


Abbildung 4-41.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unter Kontrolle von  $P_{mtlA}/P_{manP}$  Hybridpromotoren und  $P_{manP}$ -Promotor in *B. subtilis* 3NA. Alle Stämme wurden in LB-Medium mit Spektinomycin gezogen und in früher exponentieller Wachstumsphase jeweils mit 0,2% Mannose oder Mannitol induziert. Nach 1 h wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mittels Miller's Assay gemessen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Promotoren von *manPA-yjdF* und *manR*

Bislang waren den drei Genen *manPA-yjdF* des Mannose-Operons und dem stromaufwärts liegenden *manR* in *B. subtilis* nur aufgrund von Sequenzvergleichen jeweils die Funktionen eines Mannose-PTS-Transporters, einer Mannose-6-Phosphat-Isomerase und eines Transkriptionsaktivators zugeordnet worden. Für *yjdF* konnte bisher keine Funktion gefunden werden, die Zuordnung zum Mannose-Operons geschah lediglich aufgrund seiner Lage. Informationen bezüglich der Promotoren und Regulationsmechanismen waren nicht vorhanden. Daher wurde in dieser Arbeit zuerst der Zusammenhang zwischen den Promotoren dieser Gene und dem Wachstum auf Mannose und Glucose anhand eines Expressionsvektors mit *lacZ* als Reportergen in *B. subtilis* untersucht. In den konstruierten Expressionsvektoren wurden jeweils der vermutete Promotorbereich von *manP* mit bzw. ohne Regulatorgen ( $P_{manR-manR-P_{manP}}$  und  $P_{manP}$ ) und der vermutliche Promotor von *manR* ( $P_{manR}$ ) vor *lacZ* inseriert. Durch die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *B. subtilis*-Stämme mit diesen Expressionsvektoren mit oder ohne Zugabe von Mannose wurde festgestellt, dass sich die Promotoren  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  jeweils zwischen *manR* und *manP* und vor *manR* befinden und durch Mannose induziert werden können. ManR ist ein in *trans* wirkender Aktivator des Mannose-Operons und auch ein Autoregulator für sich selbst, da er auch seine eigene Synthese aktiviert. Dadurch können allein mit der chromosomalen Kopie von *manR* die  $P_{manP}$ - und  $P_{manR}$ -Kopien auf den „low copy“ Plasmiden genau so aktiviert werden, wie wenn *manR* sich zusätzlich auf den Plasmiden befindet. Lediglich der Basalspiegel der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität stieg mit den zusätzlichen Kopien von *manR* auf den Plasmiden an, sodass es bei  $P_{manP}$  bei der Zugabe von Mannose eine 7-fache und mit  $P_{manR-manR-P_{manP}}$  nur eine 4-fache Erhöhung der Aktivität gab. Im Vergleich dazu gab es mit dem deutlich schwächeren  $P_{manR}$  eine 3-fache Steigerung der Aktivität.

Als Transkriptionsstartpunkte der Promotoren von *manPA-yjdF* und *manR* wurden durch Primer-Extension-Experimente jeweils ein **A** und ein **G** identifiziert. Die nach diesem Transkriptionsstart abgeleiteten –35- und –10-Regionen von  $P_{manP}$  haben eine relativ niedrige Identität mit der Konsensussequenz von vegetativen  $\sigma^A$  abhängigen Promotoren von *B. subtilis*, während die –35- und –10-Regionen vom  $P_{manR}$  dem *B. subtilis* vegetativen  $\sigma^A$

abhängigen Promotor eher gleichen (Tabelle 5-1). Jedoch zeigte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest, dass die Expression von  $P_{manP}$  im uninduzierten Zustand bereits doppelt so hoch ist und bei voller Induktion mit Mannose 3- bis 4-fach höher liegt als bei  $P_{manR}$ . Dies stimmt sicherlich mit dem Bedarf der Zelle an diesen Proteinen überein, da die Zelle ja für die Induktion nur eine kleine Menge Regulator benötigen sollte, dagegen aber eine große Menge an Transportproteinen und Mannose-6-Phosphatase, um genügend Mannose aufzunehmen und abzubauen. Die Übereinstimmung der -35 und -10-Regionen mit der jeweiligen Konsensussequenz ist also offensichtlich kein ausreichendes Kriterium, um die Promotorstärke und Menge an mRNA und Protein vorauszusagen. Der Abstand von -35 und -10 Sequenz spielten sicher auch eine große Rolle, und der ist bei  $P_{manP}$  mit 17 Basen optimal, bei  $P_{manR}$  dagegen mit 16 Basen suboptimal. Die Wechselwirkung des Transkriptionsregulators mit dem Operator, die hier nicht detailliert untersucht werden konnte, könnte ebenfalls die Promotorstärke beeinflussen. Dagegen sollten mRNA-Stabilität, Translationsinitiation und Proteinstabilität hier keine Rolle spielen, da diese Parameter für die Untersuchung der beiden Promotoren mit *lacZ* als Reporter identisch waren.

Tabelle 5-1. Vergleich der -10 und -35 Sequenzen von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  mit der Konsensussequenz der  $\sigma^A$  abhängigen Promotoren

	-35-Region	Abstand	-10-Region
Konsensussequenz	<b>TTGACA</b>	<b>17 bp</b>	<b>TATAAT</b>
$P_{manP}$	ATTTTA	17 bp	TACAGT
$P_{manR}$	TTGTCT	16 bp	TAATGT

Neben der -10 und -35 Sequenz wurde eine weitere für die Transkription notwendige Sequenz zwischen -79 und -35 bp bezüglich des Transkriptionsstarts von *manPA-yjdF* und zwischen -81 und -35 bezüglich des Transkriptionsstarts von *manR* festgestellt. In dem intergenischen Bereich zwischen *manR* und *manP* wurden drei unvollständige invers wiederholte Sequenzen gefunden, die jeweils in Abbildung 4-3 IRI, IRII und IRIII bezeichnet wurden. Eine zu IRIII nahezu identische Sequenz wurde auch am 5'-Ende des *manR* Promotors gefunden (Abbildung 5-1), so dass man hier vermuten konnte, dass IRIII die Operatorsequenz für beide Promotoren ist, an die ManR bindet. Durch die 5'-Verkürzung der *manP*-Promotorsequenz wurden IRI und ein Teil von IRII nacheinander entfernt, ohne die Expression zu beeinträchtigen. Dagegen führte eine Beschädigung von IRIII in beiden Fällen

zum vollständigen Verlust der Induktion und auch die Basalexpression war kaum mehr messbar. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei IRIII tatsächlich um die Operatorsequenz handelt. Die genaue Begrenzung der Operatorsequenzen ist noch unklar, zumal der Abstand der beiden vermuteten Operatorsequenzen zu den  $-35$  Sequenzen bei beiden Promotoren differiert. Dies durch DNA-Footprints herauszufinden, scheint angesichts der bisher *in vitro* beobachteten schwachen Bindung von ManR an DNA nicht möglich. Daher müssen entweder die Basen in dem Bereich systematisch ausgetauscht werden oder wie für die Hybridpromotoren von  $P_{manP}$  und  $P_{mtlP}$  beschrieben, die vermutete Operatorregion mit einer  $-10$  und  $-35$  Region eines Promotors wie *mtlA* fusioniert werden und der in Frage kommende Bereich systematisch und unter Berücksichtigung der Abstände verkleinert werden.

A.

```

manP  (-69 → -30)  GCCTTTATTACCGGAACCTATGGTAAAAAAAGCGATTTTA
                   |  ||  ||  |||  |||  ||  |||  |||  |||  ||  |  |||
manR  (-71 → -32)  TCGCTTTTTTCCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTT

```

B.

```

manP  (-69 → -30)  GCCTTTATTACCGGAACCTATGGTAAAAAAAGCGATTTTA
                   |||  ||  |||  |||  ||  |||  |||  |||  |  |  |||
manR  (-70 → -32)  CGCTTTTTT-CCGGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTT

```

Abbildung 5-1. Abgleich der ähnlichen Stamm-Schleife-Strukturen in  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  als Operatorsequenz von ManR in zwei verschiedenen Anordnungen (A und B).

