

Bildung und Homöostase von c-di-AMP in *Bacillus subtilis*

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität zu Göttingen

im Promotionsprogramm

Biomolecules: Structure – Function – Dynamics

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Felix Marco Peter Mehne

aus Frankfurt a.M.

Göttingen 2013

Thesis Committee

Prof. Dr. Jörg Stülke
(Institut für Mikrobiologie & Genetik, Abt. allgemeine Mikrobiologie)

Prof. Dr. Lutz Walter
(Deutsches Primatenzentrum, Abt. Primatengenetik)

Dr. Karin Kühnel
(Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Neurobiologie)

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Jörg Stülke
(Institut für Mikrobiologie & Genetik, Abt. allgemeine Mikrobiologie)

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Walter
(Deutsches Primatenzentrum, Abt. Primatengenetik)

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. Ivo Feussner
(Albrecht-von-Haller-Institut der Pflanzenwissenschaften, Abt. Biochemie der Pflanze)

Prof. Dr. Rolf Daniel
(Institut für Mikrobiologie & Genetik, Abt. Genomik und angewandte Mikrobiologie)

Dr. Karin Kühnel
(Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Neurobiologie)

Dr. Fabian Commichau
(Institut für Mikrobiologie & Genetik, Abt. allgemeine Mikrobiologie)

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Januar 2014

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Bildung und Homöostase von c-di-AMP in *Bacillus subtilis*“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Felix Marco Peter Mehne

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Stülke danken. Ich erinnere mich noch gut an die plötzlichen Umstände, die mich Ende 2010 völlig ungeplant nach Göttingen gebracht haben. Für diesen Ortswechsel hat Jörg sich eingesetzt wie kein Zweiter, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Unterstützt und hervorragend betreut hat er in den folgenden drei Jahren auch den Fortgang dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Lutz Walter für die Übernahme des Korreferats. Herrn Walter sowie Frau Dr. Karin Kühnel danke ich außerdem für die Teilnahme an meinem „Thesis Committee“. Bei Prof. Dr. Ivo Feussner, Prof. Dr. Rolf Daniel und Dr. Fabian Moritz Commichau möchte ich mich für die Teilnahme in meiner Prüfungskommission bedanken.

Weiterhin gehen mein Dank und meine große Anerkennung an Christina Herzberg. Durch die intensive Zusammenarbeit mit ihr habe ich viel gelernt. Dabei hat sie sich stets mit unglaublicher Hingabe eingesetzt, zum Erfolg dieser Arbeit beizutragen. Mit Rat und Tat stand auch Dr. Katrin Gunka oft zur Seite – vielen Dank!

Durch verschiedenste Kooperationen durfte ich mit vielen netten Menschen zusammenarbeiten. Dr. Kathrin Schröder-Tittmann möchte ich für die große Einsatzbereitschaft und herzliche Atmosphäre bei unserer gemeinsamen Arbeit danken. Prof. Dr. Volkhard Kaever und Annette Garbe danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Die unermüdliche Annette hat ihr Triple-Quadrupol mit unzähligen unserer Proben beschickt. Weiterhin gilt mein Dank den wertvollen Beiträgen von Dr. Robyn Talita Eijlander, Prof. Dr. Rick Lewis und Dr. Frank Schwede.

Ein weiteres großes Dankeschön geht nicht nur an alle ehemaligen Mitstreiter, sondern natürlich auch an alle aktuellen Kollegen der Abteilung. Die Arbeitsatmosphäre mit Euch war immer besonders angenehm und hat den Laboralltag bereichert. Zu Beginn haben mich Dr. Martin Lehnik-Habrink, Dr. Christine Diethmaier, Dr. Fabian Rothe, Dr. Frederik Meyer, Dr. Arne Schmeisky, Dr. Jens Landmann sowie Dr. Yvonne Göpel sehr herzlich in der Arbeitsgruppe aufgenommen und über lange Zeit begleitet. Nach wie vor tun dies Jan Gundlach, Christopher Zschiedrich, Raphael Michna, Lorena Stannek, Stephanie Großhennig

und Nora Cascante Estepa. Sei es im Labor, in der Mensa, beim DIES oder auf der ein oder anderen Tagung – in Eurer Gesellschaft hat es immer Spaß gemacht.

Die Betreuung aller meiner Praktikanten, Bachelor- und Masterstudenten war sehr angenehm und hat in jedem einzelnen Fall zu einer erfolgreichen Zusammenarbeit geführt. Hierfür möchte ich mich bei Victoria Keidel, Carina Gross, Jan Kampf, Jan Gundlach und Dominik Tödter bedanken. Vielen Dank auch an Bärbel Herbst, die durch ihre Arbeit zu einer großen Erleichterung des Laboralltags verholfen hat.

Vielen Dank an alle Menschen die – beruflich wie privat – meine Zeit in Göttingen sehr lebenswert und garantiert unvergesslich gemacht haben. Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern, danke ich sehr herzlich für ihren starken Rückhalt, ihr stetiges Vertrauen und ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	VIII	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX	
ZUSAMMENFASSUNG	XII	
ABSTRACT	XIII	
1	EINLEITUNG..... 1	
1.1	SIGNALTRANSDUKTION	1
1.2	SECOND MESSENGER.....	2
1.2.1	<i>Nukleotide als Signalmoleküle.....</i>	<i>2</i>
1.2.2	<i>Zyklisches di-Adenosinmonophosphat (c-di-AMP).....</i>	<i>4</i>
1.3	MÖGLICHE IMPLIKATIONEN FÜR C-DI-AMP	13
1.3.1	<i>Architektur und Synthese der Zellwand.....</i>	<i>13</i>
1.3.2	<i>Regulation der Zelllänge.....</i>	<i>14</i>
1.4	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	18
2.2	MEDIEN.....	18
2.3	METHODEN.....	21
2.3.1	<i>Allgemeine Methoden.....</i>	<i>21</i>
2.3.2	<i>Mikroskopische Aufnahmen.....</i>	<i>24</i>
2.3.3	<i>Arbeiten mit DNA.....</i>	<i>25</i>
2.3.4	<i>Arbeiten mit RNA.....</i>	<i>31</i>
2.3.5	<i>Arbeiten mit Proteinen.....</i>	<i>37</i>
2.3.6	<i>Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.....</i>	<i>46</i>
2.3.7	<i>Bestimmung von intrazellulären c-di-AMP Konzentrationen.....</i>	<i>49</i>
2.3.8	<i>Bestimmung von Enzymaktivitäten.....</i>	<i>51</i>
3	ERGEBNISSE	54
3.1	IDENTIFIZIERUNG VON DIADENYLATZYKLASEN IN <i>B. SUBTILIS</i>	54
3.2	C-DI-AMP-HOMÖOSTASE	55
3.2.1	<i>Essentialität von c-di-AMP in B. subtilis.....</i>	<i>55</i>
3.2.2	<i>Auswirkungen des c-di-AMP-Spiegels auf Wachstum und Zellmorphologie.....</i>	<i>57</i>
3.3	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN DES <i>CDA-GLM</i> -MODULS.....	62

3.3.1	<i>Transkriptionelle Organisation des cda-glm-Moduls</i>	62
3.3.2	<i>Aufbau und Lokalisation von CdaA</i>	65
3.3.3	<i>Die regulatorische Interaktion zwischen CdaA und CdaR</i>	67
3.3.4	<i>CdaA, CdaR und GlmM bilden einen Proteinkomplex</i>	73
3.3.5	<i>Ist c-di-AMP ein Mediator für die Stickstoffversorgung?</i>	75
3.4	DIE DAC-AKTIVITÄT VON CDAS WIRD DURCH EINE AUTOINHIBITORISCHE DOMÄNE REGULIERT	82
3.4.1	<i>Identifizierung von hyperaktiven CdaS-Varianten</i>	82
3.4.2	<i>Modell zur CdaS-Oligomerisierung: Bildung eines Hexamers</i>	88
3.4.3	<i>Untersuchung der CdaS-Oligomerisierung in vitro</i>	91
4	DISKUSSION	96
4.1	DIADENYLATZYKLASEN – EINE WEIT VERBREITETE ENZYMFAMILIE.....	96
4.2	HOMÖOSTASE: DIE RICHTIGE C-DI-AMP-KONZENTRATION IST WICHTIG.....	99
4.3	C-DI-AMP IN DER ZELLWANDSYNTHESE	101
4.4	IST C-DI-AMP EIN MEDIATOR DER STICKSTOFFVERSORGUNG?	104
4.5	WEITERE MÖGLICHE FUNKTIONEN VON C-DI-AMP	106
4.6	DIE ENZYMAKTIVITÄT VON CDAS WIRD DURCH EINE AUTOINHIBITORISCHE DOMÄNE REGULIERT	109
5	LITERATUR	113
6	ANHANG	129
6.1	MATERIALIEN	129
6.1.1	<i>Chemikalien</i>	129
6.1.2	<i>Im Labor verwendete Hilfsmittel</i>	130
6.1.3	<i>Geräte und Apparaturen</i>	130
6.1.4	<i>Kommerziell erhältliche Systeme</i>	132
6.1.5	<i>Antikörper und Enzyme</i>	133
6.2	OLIGONUKLEOTIDE	133
6.3	STÄMME	145
6.4	FREMDSTÄMME	150
6.5	PLASMIDE	151
6.6	VERWENDETE INTERNETANGEBOTE UND COMPUTERPROGRAMME	158
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	160
	TABELLENVERZEICHNIS	165
	CURRICULUM VITAE	166

Liste der Veröffentlichungen

Meyer F.M. *, M. Jules*, **F.M.P. Mehne***, D. Le Coq*, J.J. Landmann, B. Görke, S. Aymerich, J. Stülke, (2011) Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. *J Bacteriol* **193**: 6939-49

Mehne, F.M.P., K. Gunka, H. Eilers, C. Herzberg, V. Kaefer & J. Stülke, (2013) Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *J Biol Chem* **288**: 2004-2017.

* *ex aequo*

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	% (volume/volume) (Volumenprozent)
% (w/v)	% (weight/volume) (Massenprozent)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A_x	Absorption, gemessen bei Wellenlänge $\lambda = x \text{ nm}$
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
B2H / BACTH	bacterial-two-hybrid
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
Ca ₂ Cl	Calciumchlorid
CAA	Casamino acids
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	Combined chain reaction
CdaA	cyclic di-AMP synthase A (YbbP)
CdaR	cyclic di-AMP synthase A regulator (YbbR)
CdaS	cyclic di-AMP synthase S; Sporulation-spezifisch (YojJ)
c-di-AMP	zyklisches di-Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CDP*	disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3,7]decan]-4-yl) phenyl phosphate
cGAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat- Guanosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAC	Diadenylatzyklase
ddH ₂ O	Doppeltdestilliertes Wasser
DisA	DNA integrity scanning protein A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FA	Formaldehyd
Fru6P	Fructose-6-Phosphat
fwd	forward
GdpP	<u>GGDEF</u> <u>domain</u> <u>protein</u> containing phosphodiesterase
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcN1P	Glucosamin-1-Phosphat
GlcN6P	Glucosamin-6-Phosphat

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcNAc6P	N-Acetylglucosamin-6-Phosphat
GlmM	Phosphoglucosaminmutase
GlmS	Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Transaminase
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani (Medium)
LFH	Long-Flanking-Homology
mRNA	messenger RNA
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD _x	optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge λ = x nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
<i>ori</i>	Replikationsursprung
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pH	pondus Hydrogenii
ppGpp	Guanosintetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
PVDF	Polyvenylidenfluorid
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SD	Shine Dalgarno
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SP	Sporulationsmedium
SPINE	Strep-protein interaction experiment
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin
UDP-MurNAc	Uridindiphosphat-N-Acetylmuraminsäure
üN	über Nacht
üT	über Tag
WT	Wildtyp

X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
xyl	Xylose
ZAP	Zellaufschlusspuffer

Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaare
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Herz
l	Liter
m	Meter
M	molar (mol/l)
min	Minute
sek	Sekunde
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt

Vorsätze

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Aminosäuren-Nomenklatur (nach IUPAC-IUB-Vereinbarung 1969)

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	T	Tyr	Tyrosin
K	Lys	Lysin	V	Val	Valin
L	Leu	Leucin	W	Trp	Tryptophan

Zusammenfassung

Die Signaltransduktion beschreibt die Fähigkeit von Zellen, Umweltreize wahrzunehmen und entsprechende Signale weiterzuleiten, welche zur Reaktion auf die Reize führen können. Bei der Weiterleitung spielen Signalnukleotide häufig eine wichtige Rolle. Diese kleinen Botenmoleküle vermitteln die zelluläre Kommunikation durch Regulation zellbiologischer Mechanismen. Auf diese Weise werden Adaptationsvorgänge zur optimalen Anpassung an die vorliegenden Lebensbedingungen ermöglicht. In dieser Arbeit wurde der Metabolismus des Signalnukleotids c-di-AMP in dem Gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* untersucht. In *B. subtilis*, wie auch in vielen pathogenen Gram-positiven Bakterien, ist c-di-AMP essentiell. Bis heute ist es damit das erste und einzige essentielle Signalnukleotid. In *B. subtilis* existieren drei Enzyme zur Synthese von c-di-AMP: DisA, CdaA und CdaS. CdaA und CdaS wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals charakterisiert und daraufhin neu benannt. CdaA ist membranständig und wird zusammen mit seinem Regulator CdaR exprimiert. Durch eine funktionelle Interaktion beider Proteine kommt es zur Aktivierung von CdaA. CdaS hingegen wird ausschließlich in der Sporulationsphase exprimiert, weshalb die Aktivität des Enzyms vermutlich für die Sporulation oder Auskeimung wichtig ist. CdaS trägt eine N-terminale autoinhibitorische Domäne, welche die Aktivität der katalytischen Domäne limitiert. Das Enzym bildet einen hexameren Komplex. Während die Abwesenheit von c-di-AMP für *B. subtilis* letal ist, ist auch die Überproduktion sehr schädlich. Dies zeigt, dass die Homöostase von c-di-AMP sehr genau kontrolliert werden muss. Hohe c-di-AMP-Konzentrationen führen zu langen, abnormal verdrillten Zellketten. Dieser Phänotyp kann durch Magnesiumionen unterdrückt werden, was ein Hinweis für eine Rolle von c-di-AMP im Zellwandmetabolismus ist. Weiterhin wurde die mögliche Beteiligung von c-di-AMP an einer stickstoffabhängigen Zelllängenkontrolle gezeigt. Der *in vivo* Nachweis eines Proteinkomplexes aus CdaA, CdaR und GlmM spricht dafür, dass dieser Mechanismus durch eine „moonlighting“-Aktivität von GlmM als Sensor der Stickstoffversorgung vermittelt werden könnte. Zukünftige Untersuchungen könnten durch die Identifizierung von c-di-AMP-Rezeptoren in *B. subtilis* die Schlüsselproteine der beteiligten Mechanismen auffindig machen. Dadurch wäre die direkte Assoziation von c-di-AMP zu den entsprechenden Funktionen möglich.

Abstract

Signal transduction describes the ability of cells to sense environmental stimuli and transfer this information in order to react appropriately to these stimuli. In this process, signaling nucleotides are often important. These small molecules mediate the cellular communication by regulating a variety of molecular mechanisms. Thus, signal transduction enables cells to adapt to environmental conditions. This work addressed the metabolism of the signaling nucleotide c-di-AMP in the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis*. In *B. subtilis*, as well as in many Gram-positive pathogens, c-di-AMP is essential. To date, there is no other signaling nucleotide known to be essential. *B. subtilis* encodes three c-di-AMP synthases: DisA, CdaA and CdaS. CdaA and CdaS were characterized in this work for the first time and based on these insights, new designations were introduced. CdaA is located in the membrane and is encoded together with its regulator CdaR. A functional interaction of these two proteins leads to the activation of CdaA. On the other hand, CdaS is expressed exclusively during sporulation. Thus, CdaS activity is presumably important for sporulation or germination. An N-terminal autoinhibitory domain limits the activity of the catalytic domain. CdaS forms a hexameric complex. While the lack of c-di-AMP is lethal for *B. subtilis*, overproduction of the nucleotide is also detrimental. This demonstrates that homeostasis of c-di-AMP has to be tightly controlled. High levels of c-di-AMP lead to aberrant curly cell filaments. This phenotype can be suppressed by magnesium ions, which suggests an impact of c-di-AMP on cell wall metabolism. Furthermore, a possible involvement of c-di-AMP in a nitrogen-dependant cell length control was shown. The *in vivo* detection of a protein complex consisting of CdaA, CdaR and GlmM support the idea that this mechanism may be mediated by a moonlighting activity of GlmM as a sensor of nitrogen supply. The quest for c-di-AMP receptors in *B. subtilis* in future investigations could identify the key proteins of the participating mechanisms. This would provide a direct correlation of c-di-AMP with the respective cellular functions.

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Die Anpassung an veränderte Lebensbedingungen ist eines der Grundprinzipien der Evolution. Die Effizienz solcher Anpassungsvorgänge entscheidet über das Schicksal jedes lebenden Individuums. Dabei sind langfristige Adaptionen wichtig. Eine ganz entscheidende Rolle spielt aber auch die Fähigkeit kurzfristig auf Umweltsignale zu reagieren. Mechanismen, die zu spontanen Reaktionen auf äußere Reize befähigen, sind daher von größter Bedeutung.

Jede Zelle bildet ein eigenständiges Lebenssystem und ist damit die Grundeinheit allen Lebens. In mehrzelligen Organismen ist die Koordination verschiedener Zelltypen eine wichtige Voraussetzung, komplexe Zellorganisation erst zu ermöglichen. Das wird durch die Fähigkeit der Zellkommunikation erreicht – die sogenannte Signaltransduktion. Die zugrunde liegenden Mechanismen nutzen vielfältige, oft komplexe Signalkaskaden in die meist Signalproteine aber auch Lipide und Nukleinsäuren involviert sind. Auf diese Weise wird die Amplifikation des Signals ermöglicht und dadurch die inter- und intrazelluläre Kommunikation erreicht (Lodish, 2004).

Auch in Bakterien sind beide, Zell-Zell- und intrazelluläre Kommunikation, wichtig um auf Umweltreize zu reagieren und damit lebensnotwendig (Kaiser & Losick, 1993, Parkinson, 1993). Das Phänomen „quorum sensing“ bezeichnet die Fähigkeit zu sozialem Verhalten – eine Art Schwarmverhalten. Sogenannte „Autoinducer“ stellen ein Maß für die Zelldichte dar. In Gram-negativen und positiven Bakterien wird dies durch acyliertes Homoserin-Lacton beziehungsweise kleine Peptide vermittelt (Swift *et al.*, 1994, Thoendel & Horswill, 2010).

Signaltransduktion spielt in allen Bereichen des Lebens eine wichtige Rolle. Alberts *et al.* klassifizieren Genfamilien genetisch diverser Organismen aus allen Lebensdomänen. Sie zeigen, dass es in jeder Domäne Genfamilien gibt die mit der Funktion Signaltransduktion assoziiert sind (Alberts *et al.*, 2008). Die zelluläre Kommunikation stellt somit eine Grundvoraussetzung allen Lebens dar.

1.2 Second messenger

Die Aktivierung eines Oberflächenrezeptors durch ein extrazelluläres Molekül („first messenger“) bewirkt die intrazelluläre Generierung von Molekülen zur Signalweitergabe – dem sogenannten „second messenger“. Der „second messenger“ aktiviert wiederum Folgemoleküle, meist Proteine, und sorgt so für eine Signalamplifikation.

In Eukaryoten sind die „second messenger“ Inositoltriphosphat und Diacylglycerol beispielsweise wichtig für die Kontraktion der glatten Muskulatur bzw. die Membranverankerung von Enzymen (Alberts *et al.*, 2008). Das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) spielt unter anderem in der unspezifischen Immunabwehr eine Rolle, indem es von Phagozyten produziert wird (Green *et al.*, 1990). Als Folge haben einige pathogene Bakterien NO-Resistenzmechanismen entwickelt (Janeway *et al.*, 2002).

1.2.1 Nukleotide als Signalmoleküle

Verschiedenste Nukleotidderivate sind wichtige „second messenger“. Durch sie werden zelluläre Funktionen in allen Organismen reguliert. Das lineare (p)ppGpp fungiert als Alarmon in der Stressantwort auf Aminosäure-, Phosphat, Fettsäure-, Kohlenstoff- und Eisenlimitierung durch verschiedene Mechanismen, die unter dem Begriff „stringent response“ zusammengefasst werden. (Persky *et al.*, 2009, Spira *et al.*, 1995, Battesti & Bouveret, 2006, Lapouge *et al.*, 2008, Vinella *et al.*, 2005). Weiterhin verwenden Bakterien eine Vielzahl an zyklischen Nukleotidderivaten. Diese sind die zyklischen Mononukleotide cAMP und cGMP aber auch die zyklischen Dinukleotide c-di-GMP, c-di-AMP und cGAMP.

Zyklische Mononukleotide

Das bekannteste Beispiel ist das zyklische AMP (cAMP), was auch das erste entdeckte „second messenger“-Molekül ist. In *Escherichia coli* ist cAMP in die Katabolitenrepression eingebunden, indem es im Komplex mit dem CRP-Protein katabole Gene aktiviert. Dadurch ist cAMP an Regulationsmechanismen beteiligt, die zur Verwertung einer präferierten Kohlenstoffquelle führen (Buettner *et al.*, 1973, Görke & Stülke, 2008).

In *Bacillus subtilis* hingegen – dem Gram-positiven Modellorganismus – wird die Katabolitenrepression durch einen grundlegend anderen Mechanismus ausgeführt. Der Phosphorylierungsstatus von Hpr entscheidet dabei über die Repression von katabolen

Genen durch den globalen Regulator CcpA. cAMP spielt in *B. subtilis* keine Rolle. (Görke & Stülke, 2008).

Die Existenz des zyklischen GMP (cGMP) wurde ausschließlich Eukaryoten zugeordnet. Bakterielle Vorkommen wurden schon längere Zeit untersucht, jedoch als unspezifisches Nebenprodukt der Adenylatzyklase abgetan (Linder, 2010). Dennoch konnte kürzlich ein cGMP-abhängiges System in dem Alphaproteobakterium *Rhodospirillum centenum* nachgewiesen werden. Mittels eines spezifischen Transkriptionsfaktors ist cGMP für die Zystenbildung dieses Bakteriums verantwortlich (Marden *et al.*, 2011). Das Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* nutzt einen cGMP/c-di-GMP gekoppelten Mechanismus zur Regulation von Biofilmbildung und Virulenz (An *et al.*, 2013).

Zyklische Dinukleotide

Neben cAMP und cGMP sind auch zyklische Dinukleotide wichtige Signalmoleküle und seit einigen Jahren in den Fokus der Forschung geraten. Allen voran wird c-di-GMP seit 25 Jahren untersucht und spielt in vielen Bakterien eine Schlüsselrolle im Wechseln des Lebensstils zwischen Motilität und Sessilität (Simm *et al.*, 2004). Außerdem ist es von Bedeutung für die Biofilmbildung, Virulenz, Zellzyklus und Differenzierung durch Mechanismen wie der Produktion von extrazellulären Polysacchariden, adhäsiven Proteinen, Pili und Flagellen (Wolfe & Visick, 2008, Römling *et al.*, 2013). Die Bildung von c-di-GMP wird durch Diguanylatzyklasen (DGCs) katalysiert, die alle ein GGDEF-Motiv in ihrem aktiven Zentrum besitzen (Paul *et al.*, 2004). Phosphodiesterasen (PDEs) bauen das c-di-GMP zu dem linearen Produkt pGpG ab, welches daraufhin in zwei GTP Moleküle gespalten wird. Für die PDE-Aktivität sind zwei unterschiedliche Proteindomänen verantwortlich, die EAL- sowie die HD-GYP-Domäne (Christen *et al.*, 2005, Schmidt *et al.*, 2005, Ryan *et al.*, 2006).

Auf das zyklische Dinukleotid c-di-AMP soll im Folgeabsatz intensiv eingegangen werden. Beide Signalmoleküle, c-di-AMP und c-di-GMP, konnten als Auslöser einer Immunantwort in Säugern nachgewiesen werden. Die Exposition mit den Nukleotiden führte zur STING-vermittelten Interferonproduktion (Woodward *et al.*, 2010, Burdette *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2012, Konno *et al.*, 2013). Unabhängig davon konnte eine durch c-di-GMP induzierte NLRP3-vermittelte Interleukin-1 β -Produktion gezeigt werden (Abdul-Sater *et al.*, 2013). Die ursprüngliche Annahme, dass c-di-NMPs nur von Prokaryoten gebildet werden, erwies sich

seit dem Nachweis von c-di-GMP in der Amöbe *Dictyostelium discoideum* als falsch. Dort dient es als Signal für die Zelldifferenzierung (Chen & Schaap, 2012). Die Vielseitigkeit dieser c-di-NMP-Derivate wurde weiter durch die Entdeckung eines hybriden zyklischen GMP-AMP (cGAMP) betont. Während es in dem Pathogen *Vibrio cholerae* mit der Besiedelung des Darmtrakts in Verbindung gebracht werden konnte (Davies *et al.*, 2012), zeigte sich kurz darauf, dass cGAMP von Säugern selbst während der Entzündungsreaktion produziert wird. Bakterielle Fremd-DNA wird durch die Synthase cGAS erkannt, das daraufhin produzierte cGAMP aktiviert die Interferonproduktion via STING sowie den NF- κ B-Signalweg (Kato *et al.*, 2013, Kranzusch *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2013).

Abschließend kann gesagt werden, dass die Nutzung von Nukleotidderivaten als „second messenger“ in allen Domänen des Lebens wahrscheinlich deutlich vielseitiger und komplexer ist als bisher angenommen. Lange Zeit wurde cGMP als ein eukaryotischer Botenstoff angesehen – nun sprechen die Nachweise in Prokaryoten eine andere Sprache. Waren c-di-NMPs hingegen bis vor kurzem nur in Prokaryoten bekannt, muss diese Zuordnung c-di-GMP und cGAMP betreffend jetzt auch auf Eukaryoten erweitert werden. Dadurch wird das enorme Potential dieser Signalmoleküle deutlich, was sie zu vielversprechenden Forschungsobjekten macht.

1.2.2 Zyklisches di-Adenosinmonophosphat (c-di-AMP)

Die Erforschung des Signalmoleküls c-di-AMP ist noch sehr jung. Seine Entdeckung geschah rein zufällig bei der Untersuchung des DNA integrity scanning protein A (DisA) aus *B. subtilis*. DisA bindet mit seiner RuvA-ähnlichen HhH-Domäne an DNA und überprüft das Chromosom auf Schäden wie Doppelstrangbrüche und „Holliday junctions“ (Bejerano-Sagie *et al.*, 2006). Mit dem Ziel diesen Mechanismus zu untersuchen, wurde DisA aus *Thermotoga maritima* kristallisiert – in der Kristallstruktur des Proteins war ein Ligand vorhanden, der als c-di-AMP identifiziert werden konnte. DisA wurde daraufhin als Diadenylatzyklase (DAC) bestätigt. Die DAC-Aktivität war durch lineare DNA nicht beeinflusst, durch „Holliday junctions“ jedoch drastisch reduziert (Witte *et al.*, 2008). Dies legt nahe, dass die Signalweitergabe für die DNA-Integrität über c-di-AMP verläuft. Der erste Bericht über c-di-AMP-Produktion in *B. subtilis* Zellen brachte die Aktivität von DisA in Verbindung mit der Sporulation. Wenn die DisA-Aktivität durch DNA-Schäden inhibiert ist, führt der resultierende reduzierte c-di-AMP-

Spiegel zu einer Verzögerung der Sporulation (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011). Kürzlich wurde gezeigt, dass DisA oxidative DNA-Schäden erkennt und die DisA-Aktivität bei der Auskeimung und dem „Outgrow“ von *B. subtilis* Sporen benötigt wird (Campos *et al.*, 2014). Demnach ist die DisA-vermittelte DNA-Integritätskontrolle nicht nur in der Sporulationsphase, sondern wahrscheinlich zu jedem Zeitpunkt des Wachstums von *B. subtilis* wichtig ist.

Bildung von c-di-AMP

DACs katalysieren die Kondensation zweier ATP-Moleküle über 3'-5'-Phosphodiester zum c-di-AMP (Abbildung 1.1) unter Abspaltung von Pyrophosphat. Eine globuläre Domäne in DisA vermittelt die Diadenylatzyklaseaktivität und wird demnach als DAC-Domäne bezeichnet (vorher DUF147, domain of unknown function 147). Für die katalytische Aktivität sind ein DGA- und RHR-Motiv wichtig. Jedoch ist kein GGDEF-Motiv vorhanden wie es bei den DGCs der Fall ist. Trotz der Ähnlichkeit ihrer Produkte c-di-AMP und c-di-GMP scheinen die beiden Enzymklassen evolutionär unterschiedlich entstanden zu sein (Witte *et al.*, 2008, Bai *et al.*, 2012).

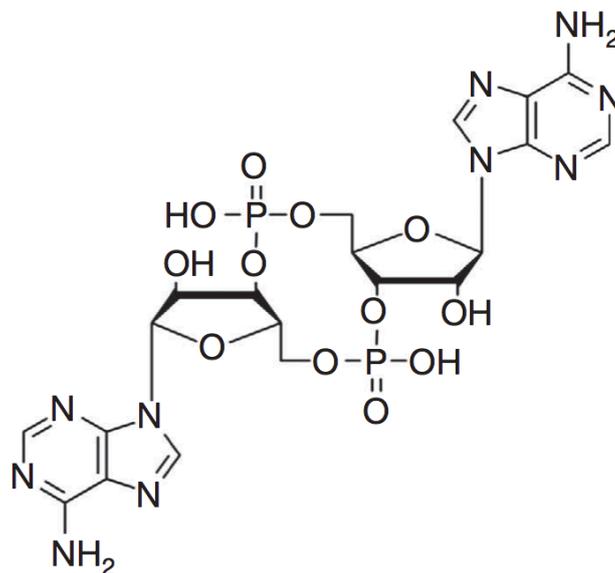


Abbildung 1.1: zyklisches di-Adenosinmonophosphat. c-di-AMP ist aus zwei Molekülen AMP über 3'-5'-Phosphodiester kondensiert.

Die DAC-Domäne ist laut der Pfam-Datenbank in 1.887 Proteinen verschiedener Spezies enthalten, was nahelegt, dass c-di-AMP ein weit verbreiteter „second messenger“ ist. Interessanterweise verfügen fast nur Gram-positive Organismen, davon über 50%

Firmicutes, sowie einige δ -Proteobakterien und Archaeen über die DAC-Domäne (Corrigan & Gründling, 2013). Barker *et al.* berichteten kürzlich über den ersten Nachweis von c-di-AMP in dem Gram-negativen Pathogen *Chlamydia trachomatis* (Barker *et al.*, 2013). *B. subtilis* verfügt neben DisA noch über zwei weitere DAC-tragende Proteine – YbbP und YojJ – weshalb ihnen schon früh eine DAC-Aktivität zugeschrieben wurde (Römling, 2008). Experimentell wurde das jedoch nicht überprüft.

B. subtilis und *Mycobacterium smegmatis* koexprimieren die benachbarten Gene *radA* und *disA*. Es konnte gezeigt werden, dass die resultierenden Proteine interagieren und die DAC-Aktivität von DisA aufgrund dieser Interaktion mit RadA inhibiert wird. Deletionsanalysen in *M. smegmatis* brachten DisA mit einer gesteigerten Zellgröße, Zellaggregation und Motilitätsverlust in Zusammenhang. Da DisA die einzige DAC in *M. smegmatis* ist, wird angenommen, dass eine Änderung der c-di-AMP-Konzentration für diese Phänotypen verantwortlich ist (Zhang & He, 2013).

In *B. subtilis* ist YbbP zusammen mit dem unbekanntem Protein YbbR sowie den essentiellen Proteinen GlmM und GlmS vermutlich in einem Operon kodiert und konstitutiv exprimiert (Nicolas *et al.*, 2012). GlmM und GlmS sind an der Peptidoglycansynthese beteiligt und somit für die Zellwandbildung erforderlich (Jolly *et al.*, 1999, Klein & Ferré-D'Amaré, 2006). Die genetische Organisation insbesondere der Gene *ybbP*, *ybbR* und *glmM* ist unter *Firmicutes* stark konserviert und könnte somit auf einen funktionellen Zusammenhang der Proteine hinweisen. Ein interessanter Zusammenhang ergibt sich auch im Hinblick auf das unbekanntem Protein YbbR. Es enthält vier „Repeats“ einer YbbR-Domäne die, wie die DAC-Domäne, unter Bakterien konserviert ist. Die Strukturen von YbbR-Domänen aus *Desulfitobacterium hafniense* zeigen Ähnlichkeiten zu den C-terminalen Domänen der RNA-bindenden ribosomalen Proteine TL5 und L25 aus *Thermus thermophilus* und *Deinococcus radiodurans* (Barb *et al.*, 2011). Kürzlich wurde auf bioinformatischer Grundlage spekuliert, dass YbbR membranverankert sein könnte und die YbbR-Domänen auf der Zellaußenseite lokalisiert. Daraus entstand die Hypothese, die extrazellulären YbbR-Domänen könnten mittels RNA-Bindung Empfänger eines noch unbekanntem Signals sein (Corrigan & Gründling, 2013).

Das dritte DAC-tragende Protein YojJ besteht aus zwei langen N-terminalen α -Helices und der DAC-Domäne. Globalen Transkriptionsstudien zufolge wird es unter Kontrolle des Sporulations-spezifischen Sigmafaktors σ^G exprimiert sowie unter Kontrolle von σ^B unter einigen Stressbedingungen (Nicolas *et al.*, 2012). Demnach ist eine Rolle in der Sporulation zu vermuten.

Zusammenfassend verfügt *B. subtilis* über drei (putative) Diadenylatzyklen, die in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt sind. DisA und YbbP werden in vegetativen Zellen konstitutiv und YojJ während der Sporulation exprimiert. YbbP scheint membranständig zu sein, die anderen beiden Proteine cytosolisch.

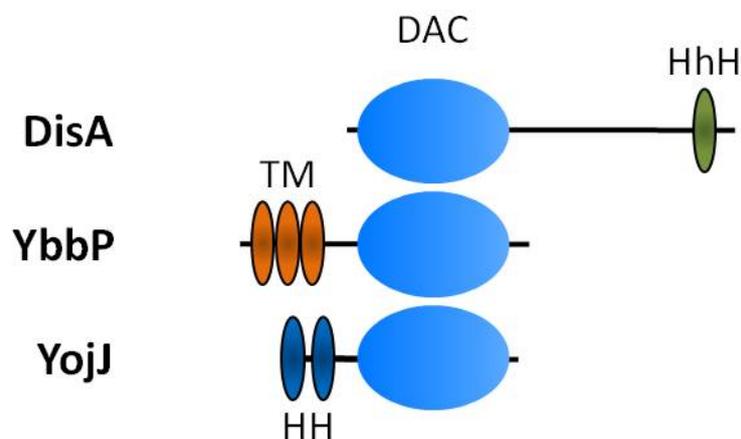


Abbildung 1.2: Die (putativen) Diadenylatzyklen DisA, YbbP und YojJ von *B. subtilis* in schematischer Darstellung. Die Proteinarchitektur ist durch die gemeinsame, konservierte DAC-Domäne (DAC) charakterisiert. DAC-Aktivität wurde bisher nur für DisA nachgewiesen. DisA bindet über die HhH-Domäne (HhH) an das Chromosom. Für YbbP werden drei Transmembrandomänen (TM) vorhergesagt. YojJ trägt zwei N-terminale α -Helices (HH).

Bezogen auf die in der Pfam-Datenbank annotierten 1.887 DAC-tragenden Proteine gibt es drei dominierend vertretene Proteinfamilien: YbbP-artig (69,1%), DisA-artig (24,1%) und YojJ-artig (5,5%). Zusammen machen sie 98,7% der DAC-tragenden Proteine aus (Corrigan & Gründling, 2013). Diese Familien sind in *B. subtilis* alle vertreten, was dieses Bakterium zu einer besonderen Ausnahme macht. Die meisten anderen Organismen verfügen nur über eine einzige DAC.

Abbau von c-di-AMP

Ähnlich wie beim c-di-GMP katalysieren Phosphodiesterasen (PDEs) den Abbau von c-di-AMP zum linearen Intermediat 5'-pApA, welches daraufhin in zwei AMP-Moleküle gespalten

wird. In *B. subtilis* und *S. aureus* ist das GGDEF domain protein containing PDE (GdpP) für diesen Abbau verantwortlich (Rao *et al.*, 2010, Corrigan *et al.*, 2011, Luo & Helmann, 2012). Der schematische Aufbau von GdpP ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Für die PDE-Aktivität ist eine DHH-DHHA1-Region am C-Terminus verantwortlich. Der „stringent response“-Regulator ppGpp wurde als kompetitiver Inhibitor der DHH-DHHA1-Domäne identifiziert. Ein sonst zur c-di-GMP-Synthese benötigtes Element ist die in GdpP enthaltene GGDEF-Domäne. Diese ist jedoch hoch modifiziert und zeigt weder DGC- noch DAC-Aktivität. Stattdessen wurde gezeigt, dass sie langsam ATP zu ADP hydrolysiert (Rao *et al.*, 2010). Die physiologische Relevanz dieser Aktivität ist noch nicht klar. Es gibt Beispiele von c-di-GMP abbauenden PDEs, die sowohl eine GGDEF- als auch eine PDE-Domäne enthalten. In diesem Fall führt die Bindung von GTP nicht zur c-di-GMP-Synthese, sondern zur Aktivierung der PDE-Domäne, wie bei dem Enzym PdeA aus *Caulobacter crescentus* (Christen *et al.*, 2005). Zudem führte die Mutation von konservierten Aminosäuren in der GGDEF-Domäne des homologen GdpP aus *Staphylococcus aureus* zu deutlich reduzierter PDE-Aktivität (Corrigan *et al.*, 2011). Dies legt eine regulatorische Funktion der GGDEF-Domäne nahe. Ein weiteres interessantes Element in GdpP ist die PAS-Domäne. Es wurde beschrieben, dass diese Domäne Häm bindet. Aufgrund der Bindung wurde die PDE-Aktivität reduziert – NO-gebundenes Häm hingegen steigerte die PDE-Aktivität (Rao *et al.*, 2011). Außerdem wurde in der Kristallstruktur der PAS-Domäne aus *Geobacillus thermodenitrificans* eine kleine hydrophobe Bindungstasche identifiziert. Experimente in der Anwesenheit von Häm oder Zink-Protoporphyrin lassen vermuten, dass diese als Liganden wahrscheinlich sind. Jedoch konnte ein Ligand nicht eindeutig bestimmt werden. Die Autoren können nicht sicher ausschließen, dass *in vivo* ein anderes kleines Molekül mit höherer Affinität an diese Bindungstasche bindet (Tan *et al.*, 2013).

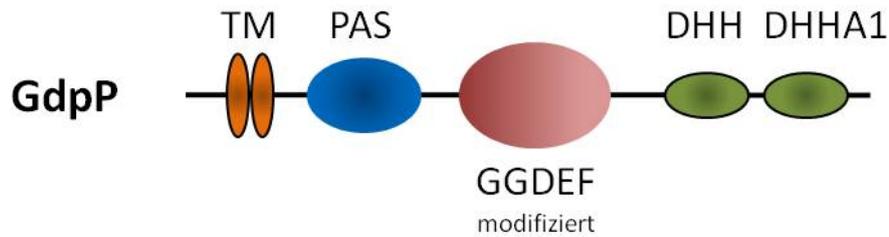


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der Phosphodiesterase GdpP. Zwei Transmembrandomänen (TM) verankern das Protein wahrscheinlich in der Membran. Die PAS-Domäne (PAS) bindet Häm, was einen Effekt auf die PDE-Aktivität hat. Eine modifizierte GGDEF-Domäne (GGDEF) hydrolysiert ATP, zeigt aber keine DAC- oder DGC-Aktivität. Die eigentliche PDE-Aktivität zum Abbau von c-di-AMP wird durch die DHH-DHHA1-Domäne vermittelt (Rao *et al.*, 2010, Rao *et al.*, 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aktivität der Phosphodiesterase GdpP durch den „stringent response“-Regulator ppGpp inhibiert wird und, dass das Enzym möglicherweise als Häm- und/oder NO-Sensor fungiert. Der c-di-AMP-Metabolismus scheint demnach durch verschiedene Signale beeinflusst zu werden. Bezüglich der Domänenorganisation GdpP-ähnliche Proteine finden sich nur in *Firmicutes*. In anderen Bakterien und Archaeen existieren nur DHH-DHHA1-Domänen alleine oder in Verbindung mit unbekanntem Domänen (Corrigan & Gründling, 2013).

c-di-AMP Homöostase

Die Präsenz von c-di-AMP-synthetisierenden und -abbauenden Enzymen suggeriert, dass die Homöostase des Dinukleotids entscheidend für seine Funktion in den noch weitgehend unbekanntem Signalwegen ist. Die DAC-Gene einiger Organismen wurden bereits als essentiell klassifiziert. Die Gene wurden durch „screening“-Studien in *Mycoplasma spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, und *Staphylococcus aureus* identifiziert – alles Organismen die nur ein einziges DAC-Gen besitzen (Glass *et al.*, 2006, French *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2005, Chaudhuri *et al.*, 2009). Konsistenterweise war die Deletion der einzigen Diadenylatzyklase YbbP in *Listeria monocytogenes* nicht möglich (Woodward *et al.*, 2010). Dies lässt eine essentielle Rolle für c-di-AMP vermuten. Dass tatsächlich die Anwesenheit von c-di-AMP für das Zellwachstum zwingend notwendig ist, wurde zum ersten Mal in *B. subtilis* gezeigt. Dies wurde zeitgleich mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen beschrieben (Luo & Helmann, 2012, Mehne *et al.*, 2013). Damit ist c-di-AMP das bisher einzige bekannte essentielle Signalmolekül.

Auch wenn konkrete Mechanismen noch aufgeklärt werden müssen, folgt die Signaltransduktion von c-di-AMP den Prinzipien anderer „second messenger“. Bildung und Erhalt des Moleküls durch synthetisierende oder abbauende Enzyme können dazu benutzt werden, noch unbekannte Stimuli weiterzugeben. Wahrscheinlich resultiert dies in der Änderung des zellulären c-di-AMP-Spiegels. Daher nimmt man an, dass c-di-AMP bei hohen Konzentrationen an bestimmte spezifische Rezeptorproteine oder andere regulatorische Elemente, wie z.B. RNAs, bindet um allosterisch ihre Funktion zu beeinflussen und damit weitere Effektoren zu regulieren (Corrigan & Gründling, 2013). Die, die Konzentration bestimmende, c-di-AMP-Homöostase scheint damit ein entscheidender Faktor in der Signalweiterleitung zu sein. Prinzipiell sind dabei zwei unterschiedliche Wirkungsweisen vorstellbar: (I) Die zelluläre Gesamtkonzentration bewirkt einen globalen Effekt auf alle Effektoren oder (II) subzelluläre Konzentrationen wirken lokal auf bestimmte Effektoren.

c-di-AMP-Rezeptoren

Als erstes c-di-AMP bindendes Protein wurde der „cyclic di-AMP receptor regulator“ DarR (Ms5346) aus *Mycobacterium smegmatis* identifiziert. DarR ist ein Transkriptionsfaktor der TetR-Familie und reprimiert seine eigene Expression wie auch die Gene Ms5347 (unbekannter Transporter), Ms5348 (Fettsäuresynthese) und Ms5696 (cold shock protein CspA) (Zhang et al., 2013).

In einer weiteren Studie wurden aus *S. aureus* die Proteine KtrA, CpaA, KdpD und PstA als c-di-AMP Rezeptoren identifiziert (Corrigan et al., 2013). Zusammen mit dem membranständigen KtrB (Ionenkanal) bildet KtrA (cytosolische Komponente) den Komplex KtrAB – einen weit verbreiteten Kaliumtransporter, der auch in *B. subtilis* vorhanden ist (Holtmann et al., 2003). KtrA besitzt eine RCK_N- und eine RCK_C-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass energiereiche Nukleotide an die RCK_N-Domäne binden, um so die Energie für den Transport der Kaliumionen bereitzustellen (Vieira-Pires et al., 2013). c-di-AMP bindet jedoch nicht an RCK_N sondern spezifisch an die RCK_C-Domäne. Dies wurde sowohl für das *S. aureus*- als auch für das *B. subtilis*-Protein nachgewiesen. KtrA ist für das Wachstum von *S. aureus* bei subphysiologischen Kaliumkonzentrationen notwendig. Ob die Bindung von c-di-AMP tatsächlich die Aktivität von KtrA beeinflusst, wurde noch nicht bewiesen (Corrigan et al., 2013). Das Protein CpaA trägt ebenfalls eine RCK_C-Domäne, die

c-di-AMP bindet. CpaA ist wahrscheinlich ein Kationen/Protonen-Antiporter zur Aufnahme von Natrium oder Kalium im Austausch mit einem intrazellulären Proton (Corrigan *et al.*, 2013). Die in Bakterien und Archaeen weit verbreitete RCK_C-Domäne könnte daher in vielen Organismen an c-di-AMP-regulierten Transportfunktionen beteiligt sein. Auch der c-di-AMP-Rezeptor KdpD ist in die Kaliumaufnahme involviert, hat aber keine mechanistischen oder strukturellen Ähnlichkeiten zu KtrA oder CpaA. Als Histidin-Kinase fungiert KdpD zusammen mit KdpE in einem Zweikomponentensystem, das in vielen Bakterien vorkommt. Dieses System induziert bei niedrigen Kaliumkonzentrationen das Aufnahmesystem KdpABCF (Epstein, 2003). In einigen Pathogenen, darunter *S. aureus*, wurde das KdpDE-Zweikomponentensystem zusätzlich mit der Regulation von Virulenzfaktoren in Verbindung gebracht (Xue *et al.*, 2011, Freeman *et al.*, 2013). Die Rolle von PstA ist noch nicht bekannt und somit kann nur spekuliert werden, welche möglichen Konsequenzen der Ligand c-di-AMP in diesem Kontext bewirken könnte. PstA hat strukturelle Gemeinsamkeiten mit PII-artigen Stickstoffregulatoren (Corrigan *et al.*, 2013). PII-Proteine sind in wichtige Signaltransduktionssysteme involviert. Sie sind Mediatoren der Stickstoff- und Kohlenstoffversorgung, indem sie zelluläre Glutamin- und α -Ketoglutarat-Konzentrationen vermitteln (Ninfa & Atkinson, 2000). Experimentell konnte noch keine Verbindung zwischen PstA und einer möglichen Stickstoffregulation gezeigt werden. Die bisher bekannten, durch Rezeptorproteine vermittelten, c-di-AMP-Signalwege sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

In *Streptococcus pneumoniae* wurde kürzlich ein weiterer c-di-AMP-Rezeptor identifiziert: CabP. Dieser interagiert mit dem Kaliumtransporter SPD_0076. Bei erhöhten c-di-AMP-Konzentrationen waren sowohl die CabP-SPD_0076-Interaktion als auch die Effizienz der Kaliumaufnahme beeinträchtigt (Bai *et al.*, 2014).

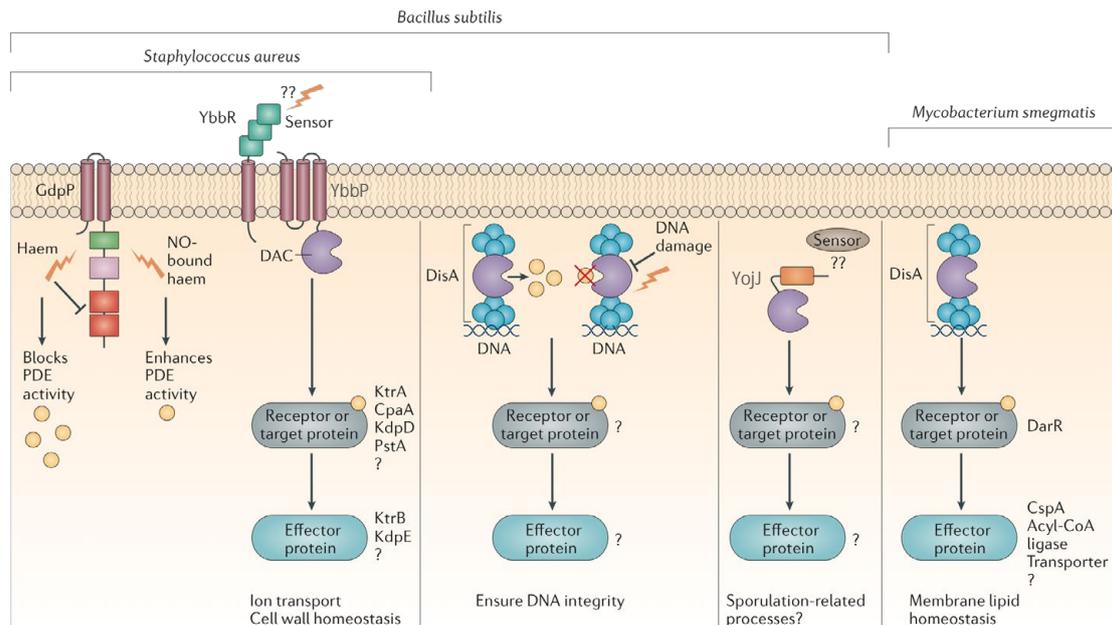


Abbildung 1.4: Übersicht der proteinvermittelten c-di-AMP-Signalwege nach Corrigan & Gründling (2013). Bildung und Abbau von c-di-AMP (gelber Kreis) sowie die Effekte auf Rezeptorproteine sind schematisch nach dem derzeitigen Kenntnisstand für die Organismen *B. subtilis*, *S. aureus* und *M. smegmatis* dargestellt. Die Bindung von c-di-AMP an KtrA, CpaA, KdpD und PstA wurde mit Proteinen aus *S. aureus* nachgewiesen. Für KtrA wurde dies auch mit dem *B. subtilis*-Protein gezeigt (Corrigan *et al.*, 2013).

Neben Rezeptorproteinen, die c-di-AMP binden, wurde kürzlich auch eine ganz neue Klasse an c-di-AMP-vermittelten Regulationsmechanismen entdeckt: Der *ydaO*-Riboswitch bindet c-di-AMP in pikomolaren Konzentrationen (Nelson *et al.*, 2013). Riboswitche sind ligandenbindende Elemente in mRNAs. Aufgrund einer mit der Bindung einhergehenden spezifischen Sekundärstruktur wird die weitere Expression der mRNA beeinflusst und damit reguliert (Mandal *et al.*, 2003). Waren c-di-GMP-bindende Riboswitche bekannt (Sudarsan *et al.*, 2008), ist diese Art der Signaltransduktion für c-di-AMP völlig neu und zeigt eine weitere Ebene der Regulation dieses Signalmoleküls auf. Der *ydaO*-Riboswitch reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen in Actinobakterien, Clostridien, Cyanobakterien und Bazillen. In Bazillen finden sich Aminosäure-, Anionen- und Natrium-/Kaliumtransporter sowie Gene aus dem Zellwandmetabolismus, deren Expression aufgrund der Bindung von c-di-AMP an das *ydaO*-Aptamer inhibiert wird. In *S. aureus* werden die Gene *ktrA* und *kdpD* (s. oben) durch den *ydaO*-Riboswitch reguliert. Dies ist ebenso für *ktrA* in *B. subtilis* der Fall (Nelson *et al.*, 2013). Ihre Funktionen stehen somit unter doppelter Kontrolle von zwei verschiedenen c-di-AMP-vermittelten Mechanismen: Inhibierung der Expression auf mRNA-Ebene und Regulation der Aktivität auf Proteinebene. Dies unterstreicht die Relevanz von c-di-AMP als „second messenger“ in fundamentalen zellulären Prozessen. Insgesamt kommt

der *ydaO*-Riboswitch in *B. subtilis* zweimal vor, neben dem *ktrA*-Gen wird auch das *ydaO*-Gen durch ihn reguliert. Über die Funktion von *ydaO* ist noch nichts bekannt. Die Untersuchung dieses Gens könnte dazu beitragen, die Rolle von c-di-AMP in *B. subtilis* genauer zu verstehen.

1.3 Mögliche Implikationen für c-di-AMP

1.3.1 Architektur und Synthese der Zellwand

Die Zellwand von Bakterien ist ein bedeutendes Strukturmerkmal, durch das sie sich von Archaeen und Eukaryoten unterscheiden. Die Zellwand Gram-positiver Organismen setzt sich aus Peptidoglycan sowie den anionischen polymeren Wand- und Lipoteichonsäuren zusammen. Anders als lange angenommen, setzt sie sich zu etwa gleichen Mengenanteilen aus Peptidoglycan und anionischen Polymeren zusammen (Bhavsar & Brown, 2006, Swoboda *et al.*, 2010, Xia *et al.*, 2010). Die Peptidoglycanschicht, die bei Gram-positiven Organismen 5 – 10 mal dicker als bei Gram-negativen Spezies ist, ist nicht nur für die Zellmorphologie entscheidend, sondern bietet auch Schutz vor chemischen und physikalischen Einflüssen. Wichtige Enzyme der Peptidoglycansynthese sind unter allen Bakterien ubiquitär, die Zusammensetzung und Struktur der Zellwand ist stark konserviert. So nimmt man an, dass schon ein bakterieller Urahn über eine Zellwand verfügte (Errington, 2013).