## 5.2 Die Rolle der *manR*, *manP* und *manA*-Gene bei der Regulation des Mannose-Operons

Das Mannose-Operon besteht aus drei Genen, *manPA-yjdB* sowie einem separaten Aktivatorgen *manR*. Das dritte Gen des Operons *yjdB* kann inaktiviert werden, ohne das Wachstum der Zellen auf Mannose zu beeinträchtigen. Eine Suche in der GenBank führt zu keinem brauchbaren Ergebnis, da das Protein keine Homologie zu Proteinen zeigt, deren Funktion bekannt ist. Daher wurde *yjdB* in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Für die Untersuchung der verbleibenden drei Gene wurden zuerst Mutanten mit jeweils einer Deletion im *manR*-, *manP*- und *manA*-Gen isoliert, um die Auswirkung dieser Deletionen auf die einzelnen Gene zu untersuchen. Alle drei Mutanten verloren die Fähigkeit auf Mannose als

einzigster C-Quelle zu wachsen, was die Bedeutung der Gene im Mannosestoffwechsel unterstreicht. Außerdem verursachte die Deletion von *manR* einen Verlust der Induzierbarkeit von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$ . Befand sich zusätzlich *manR* auf dem Plasmid, so wurden sowohl die Regulation des Mannose-Operons als auch das Wachstum der Mutante auf Mannose durch das episomal exprimierte *manR* wiederhergestellt. Dies zeigt, dass ManR ein in *trans* wirkender Transkriptionsaktivator ist. ManR ist gleichzeitig ein Autoregulator, wie die Untersuchungen mit  $P_{manR}$  zeigten. Diese positive Autoregulation kann den Unterschied der Transkriptionsniveaus zwischen stillgelegtem und aktiviertem Zustand verstärken. Wie weit dies hier von Bedeutung ist, wurde nicht untersucht.

Die Deletion von *manP* (Mannose-Transporter) hatte eine konstitutive Expression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  zur Folge. Dies deutet darauf hin, dass ManP neben seiner vermuteten Transporter-Funktion auch noch eine regulatorische Funktion als negativ wirkender Regulator des Mannose-Operons ausübt. Nach bisherigen Studien hat eine der beiden PRDs eines PRD-Regulators nach der Phosphorylierung eine stimulierende (PRDII) und die zweite Domäne eine hemmende Wirkung (PRDI) auf die Funktion des Transkriptionsregulators. Die PRDI vom *B. stearothermophilus*-MtlR, einem zu *B. subtilis*-ManR homologen PRD-Regulator, wird in Anwesenheit von Mannitol vom EIICB dephosphoryliert, und damit MtlR aktiviert (Henstra, Duurkens & Robillard 2000). Ein ähnliches Phosphorylierungsereignis könnte auch bei ManR stattfinden. Voraussichtlich wird die ManR-PRDI von ManP je nach Verfügbarkeit von Mannose phosphoryliert oder dephosphoryliert, wodurch ManR bei einer Deletion von *manP* konstitutiv aktiv wird. Für die volle Aktivierung von ManR wird außerdem noch die Phosphorylierung an PRDII benötigt, die nach bisherigen Studien durch P-His15-HPr geschieht. Dies setzt voraus, dass keine Glucose oder andere schnell verwertbare PTS-Zucker vorhanden sind, da ansonsten die Menge an verfügbarem P-His15-HPr sinkt und die Phosphate bevorzugt an die Zucker übertragen werden.

Durch die chromosomale Deletion von *manA* (Mannose-6-Phosphat-Isomerase) wurden die Mutanten sensitiv gegen Mannose. Diese Mannose-Sensitivität führt zu einem gehemmten Wachstum und einer reduzierten Induktion von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  bei Zugabe von Mannose im Vollmedium. Diese Unterdrückung des Wachstums und der Induktion kann damit erklärt werden, dass Mannose weiterhin durch den PTS-Transporter als Mannose-6-Phosphat in die Zelle aufgenommen wird, aber durch die defekte Mannose-6-Phosphat-Isomerase nicht mehr weiter abgebaut oder ausgeschieden werden kann, und sich damit Mannose-6-Phosphat in der Zelle anhäuft. Das angehäuften Mannose-6-Phosphat könnte entweder zelluläre Prozesse stören oder auch zu einer Phosphatlimitierung in der Zelle führen, was zu der beobachteten

Hemmung des Wachstums führt. Ähnliche Phänomene kennt man von *E. coli*. So werden *galT* und *galE* Mutanten von *E. coli* in Vollmedium durch die Zugabe von Galaktose ebenfalls im Wachstum gehemmt, da sie phosphorylierte Zwischenprodukte (Galaktose-1-Phosphat oder UDP-Galaktose) anhäufen. Erst eine Mutation in *galK*, wodurch eine Phosphorylierung von Galaktose unterbleibt, kann diese Sensitivität aufheben.

Im Falle der *manA*-Deletion von *B. subtilis* kam es auch zu einer Erniedrigung der Induktion von *lacZ* durch Mannose, wenn diese Versuche in Hefeextrakt-freiem Vollmedium durchgeführt wurden. Insbesondere war hiervon  $P_{manP}$  betroffen. Hier war die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität um ein Drittel niedriger. Dies könnte zunächst einfach an dem reduzierten Wachstum liegen. Es könnte aber auch durch eine Hemmung des Mannosetransports erklärt werden, nachdem sich Mannose-6-Phosphat in der Zelle angehäuft hat. Wenn keine Mannose mehr transportiert wird, bleibt der Mannose-Transporter im phosphorylierten Zustand und phosphoryliert daher die PRDI von ManR. Dadurch wird ManR in einen inaktiven Zustand überführt.

Wenn die Versuche in LB-Medium durchgeführt wurden, war zunächst ein sehr hoher Basalspiegel der Expression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  zu beobachten. Da im Hefeextrakt mannosylierte Proteine vorhanden sind, könnte es sein, dass *B. subtilis* einen Teil der Mannose freisetzt und sich damit induziert. Dies könnte auch im Wildtyp auftreten, aber dort nicht auffallen, da der geringe Anteil an freigesetztem Induktor sofort abgebaut wird, während dies in der *manA*-Mutante nicht der Fall ist. Warum aber in Hefeextrakt nun die Induktion mit Mannose so viel höher war als im Wildtyp, kann mit diesen Vermutungen nicht erklärt werden.

Anhand von Alignments der Aminosäuresequenzen wurden fünf Domänen in ManR postuliert, nämlich eine N-terminale DNA-Bindedomäne, zwei PRDs und eine PTS-EIIA- und eine PTS-EIIB-ähnliche Domäne am C-Terminus. Die Bindung der DNA-Bindedomäne von ManR an die Operatorsequenz wurde mit zwei komplementären Oligonukleotiden untersucht, deren Sequenz dem durch Deletionsanalyse abgeleiteten Operator von ManR in  $P_{manP}$  entspricht. Unter den experimentellen Bedingungen band das Protein mit nur der DNA-Bindedomäne etwas stärker an den Operator als die anderen zwei ManR-Varianten, die länger waren. Die erste schwache Bindung erfolgte im Verhältnis 30 zu 1 zwischen Proteinmenge und DNA-Menge. Wenn die Proteinkonzentration 10-fach erhöht wurde, war immer noch ein beträchtlicher Teil der DNA ungebunden. Außerdem trat ein starker Schmier in den Spuren des Trenngels auf und ein Teil der DNA blieb dann auch in den Taschen liegen. Dies weist entweder auf eine Protein-DNA-Bindung mit sehr hoher Dissoziationskonstante oder auf eine

niedrige spezifische Aktivität des eingesetzten Proteins hin. Ersteres könnte damit erklärt werden, dass neben ManR noch ein weiteres Protein oder auch die RNA-Polymerase selbst notwendig sind, die Bindung an die DNA zu stabilisieren. Eine weitere Erklärung wäre, dass die verkürzten Aktivatoren nicht die notwendige Konformation für eine feste Bindung hatten. Im Fall von dem verwandten LicT in *B. subtilis* bildet LicT *in vitro* und in hoher Konzentration ein für die Bindung an DNA notwendiges Dimer aus, das aber relativ instabil ist und von der Phosphorylierung der PRDs abhängig ist (van Tilbeurgh, Le & Declerck 2001). Auch die DNA-Bindedomäne von ManR, als ManR-Variante ManR427 getestet, bildet ein Dimer aus, wie durch die Gelfiltration gezeigt wurde. Dieses kann aber nicht durch Phosphorylierung verändert werden und erklärt vielleicht, warum die Bindung an die Operatorsequenz sehr schwach ist. Andererseits zeigte die ManR-Variante mit DNA-Bindedomäne und zwei PRD (ManR419) eine noch schwächere Bindung *in vitro*, obwohl eine Deletion der EIIBA-Domäne zu einer konstitutiven Expression von *manR in vivo* in *B. subtilis* führte. Die ManR419-Variante war allerdings auch in *E. coli* exprimiert worden und weist vermutlich keinerlei Phosphorylierung auf, und ohne Phosphorylierung der PRDII sollte der Transkriptionsaktivator inaktiv sein.

Wie schon erwähnt, sollte für einen aktiven Transkriptionsfaktor PRDI nicht phosphoryliert und PRDII phosphoryliert sein. Eine *manP*-Mutante ist konstitutiv, ebenso eine *manR*-Mutante, bei der EIIBAB deletiert ist. Es ist daher davon auszugehen, dass die Phosphorylierung der PRDI von ManP ausgeht und die Phosphate über EIIBAB von ManP auf EIIBAB von ManR übertragen werden, und von dort auf PRDI von ManR.  $EII^{Man}$  von *B. subtilis* gehört zu der Mannitol-Fructose-EII-Familie (Greenberg, Stülke & Saier, Jr. 2002), die wiederum zu Glucose-Fructose-Laktose-Superfamilie gehört, während der *E. coli*- $EII^{Man}$  zu der Mannose-EII-Familie gehört. Es ist also völlig unwahrscheinlich, dass die PRDI von ManR in *E. coli* von dem *E. coli* ManP phosphoryliert wird. Da PRDI für einen aktiven Transkriptionsaktivator ohnehin nicht phosphoryliert sein sollte, wäre dies auch kein Problem. Das Problem stellt die Phosphorylierung der PRDII dar. PRDII sollte durch HPr phosphoryliert werden. *E. coli* besitzt zwar ein ähnliches PTS System wie *B. subtilis* und das zentrale Protein HPr im PTS-System von *B. subtilis* weist eine fast identische Struktur zu der von *E. coli* und anderen Bakterien auf. Dennoch ist das HPr von *B. subtilis* sowie auch das EI nicht in der Lage, die entsprechenden Proteine von *E. coli* zu ersetzen und z.B. die *E. coli* EIIBAB-Domänen der PTS-Transporter zu phosphorylieren. Da vermutlich die Phosphorylierung von ManR PRDII in *E. coli* unterbleibt, ist ManR auch nicht genügend aktiv in einem DNA-Mobility-Shift-Assay. Der geringe Anteil der in dieser Arbeit

detektierten Protein-DNA-Bindung entspricht vermutlich dem Bindungszustand einer nicht-induzierten *B. subtilis* Zelle.

Um die *in vitro* Bindung zwischen ManR und seinem Operator zu ermitteln, müsste vor allem die Expression und Reinigung von ManR aus *B. subtilis* optimiert werden oder andere Methoden wie DNA-Footprint eingesetzt werden. Vor allem aber wäre es notwendig, eine Methode zu entwickeln, um den Phosphorylierungszustand der einzelnen Histidinreste der PRDs analysieren zu können, um einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung, DNA-Bindung, Dimerbildung und Transkriptionsaktivierung herstellen zu können.

Die Deletion der EIIA- und EIIB-ähnlichen Domänen von ManR führten aus obigen Gründen zu einer konstitutiven Expression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$ . In dieser  $\Delta$ EIIA-ManR Mutante führte die Zugabe von Mannose erstaunlicherweise zu einer Verringerung der Expression. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von Tobisch *et al.*'s in der Studie über LicR (Tobisch, Stülke & Hecker 1999) erhalten. Eine Erklärung wäre, dass durch die Aufnahme und Phosphorylierung der Mannose die Menge an P-His15-HPr abnimmt und damit weniger Moleküle für die Aufrechterhaltung der Phosphorylierung von PRDII zur Verfügung stehen, damit also auch ein weniger aktiver Transkriptionsaktivator vorhanden ist. Zusätzlich werden mehr Fructose-1,6-Bisphosphat und Glucose-6-Phosphat gebildet, die über CcpA im Komplex mit P-Ser46-HPr die Synthese von ManR reprimieren.

Zusammengefasst wird die Induktion von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  durch Mannose durch den Transkriptionsaktivator ManR reguliert, dessen Aktivität wieder von  $EII^{Man}$ , HPr und den PRDs in ManR reguliert wird. Die Aktivierung von ManR hängt von den Phosphorylierungszuständen der zwei PRDs ab, die von der Verfügbarkeit des Substrats abhängig sind. Mit der Veränderung der Phosphorylierungszustände der PRDs ändert sich die Konformation der DNA-Bindedomäne, wodurch sie effektiver an den Operator in  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  bindet und die Transkription anschaltet. Die Aufklärung der 3D-Struktur von LicT, einem *B. subtilis*-PRD-Antiterminator, bestätigte die Konformationsänderung und den Regulationsmechanismus. Für die Transkriptionsaktivatoren sind nur einzelne Domänen in ihrer 3D-Struktur bekannt, es bedarf daher noch großer Anstrengungen, um auch hier den Regulationsmechanismus in allen Details aufzuklären.



### 5.3 Die Katabolitrepression ist ein weiterer wichtiger Regulator des Mannose-Operons

Während Mannose zur Induktion des Mannose-Operons und des *manR*-Gens führt, verhindert die gleichzeitige Zugabe von Glucose dies weitgehend. Es wurde festgestellt, dass sowohl  $P_{manP}$  als auch  $P_{manR}$  von der Katabolitrepression betroffen sind. Die Zugabe von gleichen Mengen Glucose und Mannose unterdrückte die Induktion durch Mannose von  $P_{manP}$  um das 3,4-fache und die von  $P_{manR}$  um das 2,4-fache. Nur wenn das Regulatorgen *manR* sich auch auf dem Plasmid befand ( $P_{manR}$ -*manR*- $P_{manP}$ ), war die Katabolitrepression auf  $P_{manP}$  etwas weniger ausgeprägt (Repressionsrate 1,6), vermutlich durch die höhere Menge an ManR in der Zelle.

Um die Mechanismen der auf die Mannose-Promotoren wirkenden Katabolitrepression aufzuklären, wurden die für ihre Beteiligung an der Katabolitrepression bekannten Faktoren wie HPr, Crh, HprK und CcpA durch Mutationsanalyse untersucht.

Die Katabolitrepression auf  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  war in der *ptsH-S46A*-Mutante im Vergleich zum WT etwas verringert. Durch die Deletion von *crh*, das ein HPr-homologes Protein Crh codiert, wurde die Katabolitrepression auf  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  nicht messbar beeinflusst. Nur in der *ptsH-S46A Δcrh* Doppelmutante war die Katabolitrepression auf  $P_{manP}$  and  $P_{manR}$  deutlich weniger ausgeprägt. Dies impliziert, dass P-Ser-HPr die Hauptrolle in dieser CcpA-abhängigen Katabolitrepression spielt, und dass Crh nur als ein Ersatzkandidat zur Verfügung steht. Beim Fehlen von Crh kann HPr die Aufgabe in der Katabolitrepression voll übernehmen. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für das *xynB*-Gen erhalten, das eine  $\beta$ -Xylosidase in *B. subtilis* codiert (Galini r, Deutscher & Martin-Verstraete 1999). Neben der verringerten Katabolitrepression war auch die maximale Induktion der beiden Mannose-Promotoren in der *ptsH-S46A*-Mutante geringer als die beim WT, während die  $\Delta crh$ -Mutante davon nicht betroffen war. Die reduzierte maximale Expression des Mannose-Operons durch die HPr-Ser46Ala-Mutation könnte dadurch verursacht werden, dass die Mutation auch die PEP-abhängige Phosphorylierung von HPr-His15 beeinflusst. Das Crh hat ein Glutamin statt Histidin im aktiven Zentrum und ist daher auch nicht an der Phosphatübertragung von EI auf PTS-Zucker beteiligt, folglich sollte auch die Expression von  $P_{manP}$  durch eine Deletion von *crh* nicht beeinflusst werden.

Wie schon in der Einleitung aufgezeigt, ist HPr in *B. subtilis* über zwei Wege an der Katabolitrepression beteiligt. Bei dem CcpA-unabhängigen Weg geht es um die Konkurrenz um HPr, da die PEP-abhängige Phosphorylierung an HPr-His15 eine essentielle Rolle im

Transport von PTS-Zuckern spielt. Diese Unentbehrlichkeit von P-His-HPr bei der Aktivierung von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  wurde bereits durch die Mutation an His15-HPr bestätigt. Der andere Weg bezieht sich auf die Phosphorylierung an Ser46 von HPr. Das P-Ser-HPr bildet einen Komplex mit CcpA und bindet an die *cre*-Sequenz vieler Gene des Kohlenhydratstoffwechsels und reprimiert sie. In den hier vorgestellten Experimenten wurde die Beteiligung von P-Ser-HPr an der Katabolitrepression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  bestätigt. Dies wurde mit einer  $\Delta ccpA$ -Mutante und einer Mutante mit einer mutierten *cre*-Sequenz im  $P_{manR}$  untersucht. Durch die Mutation der *cre*-Sequenz vor *manR* wurde die Katabolitrepression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  stark reduziert. Gleichzeitig führte diese *cre*-Mutation auch zu einer Erhöhung sowohl der Induktion als auch des Basalspiegels von  $P_{manR}$ . Diese erhöhte Expression könnte einmal an der veränderten Promotorsequenz liegen. Die -10 und -35 Sequenzen wurden zwar nicht verändert, es ist aber bekannt, dass auch die Umgebung dieser Sequenzen eine Rolle für die Promotorstärke spielt. Naheliegender ist allerdings die Annahme, dass der CcpA/P-Ser46-HPr-Komplex unter den verwendeten experimentellen Bedingungen wie Vollmedium und hohe Mengen Zucker ständig in geringem Maße wirksam ist, und daher permanent die Expression der Mannose-Promotoren verringert.