Das Peptidoglycan bildet ein starres Gewebe, welches aus den alternierend β -1,4-glycosidisch verknüpften Bausteinen N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) besteht (Bhavsar & Brown, 2006). Ihre UDP-Derivate (UDP-GlcNAc und UDP-MurNAc) sind wichtige Vorläuferbausteine in der Peptidoglycansynthese. Der zweite Schritt in diesem Stoffwechselweg ist die Isomerisierung von Glucosamin-6-Phosphat (GlcN6P) zu Glucosamin-1-Phosphat (GlcN1P). Dies wird von der Phosphoglucosaminmutase (GlmM) durch einen einzigartigen Autophosphorylierungs-Mechanismus katalysiert (Jolly *et al.*, 1999, Jolly *et al.*, 2000, Barreteau *et al.*, 2008, Schmidl *et al.*, 2010). Das GlmM-Substrat GlcN6P kann auf zwei Wegen bereitgestellt werden: (I) Aus dem glycolytischen Intermediat Fructose-6-Phosphat (Fru6P) durch das Enzym GlmS (Bates & Pasternak, 1965) und (II) aus dem Murein-regenerierenden Stoffwechselweg durch das

Enzym NagA (Bates & Pasternak, 1965, White & Pasternak, 1967). Abbildung 1.5 zeigt eine Übersicht dieses Stoffwechselweges. Die Aktivität von GlmM ist für die Peptidoglycansynthese unerlässlich – die von GlmS hingegen nicht erforderlich, so lange GlcN6P durch NagA generiert wird. In *B. subtilis* wird die Expression von GlmS daher durch das GlcN6P-bindende *glmS*-Ribozym kontrolliert (Winkler *et al.*, 2004, Klein & Ferré-D'Amaré, 2006, Collins *et al.*, 2007).

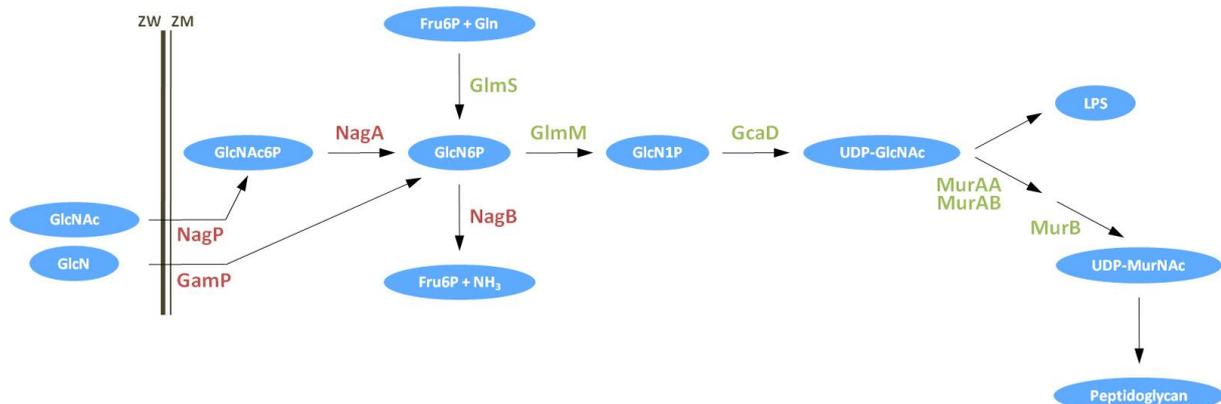


Abbildung 1.5: Cytoplasmatische Reaktionen der Peptidoglycansynthese (angepasst nach Barreteau *et al.*, 2008). Stoffwechselintermediate sind in blauen Ellipsen dargestellt. Katabole Enzyme sind rot, anabole Enzyme grün gekennzeichnet. Die Bausteine des Peptidoglycans – GlcNAc und MurNAc – werden unter Verwertung von Aminozuckern im Cytoplasma synthetisiert. GlcNAc und GlcN werden über die spezifischen PTS-Systeme NagP und GamP aufgenommen (Reizer *et al.*, 1999) und durch NagA zu GlcN6P umgesetzt. Dieses kann auch durch GlmS aus dem glycolytischen Intermediat Fru6P unter Verwendung von Glutamin generiert werden. GlcN6P kann durch NagB entweder als Energie- und Stickstoffquelle genutzt werden, indem es zu Fru6P und NH₃ zersetzt wird, oder durch GlmM, GcaD, MurAA/MurAB, MurB zur Synthese von UDP-MurNAc.

In *B. subtilis* fand man heraus, dass die Überexpression der PDE GdpP in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber β -Lactam-Antibiotika, also Inhibitoren der Zellwandsynthese, resultierte. Es wurde vermutet, dass die damit einhergehende verringerte c-di-AMP-Konzentration für diesen Effekt verantwortlich war und c-di-AMP für die Zellwand-Homöostase wichtig ist (Luo & Helmann, 2012). Die oben erwähnte Organisation des putativen *ybbP-ybbR-glmM-glmS*-Operons sowie seine Konservierung im Phylum *Firmicutes* lässt eine Verbindung des c-di-AMP- mit dem Peptidoglycan-Stoffwechsel vermuten.

1.3.2 Regulation der Zelllänge

Wie auch Eukaryoten, regulieren Bakterien ihre Größe durch Koordination der Zellteilung mit dem Zellwachstum. Schnell wachsende, stäbchenförmige Bakterien wie *E. coli* oder *B. subtilis* weisen bei guter Nährstoffversorgung eine Zunahme der Zelllänge auf (Donachie & Begg, 1989, Sargent, 1975). Man nimmt an, dass die Zellen bei gutem Wachstum zusätzlichen Platz

für mehr Ribosomen und andere Makromoleküle benötigen (Shiomi & Margolin, 2007). Der bestimmende Faktor für das Wachstum und damit auch für die Zelllänge ist die Nährstoffversorgung (Cooper, 1969, Schaechter *et al.*, 1958, Sargent, 1975, Donachie & Begg, 1989). Es geht darum sicherzustellen, dass Tochterzellen die, den vorliegenden Nährstoffbedingungen entsprechend, korrekte Länge haben. Eine zu früh oder zu spät eingeleitete Zellteilung würde sich daher negativ auswirken (Chien *et al.*, 2012). Doch wie registrieren Bakterien das Erreichen der korrekten Länge?

In zwei Studien wurde die Glycosyltransferase UgtP aus *B. subtilis* als ein metabolischer Sensor identifiziert und der Mechanismus aufgeklärt, der zur Koordination von Zelllänge und Nährstoffversorgung führt. UgtP synthetisiert die Bildung von di-Glucose-Diacylglycerol, welches als Membrananker für Lipoteichonsäuren fungiert. Es wurde herausgefunden, dass UgtP über eine zusätzliche Fähigkeit verfügt. Unter nährstoffreichen Bedingungen inhibiert UgtP das Tubulin-artige Zellteilungsprotein FtsZ, wodurch die Zellteilung später eintritt und dementsprechend längere Zellen entstehen. Unter nährstoffarmen Bedingungen hingegen wird FtsZ nicht durch UgtP inhibiert, so dass die früher einsetzende Zellteilung zu kürzeren Zellen führt. Die regulierende Determinante für diesen Mechanismus ist die Konzentration des Stoffwechselintermediats UDP-Glucose (UDP-Glc), des Substrates von UgtP. Hohe UDP-Glc-Konzentrationen (nährstoffreiche Bedingungen) stabilisieren allosterisch die Interaktion UgtP-FtsZ, was die Bildung eines Zellteilungsringes durch FtsZ-Akkumulation verlangsamt. Niedrige UDP-Glc-Konzentrationen (nährstoffarme Bedingungen) führen zur Bildung eines UgtP-UgtP-Dimers. Dadurch wird FtsZ nicht inhibiert, so dass eine schnellere Ausbildung des Zellteilungsringes zur früheren Zellteilung führt (Weart *et al.*, 2007, Chien *et al.*, 2012).

In *E. coli* wurde ein ähnlicher Mechanismus identifiziert. Die Glycosyltransferase OpgH synthetisiert sogenannte osmoregulierte periplasmatische Glucane, die aus mehreren Glucoseeinheiten bestehen. Auch für OpgH wurde eine zusätzliche Funktion gefunden: OpgH ist das funktionelle Analog zum *B. subtilis* UgtP. Bei hohen UDP-Glc-Konzentrationen interagiert OpgH ebenfalls mit FtsZ, wodurch längere Zellen resultieren. Beide, UgtP und OpgH, nutzen UDP-Glc als ihr natürliches Substrat, zeigen jedoch keine Homologie und besitzen unterschiedliche enzymatische Aktivitäten. Auch die Interaktion mit FtsZ unterliegt verschiedenen molekularen Grundlagen (Hill *et al.*, 2013). In diesem Beispiel konvergenter Evolution zeigt sich, wie zwei unterschiedliche Enzyme auf verschiedene Art und Weise

einen in der Sache gleichartigen Mechanismus vermitteln: Die Inaktivierung von FtsZ in Abhängigkeit von der UDP-Glc-Konzentration und dadurch Koordination der Zelllänge mit der Nährstoffversorgung. Die Verwendung von Enzymen, die neben ihrer eigentlichen enzymatischen Funktion eine weitere „moonlighting“-Aktivität ausüben, scheint für Bakterien eine effektive Methode zu sein, die Information der Nährstoffversorgung zu verarbeiten.

Der elegante Mechanismus von UgtP und OpgH nutzt als bestimmendes Signal die Versorgung der Zelle mit einer geeigneten C-Quelle. Für das Zellwachstum ist aber auch die Stickstoffassimilation zwingend notwendig. Es wäre also sinnvoll, auch die Versorgung mit geeigneten N-Quellen als Determinante in die Regulation der Zelllänge einzubeziehen. Ein geeignetes stickstoffabhängiges Signal könnten die Aminosucker-Intermediate der Peptidoglycansynthese liefern (s. Abbildung 1.5). Die Enzyme dieses Stoffwechselweges könnten demnach, neben ihrer eigentlichen katalytischen Funktion, zusätzlich an einer stickstoffabhängigen Regulation der Zelllänge beteiligt sein. Dieser Zusammenhang ist ein weiterer Ansatzpunkt die Konservierung und weite Verbreitung des putativen *ybbP-ybbR-glmM-glmS*-Operons sowie seine Konservierung im Phylum *Firmicutes* zu erklären. Als zentrales und wichtiges Enzym der Peptidoglycansynthese könnte GlmM in c-di-AMP-abhängiger Weise die Stickstoffversorgung der Zelle vermitteln.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Thema dieser Arbeit war die Rolle von c-di-AMP in *Bacillus subtilis*. Zu Beginn existierten Berichte über die Funktionsweise von DisA und einer damit vermittelten Funktion in der Kontrolle der DNA-Integrität sowie *in vivo* Charakterisierungen der Phosphodiesterase GdpP. In der darauffolgenden Zeit gewann die Erforschung von c-di-AMP enormen, stetig steigenden Zuspruch.

Die Tatsache, dass *B. subtilis* mit YbbP und YojJ über zwei weitere DACs verfügt suggerierte, dass es sich bei c-di-AMP um einen wichtigen „second messenger“ mit verschiedenen Funktionen handelt. So stand die Untersuchung der Funktionsweise von YbbP und YojJ im Vordergrund. Neben der Analyse der Expression der DACs sollten vor allem Mechanismen zur Regulation der DAC-Aktivität auf Proteinebene aufgeklärt werden. Durch diese

Erkenntnisse sollten weitere Einblicke in die biologische Relevanz von c-di-AMP gewonnen und vertiefend untersucht werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass es sich bei den Proteinen YbbP und YojJ um Diadenylatzyklasen handelt. Außerdem, dass YbbR einen Aktivator von YbbP ist. Daraufhin wurden für die Proteine YbbP, YbbR und YojJ die neuen Bezeichnungen CdaA (cyclic di-AMP synthase A), CdaR (cyclic di-AMP synthase A regulator) und CdaS (cyclic di-AMP synthase S, Sporulation-spezifisch) eingeführt, die von hier an weiterverwendet werden. Die Aufeinanderfolge der Gene *cdaA*, *cdaR* und *glmM* wird im Folgenden auch als *cda-glm*-Modul bezeichnet.

Ein weiteres Ziel war die methodische Etablierung der *in vivo* Messung der c-di-AMP-Konzentration in *B. subtilis*. Mit ihr sollte vor allem ermöglicht werden die Homöostase des Dinukleotids genauer zu verstehen.

2 Material und Methoden

Materialien

Chemikalien, Hilfsmittel, Geräte, Apparaturen, kommerziell erhältliche Systeme sowie Proteine, Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die Bakterienstämme und Plasmide sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

2.2 Medien

Puffer, Lösungen und Medien wurden mit ddH₂O angesetzt und 20 min im Tischautoklav bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und steril filtriert. Alle Angaben beziehen sich auf Wasser, andere Lösungsmittel sind angegeben. Den Grundmedien wurden zur Verfestigung bei Herstellung von Plattenmedien 15 g/l Agar zugesetzt (Hübner, 2008).

Bakterienmedien und fakultative Zusätze:

LB-Medium (1 l)	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
5 x C-Salze (1 l)	20 g	KH ₂ PO ₄
	80 g	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O
	16,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
III'-Salze (1 l)	0,232 g	MnSO ₄ x 4 H ₂ O
	12,3 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 x CSE-Medium	100 ml	1 x C-Salze
	1 ml	Tryptophan (5 mg/ml)
	1 ml	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg/ml)
	1 ml	III'-Salze
	2 ml	Kaliumglutamat (40%)
	2 ml	Natriumsuccinat (30%)
Stärkeplatten	7,5 g	Nutrient-Broth
	5 g	Stärke

SP-Medium (1 l)	8 g	Nutrient Broth
	0,25 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1 g	KCl
		ad. 1000 ml ddH ₂ O
		anschließende Zugabe von:
	1 ml	CaCl ₂ (0,5 M)
	1 ml	MnCl ₂ (10 mM)
	2 ml	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg/ml)
5 x Spizizen-Salze (0,5 l)	35 g	K ₂ HPO ₄
	15 g	KH ₂ PO ₄
	2,5 g	Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O
	0,5 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
100 x Spurenelemente (0,1 l)	55 mg	CaCl ₂
	10 mg	MgCl ₂ x 4H ₂ O
	17 mg	ZnCl ₂
	4,3 mg	CuCl ₂ x 6H ₂ O
	6 mg	CoCl ₂ x 6H ₂ O
	6 mg	NaMoO ₄ x 2H ₂ O
100 x Eisencitrat-Lösung (sterilfiltriert)	13,5 mg	FeCl ₃ x 6H ₂ O
	100 mg	Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O
SM-Medium (1 l) *	200 ml	5x Spizizen-Salze
	10 ml	100x Spurenelemente
	10 ml	Glucose (50%)
	10 ml	100x Eisencitrat-Lösung
	10 ml	Tryptophan (5 mg/ml)
MNGE-Medium (10 ml)	9,2 ml	1x MN-Medium
	1 ml	Glucose (20%)
	50 µl	Kaliumglutamat (40%)
	50 µl	Ammoniumeisencitrat (2,2 mg/ml)
	100 µl	Tryptophan (5 mg/ml)
	30 µl	MgSO ₄ (1 M)
	+/- 100 µl	CAA (10%)
10x MN-Medium (1 l)	136 g	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O
	60 g	KH ₂ PO ₄
	10 g	Natriumcitrat x 2 H ₂ O
X-Gal		Stammlösung: 80 mg/ml X-Gal in DMF
		Endkonzentration von 80 µg/ml in Medien

* angepasst nach Anagnostopoulos & Spizizen, 1961

Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Ampicillin, Spectinomycin, Lincomycin und Kanamycin wurden dazu in ddH₂O gelöst, Chloramphenicol, Tetracyclin und Erythromycin in 70% Ethanol. Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca. 50°C wurden die Antibiotika zu den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben (Hübner, 2008).

Selektionskonzentration für *E. coli*:

Ampicillin	10 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Selektionskonzentration für *B. subtilis*:

Kanamycin	10 µg/ml
Chloramphenicol	5 µg/ml
Erythromycin ¹	2 µg/ml
Lincomycin ¹	25 µg/ml
Spectinomycin	150 µg/ml
Tetracyclin	12 µg/ml

¹Zur Selektion auf *ermC* wurde eine Mischung aus Erythromycin und Lincomycin in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Allgemeine Methoden

Eine Zusammenfassung der allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit angewendet wurden, ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Allgemeine Methoden.

Methoden	Referenz
Absorptionsmessung	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Ethidiumbromidfärbung von DNA	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Fällung von Nukleinsäuren	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Gelelektrophorese von DNA	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Gelelektrophorese von Proteinen (denaturierend)	(Laemmli, 1970)
Ligation von DNA-Fragmenten	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Proteinmengenbestimmung	(Bradford, 1976)
Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	(Sanger <i>et al.</i> , 1977)

2.3.1.1 Anzucht von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und 200 rpm in Reagenzgläsern oder Schikanekolben angezogen. Für die Anzucht von *B. subtilis* wurde LB-Medium, CSE-Medium, SP-Medium, Spizizen-Minimal (SM) -Medium oder MNGE-Medium verwendet. Die Zellen wuchsen bei 37°C in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Beim pft wurde von frischen Vereinzlungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt.

Zur Berechnung der Generationszeit wurde die optische Dichte der Kulturen im Bereich des logarithmischen Wachstums herangezogen. Die Generationszeit (g) wurde mit folgender Formel berechnet (Hübner, 2008):

$$g = \frac{\lg 2 \times (t_2 - t_1)}{\log K_2 - K_1}$$

g	Generationszeit [min]		
t_1	Zeitpunkt 1 [min]	t_2	Zeitpunkt 2 [min]
K_1	OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt 1	K_2	OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt 2

2.3.1.2 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation (nach Lederberg und Cohen, 1974)

Präparation kompetenter Zellen (CaCl₂)

Eine 4 ml Vorkultur wurde mit dem zu transformierenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml LB in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit der Vorkultur auf OD₆₀₀ 0.1 angeimpft. Die 10 ml LB-Kultur wurde bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 wachsen gelassen. Die Kultur wurde in ein Falconröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Von diesem Zeitpunkt an müssen die Zellen bis zum Hitzeschock permanent kalt bleiben. Die Kultur wurde in einer vorgekühlten Zentrifuge für 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurden die Bakterien vorsichtig in 5 ml vorgekühltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte. Das Pellet wurde in 1 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt (Rothe, 2012).

Präparation kompetenter Zellen (Inoue *et al.*, 1990)

Der zu transformierende Stamm wurde auf eine LB-Platte (mit Selektionsmedien) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer großen Kolonie (2-3 mm Durchmesser) wurde 20 ml LB-Medium in einem 300 ml Kolben angeimpft und für 20 h bei 28°C geschüttelt (200-250 U min⁻¹). 6 ml LB-Medium mit dem zu transformierenden Stamm wurden in 250 ml SOB-Medium (2 l Kolben) überimpft und schüttelnd (200-250 rpm) bei 18°C inkubiert. Bei OD₆₀₀ von 0,5-0,9 (nach 20-24 h) wurde der Kolben auf Eis gestellt. Die

Zellen wurden 30 min mit 2500 g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zentrifugiert und mit 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Vorsichtig wurde eine DMSO-Konzentration von 7% eingestellt. Aliquots von 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (Rothe, 2009).

Lösungen zum Arbeiten mit kompetenten *E. coli*-Zellen

TB-Puffer pH 6,7	10 mM	Pipes
	55 mM	MnCl ₂
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl

Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zu 200 µl kompetenten Zellen wurden 10-100 ng DNA gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Reaktionsgefäß 1,5 min auf 42°C erwärmt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 100 µl und der zentrifugierte Rest auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin bzw. Kanamycin) ausplattiert (Rothe, 2009).

2.3.1.3 Transformation von *B. subtilis*

Herstellung von kompetenten Zellen

In 10 ml MNGE-Medium (mit CAA) wurde mit einer Übernachtskultur eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von 1,3 wurden die Zellen mit gleicher Menge an MNGE-Medium ohne CAA verdünnt. Danach wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37°C geschüttelt. Die anschließende Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 5000 rpm und RT für 5 min. Der Überstand wurde in ein steriles Greinergefäß dekantiert. Das Pellet wurde in 1/8 des Überstandes resuspendiert und eine Glycerinkonzentration von 10% eingestellt. Aliquots von 300 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert (Hübner, 2008).

Transformation der kompetenten Zellen

Die zu 300 µl aliquotierten Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und mit folgender vorpipettierten Lösung versetzt: 1,7 ml 1 x MN, 43 µl 20% Glucose, 34 µl 1 M MgSO₄. Zu 400 µl dieser Zellsuspension wurde 0,1-1 µg DNA gegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl Expressionslösung (500 µl Hefeextrakt (5%), 250 µl CAA (10%), 250 µl ddH₂O, 50 µl Tryptophan (5 mg/ml)), zupipettiert und für weitere 60 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert (Hübner, 2008).

2.3.2 Mikroskopische Aufnahmen

2.3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Anfertigung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden 4 ml LB mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen erfolgte, wie alle darauf folgenden Schritte, möglichst ohne direkten Lichteinfall auf die Zellen. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden 200 µl der Zellen geerntet. Die anschließende Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 13.000 rpm und RT für 1 Minute. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl PBS resuspendiert. Um die Zellen auf den Objektträgern fixieren zu können, wurden diese mit 700 µl 1%iger Agarose (in H₂O angesetzt) beschichtet. 10 µl der hergestellten Zellsuspension wurden auf den vorbereiteten Objektträger pipettiert. Für die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot (Sigma-Aldrich) wurden vorher 3 µl einer Nilrotlösung (10 µg/ml in Ethanol) zupipettiert. Die Zellen wurden daraufhin unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40 FL) untersucht und fotografiert. Es wurden folgende Filter für die Untersuchung verwendet: eGFP HC-Filterset (BP: 472/30, FT 495, LP: 520/35; AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany) für die GFP-Detektion und Filterset 43 (BP: 545/25, FT570, LP: 650/70; Carl Zeiss) für die Nilrot-detektion. Zur Auswertung wurde die Software AxioVision Rel 4.7 und die Kamera AcioCam MRm verwendet (Diethmaier, 2008).

2.3.2.2 Phasenkontrastmikroskopie

Zur Anfertigung von phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen erfolgte wie oben beschrieben (2.3.2.1). Die Zellen wurden jedoch nicht zentrifugiert, sondern direkt aus der Kultur auf einem agarosebeschichteten Objektträger fixiert.

2.3.3 Arbeiten mit DNA

2.3.3.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA über modifizierte Alkali/SDS-Lyse

Die Plasmidisolierung wurde mittels alkalischer Lyse und anschließender chromatographischer Aufreinigung durchgeführt. Dabei wurden 1,5 ml üN-Kultur eingesetzt und die Isolation unter Verwendung des Nucleospin-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Hübner, 2008).

2.3.3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolation der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen). Hierzu wurden 1,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen üN-Kultur 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 180 µl Lyse-Puffer resuspendiert und bei 37°C inkubiert. Nach 50 min wurden 2 µl einer RNaseA-Lösung (50 mg/ml, Roche) zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolation der chromosomalen DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers (Hübner, 2008).

2.3.3.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung und zur präparativen Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit 1% Agarosegelen durchgeführt. Die Agarosegele hatten eine Dimension von 8,5 cm Länge, 10 cm Breite und waren 3-5 mm dick. Die Agarosegele wurden nach dem Gießen (60°C) durch Abkühlen auf RT verfestigt, die Proben mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100-150 V, bis der DNA-Farbmarker das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Danach wurden die Gele in Ethidiumbromid 5 min gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und anschließend unter UV Licht (254 nm) fotografiert. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der λ-DNA-Marker verwendet (Hübner, 2008).

2.3.3.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden im Göttinger Genomics Laboratory, von der Firma SeqLab in Göttingen oder von der Firma LGC Genomics in Berlin durchgeführt.

2.3.3.5 Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Enzymmenge und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und dem Reaktionsvolumen. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es wurden zwischen 10 und 100 ng Vektor-DNA und ein 1-5facher molarer Überschuss an Fragment eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte für mindestens 2 h bei RT oder üN bei 16°C (Hübner, 2008).

2.3.3.6 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Calf-Intestine-Alkalische-Phosphatase (CIAP) unter Einsatz des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Einem Ansatz mit einer DNA-Endkonzentration von ca. 3-10 ng/ μ l wurden 1 μ l CIAP (1000 Units/ μ l) zugesetzt. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach erneut 1 μ l CIAP zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits gereinigt. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden (Hübner, 2008).

2.3.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde stets mit chromosomaler DNA oder zirkulärer Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt.

Reaktionsansatz für die Phusion-Polymerase (100 μ l):

2 μ l Primer 1 (10 pmol)
2 μ l Primer 2 (10 pmol)
4 μ l Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
20 μ l 5 x Phusion HF Puffer
1 μ l Phusion-Polymerase (2 U/ μ l)
2 μ l dNTPs (12,5 μ mol/ml)
79 μ l ddH₂O

Reaktionsansatz für die Taq-Polymerase (100 µl):

2 µl Primer 1 (10 pmol)
 2 µl Primer 2 (10 pmol)
 4 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
 10 µl 10 x Taq-Polymerase Puffer
 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 2 µl dNTPs (12,5 µmol/ml)
 79 µl ddH₂O

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	98°C	5 min
30	Denaturierung	98°C	0,5 min
	Annealing	50-60°C	0,5 min
	Elongation	72°C	0,5-3 min
1	Endlauf	72°C	10 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.

2.3.3.8 Combined Chain Reaction (CCR)

Die *Combined Chain Reaction* ist eine Methode zur Einführung von einer oder zwei Punktmutationen (Bi und Sambrook, 1998). Die *Multiple Mutation Reaction* ist eine Weiterentwicklung der CCR um noch mehr Mutationen simultan einfügen zu können (Hames *et al.*, 2005). Da bei diesen Methoden die Einführung der Mutationen und die Amplifikation des mutagenisierten Fragments in nur einem Schritt erfolgt, entfallen dazwischenliegende Aufreinigungsschritte. Es erfolgt sowohl eine Polymerasekettenreaktion als auch eine Ligation. Zur Ligrationsreaktion werden am 5'-Ende phosphorylierte Oligonukleotide und eine thermostabile Ligase (Ampligase, Biozym) benötigt (Hübner, 2008).

Reaktionsansatz für die Accuzyme-Polymerase (50 µl):

2 µl Primer 1 (20 pmol)
 2 µl Primer 2 (20 pmol)
 4 µl Mutageneseprimer (20 pmol)
 1 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
 5 µl 10 x CCR Puffer
 2 µl Accuzyme-Polymerase (2,5 U/µl)
 1 µl dNTPs (12,5 µmol/ml)
 2 µl BSA (10 mg/ml)
 3 µl Ampligase (15 U)
 29 µl ddH₂O

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Programm der CCR für Accuzyme-Polymerase

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	96°C	5 Min
30	Denaturierung	96°C	1 Min
	Annealing	50-60°C	1 Min
	Primer Extension	72°C	1-6 Min
1	Endlauf	72°C	10 Min

2.3.3.9 Long Flanking Homology PCR (LFH-PCR)

Die Long Flanking Homology (LFH)-PCR dient der Herstellung linearer DNA-Fragmente zur Konstruktion von Deletionsmutanten oder zur Integration von Fremd-DNA ins Chromosom mittels sogenannter Allelic-Replacement-Mutagenese (Wach, 1996). Eine schematische Darstellung zur Herstellung einer Deletionsmutante ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Für die Konstruktion einzelner Mutanten wurde jeweils die Resistenzkassette für Chloramphenicol, Erythromycin oder Kanamycin vom Plasmid pGEM-cat, pDG646 oder pDG780 amplifiziert (Guérout-Fleury *et al.*, 1995). Resistenzkassetten die innerhalb eines Operons integrieren sollten, wurden mit Primern amplifiziert, die sich vor dem Terminator des Resistenzgens

anlagern. Die Expression der Gene hinter der Resistenzkassette konnte so gewährleistet werden und polare Effekte wurden vermieden.

Des Weiteren wurden zwei Primerpaare abgeleitet, mit denen die flankierenden Bereiche des Integrationsortes bzw. des zu ersetzenden DNA-Fragments amplifiziert werden konnten. Diese Fragmente mit einer Größe von ca. 1000 bp mussten so gewählt werden, dass die Expression der angrenzenden Gene nicht beeinflusst wurde. An das strangaufwärts und an das strangabwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem reverse Primer bzw. forward Primer jeweils eine 25 Basen lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zum 5´- bzw. 3´-Ende der Resistenzkassette. Die PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. In einer zweiten PCR wurden die strangaufwärts und strangabwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 25 Basen lange Sequenz miteinander verbunden und amplifiziert.

Reaktionsansatz für die LFH-PCR (50µl):

10 µl 5 x Phusion HF Puffer
0,5 µl Phusion-Polymerase (2 U/µl)
1 µl dNTPs (12,5 mM)
2 µl (150 ng) oberes Fragment
2 µl (150 ng) unteres Fragment
2 µl (100-150 ng) Resistenzkassette
24,5 µl ddH₂O

Die Primer wurden nach dem ersten PCR-Schritt dazugegeben:

4 µl Primer 1 (20 pmol)
4 µl Primer 2 (20 pmol)

Programm der LFH für Phusion-Polymerase

	Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
Schritt 1	1	Vorlauf	98°C	1 min
	10 {	Denaturierung	98°C	10 sek
		Annealing	50-60°C	30 sek
		Elongation	72°C	1 min 15 sek
	1	Pause	15°C	∞

Zugabe der Primer.

Schritt 2	21 {	Denaturierung	98°C	10 sek
		Annealing	50-60°C	30 sek
		Elongation	72°C	1 min 15 sek +5 sek/Zyklus
	1	Endlauf	72°C	10 min
	1	Pause	15°C	∞

B. subtilis wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten (20 µl) transformiert und die Zellen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR überprüft. Um sicherzustellen, dass bei den beiden LFH-PCR-Schritten keine Mutationen eingebaut wurden, wurden die bei den Kontroll-PCRs erhaltenen DNA-Fragmente sequenziert (Diethmaier, 2008).

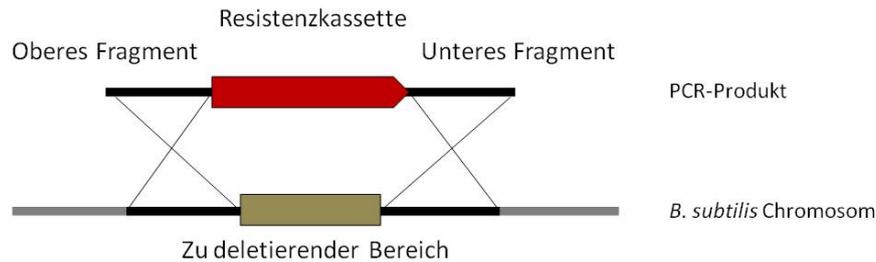


Abbildung 2.1: Konstruktion einer Deletionsmutante mit Hilfe der LFH-PCR (Rothe, 2012). Durch doppelt homologe Rekombination wird die zu deletierende Sequenz durch eine Resistenzkassette ersetzt.

2.3.3.10 Lösungen für das Arbeiten mit DNA

Agarosegel 1% für DNA-Gelelektrophorese	1% (w/v) Agarose in 1x TAE
DNA-Farbmarker 5 x für DNA-Gelelektrophorese	5 ml Glycerin (100%) 4,5 ml ddH ₂ O 200 µl TAE (50 x) 0,01 g Bromphenolblau 0,01 g Xylencyanol
TAE-Puffer 50 x für DNA-Gelelektrophorese	2 M Tris 57,1 ml Essigsäure (100%) 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Lyse-Puffer zur Isolation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	50 mg Lysozym 50 µl Tris-HCl pH 8,0 (1 M) 10 µl EDTA pH 8,0 (0,5 M) 2,5 ml Millipore-Wasser

2.3.4 Arbeiten mit RNA

2.3.4.1 Präparation und Nachweis von RNA

Die Zellen wurden in CSE-Medium mit Glucose (0,5%) angezogen. Für die RNA-Isolation wurden zunächst 25 ml Bakteriensuspension bei einer OD₆₀₀ von 1 auf 15 ml gefrorenen Killing-Puffer gegeben, gemischt und bis zur Zentrifugation auf Eis gehalten. Die durch das im

Killing-Puffer enthaltene Azid abgetöteten Zellen wurden im nächsten Schritt zentrifugiert (4 min, 4°C, 8.500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte nach der "Dismembrator"-Methode (abgewandelt nach Hauser *et al.*, 1998). Die gefrorenen Zellpellets wurden in 0,5 ml Killing-Puffer resuspendiert und sofort in ein, mit flüssigen Stickstoff, vorgekühltes Teflongefäß pipettiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf mechanische Weise durch die Bewegung einer Stahlkugel in einem Teflongefäß bei 1.800 rpm für 3 min mit dem Mikrodismembrator. Die Zelltrümmer wurden in 2 ml auf 55°C vorgewärmten Lysispuffer (RLT-Plus Puffer RNeasy Mini Kit) aufgenommen und mit der Pipette so lange invertiert bis die Lösung aufklarte. Im Anschluss wurde die Lösung für 5 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon überführt. Für den weiteren Verlauf der RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen) wurde von der Lösung jeweils 600 µl abgenommen. Die Konzentration der gereinigten RNA wurde mit Hilfe des Nano-Drop bestimmt. Die RNA-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut (Hübner, 2008).

2.3.4.2 DNaseI-Verdau

Für den DNaseI-Verdau wurde die DNaseI (RNase-frei) der Firma Fermentas verwendet. Der Ansatz wurde nach Angaben des Herstellers pipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Für einen 50 µl Ansatz wurden 5 µg RNA eingesetzt.

2.3.4.3 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

B. subtilis 168 Gesamt-RNA wurde wie oben beschrieben isoliert. Um Verunreinigungen durch genomische DNA zu eliminieren, wurde ein Verdau mit DNaseI durchgeführt (Fermentas). Zusätzlich wurde der Ansatz mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen) gereinigt, hierbei wird durch eine „gDNA eliminator column“ genomische DNA beseitigt. Die RNA-Probe wurde durch die Maxima Reverse Transkriptase (Fermentas) nach Herstellerangaben in Erststrang-cDNA umgewandelt (+RT). Als Negativkontrolle wurde eine weitere RNA-Probe (-RT) identisch behandelt, jedoch unter Auslassung des reversen Transkriptionsschritts. Beide Proben (-RT und +RT) wurden direkt einer herkömmlichen PCR unterzogen. Dafür wurden die Primerpaare FX44/FX27, FX116/FX117 oder FX118/119 verwendet. Das Ergebnis wurde durch 2%ige Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.3.4.4 Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurden denaturierende Agarosegele mit einer Seitenlänge von 9 mal 11 cm und einer Schichtdicke von ca. 0,4 cm verwendet. Es wurden Gele mit etwa 1% Agarosegehalt verwendet. Die erforderliche Menge Agarose wurde vorgelegt und es wurden 75 ml ddH₂O und 10 ml 10x MOPS-Puffer zugegeben. Danach wurde die Mischung mehrmals in der Mikrowelle erhitzt, bis die gesamte Agarose in Lösung war. Die heiße Agarose wurde dann in einem Wasserbad für 30 min auf 65°C temperiert und danach 8,5 ml Formaldehyd zupipettiert. Schließlich wurde die Agarose noch für 20 min bei 65°C belassen. Die Gelgießform und die Gelkammer wurden vor Gebrauch gründlich mit Seife und ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Gele gegossen und 1 h bei RT belassen. Nach dem Überschichten der Gele mit Laufpuffer (1x MOPS) wurden die Kämme entfernt und für 10 min ein Vorlauf bei 100 V durchgeführt. 5 µg der RNA-Proben wurden in Eppendorfgefäßen vorgelegt. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 10 µl erhöht und 10 µl RNA-Auftragepuffer mit Ethidiumbromid zugegeben. Vor dem Auftragen auf das denaturierende Formaldehyd-Gel wurden die Proben für 20 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Die Gele wurden zügig mit den RNA-Proben beladen und bei 70 V für 3 bis 3,5 h aufgetrennt, abhängig von der erwarteten Größe der nachzuweisenden mRNA und der verwendeten Agarosekonzentration. Anschließend wurde ein Vakuumblot durchgeführt (Hübner, 2008).

2.3.4.5 Northern Blot

Der Vakuum-Transfer wurde mit einer Vakuumblot-Anlage (VacuGeneTMXI) durchgeführt. Dabei wurden ein Gel oder jeweils zwei Gele parallel der Prozedur unterzogen. Entsprechend wurden positiv geladene Nylonmembranen mit einer Größe von 9 x 10 cm zunächst mit sterilem ddH₂O getränkt und danach für 15 min in 2x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran auf die gut mit ddH₂O durchfeuchtete poröse Trägerplatte aufgelegt. Mit einer Plastikmaske wurde der Blot abgedichtet. Durch das Auflegen der Agarosegele auf die Membranen und die Plastikmaske erfolgte das luftdichte Verschließen der Apparatur. Ein Vakuum von 60 mm Hg wurde an die Vakuum-Kammer angelegt und das Gel nacheinander mit den folgenden Lösungen überschichtet:

1. Denaturierungslösung 2 min
2. Neutralisierungslösung 2 min
3. 20x SSC 4 -5 h je nach Agarosekonzentration

Beim Wechsel der Lösungen wurden Reste der vorherigen Lösung entfernt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nylonmembran zur Entfernung von Agaroseresten 2 min in 20x SSC geschwenkt und die RNA mittels UV-Licht an der Membran fixiert. Anschließend wurden die Membranen auf einem Papiertuch luftgetrocknet. Danach konnte die Membran zur Hybridisierung mit verschiedenen Sonden zerschnitten werden. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran bei RT trocken und vor Staub geschützt gelagert (Hübner, 2008).

2.3.4.6 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Die *in vitro*-Synthese von Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des DIG-RNA-Labeling-Systems der Firma Roche Diagnostics. Zunächst wurde das für die Sonde ausgewählte DNA-Fragment (5'-Bereich des zu untersuchenden Gens) mittels PCR amplifiziert, wobei der reverse Primer die Sequenz für den Promotor der T7-Polymerase enthielt. Das PCR-Produkt konnte nach der Reinigung für den *in vitro*-Ansatz zur Synthese der DIG-markierten RNA-Sonde eingesetzt werden.

20 µl Ansatz:

- 10 µl PCR-Produkt (1 mg)
- 2 µl DIG RNA Labeling Mix
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 3 µl ddH₂O

Zuletzt wurden 2 µl T7-Polymerase sowie 1 µl RNAGuardTM hinzugefügt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit dem RNeasy Plus Kit unter Zugabe von 1 µl RNAGuardTM gereinigt.

2.3.4.7 Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG-markierten RNA-Sonden

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf Membrangrößen von maximal 9 x 10 cm. Die Nylonmembran, die die UV-fixierte RNA trägt, wurde mit 20 ml Vorhybridisierungslösung bzw. Prähybridisierungslösung in Hybridisierungsröhrchen transferiert und bei 68°C für

mindestens eine Stunde im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung bzw. Prähybridisierungslösung verworfen und durch die Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Sonde entfernt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Die Membran wurde zweimal für 5 min bei RT in 50 ml 2x SSC Waschlösung sowie dreimal 15 min bei 68°C in 50 ml vorgewärmter (auf 68°C) 0,1x SSC Waschlösung inkubiert, um unspezifisch gebundene RNA-Sonden zu entfernen. Beide Waschlösungen enthalten je 0,1 % SDS. Anschließend konnte die Membran zur Detektion der DIG-markierten RNA/RNA-Hybride eingesetzt werden (Hübner, 2008).

2.3.4.8 Detektion von RNA/RNA-Hybriden

Der Nachweis der RNA schließt sich direkt an die Hybridisierung an. Zunächst wird die Membran für 5 min in Puffer I, danach für weitere 30 min in Puffer II inkubiert. Es folgte die Detektion der hybridisierten Sonden durch an Alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-DIG-Antikörper (30 min), die im Verhältnis 1:10.000 in Puffer II gelöst waren. Anschließend wurde die Membran zweimal für 30 min in Puffer I und danach 5 min in Puffer III gewaschen. Im letzten Schritt wurde die Membran zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und mit 1 ml Puffer III, der 5 µl Substrat CDP* enthielt, für 5 min inkubiert. Nach den 5 min wurde die Membran kurz abgetropft und in eine frische Folie überführt, die sofort in die Belichtungskassette gelegt wurde. Abschließend erfolgte die Belichtung der Filme, wobei abhängig von den Sonden und den Bandenintensitäten unterschiedliche Belichtungszeiten angewendet wurden. Dabei wurde die Chemilumineszenz detektiert, die bei der Spaltung des Substrates CDP* durch die Alkalische Phosphatase entsteht. Für die Detektion wurde ein Lumi-ImagerTM verwendet (Hübner, 2008).

2.3.4.9 Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA

Blocking-Lösung	10% (w/v) Blockingreagenz in Puffer I autoklaviert
Denaturierungslösung	50 mM NaOH 10 mM NaCl autoklaviert
Neutralisierungslösung	100 mM Tris/HCl pH 7,4 autoklaviert

Killing-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5 5 mM MgCl ₂ autoklaviert, danach Zugabe von 20 mM NaN ₃
10x MOPS-Puffer	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt punktautoklaviert
N-Lauroylsarcosin 10%	10% N-Lauroylsarcosin in ddH ₂ O autoklaviert
10x Puffer I	1 M Maleinsäure 1,5 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert
Puffer II	1% Blockingreagenz in 1x Puffer I
Puffer III	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl pH 9,5, mit HCl eingestellt
RNA-Probenpuffer	6,5 ml Formamid 1,2 ml Formaldehyd 2,0 ml 10 x MOPS 0,4 ml 50% Saccharose 20 mg Bromphenolblau 20 mg Xylencyanol
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat mit HCl auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert
Vorhybridisierungs-Lösung (200 ml)	100 ml 100% Formamid 50 ml 20 x SSC 40 ml 10% Blocking-Lösung 2 ml 10% N-Lauroylsarcosin 0,2 ml 20% SDS
Prähybridisierungs-Lösung (400 ml)	200 ml Formamid 100 ml 20xSSC 4 ml 10% N-Lauroylsarcosin 8 g Blocking-Reagenz 28 g SDS ad 400 ml ddH ₂ O, nicht autoklaviert
Waschlösung 0,1 x SSC	0,1 x SSC 0,1% SDS
Waschlösung 2 x SSC	2 x SSC 0,1% SDS

2.3.5 Arbeiten mit Proteinen

2.3.5.1 Zellaufschluß durch Lysozym

Bakterienkulturen wurden für 2 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40-125 µl einer Lösung aus Z-Puffer/LD-Mix (1 ml Z-Puffer + 25 µl LD-Mix) resuspendiert (s. 2.3.8.2). Der Aufschluss erfolgte für 30 min bei 37°C. Das Gemisch wurde anschließend zum Abtrennen der Zelltrümmer zentrifugiert (13.000 rpm, RT, 2 min) (Hübner, 2008).

2.3.5.2 Zellaufschluß mit der French Press

Die vorgekühlte Bombe der French Press wurde mit der Bakteriensuspension gefüllt. Nach Verschluss der Bombe wurde die noch eingeschlossene Luft vollständig herausgedrückt. Nach Schließung des Ablassventils wurde die Bombe in die French Press eingespannt und unter Druck gesetzt. Der Aufschluss erfolgte bei einem Zellinnendruck von 1.241 bar (18.000 psi) und wurde für *E. coli* Zellen mindesten einmal, für *B. subtilis* Zellen dreimal durchgeführt (Hübner, 2008).

2.3.5.3 Zellaufschluß mit dem TissueLyser II (Qiagen)

Bakterienkulturen wurden für 2 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml ZAP-Puffer resuspendiert und zusammen mit 0,5-0,7 g Glaskugeln (Durchmesser 0,1 mm, Roth) in ein 2 ml-Schraubdeckel-Eppendorfgefäß gegeben. Der Aufschluss erfolgte im TissueLyser II für 0,5 min bei 30 Hz und wurde dreimal durchgeführt. Anschließend wurden die Glaskugeln durch Zentrifugation abgetrennt (5 min, 4°C, 20.800 x g) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

2.3.5.4 Überproduktion von Proteinen in *E. coli*

Zur Überexpression von Proteinen wurde 1 Liter LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur von einem Stamm, der das entsprechende Expressionsplasmid trug, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Zur Überprüfung der Überproduktion wurde vor der Induktion und vor der Zellernte je eine Probe entnommen. Die Proben wurden per SDS-PAGE analysiert. Die Kultur wurde ca. 3 h nach der Induktion geerntet und 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Die Zellen

wurden mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde das Gemisch in der Ultrazentrifuge 1 h bei 4°C bei 100.000 x g zentrifugiert (Hübner, 2008).

2.3.5.5 Reinigung von Proteinen durch Ni²⁺-NTA-Chromatographie

Das Wildtypenzym CdaS wurde für die Untersuchung mittels Gelfiltration an einem Äkta-System gereinigt. In allen anderen Fällen wurden „gravity flow“-Säulen verwendet.

Reinigung mit Äkta Prime Plus

Eine HisTrap™ Ni²⁺-NTA-Sepharose Säule (5 ml) wurde mit Puffer I (1x ZAP, 10 mM Imidazol, 10% Glycerin) äquibriert. Der Proteinrohextrakt wurde auf die Säule gegeben. Um schwach bindende Proteine zu entfernen, wurde mit Puffer I gewaschen. Anschließend wurde für 12 Säulenvolumen mit einem linearen Gradienten von 0 – 100% Puffer II (1x ZAP, 500 mM Imidazol, 10% Glycerin) eluiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt.

Reinigung mit Ni²⁺-NTA Säule

Zur Reinigung der Proteine mit einer N-terminalen 6x- oder 10x-Histidin-Sequenz wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulen (BIO-RAD) verwendet. Dabei wurde die Säule zunächst mit 2,5 ml Ni²⁺-NTA-Sepharose (QIAGEN) beladen und dann mit 20 ml ZAP äquibriert. Das Proteinrohextrakt wurde über die Matrix gegeben und es folgte ein Waschschriff mit 15 ml ZAP-Puffer. Die Chromatographie-Säule wurde anschließend mit je 8 ml Imidazol-Puffer mit steigender Imidazolkonzentration (10 mM, 50 mM) und darauf mit je 5 ml Imidazol-Puffer mit steigender Imidazolkonzentration (100 mM, 200 mM, 500 mM) beladen. Mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen und danach das His-tag-tragende Protein eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE mit anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die gereinigtes Protein enthielten, wurden üN dialysiert und anschließend mittels Bradford-Reagenz auf ihre Proteinkonzentrationen getestet (Hübner, 2008).

2.3.5.6 Reinigung von Proteinen über Strep-Tactin®-Sephrose Säule

Zur Reinigung der Proteine mit einem N- oder C-terminalen Strep-tag wurde eine Strep-Tactin®-Sephrose Säule (IBA) mit einem Matrixvolumen von 0,25 ml verwendet. Diese Matrix bindet spezifisch eine Sequenz von acht Aminosäuren (WSHPOQFEK), den Strep-tag. Die Bindung kann durch eine Verdrängungsreaktion mit D-Biotin oder D-Desthiobiotin wieder aufgehoben werden. Dadurch können Proteine, die mit dieser Aminosäuresequenz versehen sind, aus einem Proteingemisch isoliert werden. Zuerst wurde die Säule mit 10 ml Puffer W äquilibriert. Dann konnte die Säule mit dem Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 5x 2,5 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 1x 0,25 ml und 3x 0,5 ml Puffer E eluiert werden. Die bei der Elution erhaltenen Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, überprüft (Hübner, 2008).

2.3.5.7 Herstellung von Antikörpern

Für die Herstellung antikörperhaltiger Blutseren gegen ein gewünschtes Zielprotein, wurde das entsprechende Protein gereinigt. Lösung mit einem Proteingehalt von circa 1 mg wurden an die Firma Bioscience, Göttingen (Dr. Mustafa Benli) übergeben. Dort wurde die Lösung für die dreimonatige Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Die erhaltene „final bleeding“-Charge wurde anschließend als Antikörper bezeichnet und für Immunologische Nachweismethoden (z.B. Western Blot) eingesetzt.

Es wurden Antikörper gegen die Proteine CdaR, GlnM und YlaN hergestellt. Die zur Herstellung benötigten Proteine wurden mit Hilfe der Plasmide pGP2565, pGP1401 und pGP2583 gereinigt. Informationen zu den resultierenden Antikörpern sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Tabelle 2.2: Übersicht über die hergestellten Antikörper. Die angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf den Einsatz im Western Blot.

Antikörper	Lot-Nr.	Datum	Verdünnung
α -CdaR	AN 13008	10.07.13	1:10.000
α -GlnM	AN 13009	10.07.13	1:10.000
α -YlaN	AN 120100	15.04.13	1:10.000

2.3.5.8 Dialyse von Proteinen

Bei der Reinigung eines Proteins über eine N-terminale 6 x- oder 10 x-Histidin-Sequenz oder Strep-tag-Sequenz ist zum Ablösen des an die Säule gebundenen Proteins Imidazol bzw. Biotin/Desthiobiotin notwendig, welches weitere Versuche mit dem gereinigten Protein negativ beeinflussen kann. Um das Imidazol bzw. das Biotin/Desthiobiotin aus der Proteinpräparation zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 3,5 kDa) gegen einen geeigneten Lagerungs-Puffer dialysiert. Je nach Eigenschaften des gereinigten Proteins wurde 1 mM DTT und 10% Glycerin zugesetzt. Die Dialyse wurde zweimal für 24 h bei 4°C durchgeführt. Das Volumen des Dialysepuffers betrug das 1.000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung (Hübner, 2008).

2.3.5.9 Denaturierende Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierende Polyacrylamid-Proteingele wurden nach der Methode von Laemmli hergestellt (Laemmli, 1970). Die Gele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel, wurden mit einer Dicke von 1 oder 1,5 mm gegossen. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (2x) versetzt und vor der Auftragung 10 min auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei 100 V erfolgte (Hübner, 2008).

2.3.5.10 Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die zu färbenden Polyacrylamid-Gele wurden zunächst für 10 min in Fixierlösung inkubiert. Daraufhin wurden sie für 15 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und in der Entfärbelösung inkubiert bis ein optimaler Kontrast zwischen Proteinbanden und Gelhintergrund erreicht war (Hübner, 2008).

Wasch- und Fixierlösung	45% Methanol 10% Essigsäure 45% H ₂ O
Färbelösung	0,5% Coomassie Brillant Blue R250 10% Essigsäure 45% Methanol 44,5% H ₂ O

Thiosulfatlösung (100 ml)	20 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml ddH ₂ O
Imprägnierer (100 ml)	0,2 g AgNO_3 37 μl Formaldehyd ad 100 ml ddH ₂ O
Entwickler (100 ml)	6 g NaCO_3 2 ml Thiosulfatlösung 50 μl Formaldehyd ad 100 ml ddH ₂ O
Stopplösung (100 ml)	1,86 g EDTA ad 100 ml ddH ₂ O

2.3.5.12 Molekulargewichtsbestimmung mittels analytischer Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration ist eine Methode, um das Molekulargewicht von Proteinen und dadurch ihren Oligomerisierungsstatus zu bestimmen. Im Fall von globulären Proteinen besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem relativen Elutionsvolumen (V_E/V_0). Mit Hilfe von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (Gel Filtration Standard, Bio-Rad) wurde eine Standardkurve erstellt, die zur Berechnung des Molekulargewichts des zu untersuchenden Proteins verwendet wurde. Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex™ 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) und dem Äkta Purifier System durchgeführt. Die Säule wurde mit Puffer äquilibriert (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 10% Glycerin). Mittels Ni^{2+} -NTA gereinigte Proteinproben wurden anschließend auf die Säule gegeben. Abbildung 2.2 zeigt das Elutionsprofil der Standardproteine (A) und die daraus berechnete Standardgerade (B).

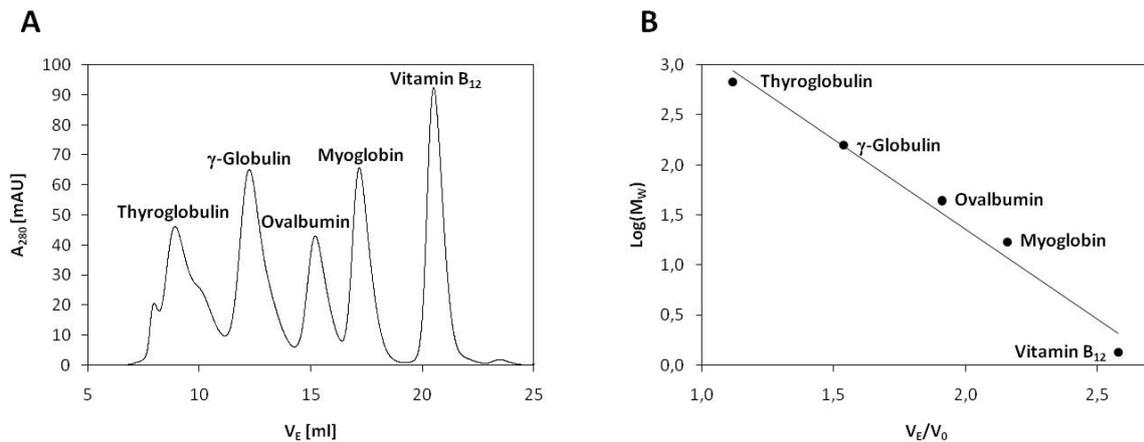


Abbildung 2.2: Standardkurve der analytischen Gelfiltration an einer Superdex™ 200 10/300 GL.

(A) Elutionsprofil des Gel Filtration Standards (Bio-Rad). Die Molekulargewichte der verwendeten Proteine sind 670 kDa (Thyroglobulin), 158 kDa (γ -Globulin), 44 kDa (Ovalbumin), 17 kDa (Myoglobin) sowie 1,3 kDa für den Cofaktor Vitamin B₁₂. (B) Berechnete Standardgerade durch Auftragung des relativen Elutionsvolumens (V_E/V_0) gegen den Logarithmus der Molekulargewichte ($\log(M_W)$). V_E = Elutionsvolumen; V_0 = Ausschlussvolumen (7,959 ml).

Die Gleichung der berechneten Standardgerade ist $\log M_W = 4,945 - 1,795 \frac{V_E - V_0}{V_0}$.

2.3.5.13 Molekulargewichtsbestimmung mittels Blau Nativ-Gelelektrophorese (blue native-PAGE)

Bei der nicht-denaturierenden Blau Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine in nativem Zustand nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dadurch ist die grobe Analyse des Molekulargewichts und des Oligomerisierungsstatus möglich. Durch die Zugabe von Coomassie Brilliant Blue G250 wird den zu untersuchenden Proteinen eine einheitliche negative Ladung verliehen, der native Zustand wird jedoch beibehalten. Anders als bei der SDS-PAGE fungiert Histidin anstatt Glycin als dipolare ionische Pufferkomponente. Wie bereits beschrieben wurde je 1 μ g oder 3 μ g gereinigtes Protein über ein 5-24%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt (Niepmann & Zheng, 2006). Der Gellauf erfolgte bei 10°C und 20 V/cm für 10 h. Zur Visualisierung der Proteine erfolgte anschließend eine Silberfärbung oder ein Western Blot.