Die durch die Mutation der *cre*-Sequenz veränderte Katabolitrepression beweist, dass CcpA und die postulierte *cre*-Sequenz tatsächlich an der Katabolitrepression von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  beteiligt sind. Dies konnte allerdings nicht durch die Deletion von *ccpA* abgesichert werden, da eine Induktion von  $P_{manP}$  und  $P_{manR}$  durch Mannose in der hier konstruierten  $\Delta ccpA$ -Mutante nicht möglich war. CcpA reguliert bis zu 300 Gene in *B. subtilis* und kann sowohl als Repressor als auch als Aktivator wirken, je nach Lage der *cre*-Sequenz in den Promotoren. Nach den Ergebnissen der Mutationen in *ptsH*, *crh* und *cre* sowie auch der Lage der *cre*-Sequenz im *manR*-Promotor sollte CcpA auf keinen Fall ein Aktivator für die Mannose-Promotoren sein. Wahrscheinlicher ist, dass die Inaktivierung von *ccpA* die Funktionen einiger Gene wie *gltAB* (für Glutamatsynthase) (Faires et al. 1999) und das *gap*-Operon (für die Gene in Glykolyse) (Ludwig et al. 2001) beeinflusst, die eigentlich von CcpA aktiviert werden sollten. Das schwache Wachstum der *ccpA*-Mutanten auf Glucose ist bekannt und wurde auf das Fehlen der Aktivierung von *gltAB* und dem *gap*-Operon zurückgeführt (Faires et al. 1999; Ludwig et al. 2002). Auch die in dieser Arbeit isolierte  $\Delta ccpA$ -Mutante TQ303 wuchs auf Minimalmedium mit Glucose wesentlich schlechter als der WT-Stamm 3NA. Mannose ist ein Epimer von Glucose und wird nach Aufnahme und Phosphorylierung anschließend zu dem gemeinsamen Zwischenprodukt FBP umgewandelt. Wenn dieses aufgrund zu weniger Glycolyse-Enzyme nur noch langsam abgebaut wird, und sich

zusammen mit Mannose-6-Phosphat in der Zelle anhäuft, könnte dies wiederum Auswirkungen auf den Transport von Mannose haben, der sich ebenfalls verlangsamt. Daher könnten die Phosphatgruppen aus dem Transporter wieder auf die PRDI von ManR übertragen werden, der Regulator würde inaktiv und es fände keine Induktion mehr statt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass durch die Deletion von *ccpA* vielleicht die stromabwärts liegenden Gene, *ytxD* und *ytxE* (ähnlich wie *motA* und *motB* in *E. coli*) in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden, da die  $\Delta$ *ccpA*-Mutante in dieser Arbeit durch Austausch mit einem Erythromycin-Resistenzgen zustande gekommen war. Andererseits wurde berichtet, dass die Inaktivierung der zwei Gene keinen Effekt auf die Mobilität und Katabolitrepression von *B. subtilis* hat (Grundy et al. 1993). Trotzdem kann dieser eventuell polare Effekt und eine Auswirkung auf die Induktion des Mannose-Operons nicht ausgeschlossen werden. In einigen Publikationen über Katabolitrepression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsel wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von *ccpA* zur Aufhebung der Katabolitrepression auf solche Gene und Operons führte (Lorca et al. 2005; Martin-Verstraete et al. 1995). Deswegen wäre es sinnvoll, in weiteren Experimenten andere, bereits charakterisierte *ccpA*-Mutanten in die Untersuchungen der Auswirkung einer *ccpA*-Mutation auf die Regulation des Mannose-Operons mit einzubeziehen.

Die HPr-Kinase ist ein weiteres wichtiges Protein für die Katabolitrepression in *B. subtilis*. Daher wurde auch die Auswirkung einer  $\Delta$ *hprK*-Mutante auf die Katabolitrepression von *P<sub>manP</sub>* und *P<sub>manR</sub>* untersucht. Aber erstaunlicherweise wurden sowohl der Basalspiegel als auch die Induktion so gravierend erniedrigt, dass eine Beurteilung der Katabolitrepression der beiden Promotoren in dieser Mutante nicht mehr sinnvoll war. Nach Literaturdaten ist das Gravierende an einer *hprK*-Mutation vor allem der Verlust der HPr-Phosphatase-Aktivität, die die Expression von der Katabolitrepression unterliegenden Gene unterdrückt (Hanson et al. 2002; Monedero et al. 2001). Die Mutante TQ308 enthält eine *hprK*-Knockout-Mutation, die sowohl die Kinase- als auch die Phosphatase-Aktivität von HprK unterbinden sollte. In so einer Mutante sollte nach der gängigen Theorie weder das Wachstum auf PTS-Zucker noch die Expression der CR unterliegenden Gene beeinträchtigt sein (Hanson et al. 2002). In *B. subtilis* besteht das *hprK*-Operon aus fünf Genen, nämlich *hprK*, *lgt* und *yvoDEF* (Abbildung 4-25). Das *lgt*-Gen liegt direkt stromabwärts von *hprK* und codiert eine Prolipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase. Bei den Enterobacteriaceae befindet sich das *lgt*-Gen direkt hinter *ptsP*, das ein aus einer EI-Domäne und einer GAF-Domäne fusioniertes Protein codiert. Die *yvoDEF*-Gene codieren jeweils ein potenzielles integrales Membranprotein, eine

potenzielle Phosphatase und eine *o*-Acetyltransferase. Dieser enge räumliche Zusammenhang zwischen dem *lgt*-Gen und den Genen für das PTS-System weist auf eine funktionelle Verknüpfung hin, jedoch ist es bis jetzt noch unklar, ob dieser Zusammenhang auch in *B. subtilis* vorhanden ist. In TQ308 wurde der *hprK*-Promotor durch die Deletion von *hprK* nicht betroffen. Ob jedoch die Transkription der anderen Gene im *hprK*-Operon durch die Integration des *erm*-Gens intakt blieb, wurde noch nicht experimentell bestätigt. Eine Transkriptionsveränderung der stromabwärts liegenden Gene könnte vielleicht ein Grund für die starke Beeinträchtigung des Wachstums dieser Mutante sein.

Weder in einer *cre*\*-*manR*-Mutante noch in einer *ptsH-S46A Δcrh*-Doppelmutante wurde die Katabolitrepression komplett aufgehoben. Dies ist auch nicht verwunderlich, da durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der PRDII von ManR ein zweiter Mechanismus der Katabolitrepression greift und vermutlich auch die Konkurrenz um HPr zwischen Glucose- und Mannose-Transporter noch eine Rolle spielt. Außerdem könnten noch weitere Regulatoren wie CcpB (Chauvaux, Paulsen & Saier, Jr. 1998), CcpC (Jourlin-Castelli et al. 2000), CcpN (Servant, Le & Aymerich 2005) und CggR (Doan & Aymerich 2003) involviert sein und auch noch die Katabolitrepression des Mannose-Operon direkt oder indirekt beeinflussen.

## **5.4 Hybride aus Mannose- und Mannitol-Promotoren und Regulatoren**

In Hinblick auf die Homologie in den Aminosäuresequenzen, die ähnlichen Funktionen von Regulator und Transporter sowie dem Metabolismus und der Gen-Anordnung in Mannose- und Mannitol-Operon wurde versucht, ein Hybridsystem aus den zwei Regulationssystemen zu entwickeln. Dies wäre für biotechnologische Anwendungen des Induktionssystems von Bedeutung, da Mannitol wesentlich billiger ist als Mannose. Zum anderen sollten funktionierende Hybride auch weitere Anhaltspunkte zum Verständnis der Regulation und ihrer notwendigen Komponenten liefern. Zuerst wurden vier Hybridregulatoren aus ManR- und MtlR-Domänen konstruiert, mit denen versucht wurde, den *manP*-Promotor durch Mannitol zu aktivieren. Aber weder durch Mannose noch durch Mannitol konnte der *manP*-Promotor mit den vier Hybridregulatoren induziert werden. Da die 3D-Struktur der beiden Regulatoren nicht bekannt ist, konnten die Fusionsstellen zwischen den identifizierten

Domänen nicht extrakt ausgewählt werden. Möglicherweise waren alle Fusionsstellen so unglücklich gewählt, dass es zur Fehlfaltung der Proteine geführt hat. Andererseits entsprach die Expression der Mannosepromotoren etwa der Basalexpression im Wildtyp und nicht einer *manR*-Deletionsmutante. Daher ist es wahrscheinlicher, dass eine Induktion aufgrund des Fehlens einer Wechselwirkung zwischen den PRD- bzw. EIIA/EIIB Domänen und der DNA-Bindedomäne ausblieb. Ebenso könnte die Wechselwirkung mit dem PTS-Transporter gestört sein. Um den tatsächlichen Grund für diesen Misserfolg zu finden, müssten die Regulatoren gereinigt und *in vitro* auf ihr Phosphorylierungsverhalten untersucht werden.

Da diese Versuche aufgrund der fehlenden strukturellen Daten nicht weiterführten, wurde stattdessen eine Serie von Hybridpromotoren konstruiert, die sich jeweils aus der Operatorsequenz von *mtlA* und einer in der Länge variablen *manP*-Promotorsequenz zusammensetzen. Alle Promotoren zeigten eine sehr geringe bis fehlende Basalexpression, doch zwei dieser Hybridpromotoren ließen sich wie erwartet auch durch Mannitol induzieren, nicht jedoch durch Mannose. Die verschiedenen Hybridpromotoren unterschieden sich vor allem durch den Abstand der Operatorsequenz zur  $-35$  Sequenz. Die Experimente zeigten daher, dass der Abstand zwischen Promotorsequenz und Operatorsequenz für die Transkriptionsaktivierung eine entscheidende Rolle spielt. Da die zwei Hybridpromotoren, die sich durch Mannitol induzieren ließen, etwa gleich aktiv waren, sich aber in einer Base im Abstand von  $-35$  Sequenz und vermuteten Operator unterschieden, zeigte das Experiment weiterhin, dass es eine gewisse Flexibilität im Kontakt von Regulator und RNA Polymerase geben muss. Im Vergleich zum *mtlA*-Promotor und *manP*-Promotor waren die beiden funktionellen Hybridpromotoren deutlich schwächer. Ein Grund könnte sein, dass der Mannitolpromotor stärker ist als der Mannosepromotor, aber dies durch eine schwächere Wechselwirkung von MtlR mit der RNA-Polymerase wieder ausgeglichen wird, sodass letztlich beide Promotoren wieder etwa gleich stark sind. In den Hybridpromotoren sind nun der schwächere Promotor mit dem schwächeren Aktivator kombiniert worden. Wenn dies richtig ist, sollte bei der reziproken Kombination von Mannose-Operator und Mannitol-Promotor ein wesentlich stärkerer Promotor entstehen, eine Voraussage, die sich leicht überprüfen lässt. Eine andere Erklärung wäre, dass bei der Kombination der Operator bzw. die  $-35$  Sequenz beschädigt wurde. Der Operator von MtlR liegt zwischen bp  $-85$  und  $-49$  bezüglich des Transkriptionsstarts von *mtlA*. Dies wurde aber nie experimentell bestätigt, sondern nur vermutet. Wenn der Mannitol-Operator tatsächlich mit der  $-35$  Sequenz überlappen sollte, so würden in allen Hybridpromotoren ein kleiner Teil des Operators fehlen und somit aufgrund der schwächeren DNA-Bindung auch nur eine geringere Aktivierung

möglich sein. Bei der weiteren Verkürzung der Fusionsstelle in den Hybridpromotoren über  $P_{HP4}$  hinaus, wurde schließlich auch die  $-35$  Sequenz des Mannose-Promotors beschädigt, sodass die nachfolgenden Promotoren vermutlich deshalb ihre Aktivität verloren. Insgesamt müssten hier die Wildtyp-Promotoren noch weiter analysiert werden, indem systematisch jeweils mehrere Basen in den vermuteten Operatorsequenzen mutiert werden, insbesondere unmittelbar vor der  $-35$  Sequenz, um die genauen Grenzen der Operatoren festzustellen. Erst mit diesem Wissen kann versucht werden, noch stärkere und eventuell besser regulierte Promotoren zu synthetisieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- Altenbuchner, J., Viell, P. & Pelletier, I. (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol.* **216**, 457-466.
- Amster-Choder, O., Houman, F. & Wright, A. (1989) Protein phosphorylation regulates transcription of the beta-glucoside utilization operon in *E. coli*. *Cell* **58**, 847-855.
- Amster-Choder, O. & Wright, A. (1992) Modulation of the dimerization of a transcriptional antiterminator protein by phosphorylation. *Science* **257**, 1395-1398.
- Aymerich, S. & Steinmetz, M. (1992) Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 10410-10414.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Medigue, C. & Danchin, A. (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**, 1758-1775.
- Becker, A.K., Zeppenfeld, T., Staab, A., Seitz, S., Boos, W., Morita, T., Aiba, H., Mahr, K., Titgemeyer, F. & Jahreis, K. (2006) YeeI, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **188**, 5439-5449.
- Blencke, H.M., Homuth, G., Ludwig, H., Mader, U., Hecker, M. & Stülke, J. (2003) Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* **5**, 133-149.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brantl, S. (2004) Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol.* **12**, 473-475.
- Bron, S. (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus* (eds C.R. Harwood & S.M. Cutting), pp. 75-174. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Chauvaux, S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1998) CcpB, a novel transcription factor implicated in catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**, 491-497.
- Chen, Y., Fairbrother, W. J. & Wright, P. E. (1993) Three-dimensional structures of the central regulatory proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and enzyme IIAGlc. *J. Cell Biochem.* **51**, 75-82.
- Conte, C., Dastugue, B. & Vaury, C. (2002) Promoter competition as a mechanism of transcriptional interference mediated by retrotransposons. *EMBO J.* **21**, 3908-3916.
- Cornilescu, G., Lee, B. R., Cornilescu, C. C., Wang, G., Peterkofsky, A. & Clore, G. M. (2002) Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the cytoplasmic A

- domain of the mannitol transporter IIMannitol and HPr of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J.Biol.Chem.* **277**, 42289-42298.
- 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. *Mol.Microbiol.* **43**, 1039-1052.
- Declerck,N., Dutartre, H., Receveur, V., Dubois, V., Royer, C., Aymerich, S. & van, T. H. (2001) Dimer stabilization upon activation of the transcriptional antiterminator LicT. *J.Mol.Biol.* **314**, 671-681.
- Deutscher,J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* **11**, 87-93.
- Deutscher,J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **70**, 939-1031.
- Deutscher,J., Kessler, U. & Hengstenberg, W. (1985) Streptococcal phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system: purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein. *J.Bacteriol.* **163**, 1203-1209.
- Deutscher,J., Kuster, 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. *Mol.Microbiol.* **15**, 1049-1053.
- Deutscher,J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier, M. H., Jr. & Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the ptsH gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **176**, 3336-3344.
- Deutscher,J. & Saier, M. H., Jr. (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**, 6790-6794.
- Doan,T. & Aymerich, S. (2003) Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate. *Mol.Microbiol.* **47**, 1709-1721.
- Eisermann,R., Deutscher, J., Gonzy-Treboul, G. & Hengstenberg, W. (1988) Site-directed mutagenesis with the ptsH gene of *Bacillus subtilis*. Isolation and characterization of heat-stable proteins altered at the ATP-dependent regulatory phosphorylation site. *J.Biol.Chem.* **263**, 17050-17054.
- Erni,B. (1986) Glucose-specific permease of the bacterial phosphotransferase system: phosphorylation and oligomeric structure of the glucose-specific IIGlc-IIIIGlc complex of *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **25**, 305-312.
- Faires,N., Tobisch, S., Bachem, S., Martin-Verstraete, I., Hecker, M. & Stülke, J. (1999) The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **1**, 141-148.