2.3.5.14 Trennung und Isolierung von Cytosol- und Membranfraktionen durch Ultrazentrifugation

Zellpellets des Stamms GP1381 wurden in kaltem Puffer M (50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, pH 6,8) resuspendiert und mit der French Press

aufgeschlossen. Anschließend wurde zentrifugiert (15 min, 4°C, 8500 rpm), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und nochmals zentrifugiert (30 min, 4°C, 8500 rpm). Vom Überstand wurde eine Probe genommen und als „Rohextrakt“ bezeichnet (RE), danach wurde er in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (1 h, 4°C, 35.000 rpm). Erneut wurde vom entstandenen Überstand eine Probe genommen und als „Cytosol“ bezeichnet. Das entstandene Pellet wurde in 0,5 ml Puffer M gelöst, das Zentrifugationsröhrchen mit Puffer M aufgefüllt und es erfolgte ein weiterer Ultrazentrifugationsschritt (30 min, 4°C, 35.000 rpm). Diese Prozedur wurde einmal wiederholt. Dazwischen wurde vom Überstand eine Probe genommen und als „Wasch“ bezeichnet. Das finale Pellet wurde in 0,5 ml Puffer M, 5% CHAPS resuspendiert und als „Membran“ bezeichnet. Anschließend wurden die isolierten Proben durch SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mittels Flag-Antikörper visualisiert.

2.3.5.15 Western Blot

Der Blot von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Semi Dry Blot Apparatur. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst 30 Sekunden in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol (100%) und anschließend 5 min. in Transferpuffer inkubiert. Nach dem einstündigen Transfer bei 0,8 mA/cm² wurde die PVDF-Membran mindestens 30 min in Milchblockinglösung (Blotto) geschwenkt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit polyklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Protein. Der FLAG-tag Antikörper sowie die Antikörper gegen CdaR und GImM wurden 1:10.000 in Blotto verdünnt eingesetzt. Die Strep-tag und His-tag Antikörper wurden 1:1.000 in TBS verdünnt eingesetzt. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschschritten von je 30 min in Blotto erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt), der 1:100.000 in Blotto verdünnt zum Einsatz kam. Nach drei weiteren 20-minütigen Waschschritten mit Blotto wurde die Membran in ddH₂O gespült und anschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 min in Puffer III inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP*. Das Lumineszenzgerät Chemocam (Intas) wurde zur Dokumentation der Signale verwendet.

Blotto	1 x TBS 2,5% Magermilchpulver 0,1% Tween 20
10x TBS	60 g Tris 90 g NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen ad 1 l mit ddH ₂ O
Transferpuffer	15,2 g Tris 72,1 g Glycin 750 ml Methanol (100%) ad 5 l mit ddH ₂ O
Puffer III	0,1 M Tris 0,1 M NaCl pH 9,5 mit HCl eingestellt

2.3.5.16 Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen

IPTG steril filtriert	1 M IPTG
Puffer E	100 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer W	100 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Zellaufschlußpuffer ZAP	50 mM Tris-HCl pH 7,5 200 mM NaCl
Probenpuffer 5x (für native Proteingelektrophorese)	3,1 ml Tris-HCl pH 8,8 (1M) 5 ml Glycerol (100%) 1,4 ml ddH ₂ O

SDS-Probenpuffer 2x (für denaturierende Proteingelektrophorese)

1,4 ml Tris-HCl pH 7,0 (1 M)
3 ml Glycerin (100%)
2 ml SDS (20%)
1,6 ml β -Mercaptoethanol (100%)
0,01 g Bromphenolblau
2 ml ddH₂O

Sammelgel (für denaturierende Proteingelektrophorese)

1,4 ml ddH₂O
0,33 ml Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) (30%)
0,25 ml Tris-HCl pH 6,8 (1,5 M)
20 μ l SDS (10%)
20 μ l APS (10%)
10 μ l TEMED

Trenngel (8%) (für denaturierende Proteingelektrophorese)

2,3 ml ddH₂O
1,3 ml Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) (30%)
1,3 ml Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)
50 μ l SDS (10%)
50 μ l APS (10%)
10 μ l TEMED

Trenngel (12%) (für denaturierende Proteingelektrophorese)

1,6 ml ddH₂O
2,0 ml Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) (30%)
1,3 ml Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)
50 μ l SDS (10%)
50 μ l APS (10%)
10 μ l TEMED

Waschlösung (für Proteingelektrophorese)

45% Methanol
10% Essigsäure
45% H₂O

2.3.6 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte mittels SPINE- oder Two-Hybrid-Analysen (Herzberg *et al.*, 2007, Karimova *et al.*, 1998).

2.3.6.1 Strep-Protein Interaction Experiment (SPINE)

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Strep-Protein Interaction Experiment (SPINE) durchgeführt. Bei dieser Methode werden *in vivo* eng benachbarte Proteine (~2 Å) durch die Zugabe von Formaldehyd miteinander verknüpft. Anschließend erfolgt die Reinigung des Strep-getagten Köderproteins und des damit verknüpften Proteins mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (Herzberg *et al.*, 2007). Formaldehyd verknüpft die Proteine reversibel. Nach der Reinigung können diese kovalenten Verbindungen (Methylenbrücken) durch Erhitzen wieder gelöst werden. Für das Experiment wurden zunächst 4 ml LB-Medium mit den Zellen angeimpft, die das Köderprotein exprimieren. Diese Kulturen wurden üT bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Mit der üT-Kultur wurden abends 200 ml CSE-Glucose-Medium mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle angeimpft. Am nächsten Tag wurde 1 l CSE-Glucose-Medium mit Zellen der üN-Kultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Diese Kultur wurde, wie auch die Vorkulturen, bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 wurde die Hälfte der Kultur geerntet (10 min, 4°C, 5.000 rpm), die andere Hälfte wurde mit einer 4%-igen Formaldehyd-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration 0,6% betrug. Die Formaldehyd-Lösung wurde durch Lösen von 40 g Paraformaldehyd in 1 l PBS pH 6,5 hergestellt. Es folgte eine weitere Inkubation für 20 min bei 37°C und anschließende Zellernte (10 min, 4°C, 5.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 12 ml kaltem Puffer W resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen mit der French Press aufgeschlossen und die Zellextrakte über eine Strep-Tactin®-Sephарose Säule (IBA) gereinigt. Proteine, die durch die Formaldehyd-Zugabe mit dem rekombinanten Protein vernetzt worden waren, wurden bei der Reinigung koeluiert. Um die Interaktionspartner zu trennen, wurden die Proben für 20 min auf 95°C erhitzt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Auf dem Gel sichtbare Banden koeluiert Proteine wurden ausgeschnitten und zur Identifizierung einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die massenspektrometrische Analyse der Proteine wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Oliver Valerius, Yeast and Proteomics, Abteilung für Molekulare Mikrobiologie in Göttingen durchgeführt. Wurden bereits bekannte oder vermutete Interaktionen untersucht, so wurde

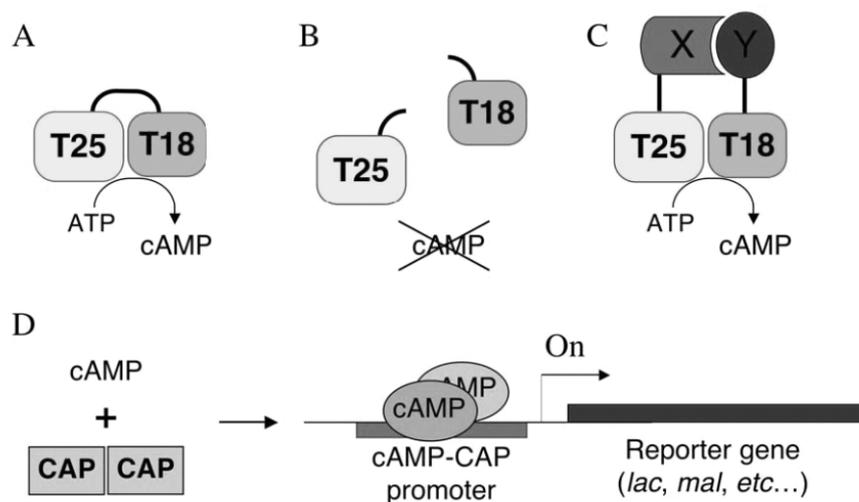
ein Western Blot mit einem Antikörper durchgeführt, der spezifisch für den potentiellen Interaktionspartner war (Meyer, 2009).

10 x PBS pH 6,5

80 g NaCl
 2 g KCl
 2,4 g KH_2PO_4
 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 ad 1 l ddH_2O

2.3.6.2 Bakterielles Adenylatzyklase Two-Hybrid-System

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde das bakterielle Adenylatzyklase Two-Hybrid-System verwendet (Karimova *et al.*, 1998). Dieses System basiert auf der Rekonstruktion der Adenylatzyklaseaktivität in *E. coli* (s. Abbildung 2.3). In diesem Two-Hybrid-System wird die Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* verwendet, die aus den zwei Domänen T18 und T25 besteht. Werden die zwei Domänen mit Proteinen verknüpft, die interagieren, so kommt es zur funktionellen Komplementation der Adenylatzyklase. Das dann von der Adenylatzyklase synthetisierte cAMP bindet sich an das Kataboliten-Aktivatorprotein CAP und der cAMP/CAP-Komplex aktiviert daraufhin das Reporterogen *lacZ*. Die Stärke der Interaktion spiegelt sich somit in der Expression des *lacZ*-Gens wieder.



Interaktion zwischen hybridisierenden Proteinen → hohe β -Galaktosidase-Aktivität

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung zum Prinzip des bakteriellen Two-Hybrid-Systems BACTH. (A) Die katalytischen Domänen der Adenylatzyklase sind für die Synthese des cAMP verantwortlich. (B) die Domänen sind im getrennten Zustand inaktiv. (C) Fusioniert mit zwei interagierenden Proteinen (X, Y) wird die Aktivität wiederhergestellt. (D) Durch die Bildung von cAMP werden verschiedene Reportergene transkribiert (Meyer, 2009).

Zur Detektion der Interaktion wurden die zu untersuchenden Proteine sowohl C- als auch N-terminal mit den Domänen der Adenylatzyklase fusioniert. Für die Klonierung wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet. Das Plasmid p25-N ermöglicht die Expression von Proteinen, die N-terminal an die T25-Domäne fusioniert sind, das Plasmid pUT18C ermöglicht die Expression von Proteinen, die C-terminal an die T18-Domäne fusioniert sind. Bei dem Plasmid pUT18C handelt es sich um einen high-copy Vektor (ori ColEI), bei dem Plasmid p25-N um einen low-copy Vektor (ori p15A) (Karimova *et al.*, 1998, Claessen *et al.*, 2008). Die Primer für das Amplifikat, das in den Vektor pUT18C kloniert wurde, wurden so entworfen, dass das entsprechende Fusionsgen mit einem Stoppkodon endet. Die amplifizierten Genprodukte und die Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Kpn*I verdaut und anschließend ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der Stamm XL1-blue transformiert. In diesem Stamm wird das Gen *lacI* stark exprimiert, so dass die Expression der Fusionsproteine verhindert wird. Anschließend wurden die beiden entsprechenden Plasmide in den *E. coli* Stamm BTH101 kotransformiert. Dieser Stamm besitzt keine eigene Adenylatzyklase. Jeweils 4 µl der Zellen wurden auf Selektionsmedium (80 µg/ml X-Gal, 1 mM IPTG, 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin) gespottet. Die Platten wurden für 36 h bei 30°C inkubiert. Interagierende Proteine konnten anhand der Spaltung von X-Gal und der dabei auftretenden Blaufärbung erkannt werden. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich die Plasmide pKT25-zip und pUT18C-zip kotransformiert. Diese Plasmide kodieren für ein Leucin-Zipper-Motiv und weisen eine starke Interaktion auf (Meyer, 2009).

2.3.7 Bestimmung von intrazellulären c-di-AMP Konzentrationen

2.3.7.1 Probenvorbereitung für *E. coli*

Zur Bestimmung der intrazellulären c-di-AMP Konzentration wurde *E. coli* mit einem Expressionsvektor, der das Gen für die Diadenylatzyklase enthält, transformiert. Es erfolgte eine Induktion mit IPTG bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5. Die Induktion lief über einen Zeitraum von 3h. Anschließend wurden 10 ml der Kultur abgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 4°C, 8.500 rpm) und der Überstand verworfen. Es folgte ein Extraktionsschritt mit 300 µl Extraktionslösung. Das gelöste Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, 10 min auf 95°C erhitzt und zentrifugiert (10 min, 4°C, 20.800 x g). Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde

zweimal für 15 Minuten mit je 200 µl Extraktionslösung unter Auslassung des Erhitzungsschrittes wiederholt. Die Überstände der drei Extraktionsschritte wurden vereinigt und über Nacht bei -20°C gelagert. Dabei ausgefallenes Protein wurde durch erneutes Zentrifugieren beseitigt (10 min, 4°C, 20.800 x g). Der Überstand wurde in einer SpeedVac getrocknet (Schmeisky, 2013).

2.3.7.2 Probenvorbereitung für *B. subtilis*

Für die intrazelluläre Bestimmung von c-di-AMP aus *B. subtilis* wurden Kulturen in CSE-Glucose-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. 10 ml der Kultur wurden zentrifugiert (10 min, 4°C, 8500 rpm). Das Pellet wurde in 0,8 ml Extraktionslösung resuspendiert und die Zellen mit Hilfe des TissueLyser II aufgeschlossen (s. 2.3.5.3, 7,5 min, 30 Hz). Es folgte ein Zentrifugationsschritt, um die Glaskugeln zu separieren (5 min, 4°C, 17.000 x g), der Überstand wurde abgenommen und in einem separaten Gefäß auf Eis gelagert. Die verbliebene Probe wurde mit 0,6 ml Extraktionslösung versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und erneut im TissueLyser II aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (5 min, 4°C, 17.000 x g) wurden die Überstände aus diesem und dem vorherigen Zentrifugationsschritt vereinigt. Noch einmal wurde die verbliebene Probe mit 0,4 ml Extraktionslösung versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde zu den vorherigen hinzugefügt, so dass schließlich die Überstände aus 3 Extraktionsschritten vereinigt waren. Diese Probe wurde über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurde ausgefallenes Protein durch Zentrifugieren beseitigt (10 min, 4°C, 20.800 x g) und der Überstand bei 40°C in einer SpeedVac getrocknet. Die HPLC-MS/MS-Messung von c-di-AMP wurde in der Zentralen Forschungseinrichtung Massenspektrometrie-Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie, Prof. Dr. Volkhard Kaefer durchgeführt (Spangler *et al.*, 2010). Zur Quantifizierung von c-di-AMP nach Analyse per LC-MS/MS musste eine Proteinbestimmung aus einem Milliliter Flüssigkultur mit derjenigen OD durchgeführt werden, bei der auch die Extraktion gestartet wurde. Hierfür wurde den Kulturen jeweils 1 ml entnommen und bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,8 ml 0,1 N NaOH gelöst und 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend für 5 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, die NaOH-Behandlung wiederholt und der resultierende Überstand mit dem vorherigen vereint. Die Proteinbestimmung nach Bradford

wurde von dieser Lösung durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen an c-di-AMP wurden in nM angegeben.

Zur Normalisierung der Ergebnisse war es daher wichtig, die Konzentration auf die Proteinmenge in der Zelle zu beziehen (Proteinbestimmung), aber auch das geerntete Probenvolumen (10 ml) in die Messung mit einzubeziehen.

Extraktionslösung

Acetonitril/ Methanol/ ddH₂O (2/2/1) (v/v/v)

2.3.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.3.8.1 Amylasetest auf Stärkeplatten

B. subtilis besitzt ein Amylasegen, *amyE*. Dieses Gen findet häufig Anwendung, wenn Reportergenkonstrukte über doppelt homologe Rekombination in das Genom von *B. subtilis* eingeführt werden sollen. Das funktionale *amyE* kann sehr einfach nachgewiesen werden und hat zusätzlich den Vorteil, dass es für *B. subtilis* nicht essentiell ist. Der Nachweis erfolgt auf Stärkeplatten. Ist das Gen intakt, wird Amylase gebildet und die Stärke wird von den Bakterienzellen abgebaut. Wurde das Gen durch Rekombinationsereignisse zerstört, wird keine Amylase gebildet und die Stärke wird nicht angegriffen. Der Nachweis erfolgte, indem jeweils ein *amyE*-Wildtypstamm und die Klonen mit der erwarteten Rekombination auf einer Stärkeplatte ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert wurden. Am nächsten Morgen wurde Iod-Kaliumiodid-Lösung (Roth) aufgetropft und auf der Platte verteilt. Um die Ausstriche mit einem intakten *amyE*-Gen bildet sich ein deutlich sichtbarer Hof. Wurde das *amyE*-Gen jedoch zerstört, ist kein Hof erkennbar (Hübner, 2008).

2.3.8.2 Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität

Die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität wurde nach Miller (1972) durchgeführt. Die Messung beruht auf der enzymatischen Umwandlung von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) in Galactose und o-Nitrophenol durch die β -Galactosidase. O-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ bestimmt werden. Bei jedem Stamm wurde für jeden Effektor die β -Galactosidaseaktivität mindestens zweier unabhängig angezogener Kulturen bestimmt. Die

zu analysierenden Bakterienstämme wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt und anschließend 1,5 ml der Kultur 5 min mit 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl Z-Puffer/LD-Mix resuspendiert, für 10 min bei 37°C inkubiert und dann zentrifugiert (2 min, 4°C, 13.000 rpm). Der erhaltene Überstand (Zellextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Zellextrakt wurden 100 µl entnommen und mit 700 µl Z-Puffer vermischt. Diese Ansätze wurden für 5 min bei 28°C vorinkubiert. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 200 µl einer ONPG-Lösung (4 mg/ml in 1 x Z-Puffer) zugegeben. Sobald eine deutliche Gelbfärbung festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 420 nm. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Zellextrakt. Die Proteinmengenbestimmung des Zellextraktes erfolgte mittels Bradford mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München).

Die spezifische β-Galactosidaseaktivität in Units/mg Protein wurde mit folgender Formel berechnet (Hübner, 2008):

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg Protein}} = \frac{1500 \times A_{420}}{\Delta t \times V \times A_{595} \times 1,7 \times 4,4}$$

A ₄₂₀	Absorption von o-Nitrophenol
Δt	Zeitdifferenz zwischen Start und Stopp der Reaktion in min
V	eingesetztes Volumen an Zellkultur in ml
A ₅₉₅ × 1,7	Proteingehalt des Zellextraktes in mg ml ⁻¹

Lysozym/DNase (LD)	100 mg Lysozym in 10 ml ddH ₂ O gelöst 10 mg DNase zugegeben à 500 µl aliquotiert, bei -20°C gelagert
---------------------------	--

Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 50 mM β-Mercaptoethanol
-----------------	--

Iod-Kaliumiodidlösung

100 g KJ
50 g J
ad 1000 ml mit H₂O

3 Ergebnisse

Die Bedeutung von c-di-AMP als „second messenger“ in Bakterien war zu Beginn dieser Arbeit noch weitgehend unbekannt. Diadenylatzyklasen katalysieren die Synthese von c-di-AMP. Als erstes Enzym dieser Art wurde DisA in *B. subtilis* entdeckt und charakterisiert. Die Kristallstruktur von DisA identifizierte eine globuläre Domäne, die für die katalytische Aktivität verantwortlich ist (DAC-Domäne). Homologievergleiche zeigten, dass die DAC-Domäne in Proteinen anderer Bakterien, vor allem *Firmicutes*, stark konserviert ist (Witte *et al.*, 2008). Im Genom von *B. subtilis* sind neben DisA noch zwei weitere DAC-tragende Proteine kodiert – CdaA und CdaS – weshalb diese als putative Diadenylatzyklasen beschrieben wurden (Römling, 2008).

Aus kürzlichen Transkriptionsstudien geht hervor, dass die Gene *disA* und *cdaA* konstitutiv exprimiert werden. *cdaS* hingegen wird ausschließlich in der Sporulation und unter einigen Stressbedingungen exprimiert (Nicolas *et al.*, 2012).

Über die regulatorische Funktion von c-di-AMP wurde vermutet, dass es durch DisA zur Kontrolle der DNA-Integrität notwendig ist. Als „sporulation check point-Protein“ soll DisA nur Zellen mit intakter DNA zur Sporulation befähigen (Witte *et al.*, 2008, Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011).

Ziel dieser Arbeit war es, wichtige Erkenntnisse zur Relevanz und den biologischen Funktionen des c-di-AMP-Metabolismus in *B. subtilis* zu erlangen. Dabei wurde vor allem auf die funktionelle Erforschung der Diadenylatzyklasen gesetzt.

3.1 Identifizierung von Diadenylatzyklasen in *B. subtilis*

Um die c-di-AMP-Synthese-Aktivität der DAC-tragenden Proteine CdaA und CdaS zu untersuchen, wurden die Gene in den Expressionsvektor pET19b kloniert. Das *disA*-Gen wurde ebenfalls in diesen Vektor gebracht. Die erhaltenen Plasmide erhielten die Bezeichnungen pGP1970 (CdaA), pGP1972 (CdaS) und pGP2563 (DisA). Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und c-di-AMP aus Rohextrakten von diesen Kulturen quantifiziert (s. 2.3.7). Grundlage für dieses Messprinzip ist, dass *E. coli* kein c-di-AMP bildet (Corrigan *et al.*, 2011). Somit kann nachweisbares c-di-AMP einzig auf das rekombinant

produzierte Protein zurückgeführt werden. Zum Vergleich wurde eine Kultur herangezogen, die den Leervektor pET19b trug. Das Ergebnis der c-di-AMP-Quantifizierung ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Für alle drei Proteine wurden signifikante Mengen c-di-AMP gefunden, wohingegen in der Kultur mit dem Leerplasmid kein c-di-AMP nachgewiesen werden konnte. Somit konnte CdaA und CdaS eindeutig eine Diadenylatzyklase-Aktivität zugewiesen werden. Dies bestätigt die Annahme, dass die DAC-Domäne mit dieser Aktivität in Verbindung gebracht werden kann.

Tabelle 3.1: Aktivitäten der Diadenylatzyklasen CdaA, CdaS und DisA. Bestimmung von intrazellulärem c-di-AMP aus *E. coli* Kulturen, welche die Expressionsvektoren pGP1970 (pET19b-*cdaA*), pGP1972 (pET19b-*cdaS*), pGP2563 (pET19b-*disA*) trugen. Die gezeigten Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten gebildet. Die Standardabweichung ist in Klammern dargestellt.

	[ng c-di-AMP / mg Protein]		
pET19b	pGP1970	pGP1972	pGP2563
Leervektor	CdaA	CdaS	DisA
0 (0)	237 (72)	562 (140)	79.187 (25.875)

Um einen ersten Einblick in die physiologische Bedeutung von c-di-AMP für *B. subtilis* zu bekommen, wurde auch eine Bestimmung aus dem Wildtyp durchgeführt. Dafür wurden drei unabhängige Kulturen des Stamms 168 angezogen (s. 2.3.7) und die c-di-AMP Mengen gemessen. Als Mittelwert wurde eine Konzentration von 9,6 ng cdiAMP / mg Protein bei einer Standardabweichung von 0,54 bestimmt.

3.2 c-di-AMP-Homöostase

3.2.1 Essentialität von c-di-AMP in *B. subtilis*

Um die Funktionen der verschiedenen Diadenylatzyklasen zu untersuchen, wurden zunächst Deletionsstudien durchgeführt. Einzelmutanten der Gene *cdaA* (GP987), *cdaS* (GP983) und *disA* (GP987) wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Christine Diethmaier angefertigt, wie auch die Doppelmutanten $\Delta cdaA \Delta cdaS$ (GP989) und $\Delta disA \Delta cdaS$ (GP991). Alle Stämme waren lebensfähig und wuchsen wie der Wildtyp. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde versucht, diese Mutanten weiter zu kombinieren. Jedoch war weder die Herstellung einer $\Delta cdaA \Delta disA$ Doppelmutante, noch einer $\Delta cdaA \Delta disA \Delta cdaS$ Dreifachmutante möglich. Dabei fällt auf, dass ausschließlich die gleichzeitige Deletion der konstitutiv exprimierten

Gene *cdaA* und *disA* nicht möglich war. Das Gen *cdaS* ist nur unter Sporulationsbedingungen exprimiert (Nicolas *et al.*, 2012) und ließ sich in jeder Kombination deletieren. Daraus lässt sich schließen, dass *B. subtilis* nur lebensfähig ist, wenn mindestens eine Diadenylatzyklase exprimiert wird. Dies bedeutet, dass der „second messenger“ c-di-AMP essentiell ist. Diese Erkenntnisse sind in guter Übereinstimmung mit aktuellen Studien, in denen c-di-AMP für *B. subtilis* ebenfalls als essentiell beschrieben wird (Luo & Helmann, 2012).

Des Weiteren lassen die Deletionsexperimente vermuten, dass sich die verschiedenen Diadenylatzyklasen in ihren Aktivitäten gegenseitig ersetzen bzw. redundante Funktionen haben. Für einen ersten Einblick in diese Hypothese wurde ein Stamm konstruiert, der das Sporulations-spezifische Gen *cdaS* ektopisch unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors exprimiert. In der Anwesenheit von Xylose konnten in diesem Stamm alle drei DAC-Gene – *cdaA*, *cdaS* und *disA* – deletiert werden (GP1327). Um das Wachstum zu analysieren, wurden Wachstumskurven in LB-Medium mit oder ohne Xylose durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Wenn *cdaS* durch die Anwesenheit von Xylose exprimiert war wuchs der Stamm GP1327 wie der Wildtyp, jedoch war er in der Abwesenheit von Xylose nicht lebensfähig (Abbildung 3.1 A). Diese Ergebnisse zeigen, dass allein die ektopische Expression von *cdaS* die Deletion aller drei DAC-Gene ermöglichte. Hierdurch wurde die Essentialität von c-di-AMP ebenfalls bestätigt.

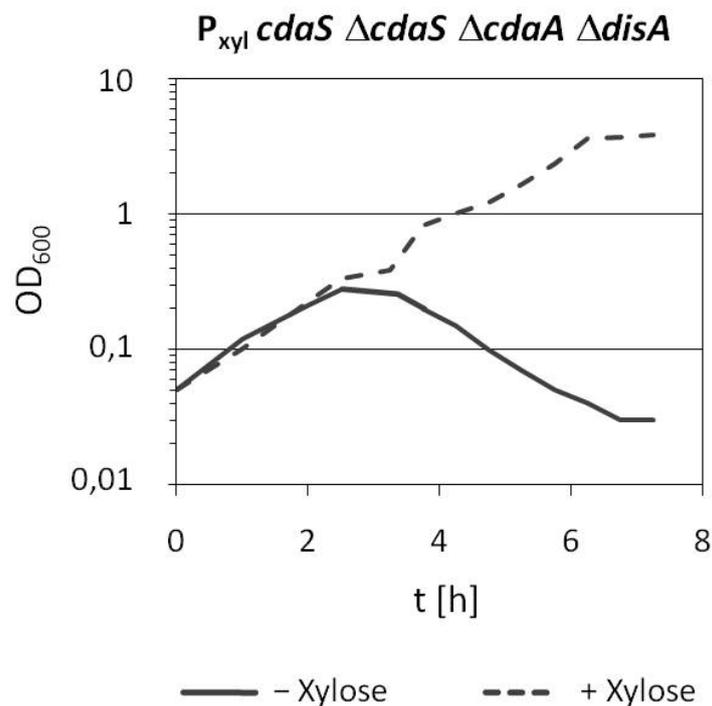


Abbildung 3.1: Essentialität von c-di-AMP. Der Stamm GP1327 wurde in LB-Medium mit oder ohne den Induktor Xylose (1%) angezogen. Die Zelldichte wurde bei 600 nm gemessen (OD₆₀₀). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Daraus ist eine repräsentative Wachstumskurve gezeigt.

3.2.2 Auswirkungen des c-di-AMP-Spiegels auf Wachstum und Zellmorphologie

Die Isolierung einer hyperaktiven Variante der Diadenylatzyklase CdaS_{L44F} (s. Kapitel 3.4.1) ermöglichte die Untersuchung von hohen c-di-AMP-Konzentrationen in *B. subtilis*. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein zeigte diese Variante eine fast 100-fach gesteigerte Aktivität. Um einen möglichen Abbau von c-di-AMP durch die Phosphodiesterase GdpP zu verhindern, wurde das entsprechende Gen deletiert. So entstand der Stamm GP1344 ($P_{\text{xyl}} cdaS_{L44F} \Delta gdpP$), der das hyperaktive *cdaS*-Allel ektopisch unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors exprimiert. Zunächst wurden intrazelluläre c-di-AMP Konzentrationen des Wildtyps (168) und des Stamms GP1344 (Wachstum in Gegenwart von Xylose) bestimmt. Im Wildtyp wurden $9,0 \pm 0,2$ ng c-di-AMP / mg Protein detektiert. Im Gegensatz dazu wurden für die Mutante $34,6 \pm 0,8$ ng c-di-AMP / mg Protein ermittelt. Die Wildtyp-Konzentration war damit in guter Übereinstimmung mit dem unter 3.1 ermittelten Wert. Die Konzentration von GP1344 betrug mehr als das 3-fache, was zeigt, dass der

intrazelluläre c-di-AMP Spiegel tatsächlich aufgrund der ektopischen Expression von $CdaS_{L44F}$ und der Abwesenheit von GdpP erhöht war.

Um den Einfluss einer gesteigerten c-di-AMP-Konzentration auf das Wachstum von *B. subtilis* zu untersuchen, wurden zwei Stämme hergestellt. Diese exprimierten entweder das Wildtyp-Allel *cdaS* (GP1341) oder das hyperaktive Allel *cdaS_{L44F}* (GP1342) ektopisch unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors. Zusätzlich wurde in den Stamm GP1341 eine Deletion der Phosphodiesterase GdpP eingebracht (GP1343), um den Abbau von c-di-AMP zu unterbinden. Zusammen mit GP1344 standen für die Untersuchung des Wachstums vier Stämme zur Verfügung (Übersicht s. Abbildung 3.2). Diese wurden in CSE-Medium mit 0,5% Glucose in An- oder Abwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Wenn die Zellen ohne den Induktor Xylose wuchsen, das ektopische *cdaS*-Allel also nicht exprimiert war, konnte nur für GP1344 ein minimal langsames Wachstum festgestellt werden (Generationszeit 53,6 min im Vergleich zu 48,5 min des isogenen Stamms GP1343 mit Wildtyp-*cdaS*). Wenn die *cdaS*-Allele Xylose exprimiert wurden, zeichneten sich deutliche Wachstumsunterschiede ab. Der Stamm GP1341, der Wildtyp-*cdaS* in Gegenwart der Phosphodiesterase exprimierte, zeigte keinen Einfluss. Bei zusätzlicher Deletion von *gdpP* (GP1343) war ein geringer Unterschied feststellbar (Generationszeit 47,7 min für GP1341 im Vergleich zu 60,0 min für GP1343). Genauso hatte der Stamm GP1342 mit dem hyperaktiven *cdaS_{L44F}*-Allel im Vergleich zu GP1341 mit Wildtyp-*cdaS* nur einen geringen Wachstumsdefekt (Generationszeit 76,4 min für GP1342 und 47,7 min für GP1341). Jedoch zeigte der Stamm GP1344, der die Expression von hyperaktivem *cdaS_{L44F}* mit der Abwesenheit von *gdpP* vereint, ein drastisches Wachstumsdefizit (Generationszeit 89,1 min). Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für eine Beeinträchtigung des Wachstums aufgrund zu hoher c-di-AMP-Konzentrationen.

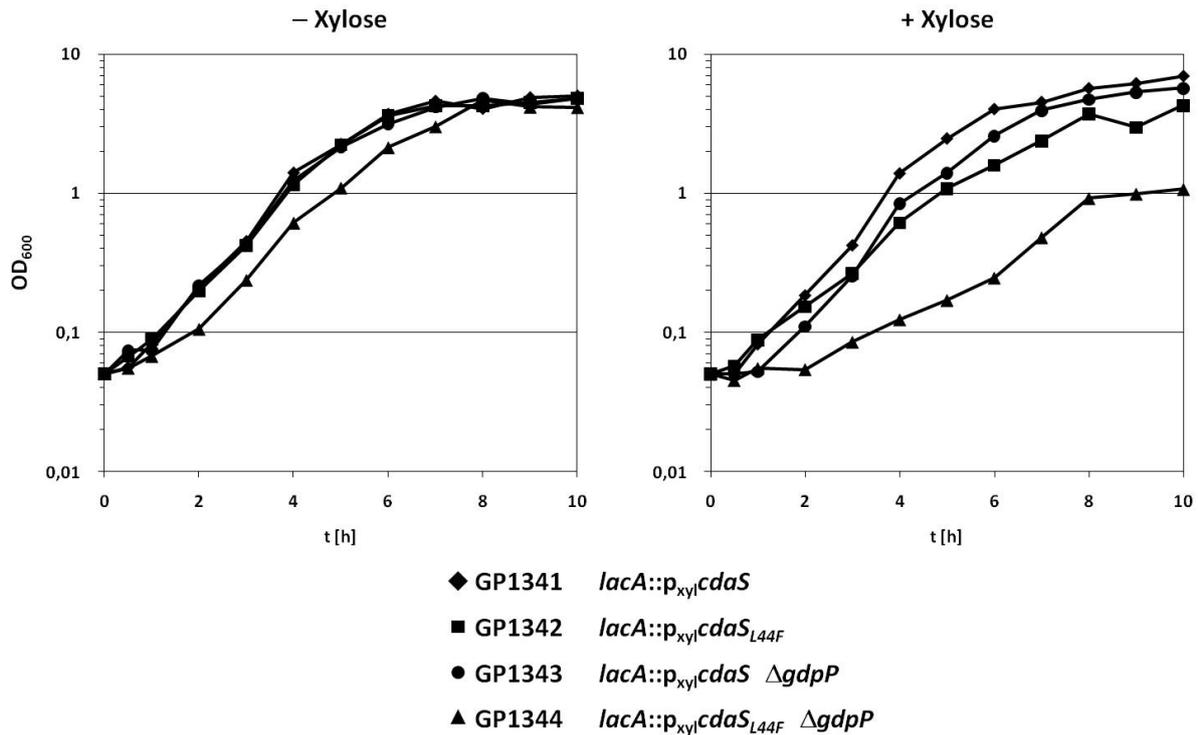


Abbildung 3.2: Einfluss von c-di-AMP auf das Wachstumsverhalten. Die Stämme GP1341, G1342, GP1343 und GP1344 wurden in CSE-Medium mit 0,5% Glucose in An- oder Abwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. Die optische Zelldichte wurde bei 600 nm gemessen (OD_{600}). Für jeden Stamm wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Daraus ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve gezeigt.

Zur genaueren Untersuchung des Wachstumsdefizits durch gesteigerte c-di-AMP-Mengen sollte der Effekt auf die Zellmorphologie geklärt werden. Dafür wurde der Wildtypstamm GP1173 (keine c-di-AMP-Akkumulation) sowie GP1344 (isogene Konstruktion mit 3-fach gesteigerter c-di-AMP-Konzentration) in SP Medium mit oder ohne Xylose (1%) angezogen. Nach 6 h in der exponentiellen Phase und nach 23 h in der stationären Phase wurden Proben genommen und per Phasenkontrastmikroskopie analysiert (Abbildung 3.3). Die Zellmorphologie war ohne den Induktor Xylose für beide Stämme vergleichbar. Exponentiell wachsende Zellen des Stamms GP1344 waren vom Wildtyp GP1173 nicht zu unterscheiden. Genauso verhielten sich Zellen in der stationären Phase (23 h), hier waren bereits einige Sporen sichtbar. Wurden die Stämme in Anwesenheit von Xylose kultiviert, zeigte sich für den Wildtyp GP1173 ebenfalls kein Unterschied zum Wachstum ohne Xylose. Zellen des Stamms GP1344 wiesen in der exponentiellen Phase (6 h) jedoch eine stark veränderte Zellmorphologie auf. Es waren lange, nicht separierte Zellfilamente zu beobachten, die sich in stark verdrillten „Locken“ anlagerten. Interessanterweise konnte dieser Phänotyp in der stationären Phase (23 h) nicht mehr beobachtet werden. Hier waren die Zellen kurz und mit

denen des Wildtyps vergleichbar, einige Sporen waren außerdem vorhanden. Diese Aufhebung des Phänotyps sporulierender Zellen könnte einerseits durch das Auftreten einer Suppressormutation, die die Akkumulation von c-di-AMP verhindert, erklärbar sein. Andererseits ist es möglich, dass sporulierende Zellen unempfindlich gegenüber erhöhten c-di-AMP-Konzentrationen sind. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden wurden Zellen des Stamms GP1344 nach 23 h auf SP-Platten ausplattiert. Nach einigen Tagen wurde von diesen Platten erneut eine SP-Kultur angeimpft, so dass GP1344-Zellen zu beobachten waren, die nach vorangegangener Sporulation einen neuen Zellzyklus durchliefen. Erneut zeigte sich in Anwesenheit von Xylose für exponentiell wachsende Zellen (6 h) der „lockige“ Phänotyp, wohingegen sich dieser in der stationären Phase (23 h) erneut aufhob. Daraus lässt sich schließen, dass die Auswirkung eines erhöhten c-di-AMP-Spiegels auf die Zellmorphologie abhängig von der Wachstumsphase ist. Offenbar wird durch c-di-AMP-Akkumulation ein Prozess der Zellteilung in exponentiell wachsenden Zellen gestört, während dies in der stationären Phase entweder keine Auswirkung mehr hat oder die Störung nicht mehr stattfindet. Des Weiteren fiel auf, dass der „lockige“ Phänotyp nur beobachtet werden konnte, wenn von SP-Platten angeimpft wurde, auf denen die Zellen schon sporuliert waren. Dies weist möglicherweise auf einen Prozess bei der Auskeimung hin.

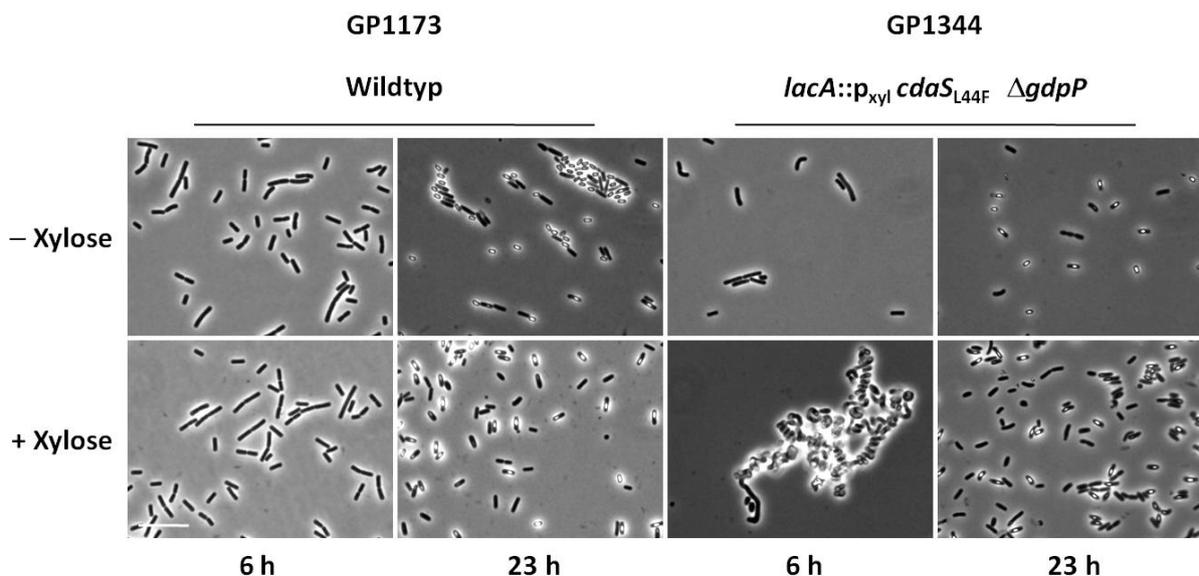


Abbildung 3.3: Einfluss unterschiedlicher c-di-AMP-Spiegel auf die Zellmorphologie. Die Stämme GP1173 und GP1344 wurden in SP-Medium in An- oder Abwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. Nach jeweils 6 h und 23 h Stunden wurden Proben genommen und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Die Zellwand ist ein wichtiger, die Zellmorphologie bestimmender Bestandteil. Eine gestörte Zellmorphologie ist demnach ein möglicher Hinweis auf einen Defekt im Zellwand-Metabolismus. Es wurde bereits beschrieben, dass die Depletion von c-di-AMP einen Defekt in der Peptidoglycansynthese hervorruft, welcher durch die Zugabe von Magnesium wieder aufgehoben werden kann (Luo & Helmann, 2012). Um zu untersuchen, ob sich der Überschuss von c-di-AMP ebenfalls auf die Peptidoglycanmaschinerie auswirkt, wurde getestet, welchen Einfluss die Zugabe von Magnesium auf die Zellmorphologie hat. Die Stämme GP1173 und GP1344 wurden wie oben beschrieben in SP-Medium in Anwesenheit von Xylose (1%) angezogen und nach 7 h mikroskopisch analysiert. Diese Analyse ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration hatte keinen Einfluss auf den Wildtypstamm GP1173. Für den Stamm GP1344, der unter den Testbedingungen einen erhöhten c-di-AMP-Spiegel aufweist, zeigte sich jedoch, dass die Störung der Zellmorphologie bei hoher Magnesiumkonzentration nahezu aufgehoben ist. Dies spricht für einen Defekt der Peptidoglycanmaschinerie durch c-di-AMP-Akkumulation. Einige lange Zellketten deuteten darauf hin, dass sich diese Zellen nicht korrekt teilen konnten und Magnesium den Effekt der c-di-AMP-Akkumulation nicht komplett aufheben kann.

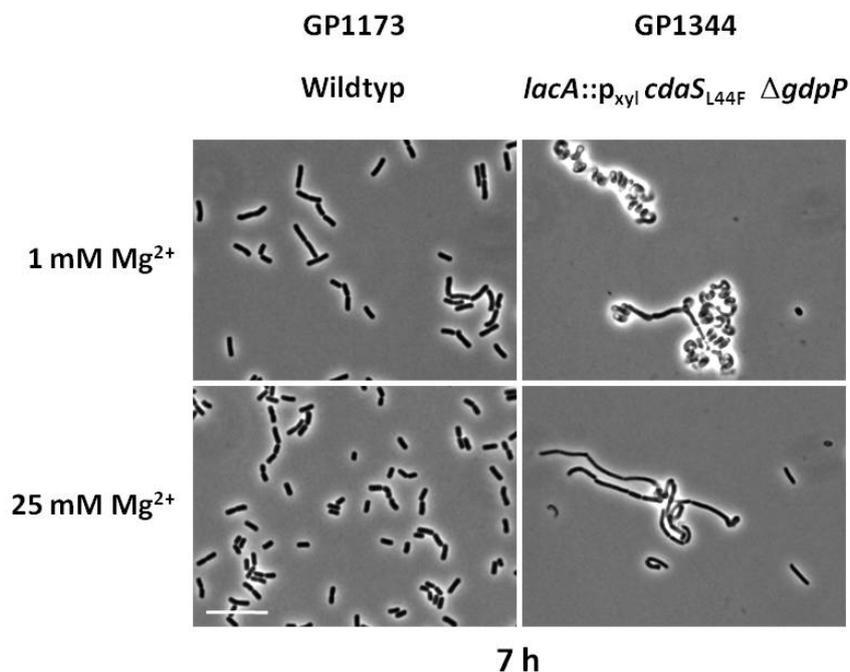


Abbildung 3.4: Einfluss von Mg²⁺ auf die Morphologie von Zellen mit unterschiedlichen c-di-AMP-Spiegeln. Die Stämme GP1173 und GP1344 wurden in SP-Medium in Anwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. MgSO₄ wurde wie in den Konzentrationen 1 mM (Standard) und 25 mM (Überschuss) dazu gegeben. Nach 7 h Stunden wurden Proben genommen und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

3.3 Funktionelle Untersuchungen des *cda-glm*-Moduls

B. subtilis kodiert für die drei Diadenylatzyklasen CdaA, CdaS und DisA, deren Expression völlig unterschiedlich reguliert ist. *disA* ist das letzte Gen im hexacistronischen *ctsR-mcsA-mcsB-clpC-radA-disA*-Operon, außerdem wird *disA* als monocistronische mRNA durch RNA-Polymerase mit dem alternativen Sigmafaktor σ^M exprimiert (Krüger *et al.*, 1996, Jervis *et al.*, 2007). Transkriptionsstudien ergaben, dass *cdaS* spezifisch nur unter Sporulations- und einigen Stressbedingungen exprimiert wird (σ^G und σ^B), *disA* und *cdaA* hingegen konstitutiv (Nicolas *et al.*, 2012). Die unterschiedliche Regulation der Diadenylatzyklasen spricht für verschiedene wichtige Rollen im vegetativen Wachstum von *B. subtilis*, wie auch in der Sporulation. *cdaA* scheint das erste Gen in einem *cdaA-cdaR-glmM-glmS*-Operon zu sein (Nicolas *et al.*, 2012). Die Gene *glmM* und *glmS* sind für die Peptidoglycansynthese essentiell, was auf eine funktionelle Verbindung schließen lässt. Die Funktionen von CdaA und CdaR sollten in diesem Kontext genauer untersucht werden.

3.3.1 Transkriptionelle Organisation des *cda-glm*-Moduls

Um einen genaueren Einblick in die Expression der Diadenylatzyklase CdaA zu erlangen, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Da die *cdaA*-mRNA von der essentiellen Endoribonuklease RNase Y abgebaut wird (Lehnik-Habrink *et al.*, 2011), wurde der Stamm GP193 für dieses Experiment verwendet. GP193 ermöglicht die Depletion von RNase Y durch xylosekontrollierte Expression. Auf diese Weise konnte die Expression von *cdaA* in der Ab- und Anwesenheit von Xylose, und der damit bewirkten Depletion von RNase Y, verglichen werden. Zusätzlich wurde auch der Wildtyp 168 verwendet. Beide Stämme wurden in CSE-Medium mit 0,5% Glucose oder 0,5% Glucosamin angezogen, anschließend wurde die RNA isoliert. Es wurden Sonden gegen alle vier mRNAs *cdaA*, *cdaR*, *glmM* und *glmS* des potentiellen Operons eingesetzt. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. *cdaA* konnte im Wildtyp nicht detektiert werden (Abbildung 3.5 A, CSE glc), was mit dem Abbau durch RNase Y zu erklären ist. Die Depletion von RNase Y im Stamm GP193 hingegen, ermöglichte den Nachweis eines 4,0 kb-Transkripts (Abbildung 3.5 A). Dieses Transkript lässt sich einer tricistronischen mRNA der Gene *cdaA*, *cdaR* und *glmM* zuordnen, auch weil vom stromaufwärts benachbarten *rsiW*-Gen nahezu kein Durchlesen erfolgt (Nicolas *et al.*, 2012). Das gleiche 4,0 kb-Transkript wurde mit Sonden gegen *cdaR* und *glmM* detektiert (Abbildung

3.5 B und C). Mit der *glmM*-Sonde war eine sehr schwache 5,7 kb-Bande erkennbar, die eine tetracistronische *cdaAR-glmMS*-mRNA repräsentieren könnte. Außerdem wurden 1,3 kb- und 3,5 kb-Banden gefunden, welche für monocistronische *glmM*- und bicistronische *glmMS*-Transkripte sprechen (Abbildung 3.5 C). Mit der *glmS*-Sonde war nur eine 2,0 kb-Bande sichtbar, die einer monocistronischen *glmS*-mRNA entspricht (Abbildung 3.5 D). Aufgrund der hohen Signalstärke dieser Bande war der gleichzeitige Nachweis der schwach detektierbaren *glmMS*-mRNA nicht möglich. Die Bande für die *glmS*-mRNA war weniger stark ausgeprägt wenn die Zellen in CSE mit Glucosamin (0,5%) wuchsen. Glucosamin ist die Vorstufe von Glucosamin-6-Phosphat, welches als Effektor für das *glmS*-Ribozym wirkt und so den Abbau des *glmS*-Transkripts einleitet (Winkler *et al.*, 2004, Klein & Ferré-D'Amaré, 2006, Collins *et al.*, 2007). Abbildung 3.5 F zeigt eine schematische Übersicht der Organisation des *cda-glm*-Operons sowie die in der Northern Blot-Analyse gefundenen Transkripte (Abbildung 3.5 A-D). Zur Bestätigung des tetracistronischen 5,7 kb-Transkripts, welches in dieser Analyse nur sehr schwach nachweisbar war, wurde eine reverse Transkription mit nachfolgender PCR an RNA des Wildtyps 168 durchgeführt. Dafür wurden Primerpaare gewählt, die zur Amplifikation der intergenischen Bereiche der beteiligten Gene führen (Abbildung 3.5 F, Pfeile 1-3). Zur Kontrolle wurden identische PCR Ansätze an RNA durchgeführt, welche nicht mit reverser Transkriptase behandelt wurde (Abbildung 3.5 E, -RT). Dass keine Amplifikate entstanden zeigt, dass die RNA-Probe frei von genomischer DNA war. Die amplifizierten Produkte 1-3 (Abbildung 3.5 E, +RT) lassen sich somit eindeutig auf die tetracistronische *cdaA-cdaR-glmM-glmS*-mRNA zurückführen.

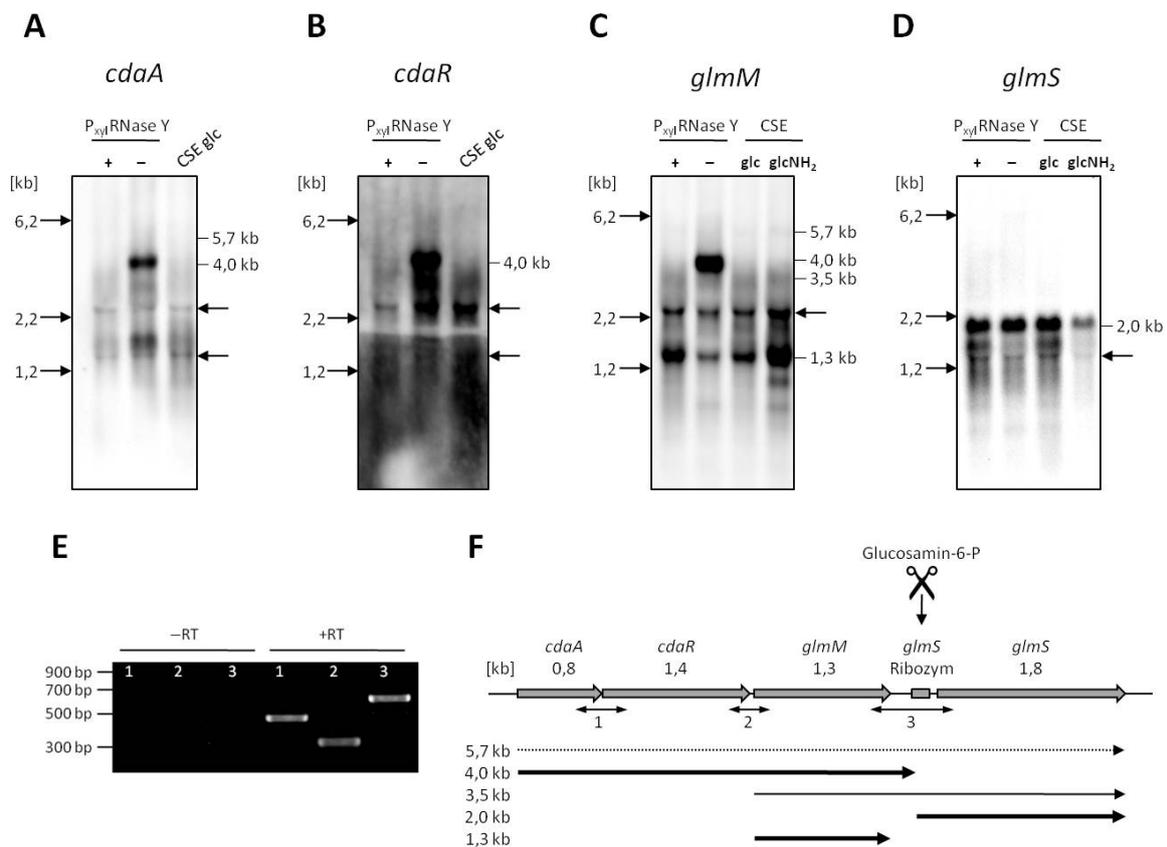


Abbildung 3.5: Genetische Organisation des *cda-glm*-Operons. (A-D) Northern Blot-Analyse des *cda-glm*-Moduls mit Sonden gegen *cdaA* (A), *cdaR* (B), *glmM* (C) und *cdaS* (D). RNA von *B. subtilis* 168 wurde aus Zellen isoliert, die in CSE-Medium mit 0,5% Glucose (glc) oder 0,5% Glucosamin (glcNH₂) gewachsen waren. Für die Depletion der essentiellen RNase Y wurde der Stamm GP193 in CSE-Medium mit oder ohne den Induktor Xylose angezogen. 5 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch getrennt (s. 2.3.4.4), auf eine Nylonmembran gebロットet und mit Gen-spezifischen RNA-Sonden inkubiert. Die Detektionszeit für die *glmS*-Sonde (D) war deutlich verkürzt, deshalb konnte das 3,5 kb-Transkript hier nicht nachgewiesen werden. Die Sonden hybridisierten ebenfalls unspezifisch mit 16 und 23 S rRNA. Die Größen für diese rRNAs sind durch Pfeile markiert. (E) RT-PCR-Analyse des *cda-glm*-Moduls. An RNA aus *B. subtilis* 168 wurde reverse Transkription mit einem zufälligen Nonamer-Primer durchgeführt. Anschließend wurden Primerpaare spezifisch für die intergenischen Bereiche von *cdaA-cdaR* (1), *cdaR-glmM* (2) und *glmM-glmS* (3) (Pfeile in (F)) eingesetzt um durch PCRs diese Bereiche von der ursprünglichen RNA-Matrize zu amplifizieren. Ein identisch behandelter Ansatz ohne die Inkubation mit reverser Transkriptase wurde als Negativkontrolle verwendet (-RT). Alle Experimente wurden jeweils mindestens dreimal mit Proben aus zwei biologischen Replikaten durchgeführt. (F) Schematische Übersicht der genetischen Organisation und der detektierten Transkripte.

Der Nachweis des 3,5 kb-*glmMS*-Transkripts in der Northern Blot-Analyse (Abbildung 3.5 C) ließ auf einen zusätzlichen schwachen Promotor vor dem *glmM*-Gen schließen. Um dies zu verifizieren wurden die stromaufwärts gelegenen Bereiche von *cdaA* und *glmM* an ein promotorloses *lacZ*-Gen fusioniert. So konnten die Promotorstärken durch Messung der resultierenden β -Galactosidase-Aktivität bestimmt werden. Dafür wurden die entsprechenden *B. subtilis* Stämme in CSE-Medium in An- oder Abwesenheit von Glucose (0,5%) oder Glucosamin (0,5%) angezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Zur Kontrolle wurde der Stamm GP1319 eingesetzt, der nur ein

promotorloses *lacZ*-Gen enthielt. Für diesen Stamm wurde lediglich Hintergrundaktivität festgestellt. Für den Stamm GP1339 wurde unter allen Bedingungen eine schwache *cdaA*-Promotoraktivität festgestellt. Solch geringe Aktivität wurde oft für schwach-konstitutive Promotoren beschrieben (Schilling *et al.*, 2007). Für den stromaufwärts gelegenen Bereich von *glmM* konnte hingegen keine Promotoraktivität gemessen werden (GP1340). Die Ergebnisse der *lacZ*-Analysen decken sich mit anderen Untersuchungen. Bioinformatische Transkriptionsstudien sagen einen *sigA*-abhängigen Promotor für *cdaA* voraus, während für *glmM* kein Promotor vorausgesagt wird (Nicolas *et al.*, 2012).

Tabelle 3.2: Promotoraktivitäten stromaufwärts von *cdaA* und *glmM*. Die Stämme GP1319 (Negativkontrolle), GP1339 und GP1340 wurden in CSE-Medium mit oder ohne Glucose (0,5%) oder Glucosamin (0,5%) angezogen. Aus den entsprechenden Zellextrakten wurde die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben.

C-Quelle	Enzymaktivität		
	GP1319 <i>lacZ</i>	GP1339 P_{cdaA} - <i>lacZ</i>	GP1340 P_{glmM} - <i>lacZ</i>
	[Units / mg Protein]		
– (CSE)	2,0 (0,2)	46,0 (0,2)	2,0 (0,3)
Glucose	0,6 (0,1)	34,0 (4,6)	1,0 (0,2)
Glucosamin	0,6 (0,1)	42,0 (3,2)	0,8 (0,3)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das *cda-glm*-Modul durch einen schwach-konstitutiven Promotor stromaufwärts von *cdaA* exprimiert wird. Prozessierungsereignisse durch RNase Y und das *glmS*-Ribozym führen zu der Expression eines *glmMS*-Suboperons.

3.3.2 Aufbau und Lokalisation von CdaA

Die erste Charakterisierung von CdaA erfolgte auf bioinformatischer Grundlage. Die Existenz einer DAC-Domäne lies auf eine Diadenylatzyklase-Aktivität schließen. Außerdem fielen drei Transmembrandomänen auf, die eine membranständige Lokalisation von CdaA nahelegen (Römling, 2008). Die DAC-Aktivität von CdaA konnte wie unter 3.1 beschrieben experimentell bestätigt werden. Für eine eingehendere Charakterisierung sollte die Membranständigkeit ebenfalls untersucht werden. Abbildung 3.6 zeigt den schematischen Aufbau von CdaA. Die drei Transmembrandomänen wurden anhand der Annotation in der Proteindatenbank UniProtKB (Q45589) angegeben. Sie befinden sich im N-terminalen

Bereich. Die Lokalisation der DAC-Domäne innerhalb des Proteins wurde mittels einer BLAST-Analyse ausfindig gemacht. Der verbleibende C-Terminus umfasst circa 40 Aminosäuren. Dieser könnte eine Interaktionsfläche für Protein-Protein-Wechselwirkungen darstellen.

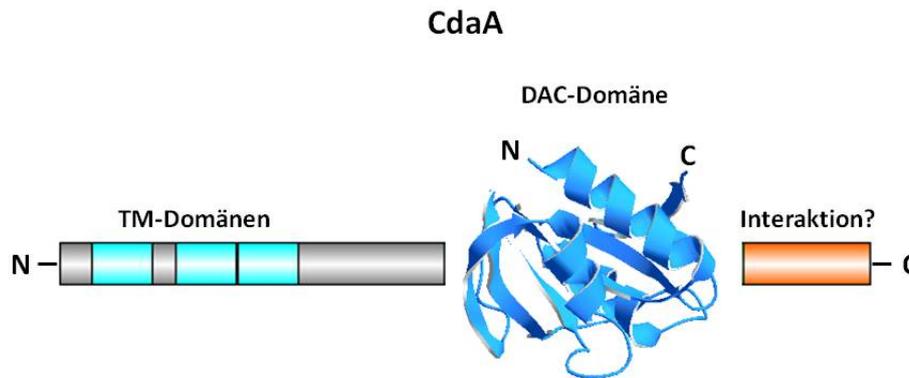


Abbildung 3.6: Architektur von CdaA. Die Proteinstruktur der DAC-Domäne wurde durch bioinformatische Modellierung erstellt und mit dem Programm Swiss Pdb-Viewer visualisiert (s. 3.4.1). Die drei Transmembrandomänen sind mit TM bezeichnet. Der ca. 40 Aminosäure umfassende C-terminale Rest ist in Orange dargestellt.

Um die Membranständigkeit von CdaA zu untersuchen, wurde der Stamm GP1381 hergestellt. Dieser kodiert das Fusionsprotein CdaA-3xFLAG im nativen Locus. Somit verhindert die Expressionsstärke des natürlichen Promotors eine artifizielle Veränderung der Proteinmengen. Weiterhin sorgt die Fusion des FLAG-tags an den C-Terminus dafür, dass die für die Lokalisation wichtigen N-terminalen Transmembrandomänen wahrscheinlich nicht beeinträchtigt werden. GP1381 wurde in 1 l LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Anschließend wurden Cytosol- und Membranfraktionen isoliert (s. 2.3.5.14) und mittels Western Blot analysiert. Jeweils identisch behandelte PVDF-Membranen wurden mit Antikörpern gegen CggR, RNase Y und den FLAG-tag inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Detektionen von CggR und RNase Y wurden zur Kontrolle durchgeführt. CggR ist ein cytosolisches Protein (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). Nach der Trennung in Cytosol- und Membranfraktionen wurde CggR ausschließlich in der Cytosolfraction gefunden (Abbildung 3.7 A). Das zeigt, dass in der Membranfraktion keine cytosolischen Proteine mehr vorhanden waren und somit, dass die Trennung beider Fraktionen vollständig war. Den umgekehrten Fall belegt der Nachweis von RNase Y in der Membranfraktion (Abbildung 3.7 B). Hier war das deutliche Hauptsignal, nur sehr geringe Spuren von RNase Y wurden auch in der Cytosol- und der Waschfraktion gefunden. Da RNase Y membranständig ist (Hahne *et al.*,

2008, Zweers *et al.*, 2009) zeigt diese Kontrolle, dass auch die Cytosolfraktion nahezu frei von Membranproteinen war. CdaA wurde durch den C-terminalen FLAG-tag mit einem entsprechenden Antikörper detektiert. Im Rohextrakt war nur ein schwaches Signal erkennbar (Abbildung 3.7 C). Da CdaA-3xFLAG unter seinem nativen, schwach-konstitutiven Promotor exprimiert wurde, war das zu erwarten. Nach der Trennung in Cytosol- und Membranfraktionen wurde CdaA in der Membranfraktion gefunden. Somit ist anzunehmen, dass die drei N-Terminalen Transmembrandomänen für die Membranständigkeit von CdaA verantwortlich sind.

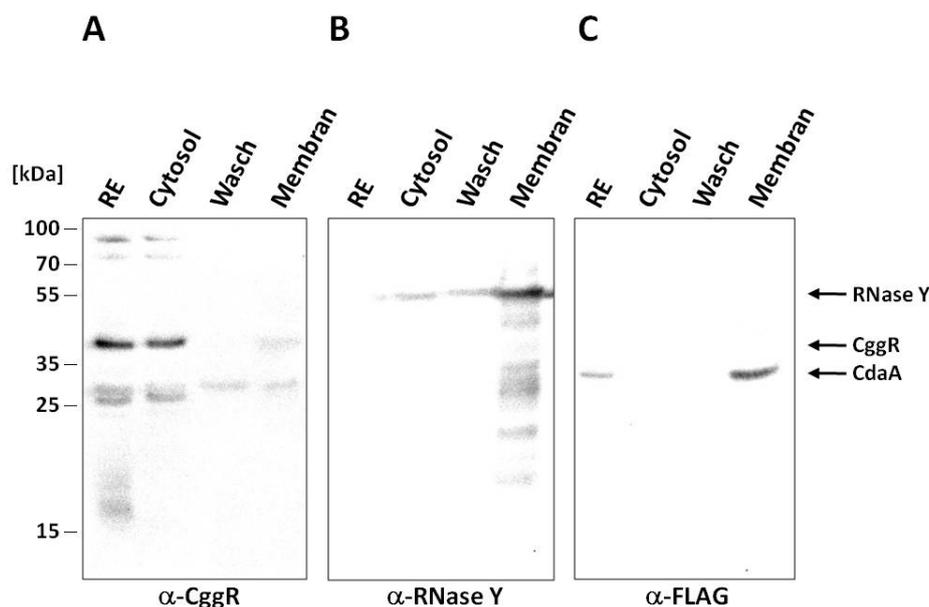


Abbildung 3.7: Lokalisation von CdaA. Trennung von Cytosol- und Membranfraktionen aus dem Rohextrakt (RE) von GP1381. Zu Kontrollzwecken wurden verschiedene Proteine per Western Blot analysiert (A-C). Alle Proben stammen jedoch aus dem identischen Rohextrakt von GP1381. Es wurden 15 μ g RE und 28 μ l der anderen Fraktionen aufgetragen. (A) Detektion des cytosolischen CggR zur Kontrolle auf Kontamination der Membranfraktion. (B) Detektion der membranständigen RNase Y zur Kontrolle auf Kontamination der Cytosolfraktion. (C) Detektion von CdaA-3xFLAG mit spezifischem α -FLAG-Antikörper. Das Experiment wurde zweimal mit biologischen Replikaten durchgeführt.

3.3.3 Die regulatorische Interaktion zwischen CdaA und CdaR

Die Gene *cdaA* und *cdaR* sind direkt benachbart und werden, wie oben gezeigt (3.3.1), in einem gemeinsamen Operon exprimiert. Über die Funktion von *cdaR* war bisher noch nichts bekannt. Das Protein trägt vier Wiederholungen einer ähnlichen, sogenannten YbbR-artigen, Domäne (Barb *et al.*, 2011). Die Nachbarschaft von *cdaA* und *cdaR* ist in den meisten *Firmicutes* konserviert. Die konservierte Koexpression von CdaA und CdaR spricht für eine Regulation der Diadenylatzyklase-Aktivität von CdaA.

Für einen solchen Regulationsmechanismus war eine funktionelle Protein-Protein-Interaktion zwischen CdaA und CdaR zu erwarten. Um diese Interaktion *in vivo* zu identifizieren, wurde der Stamm GP1331 hergestellt, der CdaR-Strep ektopisch sowie CdaA-3xFLAG im nativen Locus exprimiert. SPINE-Analysen wurden wie in 2.3.6.1 beschrieben durchgeführt. Dabei werden interagierende Proteine durch die Zugabe von Formaldehyd vernetzt und dieser Zustand somit „fixiert“. Die Proteinvernetzungen sind unter Erhitzen reversibel. Ein identisch behandelte Ansatz ohne die Zugabe von Formaldehyd kann als Vergleich herangezogen werden. Die Reinigung eines Köderproteins kann dazu führen, dass ein vernetzter Interaktionspartner mitgereinigt wird und dadurch identifiziert werden kann. Die Ergebnisse der SPINE-Analyse sind in Abbildung 3.8 gezeigt. CdaR-Strep wurde aus Rohextrakt des Stamms GP1331 mittels Strep-Tactin®-Sephrose isoliert. Rohextrakt und Elutionsfraktionen wurden per SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Die Detektion mit einem α -FLAG-Antikörper ermöglichte die Visualisierung von CdaA-3xFLAG (Abbildung 3.8 A). CdaA wurde in allen untersuchten Fraktionen gefunden. Dies zeigt, dass CdaA mit CdaR aufgrund einer Protein-Protein-Interaktion koeluiert wurde. Selbst in der unvernetzten Probe (-FA) konnte CdaA nachgewiesen werden, was für eine starke Interaktion spricht. Die vernetzte Probe wurde mit unterschiedlicher Dauer bei 95°C inkubiert (5, 10, 20, 30 min). Hier wurde ein zweites Protein mit einer Größe von circa 60 kDa gefunden. Die Tatsache, dass dies genau die doppelte Größe des CdaA-Monomers (30 kDa) ist, lässt vermuten, dass es sich hierbei um ein CdaA-Dimer handelte, welches durch Formaldehyd vernetzt war. Das reversible Lösen der Quervernetzungen ist in der Regel nach 20 min Erhitzen vollständig (Herzberg *et al.*, 2007). Die zeitlich gewählten Abschnitte der Inkubation bei 95°C zeigen, dass das Signal bei circa 60 kDa mit zunehmender Dauer abnahm. In gleichem Maße nahm die Signalstärke des CdaA-Monomers zu. Dadurch ist die Annahme, dass es sich bei der höheren Bande um ein CdaA-Dimer handelte naheliegend. Um eine unspezifische Detektion von CdaA auszuschließen, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Dafür wurden die Stämme GP1332 und GP1333 konstruiert. GP1332 exprimiert CdaR-Strep und die DEAD-Box-RNA-Helikase CshA mit einem C-terminalen FLAG-tag. Über diesen konnte CshA im Rohextrakt von GP1332 detektiert werden (Abbildung 3.8 B) jedoch nicht in den Elutionsfraktionen von CdaR-Strep. Dies schließt eine unspezifische Bindung von Proteinen an CdaR-Strep aus. Der Kontrollstamm GP1333 exprimiert CshA-Strep und CdaA-

Flag. Auch hier war CdaA im Rohextrakt dieses Stamms vorhanden (Abbildung 3.8 C), aber ebenfalls nicht in den Elutionsfraktionen von CshA-Strep nachweisbar. Diese zweite Kontrolle zeigt, dass CdaA nicht unspezifisch an die Strep-Tactin-Matrix gebunden hat.

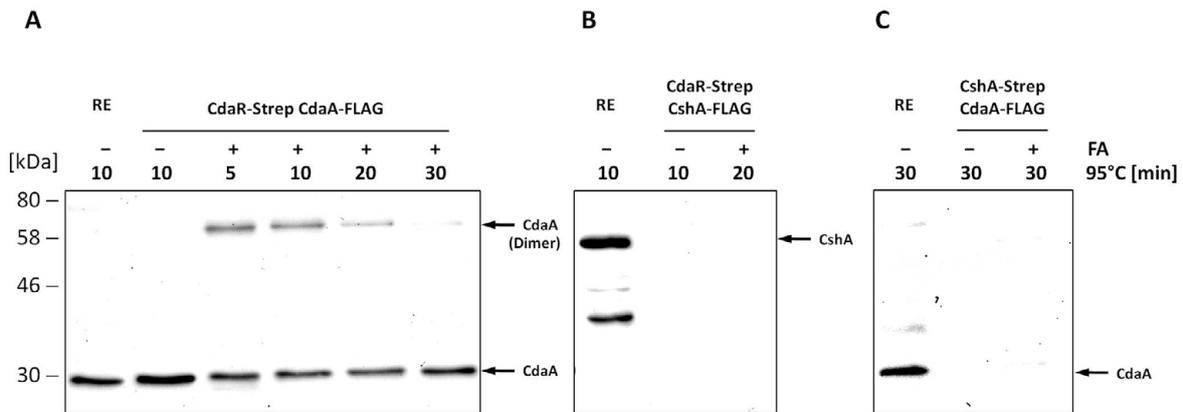


Abbildung 3.8: CdaA und CdaR interagieren *in vivo*. SPINE-Analyse mit den Stämmen GP1331, GP1332 und GP1333. Je zwei *B. subtilis* Kulturen (1 l) wurden parallel in CSE-Medium mit Glucose (0,5%) angezogen. Bei einer OD_{600} von 1 wurde eine Kultur geerntet. Zu der anderen wurde Formaldehyd (FA) dazugegeben, sie wurde weitere 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. 15 µg der Rohextrakte (RE) und 28 µl der Elutionsfraktionen der Reinigungen mit (+FA) oder ohne (-FA) vernetzendem Formaldehyd wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Die Visualisierung erfolgte per Western Blot mit einem α -FLAG-Antikörper. (A) Proben aus GP1331 zeigen, durch Reinigung von CdaR und Koelution von CdaA die Interaktion beider Proteine. Proben aus den Kontrollen (B) GP1332 und (C) GP1333 zeigen, dass mit CdaR Proteine nicht unspezifisch koeluiert werden bzw. dass CdaA nicht unspezifisch an die Strep-Tactin-Matrix bindet.

Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen durch Koelution unterscheidet nicht zwischen einer direkten oder indirekten Interaktion. Vielmehr ist damit die Analyse von Proteinkomplexen möglich. Um herauszufinden, ob CdaA und CdaR direkt miteinander interagieren, wurde daher eine Untersuchung mit dem Bacterial-two-Hybrid-System durchgeführt. Dafür wurden die Gene *cdaA* und *cdaR* via *Xba*I- und *Kpn*I-Schnittstellen in die Vektoren pUT18C und p25-N ligiert, wodurch die Plasmide pGP1989 (pUT18C-*cdaR*), pGP1990 (p25-N-*cdaA*) und pGP1992 (pUT18C-*cdaA*) entstanden. Im Rahmen der Bacterial-two-Hybrid-Untersuchung wurden jeweils zwei dieser Plasmide in allen sinnvollen Kombinationen in den *E. coli*-Stamm BTH101 kotransformiert. Als Positivkontrolle wurden die Plasmide pUT18zip und pKT25zip eingesetzt, die für ein Leucin-Zipper-Motiv kodieren und zu einer starken Interaktion führen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Während zwischen CdaR keine Selbstinteraktion identifizierbar war, konnte für CdaA und CdaR anhand der Blaufärbung der Kolonien eine starke direkte Interaktion nachgewiesen werden.

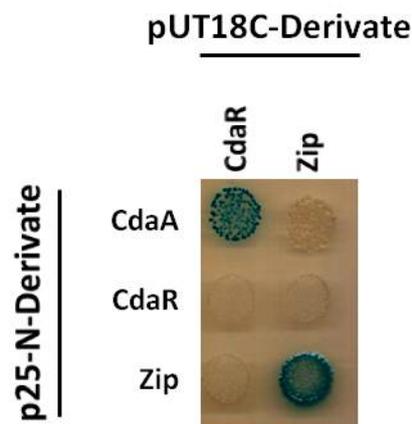


Abbildung 3.9: Direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen CdaA und CdaR. Die Plasmide pGP1989 (pUT18C-*cdaR*), pGP1990 (p25-N-*cdaA*) und pGP1992 (pUT18C-*cdaR*) wurden verwendet um eine Bacterial-two-Hybrid-Analyse wie in 2.3.6.2 beschrieben durchzuführen. Dazu wurden jeweils zwei der Plasmide in den angegebenen Kombinationen in den *E. coli*-Stamm BTH101 kotransformiert. Die Kombination der Plasmide pUT18zip und pKT25zip wurde als Positivkontrolle verwendet. Gleichzeitig diente die Kotransformation von pUT18zip oder pKT25zip und einem der anderen verwendeten Plasmide als Negativkontrolle. Die Blaufärbung der Kolonien zeigt den Abbau von X-Gal aufgrund der Anwesenheit einer funktionalen Adenylatzyklase und somit die direkte Interaktion der untersuchten Proteine an.

Die Funktion von CdaR war noch nicht bekannt, jedoch wurde vermutet, dass das Protein keine DAC-Aktivität besitzt. Die Interaktion zwischen CdaA und CdaR lässt vermuten, dass es sich bei CdaR um einen Regulator der Diadenylatzyklase CdaA handelt. Für einen ersten Einblick in diese Hypothese, wurden zwei Stämme hergestellt, in denen die DAC-Gene *disA* und *cdaS* deletiert waren und die das Sporulations-spezifische Gen *cdaS* unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors exprimierten. Außerdem wurde in der Anwesenheit von Xylose entweder das DAC-Gen *cdaA* (GP1328) oder die Kombination der Gene *cdaA* und *cdaR* (GP1329) deletiert. Um das Wachstum von GP1328 und GP1329 zu analysieren wurden Wachstumskurven in LB-Medium mit oder ohne Xylose durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 gezeigt. Die Deletion von *cdaR* hatte keine Auswirkung, da dieser Stamm mit und ohne Xylose vergleichbar gut wuchs (Abbildung 3.10 A). Die Kombination von $\Delta cdaA$ und $\Delta cdaR$ (GP1329) war ohne Xylose jedoch letal. Dieser Phänotyp war mit dem des Stamms GP1327 vergleichbar ($\Delta cdaA$; s. Abbildung 3.1 C). Daraus lässt sich schließen, dass GP1329 Abwesenheit von Xylose kein c-di-AMP mehr produzieren konnte und deshalb nicht lebensfähig war. Die Deletion des *cdaR*-Gens in GP1328 und GP1329 zeigt, dass es sich bei dem Protein CdaR nicht um eine Diadenylatzyklase handelt. Vielmehr wird durch die Vitalität von GP1328 auch in Abwesenheit von Xylose ersichtlich, dass das verwendete Deletionskonstrukt keine Auswirkung auf das stromabwärts gelegene, essentielle *glmM* hat.

Dies sowie die Tatsache, dass die Doppeldeletion von *cdaA* und *cdaS* möglich ist, schließt die Möglichkeit aus, CdaA würde für die GlmM-Aktivität benötigt. Weiterhin kann man aus diesem Ergebnis schließen, dass CdaA auch in Abwesenheit von CdaR eine DAC-Aktivität besitzt. Dies spricht für eine regulatorische Funktion von CdaR auf CdaA. Somit könnte CdaR ein negativer Effektor für CdaA sein, oder alternativ eine DAC-Basalaktivität von CdaA verstärken. Die direkte Nachbarschaft der Gene *cdaA* und *cdaR* und ihre vermutlich gemeinsame Expression in einem Operon unterstützen diese Annahme und lassen eine funktionelle Verbindung vermuten.

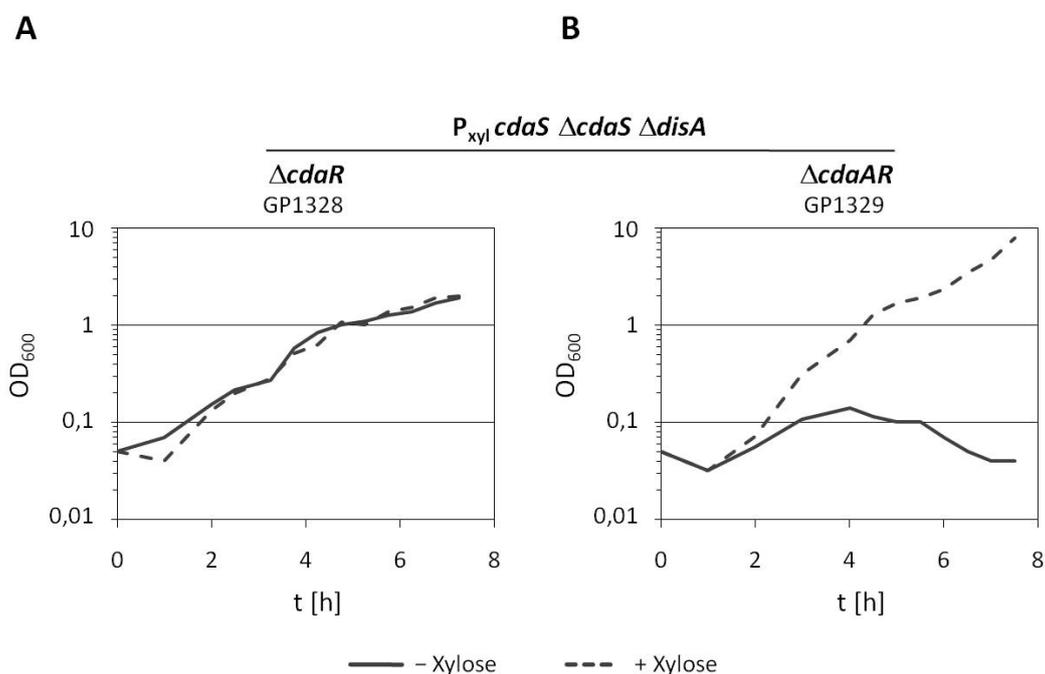


Abbildung 3.10: CdaR ist wahrscheinlich ein Regulator von CdaA. Die Stämme GP1328 und GP1329 wurden in LB-Medium mit oder ohne den Induktor Xylose (1%) angezogen. Die Zelldichte wurde bei 600 nm gemessen (OD_{600}). Für jeden Stamm wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Daraus ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve gezeigt.

Um die Auswirkung von CdaR auf CdaA genauer zu untersuchen, wurden die DAC-Aktivitäten beider Proteine – alleine oder in Kombination – bestimmt. Für diesen Zweck wurde das Plasmid pGP1984 hergestellt, welches das *cdaR*-Gen in dem Expressionsvektor pRSF-Duet-1 trägt. Dieser ist für die gleichzeitige Koexpression mit den Vektoren des pET-Systems (Novagen) in derselben *E. coli*-Wirtszelle geeignet. Außerdem wurde das oben, unter 3.1, beschriebene Plasmid pGP1970 (pET19b-*cdaA*) verwendet. Beide Plasmide wurden alleine oder gemeinsam in *E. coli* BL21(DE3) transformiert bzw. kotransformiert und c-di-AMP aus Rohextrakten von diesen Kulturen wie in 2.3.7.1 beschrieben quantifiziert. Abbildung 3.11

zeigt das Ergebnis dieser Bestimmung. In Kulturen, die CdaR alleine exprimierten, konnte kein c-di-AMP gefunden werden. Bei alleiniger Expression von CdaA wurden 477 ± 37 ng c-di-AMP/mg Protein gemessen. Die gemeinsame Expression von CdaA und CdaR hingegen führte zu einer c-di-AMP-Menge von 2880 ± 175 ng c-di-AMP/mg Protein. Somit führte die zusätzliche Expression von CdaR zu einer 6-fachen Steigerung der c-di-AMP-Menge.

Da auch die Diadenylatzyklasen CdaS und DisA über eine DAC-Domäne verfügen, konnte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass CdaR auch deren Aktivität steigert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden c-di-AMP-Mengen aus Kulturen bestimmt, die die Plasmide pGP1972 (pET19b-*cdaS*) und pGP2563 (pET19b-*disA*) ebenfalls alleine oder gemeinsam mit dem Plasmid pGP1984 (pRSF-Duet-1-*cdaR*) trugen. Egal ob CdaR anwesend war oder nicht, konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Die ermittelten Werte waren mit den in Tabelle 3.1 gezeigten vergleichbar. Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass CdaR spezifisch die DAC-Aktivität von CdaA steigert.

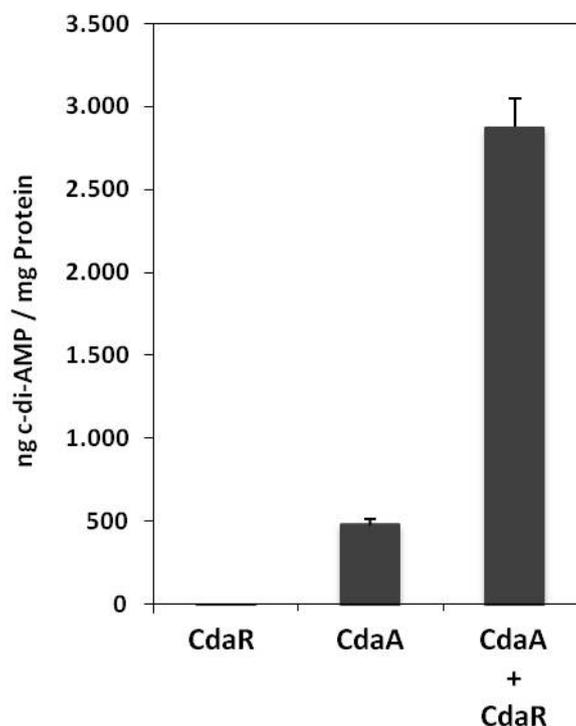


Abbildung 3.11: CdaR stimuliert die DAC-Aktivität von CdaA. Bestimmung von intrazellulärem c-di-AMP aus *E. coli* Kulturen, welche die Expressionsvektoren pGP1970 (pET19b-*cdaA*) und pGP1984 (pRSF-Duet-1-*cdaR*) alleine oder gemeinsam trugen. Die Kulturen wuchsen in LB Medium und die c-di-AMP Konzentrationen wurden wie unter 2.3.7 beschrieben bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt.

3.3.4 CdaA, CdaR und GlmM bilden einen Proteinkomplex

Die Organisation von *cdaA*, *cdaR*, *glmM* und *glmS* in einem gemeinsamen Operon ist sehr auffällig. Dies sowie die Tatsache, dass dieses Modul, mit Ausnahme von *glmS*, in fast allen *Firmicutes* konserviert ist, lässt einen funktionellen Zusammenhang vermuten. Das essentielle Gen *glmM* kodiert für eine Phosphoglucosaminmutase. Sie katalysiert die Isomerisierungsreaktion von Glucosamin-6-Phosphat zu Glucosamin-1-Phosphat, welche einen essentiellen Schritt in der Synthese von Peptidoglycan darstellt (Mengin-Lecreux & van Heijenoort, 1996, Jolly et al., 1999). Glucosamin-6-Phosphat kann auf zwei Wegen generiert werden: (I) Durch Deacetylierung von N-Acetylglucosamin-6-Phosphat durch die N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase (NagA) (Bates & Pasternak, 1965, White & Pasternak, 1967). (II) GlmS, eine Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Transaminase, kann Glutamin und Fructose-6-Phosphat zu Glutamat und Glucosamin-6-Phosphat umsetzen (Bates & Pasternak, 1965). Sie stellt somit das für die Peptidoglycansynthese wichtige Substrat von GlmM aus der Glycolyse bereit, für den Fall, dass dies nicht durch NagA geschehen kann. Dieser redundante GlmS-Mechanismus ist daher nicht immer notwendig, weshalb das Gen *glmS* als fakultativ essentiell betrachtet werden kann. Aus diesem Grund unterliegt die Expression von *glmS* einer Prozessierung durch das *glmS*-Ribozym (Winkler et al., 2004, Klein & Ferré-D'Amaré, 2006, Collins et al., 2007).

Zusammengenommen werfen diese Fakten die Frage auf, warum *glmM* mit den bisher unbekanntenen Genen *cdaA* und *cdaR* in einem gemeinsamen Operon konserviert ist. Es drängt sich der Verdacht eines funktionellen Zusammenhangs auf. Die kürzlich publizierten (Luo & Helmann, 2012) sowie oben beschriebenen Hinweise (3.2.2), dass c-di-AMP für die Zellwand-Synthese wichtig ist, bestärken diese Vermutung. Ein solch funktioneller, eventuell regulatorischer, Zusammenhang ist durch eine Protein-Protein-Interaktion am wahrscheinlichsten.

Deshalb sollte untersucht werden, ob über die Interaktion CdaA-CdaR hinaus weitere Interaktionen mit GlmM möglich sind. In diesem Fall würde sich die Frage nach dem Modus dieser Interaktionen stellen. Denkbar wäre ein sogenannter „ligand switching“-Mechanismus wie aber auch ein Proteinkomplex, in dem alle drei Proteine gleichzeitig interagieren. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurde der Stamm GP1331 für SPINE-Analysen

verwendet. Dieser Stamm exprimiert die Fusionen *cdaR-Strep* und *cdaA-FLAG* im ektopischen bzw. nativen Locus. GP1331 wurde in CSE mit Glucose (0,5%) angezogen. CdaR-Strep wurde aus dem Rohextrakt mittels Strep-Tactin®-Sephrose isoliert. Rohextrakt und Elutionsfraktionen wurden per SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.12 A gezeigt. In den Elutionsfraktionen wurden die Proteine PycA und AccB gefunden. Da PycA und AccB Biotin-tragende Proteine sind, binden sie direkt an die Strep-Tactin®-Matrix und werden ebenfalls isoliert. Darüber hinaus waren drei weitere markante Banden zu sehen, die massenspektrometrisch untersucht wurden. Die Proteine aus diesen Banden wurden als MetE, GlmM und CdaA identifiziert. MetE ist ein Protein, das sehr häufig bei SPINE-Analysen gefunden wird und daher offenbar unspezifisch an die Matrix bindet (Erfahrung und persönliche Kommunikation der AG Prof. Stülke). Der Nachweis von GlmM und CdaA zeigt, dass sie wahrscheinlich mit CdaR-Strep aufgrund einer Interaktion koeluiert wurden. Man kann davon ausgehen, dass alle drei Proteine gleichzeitig interagierten, da die verschiedenen Elutionsfraktionen (-/+ FA) aus derselben Kultur stammen. Die Tatsache, dass CdaA nur in der unvernetzten Probe (- FA) gefunden wurde, lässt sich durch seine Membranständigkeit erklären. Membranproteine zeigen oft ein solches Verhalten, wenn das Köderprotein aufgrund einer Interaktion gebunden wird und sich dann in der Membranfraktion befindet. Köderprotein und Interaktionspartner lassen sich in diesem Fall nicht isolieren. Um zu überprüfen, dass CdaA, CdaR und GlmM tatsächlich gleichzeitig interagieren können, wurde eine weitere SPINE-Analyse ebenfalls mit GP1331 durchgeführt. Die Zellen wurden in SM-Medium mit Glutamin (1%) angezogen. Identische Proben aus dem Rohextrakt und den Elutionsfraktionen wurden in drei verschiedenen Gelen mittels SDS-PAGE getrennt. Zwei dieser Gele wurden für eine Western Blot-Analyse weiter verwendet und mit einem Antikörper gegen den Strep-tag bzw. gegen den FLAG-tag inkubiert. Das dritte Gel wurde durch eine Silberfärbung analysiert. Relevante Proteinbanden wurden ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Die darin enthaltenen Proteine wurden als GlmM identifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.12 B zusammengefasst. Im Rohextrakt von GP1331 wurden alle drei untersuchten Proteine CdaA, CdaR und GlmM gefunden. In den Elutionsfraktionen wurde nicht nur das Köderprotein CdaR-Strep gefunden, sondern gleichzeitig auch die Proteine CdaA und GlmM, egal ob die Zellen mit Formaldehyd behandelt waren oder nicht. Dieses

Ergebnis zeigt, dass alle drei Proteine einen Komplex eingehen können. Über die genaue Stochastik oder die exakte Verteilung der Bindungspartner lässt sich keine Aussage treffen. Aufgrund der bisher untersuchten Interaktionsverhältnisse ist jedoch anzunehmen, dass CdaR im Komplex das zentrale Protein darstellt und sowohl mit CdaA als auch mit GlmM interagiert.

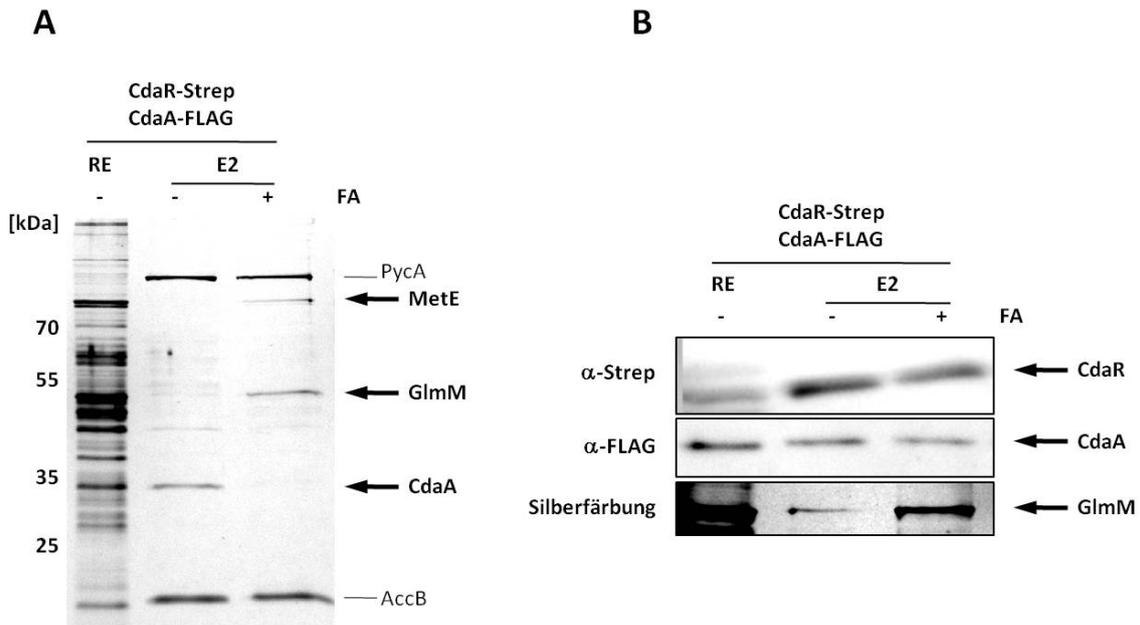


Abbildung 3.12: CdaA, CdaR und GlmM bilden einen Proteinkomplex *in vivo*. Zur SPINE-Analyse wurde 1 l einer *B. subtilis* Kultur des Stamms GP1331 in (A) CSE-Medium mit Glucose (0,5%) oder (B) in SM-Medium mit Glutamin (1%) (B) angezogen. Bei einer OD_{600} von 1 wurde die Hälfte geerntet. Zu der verbliebenen Hälfte wurde Formaldehyd (FA) dazugegeben, sie wurde weitere 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. **(A)** 0,5 µg Rohextrakt (RE) und 28 µl der Elutionsfraktionen (E2) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Silberfärbung visualisiert. Die Proteine PycA und AccB sind Biotin-haltig und binden daher an die Matrix. Markante Proteinbanden wurden untersucht und die darin enthaltenen Proteine als MetE, GlmM und CdaA identifiziert. **(B)** 20 µg des Rohextrakts (RE) und 28 µl der Elutionsfraktionen (E2) wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Die Visualisierung erfolgte per Western Blot mit Hilfe der angegebenen Antikörper. Außerdem wurden 0,5 µg Rohextrakt und 28 µl der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE getrennt und durch Silberfärbung visualisiert. Relevante Proteinbanden wurden massenspektrometrisch untersucht und die darin enthaltenen Proteine als GlmM identifiziert. Der direkte Nachweis aller drei Proteine CdaA, CdaR und GlmM in allen untersuchten Fraktionen zeigt, dass es sich um einen Proteinkomplex handelt.

3.3.5 Ist c-di-AMP ein Mediator für die Stickstoffversorgung?

Um weitere Erkenntnisse zum Zusammenspiel zwischen der Diadenylatzyklase CdaA, ihrem Regulator CdaR und der für die Zellwandsynthese essentiellen Phosphoglucosaminmutase GlmM zu erlangen, sollte die Frage nach einem funktionellen Zusammenhang vertieft werden. Einerseits ist die katalytische Funktion von GlmM bereits gut untersucht, andererseits weist das gemeinsame *cda-glm*-Operon sowie die Interaktion der

resultierenden Proteine auf einen unmittelbaren Zusammenhang hin. Die Zuflussreaktionen für die GlmM-Reaktion beinhalten allesamt wichtige stickstoffhaltige Stoffwechselintermediate. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Stickstoffversorgung der Zelle Einfluss auf GlmM oder den c-di-AMP-Metabolismus hat. Dies könnte sich über die GlmM-abhängige Peptidoglycansynthese auf das Zellwachstum und somit auf die Zelllänge auswirken. Es wäre denkbar, dass Zellen bei guter Stickstoffversorgung länger wachsen bei schlechter Stickstoffversorgung. Ein ähnlicher Mechanismus, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Glucoseversorgung reguliert, ist bekannt (Weart *et al.*, 2007, Chien *et al.*, 2012).

Um einen ersten Einblick in einen möglichen stickstoffabhängigen Effekt auf die Zelllänge von *B. subtilis* zu bekommen, sollten zwei Zustände miteinander verglichen werden: Das Wachstum mit einer guten und einer schlechten Stickstoffquelle. Dafür wurden die Metabolite Glutamin und Glutamat ausgewählt, die ebendiese Eigenschaften aufweisen. *B. subtilis* verwertet Glutamin als favorisierte Stickstoffquelle und kann bei Bedarf auf weniger präferierte Quellen wie Glutamat oder Ammonium zurückgreifen (Detsch & Stülke, 2003, Commichau, 2006). Glutamin oder Glutamat (1%) wurden dem SM-Medium zugesetzt (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Dieses eignet sich als Minimalmedium, dem eine definierte N-Quelle zugefüttert werden kann. Außerdem wurde zur Untersuchung eine Stammserie ausgewählt, die wesentliche Rückschlüsse auf den c-di-AMP-Metabolismus und GlmM zulässt. Der Stamm GP991 ($\Delta disA \Delta cdaS$) wurde für diese Untersuchungen als Wildtyp definiert, um c-di-AMP-Effekte einzig auf das *cda-glm*-Modul zurückführen zu können. Im Vorfeld wurde sein Wachstum unter den Testbedingungen mit dem Wildtyp 168 verglichen und es konnte kein Unterschied festgestellt werden (nicht gezeigt). Die im Folgenden hergestellten Stämme basieren alle auf einem $\Delta disA \Delta cdaS$ -Hintergrund. Zunächst wurde der Stamm GP1346 ($\Delta disA \Delta cdaS \Delta cdaR$) konstruiert. Die Deletion des Aktivators *cdaR* sowie die Anwesenheit der Phosphodiesterase *gdpP* sollte zu einem Stamm führen, der nur noch eine *cdaA*-vermittelte DAC-Basalaktivität aufweist und somit über einen niedrigen c-di-AMP-Spiegel. Weiterhin wurden zwei isogene Stämme hergestellt: Im $\Delta disA \Delta cdaS$ -Hintergrund wurde *glmM* ektopisch unter die Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors gestellt. Dies wurde jeweils mit dem *glmM*-Gen aus *B. subtilis* und *E. coli* durchgeführt. Durch die ektopische Expression von *glmM* in Gegenwart des Induktors Xylose konnte durch

Transformation der chromosomalen DNA von GP588 das essentielle *glmM*-Gen im nativen Locus deletiert werden. Dadurch entstanden die Stämme GP1383 ($\Delta disA \Delta cdaS \Delta glmM P_{xyI} glmM_{Bsu}$) und GP1374 ($\Delta disA \Delta cdaS \Delta glmM P_{xyI} glmM_{Eco}$), die sich nur noch in der Herkunft des *glmM*-Gens unterschieden – *glmM*_{Bsu} aus *B. subtilis* und *glmM*_{Eco} aus *E. coli*. Die resultierenden Proteine beider Organismen sind sich sehr ähnlich (45% Identität, 75% Ähnlichkeit), da *E. coli* jedoch kein c-di-AMP bildet (Corrigan *et al.*, 2011), können sich etwaige c-di-AMP-Effekte auf das GlmM-Protein nur auf GlmM_{Bsu} nicht aber auf GlmM_{Eco} auswirken. Die Deletion des essentiellen nativen *glmM*-Allels zeigt, dass die ektopischen *glmM*-Allele beider Stämme, GP1383 und GP1374, komplementieren konnten und somit zu einem funktionellen GlmM führten. Die Stämme der Serie aus GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) angezogen und bei ähnlicher optischer Dichte in der exponentiellen Wachstumsphase durch Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis. Der Wildtypstamm GP991 zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den ausgewählten Testbedingungen. Je nach dem, ob die Bakterien mit guter (Glutamin) oder schlechter (Glutamat) N-Quelle wuchsen, waren die Zellen entweder lang oder kurz. GP1346-Zellen hingegen, die aufgrund der *cdaR*-Deletion einen niedrigen c-di-AMP-Spiegel haben müssten, zeigten diesen Unterschied nicht und waren ausschließlich kurz. GP1383, der über GlmM_{Bsu} verfügt, zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp, die Zellen waren sehr lang (Glutamin) oder ausschließlich kurz (Glutamat). GP1374-Zellen hingegen, die über GlmM_{Eco} verfügen, waren unter beiden Bedingungen ausschließlich kurz. Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass die Qualität der N-Quelle für *B. subtilis* wichtig ist und sich dies in der Zelllänge widerspiegelt. Weiterhin scheint c-di-AMP eine Rolle in dieser Regulation zu spielen, da GP1346, dem der Regulator CdaR fehlt und der einen niedrigen c-di-AMP-Spiegel aufweisen müsste, diese nicht mehr ausüben konnte. Ebenfalls scheint GlmM in c-di-AMP-abhängiger Weise involviert zu sein, da der Stamm mit dem *B. subtilis*-Protein (GP1383) zu der Zelllängen-Regulation in der Lage war, der Stamm mit dem *E. coli*-Protein (GP1374) jedoch nicht.

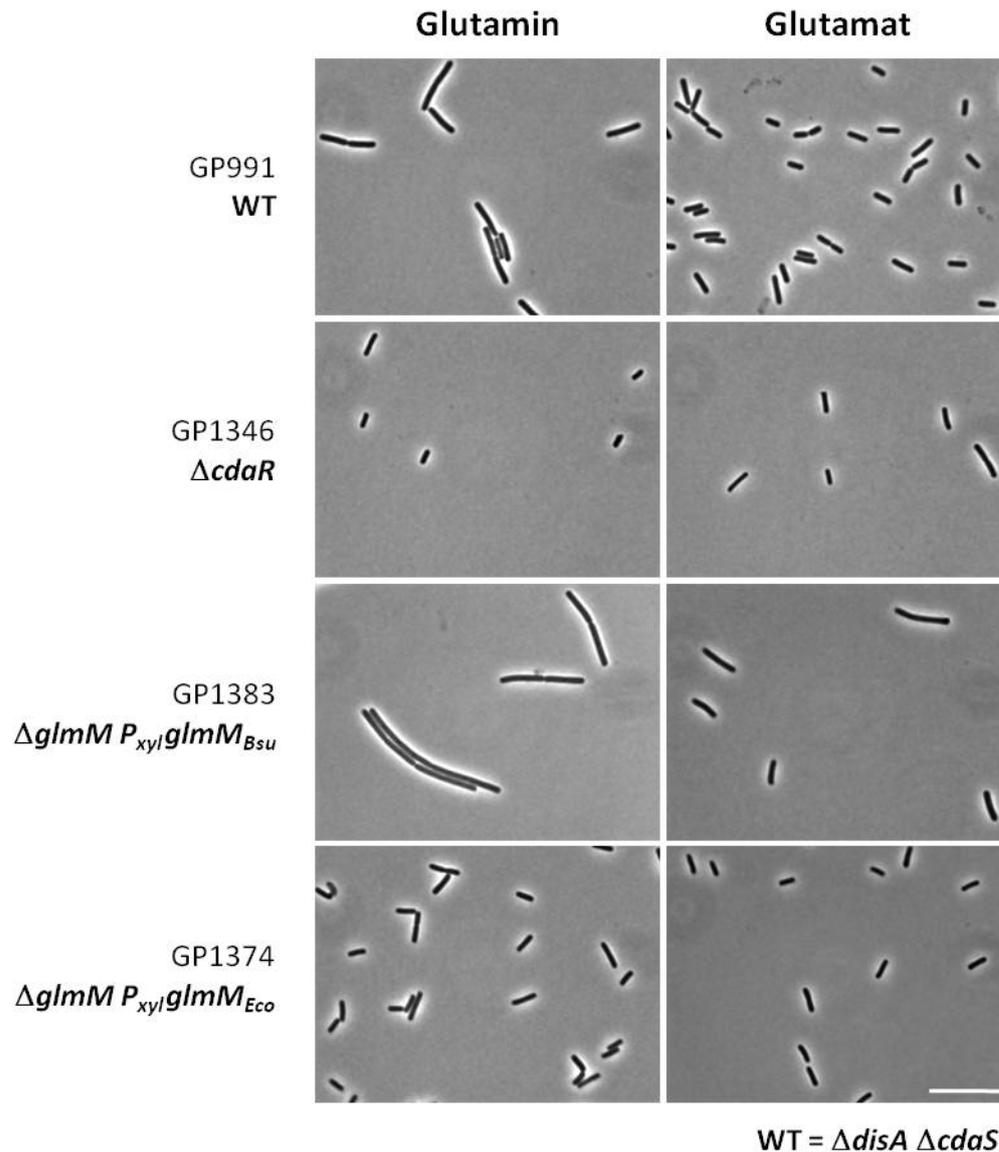


Abbildung 3.13: Die Qualität der N-Quelle hat einen Einfluss auf die Zelllänge. Die Stämme GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. GP1383 und GP1374 wuchs zusätzlich mit 1% Xylose zur Induktion des *glm*-Allels. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlich optischer Dichte Proben genommen und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Die Proben wurden dafür nicht zentrifugiert. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Alle Analysen wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Davon ist jeweils ein charakteristisches Ergebnis dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Die oben beschriebene Untersuchung der Zelllänge in *B. subtilis* vermittelte einen ersten Eindruck über eine neuartige stickstoffabhängige Regulation. Die Auswertung basierte jedoch auf subjektiven Kriterien und war nicht statistisch abgesichert. Um diesen Anforderungen zu genügen, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt. Die Stammserie aus GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 wurde unter denselben Bedingungen kultiviert (SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%)). Nach der Probenentnahme wurde eine Nilrotfärbung durchgeführt, wofür die Zellen kurz zentrifugiert werden mussten. Daraufhin

wurden sie durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der Farbstoff Nilrot eignet sich zur spezifischen Färbung der Zellmembranen. Auf diese Weise waren die Zellseparierungen exakt zu erkennen und somit eine eindeutige Unterscheidung zwischen einzelnen oder separierten benachbarten Zellen möglich. Mit Hilfe der Software AxioVision Rel 4.7 wurden die genauen Längen von 200 Zellen aus jeder Anzucht bestimmt. Anhand dieser Daten war ein Vergleich der Zelllängen auf objektiver und statistischer Ebene möglich. Zur Auswertung wurden zwei Vergleichsgrößen herangezogen. Erstens der Mittelwert der Längen von 200 Zellen. Zweitens wurde ein Grenzwert (GW) wie folgt definiert: Mittelwert von Zellen aus glutamathaltigem Medium multipliziert mit 1,5. Zelllängen unterhalb des Grenzwerts wurden als „kurz“ betrachtet, oberhalb des Grenzwerts als „lang“. Somit diente dieser Grenzwert als objektives Kriterium zur Unterscheidung zwischen kurzen und langen Zellen. Abbildung 3.14 stellt das Ergebnis dieser Auswertung von jeweils 200 Zelllängen als Histogramm dar. Genau wie in der oben beschriebenen phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung waren die Zellen von GP991 und GP1383 unterschiedlich lang, je nachdem ob sie mit Glutamin oder mit Glutamat wuchsen. Die zeigt sich durch die verschiedenen Mittelwerte sowie die Verteilung der Zelllängen im Histogramm. Ebenfalls zeigten die Zellen der Stämme GP1346 und GP1374 diesen Unterschied nicht. Die Mittelwerte und Zelllängenverteilung waren nahezu identisch. Setzt man die Zelllängen in Relation zum Grenzwert entsteht ein ähnliches Bild: Alle Stämme hatten ausschließlich kurze Zellen wenn sie in Glutamat wuchsen. Bei Kultivierung in Glutamin hingegen gab es signifikante Unterschiede. Während 24% der untersuchten Zellen des Wildtyps lang waren, waren es nur 8% bei GP1346. Die isogenen Stämme GP1383 und GP1374 wiesen 15% und 5% lange Zellen auf. Die Ergebnisse der Phasenkontrastmikroskopie und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen können hiermit bestätigt werden. Zusätzlich fällt auf, dass der Stamm GP1383 unter beiden Bedingungen insgesamt längere Zellen zeigte als der Wildtyp.

Die Messung der *in vivo* c-di-AMP-Spiegel der Stämme GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 unter den obigen Testbedingungen wurde ebenfalls durchgeführt. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypniveau festgestellt werden.

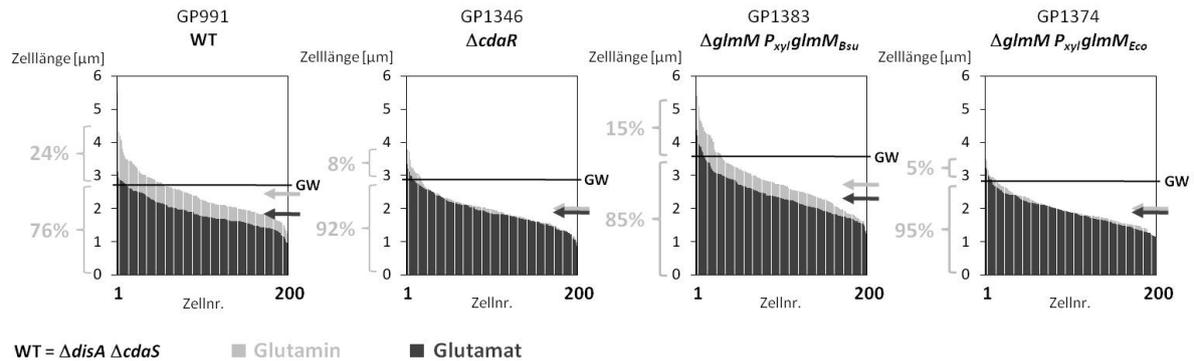


Abbildung 3.14: Statistische Auswertung der Zelllängenverteilung in Abhängigkeit von der Qualität der N-Quelle nach Nilrotfärbung. Die Stämme GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. GP1383 und GP1374 wuchs zusätzlich mit 1% Xylose zur Induktion des *glmM*-Allels. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlicher optischer Dichte Proben genommen, mit Nilrot gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Proben mussten dafür kurz zentrifugiert werden. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Die Mittelwerte der Längen von je 200 Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Grenzwert (GW) ist durch eine horizontale Linie im Diagramm dargestellt. Die Längenverteilung zwischen kurzen und langen Glutamin-gewachsenen Zellen ist in Prozent angegeben. Alle Analysen wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Davon ist jeweils ein charakteristisches Ergebnis dargestellt.