- Feese, M.D., Comolli, L., Meadow, N. D., ROSEMAN, S. & Remington, S. J. (1997) Structural studies of the *Escherichia coli* signal transducing protein IIAGlc: implications for target recognition. *Biochemistry* **36**, 16087-16096.
- Fioulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Monedero, V., Gueguen-Chaignon, V., Galinier, A., Janin, J., Deutscher, J. & Nessler, S. (2001) X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J.* **20**, 3917-3927.
- Fujita, Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 245-259.
- Galinier, A., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1999) Phosphorylation of either crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis* xyn cre and catabolite repression of the xyn operon. *J. Mol. Biol.* **286**, 307-314.
- 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**, 8439-8444.
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M. C., Deutscher, J. & Haiech, J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1823-1828.
- Garrett, D.S., Seok, Y. J., Liao, D. I., Peterkofsky, A., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1997) Solution structure of the 30 kDa N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by multidimensional NMR. *Biochemistry* **36**, 2517-2530.
- Gassner, M., Stehlik, D., Schrecker, O., Hengstenberg, W., Maurer, W. & Ruterjans, H. (1977) The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P-nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr. *Eur. J. Biochem.* **75**, 287-296.
- Ginsburg, A. & Peterkofsky, A. (2002) Enzyme I: the gateway to the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 273-278.
- Gorke, B. & Rak, B. (1999) Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* **18**, 3370-3379.
- Graille, M., Zhou, C. Z., Receveur-Brechot, V., Collinet, B., Declerck, N. & van, T. H. (2005) Activation of the LicT transcriptional antiterminator involves a domain swing/lock mechanism provoking massive structural changes. *J. Biol. Chem.* **280**, 14780-14789.
- Greenberg, D.B., Stülke, J. & Saier, M. H., Jr. (2002) Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res. Microbiol.* **153**, 519-526.
- Grundy, F.J., Waters, D. A., Takova, T. Y. & Henkin, T. M. (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**, 259-271.
- Guerout-Fleury, A.M., Frandsen, N. & Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**, 57-61.

- Haldimann, A. & Wanner, B. L. (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 6384-6393.
- Hanson, K.G., Steinhauer, K., Reizer, J., Hillen, W. & Stülke, J. (2002) HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology* **148**, 1805-1811.
- Harwood, C.R. & Archibald, A. R. (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus* (eds C.R. Harwood & S.M. Cutting), pp. 26. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. & Wallace, J. C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 6602-6606.
- Henkin, T.M. (1996) The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 9-15.
- 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* *lacl* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**, 575-584.
- Henstra, S.A., Duurkens, R. H. & Robillard, G. T. (2000) Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the *Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **275**, 7037-7044.
- Henstra, S.A., Tuinhof, M., Duurkens, R. H. & Robillard, G. T. (1999) The *Bacillus stearothermophilus* mannitol regulator, MtlR, of the phosphotransferase system. A DNA-binding protein, regulated by HPr and *iicbmtl*-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 4754-4763.
- Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411**, 177-184.
- Hu, K.Y. & Saier, M. H., Jr. (2002) Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res. Microbiol.* **153**, 405-415.
- Hurley, J.H., Faber, H. R., Worthylake, D., Meadow, N. D., ROSEMAN, S., Pettigrew, D. W. & Remington, S. J. (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III<sub>Glc</sub> with glycerol kinase. *Science* **259**, 673-677.
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. M. & Sonenshein, A. L. (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **295**, 865-878.
- Jürgen, B., Schweder, T. & Hecker, M. (1998) The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 538-545.
- Knippers, R. (2001) *Molekulare Genetik*, 8 edn. Thieme, Stuttgart.

- Kolb,A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu.Rev.Biochem.* **62**, 749-795.
- Krüger,S. & Hecker, M. (1995) Regulation of the putative bglPH operon for aryl-beta-glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **177**, 5590-5597.
- Kundig,W., Ghosh , S. & Rosenman, S. (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **52**, 1067-1074.
- Kunst,F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, 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., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. & . (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
- Lagodich,A.V., Cherva, E. A., Shtaniuk, I., Prokulevich, V. A., Fomichev, I., Prozorov, A. A. & Titok, M. A. (2005) Construction of vector system for molecular cloning in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol.Biol.(Mosk)* **39**, 345-348.
- Lee,S.Y. & Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques* **9**, 676-679.
- Lorca,G.L., Chung, Y. J., Barabote, R. D., Weyler, W., Schilling, C. H. & Saier, M. H., Jr. (2005) Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J.Bacteriol.* **187**, 7826-7839.
- Ludwig,H., Homuth, G., Schmalisch, M., Dyka, F. M., Hecker, M. & Stülke, J. (2001) Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the gapA operon. *Mol.Microbiol.* **41**, 409-422.
- Ludwig,H., Rebhan, N., Blencke, H. M., Merzbacher, M. & Stülke, J. (2002) Control of the glycolytic gapA operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol.Microbiol.* **45**, 543-553.
- Luesink,E.J., Beumer, C. M., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1999) Molecular characterization of the *Lactococcus lactis* ptsHI operon and analysis of the regulatory role of HPr. *J.Bacteriol.* **181**, 764-771.
- Lulko,A.T., Buist, G., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2007) Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **12**, 82-95.
- LURIA,S.E., DAMS, J. N. & TING, R. C. (1960) Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* **12**, 348-390.
- Magasanik,B. (1970) *The Lactose Operon* pp. 189-219. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Marquez,J.A., Hasenbein, S., Koch, B., Fieulaine, S., Nessler, S., Russell, R. B., Hengstenberg, W. & Scheffzek, K. (2002) Structure of the full-length HPr kinase/phosphatase from *Staphylococcus xylosus* at 1.95 Å resolution: Mimicking the product/substrate of the phospho transfer reactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 3458-3463.

- Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Stülke, J., Galinier, A., Erni, B., Rapoport, G. & Deutscher, J. (1998) Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR. *Mol.Microbiol.* **28**, 293-303.
- Martin-Verstraete, I., Debarbouille, M., Klier, A. & Rapoport, G. (1990) Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J.Mol.Biol.* **214**, 657-671.
- Martin-Verstraete, I., Debarbouille, M., Klier, A. & Rapoport, G. (1994) Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J.Mol.Biol.* **241**, 178-192.
- Martin-Verstraete, I., Stülke, J., Klier, A. & Rapoport, G. (1995) Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J.Bacteriol.* **177**, 6919-6927.
- McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T. & Sueoka, N. (1986) The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **15**, 93-103.
- Michel, J.F. & Millet, J. (1970) Physiological studies on early-blocked sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. *J.Appl.Bacteriol.* **33**, 220-227.
- Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M. & Fujita, Y. (2000) Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1206-1210.
- Monedero, V., Maze, A., Boel, G., Zuniga, M., Beaufils, S., Hartke, A. & Deutscher, J. (2007) The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **12**, 20-32.
- 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. *EMBO J.* **20**, 3928-3937.
- Monod, J. (1942) *Recherche sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann et Cie, Paris, France.
- Moran, C.P., Jr., Lang, N., LeGrice, S. F., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A. L., Pero, J. & Losick, R. (1982) Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol.Gen.Genet.* **186**, 339-346.
- Moreno, M.S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. & Saier, M. H., Jr. (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol.Microbiol.* **39**, 1366-1381.
- Mortensen, L., Dandanell, G. & Hammer, K. (1989) Purification and characterization of the deoR repressor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**, 325-331.
- Nelson, S.O., Scholte, B. J. & Postma, P. W. (1982) Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system-mediated regulation of carbohydrate metabolism in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **150**, 604-615.

- Pas,H.H. & Robillard, G. T. (1988) S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EIIMtl. *Biochemistry* **27**, 5835-5839.
- Patel,H.V., Vyas, K. A., Mattoo, R. L., Southworth, M., Perler, F. B., Comb, D. & ROSEMAN, S. (2006) Properties of the C-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J.Biol.Chem.* **281**, 17579-17587.
- Paulsen,I.T., Chauvaux, S., Choi, P. & Saier, M. H., Jr. (1998) Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H<sup>+</sup> symporter. *J.Bacteriol.* **180**, 498-504.
- Postma,P.W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol.Rev.* **57**, 543-594.
- Ramstrom,H., Sanglier, S., Leize-Wagner, E., Philippe, C., Van, D. A. & Haiech, J. (2003) Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J.Biol.Chem.* **278**, 1174-1185.
- Recsei,P.A., Gruss, A. D. & Novick, R. P. (1987) Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 1127-1131.
- Reichenbach,B., Breustedt, D. A., Stülke, J., Rak, B. & Gorke, B. (2007) Genetic dissection of specificity determinants in the interaction of HPr with enzymes II of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **189**, 4603-4613.
- Reizer,J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M. H., Jr. & 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** ( Pt 12), 3419-3429.
- Reizer,J., Hoischen, C., Reizer, A., Pham, T. N. & Saier, M. H., Jr. (1993) Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and HPr of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Protein Sci.* **2**, 506-521.
- Reizer,J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M. H., Jr. & Hillen, W. (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol.Microbiol.* **27**, 1157-1169.
- Reizer,J., Novotny, M. J., Hengstenberg, W. & Saier, M. H., Jr. (1984) Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a seryl residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J.Bacteriol.* **160**, 333-340.
- Reizer,J. & Reizer, A. (1996) A voyage along the bases: novel phosphotransferase genes revealed by in silico analyses of the *Escherichia coli* genome. *Res.Microbiol.* **147**, 458-471.
- Reizer,J., Sutrina, S. L., Saier, M. H., Stewart, G. C., Peterkofsky, A. & Reddy, P. (1989) Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J.* **8**, 2111-2120.