Um die Hypothese zu bekräftigen, dass die Qualität der Stickstoffversorgung einen c-di-AMP-abhängigen Einfluss auf die Zelllänge hat, wurde eine weitere Untersuchung angestrebt. Bei der Analyse mittels Nilrotfärbung mussten die Bakterien kurz zentrifugiert werden. Um sicher auszuschließen, dass dies Auswirkungen auf die Zellmorphologie gehabt haben könnte, wurde ein weiterer Ansatz gewählt, der ohne Zentrifugationsschritt auskommt. Durch konstitutive GFP-Expression sollte die Untersuchung genau wie für die Nilrotfärbungen ermöglicht werden. Zunächst wurde ein Stamm mit einem konstitutiv exprimierten *gfp*-Gen im *amyE*-Lokus als Wildtypstamm für dieses Experiment hergestellt (GP1387). Zur Deletion von *cdaR* wurde ein entsprechendes LFH-PCR-Produkt in GP1387 transformiert wodurch der Stamm GP1399 entstand. Genetisch ist GP1399 zu dem oben untersuchten Stamm GP1346 analog und müsste demnach durch die Abwesenheit des Regulators CdaR und die Anwesenheit der Phosphodiesterase GdpP einen niedrigen c-di-AMP-Spiegel aufweisen. Für die oben verwendeten isogenen Stämme GP1383 und GP1374, die sich nur in der Herkunft ihres *glmM*-Allels unterscheiden (*glmM_{Bsu}* bzw. *glmM_{Eco}*), konnten aus genetischen Gründen keine Analoge erstellt werden, somit stand die vollständige Stammserie für dieses Experiment nicht zur Verfügung. Die Stämme GP1387 und GP1399 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert und Proben bei ähnlicher optischer Dichte genommen. Diese wurden nicht zentrifugiert, sondern direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung 3.15 zeigt einen Überblick der

untersuchten Zellen. Hierbei wird augenscheinlich ersichtlich, dass erneut der Wildtyp längere Zellen in glutaminhaltigem als in glutamathaltigem Medium aufwies. Der Stamm GP1399, der aufgrund der *cdaR*-Deletion einen niedrigen c-di-AMP-Spiegel haben sollte, tat dies nicht.

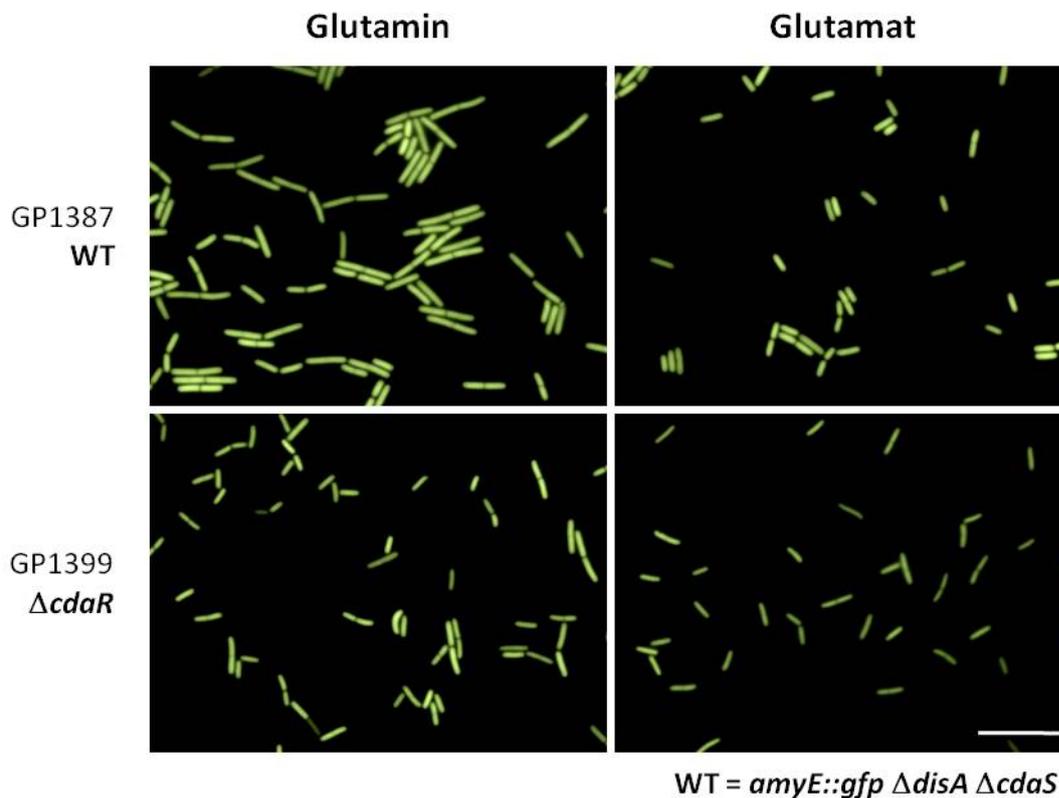


Abbildung 3.15: Visualisierung der Zelllängen durch GFP-Färbung. Die Stämme GP1387 und GP1399 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlich optischer Dichte Proben genommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Proben wurden dafür nicht zentrifugiert. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Nach den oben beschriebenen Prinzipien wurden die Längen von je 200 Zellen ermittelt und ausgewertet. Abbildung 3.16 zeigt die Darstellung dieser Auswertung. Die Mittelwerte waren für den Wildtyp unterschiedlich, was zeigt, dass in Glutamin längere Zellen vorlagen als in Glutamat. Für die CdaR-Mutante GP1399 hingegen, waren die Mittelwerte identisch. Auch die Betrachtung der Grenzwerte zeigt, dass in glutamathaltigem Medium alle Zellen kurz waren. In glutaminhaltigem Medium hingegen wies der Wildtyp 30% lange Zellen auf, GP1399 nur 4%. Die Ergebnisse beider Färbungsmethoden mit Nilrot und der GFP korrelieren sehr gut miteinander. Daher kann eine verfälschende Einwirkung auf die Zelllänge durch das kurze Zentrifugieren ausgeschlossen werden.

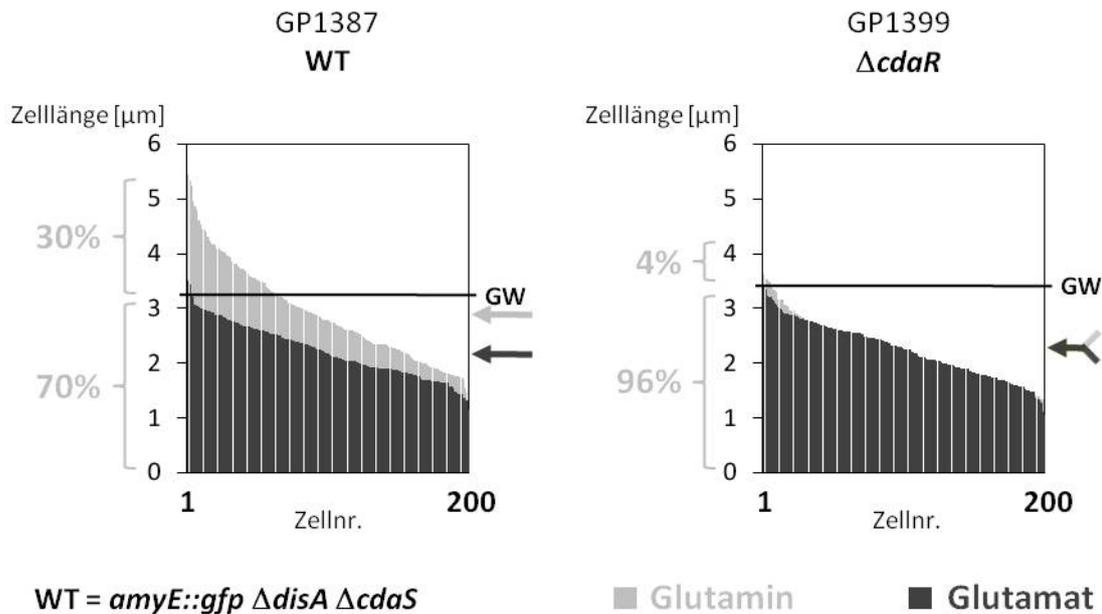


Abbildung 3.16: Statistische Auswertung der Zelllängenverteilung in Abhängigkeit von der Qualität der N-Quelle nach GFP-Färbung. Die Stämme GP1387 und GP1399 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlich optischer Dichte Proben genommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Proben wurden dafür nicht zentrifugiert. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Die Mittelwerte der Längen von je 200 Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Grenzwert (GW) ist durch eine horizontale Linie im Diagramm dargestellt. Die Längenverteilung zwischen kurzen und langen Glutamin-gewachsenen Zellen ist in Prozent angegeben.

Abschließend kann gesagt werden, dass die eingangs getätigte Hypothese einer c-di-AMP- und GlmM-vermittelten Regulation der Zelllänge in Abhängigkeit der Stickstoffversorgung hier nur anfänglich untersucht wurde. Jedoch wurden eindeutig bestätigende Indizien für diese Hypothese gefunden und auf vielfältige und statistische Weise abgesichert.

3.4 Die DAC-Aktivität von CdaS wird durch eine autoinhibitorische Domäne reguliert

3.4.1 Identifizierung von hyperaktiven CdaS-Varianten

Wie unter 3.2.1 beschrieben, war der Stamm GP1327 ($P_{xyI}cdaS \Delta cdaS \Delta cdaA \Delta disA$) ohne Xylose nicht lebensfähig, da in diesem Fall keine Diadenylatzyklase zur c-di-AMP-Produktion exprimiert wurde. Nach einigen Tagen Inkubation auf LB-Platten bildeten sich jedoch kleine Kolonien, die auch ohne Xylose wachsen konnten. Für das Auftreten dieser Suppressoren

sind vier denkbare Erklärungen möglich: (I) Die Inaktivierung des *xyIR*¹-Gens würde zur konstitutiven Expression *cdaS*-Expression führen. (II) Eine Mutation im *xyI*-Promotor würde zur konstitutiven Promotoraktivität und somit *cdaS*-Expression führen. (III) Die Inaktivierung eines unbekanntes essentiellen c-di-AMP-Rezeptors könnte bewirken, dass c-di-AMP nicht länger benötigt wird. (IV) Eine Mutation im *cdaS*-Gen, so dass auch bei sehr geringem Expressionsniveau (minimal undichter Promotor) ausreichend c-di-AMP gebildet werden kann. Die erste Möglichkeit war sehr unwahrscheinlich, da GP1327 über zwei Kopien des *xyIR*-Allels verfügt – eine im nativen und eine im ektopischen *lacA*-Lokus. Die dritte Möglichkeit war nicht auszuschließen, wurde aber nicht weiter verfolgt. Zum damaligen Zeitpunkt gab es keine konkreten Hinweise auf einen c-di-AMP-Rezeptor. Für eine eingehende Untersuchung hätte daher das Genom jedes Suppressors sequenziert werden müssen. Um zwischen der zweiten und vierten Möglichkeit zu unterscheiden, wurden die *P_{xyI}cdaS*-Bereiche im ektopischen *lacA*-Lokus von über 80 isolierten Suppressoren sequenziert. In einer Suppressormutante, GP1348, wurden zwei Mutationen in der XylR-Bindestelle gefunden. Am Ende des „Spacers“ zwischen den beiden Teilen der palindromischen Sequenz war ein zusätzliches A eingebaut. Außerdem war das A an Position vier der zweiten Palindromeinheit durch ein T ersetzt. Durch diese beiden Mutationen änderte sich die Länge des „Spacers“ und das Palindrom wurde zerstört. „Spacer“ und Palindrom sind beide für eine effiziente Reprimierung durch XylR wichtig (Gärtner *et al.*, 1992, Dahl *et al.*, 1994), somit wurde die zweite Möglichkeit der erwarteten Mutationen bestätigt. Es ist anzunehmen, dass *cdaS* in GP1348 durch die *P_{xyI}*-Inaktivierung konstitutiv exprimiert wurde. Identische wie aber auch ähnliche Mutationen im *xyI*-Promotor wurden in großer Zahl gefunden. Darüber hinaus konnten Einzelmutationen im *cdaS*-Gen von sechs Suppressoren identifiziert werden und somit auch die vierte Möglichkeit der erwarteten Mutationen bestätigt werden. Zum Beispiel war in Suppressor GP1334 das C an Position 130 durch ein T ersetzt, wodurch im kodierten Protein ein Austausch von Leucin zu Phenylalanin resultierte. Tabelle 3.3 gibt eine genaue Übersicht über die identifizierten Mutationen. Die Mutation C121A (Q41K) wurde in einem ersten Sequenzierungsansatz gefunden, in dem

¹ Kodiert für den Xyloserepressor, der *P_{xyI}* in Abwesenheit von Xylose reprimiert. Dafür bindet er eine spezifische XylR-Erkennungssequenz.

durch Kolonie-PCR amplifizierte Templates verwendet wurden. Bei weiteren Ansätzen in denen von chromosomaler DNA generierte PCR-Produkte sequenziert wurden, konnte diese Mutation jedoch nicht bestätigt werden. Möglicherweise war der isolierte Suppressorstamm kein Einzelklon, eine oder mehrere andere Mutationen könnten sich demnach durchgesetzt haben. Der Suppressor erhielt daher keine Stammnummer und wurde nicht weiter untersucht.

Tabelle 3.3: Suppressorenscreening identifiziert relevante Mutationen. GP1327 wurde ohne Xylose inkubiert, was zur Bildung von Suppressorkolonien führte. Von diesen wurden über 80 isoliert und die $P_{xyl}cdaS$ -Bereiche sequenziert.

Stammnr.	Ort der Mutation	Art der Mutation	Auswirkung
>70 Suppressoren ohne Nr.	<i>xyl</i> -Promotor	Änderung XylR- Bindestelle	konstitutive <i>cdaS</i> -Expression
–	<i>cdaS</i> -Gen	C121A	Q41K
GP1334	<i>cdaS</i> -Gen	C130T	L44F
GP1354	<i>cdaS</i> -Gen	G136A	E46K
GP1350	<i>cdaS</i> -Gen	C182T	A61V
GP1353	<i>cdaS</i> -Gen	C227T	A76V
GP1355	<i>cdaS</i> -Gen	C602A	P201Q

Um zu verifizieren, dass der Suppressorphänotyp tatsächlich durch die Mutation im *cdaS*-Gen und nicht durch Sekundärmutationen entstanden ist, wurde chromosomale DNA des Suppressors GP1334 in GP991 ($\Delta disA \Delta cdaS$) transformiert. Klone welche die Gene für alle drei Diadenylatzyklen deletiert hatten und das mutierte *cdaS*-Gen im *lacA*-Lokus trugen wurden durch Selektion mit Kanamycin und Chloramphenicol isoliert. Diese Klone wurden in der Abwesenheit von Xylose inkubiert, um zu testen, ob allein die Mutation *cdaS*_{L44F} für das Auftreten des Suppressorphänotyps verantwortlich war. Tatsächlich waren alle Klone ohne Xylose lebensfähig. Somit ist anzunehmen, dass auch die anderen *cdaS*-Mutationen in den Suppressoren GP1350, GP1353, GP1354 und GP1355 alleinig in der Lage waren, diesen Phänotyp hervorzurufen. Für eine eingehende Analyse der fünf identifizierten *cdaS*-Mutationen wurde zunächst ein Modell der CdaS-Proteinstruktur entworfen. Mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers zur Homologiemodellierung (Kiefer *et al.*, 2009) wurde ein

dreidimensionales Modell anhand der bekannten Struktur des homologen CdaS-Proteins aus *Bacillus cereus* (Protein Data Bank Nr. 2FB5) und der CdaS-Proteinsequenz von *B. subtilis* erstellt. Dieses Modell ist in Abbildung 3.17 gezeigt. Die konservierte globuläre DAC-Domäne ist in hellblau zu sehen. Außerdem existieren zwei N-terminale Helices (H1 und H2) die durch eine Schleife (loop) miteinander verbunden sind und durch eine weitere Schleife mit der DAC-Domäne verbunden sind. Zwei der identifizierten Mutationen waren direkt in der Schleife lokalisiert (L44F und E46K), die Mutation A61V befand sich in der zweiten Helix (H2) und die Mutation A76V in der Schleife unmittelbar vor der DAC-Domäne. Auffällig ist, dass alle Mutationen außerhalb der DAC-Domäne lokalisiert waren, mit Ausnahme von P201Q sehr nahe am C-Terminus. Dies führte zu der Frage, ob die Helices eine regulatorische Funktion für die Aktivität der DAC-Domäne haben können. Außerdem fiel auf, dass sich zwei Cysteinreste an Position 42 und 45 in der Schleife sehr nahe beeinander befinden. Möglicherweise könnte eine Disulfidbrücke innerhalb der Schleife wichtig für die Anordnung der Helices sein.

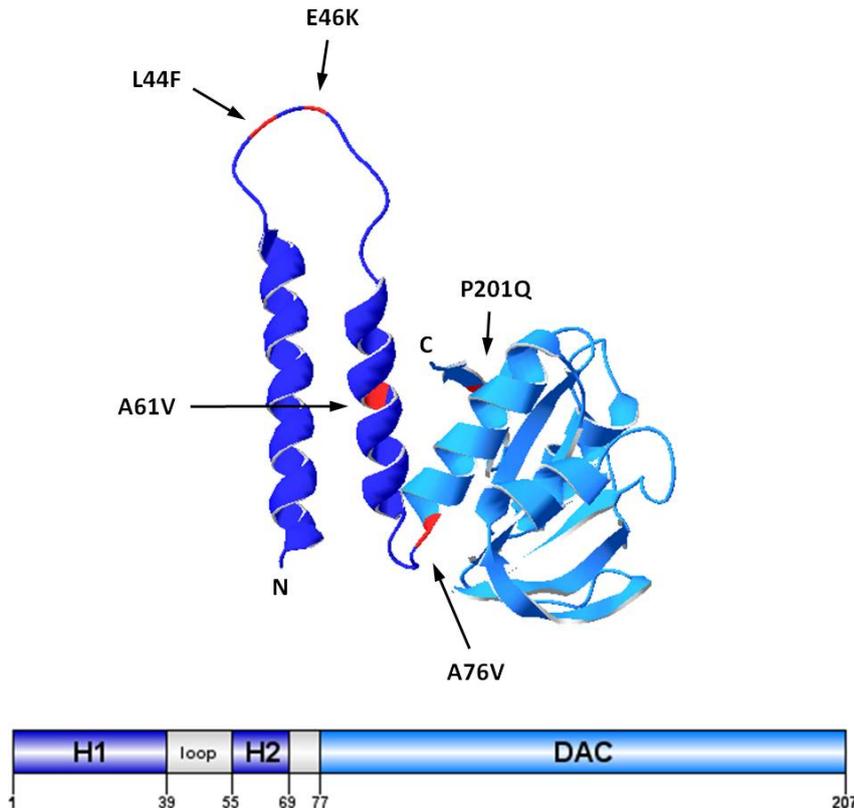


Abbildung 3.17: Modell der CdaS-Struktur. (oben) Mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers zur Homologiemodellierung (Kiefer *et al.*, 2009) wurde ein dreidimensionales Modell anhand der bekannten Struktur des homologen CdaS-Proteins aus *B. cereus* (Protein Data Bank Nr. 2FB5) und der CdaS-Proteinsequenz von *B. subtilis* erstellt. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm Swiss Pdb-Viewer. Die durch Suppressorenscreening identifizierte Einzelmutationen sind rot und durch Pfeile gekennzeichnet. N-terminale Helices (Dunkelblau), DAC-Domäne (Hellblau). (unten) Schematische Darstellung der CdaS-Architektur. Die Helices sind mit H1 und H2 benannt. Zahlen geben die Bereiche der strukturgebenden Elemente als Aminosäurepositionen an. Schleife (loop), DAC-Domäne (DAC).

Um herauszufinden, ob die im Suppressorenscreening identifizierten *cdaS*-Mutationen tatsächlich zu einer Steigerung der DAC-Aktivität führen konnten, wurden die entsprechenden CdaS-Varianten *in vitro* getestet. Die *cdaS*-Allele wurden an chromosomaler DNA der Suppressoren GP1334, GP1350, GP1353, GP1354 und GP1355 amplifiziert und in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Durch Amplifikation an Wildtyp DNA wurde das Wildtyp *cdaS*-Gen ebenfalls in diesen Vektor kloniert. Die resultierenden Plasmide, sowie der Leervektor pET28a, wurden in den heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Mengen an gebildetem c-di-AMP bestimmt. Das Ergebnis sowie die Plasmidnummern der entstandenen Plasmide sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Der Leervektor pET28a führte wie erwartet zu keiner c-di-AMP-Bildung. Wildtyp-CdaS resultierte in 623 ng c-di-AMP / mg Protein und ist damit in guter Übereinstimmung mit dem in 3.1 gefundenen Wert (im pET19b-Rückgrat untersucht). Alle im Suppressorenscreening identifizierten Mutationen

fürten zu einer deutlich gesteigerten c-di-AMP Menge – die geringste Steigerung betrug das 4-fache (A76V), die größte Steigerung betrug das nahezu 100-fache (L44F) verglichen mit der vom Wildtyp-Protein hergestellten c-di-AMP-Menge. Die Menge an gebildetem c-di-AMP ist direkt auf die Aktivität der entsprechenden Enzyme während der Anzucht in *E. coli* zurückzuführen. Daher kann von einer gesteigerten Enzymaktivität ausgegangen werden.

Da die im Suppressorenscreening identifizierten *cdaS*-Mutationen alle innerhalb der beiden N-terminalen Helices H1 und H2 bzw. der dazwischen liegenden Schleife lokalisiert sind (außer P201Q) und zu einer Steigerung der CdaS-Aktivität führten, war anzunehmen, dass die H1 und H2 für die Regulation der Aktivität wichtig sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurden zwei Helix-trunkierte Varianten in den Vektor pET28a kloniert – der Variante $\Delta H1$ fehlte die Helix H1, der Variante $\Delta H2$ fehlten beide Helices H1 und H2. Mit Hilfe der resultierenden Plasmide pGP1993 und pGP1994 wurden die in *E. coli* gebildeten c-di-AMP-Mengen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 gezeigt. Beide Varianten zeigten mit 20-fach ($\Delta H1$) und 17-fach ($\Delta H2$) gesteigerter c-di-AMP-Menge ebenfalls einen deutlichen Unterschied zum Wildtyp-Protein. Die Helices H1 und H2 sind demnach tatsächlich wichtig für die DAC-Aktivität von CdaS. Die gefundenen Daten sprechen dafür, dass H1 und H2 als autoinhibitorische Domäne die Aktivität der DAC-Domäne inhibieren. Möglicherweise wird diese Inhibition aufgrund eines unbekanntes Stimulus aufgehoben, so dass die volle CdaS-Aktivität ausgeübt werden kann.

Zur Untersuchung einer möglichen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten an Position 42 und 45, die in der Schleife zwischen den Helices H1 und H2 lokalisiert sind, sollte C42 durch einen Serinrest ausgetauscht werden. Auf diese Weise würde die Bildung einer Disulfidbrücke verhindert. Außerdem sollte der Einfluss der Aminosäure S125 untersucht werden. S125 ist in der DAC-Domäne inmitten der Dimerisierungs-Grenzfläche gelegen und könnte daher für die Aktivität eine Rolle spielen. Durch CCR (2.3.3.8) wurden die künstlichen Aminosäuresubstitutionen C42S, S125A und S125Y eingeführt und die erhaltenen Allele einzeln in pET28a kloniert. Mit Hilfe der resultierenden Plasmide pGP1997, pGP2589 und pGP2590 wurden die in *E. coli* gebildeten c-di-AMP-Mengen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Die für die CdaS-Varianten C42S, S125A und S125Y gefundenen c-di-AMP-Mengen waren entweder deutlich geringer als für das Wildtyp-Protein oder es wurde gar kein c-di-AMP gebildet. Diese Mutationen führen demnach zu einem signifikanten

Aktivitätsverlust. Cystein an der Position 42 scheint zwar für die Aktivität der DAC-Domäne wichtig zu sein, jedoch ist die Bildung einer Disulfidbrücke mit C45 unwahrscheinlich. Wäre diese ein entscheidendes Element um die Helices zu positionieren, würde für den Wegfall der Cystinbrücke ebenfalls eine gesteigerte Enzymaktivität erwartet wie es bei den Trunkierungen $\Delta H1$ und $\Delta H2$ vergleichbar der Fall war. Die Effekte der Varianten S125A und S125Y werden unten (3.4.2) näher erläutert.

Tabelle 3.4: Aktivitäten der CdaS Varianten. Bestimmung von intrazellulärem c-di-AMP aus *E. coli* Kulturen welche die angegebenen Expressionsvektoren (pET28a-Rückgrat) trugen. Die Kulturen wuchsen in LB-Medium und die c-di-AMP Konzentrationen wurden wie unter 2.3.7 beschrieben bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist in Klammern dargestellt.

Vektor	Mutation	ng c-di-AMP / mg Protein
pET28a	Leervektor	0 (0)
pGP1974	WT	623 (35)
pGP1975	L44F	56.400 (11.480)
pGP2553	E46K	12.200 (140)
pGP1995	A61V	7.250 (2.525)
pGP1998	A76V	2.700 (463)
pGP2552	P201Q	7.970 (463)
pGP1993	$\Delta H1$	12.500 (1.200)
pGP1994	$\Delta H2$	10.500 (1.100)
pGP1997	C42S	13 (2)
pGP2589	S125A	117 (25)
pGP2590	S125Y	0 (0)

3.4.2 Modell zur CdaS-Oligomerisierung: Bildung eines Hexamers

In Zusammenarbeit mit Prof. Rick Lewis (Universität Newcastle, England) entstand auf bioinformatischer Ebene ein Modell, mit dem die oben gezeigten Enzymaktivitäten der Diadenylylzyklase CdaS erklärt werden können. Außerdem unterstützt dieses Modell die experimentellen Hinweise, dass die beiden N-terminalen Helices als autoinhibitorische Domäne zur Regulation der CdaS-Aktivität wirken. Mit Hilfe des dreidimensionalen Strukturmodells und der Proteinsequenz wurde spekuliert, dass CdaS einen hexameren

Proteinkomplex eingeht. Das Modell dieser oligomeren Struktur ist in Abbildung 3.18 abgebildet.

Zwei Dimerisierungs-Grenzflächen stabilisieren das Hexamer. Die erste Grenzfläche bilden die N-terminalen Helixpaare, beispielsweise zwischen den Molekülen Gelb und Pink, Blau und Grün, Rosa und Grau (Abbildung 3.18 A). Sie umfasst eine Fläche von circa 1.500 \AA^2 – das sind 11% der Fläche des gesamten Hexamers – etwa ein Drittel der Gesamtfläche würde also von dieser Grenzfläche eingenommen. Durch Trunkierung der Helix H1 oder beider Helices würde die Dimerisierung an dieser Grenzfläche aufgehoben, so dass nur noch Dimere vorliegen die an der zweiten Dimerisierung-Grenzfläche, der DAC-Domäne, zusammengehalten werden. Es entstünden Dimere aus den Molekülen Pink und Blau, Grün und Rosa, Grau und Gelb. Dies war möglicherweise der Grund für die Hyperaktivität der CdaS-Varianten $\Delta H1$ und $\Delta H2$.

Die zweite Dimerisierungs-Grenzfläche innerhalb der DAC-Domäne umfasst eine Fläche von circa 700 \AA^2 und ist damit etwa halb so groß wie die erste. Durch Mutationen am C-Terminus könnte die Positionierung von H2 betroffen sein. Das könnte die gesteigerte Aktivität der CdaS-Variante P201Q erklären, deren gefundene Mutation als einzige in der DAC-Domäne lokalisiert war.

Kippt man die Struktur des Modells auf einer horizontalen Achse um 90° nach vorne, erhält man einen Blick auf die Dimerisierungs-Grenzfläche innerhalb der DAC-Domäne (Abbildung 3.18 C). Vergrößert man diese Ansicht (Abbildung 3.18 D), sieht man die Aminosäure Serin an der Position 125. Diese steht sich mit S125 des Nachbarmoleküls im Dimer genau gegenüber. Der Abstand zwischen beiden Aminosäuren beträgt $3,9 \text{ \AA}$. Durch den Austausch S125A würde ein kleinerer Aminosäurerest den Abstand zwischen beiden Dimerisierungs-Grenzflächen verkleinern. Dies könnte die stark reduzierte Enzymaktivität der untersuchten CdaS-Variante S125A erklären. Der Austausch S125Y würde den Abstand zwischen den DAC-Domänen vergrößern und die Dimerisierung möglicherweise aufheben. In diesem Fall entstünden Dimere aus den Molekülen Gelb und Pink, Blau und Grün, Rosa und Grau, die nur noch von den N-terminalen Helices zusammengehalten werden. Dies könnte den Aktivitätsverlust der analysierten CdaS-Variante S125Y erklären. Vielmehr unterstützt diese

Annahme die Hypothese, dass mindestens zwei DAC-Domänen für die Produktion von c-di-AMP benötigt werden.

Die Mutationen L44F und E46K sind in der Schleife zwischen den beiden Helices lokalisiert und nahe an der DAC-Domäne des Nachbarmoleküls im jeweiligen Dimer gelegen, z. B. Schleife Rosa und DAC-Domäne Grau. Abbildung 3.18 B zeigt eine Vergrößerung dieses Ausschnitts. Die Aminosäuren Phenylalanin und Lysin an diesen Positionen könnten daher den Abstand zur gegenüberliegenden DAC-Domäne vergrößern und so für die Hyperaktivität der Enzymvarianten verantwortlich sein.

Die Mutation A61V befindet sich in der Helix H2 und könnte den Abstand zur gegenüberliegenden Helix H1 vergrößern. Die Mutation A76V ist in der Schleife direkt vor der DAC-Domäne gelegen und könnte die Ausrichtung der Helix H2 verändern. Beide Effekte auf die Positionierung der Helices waren möglicherweise für die gesteigerte Aktivität der jeweiligen CdaS-Variante A61V und A76V verantwortlich.

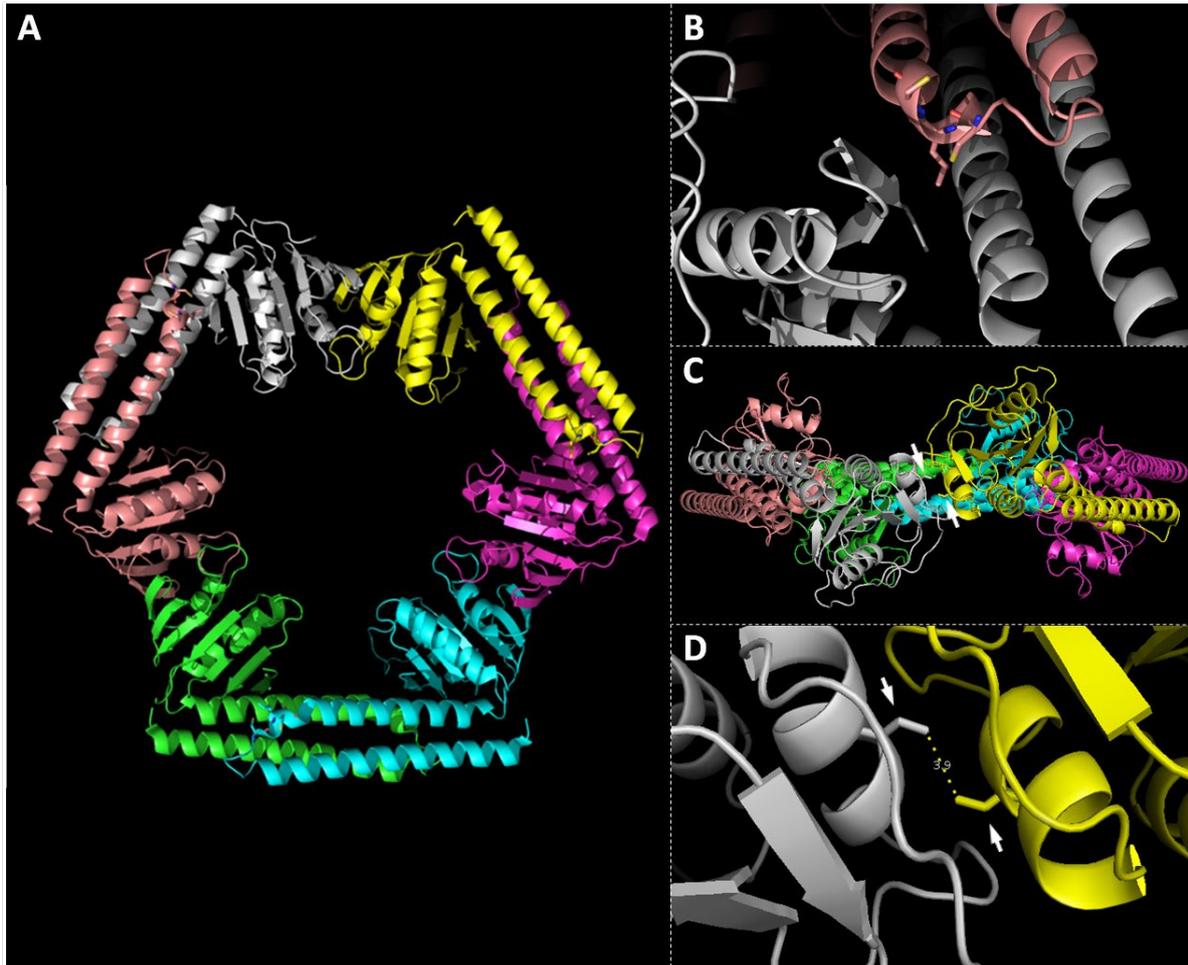


Abbildung 3.18: Modell des CdaS-Hexamers. Ausgehend vom dreidimensionalen Strukturmodell (3.4.1) und der Proteinsequenz von CdaS ist anzunehmen, dass ein hexamerer Proteinkomplex gebildet wird. Dieses Modell entstand in Zusammenarbeit mit Prof. Rick Lewis (Newcastle). Die einzelnen CdaS-Moleküle sind in den Farben Gelb, Pink, Blau, Grün, Rosa und Grau dargestellt. Weiße Pfeile kennzeichnen die Aminosäuren S125. **(A)** Übersicht der hexameren Anordnung. Die Struktur wird durch die Dimerisierungs-Grenzflächen der beiden Helices sowie des C-Terminus stabilisiert. **(B)** Vergrößerte Ansicht der Rosa Schleife, die der grauen DAC-Domäne gegenüber liegt. Die Mutationen L44F und E46K sind in dieser Schleife lokalisiert. **(C)** Die auf einer horizontalen Achse um 90° nach vorne gekippte Ansicht von (A) zeigt die Dimerisierungs-Grenzfläche der C-Termini der Moleküle Grau und Gelb. **(D)** Vergrößerte Ansicht von (C). Die Aminosäuren S125 in der DAC-Domäne der Moleküle Grau und Gelb stehen sich genau gegenüber. Der Abstand zwischen ihnen beträgt 3,9 Å.

Anhand des Modells der CdaS-Oligomerisierung in Verbindung mit den experimentell ermittelten Enzymaktivitäten zeigt sich, dass die Helices eine Schlüsselfunktion, nicht nur für die Oligomerisierung zum Hexamer haben sondern auch, um als autoinhibitorische Einheit die Aktivität der DAC-Domäne zu regulieren.

3.4.3 Untersuchung der CdaS-Oligomerisierung *in vitro*

Um zu bestätigen, dass CdaS ein Hexamer bildet, sollte der Oligomerisierungsstatus durch Molekulargewichtsbestimmung mittels analytischer Gelfiltration und Blau nativ-PAGE

genauer untersucht werden. Die Varianten A61V und Δ H1 wurden in die Analyse mit eingeschlossen um Erkenntnisse über die Ursache ihrer gesteigerten DAC-Aktivitäten zu erhalten. Die entsprechenden His-tag-tragenden Proteine wurden wie in 2.3.5.5 beschrieben mit Hilfe der Expressionsplasmide pGP1974 (pET28a-*cdaS*), pGP1995 (pET28a-*cdaS*_{A61V}) und pGP1993 (pET28a-*cdaS* _{Δ H1}) gereinigt und die Elutionsfraktionen per SDS-PAGE auf Proteingehalt und Reinheit untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Alle drei Lösungen enthielten das gereinigte Protein. Die analysierten Proteinmassen stimmten mit den theoretischen Massen von 23 kDa (WT und A61V) bzw. 18 kDa (Δ H1) überein. Verunreinigungen waren kaum zu erkennen. Eine schwache Bande knapp unterhalb der Hauptbande im SDS-Gel (Spur „WT“) zeigte wahrscheinlich ein Abbauprodukt von CdaS.

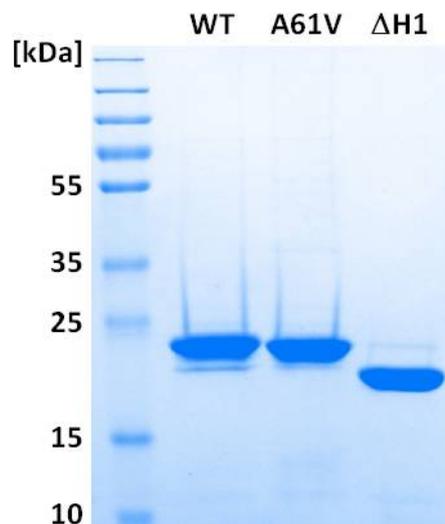


Abbildung 3.19: SDS-PAGE der gereinigten CdaS-Varianten. Die Plasmide pGP1974 (WT), pGP1995 (A61V) und pGP1993 (Δ H1) wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Transformanten wurden in LB-Medium kultiviert und die Expression der rekombinanten Enzyme durch Zugabe von IPTG induziert. Die Induktion erfolgte bei 16°C für 18 h. Anschließend wurde eine Reinigung durch Ni²⁺-NTA durchgeführt mit 1x ZAP pH 7,5, 10 mM Imidazol, 10% Glycerin als Ausgangspuffer. CdaS, CdaS_{A61V} und CdaS _{Δ H1} eluierten bei 150 – 200 mM Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden per 12% SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie Brilliantblau gefärbt.

Die hohe Reinheit der Proteinlösungen war ein wichtiges Kriterium, um sie im Folgenden durch analytische Gelfiltration und Blau nativ-PAGE weiter zu untersuchen. Jedoch wurde festgestellt, dass die drei Proteine sehr instabil waren. Dies machte sich durch deutlich sichtbare Präzipitation nach Inkubation bei 4°C üN bemerkbar. Um diesem Problem vorzubeugen, wurden die weiteren Experimente sehr rasch nach der Reinigung durchgeführt und dafür folgender Puffer gewählt: 1x ZAP pH 7,5, 150 mM Imidazol, 10% Glycerin. Das Ergebnis der analytischen Gelfiltration ist in Abbildung 3.20 gezeigt. Für das Wildtyp-Protein

wurden drei signifikante Signale detektiert, die in Relation zum Standard gut mit den Molekulargewichten für ein Hexamer, Dimer und Monomer korrelieren. Unter Zuhilfenahme der Gleichung der Standardgerade konnte für diese Signale die Molekulargewichte 167 kDa, 37 kDa und 17 kDa berechnet werden. Diese Werte entsprechen etwa dem theoretischen Molekulargewicht eines Hexamers, Dimers bzw. Monomers (23 kDa), somit unterstützen sie diese Erkenntnis bestens. Für die Variante CdaS_{A61V} wurde ein deutliches Signal mit einem berechneten Molekulargewicht von 164 kDa beobachtet. Ein weiteres, extrem schwaches Signal entspricht einem Molekulargewicht von 32 kDa. Aufgrund der sehr geringen Intensität ist jedoch fraglich ob es als relevant betrachtet werden kann. Diese Daten sprechen dafür, dass, bedingt durch die Mutation A61V, möglicherweise ausschließlich ein Hexamer gebildet werden kann. Die Analyse der Variante Δ H1 resultierte ebenfalls in einem einzigen Signal für das ein Molekulargewicht von 36 kDa errechnet wurde. Wie erwartet entspricht das exakt dem theoretischen Molekulargewicht für ein CdaS- Δ H1-Dimer (2 x 18 kDa).

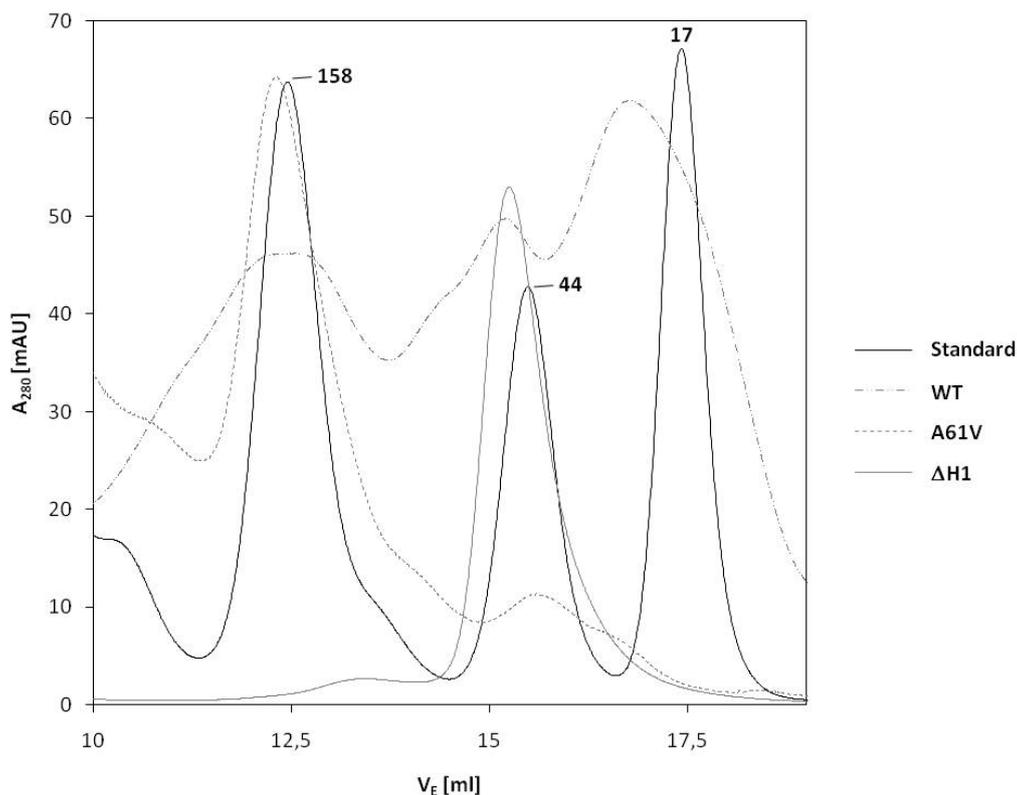


Abbildung 3.20: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung des Oligomerisierungszustands der CdaS-Varianten. Die Proteinlösungen mit gereinigtem CdaS, CdaS_{A61V} und CdaS Δ H1 sowie des Proteinstandards wurden an einer Superdex™ 200 10/300 GL getrennt (2.3.5.12). Mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte des Standards (durch Zahlen [kDa] gekennzeichnet) konnte eine Standardgleichung ermittelt werden die zur Berechnung der Molekulargewichte der Proben verwendet wurde. Absorption bei 280 nm (A_{280}), Elutionsvolumen (V_E).

Die in Abbildung 3.19 gezeigten Proteinlösungen wurden ebenfalls mittels Blau nativ-PAGE weiter untersucht. Zur Visualisierung wurde ein Western Blot angeschlossen und mit einem Antikörper gegen den His-tag detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 gezeigt. Hier ist anzumerken, dass die Proben auf unterschiedlichen Gelen analysiert wurden, weshalb sie in Abbildung 3.21, durch die gestrichelte Linie markiert, getrennt dargestellt sind. Die relativen Größenverhältnisse im Vergleich mit Standardproteinen sind jedoch nahezu identisch. Der Vergleich mit diesen Standardproteinen ermöglicht weiterhin Rückschlüsse auf das Molekulargewicht und damit auf den Oligomerisierungsstatus der untersuchten CdaS-Proteine. Für das Wildtyp-Protein und die Variante CdaS_{A61V} wurden vier sehr ähnliche Signale festgestellt. Das oberste entsprach einem Molekulargewicht von >158 kDa. Bei einem theoretischen Molekulargewicht des Monomers von 23 kDa repräsentiert diese Bande wahrscheinlich ein Hexamer. Das zweithöchste Signal entsprach ca. 158 kDa und repräsentiert demnach entweder ein Tetramer oder ein Abbauprodukt des Hexamers. Weiterhin wurde je ein Signal von ca. 68 kDa und <45 kDa gefunden, welche somit ein Dimer und Monomer zeigen. Für die CdaS-Variante $\Delta H1$ wurde mit ca. 45 kDa ein einziges Signal beobachtet. Bei einem theoretischen Molekulargewicht des Monomers von 18 kDa entspricht diese Bande einem Dimer.

Generell bietet die Methode der Blau nativ-PAGE die Möglichkeit, Proteine in ihrem nativen Zustand nach dem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass jedes Protein unterschiedliche Charakteristika aufweist, bedingt durch die chemischen Eigenschaften des Proteins im nativen Zustand. Deshalb ist die Ermittlung eines konkreten Molekulargewichts durch Vergleich mit Standardproteinen – die evtl. auch eine spezifische Charakteristik aufweisen – nur als grober Richtwert zu betrachten.

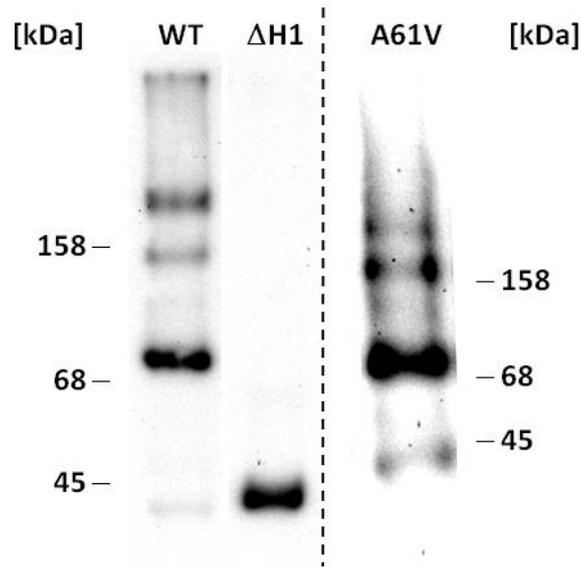


Abbildung 3.21: Untersuchung des Oligomerisierungszustands der CdaS-Varianten mittels Blau nativ-PAGE. Von jeder Probe wurde 1 μg (WT ΔH1) bzw. 3 μg (A61V) gereinigtes Protein auf ein 5-24%iges nicht-denaturierendes PAA Gel aufgetragen und mittels Blau nativ-PAGE getrennt (2.3.5.13). Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt und durch α -His-Färbung visualisiert. Theoretisches Molekulargewicht CdaS und CdaS_{A61V} = 23 kDa (Monomer). Theoretisches Molekulargewicht CdaS _{ΔH1} = 18 kDa (Monomer). Die gestrichelte Linie symbolisiert die Analyse mittels verschiedener Gele.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse der Gelfiltration und der Blau nativ-PAGE das Modell eines CdaS-Hexamers (3.4.2) unterstützen. Das gleichzeitige Vorliegen eines hexameren, dimeren und monomeren Status scheint eine Gleichgewichtsreaktion zu sein, die wahrscheinlich auch durch die Proteinkonzentration beeinflusst wird. Diese Auswirkung ist vermutlich auch für die verschiedenen Ergebnisse für die Variante A61V verantwortlich. Spricht die Analyse per Gelfiltration für ein Hexamer, zeigt die nativ-PAGE, dass sich A61V genau wie das Wildtyp-Protein verhält. Mit Rücksicht auf die Lokalisation der Mutation A61V in einer der Dimerisierungs-Grenzflächen ist nicht ersichtlich, warum die niedrigeren Oligomerisierungszustände Tetra-, Di- und Monomer ausgeschlossen werden können. Viel wahrscheinlicher ist, dass die Mutation A61V eine Konformationsänderung bewirkt, welche die DAC-Domäne günstiger positioniert und somit für die Hyperaktivität von CdaS_{A61V} verantwortlich ist. Dieser Effekt würde auch die Hyperaktivitäten der anderen identifizierten CdaS-Varianten (Tabelle 3.4) erklären. Die verkürzte Variante ΔH1 lag nur noch als Dimer vor. Da mit den beiden Helices eine von zwei Dimerisierungs-Grenzflächen fehlte, war genau das erwartet. Auch hier scheint die DAC-Domäne im Dimer eine Position/Konformation einzunehmen, die zur Hyperaktivität führt.

4 Diskussion

Seit seiner Entdeckung im Jahre 2008 hat die internationale Beachtung des Signalmoleküls c-di-AMP rasant an Fahrt aufgenommen. Die Relevanz dieses essentiellen „second messengers“ ist unumstritten und spiegelt sich in der kürzlich angestiegenen Anzahl an Publikationen wider. Sucht man in der Literaturodatenbank Pubmed mit dem Schlüsselbegriff „c-di-AMP or cyclic di-AMP“ werden 50 Veröffentlichungen gelistet. Davon sind jeweils 2 aus den Jahren 2008 und 2009, in den folgenden Jahrgängen bis 2013 sind je 4, 9, 12 und 21 Artikel hervorgegangen (Stand 04.11.13). Durch diese neuen Erkenntnisse ist die vielfältige Funktionsweise von c-di-AMP gerade im Begriff, nach und nach entschlüsselt zu werden. Auch wenn über die genauen molekularen Mechanismen noch wenig bekannt ist, wurde klar, dass das c-di-AMP-Netzwerk hochkomplex ist und eine Vielzahl von Prozessen reguliert (Nelson et al., 2013). Neben einigen δ -Proteobakterien sind es vor allem die Gram-positiven Organismen, allen voran die *Firmicutes*, die über einen c-di-AMP-Metabolismus verfügen (Römling, 2008).

In dieser Arbeit wurde die Rolle von c-di-AMP in *B. subtilis* untersucht und wichtige Einblicke in die Bildung und Funktionsweise dieses Moleküls gewonnen. War zu Beginn noch sehr wenig bekannt, wurde der Fortschritt oft von neu veröffentlichten Erkenntnissen richtungsweisend beeinflusst und gefördert. Die Ergebnisse dieser Arbeit beleuchten die Ansätze der c-di-AMP-regulierten Funktionen und bilden eine wichtige Grundlage, diese in Zukunft genauer zu verstehen. Kenntnisse des Modellorganismus *B. subtilis* lassen sich auf artverwandte Spezies übertragen und sind daher für die gesamte Gram-positive Welt von Bedeutung.

4.1 Diadenylatzyklen – eine weit verbreitete Enzymfamilie

Die Existenz von Diadenylatzyklen (DACs) wurde bisher in verschiedenen Gram-positiven Spezies wie *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* und *Mycoplasma pneumoniae* nachgewiesen (Witte et al., 2008, Woodward et al., 2010, Corrigan et al., 2011, Bai et al., 2012, Zhang & He, 2013, Schmeisky, 2013). Kürzlich wurde der erste Nachweis in dem Gram-negativen Bakterium *Chlamydia trachomatis* erbracht (Barker et al., 2013). Diese Enzyme tragen alle die, für ihre

Aktivität verantwortliche, DAC-Domäne. Aufgrund der hohen Konservierung dieser Domäne lassen sich DACs leicht vorhersagen. So wurden die *B. subtilis* DACs CdaA und CdaS schon früh als solche betrachtet (Römling, 2008), jedoch erst im Rahmen dieser Arbeit wurde der erste experimentelle Nachweis gezeigt, dass beide Enzyme tatsächlich c-di-AMP synthetisieren. Daraufhin wurden diese Proteine neu benannt (vorher YbbP und YojJ).

Durch ihre DAC-Domäne sind DACs klar von Diguanylatzyklasen (GGDEF-Motiv wichtig für Aktivität) zu unterscheiden. Beide Enzymfamilien sind nicht homolog und müssen evolutionär unabhängig voneinander entstanden sein (Witte *et al.*, 2008). Mit ihren Produkten c-di-AMP und c-di-GMP stellen sie durchaus ähnliche Moleküle her. Daher stellt sich die Frage, ob es nicht einfacher gewesen wäre ein Enzym „umzuprogrammieren“ als ein gänzlich neues zu erschaffen. Das letzteres durchaus möglich ist zeigt der Bericht von Baker und Kelly über verschiedene Adenylatzyklasen – welche dasselbe cAMP-Molekül herstellen – die ebenfalls unabhängig voneinander entstanden sind (Baker & Kelly, 2004).