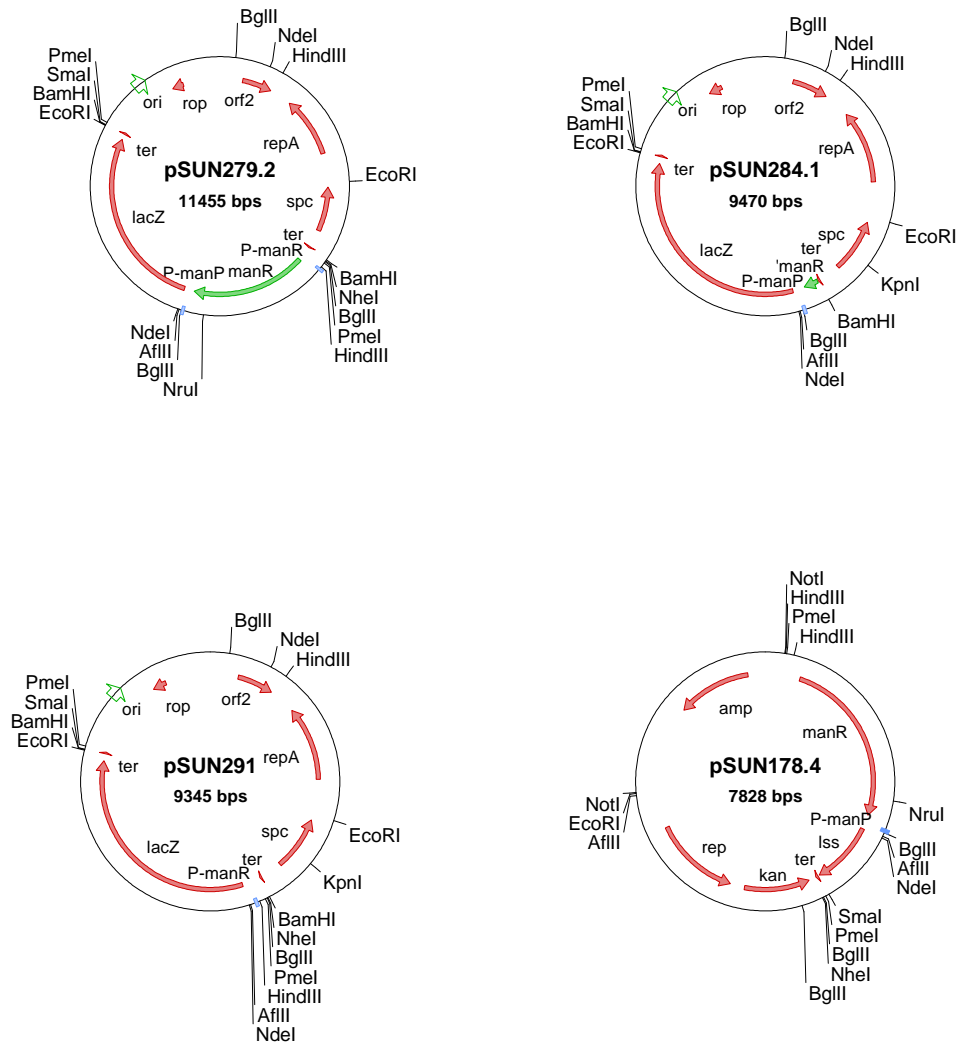
- Robillard, G.T. & Broos, J. (1999) Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim.Biophys.Acta* **1422**, 73-104.
- Saier, M.H., Jr., Goldman, S. R., Maile, R. R., Moreno, M. S., Weyler, W., Yang, N. & Paulsen, I. T. (2002) Transport capabilities encoded within the *Bacillus subtilis* genome. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **4**, 37-67.
- Saier, M.H., Jr., Keeler, D. K. & Feucht, B. U. (1982) Physiological desensitization of carbohydrate permeases and adenylate cyclase to regulation by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Involvement of adenosine cyclic 3',5'-phosphate and inducer. *J.Biol.Chem.* **257**, 2509-2517.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**, 5463-5467.
- Schnetz, K., Toloczyki, C. & Rak, B. (1987) Beta-glucoside (bgl) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J.Bacteriol.* **169**, 2579-2590.
- Scholte, B.J., Schuitema, A. R. & Postma, P. W. (1982) Characterization of factor III<sup>GLc</sup> in catabolite repression-resistant (crr) mutants of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **149**, 576-586.
- Schultz, S.C., Shields, G. C. & Steitz, T. A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**, 1001-1007.
- Schumacher, M.A., Allen, G. S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G. (2004) Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* **118**, 731-741.
- 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. *J.Biol.Chem.* **281**, 6793-6800.
- Servant, P., Le, C. D. & Aymerich, S. (2005) CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes. *Mol.Microbiol.* **55**, 1435-1451.
- Spelbrink, R.E., Kolkman, A., Slijper, M., Killian, J. A. & de, K. B. (2005) Detection and identification of stable oligomeric protein complexes in *Escherichia coli* inner membranes: a proteomics approach. *J.Biol.Chem.* **280**, 28742-28748.
- Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **44**, 1072-1078.
- Steinmetz, M., Le, C. D. & Aymerich, S. (1989) Induction of saccharolytic enzymes by sucrose in *Bacillus subtilis*: evidence for two partially interchangeable regulatory pathways. *J.Bacteriol.* **171**, 1519-1523.
- Stock, A.M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* **69**, 183-215.

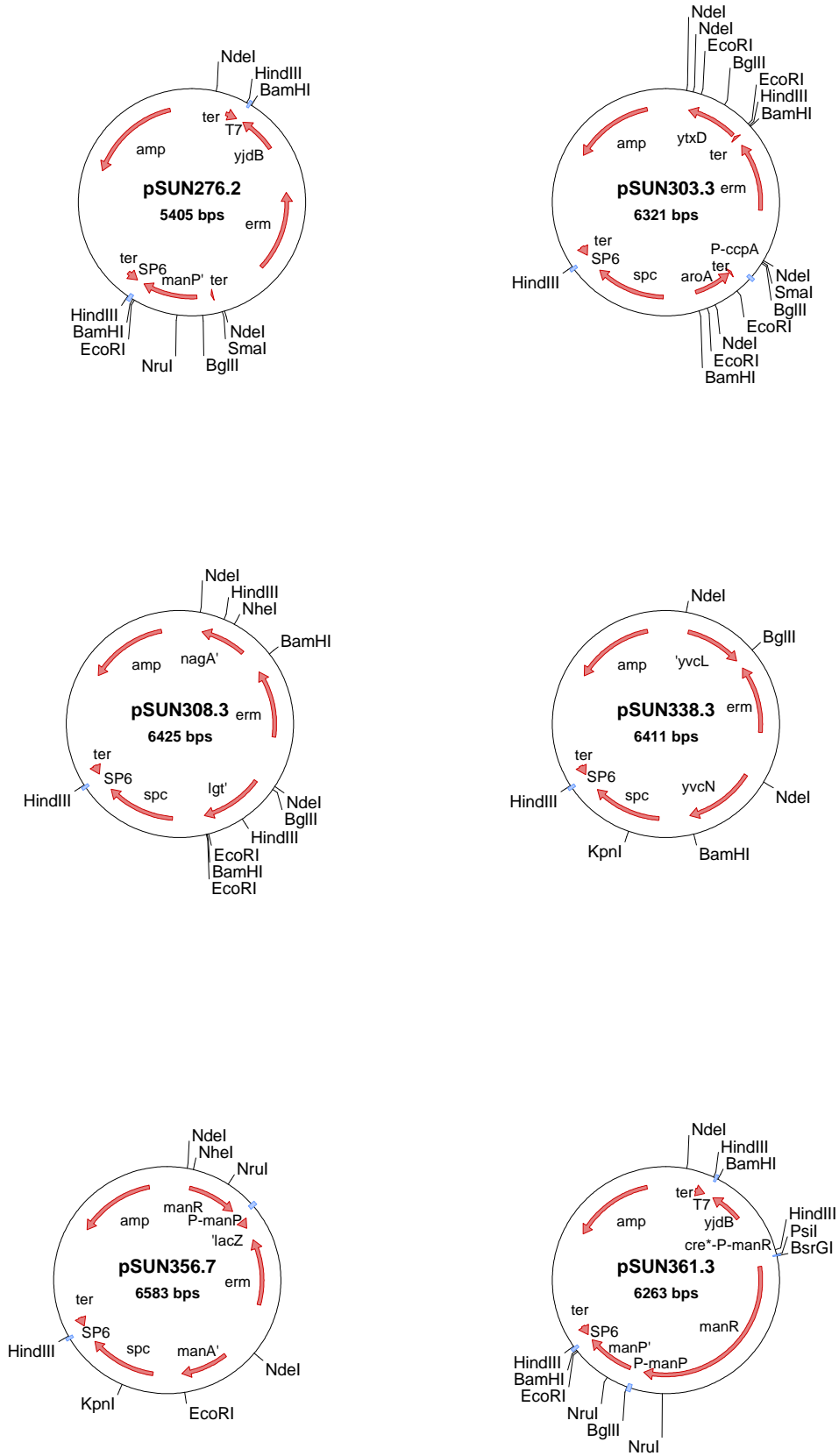
- Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G. & Martin-Verstraete, I. (1998) PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol.Microbiol.* **28**, 865-874.
- Stülke, J. & Hillen, W. (1998) Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* **85**, 583-592.
- Stülke, J. & Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu.Rev.Microbiol.* **54**, 849-880.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Klier, A., Deutscher, J. & Rapoport, G. (1995) The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J.Bacteriol.* **177**, 6928-6936.
- Tanaka, Y., Itoh, F., Kimata, K. & Aiba, H. (2004) Membrane localization itself but not binding to IICB is directly responsible for the inactivation of the global repressor Mlc in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **53**, 941-951.
- Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J. S. & Saier, M. H., Jr. (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **3**, 329-346.
- Titgemeyer, F. & Hillen, W. (2002) Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 59-71.
- 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**, 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. *J.Bacteriol.* **181**, 4995-5003.
- Tobisch, S., Zuhlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J. & Hecker, M. (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **181**, 6996-7004.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K. & Fujita, Y. (2005) Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* ilv-leu operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol.Microbiol.* **56**, 1560-1573.
- Tortosa, P., Aymerich, S., Lindner, C., Saier, M. H., Jr., Reizer, J. & Le, C. D. (1997) Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J.Biol.Chem.* **272**, 17230-17237.
- van Tilbeurgh, H. & Declerck, N. (2001) Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **11**, 685-693.
- van Tilbeurgh, H., Le, C. D. & Declerck, N. (2001) Crystal structure of an activated form of the PTS regulation domain from the LicT transcriptional antiterminator. *EMBO J.* **20**, 3789-3799.