Ausnahmestellung von *B. subtilis* hinsichtlich seiner DACs

Dass *B. subtilis* über drei verschiedene DACs verfügt (CdaA, DisA, CdaS) ist besonders, bedenkt man, dass die meisten anderen DAC exprimierenden Organismen nur eins dieser Enzyme besitzen. Es gibt einige Clostridienarten, die zwei DACs haben (CdaA und DisA). Einige wenige, hauptsächlich *Bacillus*-Vertreter, verfügen über drei DACs. So trägt *B. cereus* beispielsweise zwei *cdaA*-Gene und ein *disA*-Gen. Die Abwesenheit von CdaS in diesen sporenbildenden Organismen spricht dafür, dass CdaS für die Sporulation nicht essentiell ist. In *B. subtilis* scheint CdaS jedoch eine wichtige Funktion in diesem Zusammenhang zu spielen, da das Protein spezifisch während der Sporulation exprimiert wird (Nicolas *et al.*, 2012). Die konstitutiv exprimierten DACs DisA und CdaA spielen während des exponentiellen Wachstums von *B. subtilis* eine wichtige Rolle. Für DisA wurde gezeigt, dass es die Integrität der DNA überprüft, indem DisA an DNA bindet und am Chromosom entlang gleitet. Beim Treffen auf DNA-Schäden wird die c-di-AMP-Synthese inhibiert (Witte *et al.*, 2008). Diese Integritätskontrolle wurde mit dem Eintritt in die Sporulation in Verbindung gebracht (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011). Bei der Frage nach der Rolle von CdaA ist besonders die hohe Verbreitung des konservierten *cda-glm*-Moduls zu beachten. Die direkt

aufeinanderfolgenden Gene *cdaA*, *cdaR* und *glmM* lassen einen funktionellen Zusammenhang vermuten.

Aufgrund bioinformatischer Analyse wurde spekuliert, dass CdaR membranständig sein könnte (Corrigan & Gründling, 2013). Das Protein lässt sich jedoch gut isolieren, was beispielsweise für die Herstellung eines CdaR-Antikörpers notwendig war. Die Isolierung von Membranproteinen ist hingegen meistens sehr schwierig. Deshalb ist anzunehmen, dass CdaR gelöst im Cytosol vorliegt. Im Gegensatz dazu wurde die Reinigung und Isolierung von CdaA mehrfach erfolglos versucht, was in guter Übereinstimmung mit der experimentell bestätigten Membranständigkeit des Proteins ist (Abbildung 3.7).

CdaR stimuliert die Zyklaseaktivität von CdaA

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zeigen, dass die DAC-Aktivität von CdaA aufgrund einer regulatorischen Protein-Protein-Interaktion mit CdaR gesteigert wird (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9, Abbildung 3.11). CdaR fungiert daher als ein Regulator von CdaA. Diese CdaR-vermittelte Aktivierung erfolgt nicht auf die anderen beiden Diadenylatzyklasen DisA und CdaS und ist somit spezifisch für CdaA. CdaA trägt einen kurzen C-terminalen Rest (ca. 40 Aminosäuren, Abbildung 3.6) dem bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Dieser Rest ist deshalb auffällig, da er in direkter Nachbarschaft zur DAC-Domäne eine mögliche Interaktionsfläche für CdaR darstellt. So käme CdaR in Kontakt mit der DAC-Domäne um diese zu aktivieren. Eine durch Interaktion induzierte Konformationsänderung würde die Aktivitätssteigerung erklären. Der funktionelle Zusammenhang der Proteine CdaA und CdaR wird weiter durch die Tatsache unterstrichen, dass beide Gene benachbart im *cda-glm*-Modul kodiert und exprimiert sind.

In der Zwischenzeit wurde auch für andere Beispiele gezeigt, dass die DAC-Aktivität durch Protein-Protein-Interaktion beeinflusst werden kann. RadA ist mit seiner Rolle in der Stabilisierung und Prozessierung von „Holliday junctions“ an der DNA-Reparatur beteiligt (Carrasco *et al.*, 2004). Zusätzlich interagiert RadA mit DisA, woraufhin die DAC-Aktivität von DisA inhibiert wird (Zhang & He, 2013). Diese Inhibierung ist in guter Übereinstimmung mit der bisher beschriebenen Funktion von DisA, das an der DNA entlang gleitet und die Synthese von c-di-AMP beim Treffen auf Doppelstrangbrüche und „Holliday junctions“ stoppt (Bejerano-Sagie *et al.*, 2006, Witte *et al.*, 2008, Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011).

Interessanterweise sind die Gene *radA* und *disA* benachbart kodiert und reguliert (Krüger *et al.*, 1996, Jervis *et al.*, 2007). Diese Nachbarschaft wurde in über 85 bakteriellen Spezies gefunden (Zhang & He, 2013). Genau wie für CdaA/CdaR zeigt sich mit DisA/RadA ein funktionelles Paar, das gemeinsam exprimiert ist und die DAC-Aktivität durch Protein-Protein-Interaktion reguliert.

Für die RadA-DisA-Interaktion wurde noch kein direkter Zusammenhang zur Prozessierung von „Holliday junctions“ gezeigt. Die eindeutige Assoziation beider Proteine zu dieser Funktion spricht dafür, dass DNA-Schäden ein Stimulus für RadA sind, die Interaktion mit DisA einzugehen. Im Gegensatz dazu ist der Stimulus für CdaR noch unbekannt. CdaR trägt vier YbbR-Domänen. Die Struktur dieser Domänen aus *Desulfitobacterium hafniense* zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit dem ribosomalen Protein L25 (Barb *et al.*, 2011). L25 bindet die 5 S ribosomale RNA (Gongadze *et al.*, 1999, Schmalisch *et al.*, 2002), daher könnte die Bindung von RNA ein Stimulus für CdaR sein, wodurch die CdaA-CdaR-Interaktion beeinflusst wird.

4.2 Homöostase: die richtige c-di-AMP-Konzentration ist wichtig

c-di-AMP ist essentiell

Die Tatsache, dass sich keine $\Delta cdaA \Delta disA \Delta cdaS$ Dreifachmutante herstellen ließ, sondern immer mindestens eine der konstitutiv exprimierten DACs, CdaA oder DisA, anwesend sein musste, legte nahe, dass das c-di-AMP für *B. subtilis* essentiell ist. Erst die ektopische Expression von CdaS ermöglichte die Dreifachdeletion (Abbildung 3.1). Dadurch wurde klar gezeigt, dass tatsächlich die Anwesenheit des c-di-AMP für das Zellwachstum erforderlich ist. Diese Deletionsexperimente sind in sehr guter Übereinstimmung mit zeitgleich publizierten Ergebnissen (Luo & Helmann, 2012). In verschiedenen Gram-positiven Organismen, die nur über ein einziges DAC-Gen verfügen, wurden diese Gene in Screeningstudien als essentiell klassifiziert (Glass *et al.*, 2006, French *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2005, Chaudhuri *et al.*, 2009). Barker *et al.* wiesen c-di-AMP zum ersten Mal in dem Gram-negativen *Chlamydia trachomatis* nach. Sie vermuten, dass c-di-AMP auch in diesem Organismus essentiell ist (Barker *et al.*, 2013). c-di-AMP ist bisher der erste und einzige essentielle „second messenger“.

***In vivo* c-di-AMP-Konzentration**

Die Messung von *in vivo* c-di-AMP-Mengen in *B. subtilis* gestaltete sich methodisch sehr schwierig und nahm viel Zeit in Anspruch. Für die Bestimmung aus *E. coli* gab es ein verlässliches Protokoll (Spangler *et al.*, 2010), das sich leider nicht direkt auf *B. subtilis* übertragen ließ. Die Extraktionseffizienz von c-di-AMP aus dem deutlich schwieriger aufzuschließenden Gram-positiven Organismus war mit deutlichen Schwankungen behaftet. Letztlich konnte die Methode zur Messung aus *B. subtilis* durch Modifikation von Zellaufschluss und nachfolgenden Extraktionsschritten erfolgreich etabliert werden und führte zu reproduzierbaren Ergebnissen. Die c-di-AMP-Konzentration für den *B. subtilis* Wildtyp wurde mit 9,6 ng c-di-AMP/mg Protein bestimmt. Dabei stellt die Normierung auf den Gesamtproteingehalt eine sinnvolle, reproduzierbare Messgröße dar. Aufgrund unterschiedlicher Normalisierungsparameter und anderer Einheiten sind Angaben aus anderen Studien nicht direkt vergleichbar. In *B. subtilis* und *S. aureus* wurden c-di-AMP-Konzentrationen von 1,7 μM bzw. 2,1 μM (oder 3,3 ng c-di-AMP/mg Trockengewicht) gemessen (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011, Corrigan *et al.*, 2011).

Zu hohe Mengen zeigen: Die c-di-AMP-Homöostase ist wichtig

Durch Deletionsexperimente wurde demonstriert, dass sich die verschiedenen DACs gegenseitig komplementieren können. Das bedeutet, eine untere c-di-AMP-Konzentration ist für das Wachstum entscheidend, unabhängig davon, welche DAC das Dinukleotid bildet. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass eine zu hohe c-di-AMP-Konzentration ebenfalls sehr schädlich ist, indem sie zur Ausbildung langer verdrillter Zellfilamente führt (Abbildung 3.3). Bildung und Erhalt – also die Homöostase – des c-di-AMP spielen demnach eine wichtige Rolle für das Zellwachstum.

Jede der drei Zyklasen CdaA, DisA und CdaS ist in der Lage, die Mindestmenge an c-di-AMP zu produzieren. Dies spricht dafür, dass die Regulation auf „downstream“-Rezeptoren durch einen globalen Effekt bewirkt wird. Die sehr spezialisierten Funktionen von DisA und CdaS für die DNA-Integrität und Sporulation (Bejerano-Sagie *et al.*, 2006, Witte *et al.*, 2008, Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011) scheinen hingegen in orts- und zeitabhängiger Weise ausgeführt zu werden. Bei einem sogenannten „high specificity signaling“ werden Signalmoleküle direkt am Ort des Geschehens produziert und wirken somit lokal auf ihre

Effektoren. Demnach entscheidet vermutlich die Sensitivität der c-di-AMP-Rezeptoren inwieweit sie durch eine lokale oder die globale c-di-AMP-Konzentration beeinflusst werden. Für c-di-GMP wurde solch eine Hypothese postuliert (Seshasayee *et al.*, 2010). Die Vielfalt der beteiligten Enzyme ist bei diesen Signalwegen um ein Vielfaches höher im Vergleich zum c-di-AMP. Besitzt *E. coli* schon 31 c-di-GMP-relevante Enzyme (Römling, 2008), hat *Vibrio vulnificus* über 60 c-di-GMP produzierende DGCs (Galperin, 2005). Für *Vibrio cholerae* wurde gezeigt, dass die Regulation der c-di-GMP-vermittelten Biofilmbildung einem „high specificity signaling“-Mechanismus folgt (Massie *et al.*, 2012).

Abbau von c-di-AMP durch GdpP

Wenn es um die Frage des c-di-AMP-Spiegels ging, wurde oft der Einfluss der Phosphodiesterase GdpP auf die Homöostase untersucht. Für *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* wurde gezeigt, dass der Abbau von c-di-AMP durch GdpP einen Effekt auf die Konzentration hat, der sich durch Phänotypen wie Sensitivität gegenüber Zellwand-Antibiotika, veränderte Zellgröße und Virulenz äußert (Corrigan *et al.*, 2011, Luo & Helmann, 2012, Witte *et al.*, 2013).

Wie die synthetisierenden DACs, so unterliegt auch GdpP einer Regulation: Die Hydrolyseaktivität wird durch den „stringent response“-Mediator ppGpp kompetitiv inhibiert (Rao *et al.*, 2010). Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es weitere Faktoren die ebenfalls einen Einfluss auf die GdpP-Aktivität bewirken. Die modifizierte GGDEF-Domäne könnte eine Regulatorfunktion haben (Corrigan *et al.*, 2011). Für die PAS-Domäne wurde die Bindung von Häm und ein resultierender Effekt auf die PDE-Aktivität beschrieben (Rao *et al.*, 2011).

Die weitere Analyse der enzymatischen Aktivität von GdpP hinsichtlich regulierender Stimuli kann dazu beitragen, die Funktionsweise von c-di-AMP besser zu verstehen. Gerade weil noch nicht ausreichend geklärt ist, unter welchen Bedingungen GdpP *in vivo* aktiv ist, sollte ihr Einfluss bei der c-di-AMP-Homöostase immer berücksichtigt werden.

4.3 c-di-AMP in der Zellwandsynthese

Die Enzyme GlmM und GlmS stellen wichtige Intermediate für die Peptidoglycansynthese her und sind deshalb essentiell bzw. fakultativ essentiell. Die genetische Organisation von *cdaA* und dem Regulator *cdaR* zusammen mit den Genen *glmM* und *glmS* sowie die hohe

Konservierung dieses *cda-glm*-Moduls in *Firmicutes* und δ -Proteobakterien – mit Ausnahme der zellwandlosen *Mollicutes* – spricht daher für eine Verbindung vom c-di-AMP- zum Zellwandmetabolismus.

In *B. subtilis* wurde die c-di-AMP-Homöostase mit der Peptidoglycansynthese durch eine Studie in Verbindung gebracht, in der die Autoren demonstrieren, dass die Deletion von *CdaA* zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber β -Lactamen (Zellwand-Antibiotika) führte. Die zusätzliche Überexpression der spezifischen Phosphodiesterase *GdpP* erhöhte diese Sensibilität weiter (Luo & Helmann, 2012). Die Annahme, dass die reduzierte Menge an c-di-AMP für einen Defekt in der Synthese von Peptidoglycan verantwortlich ist, ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier wurde der gegenteilige Fall untersucht: Die Überproduktion von c-di-AMP führte zur Ausbildung von langen, stark verdrillten Zellfilamenten. Dieser Phänotyp war nur in der exponentiellen Wachstumsphase und in Mg^{2+} -Abhängigkeit zu beobachten (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4). Magnesium ist dafür bekannt, Defekte zu kompensieren, die durch Deletion von zellmorphologie- und zellwandrelevanten Genen hervorgerufen werden (Murray *et al.*, 1998, Formstone & Errington, 2005). Es wird vermutet, dass die divalenten Magnesiumionen direkt mit dem Peptidoglycan oder den in der Zellwand lokalisierten Lipoteichonsäuren interagieren. Die genaue Wirkungsweise ist nach wie vor unbekannt (Muchová *et al.*, 2013). Ähnlich verdrillte Zellketten wurden bei der Deletion des Zellmorphologie bestimmenden Proteins *Mbl* entdeckt und der Synthese von Lipoteichonsäuren zugeordnet (Schirner & Errington, 2009, Schirner *et al.*, 2009).

Eine Verbindung der Faktoren c-di-AMP, Zellwand und Lipoteichonsäuren ergab sich auch für andere eng verwandte Gram-positive Arten. So wurden *S. aureus*-Stämme isoliert, die ohne für die Zellwand essentielle Lipoteichonsäuren wachsen können. Diese Isolate hatten einen gesteigerten c-di-AMP-Spiegel und eine erhöhte Menge an Peptidoglycan. Es wurde spekuliert, die gesteigerte Peptidoglycanmenge könnte für die Kompensation des Lipoteichonsäuredefizits verantwortlich sein (Corrigan *et al.*, 2011). In Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) -Stämmen wurde eine verringerte Expression von Zellwandstress-assoziierten Genen simultan mit einer reduzierten c-di-AMP-Konzentration beobachtet. Die Autoren gehen davon aus, dass die verringerte Konzentration für eine einhergehende gesteigerte Fitness der MRSA-Stämme mitverantwortlich ist (Dengler *et al.*, 2013). Für

L. monocytogenes wurde berichtet, dass Zellwandstress durch die Überexpression von CdaA ausgeglichen werden kann. Eine durch die Überexpression angenommene Erhöhung der c-di-AMP-Konzentration wurde deshalb direkt mit der Peptidoglycansynthese in Verbindung gebracht (Kaplan Zeevi et al., 2013). Schlussfolgernd sprechen diese Informationen für folgenden Zusammenhang: Mehr c-di-AMP führt zu einer gesteigerten Peptidoglycansynthese. Dieser Zusammenhang wäre konsistent mit den langen, verdrillten Ketten aus *B. subtilis*-Zellen (Abbildung 3.3) und wäre ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Phänotyp.

Ist die essentielle Funktion von c-di-AMP mit der Zellwandsynthese verknüpft?

Gibt es in *B. subtilis* ein Protein, dessen essentielle Funktion die Anwesenheit von c-di-AMP erfordert? Solch ein essentieller c-di-AMP-Rezeptor würde die Essentialität des Signalmoleküls c-di-AMP leicht erklären. Der Gedanke, dass das Zellwand-Gen *glmM* oder *glmS* für einen solchen Rezeptor kodiert, ist daher naheliegend. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Möglichkeit jedoch experimentell ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Demnach ist von der Existenz eines noch unbekanntem, essentiellen c-di-AMP-Rezeptors auszugehen.

Dieser könnte auch in den GlmM/GlmS nachfolgenden Reaktionen des Peptidoglycansyntheseweges (Abbildung 1.5) zu finden sein. In diesem Stoffwechselweg sind weitere essentielle Proteine involviert, wie zum Beispiel die paralogen Proteine MurAA und MurAB. Interessanterweise sind MurAA und MurAB sehr ähnlich, katalysieren dieselbe Reaktion und sind beide konstitutiv, aber unabhängig voneinander exprimiert. MurAA ist essentiell, MurAB hingegen nicht (Kobayashi et al., 2003). Es drängt sich also die Frage auf, warum sich beide Enzyme nicht gegenseitig komplementieren können. Eventuell ist ein zusätzlicher Faktor für die Aktivität nötig. Vorstellbar wäre, dass MurAA und MurAB einen katalytischen Komplex bilden der durch einen Cofaktor – möglicherweise c-di-AMP – stabilisiert wird. *E. coli*, welcher keinen c-di-AMP-Metabolismus besitzt, hat für diese Reaktion nur ein einziges Enzym, MurA (Marquardt et al., 1992). Die Identifizierung eines c-di-AMP-Rezeptors im Peptidoglycansyntheseweg würde die Frage nach der Verknüpfung der essentiellen Rolle von c-di-AMP mit der Zellwandsynthese klären.

4.4 Ist c-di-AMP ein Mediator der Stickstoffversorgung?

Diese Frage entstand auf der Suche nach weiteren Erklärungsansätzen für einen funktionellen Zusammenhang der Proteine des *cda-glm*-Moduls. Es ergaben sich experimentelle Hinweise die darauf schließen lassen, dass c-di-AMP sowie die Proteine CdaR und GlmM an einer stickstoffabhängigen Regulation beteiligt sein könnten. So konnte klar gezeigt werden, dass die Qualität der Stickstoffversorgung einen Einfluss auf die Zelllänge hat. Das Wachstum mit einer guten oder schlechten N-Quelle führte zu langen oder kurzen Zellen. Diese Beobachtung ist an sich schon für den Wildtyp neuartig. Darüber hinaus konnten Zellen, die durch Mutationen in CdaA-abhängiger Weise im c-di-AMP-Metabolismus beeinträchtigt waren, diese Regulation nicht mehr ausführen, wie sich in den resultierenden Zelllängen widerspiegelte. Die Fragestellung der stickstoffabhängigen Zelllängenkontrolle wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur initial untersucht. Daher kann über zugrundeliegende Mechanismen bisher nur spekuliert werden. Ein grundlegendes Argument für diese Hypothese ist der Nachweis eines CdaA-CdaR-GlmM-Proteinkomplexes, höchstwahrscheinlich mit CdaR als zentralem Protein. Dies könnte für eine „moonlighting“-Aktivität der Phosphoglucosaminmutase GlmM sprechen. Für die Zuflussreaktion zur Bildung von GlcN6P – dem GlmM-Substrat – durch GlmS wird Glutamin benötigt. Aber auch andere Synthesewege, die zur GlcN6P-Bildung führen, benötigen die Anwesenheit von Aminosackern. So könnte GlmM in GlcN6P-abhängiger Weise ein Sensor für die Stickstoffversorgung sein und dieses Signal durch Interaktion an CdaA/CdaR weitergeben. Alternativ ist denkbar, dass CdaR von GlmM durch Interaktion abgefangen wird. Somit würde die aktivierende CdaA-CdaR-Interaktion verhindert, was eine reduzierte c-di-AMP-Produktion von CdaA zur Folge hätte. Auf diese Weise könnte c-di-AMP den finalen Signalträger für die Stickstoffverfügbarkeit darstellen. Dieses Modell wird in Abbildung 4.1 schematisch veranschaulicht.

Die Formation des Proteinkomplexes wurde *in vivo* in Medien nachgewiesen, die eine gute Stickstoffversorgung gewährleisten (CSE-Medium mit 0,5% Glucose bzw. SM-Medium mit 1% Glutamin). Folglich wären für weitere Einblicke zwei experimentelle Ansätze in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung interessant: (I) Sind Unterschiede in den Interaktionsverhältnissen des CdaA-CdaR-GlmM-Trimers zu ermitteln? (II) Ändert sich der c-di-AMP-Spiegel *in vivo*?

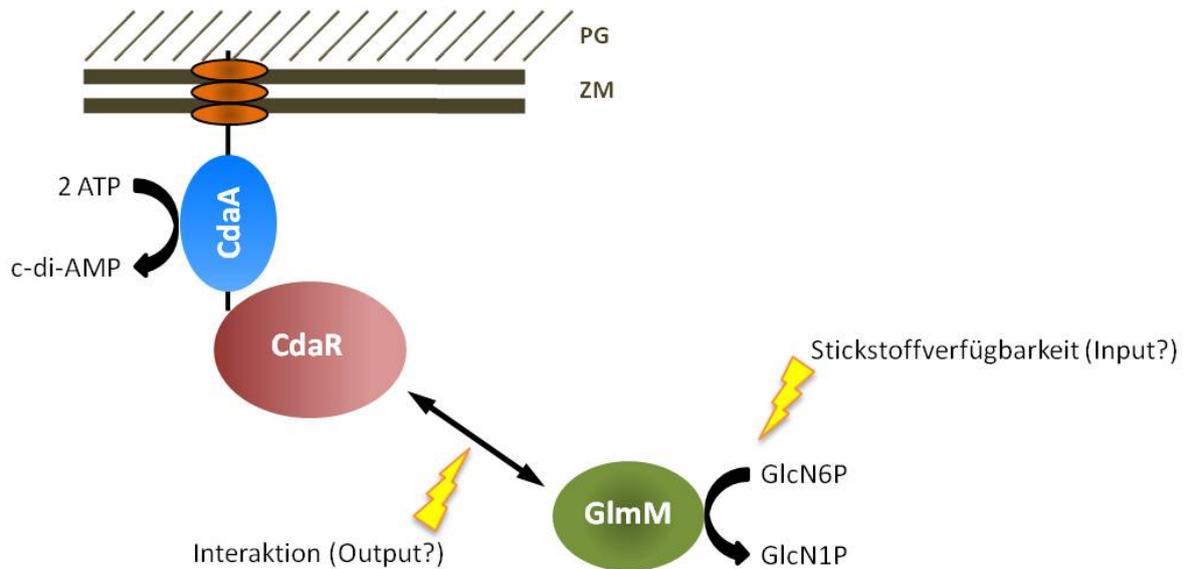


Abbildung 4.1: Modell zur Bildung des CdaA-CdaR-GlmM-Komplexes. Die Existenz dieses Komplexes wurde *in vivo* unter guten Stickstoffbedingungen nachgewiesen. Durch die Interaktion mit CdaR könnte GlmM ein stickstoffabhängiges Signal weitergeben, welches die Produktion von c-di-AMP durch CdaA beeinflusst. PG = Peptidoglycan, ZM = Zellmembran.

Bifunktionelle Proteine, die durch ihre Aktivität über die Verfügbarkeit von Metaboliten informieren, kommen in verschiedensten Zusammenhängen vor. Diese sogenannten „trigger“-Enzyme regulieren oft die Expression betreffender Gene in Abhängigkeit von der Metabolitkonzentration (Commichau & Stülke, 2008). Der globale Regulator TnrA kontrolliert in *B. subtilis* die Expression der Gene für die Stickstoffassimilation. Dabei wird er in glutaminabhängiger Weise von der Aktivität der Glutaminsynthase GlnA reguliert. Ist GlnA aktiv (schlechte Stickstoffversorgung) kann der Transkriptionsfaktor TnrA die Expression seiner Zielgene aktivieren. Ist die „feedback“-inhibierte Glutaminsynthase hingegen inaktiv (gute Stickstoffversorgung), findet eine Protein-Protein-Interaktion mit TnrA statt, wodurch dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor unterbunden wird (Wray *et al.*, 1996, Belitsky *et al.*, 2000, Wray *et al.*, 2001).

Neben diesem Beispiel der Genexpressionskontrolle über die Stickstoffassimilation ist durchaus vorstellbar, dass eine stickstoffabhängige Regulation helfen kann, die Zelllänge den aktuellen Nährstoffbedingungen anzupassen. Dass ein solcher Vorgang zu einem Wachstumsvorteil führen kann zeigt er Mechanismus der zelllängenbestimmenden Glycosyltransferase UgtP. UgtP fungiert als ein metabolischer Sensor, um in Substratabhängigkeit von UDP-Glucose die Kohlenstoffversorgung mit der Zellteilung zu koordinieren. So wird die Zelllänge optimal an die vorliegende Kohlenstoffverfügbarkeit

angepasst (Weart *et al.*, 2007, Chien *et al.*, 2012). Für diesen Mechanismus ist die glucoseabhängige Isomerisierungsreaktion von Glucose-6-Phosphat zu Glucose-1-Phosphat durch die Phosphoglucomutase PgcA entscheidend (Weart *et al.*, 2007). Diese Zuflussreaktion ist der der Phosphoglucosaminmutase GlmM (GlcN6P \rightarrow GlcN1P) überraschend ähnlich. Für ein effizientes Zellwachstum ist die ausreichende Versorgung mit beidem, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, wichtig. Um dieses Wachstum unter allen Bedingungen so effizient wie möglich zu gestalten, wäre es daher sinnvoll, zusätzlich zur Kopplung von Kohlenstoffversorgung und Zelllänge ebenfalls die Kopplung mit der Stickstoffversorgung einzubeziehen. Inwiefern die Gene des *cda-glm*-Moduls und/oder der „second messenger“ c-di-AMP daran beteiligt sind, ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Weiterhin ist vorstellbar, dass ein noch unbekannter c-di-AMP-Rezeptor in eine Regulation involviert ist. Das in *S. aureus* identifizierte c-di-AMP-bindende Protein PstA besitzt eine „domain of unknown function“ (DUF970). Diese Domäne findet sich auch in PII-Stickstoffregulatoren der GlnB Superfamilie (Corrigan *et al.*, 2013). PII-Proteine vermitteln die Stickstoff- und Kohlenstoffversorgung anhand der Substrate Glutamin und α -Ketoglutarat (Ninfa & Atkinson, 2000). In *B. subtilis* ist das PII-artige Protein NrgB für die Regulation der Ammoniumaufnahme via NrgA zuständig (Detsch & Stülke, 2003). NrgB trägt keine DUF970, jedoch das unbekannte Protein YaaQ. Beide Proteine weisen, außer ihrer Masse von 12 kDa bzw. 13 kDa, nur sehr geringe Ähnlichkeit auf. Sollte es sich bei YaaQ um ein PII-artiges Protein handeln, das durch c-di-AMP reguliert wird, könnte dies eine Verbindung zu den in dieser Arbeit gezeigten stickstoffabhängigen Effekten sein.

4.5 Weitere mögliche Funktionen von c-di-AMP

ydaO-Riboswitch

Der bereits erwähnte *ydaO*-Riboswitch, welcher durch c-di-AMP bei pikomolaren Konzentrationen inhibiert wird, reguliert eine Vielzahl von Genen in Gram-positiven Bakterien. In Bazillen stehen Transporter für Aminosäuren, Anionen sowie Natrium und Kalium und Gene aus dem Zellwandmetabolismus unter dieser Kontrolle. In *B. subtilis* wird neben *ktrA* wird auch das *ydaO*-Gen durch den *ydaO*-Riboswitch reguliert (Nelson *et al.*, 2013). Die Funktion des YdaO-Proteins ist noch unbekannt. Ihre Analyse würde ein weiteres

Puzzlestück für die funktionelle Entschlüsselung des c-di-AMP-Metabolismus beitragen. Weiterhin wurden in einigen Organismen annotierte GGDEF-Domänen (katalytische Domäne der c-di-GMP synthetisierenden DGCs) gefunden, die vom *ydaO*-Riboswitch kontrolliert werden. Das könnte bedeuten, dass c-di-AMP auch die Synthese von c-di-GMP kontrolliert oder, dass diese Domänen eine neue Klasse von Diadenylatzyklen repräsentieren (Nelson *et al.*, 2013).

c-di-AMP und die Kaliumaufnahme

Der bisher erste und einzige experimentell bestätigte c-di-AMP-Rezeptor in *B. subtilis* ist KtrA (Corrigan *et al.*, 2013). Zusammen mit KtrB bildet der KtrAB-Komplex einen „high affinity“ Kaliumtransporter. Daneben existiert der homologe KtrCD-Komplex als „low affinity“ Kaliumtransporter. Beide Systeme sind für die Kaliumaufnahme wichtig (Holtmann *et al.*, 2003). Die hohe Kaliumaffinität von KtrAB zeigt, dass der Komplex besonders für die Aufnahme unter Niedrigkaliumbedingungen relevant ist. Herrschen auf der Zellaußenseite hingegen moderate bis höhere Kaliumkonzentrationen, ist es vermutlich wichtig, die KtrAB-Aktivität zu inhibieren, um nicht zu viel Kalium aufzunehmen. Diese Inhibition wird mittels c-di-AMP wahrscheinlich durch gleich zwei redundante Mechanismen reguliert: (I) Interaktion von c-di-AMP mit der RCK_C-Domäne von KtrA (Corrigan *et al.*, 2013). Kurz bevor diese Interaktion überraschend publiziert wurde, wurde anhand der KtrAB-Struktur ein Modell postuliert, in dem die Aufnahme durch einen noch unbekanntem Stimulus reguliert wird (Vieira-Pires *et al.*, 2013). Dieser Stimulus könnte die Abwesenheit von c-di-AMP sein. (II) Expressionskontrolle auf mRNA-Ebene durch den *ydaO*-Riboswitch. Die *ktrAB*-mRNA steht unter der Kontrolle des c-di-AMP-regulierten *ydaO*-Riboswitch. Dieser bindet c-di-AMP hochaffin, wodurch die weitere Expression der mRNA verhindert wird (Nelson *et al.*, 2013).

Die RCK_C-Domäne ist in *B. subtilis* laut Annotierung (UniProtKB) neben KtrA auch in den Proteinen KtrC, YhaT und YrvC vorhanden. KtrC ist das KtrA-Homolog des „low affinity“ Kaliumtransporter-Komplexes KtrCD. YhaT ist ein K⁺/H⁺-Antiporter (Fujisawa *et al.*, 2004, Fujisawa *et al.*, 2007). Damit zeigt er die gleiche Aktivität wie der in *S. aureus* identifizierte, RCK_C-tragende c-di-AMP-Rezeptor CpaA (Corrigan *et al.*, 2013). Für YrvC ist bisher noch keine Funktion bekannt. Es wäre interessant, die c-di-AMP-Bindung an die RCK_C-Domänen

dieser Proteine zu bestätigen. Vielmehr könnte die Aufklärung der Funktion von YrvC weitere Einblicke in die Rolle von c-di-AMP ermöglichen, sofern eine Interaktion stattfindet.

c-di-AMP scheint ein wichtiger, regulierender Signalträger in der Kaliumhomöostase zu sein. Kalium, als das bedeutendste intrazelluläre Kation, spielt nicht nur für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials eine Rolle sondern auch in der Osmoregulation – eine Funktion für die eine intakte Zellwand ebenfalls wichtig ist (Damper & Epstein, 1981, Mates *et al.*, 1983, Epstein, 2003). Somit könnte auch ein indirekter Zusammenhang zwischen der c-di-AMP-regulierten Kaliumaufnahme und der Zellwand bestehen.

c-di-AMP-Export

In *L. monocytogenes* wurden die Proteine MdrT, MdrM, und LmrB als c-di-AMP-Exporter klassifiziert. Von dem pathogenen Organismus infizierte Wirtszellen aktivieren eine STING-vermittelte Immunantwort durch Erkennung des sekretierten c-di-AMPs (Crimmins *et al.*, 2008, Woodward *et al.*, 2010, Schwartz *et al.*, 2012). Zu welchem Zweck c-di-AMP von Bakterien sekretiert wird, ist nach wie vor unklar (Kaplan Zeevi *et al.*, 2013). Die *B. subtilis*-Proteine YcnB, YhcA, YfmO und LmrB weisen eine hohe Identität zu den *L. monocytogenes*-Transportern auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde initial nachgewiesen, dass c-di-AMP auch von *B. subtilis* sekretiert wird (Daten nicht gezeigt), ohne die Rolle der putativen Transporter zu untersuchen. Der Export von c-di-AMP scheint demnach auch für *B. subtilis* eine Rolle zu spielen.

CdaA-GatA-Interaktion in *Treponema pallidum*

In einer Screeningstudie fand die Diadenylatzyklase CdaA (TP_0826) des Gram-negativen Syphiliserreger *T. pallidum* schon 2008 Erwähnung – bevor c-di-AMP überhaupt entdeckt wurde. Demnach war die Funktion des Proteins damals unbekannt. In den Screeningexperimenten zur Untersuchung des binären Protein-Interaktions wurde mittels two-hybrid-Analysen eine CdaA-GatA-Interaktion gefunden (Titz *et al.*, 2008). GatA ist eine weit verbreitete, essentielle Untereinheit der Glutamyl-tRNA-Amidotransferase (Glutamin-tRNA) und stellt demnach eine weitere Verbindung zwischen dem c-di-AMP- und Glutamin-Stoffwechsel her.

4.6 Die Enzymaktivität von CdaS wird durch eine autoinhibitorische Domäne reguliert

Bisher wurden verschiedene Ebenen der Regulation für die c-di-AMP-Synthese diskutiert. Auf Expressionsebene ist die Transkription der verschiedenen DACs abhängig von unterschiedlichen Promotoren (*cdaA* und *disA*, konstitutiv; *cdaS*, Sporulation und Stress). Darüber hinaus wird die Aktivität der DACs auf Proteinebene durch Interaktionen mit Regulatoren kontrolliert. DisA wird durch das benachbart kodierte RadA inhibiert. CdaA wird durch das ebenfalls benachbart kodierte CdaR aktiviert. Diese Regulationsmechanismen gelten nicht nur für *B. subtilis*, sondern sind vermutlich weit verbreitet. Es scheint demnach, als sei die präzise Kontrolle der DAC-Aktivität wichtig. In weiterer Konsequenz spricht das für eine spezifische Assoziation der Aktivität mit der Funktion.

Regulation der CdaS-Aktivität

Wie in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, wird die Aktivität der Diadenylatzyklase CdaS ebenfalls reguliert. Damit unterliegen alle drei DACs von *B. subtilis* einer Kontrolle auf Proteinebene. CdaS bildet einen hexameren Komplex (Abbildung 3.18). Jede monomere Untereinheit trägt zwei N-terminale Helices, die sowohl für die Oligomerisierung als auch für die Aktivität wichtig sind. Die Identifizierung mehrerer CdaS-Varianten zeigte, dass bestimmte Mutationen in diesen Helices zur Hyperaktivität führen (Tabelle 3.4). Sehr wahrscheinlich ändert sich die Konformation der DAC-Domänen im hexameren Komplex derart, dass die Katalyse sterisch begünstigt und folglich effizienter ablaufen kann. Die Trunkierung der Helices führte zu einem Protein, das nur noch aus der katalytischen DAC-Domäne bestand, welche über den C-Terminus dimerisierte. Dieses Konstrukt zeigte die gleiche Hyperaktivität. Die beiden N-terminalen Helices fungieren demnach als autoinhibitorische Domäne von CdaS, welche die DAC-Domäne zwischen „aktiver“ und „inaktiver“ Konformation schalten kann. Es ist anzunehmen, dass diese Schaltung durch einen noch nicht bekannten Stimulus gesteuert wird.

Autoinhibitorische Domänen sind auch für andere Proteine bekannt. Zur Expression der Gene der Arginin- und Ornithinsynthese benötigt *B. subtilis* den Transkriptionsfaktor RocR. Dessen Aktivität wird durch eine N-terminale Domäne inhibiert, indem diese mit der

katalytischen Einheit interagiert. In Anwesenheit der Effektoren Ornithin oder Citrullin wird RocR aktiviert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der N-terminalen Domäne zur konstitutiven Aktivierung von RocR führen können (Gardan *et al.*, 1997, Zaprasis *et al.*, 2013).

Ein weiteres Beispiel für die intrinsische Kontrolle durch eine N-terminale autoinhibitorische Domäne ist der Sigmafaktor σ^{54} . Es wurde gezeigt, dass diese Domäne eine Interaktion von σ^{54} mit der RNA-Polymerase verhindert und somit kein funktionelles Holoenzym gebildet werden kann. Eine verkürzte σ^{54} -Variante, welche die autoinhibitorische Domäne nicht mehr besaß, war hingegen konstitutiv aktiv (Cannon *et al.*, 1999).

Deutlich mehr Ähnlichkeit zur Aktivität von CdaS zeigt die cAMP synthetisierende Adenylatzyklase Rv1264 aus *Mycobacterium tuberculosis*. Wie andere Adenylatzyklasen der Klasse III besitzt Rv1264, welches als Dimer aktiv ist, ebenfalls eine N-terminale autoinhibitorische Domäne. Genau wie bei CdaS führen Punktmutationen innerhalb der Domäne sowie ihre Deletion zur Aktivitätssteigerung (Linder *et al.*, 2002). Die strukturelle Analyse von Rv1264 zeigte, dass die inhibitorische Domäne die Aktivität der katalytischen Einheit durch Interaktion kontrolliert. Die Rotation der katalytischen Einheit von 55° im aktiven Zustand führt zur Ausbildung einer aktiven Grenzfläche des Dimers (Tews *et al.*, 2005). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Inhibition durch die N-terminale Domäne pH-abhängig ist und dadurch die Virulenz von *M. tuberculosis* beeinflusst wird (Tews *et al.*, 2005, Abdel Motaal *et al.*, 2006, Dittrich *et al.*, 2006, Findeisen *et al.*, 2007).

Biologische Relevanz von CdaS

Die Grundlage, auf der die *B. subtilis* Supressormutanten entstanden, war die Depletion von c-di-AMP. Die Tatsache, dass diese Suppressoren, dank der hyperaktiven CdaS-Varianten, zum Überleben ausreichende Mengen c-di-AMP synthetisieren konnten, ist eine weitere Bestätigung dafür, dass es keine Rolle spielt, durch welche DAC die Mindestmenge produziert wird. Nichtsdestotrotz scheinen die Aktivitäten der verschiedenen Diadenylatzyklasen CdaA, DisA und CdaS spezifisch mit einer biologischen Funktion assoziiert zu sein. Neben den besprochenen Regulationsmechanismen (Expression und Aktivität) für CdaA und DisA ist auch CdaS auf beiden Ebenen reguliert. Die spezifische Expression von CdaS während der Sporulationsphase ist ein starker Hinweis auf eine Rolle im

Sporulationsprozess. Es stellt sich hingegen die Frage, warum bei solch spezifischer Expression die Aktivität von CdaS gleichzeitig durch eine autoinhibitorische Domäne abgeschaltet werden muss. Der Stimulus, der die Regulation der CdaS-Aktivität durch die inhibitorische Domäne beeinflusst, würde diesen Zusammenhang tiefer erläutern und dadurch möglicherweise Aufschluss über die biologische Relevanz von CdaS geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise gefunden, dass eine CdaS-Mutante unter bestimmten Bedingungen einen Auskeimungsdefekt aufweist (Daten nicht gezeigt). Demnach könnte CdaS auch eine Funktion in der Auskeimung – der Transformation der dormanten Spore zur vegetativen Zelle – haben. Eine mögliche Hypothese wäre, dass CdaS während der Sporulationsphase exprimiert wird, die Enzymaktivität aber durch die regulatorische Domäne inhibiert bleibt. Erst beim Auskeimungsprozess wird die volle CdaS-Aktivität aufgrund eines noch unbekanntes Stimulus erreicht. *B. subtilis* Sporen enthalten circa 10% Calcium-Dipicolinsäure (Paidhungat *et al.*, 2000). Zu Beginn der Auskeimung strömt Wasser in die trockenen Sporen ein, die Kationen H^+ , Na^+ und K^+ (Swerdlow *et al.*, 1981) sowie Ca^{2+} und Dipicolinsäure werden ins Medium abgegeben. Kurz darauf wird Kalium wieder durch energieverbrauchende Transportprozesse aufgenommen, über die noch wenig bekannt ist (Moir, 2006). Eine so hervorgerufene pH-Änderung könnte einen Stimulus für die autoinhibitorische Domäne von CdaS darstellen, wie bei der Adenylatzyklase Rv1264. Dies wäre eine Möglichkeit, in dem kritischen Stadium der Auskeimung sehr schnell c-di-AMP synthetisieren zu können, ohne zuerst das benötigte Enzym produzieren zu müssen. In diesem Fall wäre c-di-AMP für die Auskeimung relevant.

Im Widerspruch dazu steht, dass die mit der Auskeimung assoziierten Gene *sleB* (Moriyama *et al.*, 1999) und *pdaA* (Gilmore *et al.*, 2004) in Clostridien und Bazillen oft unter der Kontrolle des *ydaO*-Riboswitch sind (Nelson *et al.*, 2013). Demnach wird die Expression von *sleB* und *pdaA* in Anwesenheit von c-di-AMP inhibiert, was dafür spricht, dass bei der Auskeimung nur eine sehr geringe c-di-AMP-Konzentration vorliegen darf. In *B. subtilis* stehen *sleB* und *pdaA* nicht unter der Kontrolle des *ydaO*-Riboswitch.

Die sehr komplexen Vorgänge, die sowohl für die Sporulation als auch für die Auskeimung benötigt werden, sind heutzutage gut untersucht. Dennoch gibt es viele Aspekte die nach

wie vor nicht aufgeklärt sind. Die Rolle von CdaS in der Sporulation bzw. Auskeimung könnte helfen diese wichtigen Prozesse besser zu verstehen.

5 Literatur

Abdel Motaal, A., I. Tews, J.E. Schultz & J.U. Linder (2006) Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J* **273**: 4219-4228.

Abdul-Sater, A.A., I. Tattoli, L. Jin, A. Grajkowski, A. Levi, B.H. Koller, I.C. Allen, S.L. Beaucage, K.A. Fitzgerald, J.P. Ting, J.C. Cambier, S.E. Girardin & C. Schindler (2013) Cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP activate the NLRP3 inflammasome. *EMBO Rep* **14**: 900-906.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter (2008) *Molecular biology of the cell*. 5. Ausgabe. Garland Science, New York.

An, S.Q., K.H. Chin, M. Febrer, Y. McCarthy, J.G. Yang, C.L. Liu, D. Swarbreck, J. Rogers, J. Maxwell Dow, S.H. Chou & R.P. Ryan (2013) A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis. *EMBO J* **32**: 2430-2438.

Anagnostopoulos, C. & J. Spizizen (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746.

Artimo, P., M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios & H. Stockinger (2012) ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* **40**: W597-603.

Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* **36**: 525-557.

Bai, Y., J. Yang, T.M. Zarrella, Y. Zhang, D.W. Metzger & G. Bai (2014) Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a c-di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*: in press.

Bai, Y., J. Yang, X. Zhou, X. Ding, L.E. Eisele & G. Bai (2012) *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP. *PLoS One* **7**: e35206.

Baker, D.A. & J.M. Kelly (2004) Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol* **52**: 1229-1242.

Barb, A.W., J.R. Cort, J. Seetharaman, S. Lew, H.W. Lee, T. Acton, R. Xiao, M.A. Kennedy, L. Tong, G.T. Montelione & J.H. Prestegard (2011) Structures of domains I and IV from YbbR are representative of a widely distributed protein family. *Protein Sci* **20**: 396-405.

Barker, J.R., B.J. Koestler, V.K. Carpenter, D.L. Burdette, C.M. Waters, R.E. Vance & R.H. Valdivia (2013) STING-dependent recognition of cyclic di-AMP mediates type I interferon responses during *Chlamydia trachomatis* infection. *MBio* **4**: e00018-00013.

Barreteau, H., A. Kovač, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec & D. Blanot (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 168-207.

Bates, C.J. & C.A. Pasternak (1965) Further studies on the regulation of amino sugar metabolism in *Bacillus subtilis*. *Biochem J* **96**: 147-154.

Battesti, A. & E. Bouveret (2006) Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol* **62**: 1048-1063.

Bejerano-Sagie, M., Y. Oppenheimer-Shaanan, I. Berlatzky, A. Rouvinski, M. Meyerovich & S. Ben-Yehuda (2006) A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **125**: 679-690.

Belitsky, B.R., L.V. Wray, Jr., S.H. Fisher, D.E. Bohannon & A.L. Sonenshein (2000) Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. *J Bacteriol* **182**: 5939-5947.

Bhavsar, A.P. & E.D. Brown (2006) Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Mol Microbiol* **60**: 1077-1090.

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.

Buettner, M.J., E. Spitz & H.V. Rickenberg (1973) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **114**: 1068-1073.

Burdette, D.L., K.M. Monroe, K. Sotelo-Troha, J.S. Iwig, B. Eckert, M. Hyodo, Y. Hayakawa & R.E. Vance (2011) STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**: 515-518.

Butcher, L.A. & J.K. Tomkins (1985) A comparison of silver staining methods for detecting proteins in ultrathin polyacrylamide gels on support film after isoelectric focusing. *Anal Biochem* **148**: 384-388.

Campos, S.S., J.R. Ibarra-Rodriguez, R.C. Barajas-Ornelas, F.H. Ramírez-Guadiana, A. Obregón-Herrera, P. Setlow & M. Pedraza-Reyes (2014) Interaction of apurinic/apyrimidinic (AP) endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein (DisA) in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *J Bacteriol*: in press.

-
- Cannon, W., M.T. Gallegos, P. Casaz & M. Buck (1999) Amino-terminal sequences of sigmaN (sigma54) inhibit RNA polymerase isomerization. *Genes Dev* **13**: 357-370.
- Carrasco, B., M.C. Cozar, R. Lurz, J.C. Alonso & S. Ayora (2004) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J Bacteriol* **186**: 5557-5566.
- Chaudhuri, R.R., A.G. Allen, P.J. Owen, G. Shalom, K. Stone, M. Harrison, T.A. Burgis, M. Lockyer, J. Garcia-Lara, S.J. Foster, S.J. Pleasance, S.E. Peters, D.J. Maskell & I.G. Charles (2009) Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). *BMC Genomics* **10**: 291.
- Chen, Z.H. & P. Schaap (2012) The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature* **488**: 680-683.
- Chien, A.C., S.K. Zareh, Y.M. Wang & P.A. Levin (2012) Changes in the oligomerization potential of the division inhibitor UgtP co-ordinate *Bacillus subtilis* cell size with nutrient availability. *Mol Microbiol* **86**: 594-610.
- Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte & U. Jenal (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**: 30829-30837.
- Claessen, D., R. Emmins, L.W. Hamoen, R.A. Daniel, J. Errington & D.H. Edwards (2008) Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**: 1029-1046.
- Collins, J.A., I. Irnov, S. Baker & W.C. Winkler (2007) Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme. *Genes Dev* **21**: 3356-3368.
- Commichau, F.M. (2006) Regulation der Glutamatsynthese in *Bacillus subtilis* durch die Glutamatdehydrogenase RocG und das Aktivatorprotein GltC. *Doktorarbeit. Universität Göttingen*.
- Commichau, F.M., K. Forchhammer & J. Stülke (2006) Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* **9**: 167-172.
- Commichau, F.M., F.M. Rothe, C. Herzberg, E. Wagner, D. Hellwig, M. Lehnik-Habrink, E. Hammer, U. Völker & J. Stülke (2009) Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics* **8**: 1350-1360.
- Commichau, F.M. & J. Stülke (2008) Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol Microbiol* **67**: 692-702.
-

Cooper, S. (1969) Cell division and DNA replication following a shift to a richer medium. *J Mol Biol* **43**: 1-11.

Corrigan, R.M., J.C. Abbott, H. Burhenne, V. Kaefer & A. Gründling (2011) c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathog* **7**: e1002217.

Corrigan, R.M., I. Campeotto, T. Jeganathan, K.G. Roelofs, V.T. Lee & A. Gründling (2013) Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 9084-9089.

Corrigan, R.M. & A. Gründling (2013) Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat Rev Microbiol* **11**: 513-524.

Crimmins, G.T., A.A. Herskovits, K. Rehder, K.E. Sivick, P. Lauer, T.W. Dubensky, Jr. & D.A. Portnoy (2008) *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10191-10196.

Dahl, M.K., J. Degenkolb & W. Hillen (1994) Transcription of the xyl operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pairs. *J Mol Biol* **243**: 413-424.

Damper, P.D. & W. Epstein (1981) Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **20**: 803-808.

Davies, B.W., R.W. Bogard, T.S. Young & J.J. Mekalanos (2012) Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* **149**: 358-370.

Dengler, V., N. McCallum, P. Kiefer, P. Christen, A. Patrignani, J.A. Vorholt, B. Berger-Bächi & M.M. Senn (2013) Mutation in the c-di-AMP cyclase *dacA* affects fitness and resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **8**: e73512.

Detsch, C. & J. Stülke (2003) Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* **149**: 3289-3297.

Diethmaier, C. (2008) CsrA-abhängige Regulation in *Bacillus subtilis*. *Diplomarbeit. Universität Göttingen*.

Diethmaier, C., N. Pietack, K. Gunka, C. Wrede, M. Lehnik-Habrink, C. Herzberg, S. Hübner & J. Stülke (2011) A novel factor controlling bistability in *Bacillus subtilis*: the YmdB protein affects flagellin expression and biofilm formation. *J Bacteriol* **193**: 5997-6007.

-
- Dittrich, D., C. Keller, S. Ehlers, J.E. Schultz & P. Sander (2006) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant deficient in pH-sensing adenylate cyclase Rv1264. *Int J Med Microbiol* **296**: 563-566.
- Donachie, W.D. & K.J. Begg (1989) Cell length, nucleoid separation, and cell division of rod-shaped and spherical cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 4633-4639.
- Epstein, W. (2003) The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **75**: 293-320.
- Errington, J. (2013) L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open Biol* **3**: 120143.
- Findeisen, F., J.U. Linder, A. Schultz, J.E. Schultz, B. Brügger, F. Wieland, I. Sinning & I. Tews (2007) The structure of the regulatory domain of the adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* with bound oleic acid. *J Mol Biol* **369**: 1282-1295.
- Formstone, A. & J. Errington (2005) A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **55**: 1646-1657.
- Freeman, Z.N., S. Dorus & N.R. Waterfield (2013) The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence. *PLoS Pathog* **9**: e1003201.
- French, C.T., P. Lao, A.E. Loraine, B.T. Matthews, H. Yu & K. Dybvig (2008) Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol Microbiol* **69**: 67-76.
- Fujisawa, M., M. Ito & T.A. Krulwich (2007) Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13289-13294.
- Fujisawa, M., Y. Wada & M. Ito (2004) Modulation of the K⁺ efflux activity of *Bacillus subtilis* YhaU by YhaT and the C-terminal region of YhaS. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 211-217.
- Galperin, M.Y. (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**: 35.
- Gardan, R., G. Rapoport & M. Débarbouillé (1997) Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **24**: 825-837.
- Gärtner, D., J. Degenkolb, J.A. Ripperger, R. Allmansberger & W. Hillen (1992) Regulation of the *Bacillus subtilis* W23 xylose utilization operon: interaction of the Xyl repressor with the xyl operator and the inducer xylose. *Mol Gen Genet* **232**: 415-422.
-

-
- Gilmore, M.E., D. Bandyopadhyay, A.M. Dean, S.D. Linnstaedt & D.L. Popham (2004) Production of muramic delta-lactam in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *J Bacteriol* **186**: 80-89.
- Glass, J.I., N. Assad-Garcia, N. Alperovich, S. Yooseph, M.R. Lewis, M. Maruf, C.A. Hutchison, 3rd, H.O. Smith & J.C. Venter (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 425-430.
- Gongadze, G.M., V.A. Meshcheryakov, A.A. Serganov, N.P. Fomenkova, E.S. Mudrik, B.H. Jonsson, A. Liljas, S.V. Nikonov & M.B. Garber (1999) N-terminal domain, residues 1-91, of ribosomal protein TL5 from *Thermus thermophilus* binds specifically and strongly to the region of 5S rRNA containing loop E. *FEBS Lett* **451**: 51-55.
- Görke, B. & J. Stülke (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624.
- Green, S.J., S. Mellouk, S.L. Hoffman, M.S. Meltzer & C.A. Nacy (1990) Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett* **25**: 15-19.
- Guérout-Fleury, A.M., K. Shazand, N. Frandsen & P. Stragier (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**: 335-336.
- Guex, N. & M.C. Peitsch (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Gunka, K. (2010) Der Einfluss der Glutamatdehydrogenasen auf die Verknüpfung des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels in *Bacillus subtilis*. *Doktorarbeit. Universität Göttingen*.
- Hahne, H., S. Wolff, M. Hecker & D. Becher (2008) From complementarity to comprehensiveness--targeting the membrane proteome of growing *Bacillus subtilis* by divergent approaches. *Proteomics* **8**: 4123-4136.
- Hames, C., S. Halbedel, O. Schilling & J. Stülke (2005) Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the glpK gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4097-4100.
- Herzberg, C., L.A. Weidinger, B. Dörrbecker, S. Hübner, J. Stülke & F.M. Commichau (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* **7**: 4032-4035.
- Hill, N.S., P.J. Buske, Y. Shi & P.A. Levin (2013) A Moonlighting Enzyme Links *Escherichia coli* Cell Size with Central Metabolism. *PLoS Genet* **9**: e1003663.
-

-
- Holtmann, G., E.P. Bakker, N. Uozumi & E. Bremer (2003) KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* **185**: 1289-1298.
- Huang, Y.H., X.Y. Liu, X.X. Du, Z.F. Jiang & X.D. Su (2012) The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 728-730.
- Hübner, S. (2008) Untersuchung der Spezifität von Antiterminationsproteinen in *Bacillus subtilis*. *Doktorarbeit. Universität Göttingen*.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport & M. Shlomchik (2002) *Immunologie*. 5. Ausgabe. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Jervis, A.J., P.D. Thackray, C.W. Houston, M.J. Horsburgh & A. Moir (2007) SigM-responsive genes of *Bacillus subtilis* and their promoters. *J Bacteriol* **189**: 4534-4538.
- Jolly, L., P. Ferrari, D. Blanot, J. Van Heijenoort, F. Fassy & D. Mengin-Lecreulx (1999) Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **262**: 202-210.
- Jolly, L., F. Pompeo, J. van Heijenoort, F. Fassy & D. Mengin-Lecreulx (2000) Autophosphorylation of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 1280-1285.
- Kaiser, D. & R. Losick (1993) How and why bacteria talk to each other. *Cell* **73**: 873-885.
- Kaplan Zeevi, M., N.S. Shafir, S. Shaham, S. Friedman, N. Sigal, R. Nir-Paz, I.G. Boneca & A.A. Herskovits (2013) *Listeria monocytogenes* MDR transporters and c-di-AMP that contribute to Type I interferons induction, play a role in cell wall stress. *J Bacteriol* **195**: 5250-5261.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann & D. Ladant (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.
- Kato, K., R. Ishii, E. Goto, R. Ishitani, F. Tokunaga & O. Nureki (2013) Structural and Functional Analyses of DNA-Sensing and Immune Activation by Human cGAS. *PLoS One* **8**: e76983.
- Kiefer, F., K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli & T. Schwede (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* **37**: D387-392.
- Klein, D.J. & A.R. Ferré-D'Amaré (2006) Structural basis of *glmS* ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science* **313**: 1752-1756.
-

Kobayashi, K., S.D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K.K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai, S. Ashikaga, S. Aymerich, P. Bessieres, F. Boland, S.C. Brignell, S. Bron, K. Bunai, J. Chapuis, L.C. Christiansen, A. Danchin, M. Débarbouillé, E. Dervyn, E. Deuerling, K. Devine, S.K. Devine, O. Dreesen, J. Errington, S. Fillinger, S.J. Foster, Y. Fujita, A. Galizzi, R. Gardan, C. Eschevins, T. Fukushima, K. Haga, C.R. Harwood, M. Hecker, D. Hosoya, M.F. Hullo, H. Kakeshita, D. Karamata, Y. Kasahara, F. Kawamura, K. Koga, P. Koski, R. Kuwana, D. Imamura, M. Ishimaru, S. Ishikawa, I. Ishio, D. Le Coq, A. Masson, C. Mauël, R. Meima, R.P. Mellado, A. Moir, S. Moriya, E. Nagakawa, H. Nanamiya, S. Nakai, P. Nygaard, M. Ogura, T. Ohanan, M. O'Reilly, M. O'Rourke, Z. Pragai, H.M. Pooley, G. Rapoport, J.P. Rawlins, L.A. Rivas, C. Rivolta, A. Sadaie, Y. Sadaie, M. Sarvas, T. Sato, H.H. Saxild, E. Scanlan, W. Schumann, J.F. Seegers, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S.J. Séror, M. Simon, P. Stragier, R. Studer, H. Takamatsu, T. Tanaka, M. Takeuchi, H.B. Thomaidis, V. Vagner, J.M. van Diji, K. Watabe, A. Wipat, H. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Yamamoto, K. Yamane, K. Yata, K. Yoshida, H. Yoshikawa, U. Zuber & N. Ogasawara (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678-4683.

Konno, H., K. Konno & G.N. Barber (2013) Cyclic Dinucleotides Trigger ULK1 (ATG1) Phosphorylation of STING to Prevent Sustained Innate Immune Signaling. *Cell* **155**: 688-698.

Kranzusch, P.J., A.S. Lee, J.M. Berger & J.A. Doudna (2013) Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep* **3**: 1362-1368.

Krüger, E., T. Msadek & M. Hecker (1996) Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Mol Microbiol* **20**: 713-723.

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

Lapouge, K., M. Schubert, F.H. Allain & D. Haas (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**: 241-253.

Lehnik-Habrink, M., H. Pförtner, L. Rempeters, N. Pietack, C. Herzberg & J. Stülke (2010) The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol*.

Lehnik-Habrink, M., M. Schaffer, U. Mäder, C. Diethmaier, C. Herzberg & J. Stülke (2011) RNA processing in *Bacillus subtilis*: identification of targets of the essential RNase Y. *Mol Microbiol* **81**: 1459-1473.

Lewis, P.J. & A.L. Marston (1999) GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **227**: 101-110.

Linder, J.U. (2010) cGMP production in bacteria. *Mol Cell Biochem* **334**: 215-219.

Linder, J.U., A. Schultz & J.E. Schultz (2002) Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J Biol Chem* **277**: 15271-15276.

Lodish, H. (2004) *Molecular cell biology*. 5. Ausgabe. Freeman, New York.

Luo, Y. & J.D. Helmann (2012) Analysis of the role of *Bacillus subtilis* sigma(M) in beta-lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Mol Microbiol* **83**: 623-639.

Lüttmann, D. (2011) Die regulatorischen Funktionen des paralogen Phosphotransferase Systems (PTS-Ntr) in *Escherichia coli*. *Doktorarbeit. Universität Göttingen*.

Mandal, M., B. Boese, J.E. Barrick, W.C. Winkler & R.R. Breaker (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**: 577-586.

Marden, J.N., Q. Dong, S. Roychowdhury, J.E. Berleman & C.E. Bauer (2011) Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development. *Mol Microbiol* **79**: 600-615.

Marquardt, J.L., D.A. Siegele, R. Kolter & C.T. Walsh (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *murZ* and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *J Bacteriol* **174**: 5748-5752.

Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier & G. Rapoport (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.

Massie, J.P., E.L. Reynolds, B.J. Koestler, J.P. Cong, M. Agostoni & C.M. Waters (2012) Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 12746-12751.

Mates, S.M., L. Patel, H.R. Kaback & M.H. Miller (1983) Membrane potential in anaerobically growing *Staphylococcus aureus* and its relationship to gentamicin uptake. *Antimicrob Agents Chemother* **23**: 526-530.

Mehne, F.M.P., K. Gunka, H. Eilers, C. Herzberg, V. Kaefer & J. Stülke (2013) Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *J Biol Chem* **288**: 2004-2017.

Mengin-Lecreulx, D. & J. van Heijenoort (1996) Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 32-39.

Merzbacher, M., C. Detsch, W. Hillen & J. Stülke (2004) *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphorylase. *Eur J Biochem* **271**: 367-374.

Meyer, F. (2009) Protein-Protein-Interaktionen im Citratzyklus von *Bacillus subtilis*. *Diplomarbeit. Universität Göttingen*.

Meyer, F.M., M. Jules, F.M.P. Mehne, D. Le Coq, J.J. Landmann, B. Görke, S. Aymerich & J. Stülke (2011) Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. *J Bacteriol* **193**: 6939-6949.

Mogk, A., G. Homuth, C. Scholz, L. Kim, F.X. Schmid & W. Schumann (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**: 4579-4590.

Moir, A. (2006) How do spores germinate? *J Appl Microbiol* **101**: 526-530.

Moriyama, R., H. Fukuoka, S. Miyata, S. Kudoh, A. Hattori, S. Kozuka, Y. Yasuda, K. Tochikubo & S. Makino (1999) Expression of a germination-specific amidase, SleB, of Bacilli in the forespore compartment of sporulating cells and its localization on the exterior side of the cortex in dormant spores. *J Bacteriol* **181**: 2373-2378.

Muchová, K., Z. Chromiková & I. Barák (2013) Control of *Bacillus subtilis* cell shape by RodZ. *Environ Microbiol* **15**: 3259-3271.

Murray, T., D.L. Popham & P. Setlow (1998) *Bacillus subtilis* cells lacking penicillin-binding protein 1 require increased levels of divalent cations for growth. *J Bacteriol* **180**: 4555-4563.

Nelson, J.W., N. Sudarsan, K. Furukawa, Z. Weinberg, J.X. Wang & R.R. Breaker (2013) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nat Chem Biol* **9**: 834-839.

Nesterenko, M.V., M. Tilley & S.J. Upton (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**: 239-242.

Nicolas, P., U. Mäder, E. Dervyn, T. Rochat, A. Leduc, N. Pigeonneau, E. Bidnenko, E. Marchadier, M. Hoebeke, S. Aymerich, D. Becher, P. Bisicchia, E. Botella, O. Delumeau, G. Doherty, E.L. Denham, M.J. Fogg, V. Fromion, A. Goelzer, A. Hansen, E. Hartig, C.R. Harwood, G. Homuth, H. Jarmer, M. Jules, E. Klipp, L. Le Chat, F. Lecointe, P. Lewis, W. Liebermeister, A. March, R.A. Mars, P. Nannapaneni, D. Noone, S. Pohl, B. Rinn, F. Rugheimer, P.K. Sappa, F. Samson, M. Schaffer, B. Schwikowski, L. Steil, J. Stülke, T. Wiegert, K.M. Devine, A.J. Wilkinson, J.M. van Diji, M. Hecker, U. Völker, P. Bessieres & P. Noirot (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**: 1103-1106.

Niepmann, M. & J. Zheng (2006) Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**: 3949-3951.

-
- Ninfa, A.J. & M.R. Atkinson (2000) PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol* **8**: 172-179.
- Oppenheimer-Shaanan, Y., E. Wexselblatt, J. Katzhendler, E. Yavin & S. Ben-Yehuda (2011) c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep* **12**: 594-601.
- Paidhungat, M., B. Setlow, A. Driks & P. Setlow (2000) Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J Bacteriol* **182**: 5505-5512.
- Parkinson, J.S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-871.
- Paul, R., S. Weiser, N.C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese & U. Jenal (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**: 715-727.
- Persky, N.S., D.J. Ferullo, D.L. Cooper, H.R. Moore & S.T. Lovett (2009) The ObgE/CgtA GTPase influences the stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**: 253-266.
- Rao, F., Q. Ji, I. Soehano & Z.X. Liang (2011) Unusual heme-binding PAS domain from YybT family proteins. *J Bacteriol* **193**: 1543-1551.
- Rao, F., R.Y. See, D. Zhang, D.C. Toh, Q. Ji & Z.X. Liang (2010) YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity. *J Biol Chem* **285**: 473-482.
- Reizer, J., S. Bachem, A. Reizer, M. Arnaud, M.H. Saier, Jr. & J. Stülke (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.
- Römling, U. (2008) Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. *Sci Signal* **1**: pe39.
- Römling, U., M.Y. Galperin & M. Gomelsky (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 1-52.
- Rothe, F. (2009) Funktionelle Analyse der Domänen der essentiellen RNase Y in *Bacillus subtilis*. *Diplomarbeit. Universität Göttingen*.
- Rothe, F. (2012) Regulation der Aktivität und Lokalisation von Antiterminatorproteinen der BglG-Familie. *Doktorarbeit. Universität Göttingen*.
-

Ryan, R.P., Y. Fouhy, J.F. Lucey, L.C. Crossman, S. Spiro, Y.W. He, L.H. Zhang, S. Heeb, M. Cámara, P. Williams & J.M. Dow (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6712-6717.

Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Ausgabe. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.

Sargent, M.G. (1975) Control of cell length in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **123**: 7-19.

Schaechter, M., O. Maaløe & N.O. Kjeldgaard (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* **19**: 592-606.

Schilling, O., O. Frick, C. Herzberg, A. Ehrenreich, E. Heinzle, C. Wittmann & J. Stülke (2007) Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: transcription regulation is important but not sufficient to account for metabolic adaptation. *Appl Environ Microbiol* **73**: 499-507.

Schilling, O., C. Herzberg, T. Hertrich, H. Vörsmann, D. Jessen, S. Hübner, F. Titgemeyer & J. Stülke (2006) Keeping signals straight in transcription regulation: specificity determinants for the interaction of a family of conserved bacterial RNA-protein couples. *Nucleic Acids Res* **34**: 6102-6115.

Schirmer, F., S. Ehrt & W. Hillen (1997) Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J Bacteriol* **179**: 1329-1336.

Schirner, K. & J. Errington (2009) The cell wall regulator σ^I specifically suppresses the lethal phenotype of *mbl* mutants in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **191**: 1404-1413.

Schirner, K., J. Marles-Wright, R.J. Lewis & J. Errington (2009) Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **28**: 830-842.

Schmalisch, M., I. Langbein & J. Stülke (2002) The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 495-501.

Schmeisky, A. (2013) Untersuchung zur kohlenstoffabhängigen Wasserstoffperoxidproduktion und Virulenz in *Mycoplasma pneumoniae* und *Mycoplasma genitalium*. Doktorarbeit. Universität Göttingen.

-
- Schmidl, S.R., K. Gronau, N. Pietack, M. Hecker, D. Becher & J. Stülke (2010) The phosphoproteome of the minimal bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the complete known Ser/Thr kinome suggests the existence of novel kinases. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1228-1242.
- Schmidt, A.J., D.A. Ryjenkov & M. Gomelsky (2005) The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187**: 4774-4781.
- Schwartz, K.T., J.D. Carleton, S.J. Quillin, S.D. Rollins, D.A. Portnoy & J.H. Leber (2012) Hyperinduction of host beta interferon by a *Listeria monocytogenes* strain naturally overexpressing the multidrug efflux pump MdrT. *Infect Immun* **80**: 1537-1545.
- Seshasayee, A.S., G.M. Fraser & N.M. Luscombe (2010) Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* **38**: 5970-5981.
- Shiomi, D. & W. Margolin (2007) A sweet sensor for size-conscious bacteria. *Cell* **130**: 216-218.
- Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz & U. Römling (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**: 1123-1134.
- Song, J.H., K.S. Ko, J.Y. Lee, J.Y. Baek, W.S. Oh, H.S. Yoon, J.Y. Jeong & J. Chun (2005) Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells* **19**: 365-374.
- Spangler, C., A. Böhm, U. Jenal, R. Seifert & V. Kaefer (2010) A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods* **81**: 226-231.
- Spira, B., N. Silberstein & E. Yagil (1995) Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol* **177**: 4053-4058.
- Stülke, J., I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier & G. Rapoport (1997) Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* **25**: 65-78.
- Sudarsan, N., E.R. Lee, Z. Weinberg, R.H. Moy, J.N. Kim, K.H. Link & R.R. Breaker (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413.
- Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen & Z.J. Chen (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**: 786-791.
-

Swerdlow, B.M., B. Setlow & P. Setlow (1981) Levels of H⁺ and other monovalent cations in dormant and germinating spores of *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* **148**: 20-29.

Swift, S., N.J. Bainton & M.K. Winson (1994) Gram-negative bacterial communication by N-acyl homoserine lactones: a universal language? *Trends Microbiol* **2**: 193-198.

Swoboda, J.G., J. Campbell, T.C. Meredith & S. Walker (2010) Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *Chembiochem* **11**: 35-45.

Tan, E., F. Rao, S. Pasunooti, T.H. Pham, I. Soehano, M.S. Turner, C.W. Liew, J. Lescar, K. Pervushin & Z.X. Liang (2013) Solution structure of the PAS domain of a thermophilic YybT protein homolog reveals a potential ligand-binding site. *J Biol Chem* **288**: 11949-11959.

Tews, I., F. Findeisen, I. Sinning, A. Schultz, J.E. Schultz & J.U. Linder (2005) The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science* **308**: 1020-1023.

Thoendel, M. & A.R. Horswill (2010) Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Adv Appl Microbiol* **71**: 91-112.

Titz, B., S.V. Rajagopala, J. Goll, R. Häuser, M.T. McKevitt, T. Palzkill & P. Uetz (2008) The binary protein interactome of *Treponema pallidum* - the syphilis spirochete. *PLoS One* **3**: e2292.

Vieira-Pires, R.S., A. Szollosi & J.H. Morais-Cabral (2013) The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* **496**: 323-328.

Vinella, D., C. Albrecht, M. Cashel & R. D'Ari (2005) Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**: 958-970.

Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-265.

Weart, R.B., A.H. Lee, A.C. Chien, D.P. Haeusser, N.S. Hill & P.A. Levin (2007) A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell* **130**: 335-347.

Weinrauch, Y., T. Msadek, F. Kunst & D. Dubnau (1991) Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 5685-5693.

White, R.J. & C.A. Pasternak (1967) The purification and properties of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*. *Biochem J* **105**: 121-125.

Winkler, W.C., A. Nahvi, A. Roth, J.A. Collins & R.R. Breaker (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**: 281-286.

Witte, C.E., A.T. Whiteley, T.P. Burke, J.D. Sauer, D.A. Portnoy & J.J. Woodward (2013) Cyclic di-AMP is critical for *Listeria monocytogenes* growth, cell wall homeostasis, and establishment of infection. *MBio* **4**: e00282-00213.

Witte, G., S. Hartung, K. Buttner & K.P. Hopfner (2008) Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* **30**: 167-178.

Wolfe, A.J. & K.L. Visick (2008) Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190**: 463-475.

Woodcock, D.M., P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael & M.W. Graham (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.

Woodward, J.J., A.T. Iavarone & D.A. Portnoy (2010) c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* **328**: 1703-1705.

Wray, L.V., Jr., A.E. Ferson, K. Rohrer & S.H. Fisher (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8841-8845.

Wray, L.V., Jr., J.M. Zalieckas & S.H. Fisher (2001) *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* **107**: 427-435.

Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen & Z.J. Chen (2013) Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339**: 826-830.

Xia, G., T. Kohler & A. Peschel (2010) The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **300**: 148-154.

Xue, T., Y. You, D. Hong, H. Sun & B. Sun (2011) The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K⁺ sensing and Agr signaling to infection programming. *Infect Immun* **79**: 2154-2167.

Zapras, A., T. Hoffmann, G. Wünsche, L.A. Flórez, J. Stülke & E. Bremer (2013) Mutational activation of the RocR activator and of a cryptic *rocDEF* promoter bypass loss of the initial steps of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol*: doi: 10.1111/1462-2920.12193.

Zhang, L. & Z.G. He (2013) Radiation-sensitive gene A (RadA) targets DisA, DNA integrity scanning protein A, to negatively affect cyclic Di-AMP synthesis activity in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **288**: 22426-22436.

Zhang, L., W. Li & Z.G. He (2013) DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **288**: 3085-3096.

Zweers, J.C., T. Wiegert & J.M. van Dijl (2009) Stress-responsive systems set specific limits to the overproduction of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7356-7364.

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Antibiotika	Sigma, München
CDP*	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue, R350	Amersham, Freiburg
Desthiobiotin	Iba, Göttingen
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- b -D-Thiogalactopyranosid	Peqlap, Erlangen
Ni ²⁺ -NTA-Sepharose	Iba, Göttingen
Nilrot	Sigma, München
Nutrient Broth	Merck, Darmstadt
o-Nitrophenyl- b -D-Galactopyranosid	Sigma, München
Strep-Tactin® Sepharose	Iba, Göttingen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Oxoid, Heidelberg

Alle sonstigen verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden von Applichem, Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen.

6.1.2 Im Labor verwendete Hilfsmittel

96-Well-Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Drogheda, Irland
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Eppendorfgefäße	Greiner, Nürtingen
Falcon-Tubes	Sarstedt, Nürmbrecht
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaskugeln, Durchmesser 0,1 mm	Roth, Karlsruhe
Halbmikroküvetten aus Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Kunststoffpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Membranfilter	Schleicher und Schüll, Dassel
NC45 (0,2 µm Porengröße)	
Mikroliterpipetten	Gilson, Düsseldorf
(2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nürmbrecht
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürmbrecht
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifugenbecher	Beckmann, München

6.1.3 Geräte und Apparaturen

Äkta Prime Plus	GE Healthcare, München
Äkta Purifier	GE Healthcare, München
Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Biofuge fresco	Heraeus Christ, Osterode
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen

Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40FL + Kamera (AxioCam MRm)	Zeiss, Göttingen
French Press HTU-Digi	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Molecular Imager Gel Doc XR+	
Gelelektrophoreseapparaturen	Waasetec, Göttingen
	EasyCast™ Minigelsystem, Peqlab, Erlangen
Heizblock Thermo	Waasetec, Göttingen
HisTrap™ Ni ²⁺ -NTA-Sepharose-Säule (5 ml)	GE Healthcare, München
Horizontalschüttler 3006	GFL, Burgwedel
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Kulturschüttler Innova 2300	New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler-Inkubator Innova 42	New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler-Inkubator Innova 44	New Brunswick, Neu-Isenburg
LabCycler	SensorQuest, Göttingen
Lumineszenzgerät Chemocam	Intas, Göttingen
Magnetrührer KMO 2 basic	IKA Werk, Staufen
Magnetrührer reo basic C	IKA Werk, Staufen
Magnetrührer RET basic C	IKA Werk, Staufen
Mikroprozessor pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Mikrowelle 8020	Privileg
Nanodrop ND-1000	Thermoscientific, Bonn
Spannungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories California USA
Spannungsgerät Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories California USA
Spannungsgerät Power Pac P25T	Biometra, Göttingen
SpeedVac Concentrator Savant SPD 111V	Thermo Scientific, Bonn
Spektralphotometer Ultraspec 2100 pro	Amersham, Freiburg
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific, Bonn
Superdex™ 200 10/300 GL	GE Healthcare, München

Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Ultraschallgerät Labsonic U	Braun, Melsungen
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman, München
Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80	Thermo Scientific, Bonn
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam
Vertikalgelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad Laboratories, California USA
Mini Protean III System	
Vortexer Genius 3	IKA Werk, Staufen
Waage Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbadschüttler Innova 3100	New Brunswick, Neu-Isenburg
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach
Western Blot-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge Biofuge pico 21	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Sorval RC6+	Thermo Scientific, Bonn

6.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme

DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	Qiagen, Hilden
Gel Filtration Standard #151-1901	Bio-Rad Laboratories California USA
Gene Ruler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green	Bio-Rad Laboratories California USA
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
Prestained Protein Marker PageRuler Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden

6.1.5 Antikörper und Enzyme

Accuzyme-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Ampligase	Epicentre, Medison (Wisconsin)
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche Diagnostics, Mannheim
DNaseI	Roche Diagnostics, Mannheim
DNaseI (RNase free)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Extender DNA Polymerase	5 Prime, Hamburg
Lysozym aus Hühnereiweiß (178000 U/mg)	Merck, Darmstadt
Phusion™ DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo Finland
Restriktionsendonukleasen	NEB Biolabs, Frankfurt am Main MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA	Roche Diagnostics, Mannheim
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
α-FLAG-tag Antikörper #F7425-2MG	Sigma, München
α-His-tag Antikörper #ABIN398410	antibodies-online.de
α-Strep-tag Antikörper #PK-AB718-4217	PromoKine, Heidelberg

6.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma, München bezogen.

Tabelle 6.1: Oligonukleotide

Name	Sequenz	Gen / Zweck
	(Schnittstellen unterstrichen, Mutationen in Fettschrift, Promotoren kursiv)	
FX1	5' AA <u>AGGATCC</u> CTCACTTATTTAAAG GAGGAAACAATCATGGGAGCAATTC CAAAAACGGGGAC	fwd; Klonierung des <i>maeN</i> -Gens in pBQ200, <i>SD-Sequenz (gapA)</i>

FX2	5' AAAGTCGACTTATGAAGTGAAAAA ACGAAGCAGCACTGTC	rev; Klonierung des <i>maeN</i> -Gens in pBQ200
FX3	5' CAGTCGCGGTTCGGCATCACC	Deletion von <i>malR</i> durch LFH, (Sequenzierung up forward)
FX4	5' GCCGTTATCGTCGCCCGTACAG	Deletion von <i>malR</i> durch LFH, (up forward)
FX5	5' CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGG AAGCGATGCCTTTCAGCTGAAAGC	Deletion von <i>malR</i> durch LFH, (up reverse), <i>kan</i> -Fähnchen
FX6	5' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGGGCGTACGGAACGATCGGAAGAC	Deletion von <i>malR</i> durch LFH, (down forward), <i>kan</i> -Fähnchen
FX7	5' GCGGCCACTCCGACGAGAAATG	Deletion von <i>malR</i> durch LFH, (down reverse)
FX8	5' GGTTAACTGCTTGACGCGCCGGC	Deletion von <i>malR</i> durch LFH, (Sequenzierung down reverse)
FX9	5' CCGGCTAATGTGGCATGATTGGC	Deletion von <i>xyIR</i> durch LFH, (Sequenzierung up forward)
FX10	5' CCCTGTGTACCCGATTTCTTCG	Deletion von <i>xyIR</i> durch LFH, (up forward)
FX11	5' CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGG CATGACAGGTCTTCTTCGCGC	Deletion von <i>xyIR</i> durch LFH, (up reverse), <i>kan</i> -Fähnchen
FX12	5' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGCCATCTTCTTAGGACAGAATGCA CC	Deletion von <i>xyIR</i> durch LFH, (down forward), <i>kan</i> -Fähnchen
FX13	5' CGTCATGGCATGACCCAGGAAATC	Deletion von <i>xyIR</i> durch LFH, (down reverse)
FX14	5' GGAACACGGTACGAACATGCTGC	Deletion von <i>xyIR</i> durch LFH, (Sequenzierung down reverse)
FX15	5' AAAGGATCCGCGGAATTTAAGCGT TCTCCAGTGCC	fwd, BamHI; Klonierung 3' <i>ccpA</i> à pGP1389; CcpA-Strep (SPINE)
FX16	5' AAAGTCGACTGACTTGGTTGACTTT CTAAGCTCTATACGG	rev, Sall; Klonierung 3' <i>ccpA</i> à pGP1389; CcpA-Strep (SPINE)
FX17	5' AAAGGATCCATGGTTATAGAAGAA GGAAGAAGAATCATAAAGACC	fwd BamHI; Klonierung <i>xynP</i> -Promotor à pWH1520
FX18	5' AAAGCATGCGCATAAATTAATAA CAAGCAAATCTCCAGACGC	rev SphI; Klonierung <i>xynP</i> -Promotor à pWH1520
FX19	5' TTTGGTACCTTACTATTCAAAGAAC ATGTGATCATCGTTGATTAATAACG	Rev kpnI; Klonierung des <i>ymdB</i> -Gens mit FC132 (fwd; XbaI)
FX20	5' GGGGCGAAACACGAGTTAG	fwd; qRT-PCR-Primer für <i>disA</i> (150bp)

FX21	5'GTCCACCACTTCTTTTACTTTATC	rev; qRT-PCR-Primer für <i>disA</i> (150bp)
FX22	5'GCGTTCAAGGGGAAAATACAG	fwd; qRT-PCR-Primer für <i>cdaS</i> (150bp)
FX23	5'GGATGCAATCCCCTGCATG	rev; qRT-PCR-Primer für <i>cdaS</i> (150bp)
FX24	5'GATATATAAATTGATTATGGTGAT ACGC	fwd; qRT-PCR-Primer für <i>cdaA</i> (150bp, Genanfang)
FX25	5'AATCCCCATGTTATCGCTTGGT	rev; qRT-PCR-Primer für <i>cdaA</i> (150bp, Genanfang)
FX26	5'GGTTAACAGCAACCAAGCAC	fwd; qRT-PCR-Primer für <i>cdaR</i> (150bp)
FX27	5'ACCGTTTGCGGAACACCC	rev; qRT-PCR-Primer für <i>cdaR</i> (150bp)
FX28	5'AAATCTAGAGATGGCTTTTGAGGA TATCCCTTTTTTGCAGTACC	fwd <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens
FX29	5'TTTGGTACCCTATTATCCATTTTTCT TGCCCTCCAATACCAG	rev <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens, zusätzliches Stopp
FX30	5'AAATCTAGAGATGGATAAATTCTT AAACAACCGCTGGGCTG	fwd <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens
FX31	5'TTTGGTACCCTATTATCCGATGAG GATTGTGAATTCGCAGTG	rev <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens, zusätzliches Stopp
FX32	5'AAATCTAGAGATGAGTAATCGTAA ATATTCGGTACCGATGG	fwd <i>XbaI</i> ; Klonierung von <i>glmM_{Eco}</i>
FX33	5'TTTGGATCCCTATTAACGGCTTTT ACTGCATCGGCGATG	rev <i>BamHI</i> ; Klonierung von <i>glmM_{Eco}</i> , zusätzliches Stopp
FX34	5'AAACTCAGAGATGGGATTCGGTAT TTGGTCAATGCATTTTGTAG	fwd <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>ykoW</i> -Gens
FX35	5'TTTGGTACCCTATTATTGCGACGGC TGTTCAATAATGAATTGTCG	rev <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>ykoW</i> -Gens, zusätzliches Stopp
FX36	5'TGGCCTGCGTTTGCTC	fwd; qRT-PCR-Primer für <i>yhcK</i> (150bp)
FX37	5'CTGCAGTGATCATGGCCAG	rev; qRT-PCR-Primer für <i>yhcK</i> (150bp)
FX38	5'GTCCATATGGAAATGCCGATG	fwd; qRT-PCR-Primer für <i>ykoW</i> (150bp)
FX39	5'GCCAAGCACAACTGATCCG	rev; qRT-PCR-Primer für <i>ykoW</i> (150bp)
FX40	5'CTGGTGTCAACAAGCGTATCAGTG C	rev; interner Sequenzierprimer <i>ykoW</i>
FX41	5'GGCATGCCTTCTGTTAGGTAAGTCT G	rev; interner Sequenzierprimer <i>ykoW</i>
FX42	5'AAAGGATCCGCTGATCGGCGGCTC ACTTATTATG	fwd <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>ykoW</i> -Gens inkl. native SD-Sequenz

FX43	5' TTTGGATCCCATGCCCGAAATCCCA ATGCC	rev <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>ykoW</i> -Gens incl. native SD-Sequenz
FX44	5' TGTTATCTGCCGCTTTCTGAG	fwd; qRT-PCR-Primer for <i>cdaA</i> (150bp, end of gene)
FX45	5' GTCGCCGTTCTTTGCCAC	rev; qRT-PCR-Primer for <i>cdaA</i> (150bp, end of gene)
FX46	5' AAATCTAGAGATGAAGGCTATGCG CTATGAGCAGATATC	fwd <i>Xba</i> I; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens
FX47	5' TTTGGTACCCTATTACGTTCTTGGT GAAATTAACGGATATAATACACC	rev <i>Kpn</i> I; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens, zusätzliches Stopp
FX48	5' CATCAGTTGGTGCTAATGCACAAC CTC	Deletion von <i>ykuI</i> durch LFH, (Sequenzierung up forward)
FX49	5' CCCAGTTGTTGTTCCAATTAGGTTA GCC	Deletion von <i>ykuI</i> durch LFH, (up forward)
FX50	5' CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGC TCGGCACTAAAAATCGCCTGGTAATA TG	Deletion von <i>ykuI</i> durch LFH, (up reverse), <i>kan</i> -Fähnchen
FX51	5' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGCGTTTTTCATATCCGATGGATGATC AGATG	Deletion von <i>ykuI</i> durch LFH, (down forward), <i>kan</i> -Fähnchen
FX52	5' GAAATAACGCTGCATTGGCTCGTT AGC	Deletion von <i>ykuI</i> durch LFH, (down reverse)
FX53	5' CATGTCGATATTATCAAACGGATA TGTGTTAGG	Deletion von <i>ykuI</i> durch LFH, (Sequenzierung down reverse)
FX54	5' AAATCTAGACTCACTTATTTAAAGG AGGAAACAATCATGGCTTTTGAGGA TATCCCTTTTTTGACG	fwd, <i>Xba</i> I; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pGP1460, SD-sequenz (<i>gapA</i>)
FX55	5' TTTCTGCAGTCCATTTTTCTTGCCCC TCCAATACCAG	rev, <i>Pst</i> I; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pGP1460, ohne Stopp
FX56	5' AAATCTAGACTCACTTATTTAAAGG AGGAAACAATCATGGATAAATTCTTA AACAACCGCTGGGCTG	fwd, <i>Xba</i> I Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens in pGP1460, SD-sequenz (<i>gapA</i>)
FX57	5' TTTCTGCAGTCCGATGAGGATTGT GAATTCGCAGTG	rev, <i>Pst</i> I; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens in pGP1460, ohne Stopp
FX58	5' AAAGGTACCCATATGATGGCTTTT GAGGATATCCCTTTTTTGACGTAC	fwd, <i>Kpn</i> I+ <i>Nde</i> I; Klonierung der <i>cdaAR</i> -Gene in pET3c via pBuescriptII SK-

FX59	5' <u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> GAGGCTACCCTTTGTAAACAACGGA AG	<i>frlR</i> antisense-Sonde fwd + T7-Promotor
FX60	5'GTAGGGGCTGTTGATGGTAAAAGT GAC	<i>frlR</i> antisense-Sonde rev
FX61	-	
FX62	5' <u>AAAAAGCTTCCGCTTCATGACGGT</u> GCGGTAATTATG	fwd, <i>HindIII</i> ; Klonierung 3'-Ende des <i>cdaA</i> -Gens in pGP1087
FX63	5' <u>TTTGGTACCTCCATTTTTCTTGCCCC</u> TCCAATACCAG	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung 3'-Ende des <i>cdaA</i> -Gens in pGP1087, ohne Stopp
FX64	5' <u>AAAAAGCTTGACGGGGAGCATAG</u> CGTGAAGC	fwd, <i>HindIII</i> ; Klonierung 3'-Ende des <i>cdaR</i> -Gens in pGP1087
FX65	5' <u>TTTGGTACCTCCGATGAGGATTGT</u> GAATTCGCAGTG	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung 3'-Ende des <i>cdaR</i> -Gens in pGP1087, ohne Stopp
FX66	5' <u>AAAGGATCCCTCACTTATTTAAAGG</u> <u>AGGAAACAATCATGGCTTTTGAGGA</u> TATCCCTTTTTTGAG	fwd, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pBQ200, <i>SD-Sequenz (gapA)</i>
FX67	5' <u>TTTGTCGACTTATCCATTTTTCTTGC</u> CCCTCCAATACCAG	rev, <i>SalI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pBQ200
FX68	5' <u>AAACATATGATGGCTTTTGAGGAT</u> ATCCCTTTTTTGAGTAC	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pET3c
FX69	5' <u>TTTGGATCCTTATCCATTTTTCTTGC</u> CCCTCCAATACCAG	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pET3c
FX70	5' <u>TTTGGATCCTTATTCCGATGAGGAT</u> TGTGAATTCGCAGTG	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens in pET3c
FX71	5' <u>AAACATATGATGAAGGCTATGCGC</u> TATGAGCAGATATC	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens in pET3c
FX72	5' <u>TTTGGATCCTTACGTTCTTGGTGAA</u> ATTAACGGATATAATACACC	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens in pET3c
FX73	5' ATGGCTTTTGAGGATATCCCTTTTT TGAG	<i>cdaA</i> -Sonde fwd
FX74	5' <u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> TTATCCATTTTTCTTGCCCCTCCAATA CCAG	<i>cdaA</i> -Sonde rev + T7-Promotor
FX75	5' CTCCGGAGCAGCCGATTGTCAG	<i>cdaR</i> -Sonde fwd

FX76	5' CTAATACGACTCACTATAGGGAGA TTATTCCGATGAGGATTGTGAATTCG CAGTG	<i>cdaR</i> -Sonde rev + T7-Promotor
FX77	5' GAGCGCCTGATGGACGAACCTG	<i>glmM</i> -Sonde fwd
FX78	5' CTAATACGACTCACTATAGGGAGA CTAATCCCATTCTGACCGGACGAC	<i>glmM</i> -Sonde rev + T7-Promotor
FX79	5' CTGTCTGTGCCTGGCGATATCG	<i>glmS</i> -Sonde fwd
FX80	5' CTAATACGACTCACTATAGGGAGA CACAGTAACACTCTTCGCAAGGTTAC G	<i>glmS</i> -Sonde rev + T7-Promotor
FX81	5' AAAGAATTCCGGTCAAAGGTGATG TCACTGTC	fwd, <i>EcoRI</i> ; Klonierung der <i>cdaA</i> - Promotorregion in pAC7
FX82	5' TTTGGATCCGGCTGCAAAAAGGG ATATCCTCAAAGC	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung der <i>cdaA</i> - Promotorregion in pAC7
FX83	5' AAACAATTGGTAACGGCTAAAGGC TCTCCAC	fwd, <i>MfeI</i> ; Klonierung der <i>glmM</i> - Promotorregion in pAC7
FX84	5' TTTGGATCCGGTACACCGTCTGTTC CAAATACTTGCC	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung der <i>glmM</i> - Promotorregion in pAC7
FX85	5' AAAGAATTCCTGGAGACATGCGAG AAATGCAG	fwd, <i>EcoRI</i> ; Klonierung der <i>cdaA</i> - Promotorregion in pAC7
FX86	5' AAACAATTGGGTAACGGTTTACGG CTCACAGG	fwd, <i>MfeI</i> ; Klonierung der <i>glmM</i> - Promotorregion in pAC7
FX87	5' TTTGGATCCCAAGATTTTCTCAT TTCGTATTTTGTG	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung der <i>cdaA</i> - Promotorregion in pAC6
FX88	5' TTTGGATCCCTTTTTTATTCCGATG AGGATTGTGAATTC	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung der <i>glmM</i> - Promotorregion in pAC6
FX89	5' AAAGGATCCATGGCTTTTGAGGAT ATCCCTTTTTGCAG	fwd, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in MCS1 von pRSFDuet-1
FX90	5' TTTAAGCTTTTATCCATTTTCTTGC CCCTCCAATACCAG	rev, <i>HindIII</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in MCS1 von pRSFDuet-1
FX91	5' AAACATATGGATAAATTCTTAAAC AACCGCTGGGCTG	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens in MCS2 von pRSFDuet-1, zugehöriger Primer: FX70
FX92	5' TTTGGTACCCGTCATTTTCTTGC CCCTCCAATACCAG	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens für B2H-Analyse
FX93	5' TTTGGTACCCGCACACTGACGCCG CCGGTCTC	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ -Gens für B2H-Analyse

FX94	5' TTTGGTACCCGTTCCGATGAGGATT GTGAATTCGCAGTG	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens für B2H-Analyse
FX95	5' AAAAAGCTTCTGCTGACCATTGAG CGGGATACTG	fwd, <i>HindIII</i> ; Klonierung von 300bp <i>cdaA</i> in pGP1087 → trunkiertes <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ in nativem Lokus
FX96	5' TTTGGTACCCACACTGACGCCGCC GGTCTC	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung von 300bp <i>cdaA</i> in pGP1087 → trunkiertes <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ in nativem Lokus
FX97	5' CTTACGAAAAAGACCAGTCTCTC CTTTGTGAATTAGATGATTTG	CCR Primer zur Mutagenese von <i>cdaS</i> _{C42S} , TGT=Cys, TCT= Ser, 5' phosphoryliert
FX98	5' AAACATATGGACCAGTGTCTCCTTT GTGAATTAGATGATTTG	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> ₄₀₋₂₀₇ -Gens in pET28a (CdaSDH1)
FX99	5' AAACATATGCCGGCATTATTGAG CTGGCCAAGG	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> ₇₅₋₂₀₇ -Gens in pET28a (CdaSDH2)
FX100	5' TTTGGATCCTCCATTTTTCTTGCCCC TCCAATACCAG	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pBP20, ohne Stopp
FX101	5' CTTTCATTAACGTGTTTACCTGTGA TGAGAC	rev; Sequenzierprimer für <i>xyIR</i> ₂₄₋₅₅ (pGP888)
FX102	5' AAAGAATTCCTAAGAAGCGCGGCC ACGTATAC	fwd, <i>EcoRI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens in pBP17
FX103	5' TTTGGATCCCGTTCTTGGTCAAATT AACGGATATAATACACC	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens in pBP17, ohne Stopp
FX104	5' AAAGAATTCATATGAAGGCTATG CGCTATGAGCAGATATC	fwd, <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens in pBluescriptII SK-, zugehöriger Primer: FX72
FX105	5' AAATCTAGAGCCGGCATTATTGA GCTGGCCAAGG	fwd, <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>cdaS</i> ₇₅₋₂₀₇ -Gens in pGP888, zugehöriger Primer: FX47
FX106	5' TTTGGATCCTTACACACTGACGCC GCCGGTCTC	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ -Gens in pET28a, zusätzliches Stopp
FX107	5' AAAGGATCCCTCACTTATTTAAAG GAGGAAACAATCATGAGTAATCGTA AATATTTCCGGTACCGATGG	fwd, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> _{Eco} -Gens in pBQ200, <i>SD-Sequenz (gapA)</i>
FX108	5' TTTGTCGACTTAAACGGCTTTTACT GCATCGGCGATG	rev, <i>SalI</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> _{Eco} -Gens in pBQ200
FX109	5' AAAGGATCCCTCACTTATTTAAAG GAGGAAACAATCATGTGTGGAATTG TTGGCGCGATCG	fwd, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>glmS</i> _{Eco} -Gens in pBQ200, <i>SD-Sequenz (gapA)</i>

FX110	5' TTT <u>GTCGACT</u> TACTCAACCGTAACC GATTTTGCCAGG	rev, <i>SalI</i> ; Klonierung des <i>glmS_{Eco}</i> -Gens in pBQ200
FX111	5' AAACATATGGAAAAAGAGAAAA AGGGGCGAAACACG	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>disA</i> -Gens in pET19b
FX112	5' TTTGGATCCTCACAGTTGTCTGTCT AAATAATGCTTCTCTTG	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>disA</i> -Gens in pET19b
FX113	5' AAATCTAGAGGTGGCAAAGAACG GCGACCTTCAC	fwd, <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens für B2H-Analyse, zugehöriger Primer: FX92
FX114	5' GTTATTCGACTGGACATGGTACAA GATG	fwd; <i>rsiW</i> spezifisch: Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX115	5' GGAGAATATCAACGGCATTGCCGA G	rev; <i>cdaA</i> spezifisch: Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX116	5' CGAATGATAACAGCAGCAATACAT CAGG	fwd; <i>cdaR</i> spezifisch: Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX117	5' GGACGTTGTTTGTCTTTTGTGAGCA C	rev; <i>glmM</i> spezifisch: Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX118	5' CGTGTCATGGCTGAAGCGAAGAC	fwd; <i>glmM</i> specific. Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX119	5' CAGCAATACCAGCAGAGTCATAAC C	rev; <i>glmS</i> specific. Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX120	5' CATCGCGGCTGTGATGTGGATAAA C	fwd; <i>glmS</i> Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX121	5' CGTAATATGAACCGAAAGCCTACG AAAG	rev; <i>alkA</i> Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX122	5' AAACATATGATGGCTTTTGAGGAT ATCCCTTTTTGCGAG	fwd, <i>NdeI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> -Gens in pGP574, zugehöriger Primer: FX100
FX123	5' AAAGGTACCGATGGATAAATTCTT AAACAACCGCTGGGCTG	fwd, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens pGP172
FX124	5' TTTGGATCCTTATTCCGATGAGGAT TGTGAATTCGCAGTG	rev, <i>BamHI</i> ; Klonierung des <i>cdaR</i> -Gens pGP172
FX125	5' GGCTCGTATGTTGTGTGG	rev, Sequenzierungsprimer pBQ200, 73-55 bp vor MCS
FX126	5' CGTCGAACGCAAGACCGAG	rev; <i>glmM</i> interner Sequenzierungsprimer, zugehöriger Primer: NP108
FX127	5' CCGAACGGATTAACATTAATGAC GG	fwd; <i>glmM</i> interner Sequenzierungsprimer, zugehöriger Primer: NP109

FX128	5'GCCAGAAGGTGAGACGGTCAAAG	fwd; <i>rsiW</i> spezifisch: Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX129	5'CGAGGAATCGGTCCTTGGACAGCC	rev; <i>alkA</i> spezifisch: Primerextension-Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX130	5'AAA <u>AAGCTT</u> CTGATGAACACTTTA AAAGCAACAGGCAAG	fwd, <i>HindIII</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens in pGP1087
FX131	5'TTT <u>GGTACC</u> CTAATCCCATTCT GACCGGACG	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens in pGP1087
FX132	5'AAATCTAGAGATTTTTCAGCCTGA GCTGAGAAGAGCG	fwd, <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>cdaA</i> ₈₀₋₂₇₃ -Gens in pGP888, zugehöriger Primer: FX29
FX133	5'AAATCTAGAGATGGGCAAGTATTT TGAACAGACGG	fwd, <i>XbaI</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens für B2H-Analyse
FX134	5'TTT <u>GGTACC</u> CGCTCTAATCCCATT CTGACCGGACG	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens für B2H-Analyse
FX135	5'TTT <u>GGTACC</u> CTATTACTCTAATCCC ATTTCTGACCGGAC	rev, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens in pGP888, zusätzliches Stopp; zugehöriger Primer: FX133
FX136	5'TTCCGCGACTGGCCAGGAAGTC	Deletion von <i>dgkB</i> durch LFH (Sequenzierung up fwd)
FX137	5'GTCAAACGTGACGGAAAAGTCTA TGC	Deletion von <i>dgkB</i> durch LFH (up fwd)
FX138	5'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGC ATAGCCGGCTTGTTCAAATTTTTGCA G	Deletion von <i>dgkB</i> durch LFH (up rev), <i>kan</i> -Fähnchen
FX139	5'CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGCTGCCGGGCGAATTCGTGAATC	Deletion von <i>dgkB</i> durch LFH (down fwd), <i>kan</i> -Fähnchen
FX140	5'GATGTTTTGCACGATGGATTTGAC GTG	Deletion von <i>dgkB</i> durch LFH (down rev)
FX141	5'CGATGAGGTCGTAGATGTATTCTT CGC	Deletion von <i>dgkB</i> durch LFH (Sequenzierung down rev)
FX142	5'GGCAATAAGCCACATCCAAAAAAC CGC	Deletion von <i>ItaS</i> durch LFH (Sequenzierung up fwd)
FX143	5'CTGCACCGATCGTTGAACTGAGG	Deletion von <i>ItaS</i> durch LFH (up fwd)
FX144	5'CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGG TTGAAATTCAGGACATAACCGACATA CG	Deletion von <i>ItaS</i> durch LFH (up rev), <i>kan</i> -Fähnchen

FX145	5' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGGAAGGTGAATCCTTCTGATTATGA TTACAC	Deletion von <i>ItaS</i> durch LFH (down fwd), <i>kan</i> -Fähnchen
FX146	5' CTTTCAGTGGCAGACGGCTTGTG	Deletion von <i>ItaS</i> durch LFH (down rev)
FX147	5' GTTTGGGGGAATTATTGCCGGTTT AATTG	Deletion von <i>ItaS</i> durch LFH (Sequenzierung down rev)
FX148	5' AAGAGTGAATCCGCGGCAAGCATC	Deletion von <i>yfnI</i> durch LFH (Sequenzierung up fwd)
FX149	5' CAGGGGTGTGGCATCAAATGATTT AG	Deletion von <i>yfnI</i> durch LFH (up fwd)
FX150	5' CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGC AGTCTTGTAGGATAAATACGTTTTTG CCC	Deletion von <i>yfnI</i> durch LFH (up rev), <i>kan</i> - Fähnchen
FX151	5' CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGAGTGCCTGTACAAAGACTTGCTG AG	Deletion von <i>yfnI</i> durch LFH (down fwd), <i>kan</i> -Fähnchen
FX152	5' CATACTTCCATACTTGTGTCCTT GATTC	Deletion von <i>yfnI</i> durch LFH (down rev)
FX153	5' CACCAAATAGCTTCTAAAAGACCT GTGC	Deletion von <i>yfnI</i> durch LFH (Sequenzierung down rev)
FX154	5' GGAACGATTGCCTTGATCGAACAA G	fwd; <i>alkA</i> spezifisch: Primerextension- Analyse des <i>cda-glm</i> -Operons
FX155	5' GGGCTGATTCATGAAGGACAGTC	fwd; Sequenzierungsprimer <i>ycgG</i>
FX156	5' CTCGTGATTATCGCCATCGTTACC	rev; Sequenzierungsprimer <i>ycgG</i>
FX157	5' GTTGCAATTTTATACCTCGCTGTTA TTGC	fwd; Sequenzierungsprimer <i>yddT</i>
FX158	5' GTTTTTCCAAGATTCCTCAGACGA GG	rev; Sequenzierungsprimer <i>yddT</i>
FX159	5' AAATAATGTCTGAGATGTACAGGC TGAG	fwd; Sequenzierungsprimer <i>ylaN</i>
FX160	5' AAGAATCTCTATACGATTCGGAAG GAATG	rev; Sequenzierungsprimer <i>ylaN</i>
FX161	5' GTTTGTGCAATTTTATACCTCGCT GTAATTG	fwd; Sequenzierungsprimer <i>yomL</i>
FX162	5' GATTCCTCGTTTGAGGGATTTGCT TATG	rev; Sequenzierungsprimer <i>yomL</i>

FX163	5' AAAGGTACCGATGGTGAATGGGA TTTACACCAAAGTTTTTC	fwd, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>ycgG</i> -Gens in pGP172
FX164	5' TTTGGATCCTTATTTTCAATTTGTTGA ACATGTTCTTTAAATAAGAAAAC	rev, <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>ycgG</i> -Gens in pGP172
FX165	5' AAAGGTACCGTTGGCTTCAGAGAT GATAGTTGACCATC	fwd, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>ylaN</i> -Gens in pGP172
FX166	5' TTTGGATCCTTATTTAGCTGTAAAC GCGTCATGCAAAG	rev, <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>ylaN</i> -Gens in pGP172
FX167	5' AAAGGTACCGTTGAGAAAGAAAA GAGTTATTAATTGTGTTATGG	fwd, <i>KpnI</i> ; Klonierung des <i>yddT/yomL</i> -Gens in pGP172
FX168	5' TTTGGATCCTTAGCTATTAGGTAAA TCTACTTTTGCAGGAG	rev, <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>yddT/yomL</i> -Gens in pGP172
FX169	5' AAAGGATCCATGGTGAATGGGATT TACACCAAAGTTTTTC	fwd, <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>ycgG</i> -Gens in pWH844
FX170	5' TTTGTCGACTTATTTCAATTTGTTGA ACATGTTCTTTAAATAAGAAAAC	rev, <i>SalI</i> ; Klonierung des <i>ycgG</i> -Gens in pWH844
FX171	5' AAAGGATCCTTGGCTTCAGAGATG ATAGTTGACCATC	fwd, <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>ylaN</i> -Gens in pWH844
FX172	5' TTTGTCGACTTATTTAGCTGTAAAC GCGTCATGCAAAG	rev, <i>SalI</i> ; Klonierung des <i>ylaN</i> -Gens in pWH844
FX173	5' AAAGGATCCTTGGCTTCAGAGATG AGTTATTAATTGTGTTATGG	fwd, <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>yddT/yomL</i> -Gens in pWH844
FX174	5' TTTGTCGACTTAGCTATTAGGTAAA TCTACTTTTGCAGGAG	rev, <i>SalI</i> ; Klonierung des <i>yddT/yomL</i> -Gens in pWH844
FX175	5' GATAATTATTTATCACTTTTATTATT GTACGGTG	fwd; externer Primer zur <i>yddT</i> -Amplifikation via nested PCR
FX176	5' AAGAAGACTACACGTTGTAACACC C	rev; externer Primer zur <i>yddT</i> -Amplifikation via nested PCR
FX177	5' GAGCTTATGACCATCGACCATTTA ATCG	Überprüfung der <i>ItaS</i> Deletion (up fwd)
FX178	5' CAAGCTTATCAAGCAGCAATTGCT TTTCAG	Überprüfung der <i>ItaS</i> Deletion (up rev)
FX179	5' CTGTTACGCGGTCTTAACCGG	Überprüfung der <i>ItaS</i> Deletion (down fwd)
FX180	5' CATAATCGATAGCTCCGGCTGAAA AAG	Überprüfung der <i>ItaS</i> Deletion (down rev)

FX181	5' AAATCTAGACTCACTTATTTAAAGG AGGAAACAATCATGGGCAAGTATTT TGGAACAGACGG	fwd, <i>Xba</i> I; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens in pGP1460, <i>SD-Sequenz (gapA)</i>
FX182	5' TTTCTGCAGCTCTAATCCCATTCT GACCGGAC	rev, <i>Pst</i> I; Klonierung des <i>glmM</i> -Gens in pGP1460, ohne Stopp
FX183	5' CAGCTCTTCATTAATTGAAGCCATC TTTTTCCCGGAAACCC	CCR Primer zur Mutagenese von <i>cdaS</i> _{S125A} , AGC = Ser, GCx = Ala, 5' phosphoryliert
FX184	5' CAGCTCTTCATTAATTGAATACATC TTTTTCCCGGAAACCC	CCR Primer zur Mutagenese von <i>cdaS</i> _{S125Y} , AGC = Ser, TAc/t = Tyr, 5' phosphoryliert
FX185	5' AAAGAATTCGCTAGCATGCACGAA TGGGGCTTGTCAG	fwd <i>Eco</i> RI, <i>Nhe</i> I; Klonierung des <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pBluescriptII SK-/pET28a, Gen: BC4920
FX186	5' AAAGAATTCGCTAGCGACGAATGT ATTTTATGCAAAATGGAAGATATTC	fwd <i>Eco</i> RI, <i>Nhe</i> I; Klonierung des DH1 <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pBluescriptII SK-/pET28a, Gen: BC4920
FX187	5' AACATATGGAAAGTTCATCTTTTA TTACGACAGCTATC	fwd <i>Nde</i> I; Klonierung des DH2 <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pET28a, Gen: BC4920
FX188	5' TTTGGATCCTTATAAAGAAATCGTA TACAAAATCCCGTTTAAAG	rev <i>Bam</i> HI; Klonierung des <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pET28a
FX189	5' AAAGAATTCGTGTAAACAAATAAA GGGAAATTCACGATG	fwd <i>Eco</i> RI; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens inkl. nativem Promotor in pAC7
FX190	5' GTGATGATGATGATGATGATGAT GATGATGCATCTCCTGTTTAAATTC CAACTTTTCACGAATG	rev <i>Eco</i> RI; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens inkl. nativem Promotor in pAC7, 10xHis
FX191	5' ATGCATCATCATCATCATCATC ATCATCACATGAAGGCTATGCGCTAT GAGCAGATATC	fwd <i>Eco</i> RI; Klonierung des <i>cdaS</i> -Gens inkl. nativem Promotor in pAC7, Start + 10xHis
FX192	5' AAAGGTACCGACGAATGTATTTT ATGCAAAATGGAAGATATTC	fwd, <i>Kpn</i> I; Klonierung des DH1 <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pGP172, zugehöriger Primer: FX188
FX193	5' AAAGGTACCGAAAGTTCATCTTT TATTACGACAGCTATC	fwd; Klonierung des DH2 <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pGP172, zugehöriger Primer: FX188
FX194	5' AAAGGTACCGATGCACGAATGGG GCTTGTCAG	fwd; Klonierung des <i>cdaS</i> _{Bce} -Gens in pGP172, zugehöriger Primer: FX188
FX195	5' AAATCTAGAGTGGAGCCACCCGCA GTTTCGAAAAG	fwd, <i>Xba</i> I; Klonierung des Gens <i>cdaS</i> _{Bce} und DH2 <i>cdaS</i> _{Bce} in pGP888, Template: pGP2593 bzw. pGP2577, <i>Strep-tag II</i>

FX196 5' TTTGGATCCCTATTATAAAGAAATC rev, BamHI; Klonierung des Gens *cdaS_{Bce}*
 GTATACAAAATCCCGTTTAAAG und DH2*cdaS_{Bce}* in pGP888, Template:
 pGP2593 bzw. pGP2577, zusätzliches Stopp

6.3 Stämme

Tabelle 6.2: *B. subtilis* Stämme

Name	Genotyp	Konstruktion (Referenz)
GP1036	<i>trpC2 ΔcdaS::ermC amyE::10xHis-cdaS aphA3</i>	pGP2591 à GP983
GP1037	<i>trpC2 ΔcdaS::ermC amyE::10xHis-cdaS_{L44F} aphA3</i>	pGP2592 à GP983
GP1301	<i>trpC2 ΔmalR::cat</i>	LFH à 168
GP1302	<i>trpC2 ΔxylR::aphA3</i>	LFH à 168
GP1303	<i>trpC2 ccpA-Strep spc</i>	pGP1952 à 168 (Meyer <i>et al.</i> , 2011)
GP1304	<i>trpC2+ ccpA-Strep spc</i>	pGP1952 à GP391
GP1305	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}disA aphA3)</i>	pGP1954 à 168
GP1306	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}disA aphA3) ΔymdB::spc</i>	pGP1954 à GP583
GP1307	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}ymdB aphA3)</i>	pGP1955 à 168
GP1308	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}ymdB aphA3) ΔymdB::spc</i>	pGP1955 à GP583
GP1309	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}yhck aphA3)</i>	pGP1956 à 168
GP1310	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}yhck aphA3) ΔymdB::spc</i>	pGP1956 à GP583
GP1311	<i>trpC2 P_{xyl}ykoW cat</i>	pGP1958 à 168
GP1312	<i>trpC2 P_{xyl}ykoW cat ΔymdB::spc</i>	pGP1958 à GP583
GP1313	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}yhck aphA3) P_{xyl}ykoW cat</i>	pGP1958 à GP1309
GP1314	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}yhck aphA3) ΔymdB::spc P_{xyl}ykoW cat</i>	pGP1958 à GP1310
GP1315	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}C-yfp aphA3) ΔdisA::tet</i>	GP1173 à GP987
GP1316	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}disA aphA3) ΔdisA::tet</i>	GP1305 à GP987
GP1317	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}C-yfp aphA3) ΔymdB::spc ΔdisA::tet</i>	GP972 à GP987

GP1318	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}disA aphA3) ΔdisA::tet ΔymdB::spc</i>	GP1306 à GP987
GP1319	<i>trpC2 amyE::lacZ cat</i>	pAC6 à 168 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1320	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}glmM aphA3)</i>	pGP2572 à 168
GP1321	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}glmM aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC</i>	GP1320 à GP991
GP1322	<i>trpC2 ΔdisA::tet ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP987
GP1323	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC</i>	pGP1959 à GP991 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1324	<i>trpC2 Δykul::tet</i>	LFH à 168
GP1325	<i>trpC2 Δykul::tet ΔymdB::spc</i>	GP583 à GP1324
GP1326	<i>trpC2 ΔdisA::tet ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator <i>ΔgdpP::spc</i>	GP998 à GP1322
GP1327	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaA::cat</i> ohne Terminator	GP997 à GP1323 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1328	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP1323 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1329	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaAR::cat</i> ohne Terminator	GP985 à GP1323 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1330	<i>trpC2 lacA::(cdaR-Strep aphA3)</i>	pGP1969 à 168 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1331	<i>trpC2 lacA::(cdaR-Strep aphA3) cdaA-3xFLAG ermC</i>	pGP1966 à GP1330 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1332	<i>trpC2 lacA::(cdaR-Strep aphA3) cshA-3xFLAG spc</i>	pGP1333 à GP1330 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1333	<i>trpC2 cshA-Strep aphA3 cdaA-3xFLAG ermC</i>	pGP1966 à GP1026 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1334	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS_{L44F} aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaA::cat</i> ohne Terminator	Suppressormutante von GP1327 ohne Xylose (Mehne <i>et al.</i> , 2013)

GP1335	<i>trpC2 amyE::(cdaA2-lacZ aphA3)</i>	pGP1976 à 168
GP1336	<i>trpC2 amyE::(cdaA3-lacZ aphA3)</i>	pGP1977 à 168
GP1337	<i>trpC2 amyE::(glmM2-lacZ aphA3)</i>	pGP1978 à 168
GP1338	<i>trpC2 amyE::(glmM3-lacZ aphA3)</i>	pGP1979 à 168
GP1339	<i>trpC2 amyE::(cdaA-lacZ cat)</i>	pGP1980 à 168 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1340	<i>trpC2 amyE::(glmM-lacZ cat)</i>	pGP1981 à 168 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1341	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS aphA3)</i>	pGP1959 à 168 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1342	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS_{L44F} aphA3)</i>	GP1334 à 168 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1343	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS aphA3) ΔgdpP::spc</i>	pGP1959 à GP998 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1344	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS_{L44F} aphA3) ΔgdpP::spc</i>	GP1334 à GP998 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1345	<i>trpC2 amyE::(P_{xyI}cdaA-gfp mut1 spc)</i>	pGP1982 à 168
GP1346	<i>trpC2 ΔcdaS::ermC ΔdisA::tet ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP991 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1347	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}disA aphA3) ΔgdpP::spc</i>	pGP1954 à GP998
GP1348	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI-m}cdaS aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaA::cat</i> ohne Terminator	Suppressormutante von GP1327 ohne Xylose (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1349	<i>trpC2 lacA::(cdaR-Strep aphA3) cdaA₁₋₂₃₀-3xFLAG ermC</i>	pGP1987 à GP1330
GP1350	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS_{A61V} aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaA::cat</i> ohne Terminator	Suppressormutante von GP1327 ohne Xylose
GP1351	<i>trpC2 ΔgdpP::spc ΔymdB::cat</i>	GP922 à GP998
GP1352	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}C-yfp aphA3) ΔcdaS::ermC ΔdisA::tet ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator	pGP888 à GP1346
GP1353	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}cdaS_{A76V} aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔcdaA::cat</i> ohne Terminator	Suppressormutante von GP1327 ohne Xylose

GP1354	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>cdaS</i> _{E46K} <i>aphA3</i>) Δ <i>disA::tet</i> Δ <i>cdaS::ermC</i> Δ <i>cdaA::cat</i> ohne Terminator	Suppressormutante von GP1327 ohne Xylose
GP1355	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>cdaS</i> _{P201Q} <i>aphA3</i>) Δ <i>disA::tet</i> Δ <i>cdaS::ermC</i> Δ <i>cdaA::cat</i> ohne Terminator	Suppressormutante von GP1327 ohne Xylose
GP1356	<i>trpC2 lacA::cdaA-cfp ermC</i>	pGP1996 à 168
GP1357	<i>trpC2 lacA::</i> (<i>cdaA-cfp ermC</i>) Δ <i>cdaA::cat</i> ohne Terminator	pGP1996 à GP997
GP1358	<i>trpC2 amyE::cdaS-yfp cat</i>	pGP2554 à 168
GP1359	<i>trpC2 amyE::</i> (<i>cdaS-yfp cat</i>) Δ <i>cdaS::ermC</i>	pGP2554 à 983
GP1360	<i>trpC2</i> Δ <i>cdaS::spc</i>	LFH à 168
GP1361	<i>trpC2</i> Δ <i>cdaS::spc disA::tet</i>	GP1360 à GP987
GP1362	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>cdaS aphA3</i>) Δ <i>cdaS::spc disA::tet</i>	pGP1959 à GP1361
GP1363	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>cdaS aphA3</i>) Δ <i>cdaS::spc disA::tet</i> Δ <i>cdaA::cat</i> ohne Terminator	GP997 à GP1362
GP1364	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>cdaS aphA3</i>) Δ <i>cdaS::spc disA::tet</i> Δ <i>cdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP1362
GP1365	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>glmM</i> _{Eco} <i>aphA3</i>)	pGP2566 à GP168
GP1366	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>glmM</i> _{Eco} <i>aphA3</i>) Δ <i>cdaS::ermC</i> Δ <i>disA::tet</i>	pGP2566 à GP991
GP1367	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>glmM</i> _{Eco} <i>aphA3</i>) Δ <i>glmM::spc</i>	GP588 à GP1365
GP1368	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>glmM</i> _{Eco} <i>aphA3</i>) Δ <i>cdaS::ermC</i> Δ <i>disA::tet</i> Δ <i>cdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP1366
GP1369	<i>trpC2</i> Δ <i>ugtP::spc</i>	LFH à 168
GP1370	<i>trpC2</i> Δ <i>cdaS::ermC</i> Δ <i>disA::tet</i> Δ <i>ugtP::spc</i>	LFH à GP991
GP1371	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>cdaS aphA3</i>) Δ <i>disA::tet</i> Δ <i>cdaS::ermC</i> Δ <i>ugtP::spc</i>	LFH à GP1323
GP1372	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>ftsZ aphA3</i>) Δ <i>disA::tet</i> Δ <i>cdaS::ermC</i>	pGP2570 à GP991
GP1373	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>glmM</i> _{Eco} <i>aphA3</i>) Δ <i>glmM::spc</i> Δ <i>cdaS::ermC</i>	GP983 à GP1367
GP1374	<i>trpC2 lacA::</i> (P _{xyl} <i>glmM</i> _{Eco} <i>aphA3</i>)	GP983+GP987 à GP1367

	<i>ΔglmM::spc ΔcdaS::ermC ΔdisA::tet</i>	
GP1375	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI} glmM_{Eco} aphA3)</i> <i>ΔglmM::spc ΔcdaS::ermC ΔdisA::tet</i> <i>ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP1374
GP1376	<i>trpC2 ΔgdpP::spc ΔcdaA::cat</i> ohne Terminator	GP997 à GP998
GP1377	<i>trpC2 ΔgdpP::spc ΔcdaR::cat</i> ohne Terminator	GP999 à GP998
GP1378	<i>trpC2 ΔgdpP::spc ΔdisA::tet</i>	GP987 à GP998
GP1379	<i>trpC2 ΔgdpP::spc ΔcdaS::ermC</i>	GP983 à GP998
GP1380	<i>trpC2 lacA::(cdaR-Strep aphA3) glmM-3xFLAG ermC</i>	pGP2573 à GP1330
GP1381	<i>trpC2 cdaA-3xFLAG ermC</i>	pGP1966 à GP168
GP1382	<i>trpC2 glmM-gfp ermC</i>	pGP2574 à GP168
GP1383	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI} glmM_{Bsu} aphA3) ΔdisA::tet</i> <i>ΔcdaS::ermC ΔglmM::tet</i>	GP588 à GP1321
GP1384	<i>trpC2 lacA::(cdaA-Strep aphA3)</i> <i>ΔcdaAR::cat</i> ohne Terminator	pGP1968 à GP985
GP1385	<i>trpC2 lacA::(cdaA-Strep aphA3)</i> <i>ΔcdaAR::cat</i> ohne Terminator <i>glmM-3xFLAG ermC</i>	pGP2573 à GP1384
GP1386	<i>trpC2 lacA::(cdaA-Strep aphA3)</i> <i>ΔcdaAR::cat</i> ohne Terminator <i>rplA-3xFLAG ermC</i>	pGP1895 à GP1384
GP1387	<i>trpC2 amyE::gfp cat ΔcdaS::ermC</i> <i>ΔdisA::tet</i>	BP34 à GP991
GP1388	<i>trpC2 lacA::(glmM-Strep aphA3) cdaA-3xFLAG ermC</i>	pGP2586 à GP1381
GP1389	<i>trpC2 ΔltaS::aphA3</i>	LFH à 168
GP1390	<i>trpC2 ΔltaS::aphA3 ΔyfnI::spc</i>	LFH à GP1389
GP1391	<i>trpC2 ΔltaS::aphA3 ΔdkgB::cat</i>	LFH à GP1389
GP1392	<i>trpC2 ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔltaS::aphA3</i>	LFH à GP991
GP1393	<i>trpC2 ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔyfnI::spc</i>	LFH à GP991
GP1394	<i>trpC2 ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔltaS::aphA3</i> <i>ΔyfnI::spc</i>	GP1392 à GP1393

GP1395	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}cdaS aphA3) ΔdisA::tet ΔcdaS::ermC ΔyfnI::spc</i>	LFH à GP1323
GP1396	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}cdaS_{L44F} aphA3) ΔgdpP::spc ΔltaS::tet</i>	LFH à GP1344
GP1397	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}cdaS_{L44F} aphA3) ΔgdpP::spc ΔyfnI::ermC</i>	LFH à GP1344
GP1398	<i>trpC2 lacA::(P_{xyl}glmM_{Bsu} aphA3) ΔglmM::spc</i>	GP588 à GP1320
GP1399	<i>trpC2 amyE::gfp cat ΔcdaS::ermC ΔdisA::tet ΔcdaR::aphA3</i> ohne Terminator	LFH à GP1387

6.4 Fremdstämme

Tabelle 6.3: Fremdstämme *E. coli*

Name	Genotyp	Referenz bzw. erhalten von
BTH101	F ⁻ , <i>cya-99, araD139, galE15, galk16, rspL1 (Str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Euromedex, BACTH-System (Karimova <i>et al.</i> , 1998)
BL21 (DE3)	F, <i>lon ompT r_{BmB} hsdS gal(cl_{ts}857 indl Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
DH5a	<i>80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK,mK+), supE44, relA1, deoR, ΔlacZYAargF)U169</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
W3110	F ⁻ lambda ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph-1</i>	(Bachmann, 1972)
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacI^q ZΔ (M15 Tn10 (Tet^R))</i>	Stratagene

Tabelle 6.4: Fremdstämme *B. cereus*

Name	Genotyp	Referenz bzw. erhalten von
ATCC 14579	Wildtyp-Stamm	Bacillus Genetic Stock Center

Tabelle 6.5: Fremdstämme *B. subtilis*

Name	Genotyp	Referenz bzw. erhalten von
168	<i>trpC2</i>	Laborsammlung
BP34	<i>trpC2 amyE::gfp cat</i>	K. Gunka & F. Commichau, Göttingen
GP193	<i>trpC2 rny::pGP774 (P_{xyI}rny cat)</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
GP391	<i>trpC2+</i>	(Schilling <i>et al.</i> , 2007)
GP583	<i>trpC2 ΔymdB::spc</i>	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
GP588	<i>trpC2 ΔglmM::spc</i> ; komplementiert mit pGP400	(Schmidl <i>et al.</i> , 2010)
GP922	<i>trpC2 ΔymdB::cat</i>	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
GP972	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}C-yfp aphA3) ΔymdB::spc</i>	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
GP983	<i>trpC2 ΔcdaS::ermC</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP985	<i>trpC2 ΔcdaAR::cat</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP987	<i>trpC2 ΔdisA::tet</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP989	<i>trpC2 ΔcdaS::ermC ΔcdaAR::cat</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP991	<i>trpC2 ΔcdaS::ermC ΔdisA::tet</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP997	<i>trpC2 ΔcdaA::cat</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP998	<i>trpC2 ΔgdpP::spc</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP999	<i>trpC2 ΔcdaR::cat</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
GP1026	<i>trpC2 cshA-Strep aphA3</i>	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2010)
GP1173	<i>trpC2 lacA::(P_{xyI}C-yfp aphA3)</i>	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)

6.5 Plasmide

Tabelle 6.6: Plasmide

Name	Vektor	Insert (Referenz)
pGP1951	pBQ200/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod.: <i>maeN</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit FX1-FX2
pGP1952	pGP1389/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod.: 3' <i>ccpA</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit FX15-FX16 (Meyer <i>et al.</i> , 2011)

pGP1953	pWH1520/ <i>Bam</i> HI + <i>Sph</i> I	PCR-Prod.: <i>xynP</i> -Promotor/ <i>Bam</i> HI + <i>Sph</i> I, mit FX17-FX18
pGP1954	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>disA</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit KG157-KG158
pGP1955	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>ymdB</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FC132-FX19
pGP1956	pGP888/ <i>Kpn</i> I + <i>Eco</i> RI	PCR-Prod: <i>yhck</i> / <i>Kpn</i> I + <i>Eco</i> RI, mit KG159-KG160
pGP1957	pBluescriptII SK-/ <i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III, mit FX89-FX90
pGP1958	pX2/ <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: 5' <i>ykoW</i> / <i>Bam</i> HI, mit FX42-FX43
pGP1959	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaS</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX46-FX47 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1960	pBQ200/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit FX66-FX67
pGP1961	pET3c/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX71-FX72
pGP1962	pET3c/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX68-FX69
pGP1963	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: DH1 <i>cdaS</i> _{Bce} / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX192/188 aus ATCC 14579
pGP1964	pGP1080/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: 3' <i>cdaA</i> / <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX62/63
pGP1965	pGP1080/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: 3' <i>cdaR</i> / <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX64/65
pGP1966	pGP1087/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: 3' <i>cdaA</i> / <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX62/63 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1967	pGP1087/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: 3' <i>cdaR</i> / <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX64/65
pGP1968	pGP1460/ <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I, mit FX54/55
pGP1969	pGP1460/ <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I	PCR-Prod: <i>cdaR</i> / <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I, mit FX56/57 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1970	pET19b/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaA</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP1962
pGP1971	pET19b/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaAR</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX68-FX70
pGP1972	pET19b/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP1961
pGP1973	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaA</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP1970 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1974	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP1972 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)

pGP1975	pET28a/ <i>NdeI</i> + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> _{L44F} / <i>NdeI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX71-FX72 aus GP1334 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1976	pAC7/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaA</i> -Upstreamfragment/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX85-FX82, 727 bp
pGP1977	pAC7/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaA</i> -Upstreamfragment/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX81-FX82, 411 bp
pGP1978	pAC7/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>glmM</i> -Upstreamfragment/ <i>MfeI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX86-FX84, 715 bp
pGP1979	pAC7/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>glmM</i> -Upstreamfragment / <i>MfeI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX83-FX84, 441 bp, <i>MfeI</i> / <i>Eco</i> RI Kompatibilität
pGP1980	pAC6/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaA</i> -Upstreamfragment/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX85-FX87, 686 bp (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1981	pAC6/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>glmM</i> -Upstreamfragment/ <i>MfeI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX86-FX88, 672 bp, <i>MfeI</i> / <i>Eco</i> RI Kompatibilität (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1982	pSG1154/ <i>KpnI</i>	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>KpnI</i> , mit FX58/63
pGP1983	pRSFDuett-1/ <i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>cdaA</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III aus pGP1957 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1984	pRSFDuett-1/ <i>NdeI</i> + <i>Bgl</i> II	PCR-Prod: <i>cdaR</i> / <i>NdeI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX91/70 (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1985	pRSFDuett-1/ <i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III/ <i>NdeI</i> + <i>Bgl</i> II	<i>cdaA</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III aus pGP1983 PCR-Prod: <i>cdaR</i> / <i>NdeI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX91/70 <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II Kompatibilität (Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1986	pGP382/ <i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> I, mit FX66-FX55
pGP1987	pGP1087/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> ₃₉₀₋₆₉₀ / <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX95/96 Trunkierung von <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ im nativen Lokus
pGP1988	pUT18C/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX28/93
pGP1989	pUT18C/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaR</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX30/94

pGP1990	p25-N/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA/Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX28/92
pGP1991	p25-N/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> ₁₋₂₃₀ / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX28/93
pGP1992	p25-N/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaR/Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX30/94
pGP1993	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> ₄₀₋₂₀₇ / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI mit FX98/72
pGP1994	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> ₇₅₋₂₀₇ / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI mit FX99/72
pGP1995	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod.: <i>cdaS</i> _{A61V} / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI mit FX71/72 aus GP1350
pGP1996	pBP20/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaA</i> +Promotor/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX85/100
pGP1997	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> _{C42S} / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP2558
pGP1998	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> _{A76V} / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP2556
pGP1999	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaS</i> ₇₅₋₂₀₇ / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX105/47
pGP2000	pGP382/ <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I	<i>cdaR/Xba</i> I + <i>Pst</i> I aus pGP1969
pGP2551	pBluescriptII SK-/ <i>Eco</i> RI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> _{P201Q} / <i>Eco</i> RI, mit FX104/KG67 aus GP1355
pGP2552	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Eco</i> RI	<i>cdaS</i> _{P201Q} / <i>Nde</i> I + <i>Eco</i> RI aus pGP2551
pGP2553	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> _{E46K} / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP2555
pGP2554	pBP17/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> +Promotor/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX102/103
pGP2555	pBluescriptII SK-/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> _{E46K} / <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX104/FX72 aus GP1354
pGP2556	pBluescriptII SK-/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> _{A76V} / <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX104/FX72 aus GP1353
pGP2557	pET19b/ <i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I	<i>cdaR/Nde</i> I + <i>Xho</i> I aus pGP1985
pGP2558	pBluescriptII SK-/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	CCR-Prod: <i>cdaS</i> _{C42S} / <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX104/97/72
pGP2559	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	<i>glmS</i> _{Eco} / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I aus pBGG395
pGP2560	pGP886/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	<i>glmS</i> _{Eco} / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I aus pBGG395
pGP2561	pBQ200/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> _{Eco} / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit FX107/108
pGP2562	pBQ200/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod: <i>glmS</i> _{Eco} / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit FX109/110
pGP2563	pET19b/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>disA/Nde</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX111/112
pGP2564	pGP574/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaA/Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP2567
pGP2565	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaR/Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX123/124

pGP2566	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> _{Eco} / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX32/33
pGP2567	pBluescriptII SK-/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaA</i> / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX58/100
pGP2568	pUT18C/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> ₂₃₀₋₂₇₃ / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX113/92
pGP2569	p25-N/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> ₂₃₀₋₂₇₃ / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX113/92
pGP2570	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>ftsZ</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit KG233/234
pGP2571	pBQ200/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod: <i>ugtP</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit KG231/232
pGP2572	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit FX133/FX135
pGP2573	pGP1087/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> 3'-Ende/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX130/131
pGP2574	pGP1080/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> 3'-Ende/ <i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I, mit FX130/131
pGP2575	pGP888/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>cdaA</i> ₈₀₋₂₇₃ / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit KG233/234
pGP2576	p25-N/ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> / <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I, mit 133/134
pGP2577	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: DH2 <i>cdaS</i> _{Bce} / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX193/188 aus ATCC 14579
pGP2578	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>ycgG</i> / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX163/164
pGP2579	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>yln</i> / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX165/166
pGP2580	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>yomL</i> / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX167/168
pGP2581	pGP172/ <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>yddT</i> / <i>Kpn</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX167/168
pGP2582	pET28a/ <i>Nhe</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> _{Bce} / <i>Nhe</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX185/188 aus ATCC 14579
pGP2583	pWH844/ <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PCR-Prod: <i>yln</i> / <i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I, mit FX171/172
pGP2584	pET28a/ <i>Nhe</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: DH1 <i>cdaS</i> _{Bce} / <i>Nhe</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX186/188 aus ATCC 14579
pGP2585	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: DH2 <i>cdaS</i> _{Bce} / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI, mit FX187/188 aus ATCC 14579
pGP2586	pGP1460/ <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I	PCR-Prod: <i>glmM</i> / <i>Xba</i> I + <i>Pst</i> I, mit FX181/182
pGP2587	pBluescriptII SK-/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	CCR-Prod: <i>cdaS</i> _{S125A} / <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX104/183/72
pGP2588	pBluescriptII SK-/ <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	CCR-Prod: <i>cdaS</i> _{S125Y} / <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI, mit FX104/184/72
pGP2589	pET28a/ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> _{S125A} / <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI aus pGP2587

pGP2590	pET28a/ <i>NdeI</i> + <i>Bam</i> HI	<i>cdaS</i> _{S125Y} / <i>NdeI</i> + <i>Bam</i> HI aus pGP2588
pGP2591	pAC7/ <i>EcoRI</i> + <i>Bam</i> HI	10xHis- <i>cdaS</i> / <i>EcoRI</i> + <i>Bam</i> HI Joining PCR mit FX189/72 an FX189/190- und FX191/72-Templates; inkl. <i>cdaS</i> nativem Promotor
pGP2592	pAC7/ <i>EcoRI</i> + <i>Bam</i> HI	10xHis- <i>cdaS</i> _{L44F} / <i>EcoRI</i> + <i>Bam</i> HI Joining PCR mit FX189/72 an FX189/190- und FX191/72-Templates, inkl. <i>cdaS</i> nativem Promotor
pGP2593	pGP172/ <i>KpnI</i> + <i>Bam</i> HI	PCR-Prod: <i>cdaS</i> _{Bce} / <i>KpnI</i> + <i>Bam</i> HI, mit FX194/188 aus ATCC 14579

Tabelle 6.7: Fremdplasmide

Name	Zweck	Referenz bzw. erhalten von
pAC6	transkriptionale <i>lacZ</i> -Fusion in <i>B. subtilis</i> ; Integration in <i>amyE</i>	(Stülke <i>et al.</i> , 1997)
pAC7	translationale <i>lacZ</i> -Fusion in <i>B. subtilis</i> ; Integration in <i>amyE</i>	(Weinrauch <i>et al.</i> , 1991)
pBGG395	pKT25- <i>glmS</i> _{Eco}	(Lüttmann, 2011)
pBluescriptII SK-	Zwischenklonierung	Laborkollektion
pBP17	Fusion mit C-terminalem YFP, Integration in <i>amyE</i>	K. Gunka & F. Commichau, Göttingen
pBP20	Fusion mit C-terminalem CFP, Integration in <i>lacA</i>	K. Gunka & F. Commichau, Göttingen
pBQ200	Konstitutive Überexpression von Proteinen in <i>B. subtilis</i> ; plasmidständig	(Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1994)
pDG646	Amplifikation der Erythromycin-Resistenzkassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995)
pDG780	Amplifikation der Kanamycin-Resistenzkassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995)
pDG1514	Amplifikation der Tetracyclin-Resistenzkassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995)
pDG1726	Amplifikation der Spectinomycin-Resistenzkassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995)
pET3c	Fusion mit N-terminalem 6xHis-tag, Überexpression in <i>E. coli</i>	Novagen

pET19b	Fusion mit N-terminalem 10xHis-tag, Überexpression in <i>E. coli</i>	Novagen
pET28a	Fusion mit N-terminalem 6xHis-tag, Überexpression in <i>E. coli</i>	Novagen
pGEM-cat	Amplifikation der Chloramphenicol-Resistenzkassette	(Thorsten Mascher)
pGP172	Fusion mit N-terminalem Strep-tag® II, Überexpression in <i>E. coli</i>	(Merzbacher <i>et al.</i> , 2004)
pGP382	Fusion mit C-terminalem Strep-tag® II, Überexpression in <i>B. subtilis</i>	(Herzberg <i>et al.</i> , 2007)
pGP574	Fusion mit C-terminalem Strep-tag® II, Überexpression in <i>E. coli</i>	(Schilling <i>et al.</i> , 2006)
pGP886	doppelt homologe Rekombination in den <i>xkdE</i> -Lokus in <i>B. subtilis</i> . Induzierbare Überexpression durch P _{xyI} -Promotor	(Gunka, 2010)
pGP888	doppelt homologe Rekombination in den <i>xkdE</i> -Lokus in <i>B. subtilis</i> . Induzierbare Überexpression durch P _{xyI} -Promotor	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
pGP1080	Fusion mit c-terminalem GFP in <i>B. subtilis</i> ; Integration in nativen Locus; Downstream-Gene durch P _{spac} mit IPTG induzierbar	C. Diethmaier, Göttingen
pGP1087	Fusion mit c-terminalem 3xFLAG-tag in <i>B. subtilis</i> ; Integration in nativen Locus; Downstream-Gene durch P _{spac} mit IPTG induzierbar	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
pGP1389	Fusion mit c-terminalem Strep-tag® II in <i>B. subtilis</i> ; Integration in nativen Locus	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2011)
pGP1333	Fusion von <i>cshA</i> -3xFLAG in nativem Locus in <i>B. subtilis</i>	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2010)
pGP1460	Fusion mit c-terminalem Strep-tag® II; Integration in <i>lacA</i> in <i>B. subtilis</i>	(Mehne <i>et al.</i> , 2013)
pGP1895	<i>rplA</i> 3xFLAG <i>ermC</i> ; Integration in nativen Locus in <i>B. subtilis</i> (pGP1087)	M. Lehnik-Habrink, Göttingen
pRSF-Duett-1	Koexpression von mehreren Genen in <i>E. coli</i> ; Kompatibel zur Koexpression mit pET-Vektoren	Novagen

pSG1154	Fusion mit c-terminalem GFP in <i>B. subtilis</i> ; Integration in <i>amyE</i> ; Induktion durch Xylose	(Lewis & Marston, 1999)
pUT18C	Amp ^R C-terminale T18-Fusion (Two Hybrid)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18zip	Amp ^R Kontrollplasmid mit Leucin-Zipper am T18-Fragment von pUT18 fusioniert (Two Hybrid)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pWH844	Fusion mit N-terminalem 6xHis-tag, Überexpression in <i>E. coli</i>	(Schirmer <i>et al.</i> , 1997)
pWH1520	high-copy Shuttlevector in <i>B. subtilis</i> (200 Kopien/Zelle); plasmidständig	MoBitec GmbH
pX2	xyloseinduzierbare Expression von Genen in ihrem nativen Lokus in <i>B. subtilis</i>	(Mogk <i>et al.</i> , 1997)
p25-N	Kan ^R N-terminale T25-Fusion (Two Hybrid)	(Claessen <i>et al.</i> , 2008)
pKT25zip	Kan ^R Kontrollplasmid mit Leucin-Zipper am T25-Fragment von pKT25 fusioniert	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)

6.6 Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

Tabelle 6.8: Internetangebote.

URL	Anbieter	Anwendung
http://dbtbs.hgc.jp/	Human Genome Center, Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo	Informationen über regulierte Operons und Transkriptionsfaktoren
http://ecocyc.org/	SRI International	Sequenzrecherche und Informationen über <i>E. coli</i>
http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/	Institut Pasteur, Paris	Sequenzrecherche im Genom von <i>B. subtilis</i>
http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligoCalc.html	MBCF	Berechnung von Primer-Schmelztemperaturen
http://subtiwiki.uni-goettingen.de/	Institut für allgemeine Mikrobiologie der Universität Göttingen	Sequenzrecherche und Informationen über <i>B. subtilis</i>
http://tools.neb.com/NEBcutter2/	New England Biolabs	Erkennung von Restriktionsschnittstellen

http://web.expasy.org/protparam/	SIB Swiss Institute of Bioinformatics	Berechnung von Proteineigenschaften (Artimo <i>et al.</i> , 2012)
http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	Swiss Institute of Bioinformatics	Modifizieren von Alignments
http://www.ebi.ac.uk/clustalw/	European Bioinformatics Institute	Erstellen von Alignments
http://www.molecularcloning.com	Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA	Molekularbiologische Protokolle
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Literraturrecherche
http://www.pdb.org	RCSB	Proteindatenbank

Tabelle 6.9: Computerprogramme

Programm	Hersteller	Anwendung
Axio Vision Software Rel. 4.7.2	Zeiss	Bearbeitung von mikroskopischen Aufnahmen
ChemoStar Aufnahmesoftware	Intas	Auswertung von Chemilumineszenzsignalen
EndNote X3	ISI ResearchSoft	Literraturrecherche und -verwaltung
Geneious 6.1.2	Biomatters Ltd.	Auswertung von Sequenzierdateien
Image J		Quantifizierung von Signalintensitäten
Microsoft Office XP	Microsoft Inc.	Text- und Datenverarbeitung
Swiss-pdb viewer v4.0.4 (Guex & Peitsch, 1997)	SIB Swiss Institute of Bioinformatics	Darstellung von dreidimensionalen Proteinstrukturen

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: zyklisches di-Adenosinmonophosphat. c-di-AMP ist aus zwei Molekülen AMP über 3'-5'-Phosphodiester kondensiert. 5
- Abbildung 1.2: Die (putativen) Diadenylatzyklasten DisA, YbbP und YojJ von *B. subtilis* in schematischer Darstellung. Die Proteinarchitektur ist durch die gemeinsame, konservierte DAC-Domäne (DAC) charakterisiert. DAC-Aktivität wurde bisher nur für DisA nachgewiesen. DisA bindet über die HhH-Domäne (HhH) an das Chromosom. Für YbbP werden drei Transmembrandomänen (TM) vorhergesagt. YojJ trägt zwei N-terminale α -Helices (HH)..... 7
- Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der Phosphodiesterase GdpP. Zwei Transmembrandomänen (TM) verankern das Protein wahrscheinlich in der Membran. Die PAS-Domäne (PAS) bindet Häm, was einen Effekt auf die PDE-Aktivität hat. Eine modifizierte GGDEF-Domäne (GGDEF) hydrolysiert ATP, zeigt aber keine DAC- oder DGC-Aktivität. Die eigentliche PDE-Aktivität zum Abbau von c-di-AMP wird durch die DHH-DHHA1-Domäne vermittelt (Rao *et al.*, 2010, Rao *et al.*, 2011). 9
- Abbildung 1.4: Übersicht der proteinvermittelten c-di-AMP-Signalwege nach Corrigan & Gründling (2013). Bildung und Abbau von c-di-AMP (gelber Kreis) sowie die Effekte auf Rezeptorproteine sind schematisch nach dem derzeitigen Kenntnisstand für die Organismen *B. subtilis*, *S. aureus* und *M. smegmatis* dargestellt. Die Bindung von c-di-AMP an KtrA, CpaA, KdpD und PstA wurde mit Proteinen aus *S. aureus* nachgewiesen. Für KtrA wurde dies auch mit dem *B. subtilis*-Protein gezeigt (Corrigan *et al.*, 2013). 12
- Abbildung 1.5: Cytoplasmatische Reaktionen der Peptidoglycansynthese (angepasst nach Barreteau *et al.*, 2008). Stoffwechselintermediate sind in blauen Ellipsen dargestellt. Katabole Enzyme sind rot, anabole Enzyme grün gekennzeichnet. Die Bausteine des Peptidoglycans – GlcNAc und MurNAc – werden unter Verwertung von Aminosackern im Cytoplasma synthetisiert. GlcNAc und GlcN werden über die spezifischen PTS-Systeme NagP und GamP aufgenommen (Reizer *et al.*, 1999) und durch NagA zu GlcN6P umgesetzt. Dieses kann auch durch GlmS aus dem glycolytischen Intermediat Fru6P unter Verwendung von Glutamin generiert werden. GlcN6P kann durch NagB entweder als Energie- und Stickstoffquelle genutzt werden, indem es zu Fru6P und NH₃ zersetzt wird, oder durch GlmM, GcaD, MurAA/MurAB, MurB zur Synthese von UDP-MurNAc..... 14
- Abbildung 2.1: Konstruktion einer Deletionsmutante mit Hilfe der LFH-PCR (Rothe, 2012). Durch doppelt homologe Rekombination wird die zu deletierende Sequenz durch eine Resistenzkassette ersetzt. 31
- Abbildung 2.2: Standardkurve der analytischen Gelfiltration an einer Superdex™ 200 10/300 GL..... 43
- Abbildung 2.3: Schematische Darstellung zum Prinzip des bakteriellen Two-Hybrid-Systems BACTH. (A) Die katalytischen Domänen der Adenylatzyklase sind für die Synthese des cAMP verantwortlich. (B) die Domänen sind im getrennten Zustand inaktiv. (C) Fusioniert mit zwei interagierenden Proteinen (X, Y) wird die Aktivität wiederhergestellt. (D) Durch die Bildung von cAMP werden verschiedene Reportergene transkribiert (Meyer, 2009). 48
- Abbildung 3.1: Essentialität von c-di-AMP. Der Stamm GP1327 wurde in LB-Medium mit oder ohne den Induktor Xylose (1%) angezogen. Die Zelldichte wurde bei 600 nm gemessen
-

(OD₆₀₀). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Daraus ist eine repräsentative Wachstumskurve gezeigt. 57

Abbildung 3.2: Einfluss von c-di-AMP auf das Wachstumsverhalten. Die Stämme GP1341, G1342, GP1343 und GP1344 wurden in CSE-Medium mit 0,5% Glucose in An- oder Abwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. Die optische Zelldichte wurde bei 600 nm gemessen (OD₆₀₀). Für jeden Stamm wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Daraus ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve gezeigt. 59

Abbildung 3.3: Einfluss unterschiedlicher c-di-AMP-Spiegel auf die Zellmorphologie. Die Stämme GP1173 und GP1344 wurden in SP-Medium in An- oder Abwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. Nach jeweils 6 h und 23 h Stunden wurden Proben genommen und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm..... 60

Abbildung 3.4: Einfluss von Mg²⁺ auf die Morphologie von Zellen mit unterschiedlichen c-di-AMP-Spiegeln. Die Stämme GP1173 und GP1344 wurden in SP-Medium in Anwesenheit von Xylose (1%) kultiviert. MgSO₄ wurde wie in den Konzentrationen 1 mM (Standard) und 25 mM (Überschuss) dazu gegeben. Nach 7 h Stunden wurden Proben genommen und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm..... 61

Abbildung 3.5: Genetische Organisation des *cda-glm*-Operons. (A-D) Northern Blot-Analyse des *cda-glm*-Moduls mit Sonden gegen *cdaA* (A), *cdaR* (B), *glmM* (C) und *cdaS* (D). RNA von *B. subtilis* 168 wurde aus Zellen isoliert, die in CSE-Medium mit 0,5% Glucose (glc) oder 0,5% Glucosamin (glcNH₂) gewachsen waren. Für die Depletion der essentiellen RNase Y wurde der Stamm GP193 in CSE-Medium mit oder ohne den Induktor Xylose angezogen. 5 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch getrennt (s. 2.3.4.4), auf eine Nylonmembran geblottet und mit Gen-spezifischen RNA-Sonden inkubiert. Die Detektionszeit für die *glmS*-Sonde (D) war deutlich verkürzt, deshalb konnte das 3,5 kb-Transkript hier nicht nachgewiesen werden. Die Sonden hybridisierten ebenfalls unspezifisch mit 16 und 23 S rRNA. Die Größen für diese rRNAs sind durch Pfeile markiert. (E) RT-PCR-Analyse des *cda-glm*-Moduls. An RNA aus *B. subtilis* 168 wurde reverse Transkription mit einem zufälligen Nonamer-Primer durchgeführt. Anschließend wurden Primerpaare spezifisch für die intergenischen Bereiche von *cdaA-cdaR* (1), *cdaR-glmM* (2) und *glmM-glmS* (3) (Pfeile in (F)) eingesetzt um durch PCRs diese Bereiche von der ursprünglichen RNA-Matrize zu amplifizieren. Ein identisch behandelter Ansatz ohne die Inkubation mit reverser Transkriptase wurde als Negativkontrolle verwendet (-RT). Alle Experimente wurden jeweils mindestens dreimal mit Proben aus zwei biologischen Replikaten durchgeführt. (F) Schematische Übersicht der genetischen Organisation und der detektierten Transkripte. ... 64

Abbildung 3.6: Architektur von CdaA. Die Proteinstruktur der DAC-Domäne wurde durch bioinformatische Modellierung erstellt und mit dem Programm Swiss Pdb-Viewer visualisiert (s. 3.4.1). Die drei Transmembrandomänen sind mit TM bezeichnet. Der ca. 40 Aminosäure umfassende C-terminale Rest ist in Orange dargestellt. 66

Abbildung 3.7: Lokalisation von CdaA. Trennung von Cytosol- und Membranfraktionen aus dem Rohextrakt (RE) von GP1381. Zu Kontrollzwecken wurden verschiedene Proteine per Western Blot analysiert (A-C). Alle Proben stammen jedoch aus dem identischen Rohextrakt von GP1381. Es wurden 15 µg RE und 28 µl der anderen Fraktionen aufgetragen. (A) Detektion des cytosolischen CggR zur Kontrolle auf Kontamination der Membranfraktion. (B)

Detektion der membranständigen RNase Y zur Kontrolle auf Kontamination der Cytosolfraktion. (C) Detektion von CdaA-3xFLAG mit spezifischem α -FLAG-Antikörper. Das Experiment wurde zweimal mit biologischen Replikaten durchgeführt. 67

Abbildung 3.8: CdaA und CdaR interagieren *in vivo*. SPINE-Analyse mit den Stämmen GP1331, GP1332 und GP1333. Je zwei *B. subtilis* Kulturen (1 l) wurden parallel in CSE-Medium mit Glucose (0,5%) angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1 wurde eine Kultur geerntet. Zu der anderen wurde Formaldehyd (FA) dazugegeben, sie wurde weitere 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. 15 µg der Rohextrakte (RE) und 28 µl der Elutionsfraktionen der Reinigungen mit (+FA) oder ohne (-FA) vernetzendem Formaldehyd wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Die Visualisierung erfolgte per Western Blot mit einem α -FLAG-Antikörper. (A) Proben aus GP1331 zeigen, durch Reinigung von CdaR und Koelution von CdaA die Interaktion beider Proteine. Proben aus den Kontrollen (B) GP1332 und (C) GP1333 zeigen, dass mit CdaR Proteine nicht unspezifisch koeluiert werden bzw. dass CdaA nicht unspezifisch an die Strep-Tactin-Matrix bindet. 69

Abbildung 3.9: Direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen CdaA und CdaR. Die Plasmide pGP1989 (pUT18C-*cdaR*), pGP1990 (p25-N-*cdaA*) und pGP1992 (pUT18C-*cdaR*) wurden verwendet um eine Bacterial-two-Hybrid-Analyse wie in 2.3.6.2 beschrieben durchzuführen. Dazu wurden jeweils zwei der Plasmide in den angegebenen Kombinationen in den *E. coli*-Stamm BTH101 kotransformiert. Die Kombination der Plasmide pUT18zip und pKT25zip wurde als Positivkontrolle verwendet. Gleichzeitig diente die Kotransformation von pUT18zip oder pKT25zip und einem der anderen verwendeten Plasmide als Negativkontrolle. Die Blaufärbung der Kolonien zeigt den Abbau von X-Gal aufgrund der Anwesenheit einer funktionalen Adenylatzyklase und somit die direkte Interaktion der untersuchten Proteine an. 70

Abbildung 3.10: CdaR ist wahrscheinlich ein Regulator von CdaA. Die Stämme GP1328 und GP1329 wurden in LB-Medium mit oder ohne den Induktor Xylose (1%) angezogen. Die Zelldichte wurde bei 600 nm gemessen (OD₆₀₀). Für jeden Stamm wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Daraus ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve gezeigt. 71

Abbildung 3.11: CdaR stimuliert die DAC-Aktivität von CdaA. Bestimmung von intrazellulärem c-di-AMP aus *E. coli* Kulturen, welche die Expressionsvektoren pGP1970 (pET19b-*cdaA*) und pGP1984 (pRSF-Duet-1-*cdaR*) alleine oder gemeinsam trugen. Die Kulturen wuchsen in LB Medium und die c-di-AMP Konzentrationen wurden wie unter 2.3.7 beschrieben bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt. 72

Abbildung 3.12: CdaA, CdaR und GlmM bilden einen Proteinkomplex *in vivo*. Zur SPINE-Analyse wurde 1 l einer *B. subtilis* Kultur des Stamms GP1331 in (A) CSE-Medium mit Glucose (0,5%) oder (B) in SM-Medium mit Glutamin (1%) (B) angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1 wurde die Hälfte geerntet. Zu der verbliebenen Hälfte wurde Formaldehyd (FA) dazugegeben, sie wurde weitere 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. (A) 0,5 µg Rohextrakt (RE) und 28 µl der Elutionsfraktionen (E2) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Silberfärbung visualisiert. Die Proteine PycA und AccB sind Biotin-haltig und binden daher an die Matrix. Markante Proteinbanden wurden untersucht und die darin enthaltenen Proteine als MetE, GlmM und CdaA identifiziert. (B) 20 µg des Rohextrakts (RE)

und 28 µl der Elutionsfraktionen (E2) wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Die Visualisierung erfolgte per Western Blot mit Hilfe der angegebenen Antikörper. Außerdem wurden 0,5 µg Rohextrakt und 28 µl der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE getrennt und durch Silberfärbung visualisiert. Relevante Proteinbanden wurden massenspektrometrisch untersucht und die darin enthaltenen Proteine als GlmM identifiziert. Der direkte Nachweis aller drei Proteine CdaA, CdaR und GlmM in allen untersuchten Fraktionen zeigt, dass es sich um einen Proteinkomplex handelt. 75

Abbildung 3.13: Die Qualität der N-Quelle hat einen Einfluss auf die Zelllänge. Die Stämme GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. GP1383 und GP1374 wuchs zusätzlich mit 1% Xylose zur Induktion des *glm*-Allels. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlich optischer Dichte Proben genommen und mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Die Proben wurden dafür nicht zentrifugiert. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Alle Analysen wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Davon ist jeweils ein charakteristisches Ergebnis dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. 78

Abbildung 3.14: Statistische Auswertung der Zelllängenverteilung in Abhängigkeit von der Qualität der N-Quelle nach Nilrotfärbung. Die Stämme GP991, GP1346, GP1383 und GP1374 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. GP1383 und GP1374 wuchs zusätzlich mit 1% Xylose zur Induktion des *glmM*-Allels. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlicher optischer Dichte Proben genommen, mit Nilrot gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Proben mussten dafür kurz zentrifugiert werden. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Die Mittelwerte der Längen von je 200 Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Grenzwert (GW) ist durch eine horizontale Linie im Diagramm dargestellt. Die Längenverteilung zwischen kurzen und langen Glutamin-gewachsenen Zellen ist in Prozent angegeben. Alle Analysen wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Davon ist jeweils ein charakteristisches Ergebnis dargestellt..... 80

Abbildung 3.15: Visualisierung der Zelllängen durch GFP-Färbung. Die Stämme GP1387 und GP1399 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlich optischer Dichte Proben genommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Proben wurden dafür nicht zentrifugiert. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm..... 81

Abbildung 3.16: Statistische Auswertung der Zelllängenverteilung in Abhängigkeit von der Qualität der N-Quelle nach GFP-Färbung. Die Stämme GP1387 und GP1399 wurden in SM-Medium mit Glutamin oder Glutamat (1%) kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei ähnlich optischer Dichte Proben genommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Proben wurden dafür nicht zentrifugiert. Angegeben sind die relevanten genetischen Merkmale. Die Mittelwerte der Längen von je 200 Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Grenzwert (GW) ist durch eine horizontale Linie im Diagramm dargestellt. Die Längenverteilung zwischen kurzen und langen Glutamin-gewachsenen Zellen ist in Prozent angegeben..... 82

Abbildung 3.17: Modell der CdaS-Struktur. (oben) Mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers zur Homologiemodellierung (Kiefer *et al.*, 2009) wurde ein dreidimensionales Modell anhand

der bekannten Struktur des homologen CdaS-Proteins aus *B. cereus* (Protein Data Bank Nr. 2FB5) und der CdaS-Proteinsequenz von *B. subtilis* erstellt. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm Swiss Pdb-Viewer. Die durch Suppressorenscreening identifizierten Einzelmutationen sind rot und durch Pfeile gekennzeichnet. N-terminale Helices (Dunkelblau), DAC-Domäne (Hellblau). (unten) Schematische Darstellung der CdaS-Architektur. Die Helices sind mit H1 und H2 benannt. Zahlen geben die Bereiche der strukturgebenden Elemente als Aminosäurepositionen an. Schleife (loop), DAC-Domäne (DAC)..... 86

Abbildung 3.18: Modell des CdaS-Hexamers. Ausgehend vom dreidimensionalen Strukturmodell (3.4.1) und der Proteinsequenz von CdaS ist anzunehmen, dass ein hexamerer Proteinkomplex gebildet wird. Dieses Modell entstand in Zusammenarbeit mit Prof. Rick Lewis (Newcastle). Die einzelnen CdaS-Moleküle sind in den Farben Gelb, Pink, Blau, Grün, Rosa und Grau dargestellt. Weiße Pfeile kennzeichnen die Aminosäuren S125. (A) Übersicht der hexameren Anordnung. Die Struktur wird durch die Dimerisierungs-Grenzflächen der beiden Helices sowie des C-Terminus stabilisiert. (B) Vergrößerte Ansicht der Rosa Schleife, die der grauen DAC-Domäne gegenüber liegt. Die Mutationen L44F und E46K sind in dieser Schleife lokalisiert. (C) Die auf einer horizontalen Achse um 90° nach vorne gekippte Ansicht von (A) zeigt die Dimerisierungs-Grenzfläche der C-Termini der Moleküle Grau und Gelb. (D) Vergrößerte Ansicht von (C). Die Aminosäuren S125 in der DAC-Domäne der Moleküle Grau und Gelb stehen sich genau gegenüber. Der Abstand zwischen ihnen beträgt 3,9 Å..... 91

Abbildung 3.19: SDS-PAGE der gereinigten CdaS-Varianten. Die Plasmide pGP1974 (WT), pGP1995 (A61V) und pGP1993 (Δ H1) wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Transformanten wurden in LB-Medium kultiviert und die Expression der rekombinanten Enzyme durch Zugabe von IPTG induziert. Die Induktion erfolgte bei 16°C für 18 h. Anschließend wurde eine Reinigung durch Ni²⁺-NTA durchgeführt mit 1x ZAP pH 7,5, 10 mM Imidazol, 10% Glycerin als Ausgangspuffer. CdaS, CdaS_{A61V} und CdaS _{Δ H1} eluierten bei 150 – 200 mM Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden per 12% SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie Brilliantblau gefärbt..... 92

Abbildung 3.20: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung des Oligomerisierungszustands der CdaS-Varianten. Die Proteinlösungen mit gereinigtem CdaS, CdaS_{A61V} und CdaS _{Δ H1} sowie des Proteinstandards wurden an einer Superdex™ 200 10/300 GL getrennt (2.3.5.12). Mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte des Standards (durch Zahlen [kDa] gekennzeichnet) konnte eine Standardgleichung ermittelt werden die zur Berechnung der Molekulargewichte der Proben verwendet wurde. Absorption bei 280 nm (A₂₈₀), Elutionsvolumen (V_E). 93

Abbildung 3.21: Untersuchung des Oligomerisierungszustands der CdaS-Varianten mittels Blau nativ-PAGE. Von jeder Probe wurde 1 µg (WT Δ H1) bzw. 3 µg (A61V) gereinigtes Protein auf ein 5-24%iges nicht-denaturierendes PAA Gel aufgetragen und mittels Blau nativ-PAGE getrennt (2.3.5.13). Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt und durch α -His-Färbung visualisiert. Theoretisches Molekulargewicht CdaS und CdaS_{A61V} = 23 kDa (Monomer). Theoretisches Molekulargewicht CdaS _{Δ H1} = 18 kDa (Monomer). Die gestrichelte Linie symbolisiert die Analyse mittels verschiedener Gele..... 95

Abbildung 4.1: Modell zur Bildung des CdaA-CdaR-GlmM-Komplexes. Die Existenz dieses Komplexes wurde *in vivo* unter guten Stickstoffbedingungen nachgewiesen. Durch die

Interaktion mit CdaR könnte GlmM ein stickstoffabhängiges Signal weitergeben, welches die Produktion von c-di-AMP durch CdaA beeinflusst. PG = Peptidoglycan, ZM = Zellmembran.
 105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Allgemeine Methoden.....	21
Tabelle 2.2: Übersicht über die hergestellten Antikörper. Die angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf den Einsatz im Western Blot.	39
Tabelle 2.3: Schritte und Lösungen für die Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen.	41
Tabelle 3.1: Aktivitäten der Diadenylatzyklen CdaA, CdaS und DisA. Bestimmung von intrazellulärem c-di-AMP aus <i>E. coli</i> Kulturen, welche die Expressionsvektoren pGP1970 (pET19b- <i>cdaA</i>), pGP1972 (pET19b- <i>cdaS</i>), pGP2563 (pET19b- <i>disA</i>) trugen. Die gezeigten Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten gebildet. Die Standardabweichung ist in Klammern dargestellt.....	55
Tabelle 3.2: Promotoraktivitäten stromaufwärts von <i>cdaA</i> und <i>glmM</i> . Die Stämme GP1319 (Negativkontrolle), GP1339 und GP1340 wurden in CSE-Medium mit oder ohne Glucose (0,5%) oder Glucosamin (0,5%) angezogen. Aus den entsprechenden Zellextrakten wurde die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben.....	65
Tabelle 3.3: Suppressorenscreening identifiziert relevante Mutationen. GP1327 wurde ohne Xylose inkubiert, was zur Bildung von Suppressorkolonien führte. Von diesen wurden über 80 isoliert und die $P_{xyl}cdaS$ -Bereiche sequenziert.	84
Tabelle 3.4: Aktivitäten der CdaS Varianten. Bestimmung von intrazellulärem c-di-AMP aus <i>E. coli</i> Kulturen welche die angegebenen Expressionsvektoren (pET28a-Rückgrat) trugen. Die Kulturen wuchsen in LB-Medium und die c-di-AMP Konzentrationen wurden wie unter 2.3.7 beschrieben bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist in Klammern dargestellt.....	88
Tabelle 6.1: Oligonukleotide	133
Tabelle 6.2: <i>B. subtilis</i> Stämme	145
Tabelle 6.3: Fremdstämme <i>E. coli</i>	150
Tabelle 6.4: Fremdstämme <i>B. cereus</i>	150
Tabelle 6.5: Fremdstämme <i>B. subtilis</i>	151
Tabelle 6.6: Plasmide	151
Tabelle 6.7: Fremdplasmide.....	156
Tabelle 6.8: Internetangebote.	158
Tabelle 6.9: Computerprogramme.....	159