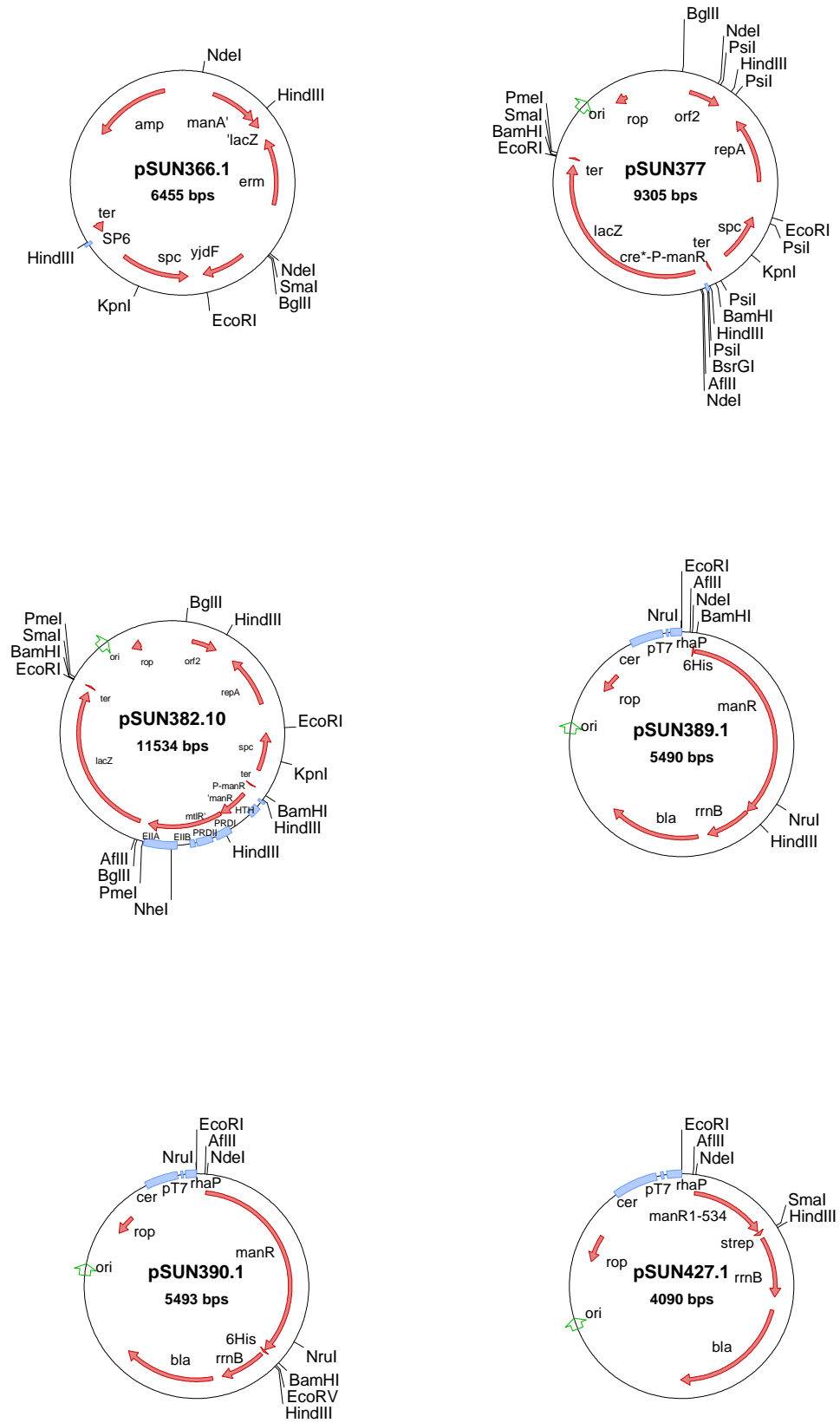
- van Tilbeurgh, H., Manival, X., Aymerich, S., Lhoste, J. M., Dumas, C. & Kochoyan, M. (1997) Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **16**, 5030-5036.
- Warner, J. B. & Lolkema, J. S. (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 475-490.
- Watanabe, S., Hamano, M., Kakeshita, H., Bunai, K., Tojo, S., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Wong, S. L. & Yamane, K. (2003) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MtlD) is required for mannitol and glucitol assimilation in *Bacillus subtilis*: possible cooperation of mtl and gut operons. *J. Bacteriol.* **185**, 4816-4824.
- Waygood, E. B. (1998) The structure and function of HPr. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 359-367.
- Wegerer, A., Sun, T. & Altenbuchner, J. (2008) Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC. Biotechnol.* **8**, 2.
- Weickert, M. J. & Adhya, S. (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* **267**, 15869-15874.
- 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**, 6238-6242.
- Weigel, N., Kukuruzinska, M. A., Nakazawa, A., Waygood, E. B. & ROSEMAN, S. (1982) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **257**, 14477-14491.
- Williams, D. C., Jr., Cai, M., Suh, J. Y., Peterkofsky, A. & Clore, G. M. (2005) Solution NMR structure of the 48-kDa IIAMannose-HPr complex of the *Escherichia coli* mannose phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **280**, 20775-20784.
- Wittekind, M., Reizer, J., Deutscher, J., Saier, M. H. & Klevit, R. E. (1989) Common structural changes accompany the functional inactivation of HPr by seryl phosphorylation or by serine to aspartate substitution. *Biochemistry* **28**, 9908-9912.
- Xue, G. P., Johnson, J. S. & Dalrymple, B. P. (1999) High osmolarity improves the electrotransformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods* **34**, 183-191.
- Yang, Y., Declerck, N., Manival, X., Aymerich, S. & Kochoyan, M. (2002) Solution structure of the LicT-RNA antitermination complex: CAT clamping RAT. *EMBO J.* **21**, 1987-1997.
- 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**, 103-119.
- Yanofsky, C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* **289**, 751-758.
- Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C. M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T. & Fujita, Y. (2001) Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **29**, 683-692.



## 7 Anhang: Plasmidkarten einiger in dieser Arbeit konstruierten wichtigen Plasmide







## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Tianqi Sun
Geburtsdatum,-ort	04.07.1975, Harbin, V. R. China
Staatsangehörigkeit	chinesisch
Familienstand	verheiratet

### Schulausbildung

1982-1988	Grundschule Tongjiang, Harbin, China
1988-1991	Das 18te Gymnasium, Harbin, V. R. China
1991-1994	Das 3te Gymnasium, Harbin, V. R. China

### Studium

09.1994-07.1999	Beijing Medizinische Universität, China, Bachelor of Medicine
05.2002-10.2006	Universität Stuttgart, Diplom Biologe (t.o.)
11.2006-04.2010	Promotion am Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart