

Untersuchung der Spezifität von  
Antiterminationsproteinen in  
*Bacillus subtilis*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von:  
Sebastian Hübner  
aus Neumünster

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. Jörg Stülke

Korreferent: PD Dr. Michael Hoppert

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2008

## **Danksagung (Director's Cut)**

An erster Stelle möchte ich mich bei Jörg dafür bedanken, dass ich sowohl meine Diplomarbeit als auch meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen durfte. Außerdem danke ich ihm dafür, dass ich nach dem frustrierenden ersten Jahr noch das Thema wechseln konnte. Bei Michael Hoppert bedanke ich mich für die Übernahme der Aufgabe als Korreferent.

Bei Sebastian Himmel bedanke ich mich für die 2 Jahre gute Zusammenarbeit im Strukturprojekt. Ich hoffe, du hast die Strukturen bald aufgeklärt. Viel Erfolg weiterhin. Dr. Stefan Becker und Prof. Griesinger danke ich ebenfalls für die erfolgreiche Kooperation und den Einblick in die Welt der Strukturanalyse.

Großer Dank gilt natürlich allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern des `Botchers Lab´. Bei meinem Ex-Betreuer Oli möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir durch die ca. 10000 erstellten RAT-Mutanten, die er im Seminar sehr ausführlich präsentiert hat, einen so einfachen Einstieg in das Thema ermöglicht hat. Bei Fabian und Sven möchte ich für die ungezählten, von Sven initiierten, Ausflüge in die Cafete sowie viele MOHAA-Abende (Warum ist diese Tradition eigentlich gestorben?) bedanken. Bei Nico und Hinnerk bedanke ich mich für die extrem gute Unterhaltung, das eine oder andere Feierabendbierchen und eine Fahrradverfolgungsjagd durch die Göttinger Innenstadt. Lope danke ich für die Weiterentwicklung meines Computerverständnisses.

Danke auch an Katrin. Die Gespräche mit dir werde ich echt vermissen! Gleiches gilt auch für Christoph.

Ein riesiger Dank geht auch an meine beiden Diplomanden Christine und Basti dafür, dass sie mir die Betreuung so einfach gemacht haben. Es war mir ein Vergnügen euch beide zu betreuen. Tini danke ich außerdem für viele nette Unterhaltungen, den Fahrdienst nach Hause und für die Satz: „Könnte es eigentlich sein, dass Arne und du gestern eine Kiste Bier getrunken haben?“

Dank auch an meine fünf Praktikanten: Nico, Fabian, Christine, Arne und Christopher. Es hat viel Spaß gemacht! Arne und Christoph: Alle meine bisherigen Praktikanten haben es bis zur Doktorarbeit in der Abteilung gebracht; also strengt euch an! ;) Christina danke ich für die vielen großartigen Hilfestellungen im Labor. Bärbel danke ich für die vielen kleinen Hilfen. Auch allen anderen Mitgliedern des `Botchers Lab´, die ich jetzt nicht namentlich erwähnt habe, danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre während der letzten 3 Jahre.

Falk danke ich für die gute Freundschaft seit nun schon 8 Jahren mit allem was dazugehört, für „Verrückte Sachen“, für 2-Mann-Wall-of-Deaths auf Konzerten der Altherrenpunkband und für Hip-Hop-Pogo (mit Meike und Fabian!).

Ein riesen Dankeschön auch an Sina für die Veteranentreffen und für erbitterten Duelle im Kickern und Bowling. (Einigen wir uns auf Unentschieden?) Für die vielen One-on-One-Kicker-Spiele inklusive toller Gespräche danke ich auch Thorsten.

Für die gute Arbeitsatmosphäre in Labor 255 danke ich auch alle Mitgliedern der AG Ehrenreich (damals) und der AG Görke (heute).

Patrick danke ich für die wohl schlechteste Dies-Mannschaft Allerzeiten (Ich bin stolz drauf!) Gruß und dank auch an die „üblichen Verdächtigen“, Jörn, Judith, Kristina, Raffael, Anja und Dr. Strube. Ohne euch hätte das Studium nicht annähernd soviel Spaß gebracht.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während des ganzen Studiums. Bei Simone und Jörg bedanke ich mich für die netten Abende und die Besuche in Münster. Danke auch an alle anderen Leute aus dem Norden, mit denen ich in den letzten Jahren viel Spaß hatte (Euch namentlich zu erwähnen würde den Rahmen sprengen).

Dem wichtigsten Menschen im meinem Leben danke ich zum Schluss: Danke Claudine, dass du immer für mich da bist, mich immer unterstützt und einfach für alles!

## Danke für tolle 5 Jahre!

The logo features the text "Botchers' Lab" in a bold, red, stylized font with a white outline. The letters are thick and blocky, with a slight slant. The apostrophe in "Botchers'" is positioned above the letter 's'. The entire text is set against a solid black rectangular background.

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis.....  | V         |
| <b>1. Zusammenfassung.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. Einleitung .....</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1. Die RNA-Welt-Theorie .....   | 2         |
| 2.2. Das Ribozym GlnS aus <i>Bacillus subtilis</i> .....                                | 3         |
| 2.3. RNA-Schalter .....   | 3         |
| 2.3.1. Metabolit-abhängige RNA-Schalter.....  | 4         |
| 2.3.2. RNA-abhängige RNA-Schalter .....   | 7         |
| 2.3.3. Regulation durch RNA-Thermometer.....  | 8         |
| 2.3.4. Regulation durch Attenuation .....   | 8         |
| 2.3.5. Protein-abhängige RNA-Schalter.....  | 9         |
| 2.4. Bedeutung der Spezifität in der Regulation.....                                    | 12        |
| 2.5. Zuckerabhängige-Antitermination in <i>B. subtilis</i> .....                        | 14        |
| 2.5.1. Das Phosphotransferase-System .....  | 14        |
| 2.5.2. Antitermination durch Protein-RNA-Interaktion .....                              | 15        |
| 2.5.3. GlcT: Antitermination am <i>ptsGHI</i> -Operon .....                             | 16        |
| 2.5.4. SacT, SacY und LicT: Die Mitglieder der BglG-Familie in <i>B. subtilis</i> ..... | 18        |
| 2.5.5. Interaktionen von GlcT und der <i>ptsG</i> -RAT-Struktur .....                   | 20        |
| 2.5.6. Die Struktur der LicT-RBD mit der <i>bglP</i> -mRNA.....                         | 21        |
| 2.6 Ziele der Arbeit.....   | 23        |
| <b>3. Material und Methoden.....</b>  | <b>24</b> |
| 3.1 Bakterienstämme und Plasmide .....  | 24        |
| 3.2 Medien .....  | 24        |
| 3.3. Methoden.....  | 27        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.1. Allgemeine Methoden .....   | 27        |
| 3.3.2. Anzucht von Bakterien.....  | 28        |
| 3.3.3. Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation.....                          | 28        |
| 3.3.4. Transformation von <i>B. subtilis</i> .....   | 29        |
| 3.3.5. Präparation und Nachweis von DNA .....  | 30        |
| 3.3.6. Arbeiten mit Proteinen .....  | 36        |
| 3.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten .....   | 43        |
| 3.3.8. Arbeiten mit RNA .....  | 45        |
| 3.3.9. Mutagenese mit <i>E. coli</i> XL1-Red.....  | 55        |
| <b>4. Ergebnisse .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.1. Die Struktur des Komplexes aus GlcT und der <i>ptsG</i>-mRNA.....</b>                          | <b>56</b> |
| 4.1.1. Ziel der Untersuchung .....   | 56        |
| 4.1.2. Herstellung einer perfekt symmetrischen RAT-Struktur .....                                      | 57        |
| 4.1.3. Bindet GlcT die symmetrische RAT-Struktur <i>in vivo</i> ?.....                                 | 59        |
| 4.1.4. Bindet GlcT die symmetrische RAT-Struktur <i>in vitro</i> ? .....                               | 60        |
| 4.1.5. Kontrolle der 10 Basen langen synthetischen RAT-RNA .....                                       | 62        |
| 4.1.6. Suche nach Kristallen.....  | 63        |
| <b>4.2. Interaktionen der Antiterminationsproteine GlcT und SacT mit PTS-Proteinen</b><br><b>.....</b> | <b>64</b> |
| 4.2.1. Ziel der Untersuchung .....   | 64        |
| 4.2.2. Rekonstruktion des PTS <i>in vitro</i> .....  | 64        |
| 4.2.3. Dimerisierung und Phosphorylierung der GlcT-PRDII .....   | 67        |
| <b>4.3. Analyse von verschiedenen RAT-Strukturen mit Hilfe von Northern Blots.....</b>                 | <b>71</b> |
| 4.3.1. Ziel der Untersuchung .....   | 71        |
| 4.3.2. Wie beeinflussen die eingeführten Mutationen die Transkription? .....                           | 74        |
| <b>4.4. Spezifität der RNA-bindenden Domäne von SacT.....</b>  | <b>75</b> |
| 4.4.1. Ziel der Untersuchung .....   | 75        |
| 4.4.2. Auswahl des Vektors.....  | 76        |
| 4.4.3. Auswahl der für LicT optimalen <i>lacZ</i> -Fusion.....   | 76        |
| 4.4.4. Die Auswahl des richtigen Stammes.....  | 77        |

---

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 4.4.5.      | Untersuchung der Funktionalität der SacT-RBD .....  | 78         |
| 4.4.6.      | Mutagenese durch Error-Prone-PCR .....  | 80         |
| 4.4.7.      | Mutagenese im <i>E. coli</i> -Stamm XL1-Red .....   | 80         |
| 4.4.8.      | Charakterisierung der SacT-RBD-Mutante XL1*1 .....  | 81         |
| 4.4.9.      | Zielgerichtete Mutagenese der SacT-RBD durch CCR .....                                      | 84         |
| 4.4.10.     | Bindung der CCR* Allele an die LicT <sup>OPT</sup> - <i>lacZ</i> -Fusion .....              | 86         |
| 4.4.11.     | Bindung der CCR* Allele an die <i>sacPA-lacZ</i> -Fusion.....                               | 87         |
| 4.4.12.     | Bindung der CCR* Allele an die <i>sacB-lacZ</i> -Fusion .....                               | 88         |
| 4.4.13.     | Bindung der CCR* Allele an die <i>bglP-lacZ</i> -Fusion .....                               | 89         |
| 4.4.14.     | Bindung der CCR* Allele an die <i>ptsG-lacZ</i> -Fusion .....                               | 90         |
| 4.4.15.     | Gel-Shift-Analysen mit ausgewählten RBD-Allelen .....                                       | 91         |
| 4.4.16.     | Schlussfolgerung .....  | 95         |
| <b>5.</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>5.1.</b> | <b>Spezifität der Zuckeraufnahme .....</b>  | <b>96</b>  |
| 5.1.1.      | Die Struktur der RNA-bindenden Domänen der BglG-Familie von Antiterminationsproteinen.....  | 96         |
| 5.1.2.      | Der Einfluss der Pro26Ser Mutation auf die Struktur und die Aktivität der SacT-RBD .....    | 99         |
| 5.1.3.      | Warum sind die SacT-Varianten unspezifisch? .....   | 100        |
| 5.1.4.      | Wie wird die Spezifität der RNA-Bindung erreicht? .....                                     | 101        |
| 5.1.5.      | Wie wird die Spezifität aufrecht erhalten? .....  | 102        |
| 5.1.6.      | Gibt es „unspezifische“ Allele in anderen Organismen? .....                                 | 104        |
| 5.1.7.      | Spezifität in der PTS-Regulation.....   | 105        |
| <b>5.2.</b> | <b>Spezifitätsdeterminanten von anderen Antiterminationsproteinen in <i>B. subtilis</i></b> | <b>107</b> |
| <b>5.3.</b> | <b>Ausblick.....</b>  | <b>109</b> |
| <b>6.</b>   | <b>Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>110</b> |
| <b>7.</b>   | <b>Anhang .....</b>   | <b>127</b> |
| <b>7.1.</b> | <b>Materialien.....</b>   | <b>127</b> |

---

|  |            |
|--|------------|
| 7.1.1. Chemikalien .....   | 127        |
| 7.1.2. Hilfsmittel.....  | 128        |
| 7.1.3. Geräte und Apparaturen .....                                | 129        |
| 7.1.4. Kommerziell erhältliche Systeme .....                       | 130        |
| 7.1.5. Antikörper und Enzyme .....                                 | 130        |
| <b>7.2. Oligonukleotide.....</b>                                   | <b>131</b> |
| <b>7.3. Plasmide .....</b>   | <b>136</b> |
| <b>7.4. Stämme.....</b>  | <b>143</b> |
| <b>7.5. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme.....</b> | <b>145</b> |
| <b>8. Lebenslauf.....</b>  | <b>146</b> |



**Abkürzungsverzeichnis**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| % (v/v)               | % (volume/volume) (Volumenprozent)   |
| % (w/v)               | % (weight/volume) (Massenprozent)  |
| Abb.                  | Abbildung  |
| Amp                   | Ampicillin   |
| APS                   | Ammoniumperoxodisulfat   |
| ATP                   | Adenosintriphosphat  |
| <i>B.</i>             | <i>Bacillus</i>  |
| BSA                   | bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)  |
| bzw.                  | beziehungsweise  |
| C                     | Kohlenstoff  |
| ca.                   | circa  |
| CAA                   | Casamino acids   |
| cAMP                  | cyclisches Adenosinmonophosphat  |
| CDP*                  | 2-Chlor-5-(4-Methoxy Spiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz |
| chrom. DNA            | chromosomale DNA   |
| Cm                    | Chloramphenicol  |
| deion. Wasser         | deionisiertes Wasser   |
| DIG                   | Digoxygenin  |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNaseI                | Desoxyribonuklease I   |
| dNTP                  | Desoxyribonukleosidtriphosphat   |
| DTT                   | Dithiothreitol   |
| <i>E.</i>             | <i>Escherichia</i> bzw. <i>Erwinia</i>   |
| EDTA                  | Ethylendiamintetraacetat   |
| <i>et al.</i>         | <i>et altera</i>   |
| EtBr                  | Ethidiumbromid   |
| EtOH                  | Ethanol  |
| Glc                   | Glukose  |
| IPTG                  | Isoprpyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid  |
| Kap.                  | Kapitel  |
| Kan                   | Kanamycin  |
| LB                    | Luria Bertani (Medium)   |
| LFH                   | Long-Flanking-Homology   |
| MOPS                  | Morpholinopropansulfonsäure  |
| mRNA                  | messenger RNA  |
| N                     | Stickstoff   |
| Ni <sup>2+</sup> -NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure  |
| OD <sub>x</sub>       | optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge $\lambda=x$ nm   |
| ONPG                  | o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid   |
| <i>ori</i>            | Replikationsursprung   |
| PAA                   | Polyacrylamid  |
| PTS                   | Phosphotransferase-System  |
| PCR                   | Polymerasekettenreaktion   |
| RBD                   | RNA-bindende Domäne  |
| RNA                   | Ribonukleinsäure   |
| RT                    | Raumtemperatur   |

|       |   |
|-------|---|
| s.    | siehe   |
| S     | Succinat  |
| SDS   | Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)           |
| SP    | Sporulationsmedium                                      |
| Tab.  | Tabelle   |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                        |
| Tris  | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                        |
| U     | Units (Einheiten)                                       |
| ÜN    | über Nacht  |
| WT    | Wildtyp   |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid |
| ZAP   | Zellaufschlusspuffer                                    |

**Einheiten**

|     |                        |
|-----|------------------------|
| A   | Ampere                 |
| bp  | Basenpaare             |
| °C  | Grad Celsius           |
| Da  | Dalton                 |
| g   | Gramm                  |
| h   | Stunde                 |
| 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 | $10^{-3}$ |
| $\mu$ | mikro | $10^{-6}$ |

**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 |

## 1. Zusammenfassung

*Bacillus subtilis* kann eine Vielzahl verschiedener Kohlenstoffquellen aufnehmen und verwerten. Damit *B. subtilis* keinen Nachteil gegenüber anderen Bakterien hat, muss zuerst die Kohlenstoffquelle verwertet werden, die die meiste Energie liefert. Damit diese Hierarchie der Kohlenstoffquellen erhalten bleibt, muss die Aufnahme strikt reguliert werden. Die Zucker Glukose, Salicin und Saccharose werden durch das sogenannte Phosphotransferase-System aufgenommen. Die Expression der Permeasen wird durch Antitermination reguliert. Ein Antiterminationsprotein bindet hierbei an die sogenannte RAT-Struktur der mRNA der jeweiligen Permease und verhindert so die Termination der Transkription. Die Regulation der Aktivität dieser Antiterminationsproteine erfolgt über Phosphorylierung durch PTS-Proteine. Das allgemeine PTS-Protein HPr aktiviert die Antiterminationsproteine, während die Phosphorylierung durch die zuckerspezifischen Permeasen zur Inaktivierung führt. Die Phosphorylierungen erfolgen an konservierten Histidinen.

Um die Spezifität der Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen, sollten die Strukturen der Komplexe der Antiterminationsproteinen mit den Phosphodonoren geklärt werden. Dafür wurden in dieser Arbeit das komplette PTS *in vitro* rekonstruiert. Die Phosphorylierung der isolierten Domänen konnte gezeigt werden. Für die Untersuchung der Struktur von GlcT im Komplex mit der *ptsG*-mRNA wurde eine RAT-Struktur entwickelt, die aus nur 10 Basen besteht und mit sich selber paaren kann. Es konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass diese RNA ausreicht um von GlcT gebunden zu werden.

Außerdem wurde in dieser Arbeit die Spezifität dieser Antiterminationsproteine auf der Ebene der RNA-Bindung untersucht. Das Protein SacT bindet die mRNA der Saccharose-Permease SacP. SacT wurde in dieser Arbeit mutiert, um Varianten zu isolieren, die andere RAT-Strukturen binden können. Ein einziger Aminosäureaustausch reicht aus, um die Spezifität der RNA-bindenden Domäne zu verändern. Wird das Prolin 26 in ein Serin getauscht, bindet dieses Antiterminationsprotein alle RAT-Strukturen in *B. subtilis*. Durch diesen Aminosäureaustausch geht die Spezifität verloren. Durch weitere Mutagenese der Positionen 26 und 31 konnten weitere Varianten isoliert werden, die ebenfalls alle unspezifisch RAT-Strukturen binden können. Dabei wurden besonders häufig Varianten isoliert, bei denen das Prolin gegen geladene Aminosäuren ausgetauscht wurde.

## 2. Einleitung

### 2.1. Die RNA-Welt-Theorie

In der von Francis Crick postulierten Abfolge des Flusses der genetischen Information dient die RNA nur als Übermittler zwischen der chromosomalen DNA zum fertigen Protein (Crick 1958 und 1971). Die DNA ist für die Speicherung der Information zuständig, während die Proteine chemische Prozesse katalysieren, die das Überleben des Organismus sicher stellen.

In ihrer Arbeit über genetische Regulationsmechanismen in der Proteinbiosynthese schlugen Jacob und Monod allerdings schon 1961 vor, dass auch die RNA eine regulatorische Funktion übernehmen könnte.

Die Identifizierung der ersten katalytischen RNAs führte zur RNA-Welt-Theorie (Gilbert, 1986). Zu diesem Zeitpunkt der Evolution war die RNA sowohl für die Speicherung der genetischen Information als auch für das Ausführen der chemischen Prozesse verantwortlich. RNAs, die eine katalytische Funktion ausführen, werden als Ribozyme bezeichnet. Die meisten Ribozyme führen autolytische Spaltungen und Splicing-Reaktionen durch (Fedor und Williamson, 2005). Die einzige Ausnahme bildet das Zentrum des Ribosoms. Dort werden Ester-Aminolyse und -Hydrolyse Reaktionen durch die RNA katalysiert (Crick, 1968; Noller, 1991; Schmeing *et al.*, 2002).

Damit das Überleben in dieser RNA-Welt möglich war, war es essentiell, dass die RNAs weitere Reaktionen katalysieren konnten. Diese Überlegungen führten zur gezielten Suche nach RNAs, die andere, zusätzliche Reaktionen katalysieren konnten (Fiammengo und Jäschke, 2005). Eine der essentiellen Reaktionen für das Überleben war, dass es eine RNA-abhängige RNA-Polymerase gab, die sich selbst replizieren kann. Diese konnte erfolgreich isoliert werden (Johnston *et al.*, 2001). Es wurden inzwischen weitere Ribozyme isoliert, die verschiedene Reaktionen durchführen können. Dazu zählen Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen, Isomerisierungen, Redox-Reaktionen und die Synthese von kleinen Molekülen (Prudent *et al.* 1994; Seelig und Jäschke, 1999; Huang *et al.*, 2000; Tsukiji *et al.*, 2003).

Die Entwicklung hin zu Protein-gesteuerter Katalyse von Reaktionen erfolgte vermutlich durch den Druck, mehr Reaktionen durchführen zu können. RNAs haben einen unveränderlichen sehr sauren  $pK_a$ -Wert, während Proteine beziehungsweise die 20 Aminosäuren eine große Spannweite von  $pK_a$ -Werten besitzen (Cochrane und Strobel, 2008).

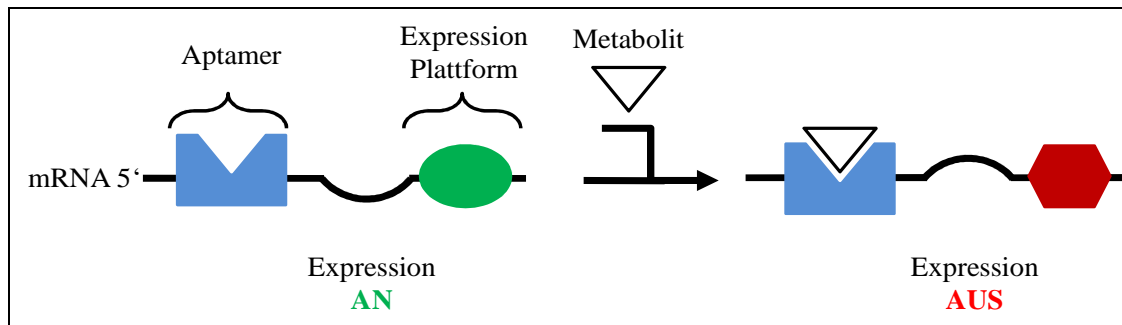
Obwohl in der heutigen Zeit praktisch alle Reaktionen von Proteinen katalysiert werden, gibt es auch weiterhin Regulationsformen, die auf Ebene der RNA ablaufen.

## 2.2. Das Ribozym GlmS aus *Bacillus subtilis*

Das Ribozym GlmS aus *B. subtilis* ist bis heute das einzige bekannte Ribozym, das von einem Kofaktor abhängt. Das Gen *glmS* kodiert für eine Glucosamin-6-phosphatsynthase. Das Ribozym reagiert auf die Anwesenheit von Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P), dem Produkt des Enzyms GlmS (Winkler *et al.*, 2004). Unter diesen Umständen schneidet sich die *glmS*-mRNA selbst. Aber nicht nur das Ribozym ist für die Spaltung notwendig. Auch das GlcN6P ist absolut essentiell für den Ablauf der Reaktion und beteiligt sich direkt an dieser (McCarthy *et al.*, 2005; Klein und Ferré-D'Amaré, 2006; Cochrane *et al.*, 2007). Das Ziel dieser Spaltung ist die Verhinderung der Synthese von GlmS, da dieses nicht mehr benötigt wird, wenn genug GlcN6P in der Zelle vorliegt (Collins *et al.*, 2007). Das sekundäre downstream-Transkript, das nach der Spaltung entsteht, wird in der Zelle sehr schnell abgebaut. Dadurch wird eine weitere Translation verhindert. Die Degradation verläuft abhängig von der RNase J1. Das Ribozym GlmS repräsentiert also eine Entwicklungsstufe zwischen der RNA-Welt und der heutigen Protein-gesteuerten Biologie.

## 2.3. RNA-Schalter

Ein weiterer Regulationsmechanismus, der auf Ebene der RNA abläuft, ist die Regulation über sogenannte RNA-Schalter. Das Prinzip der RNA-Schalter ist in Abb. 2.1. dargestellt. Die RNA-Schalter-Strukturen sind meist im 5'-untranslatierten Bereich einer RNA zu finden. Sie bestehen aus zwei Domänen. Die erste Domäne wird als Aptamer bezeichnet, die zweite als Expressionsplattform. An die Aptamerregion bindet der Effektor (Hermann und Patel, 2000; Gold *et al.*, 1995). Dabei kann es sich um Metabolite, RNAs oder Proteine handeln. Die Expressionsplattform ist für die Bindung nicht notwendig (Winkler *et al.*, 2002a; 2002b; Winkler *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2004). Die Aptamerregion ist ungefähr 70 bis 170 Basen lang. Dies ist deutlich länger als die RNAs, die bei *in vitro* Suchen nach RNA-Metabolit-Wechselwirkungen gefunden wurden (Famulok, 1999). Diese Verlängerung führt vermutlich zu einer höheren Affinität und Selektivität (Winkler und Breaker, 2003).



**Abb. 2.1.: Organisation von RNA-Schalter-RNAs in Bakterien**

Der Metabolit bindet an die Aptamer-Region und stabilisiert so eine alternative Struktur der Expressionsplattform. Dies führt dann zu einer Veränderung in der Expression des Gens. (Nach Winkler und Breaker, 2003)

Die Bindung des Metaboliten an das Aptamer löst eine strukturelle Veränderung in der Expressionsplattform aus. Die Expressionsplattform verändert dadurch die Genexpression. In den meisten Fällen wird die Expression durch das Binden des Metaboliten verhindert, da oft Synthesegene durch diese RNA-Schalter reguliert sind. So kann direkt die Menge des Metaboliten gemessen und die Expression daran angepasst werden (Henkin und Yanofsky, 2002). Der genaue Mechanismus der Regulation der Genexpression durch RNA-Schalter wird im Folgenden an einigen Beispielen erläutert.

### 2.3.1. Metabolit-abhängige RNA-Schalter

Wie das Ribozym GlmS benutzen auch Proteine sehr häufig kleine Moleküle als Kofaktoren (Holliday *et al.*, 2007). Die Synthese vieler dieser Kofaktoren ist durch einen RNA-abhängigen Mechanismus reguliert (Vitreschak *et al.*, 2004; Winkler und Breaker, 2005; Barrick und Breaker, 2007). Zu diesen Metaboliten zählen das bereits erwähnte GlcN6P sowie zum Beispiel die Aminosäuren S-Adenosylmethionin (SAM), Glycin und Lysin. Auch die Synthese der Komponenten von DNA und RNA ist häufig über RNA-Schalter reguliert. Es gibt RNA-Schalter, die auf Guanin, Adenin oder Desoxyguanosin reagieren. Des Weiteren gibt es RNA-Schalter für Thiaminpyrophosphat (TPP), Koenzym B<sub>12</sub>, zyklisches di-GMP (Sudarsan *et al.*, 2008), Molybdän und Wolfram (Regulski *et al.*, 2008). Die Sequenzen der Bereiche, die an der Metabolitenbindung beteiligt sind, sind sehr stark konserviert. RNA-Schalter für FMN, Lysin und Koenzym B12 gibt es im gesamten Reich der Prokaryoten (Vitreschak *et al.*, 2002; Nahvi *et al.*, 2004; Rodionov *et al.*, 2002). Die RNA-Schalter für SAM, Guanin und Adenin kommen bis auf einige Ausnahmen nur in Gram-positiven

Bakterien vor (Mandel *et al.*, 2003). Der TPP-abhängige RNA-Schalter stellt eine Besonderheit dar. Diesen findet man sogar in einigen eukaryotischen Genomen (Sudarsan *et al.*, 2003). Bei den RNA-Schaltern handelt es sich also um eine sehr alte Form der Regulation. Da diese ohne weitere Komponenten, wie z.B. Proteine, die Regulation verwirklichen können, wird vermutet, dass es sich bei diesen RNA-Schaltern um Relikte der RNA-Welt handelt.

### **2.3.1.1. Purin-abhängige RNA-Schalter**

Die Familie der RNA-Schalter, die Purine binden und damit die Expression der dahinter liegenden Gene steuern, ist am Besten in *B. subtilis* untersucht. Hier werden vier Operons oder einzelne Gene durch Guanin und ein Gen durch Adenin reguliert (Winkler und Breaker, 2003). Die Struktur dieser RNA-Schalter ist in allen Organismen identisch. Es bilden sich je drei kurze Stammbereiche, die so zueinander liegen, dass in deren Mitte die Bindetasche für das Guanin beziehungsweise das Adenin gebildet wird (Batey *et al.*, 2004). Liegt nicht genügend Guanin/Adenin in der Zelle vor, ist der als P1 bezeichnete Stamm nicht stabil. Es bildet sich eine alternative Struktur aus, die zum Teil mit der Sequenz des P1 Stammes überlappt. Diese Struktur wird als Antiterminator bezeichnet (Mandal *et al.*, 2003). Die RNA-Polymerase wird durch diese Struktur nicht gestört und die Synthesegene für Guanin/Adenin können abgelesen werden. Sobald Guanin/Adenin in der Zelle im Überschuss vorkommt, bindet der entsprechende Metabolit die Tasche, die durch die drei Stämme gebildet wird und stabilisiert so den P1 Stamm. In Folge dessen kann die Antiterminationsstruktur nicht mehr gebildet werden, da ein Teil dieser Struktur nun im P1 Stamm vorliegt. Es bildet sich eine Terminatorstruktur aus. Diese verhindert das Ablesen des Genes durch die RNA-Polymerase. Der Ablauf dieser strukturellen Veränderung ist detailliert untersucht (Buck *et al.*, 2007; Ottink *et al.*, 2007). Es finden nur kleine Veränderungen in der Struktur statt, sobald Guanin bindet. Diese laufen extrem schnell ab. Nur durch diese schnelle Änderung der Struktur kann sichergestellt werden, dass die RNA-Polymerase den 5'-untranslatierten Bereich der RNA noch nicht verlassen hat und die Terminatorstruktur rechtzeitig gebildet wird, um die Expression zu verhindern.

### 2.3.1.2. Aminosäure-abhängige RNA-Schalter

Der erste Aminosäure-abhängige RNA-Schalter wurde in der Regulation der Biosynthese von Methionin und Cystein beschrieben (Grundy und Henkin, 1998). Vor fast allen Genen dieser Stoffwechselwege liegt eine konservierte Sequenz im 5'-untranslatierten Bereich des Transkripts. Diese wird als S-Box bezeichnet. Der Metabolit, der an diese mRNA bindet, ist S-Adenosylmethionin (Epshtein *et al.*, 2003). SAM ist das Endprodukt dieses Stoffwechselweges. Aus Homocystein wird Methionin, welches dann in SAM umgewandelt wird. SAM ist ein wichtiger Metabolit, der in der Zelle für Methylierungen benötigt wird. Sobald SAM in großer Menge in der Zelle vorliegt, bindet SAM an den RNA-Schalter, zerstört die Antiterminationsstruktur und es bildet sich der Terminator (McDaniel *et al.*, 2006). Für das Gen *metK* (SAM-Synthetase) in Milchsäurebakterien wurde ein etwas anderer Mechanismus des RNA-Schalters identifiziert. Diese neu beschriebene Region wird als S<sub>MK</sub>-Box bezeichnet (Fuchs *et al.*, 2006). Hier wird die Shine-Dalgarno-Sequenz durch die Bindung von SAM blockiert. Dies geschieht durch eine sogenannte Anti-antiterminatorstruktur. Durch diese Änderungen in der Struktur wird die Shine-Dalgarno-Sequenz der entsprechenden Gene in einem doppelsträngigen Bereich versteckt, so dass keine Translation mehr stattfinden kann.

Auch die Biosynthese von Lysin wird auf die gleiche Art durch einen RNA-Schalter, der Lysin bindet, reguliert (Sudarsan *et al.*, 2003; Garst *et al.*, 2008). Die L-Box ist besonders in Hinsicht auf die Möglichkeit der RNA-Schalter als Ziele für Medikamente gut untersucht. Es konnten Lysin-Analoga identifiziert werden, die zu einer permanenten Termination führen und somit *B. subtilis* abtöten (Blount *et al.*, 2007, Lu *et al.*, 1992, Winkler und Breaker, 2005).

Der Glycin-abhängige RNA-Schalter vor dem Gen *gcvT* stellt eine Besonderheit dar. Hier wird die Expression der dahinterliegenden Gene erst ermöglicht, wenn Glycin in der Zelle vorhanden ist (Barrick *et al.*, 2004, Mandal *et al.*, 2004).

### 2.3.1.3. Weitere Beispiele für Metaboliten-abhängige RNA-Schalter

Die Expression von vielen weiteren Synthesegenen für kleine Moleküle werden durch RNA-Schalter kontrolliert. Neben den beschriebenen RNA-Schaltern werden auch die Biosynthese von TPP, FMN und Koenzym B<sub>12</sub> durch RNA-Schalter reguliert (Cochrane und



Strobel, 2008). Erst kürzlich identifiziert wurden die RNA-Schalter für Molybdän und Wolfram (Regulski *et al.*, 2008) sowie ein RNA-Schalter für zyklisches di-GMP (Sudarsan *et al.*, 2008). Die RNA-Schalter für Molybdän und Wolfram verhindern die Translation, während der für zyklisches di-GMP die Transkription terminiert. Es scheint so zu sein, dass es in Gram-negativen Bakterien häufiger zu einer Blockierung der Translation kommt, während in Gram-positiven Bakterien eher die Transkription verhindert wird (Winkler und Breaker, 2003). Auch das GlnS-Ribozym wird zu den Metabolit-abhängigen RNA-Schaltern gezählt, obwohl es streng genommen kein RNA-Schalter ist. Durch die Bindung des GlcN6P wird die Struktur der RNA nicht verändert (Hampel und Tinsley, 2006; Ferré-D'Amaré, 2006; Cochrane *et al.*, 2007; Tinsley *et al.*, 2007).

### 2.3.2. RNA-abhängige RNA-Schalter

Wie bereits erwähnt, gibt es auch RNA-Schalter, die keine Metabolite binden sondern RNAs. Die RNAs, die hier für Antitermination sorgen, sind tRNAs (Grundy und Henkin, 1993; Merino und Yanofsky 2005). Der konservierte Bereich dieses RNA-Schalters wird als T-Box bezeichnet (Gerdemann *et al.*, 2003, Grundy und Henkin, 2003). Diese Struktur ist vor vielen Genen der Aminosäurebiosynthese zu finden. Zu diesen gehören die Gene für die Synthese von Threonin, Glycin, Leucin, Cystein sowie das *ilv-leu*-Operon für verzweigtkettige Aminosäuren (Vitreschak *et al.*, 2008). Die T-Box bindet unbeladene tRNAs durch eine hoch konservierte Sequenz, die komplementär zu dem 5'-NCCA-3' Ende der tRNA ist (Putzer *et al.*, 1995; van de Guchte *et al.*, 1998; Grundy und Henkin 1993). Die Spezifität wird durch das Anticodon der tRNA sowie durch eine als Anti-Anti-Codon bezeichnet Sequenz im RNA-Schalter hergestellt (Grundy *et al.*, 1994, 1997, 2002; Marta *et al.*, 1996). Durch die Bindung der unbeladenen tRNA wird die Ausbildung eines Terminators verhindert, es findet Antitermination statt und die nachfolgenden Gene werden exprimiert (Fauzi *et al.*, 2005; Yousef *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Regulation durch RNA-Thermometer

Eine Besonderheit unter den RNA-Schaltern stellen die sogenannten RNA-Thermometer dar. Diese ändern ihre Struktur nicht durch die Bindung von Metaboliten, tRNAs oder Proteinen sondern durch den Einfluss der Temperatur (Narberhaus *et al.*, 2006).

Alle bekannten RNA-Thermometer blockieren bei niedrigen Temperaturen die Shine-Dalgarno-Sequenz der kontrollierten Gene. Mit steigender Temperatur schmelzen die Strukturen auf und die Shine-Dalgarno-Sequenz liegt frei. Die durch RNA-Thermometer kontrollierten Gene sind an der Hitzeschockantwort (Narberhaus *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1999; Nocker *et al.*, 2001) und an der Virulenzgenexpression beteiligt (Altuvia *et al.*, 1989).

#### **2.3.4. Regulation durch Attenuation**

Attenuation war der erste Mechanismus, an dem gezeigt werden konnte, dass die Modellierung der RNA zur Regulation der Expression von Genen benutzt werden kann (Gollnick und Babitzke, 2002). Das Tryptophan-Biosynthese-Operon in *E. coli* wird durch Attenuation und einen Transkriptionsrepressor, TrpR, reguliert (Yanofsky *et al.*, 1981). Das aus 141 Nukleotiden bestehende *trp*-Leader-Transkript kann drei sich überlappende Strukturen bilden. Diese werden Pause-Struktur, Antiterminator und Terminator genannt. Zusätzlich beinhaltet das Leader-Transkript einen 14 Peptid langen offenen Leserahmen. Nach dem Beginn der Transkription bleibt die RNA-Polymerase an der Pause-Struktur hängen und erlaubt es so dem Ribosom das Leader-Peptid zu synthetisieren. Sobald das Ribosom auf die RNA-Polymerase stößt, setzt diese die Transkription fort. Die Transkription und die Translation sind so gekoppelt. Die weitere Reaktion ist von der Tryptophan-Konzentration abhängig. Bei niedrigen Tryptophan-Konzentrationen bleibt das Ribosom an zwei Tryptophan-Codons im Leader-Transkript hängen. Dadurch wird die Antiterminationsstruktur gebildet und die RNA-Polymerase kann das ganze Operon ablesen. Ist viel Tryptophan in der Zelle vorhanden, erfolgt die komplette Translation der Leader-RNA. Dadurch bleibt das Ribosom erst am Stopp-Codon der Leader-RNA hängen. Dies verhindert die Formation des Antiterminators und die Terminatorstruktur wird gebildet. So wird die Transkription der Tryptophan-Biosynthesegene verhindert. Viele weitere Operons werden durch diesen Mechanismus reguliert. Dazu gehören die Operons für die Biosynthese von Histidin, Phenylalanin und Leucin in Enterobakterien (Artz und Holzschu, 1983; Carter *et al.*, 1986).

### 2.3.5. Protein-abhängige RNA-Schalter

#### 2.3.5.1. Das TRAP-Protein aus *B. subtilis*

Die strukturellen Veränderungen eines RNA-Schalters können nicht nur durch Metabolite oder tRNAs ausgelöst werden, sondern auch durch Proteine. Eines der gut untersuchten Beispiele dafür ist das TRAP-Protein aus *B. subtilis*. Dieses Protein reguliert die Expression des *trpEDCFBA*-Operon auf zwei verschiedene Arten (Babitzke, 2008). Es sorgt für Transkriptionstermination und es blockiert die Translation (Otridge und Gollnick, 1993; Babitzke und C. Yanofsky, 1993; Du und Babitzke, 1998). Die Aktivität von TRAP wird durch Tryptophan gesteuert. Ist Tryptophan in der Zelle vorhanden, bindet dieses das TRAP Protein, welches daraufhin aktiviert vorliegt und die RNA binden kann. Das Protein besteht aus 11 identischen Untereinheiten. Die Erkennung der RNA erfolgt über eine sich wiederholende NAG Sequenz im 5'-untranslatierten Bereich der mRNA (Babitzke *et al.*, 1995; Anston *et al.*, 1995; Babitzke *et al.*, 1996). Ohne das TRAP-Protein bildet die mRNA eine Antiterminationsstruktur. Sobald TRAP bindet, wird diese verhindert und ein Terminator wird gebildet. Die Transkription findet nicht statt. Im Falle der *trpE* mRNA erfolgt die Regulation über die Blockierung der Shine-Dalgarno-Sequenz. Das TRAP-Protein bindet auch hier eine Wiederholung der NAG-Sequenz. Durch die Bindung wird eine stabile Stammschleifenstruktur aufgelöst und die sogenannte Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz liegt frei und bindet an die Shine-Dalgarno-Sequenz. Diese ist damit blockiert und die Translation wird verhindert.

#### 2.3.5.2. Regulation der Histidin-Verwertung

Ein weiterer sehr gut untersuchter Protein-abhängiger RNA-Schalter ist die von HutP kontrollierte Expression des *hut*-Operons in *B. subtilis* (Kumar *et al.*, 2006; Kumarevel, 2007). Die Gene des *hut*-Operons kodieren für Proteine, die in der Verwertung von Histidin gebraucht werden (Chasin und Magasanik, 1968; Oda *et al.*, 1992). Das erste Gen dieses Operons kodiert allerdings für das Regulatorprotein HutP. Zwischen diesem Gen und Genen für die Enzyme kann die mRNA ausgeprägte Sekundärstrukturen bilden. Es entsteht ein stabiler Terminator. HutP wird durch L-Histidin aktiviert. So bindet es dann an eine

Antiterminationsstruktur und stabilisiert diese. Die Bildung des Terminators wird verhindert und die Hut-Enzyme können gebildet werden.

### 2.3.5.3. Regulation der Pyrimidin-Synthese

Alle Gene, die für die Synthese von UMP benötigt werden, liegen in *B. subtilis* im *pyr*-Operon (Paulus *et al.*, 1982). Dieses Operon kodiert zusätzlich für ein regulatorisches Protein, PyrR, welches die Expression der *pyr*-Gene kontrolliert (Turner *et al.*, 1994). Im 5'-untranslatierten Bereich des Operons und zwischen den Genen *pyrR* und *pyrP* bzw. zwischen *pyrP* und *pyrB* liegen Sequenzen, die nicht translatiert werden und auf der Ebene der mRNA Terminatorstrukturen ausbilden und so die Transkription der dahinter liegenden Gene verhindern (Turnbough und Switzer, 2008). Die mRNA kann alternative Antiterminationsstrukturen annehmen (Turner *et al.*, 1994). Diese sind stabiler als die Terminatorstrukturen. Die Regulation erfolgt über die Bindung von aktiviertem PyrR an die mRNA. Liegen in der Zelle hohe Konzentrationen an Guaninnukleotiden und niedrige Mengen von UMP bzw. UTP vor, bindet PyrR GTP und ist inaktiv. Sind die Konzentrationsverhältnisse entgegengesetzt, bindet PyrR UMP/UTP und wird aktiv (Turnbough und Switzer, 2008). Es bindet dann die mRNA und es kommt zur Termination der Transkription. Die Gene des *pyr*-Operons werden nicht exprimiert.

### 2.3.5.4. Das *glp*-Regulon in *B. subtilis*

Die Aufnahme von Glycerol ist in *B. subtilis* sowohl durch Katabolitenrepression als auch durch einen Antiterminationsmechanismus reguliert. Die Promotoren der Gene werden durch das Kohlenstoff-Kataboliten-Repressions-Protein A (CcpA) reguliert (für Details der Katabolitenrepression: Deutscher *et al.*, 2006). In Anwesenheit von besseren Kohlenstoffquellen als Glycerol wird die Initiation der Transkription durch die Bindung des CcpA/HPr-Komplexes an die DNA verhindert. Ist Glycerol als einzige oder beste Kohlenstoffquelle im Medium vorhanden, wird es durch GlpF aufgenommen und durch GlpK zu Glycerol-3-Phosphat umgewandelt. Dieses aktiviert das Antiterminationsprotein GlpP, welches dann die Ausbildung von Terminatorstrukturen in der mRNA des *glp*-Regulons verhindert (Holmberg *et al.*, 1999).

### 2.3.5.5. Beispiele für Protein-abhängige Antitermination in anderen Bakterien

Auch in Gram-negativen Bakterien werden verschiedene Operons durch Protein-abhängige Antitermination reguliert. Dazu gehören das *nas*-Regulon in *Klebsiella pneumoniae* und das *ami*-Operon in *Pseudomonas aeruginosa*.

In *K. pneumoniae* wird das Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle durch Antitermination reguliert. Die regulierten Gene kodieren für das Nitrat-Transport-System (Lin *et al.*, 1993). In der Anwesenheit von Nitrat bindet das Antiterminationsprotein NasR an die mRNA und ermöglicht die Expression (Goldman *et al.*, 1994; Lin und Stewart, 1996).

Das NasR Protein hat einige Sequenzähnlichkeiten zu dem Antiterminationsprotein AmiR aus *P. aeruginosa*. Auch in diesem Operon, welches für die Proteine für die Verwertung von aliphatischen Amiden kodiert, wird die Expression durch Antitermination gesteuert. AmiR bindet den 5'-untranslatierten Bereich der mRNA und verhindert die Ausbildung einer Terminatorstruktur (Wilson *et al.*, 1996). In diesem Mechanismus spielt ein weiteres Protein eine wichtige Rolle. AmiC ist ein Repressor der Expression. Die Repression erreicht AmiC durch sterische Hinderung der AmiR-Bindung (Norman *et al.*, 2000).

### 2.3.5.6. Antitermination bei der Aufnahme von PTS-Zuckern

Ein inzwischen sehr gut untersuchter Mechanismus der Antitermination wurde in *E. coli* bei der Aufnahme von  $\beta$ -Glukosiden entdeckt (Amster-Choder, 2005). Hier bindet das Antiterminationsprotein BglG in Anwesenheit dieser Zucker die mRNA der entsprechenden Permease und ermöglicht so die Antitermination. Es wurden daraufhin weitere Mitglieder dieser als BglG-Familie bezeichneten Antiterminationsproteine in *B. subtilis* gefunden. Auf die Regulation durch diese Proteine wird in Kapitel 2.9. eingegangen.

## 2.4. Bedeutung der Spezifität in der Regulation

Alle Regulationsmechanismen sind darauf angewiesen, dass die Interaktionen absolut spezifisch sind. Nur so kann garantiert werden, dass die Regulation auch den gewünschten Effekt zeigt und der Organismus keine unnötige Energie für die Produktion von Proteinen

verschwendet, die nicht benötigt werden. Gehören mehrere Regulatoren in einem Organismus einer Familie an, muss außerdem sichergestellt werden, dass es zu keinem Cross-Talk kommt.

Durch Genduplikationen oder horizontalen Gentransfer entstehen oft Gene, die für Proteine kodieren, die die gleiche Funktion haben. Diese entwickeln sich dann im Laufe der Zeit weiter und können neue Funktionen erwerben.

Ein Beispiel für eine Genduplikation oder für horizontalen Gentransfer sind die Methioninsynthase-Gene in *Bacillus clausii*. Hier hat sich im Laufe der Zeit allerdings nicht nur die Funktionsweise der Proteine geändert sondern auch die Regulation der Expression durch RNA-Schalter (Sudarsan *et al.*, 2006). Die Expression der Methioninsynthase MetH wird, wie praktisch alle Gene der Methioninsynthase, durch einen SAM-abhängigen RNA-Schalter kontrolliert (Siehe Kapitel 2.3.1.2.). Die Expression der zweiten Methioninsynthase MetE wird dagegen durch zwei RNA-Schalter kontrolliert. Bei einem handelt es sich um den gentyptischen SAM-abhängigen Schalter. Zwischen diesem und dem Gen liegt aber noch ein RNA-Schalter, der durch Koenzym B<sub>12</sub> reguliert wird. Liegt also SAM im Medium vor, werden beide Synthesen nicht produziert, weil sie nicht benötigt werden. Ist es für die Zelle aber notwendig, Methionin oder SAM zu synthetisieren, kommt es zur Expression von MetH und MetE. Ist zusätzlich Koenzym B<sub>12</sub> im Medium vorhanden, wird die Expression von MetE verhindert. Der Grund dafür liegt in der höheren enzymatischen Aktivität von MetH. MetH benötigt für die Reaktion allerdings Koenzym B<sub>12</sub> als Kofaktor. Wenn kein SAM aber Koenzym B<sub>12</sub> in der Zelle sind, ist MetH besser geeignet, um Methionin und SAM zu synthetisieren. MetE wird dann nicht benötigt.

Bei der Aufnahme von Zuckern durch das PTS wird das Phosphat vom Phosphoenolpyruvat durch das Enzym I auf HPr übertragen. HPr phosphoryliert dann die zuckerspezifischen Permeasen, die als Enzym II bezeichnet werden (PTS: Kapitel 2.5.). Obwohl HPr Proteine aus verschiedenen Organismen fast identische Strukturen zeigen, können *E. coli* Mutanten, die über Enzym I und HPr aus *B. subtilis* verfügen, gar nicht oder nur sehr schlecht auf PTS-Zuckern wachsen (Reichenbach *et al.*, 2007). Durch eine Mutagenese des HPrs konnten Allele erstellt werden, die die Enzym II A Domänen phosphorylieren können und so ein normales Wachstum ermöglichen. Die Mutationen stellen intermolekulare Interaktionen wieder her, die vom Wildtyp *E. coli* HPr gebildet werden. Alle diese Positionen sind im Bereich der Gram-negativen Bakterien konserviert und stellen möglicherweise das Motiv dar, welches HPr aus Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien unterscheidet.

Das Problem der Aufrechterhaltung der Spezifität wird besonders an dem Beispiel der Zwei-Komponenten-Systeme deutlich. Bakterien verfügen oftmals über eine hohe Anzahl paraloger Systeme. Es muss sichergestellt werden, dass das richtige Signal aus der Umwelt von der richtigen Sensor kinase auf den richtigen Response-Regulator weitergeleitet wird, damit die Reaktion der Zelle korrekt stattfinden kann. In den meisten Fällen wird die Spezifität auf der Ebene der molekularen Erkennung (Newman und Keating, 2003; Skerker *et al.*, 2005; Stiffler *et al.*, 2007; Zarrinpar *et al.*, 2003) oder durch Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufrecht erhalten. Es ist allerdings auch möglich, durch gezielte Mutationen eine Histidinkinase so zu verändern, dass sie fremde Responseregulatoren phosphorylieren (Skerker *et al.*, 2008).

Eine globalere Analyse der Spezifitäten von Regulatoren kann durch die Bioinformatik stattfinden. Lozada-Chávez *et al.* untersuchten die Evolution der Spezifität von DNA-bindenden Proteinen (Lozada-Chávez *et al.*, 2008). Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Spezifität der Proteine und ihrer Rolle in der Zelle festgestellt werden. Globale Regulatoren haben ein geringeres Maß an Spezifität, da sie an der Regulation von vielen Genen beteiligt sind. Lokale Regulatoren hingegen binden nur wenige Promotorbereiche und sind daher wesentlich spezifischer. Dies trifft zum Beispiel auf die Regulation durch FNR zu. FNR ist in *E. coli* ein globaler Regulator mit einer geringeren Spezifität. In *B. subtilis* hingegen besitzt FNR eine hohe Spezifität und reguliert nur wenige Gene. Die Spezifität hängt außerdem von der Relevanz der Regulation ab.

Wie leicht die Spezifität von Regulatoren geändert werden kann, konnte an vielen Beispielen gezeigt werden. Die RNA-Schalter für Guanin und Adenin können durch wenige Mutationen ineinander überführt werden (Gilbert *et al.*, 2007). Das TRAP-Protein aus *B. subtilis* wird durch die Mutation einer Aminosäure unabhängig von Tryptophan und bindet immer die Ziel-RNA (Payal und Gollnick, 2006). Die Roh-GTPasen RhoA und RhoD aus *Clostridium difficile* werden durch den Austausch einer Aminosäure als Substrat von anderen Cytotoxinen erkannt (Jank *et al.*, 2006).

Alle diese Beispiele zeigen, dass die Aufrechterhaltung der Spezifitäten von Regulatoren oder Enzymen absolut notwendig ist, um das Überleben zu sichern.

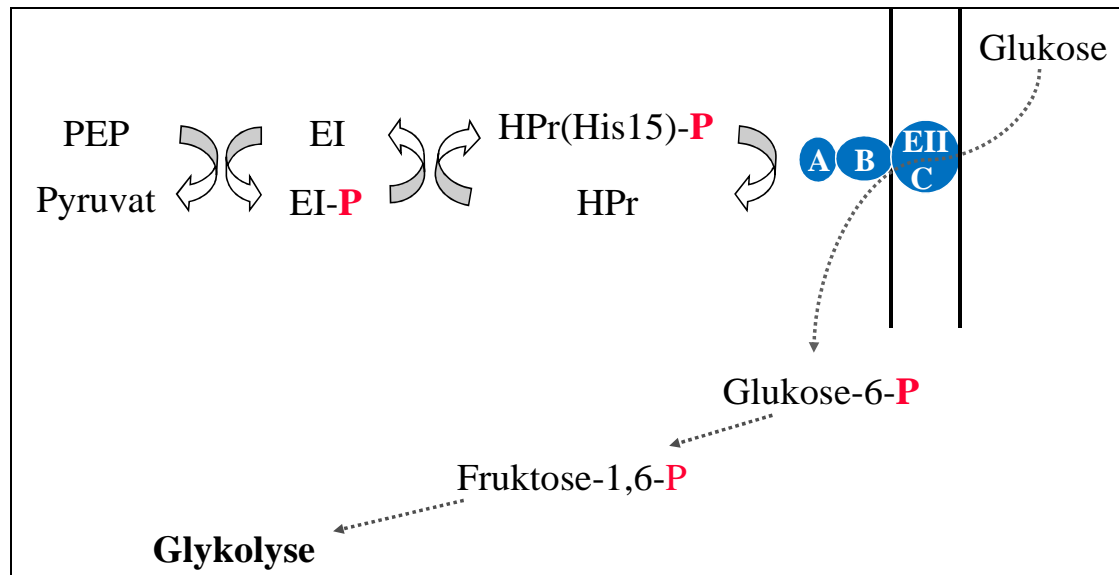
## 2.5. Zuckerabhängige-Antitermination in *B. subtilis*

Die Aufnahme von Zucker muss ebenfalls strikt reguliert werden. Die Expression von Enzymen für die Aufnahme von Zuckern, die nicht vorhanden sind, muss unterbunden werden. Dies trifft ebenfalls zu, wenn andere Zucker vorhanden sind, die auf Grund ihrer Eigenschaften mehr Energie liefern und deshalb zuerst abgebaut werden sollten. In *B. subtilis* erfolgt die Regulation der Aufnahme von machen Zuckern zusätzlich zur globalen Kohlenstoff-Kataboliten-Repression durch Protein-abhängigen RNA-Schalter.

### 2.5.1. Das Phosphotransferase-System

Die Aufnahme von Zuckern über das Phosphotransferase-System wurde zunächst in *E. coli* beschrieben (Kundig *et al.*, 1964). Es wurde gezeigt, dass zum Beispiel Glukose, Mannose und N-Acetylglukosamin über ein solches System aufgenommen werden. Für die Aufnahme der Zucker wird die Energie von Phosphoenolpyruvat benutzt, um die Zucker über eine Permease in die Zelle zu transportieren und gleichzeitig zu phosphorylieren (Deutscher *et al.*, 2006). Der Aufbau des PTS ist praktisch in allen Bakterien identisch. Es besteht aus drei Komponenten. Die zwei cytoplasmatischen Komponenten Enzym I und HPr werden für alle PTS-abhängigen Zucker benötigt. Dahingegen gibt es für jeden Zucker eine spezifische membranständige Permease, das sogenannten Enzym II. Das Enzym II besteht aus drei Domänen, A, B und C (Postma *et al.*, 1993). Der Ablauf der Phosphorylierungskaskade des PTS in *B. subtilis* ist in Abb. 2.2. schematisch für Glukose dargestellt.





**Abb. 2.2.: Schematische Darstellung der Phosphorylierungskaskade des PTS**

Das in der Glykolyse generierte PEP gibt sein Phosphat an das Enzym I weiter. Dieses phosphoryliert anschließend HPr am Histidin 15. Dieses gibt das Phosphat an die Enzym II Untereinheit A weiter. Die Domänen EIIB phosphoryliert dann die Glukose, welche durch das Enzym IIC aufgenommen wird. Die phosphorylierte Glukose kann dann in der Glykolyse weiter verwendet werden, um Energie herzustellen.

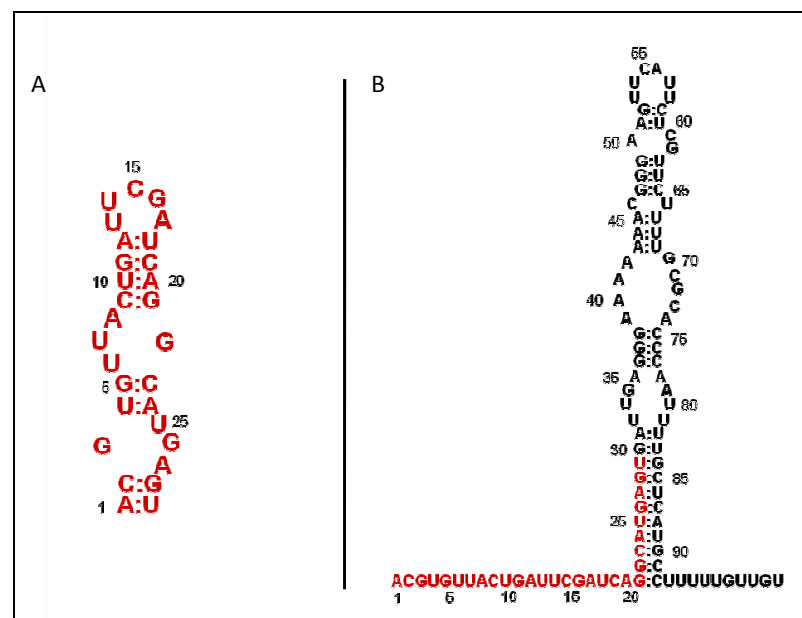
### 2.5.2. Antitermination durch Protein-RNA-Interaktion

Die Komponenten des PTS können aber auch noch andere Zielproteine phosphorylieren. Zu einer solchen Phosphorylierung kommt es bei der Regulation der Expression der zuckerspezifischen Enzym II-Komplexe. Eine dieser Phosphorylierungen führt zu Antitermination. Hierbei kommt es zu einer Interaktion zwischen einem regulatorischen Protein und der mRNA der Permeasen. Diese regulatorischen Proteine werden als Antiterminationsproteine bezeichnet. Als erstes wurde dieser Mechanismus in *E. coli* für *bglG* beschrieben (Amster-Choder *et al.*, 1989; Amster-Choder und Wright, 1992; Mahadevan und Wright 1987). Hier ist die Aufnahme von  $\beta$ -Glukosiden über Antitermination reguliert. Das entsprechende Antiterminationsprotein heißt BglG und bindet die 5'-untranslatierte mRNA des *bglP*-Operons. BglG kann durch die entsprechenden Permeasen phosphoryliert werden (Amster-Choder *et al.*, 1989). Dadurch wird das Protein inaktiviert. Diese Phosphorylierung ist abhängig vom Phosphorylierungszustand der Permease. Liegen  $\beta$ -Glukoside im Medium vor, wird das Phosphat auf den Zucker übertragen. Sind keine  $\beta$ -Glukoside vorhanden, ist das Enzym II phosphoryliert und überträgt das Phosphat auf das Antiterminationsprotein BglG. Das inaktivierte BglG kann nicht mehr die Antitermination

herbeiführen und das Transkript der Permease entsteht nicht mehr. Da BglG das erste Protein dieser Art war, spricht man von der BglG-Familie von Antiterminationsproteinen. In *B. subtilis* gibt es vier solcher Proteine. Diese sind verantwortlich für die Aufnahme von Glukose (GlcT), Saccharose (SacT und SacY) und  $\beta$ -Glukosiden (LicT).

### 2.5.3. GlcT: Antitermination am *ptsGHI*-Operon

Der genaue Mechanismus der Antitermination soll am Beispiel der Glukoseaufnahme in *B. subtilis* gezeigt werden. Das Antiterminationsprotein GlcT bindet hier die 5'-untranslatierte Region der *ptsG* mRNA (Stülke *et al.*, 1997). Diese RNA kann zwei Strukturen annehmen (Abb. 2.3. A/B) (Schilling *et al.*, 2004; Langbein *et al.*, 1999).



**Abb. 2.3.:** Die RAT-Struktur und der Terminator der *ptsG*-mRNA

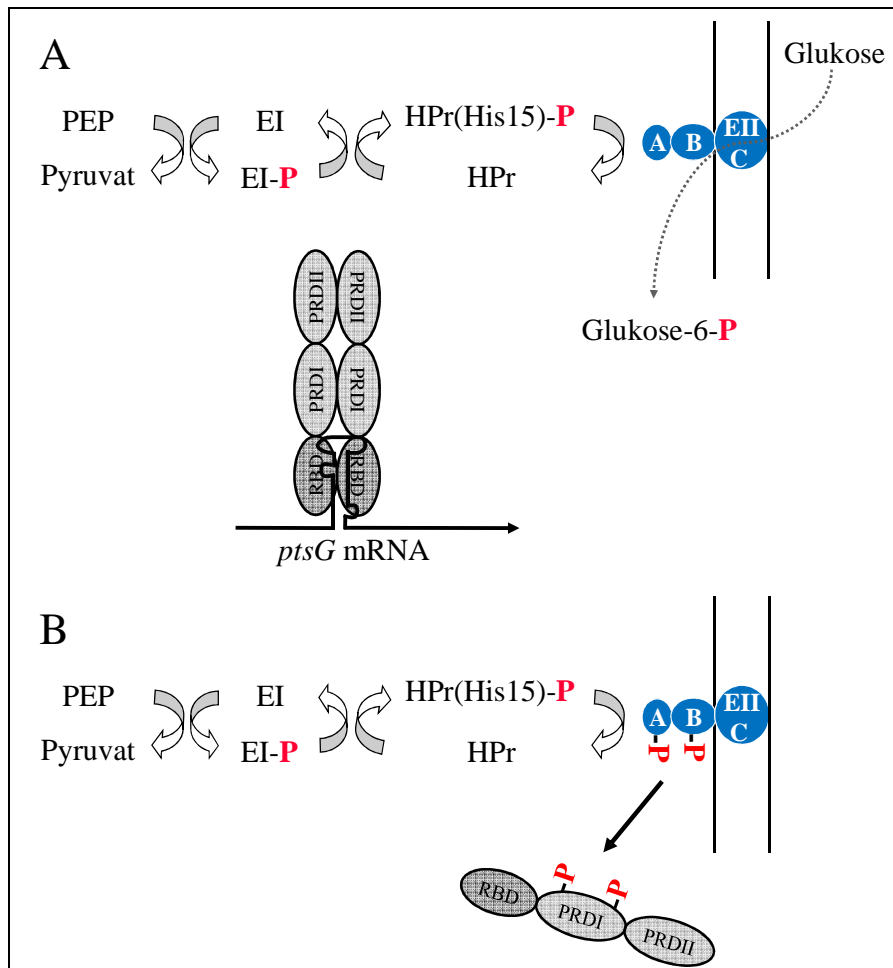
A: Die RAT-Struktur im 5'-untranslatierten Bereich der *ptsG*-mRNA.

B: Die Terminatorstruktur im 5'-untranslatierten Bereich der *ptsG*-mRNA. Rot markierte Basen sind sowohl an der Bildung der Terminatorstruktur sowie der RAT-Struktur beteiligt.

Die Terminatorstruktur verfügt über einen ausgeprägten Stammbereich und umfasst insgesamt 71 Basen. Die RAT-Struktur ist im Gegensatz dazu relativ klein und besteht aus nur 29 Basen. Die letzten 9 Basen der RAT-Struktur überlappen mit dem unteren Stammbereich des Terminators. Die beiden Strukturen schließen sich also gegenseitig aus. Es kann nur eine der Strukturen zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildet werden. Da die

Terminatorstruktur thermodynamisch bevorzugt ist, wird diese im Normalfall gebildet. Die RAT-Struktur braucht die Unterstützung durch GlcT, damit sie sich durchsetzen kann.

Wie im Falle von BglG in *E. coli* ist die Bindung von GlcT an die RNA abhängig vom Phosphorylierungszustand (Schmalisch *et al.*, 2003). Ist keine Glukose vorhanden, wird GlcT durch die Enzym IIB-Untereinheit von PtsG phosphoryliert und so inaktiviert. Es findet keine Antitermination statt und es kann kein neues PtsG gebildet werden. Die Domäne, an der diese Phosphorylierung stattfindet, wird als Phosphotransferase-System-Regulations-Domäne (PRD). Allerdings verfügt GlcT, wie auch die anderen Antiterminationsproteine in *B. subtilis*, über zwei solcher Domänen. Diese werden durch unterschiedliche Proteine phosphoryliert und die Phosphorylierungen haben gegensätzliche Auswirkungen. Die Phosphorylierung durch das Enzym IIB erfolgt an der sogenannten PRDI. Die PRDII kann durch HPr(His15)-P phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung an der PRDII scheint aber in GlcT verkümmert zu sein, da sie nur einen geringen aktivierenden Einfluß hat. Beide Phosphorylierungen scheinen Einfluß auf die Dimerisierung zu haben. Neben den beiden PRDs gibt es noch eine dritte konservierte Domäne, die N-terminale RNA bindende Domäne. Es wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt, dass die RBD auch ohne die regulatorischen PRDs aktiv ist. Die RBD ist alleine in der Lage, für Antitermination zu sorgen (Bachem *et al.*, 1998). Das heißt, dass sie Dimere bilden kann, wenn die Konzentration ausreichend hoch ist. Auch die PRDs können Dimere bilden, wenn sie ohne die RBD *in vitro* aufgereinigt werden. Ein Modell zur Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung von GlcT ist in Abb. 2.3. dargestellt.



**Abb. 2.3.: Modell der GlcT Aktivität**

A: Wenn Glukose im Medium vorhanden ist, wird das Phosphat von HPr durch Enzym II direkt auf diese übertragen. Bei diesen Bedingungen wird GlcT nicht phosphoryliert und ist aktiv. GlcT bindet die *ptsG*-RAT-Struktur. Die Transkription wird ermöglicht.

B: Wenn keine Glukose vorhanden ist, phosphoryliert das Enzym IIB die PRDI von GlcT. Die Dimerisierung wird verhindert und es kann keine Antitermination stattfinden. Dieses Modell wurde auch für BglG aus *E. coli* vorgeschlagen. (Nach Schmalisch *et al.*, 2003)

### 2.5.4. SacT, SacY und LicT: Die anderen Mitglieder der BglG-Familie in *B. subtilis*

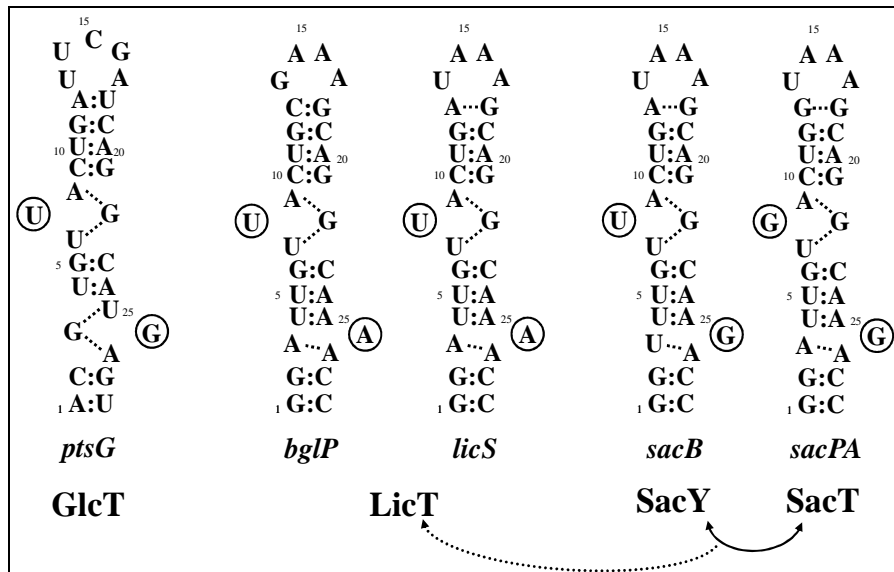
Neben GlcT gibt es, wie bereits erwähnt, drei andere PTS Aufnahme Systeme, die durch Antitermination reguliert werden. Alle Antiterminationsproteine haben den gleichen Domänenaufbau wie GlcT. N-terminal liegt die RNA-bindende Domäne. Danach folgen die PRDI und PRDII (Görke und Stülke, 2008). Die negative Regulation über die Phosphorylierung der PRDI ist bei allen Antiterminationsproteinen gleich. Die zuckerspezifische Permease phosphoryliert die PRDI, wenn der entsprechende Zucker nicht vorhanden ist. Das Antiterminationsprotein SacT reguliert die Expression des *sacPA*-

Operons. SacP kodiert für eine Saccharose-Permease. Diese Permease phosphoryliert SacT an der PRDI, wenn keine Saccharose vorhanden ist (Arnaud *et al.*, 1996, Arnaud *et al.*, 1992). Mit SacY existiert ein zweites Antiterminationssystem, welches die Aufnahme von Saccharose reguliert. Dieses reagiert allerdings erst, wenn der Zucker in einer hohen Menge in der Umgebung vorliegt. SacY kontrolliert das *sacXY*-Operon und *sacB*. Bei SacX handelt es sich um die Permease, die SacY negativ phosphoryliert (Arnaud *et al.*, 1996). Die Aufnahme von  $\beta$ -Glukosiden wird durch LicT kontrolliert (Lindner *et al.*, 1999, Le Coq *et al.*, 1995). Dieses Antiterminationsprotein bindet die mRNA der Gene *bglPH* und *licS*. Die PRDI von LicT wird durch die Permease BglP phosphoryliert. Im Gegensatz zu GlcT benötigen SacT und LicT eine Phosphorylierung an der PRDII, um aktiv zu werden. Die PRDII wird durch HPr(His15)-P phosphoryliert und diese wirkt sich vermutlich positiv auf die Dimerisierung der Proteine aus. Der Sinn dieser Phosphorylierung liegt darin, die Aktivierung von LicT und SacT zu verhindern, wenn bessere Kohlenstoffquellen im Medium vorliegen. Ist Glukose zusammen mit Saccharose oder  $\beta$ -Glukosiden im Medium vorhanden, soll zunächst die beste C-Quelle verwertet werden. Da unter diesen Bedingungen der HPr(His15)-P die Phosphatgruppe hauptsächlich auf die Glukosepermease PtsG überträgt, können SacT und LicT keine aktivierende Phosphorylierung erfahren. Somit kann es nicht zu Antitermination an der mRNA der entsprechenden Permeasen kommen. SacY benötigt diese Phosphorylierung genau wie GlcT nicht, um aktiv zu sein (Schmalisch *et al.*, 2003; Bachem und Stülke, 1998; Tortosa *et al.*, 1997).

Nicht nur in der Regulation sind sich die Antiterminationsproteine sehr ähnlich. Sie besitzen zusätzlich zur gleichen Domänenstruktur, eine sehr ähnliche Sequenz Débarbouillé *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 2002; Görke und Stülke 2008). Auch die RAT-Strukturen dieser Systeme sehen sich sehr ähnlich (Abb. 2.4.) (Yang *et al.*, 2002). Die RAT-Strukturen der Aufnahmesysteme für Saccharose ähneln sich sogar so sehr, dass SacT und SacY die Ziele des jeweils anderen Proteins binden können. Auch die Bindung von SacT und SacY an die RAT-Strukturen von *bglP* und *licS* wurden bereits bewiesen (Aymerich und Steinmetz 1992). LicT hingegen kann nicht an die Saccharose abhängigen RAT-Strukturen binden.

Während sich die RAT-Strukturen von *bglP*, *licS*, *sacB* und *sacP* sehr ähneln, unterscheidet sich die RAT-Struktur von *ptsG* deutlich von diesen. Im unteren Stamm befindet sich je ein A:U und ein G:C Basenpaar. Die anderen RATs haben dort zwei stabile G:C Paarungen. Der größte Unterschied ist allerdings im unteren Loop zu finden. Dort paaren in der *ptsG*-Struktur drei Basen miteinander. Der darauf folgende Stamm besteht aus zwei

Basenpaaren. Bei den anderen Strukturen gibt es dort je nur eine A:A (U:A bei *sacB*) Paarung. Dafür besteht der Stamm aus drei Basenpaaren. Der obere Loop sowie der Toploop inklusive oberer Stamm ist in der *ptsG*-RAT-Struktur nicht stark verschieden zu den anderen RATs. Durch diese teilweise drastischen Unterschiede in der RAT-Struktur ist zu erklären, dass kein anderes Antiterminationsprotein an die *ptsG* mRNA binden kann und das GlcT die anderen RAT-Strukturen nicht erkennt (Schilling *et al.*, 2004).



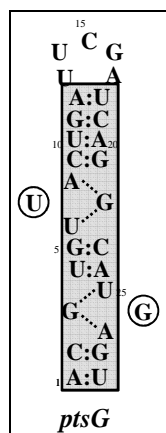
**Abb. 2.4.:** Die RAT-Strukturen der Antiterminationssysteme aus *B. subtilis*

Die RAT-Strukturen der mRNA der jeweiligen Permasen sind gezeigt. Darunter sind die entsprechenden Antiterminationsproteine aufgeführt. Die Pfeile zeigen mögliche Crosstalk-Reaktionen an.

### 2.5.5. Interaktionen von GlcT und der *ptsG*-RAT-Struktur

Die Interaktion zwischen GlcT und dem Ziel, der *ptsG* RAT-Struktur, wurden intensiv untersucht (Schilling *et al.*, 2004). Dies geschah durch Mutationen in der RAT-Struktur. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die die Terminatorstruktur zerstören, zu konstitutiver Antitermination führen. In der RAT-Struktur sind die Stämme und vor allen Dingen die beiden unteren Loopbereich entscheidend für die Erkennung durch das Antiterminationsprotein. Die beiden herausstehenden Basen U7 und G26 scheinen keinen großen Einfluss auf die Erkennung durch GlcT zu haben. Die Aktivität wird etwas gesteigert, wenn an diesen beiden Positionen ein Uracil vorhanden ist. Die Untersuchungen zeigten, dass Mutationen im Stamm Antitermination verhindern, wenn dadurch die Basenpaarungen zerstört werden. Dies konnte ebenfalls für die *sacB*-RAT-Struktur gezeigt werden. Stellt man

durch kompensatorische Mutationen die Basenpaarung wieder her, kann GlcT wieder binden. Dadurch entstand das Modell, dass eher die Struktur als die Sequenz für die Erkennung durch GlcT wichtig ist. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass sehr leicht Mutanten erstellt werden konnten, die nicht mehr durch GlcT gebunden werden können. Die Insertion einer Base an Position 4 führt dazu, dass die untere Loop denen von z.B. *licS* und *sacP* ähnelt. In dieser mutierten *ptsG-lacZ*-Fusion wird die RAT-Struktur tatsächlich nicht mehr von GlcT, sondern von LicT gebunden und dies führt zur Antitermination. Ein Modell der für den Kontakt wichtigen Basen der *ptsG* RAT-Struktur ist in Abb. 2.5. gezeigt.

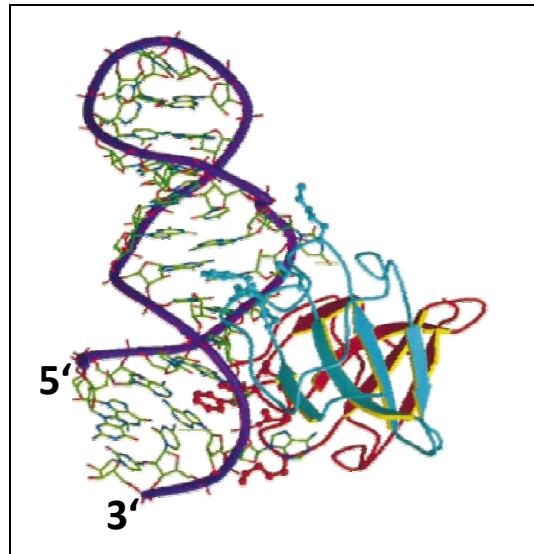


**Abb. 2.5.: Modell für die Interaktion von GlcT mit der *ptsG*-RAT-RNA**

Grau gekennzeichnet wurde der Stamm, der mit Hilfe des Antiterminationsproteins GlcT gebildet wird.

### 2.5.6. Die Struktur der LicT-RBD mit der *bglP*-mRNA

Yang *et al.* lösten die Struktur der LicT-RBD mit der dazugehörigen *bglP*-RAT-Struktur. In Abb. 2.6. ist die 3D Struktur dargestellt. In Lila eingefärbt ist die RNA zu sehen. Aus der Struktur geht eindeutig hervor, dass der Toploop nicht an der Interaktion beteiligt ist. Außerdem konnte gezeigt werden, wo genau die beiden Untereinheiten des RBD-Dimers binden. Auch die Aminosäuren, die für den RNA-Kontakt verantwortlich sind, konnten identifiziert werden. Bei den Aminosäuren handelt es sich hauptsächlich um die Aminosäuren 5 bis 10. Der Kontakt wird ebenfalls über die Aminosäuren 26, 27, 31 und 32 hergestellt. Vergleicht man diese Bereiche von LicT mit denen der anderen Antiterminationsproteine aus *B. subtilis*, stellt man fest, dass es hier praktische keine Unterschiede in der Sequenz gibt.



**Abb. 2.6.:** NMR-Struktur der LicT RBD mit der *blgP*-RAT-Struktur

Gezeigt ist das Dimer der LicT-RBD (Blau und Rot) gebunden an die RAT-Struktur (Lila) (Yang *et al.*, 2002)



## 2.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, die Interaktionen des Antiterminationsproteins GlcT näher zu charakterisieren.

Mit Hilfe der Kristallographie sollte die Struktur der GlcT-RBD gelöst werden, wenn diese an die *ptsG*-RAT-Struktur gebunden ist. Mit Hilfe dieser Ergebnisse sollte geklärt werden, warum das Paar GlcT/*ptsG* isoliert von den anderen Systemen vorliegt und es zu absolut keinen Crosstalk kommen kann.

Durch NMR-Analysen sollte geklärt werden, wie die PRDs von GlcT mit ihren Phosphodonoren interagieren. Es sollte untersucht werden, warum die PRDI spezifisch von EIIB<sup>Glc</sup> und die PRDII von HPr phosphoryliert wird. Dazu musste das komplette PTS *in vitro* rekonstruiert werden.

Nachdem die Interaktion der Antiterminationsproteine auf Ebene der RNA bereits detailliert untersucht wurde, sollte nun die RNA-bindende Domäne genauer charakterisiert werden. Hierzu sollten Mutanten von RBDs erstellt werden, die andere RAT-Strukturen als ihre eigenen binden können. So sollte geklärt werden, welche Aminosäuren entscheidend für die Spezifität der verschiedenen RBDs sind.

### 3. Material und Methoden

**Materialien:** Chemikalien, Hilfsmittel, Geräte, Apparaturen, kommerziell erhältliche Systeme sowie Proteine, Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide (Tab. 7.1.) sind im Anhang aufgeführt.

#### 3.1. Bakterienstämme und Plasmide

##### 3.1.1. Plasmide

Plasmide sind im Anhang in den Tab. 7.1. und 7.2. aufgeführt.

##### 3.1.2. Bakterienstämme

Bakterienstämme sind im Anhang in den Tab. 7.3. aufgeführt.

#### 3.2. Medien

Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deion. Wasser 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.

##### Bakterienmedien und fakultative Zusätze

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>LB-Medium</b> (1l)   | 10 g Trypton  |
|                         | 5 g Hefeextrakt   |
|                         | 10 g NaCl   |
| <b>5 x C-Salze</b> (1l) | 20 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             |
|                         | 80 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ |
|                         | 16,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                       |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>III'-Salze (1l)</b>     | 0,232 g $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$<br>12,3 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   |
| <b>1x CSE-Medium</b>       | 100 ml 1 x C-Salze<br>1 ml Tryptophan ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ )<br>1 ml Ammoniumeisencitrat ( $2,2 \text{ mg ml}^{-1}$ )<br>1 ml III'-Salze<br>2 ml Kaliumglutamat (40%)<br>2 ml Natriumsuccinat (30%)   |
| <b>SP-Medium (1l)</b>      | 8 g Nutrient Broth<br>0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$<br>1 g KCl<br>ad. 1000 ml deion. Wasser<br>anschließende Zugabe von:<br>1 ml $\text{CaCl}_2$ (0,5 M)<br>1 ml $\text{MnCl}_2$ (10 mM)<br>2 ml Ammoniumeisencitrat ( $2,2 \text{ mg ml}^{-1}$ )                          |
| <b>MNGE (10 ml)</b>        | 9,2 ml 1x MN-Medium<br>1 ml Glukose (20%)<br>50 $\mu\text{l}$ Kaliumglutamat (40%)<br>50 $\mu\text{l}$ Ammoniumeisencitrat ( $2,2 \text{ mg ml}^{-1}$ )<br>100 $\mu\text{l}$ Tryptophan ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ )<br>30 $\mu\text{l}$ $\text{MgSO}_4$ (1 M)<br>+/- 100 $\mu\text{l}$ CAA (10%) |
| <b>10 x MN-Medium (1l)</b> | 136 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$<br>60 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>10 g Natriumcitrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>Stärkeplatten</b>  | 7,5 g Nutrient-Broth<br>5 g Stärke   |
| <b>M9 (20x)</b>       | 140 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$<br>60 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>20 g $\text{NH}_4\text{Cl}$  |
| <b>M9-Medium (1l)</b> | 50 ml M9 (20X)<br>1 ml $\text{MgSO}_4$<br>1 ml $\text{CaCl}_2$<br>0,5 ml $\text{FeCl}_3$<br>1% Kohlenstoffquelle<br>1 ml Thiamindichlorid (1 mg/ml)<br>1 ml Spurenelemente |
| <b>Spurenelemente</b> | Je 1 mM $\text{CuSO}_4$ , $\text{ZnSO}_4$ , $\text{MnSO}_4$ , $\text{CoSO}_4$ , $\text{NiSO}_4$ , $\text{Na}_2\text{Mo}_4$   |

### M9-Medium

**X-Gal** Stammlösung: 40 mg/ml X-Gal in DMF  
Endkonzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  in Medien

### Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Ampicillin, Spectinomycin, Lincomycin und Kanamycin wurden dazu in deion. Wasser gelöst, Chloramphenicol und Erythromycin in 70% Ethanol. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca.  $50^\circ\text{C}$  wurden die Antibiotika zu den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben.

#### Selektionskonzentration für *E. coli*:

Ampicillin 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$

#### Selektionskonzentration für *B. subtilis*:

|                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
| Kanamycin                 | 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$   |
| Chloramphenicol           | 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$   |
| Erythromycin <sup>1</sup> | 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$   |
| Lincomycin <sup>1</sup>   | 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$  |
| Spectinomycin             | 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ |

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

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Allgemeine Methoden

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

**Tab. 3.1.: 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   |

#### 3.3.2. Anzucht von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium oder M9-Medium bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> in Reagenzgläsern oder Schikanekolben angezogen. Für die Anzucht von *B. subtilis* wurde LB-Medium, CSE-Medium, MNGE-Medium oder MSgg-Medium verwendet. Die Zellen wuchsen bei 37°C in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Beimpft wurde von

frischen Vereinzlungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm 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:

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

|                |                                   |  |
|----------------|-----------------------------------|--|
| g              | Generationszeit(min)              |  |
| t <sub>1</sub> | Zeitpunkt 1 (min)                 | t <sub>2</sub> Zeitpunkt 2 (min)                 |
| K <sub>1</sub> | OD <sub>600</sub> zum Zeitpunkt 1 | K <sub>2</sub> OD <sub>600</sub> zum Zeitpunkt 2 |

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

#### Präparation kompetenter Zellen

Eine 3 ml Vorkultur wurde mit dem zu transformierenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine 1 zu 1000 Verdünnung der Vorkultur in 25 ml LB angelegt und die Verdünnung bei 37°C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 wachsen gelassen. Von der Kultur wurden 20 ml 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 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurden die Bakterien vorsichtig in 10 ml vorgekühltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte. Das Pellet wurde in 0,5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

#### 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 700 µl LB-Medium wurden

die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 200 µl und der abzentrifugierte Rest auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin bzw. Kanamycin) ausplattiert.

### 3.3.4. Transformation von *B. subtilis*

#### Herstellung von kompetenten Zellen

In 10 ml MNGE-Medium (mit CAA) wurde mit einer Übernachtskultur eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD<sub>600</sub> verfolgt. Bei einer OD<sub>600</sub> 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 U min<sup>-1</sup> 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.

#### 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% Glukose

34 µl 1 M MgSO<sub>4</sub>

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 deion. Wasser, 50 µl Tryptophan (5 mg/ml)), zupipettiert und für weitere 60 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.3.5. Präparation und Nachweis von DNA

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

Die Plasmidisolation 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.

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

Die Isolation der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (50; Qiagen). Hierzu wurden 1,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen Übernachtskultur 1 min bei  $13000 \text{ U min}^{-1}$  abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in  $180 \mu\text{l}$  Lyse-Puffer resuspendiert und 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolation der chromosomalen DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

#### 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 ( $60^\circ\text{C}$ ) durch Abkühlen auf RT verfestigt, die Proben mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100-120 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  $\lambda$ -DNA-Marker verwendet. Bei 365 nm konnten DNA-Banden aus präparativen Gelen ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die Elution der DNA erfolgte mit dem Nucleospin Extract 2 in 1 nach Anleitung des Herstellers.



## **Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierungen wurden im Göttinger Genomics Laboratory und von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt.

## **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 Überschuss an Fragment eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur.

## **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/μl wurden 1 μl CIAP (1000 Units/μl) zugesetzt. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach erneut 1 μl CIAP zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden.

## **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

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

### Reaktionsansatz für die *Accuzyme*-Polymerase (100 μl):

2 μl Primer 1 (20 pmol)

2 μl Primer 2 (20 pmol)

4 μl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)

10  $\mu\text{l}$  10 x *Accu*-Polymerase Puffer  
2  $\mu\text{l}$  *Accuzyme*-Polymerase (2,5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )  
2  $\mu\text{l}$  dNTPs (12,5  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )  
78  $\mu\text{l}$  deion. Wasser

Reaktionsansatz für die *Phusion*-Polymerase (100  $\mu\text{l}$ ):

2  $\mu\text{l}$  Primer 1 (20 pmol)  
2  $\mu\text{l}$  Primer 2 (20 pmol)  
4  $\mu\text{l}$  Matrizen-DNA (ca. 100 ng)  
10  $\mu\text{l}$  5 x *Phusion* HF Puffer  
1  $\mu\text{l}$  *Phusion*-Polymerase (2 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )  
2  $\mu\text{l}$  dNTPs (12,5  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )  
79  $\mu\text{l}$  deion. Wasser

Reaktionansatz für die *Taq*-Polymerase (100  $\mu\text{l}$ ):

1  $\mu\text{l}$  Primer 1 (100  $\mu\text{M}$ )  
1  $\mu\text{l}$  Primer 2 (100  $\mu\text{M}$ )  
3  $\mu\text{l}$  Matrizen-DNA (ca. 100 ng)  
10  $\mu\text{l}$  10 x *Taq*-Polymerase Puffer  
10  $\mu\text{l}$  10 x  $\text{MgCl}_2$   
1  $\mu\text{l}$  *Taq*-Polymerase (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )  
4  $\mu\text{l}$  dNTPs (12,5  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )  
70  $\mu\text{l}$  deionisiertes Wasser

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

| 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             |

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

### **Combined Chain Reaction (CCR) / Multiple Mutation Reaction (MMR)**

Die Combined Chain Reaction ist eine Methode zur Einführung von einer oder zwei Punktmutationen (Bi und Stambrook, 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.

Reaktionsansatz (50  $\mu$ l):

- 2  $\mu$ l Primer 1 (5  $\mu$ M)
- 2  $\mu$ l Primer 2 (5  $\mu$ M)
- je 3  $\mu$ l 5'-phosphorylierte Mutageneseprimer (3,3  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
- 5  $\mu$ l 10 x MMR-Polymerase Puffer
- 1  $\mu$ l *Pfu*-Polymerase (2,5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup>)
- 3  $\mu$ l Ampligase
- 1  $\mu$ l dNTPs (12,5  $\mu$ mol ml<sup>-1</sup>)
- 2  $\mu$ l BSA (10 mg ml<sup>-1</sup>)
- 30  $\mu$ l deionisiertes Wasser

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

| Anzahl der Zyklen | Reaktion | Temperatur       | Dauer der Reaktion |
|-------------------|----------|------------------|--------------------|
| 1                 | Vorlauf  | 96°C             | 5 Min              |
| 35                | {        | Denaturierung    | 96°C               |
|                   |          | Annealing        | 50-60°C            |
|                   |          | Primer Extension | 65°C               |
| 1                 | Endlauf  | 65°C             | 10 Min             |

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

**Long Flanking Homolgy PCR (LFH-PCR)**

Für die Konstruktion einer *licT*-Deletionsmutante von *B. subtilis* wurde die LFH-PCR angewandt. Zunächst wurde eine Chloramphenicol-Resistenzkassette amplifiziert. Des Weiteren wurden zwei Primerpaare abgeleitet, mit denen die flankierenden Bereiche des zu *licT*-Gens amplifiziert werden konnten. Diese Fragmente mit einer Größe von circa 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 Nukleotide lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Resistenzkassette. Die PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. In einer

zweiten PCR wurden die strangaufwärts und strangabwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 25 Nukleotide lange Sequenz miteinander verbunden und amplifiziert. Die eingesetzte DNA-Menge des oberen und unteren Fragmentes betrug jeweils 150 ng, die der Resistenzkassette etwa 300 ng. Die Amplifikation der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas). Der TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf) wurde für die Verbindung der einzelnen Fragmente verwendet. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR überprüft. Um sicherzustellen, dass bei den beiden PCR-Schritten keine Mutationen eingebaut wurden, wurden die bei den Kontroll-PCRs erhaltenen DNA-Fragmente sequenziert.

### Lösungen für das Arbeiten mit DNA

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

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>10 x TBE</b>      | 108 g Tris  |
| für Gelshift Analyse | 55 g Borsäure                                     |
|                      | 40 ml EDTA (pH 8)                                 |
|                      | ad 900 ml deion. H <sub>2</sub> O → autoklavieren |

|                       |                          |
|-----------------------|--------------------------|
| <b>TBE-Gel (8 % )</b> | 4,09 ml H <sub>2</sub> O |
| für Gelshift Analyse  | 1,2 ml PAA (40%)         |
|                       | 0,6 ml 10 x TBE          |
|                       | 0,1 ml APS (10 %)        |
|                       | 0,01 ml TEMED            |

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <b>Laufpuffer</b>    | 0,5 x TBE |
| für Gelshift Analyse |           |

### 3.3.6. Arbeiten mit Proteinen

#### Zellaufschluß durch Lysozym

Bakterienkulturen wurden für 5 min bei 8500 U min<sup>-1</sup> und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl einer Lösung aus Z-Puffer/LD-Mix (4 ml Z-Puffer + 100 µl LD-Mix) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte für 30 min bei 37°C. Das Gemisch wurde anschließend zum Abtrennen der Zelltrümmer abzentrifugiert (13000 U min<sup>-1</sup>, 30 min, 4 °C).

#### Zellaufschluß mit der French Press

Die vorgekühlte Bombe 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 1400 bar (20000 psi) und wurde dreimal durchgeführt.

### **Zellaufschluß mit der One Shot**

Der Zellaufschluss mit Hilfe der One Shot erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie mit der French Press. Es wurden 6 ml der Bakteriensuspension in den gekühlten Zylinder pipettiert und dieser luftdicht verschlossen und der Druckaufbau mit Hilfe des Starterstabes aufgebaut. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei maximalem Druck (2500 psi; 2 bis 3 Durchgänge).

### **Zellaufschluß mittels Ultraschall**

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurde eine 40 ml der Bakterienkultur für 15 min bei 4000 U min<sup>-1</sup> und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit einer Ultraschallsonde bei 80% 6-mal 15 Intervalle, wobei ein Intervall 0,5 Sekunden betrug. In den Pausen wurden die Proben auf Eis gekühlt. Das Gemisch wurde anschließend zum Abtrennen der Zelltrümmer 3-mal abzentrifugiert (13000 U min<sup>-1</sup>, 10 min, 4°C). Im Anschluss wurde eine Bradford-Messung zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt

### **Überproduktion von Proteinen**

Zur Überexpression von Proteinen wurde 1 Liter LB-Ampicillin-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur von einem Stamm, der das entsprechende Überexpressionsplasmid trug, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 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 mit Ultraschall aufgeschlossen und das Zellpellet sowie der Überstand wurde auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die Kultur wurde 2 bzw. 3 h nach der Induktion geerntet und 10 min bei 5000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde das Gemisch in der Ultrazentrifuge 1h bei 4°C bei 45000 U/min. zentrifugiert.

### **Aufreinigung von Proteinen über Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule**

Zur Aufreinigung der Proteine mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulchen (BIO-RAD) verwendet. Dabei wurde die Säule zunächst mit 4 ml Ni-NTA Superflow (QIAGEN) beladen und dann mit 20 ml ZAP äquilibriert. Das Proteinrohlysat wurde über die Matrix gegeben. Mit steigender Imidazolkonzentration im

Puffer (10 mM, 20 mM, (je 20 ml); 50 mM, 80 mM 100 mM 120 mM und 250 mM (je 8 ml) Imidazol) wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen und danach das *His*-tag-tragende Protein eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden auf einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die aufgereinigtes Protein enthielten, wurden über Nacht dialysiert und anschließend mittels Bradford-Reagenz auf ihre Proteinkonzentration getestet (Bradford *et al.*, 1976).

### **Aufreinigung über Strep-Tactin-Sepharose® Säule**

Die Überexpression und der Zellaufschluss mittels French Press bzw- One Shot wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Aufreinigung des Proteins wurde eine *Strep*-Tactin Sepharose® Säule (IBA) mit einem Matrixvolumen von 1ml verwendet. Diese Matrix bindet spezifisch eine Sequenz von acht Aminosäuren (WSHPQFEK). Die Bindung kann durch eine Verdrängungsreaktion mit D-Desthiobiotin wieder aufgehoben werden. Dadurch können Proteine, die mit dieser Aminosäuresequenz versehen sind, aus einem Proteingemisch getrennt werden. Zuerst wurde die Säule mit 5 ml Puffer W äquilibriert. Dann konnte die Säule mit 10 ml Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 4 mal 1,5 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 3 ml Puffer E in Fraktionen von je 500 µl eluiert werden. Zur Regeneration der Säulenmatrix wurde dreimal 5 ml Puffer R und zweimal mit 4 ml Puffer W auf die Säule gegeben. Die, bei der Elution erhaltenen Fraktionen, wurden wie oben beschrieben überprüft.

### **Dialyse von Proteinen**

Bei der Aufreinigung eines Proteins über eine N-terminale Hexahistidin-Sequenz oder *Strep*-tag-Sequenz ist zum Ablösen des an die Säule gebundenen Proteins Imidazol bzw. Desthiobiotin notwendig, welches weitere Versuche mit dem aufgereinigten Protein negativ beeinflussen kann. Um das Imidazol bzw. das Desthiobiotin aus der Proteinpräparation zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 12-14 kDa) gegen 1 x ZAP dialysiert. Das Volumen des Dialysepuffers betrug das 1000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung.





---

|   |  |
|---|--|
|   | 1 mM DTT   |
| <b>Entfärbelösung</b><br>für Proteingelektrophorese       | 10% Essigsäure   |
| <b>Färbelösung</b><br>für Proteingelektrophorese          | 0,5% Coomassie Brilliant Blue R250<br>10% Essigsäure<br>45% Methanol<br>44,5% H <sub>2</sub> O   |
| <b>IPTG</b><br>Sterilfiltriert                            | 1 M IPTG   |
| <b>Inkubationspuffer 5x</b><br>für Gelretardationsanalyse | 100 mM Tris-HCl pH 8<br>250 mM KCl<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>5 mM EDTA<br>5 mM DTT<br>0,25% Nonidet P-40<br>25% Glycerin   |
| <b>PAA-Gel (5%)</b><br>für Gelretardationsanalyse         | 1,25 ml Acrylamid-Bisacrylamid (39:1) (40%)<br>1,3 ml Tris-HCl pH 8,8 (1M)<br>1,5 ml Tris-Borat pH 8,8 (1M)<br>5,95 ml deion.Wasser<br>200 µl APS (10%)<br>10 µl TEMED |
| <b>Puffer E</b>   | 100 mM Tris-HCl pH 8<br>150 mM NaCl<br>1 mM EDTA<br>2,5 mM Desthiobiotin   |

**Puffer R**

- 100 mM Tris-HCl pH 8
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM HABA (Hydroxy-azophenyl-benzol Säure)

**Puffer W**

- 100 mM Tris-HCl pH 8
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA

**Probenpuffer 5 x**

für native Proteingelektrophorese

- 3,1 ml Tris-HCl pH 8,8 (1M)
- 5 ml Glycerol (100%)
- 1,4 ml deion. H<sub>2</sub>O

**Sammelgel**

für denaturierende Proteingelektrophorese

- 0,75 ml Acrylamid-Bisacrylamid (39:1) (40%)
- 0,65 ml Tris-HCl pH 6,8 (1 M)
- 5,35 ml deion. Wasser
- 200 µl SDS (10%)
- 200 µl APS (10%)
- 10 µl TEMED

**SDS-Probenpuffer 2 x**

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 deion. H<sub>2</sub>O



Ausstriche mit einem intakten *amyE*-Gen bildet sich ein deutlich sichtbarer Hof. Wurde das *amyE*-Gen jedoch zerstört, ist kein Hof erkennbar.

### **Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität**

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde nach Miller (1972) durchgeführt. Die Messung beruht auf der enzymatischen Umwandlung von o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid in Galaktose und o-Nitrophenol durch die  $\beta$ -Galaktosidase. 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  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mindestens zweier unabhängig angezogener Kulturen bestimmt.

Die zu analysierenden Bakterienstämme wurden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 geschüttelt, anschließend 1,5 ml der Kultur 5 min mit 13000 U min<sup>-1</sup> bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Pellet in 400  $\mu$ l Z-Puffer/LD-Mix resuspendiert, für 10 min bei 37°C inkubiert und dann abzentrifugiert (2 min, 13000 U min<sup>-1</sup>, 4°C). Der erhaltene Überstand (Zellextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Zellextrakt wurden 100  $\mu$ l entnommen und mit 700  $\mu$ l Z-Puffer vermischt. Diese Ansätze wurden für 5 min bei 28°C vorinkubiert. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 200  $\mu$ l einer ONPG-Lösung (4 mg ml<sup>-1</sup> in 1 x Z-Puffer) zugegeben. Sobald eine deutliche Gelbfärbung festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Units/mg Protein wurde mit folgender Formel berechnet:

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

|                              |  |
|------------------------------|--|
| $A_{420}$                    | Absorption von o-Nitrophenol   |
| $\Delta t$                   | Zeitdifferenz zwischen Start und Stopp der Reaktion in min   |
| $V$                          | eingesetztes Volumen an Zellkultur in ml   |
| $A_{595} \times 1,7$         | Proteingehalt des Zellextraktes in $\text{mg ml}^{-1}$   |
| <b>Lysozym/DNase (LD)</b>    | 100 mg Lysozym in 10 ml deion. $\text{H}_2\text{O}$ gelöst<br>10 mg DNase zugegeben<br>à 500 $\mu\text{l}$ aliquotiert, bei $-20^\circ\text{C}$ gelagert |
| <b>Z-Puffer</b>              | 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$<br>40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$<br>10 mM KCl<br>1 mM $\text{MgSO}_4$<br>50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol                |
| <b>Iod-Kaliumiodidlösung</b> | 100 g KI<br>50 g J<br>ad 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}$  |

### 3.3.8. Arbeiten mit RNA

#### Präparation und Nachweis von RNA

Die Zellen wurden in CSE-Medium mit Glukose angezogen. Für die RNA-Isolation wurden zunächst 35 ml Bakteriensuspension bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 (log-Phase), 1,5 (Übergangsphase) und 2 (stationäre Phase) 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 abzentrifugiert (4 min, 8500 U/min,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bis zur weiteren

Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Bestimmung von *in vivo*-Halbwertszeiten der Transkripte wurde das Antibiotikum Rifampicin genutzt, welches die Transkriptionsinitiation blockiert. Unmittelbar nach der Entnahme von 35 ml Kultur (Zeitwert  $t_0$ ) wurde Rifampicin mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  im Medium zugegeben. Anschließend konnten in bestimmten Zeitabständen jeweils 35 ml der Kultur nach folgender Vorgehensweise geerntet werden. 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 1800 U/min für 3 min mit dem Mikrodismembrator. Die Zelltrümmer wurden in 3 ml auf  $60^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten Lysispuffer (RLT-Puffer RNeasy Mini Kit) aufgenommen und mit der Pipette so lange invertiert bis die Lösung aufklarte. Im Anschluss wurde die Lösung für 10 min bei 5000 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon überführt. Für den weiteren Verlauf der RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) wurde von der Lösung jeweils 450  $\mu\text{l}$  abgenommen. Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde mit Hilfe des Nano-Drop bestimmt. Die RNA-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.

### **DNaseI-Verdau**

Für den DNaseI-Verdau wurde die DNaseI (RNase-frei) der Firma Roche verwendet. Der Ansatz wurde nach Angaben des Herstellers pipettiert. Eingesetzt wurden 5  $\mu\text{g}$  RNA für einen 25  $\mu\text{l}$  Ansatz. Die Inkubationszeit wurde auf 60 min verlängert.

### ***In vitro* Transkription**

Als Matrizen-DNA für die *in vitro* Transkription diente ein durch PCR amplifiziertes Fragment, welches einen durch einen Primer angefügten T7-Promotor trug. Die Konzentration der Matrizen-DNA wurde über ein Agarosegel abgeschätzt.

Ansatz:

|   |        |
|---|--------|
| DNA-Template mit T7-Promotor (200 – 500 ng)   | 15 µl  |
| NTP-Mix (je 25mM)                             | 20 µl  |
| 10 x Transkriptionspuffer                     | 10 µl  |
| RNase Inhibitor (RNA Guard, Pharmacia, 2,6 U) | 1 µl   |
| 1 M DTT                                       | 2 µl   |
| Wasser  | 48 µl  |
| T7 RNA Polymerase (80 U)                      | 4 µl   |
|   | <hr/>  |
|   | 100 µl |

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 U RNase freie DNase I zugesetzt und der Ansatz für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Die Abstopfung der Reaktion und die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 4 µl 0,5 M EDTA pH 8,0, 12,5 µl 4 M LiCl und 350 µl 100% EtOH. Der Ansatz wurde für 2 h bei -70°C inkubiert. Nach der Fällung wurde die Lösung 30 min bei 13000 U min<sup>-1</sup> und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Nach Abdampfen des restlichen EtOH bei 60°C wurde die RNA in 50 µl Millipore-Wasser aufgenommen und die Konzentration durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

### **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 dest. Wasser und 10 ml 10 x 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 dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Gele gegossen und 1 h bei RT belassen. Nach dem Überschichten der Gele mit Laufpuffer (1 x MOPS) wurden die Kämme entfernt und für 10 min ein Vorlauf bei 100 V durchgeführt. Die RNA-Proben wurden in Eppendorfgefäßen vorbereitet und 5 µg RNA vorgelegt. Das Volumen wurde mit dest. Wasser auf 10 µl erhöht und 10 µl RNA-Auftragepuffer mit Ethidiumbromid zugegeben. Vom RNA-Standard wurden 3 µl eingesetzt, der wie die anderen Proben



behandelt wurde. 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 sowie mit dem RNA-Molekulargewichtsstandard 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.

### **Northernblot**

Der Vakuum-Transfer wurde mit einer Vakuumblot-Anlage (VacuGene™XI) 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 dest. Wasser getränkt und danach für 15 min in 2 x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran auf die gut mit dest. Wasser 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. 20 x 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 20 x SSC geschwenkt und die RNA mittels UV-Licht an der Membran fixiert. Anschließend wurden die Membranen auf einem Papiertuch luftgetrocknet. Danach konnten unter UV-Licht mit einem Kugelschreiber die Banden des RNA-Standards auf der Membran markiert, sowie die Membran zur Hybridisierung mit verschiedenen Sonden zerschnitten werden. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran bei RT trocken und vor Staub geschützt gelagert.

### **Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden**

Die *in vitro*-Synthese von Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonden erfolgten 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 Genes) mittels PCR amplifiziert, wobei der reverse Primer die Sequenz für den Promotor der T7-Polymerase enthielt. Das PCR-Produkt konnte nach der Aufreinigung für die *in vitro*-Ansatz zur Synthese der DIG markierte RNA-Sonde eingesetzt werden.

20 µl Ansatz: 3 µl PCR-Produkt

2 µl DIG RNA Labeling Mix

2 µl 10 x Transkriptionspuffer

12 µl Millipore-Wasser

Zuletzt wurden 1 µl T7-Polymerase sowie 1 µl RNAGuard<sup>TM</sup> hinzugefügt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von:

0,8 µl 0,5M EDTA pH 8,0

2,5 µl 4 M LiCl

gestoppt und schließlich nach Zugabe von EtOH (70 µl, -20°C) ÜN gefällt (-20°). Am nächsten Morgen wurde der Ansatz abzentrifugiert (15 min, 13000 U min<sup>-1</sup>, 4°C), das Pellet mit 50 µl 70% EtOH gewaschen und weitere 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und danach in 100 µl Millipore-Wasser aufgenommen. Schließlich wurde die RNA für mehrere Stunden bei 4°C gelöst, bevor sie bei -70°C gelagert wurde.

Die RNA-Sonden wurden vor der erstmaligen Verwendung durch Präabsorption gereinigt, um den Hintergrund der Sonde zu verringern (Sprenger *et al.*, 1995). Zunächst wurden 10 µl des Transkriptionsansatzes in 5 ml Vorhybridisierungslösung aufgenommen und für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Reinigung erfolgte, indem zunächst eine leere Membran von ca. 4 x 11 cm Größe für eine Stunde mit Vorhybridisierungslösung bei 68°C in Hybridisierungsröhrchen inkubiert wurde. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und die Sonde zur Membran dazugegeben und für mindestens 6 h oder über Nacht inkubiert. Danach war die Sonde bereit zur Verwendung.

## **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 in Hybridisierungsröhrchen transferiert und bei 68°C für zwei Stunden im Hybridisierungsöfen vorhybridisiert. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung 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 2 x SSC Waschlösung sowie dreimal 15 min bei 68°C in 50 ml vorgewärmter (auf 68°C) 0,1 x 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.

## **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 1:10000 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 tropfte die Membran kurz ab und wurde in eine frische Folie überführt, die sofort in die Belichtungskassette gelegt wurde. Abschließend erfolgte die Belichtung von Filmen, 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-Imager<sup>TM</sup> verwendet.

## **„Gel-Mobilitäts-Shift“ Analysen**

Zur Überprüfung der RNA-bindenden Eigenschaften von GlcT-RBD wurde eine sogenannte „Gel-Mobilitäts-Shift“-Analyse durchgeführt. Der Nachweis der Bindung des Proteins an die RNA erfolgt dabei durch die Verschiebung („Shift“) der RNA-Bande. Durch die Bindung

wird die Wanderung der RNA während der Gelelektrophorese gegenüber der freien RNA verzögert.

Ansatz:

- 6 µg RAT RNA (250 pmol)
- x µl Proteinlösung (Konzentration jeweils angegeben)
- 2 µl 10 x Tris-Acetat Puffer
- 4 µl 50% Glycerin (Endkonzentration ist 10%)
- ad. 20 µl H<sub>2</sub>O

Vor Zugabe der übrigen Komponenten wurde die RNA 2 min bei 95°C inkubiert, um sie vollständig zu denaturieren. Die Renaturierung erfolgte durch Zugabe von eiskaltem Wasser im Verhältnis 1:1 und anschließender Inkubation auf Eis. Nach vollständiger Renaturierung wurde die Proteinlösung in der entsprechenden Konzentration zugegeben und das Protein/RNA Gemisch 10-20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der weiteren Komponenten und die nachfolgende Analyse auf einem nativen 12% Tris-Acetat-PAA-Gel, welches für 3-4 h bei 50V laufen gelassen wurde. Nach Ethidiumbromidfärbung und Entfärbung mit Wasser wurde das Gel bei 254 nm unter UV-Licht fotografiert.

### **Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA**

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Blocking-Lösung</b>        | 10% (w/v) Blockingreagenz in Puffer I autoklaviert |
| <b>Denaturierungslösung</b>   | 50 mM NaOH<br>10 mM NaCl<br>autoklaviert           |
| <b>Neutralisierungslösung</b> | 100 mM Tris/HCl, pH 7,4<br>autoklaviert            |
| <b>Killing-Puffer</b>         | 20 mM Tris/HCl, pH 7,5                             |

---

|                              |   |
|------------------------------|---|
|                              | 5 mM MgCl <sub>2</sub>  |
|                              | autoklaviert, danach Zugabe von 20 mM NaN <sub>3</sub>  |
| <b>MOPS-Puffer 10 x</b>      | 200 mM MOPS<br>50 mM Na-Acetat<br>10 mM EDTA<br>pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt<br>punktautoklaviert |
| <b>N-Lauroylsarcosin 10%</b> | 10% N-Lauroylsarcosin in deion. Wasser<br>autoklaviert  |
| <b>Puffer I 10 x</b>         | 1 M Maleinsäure<br>1,5 M NaCl<br>mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert                            |
| <b>Puffer II</b>             | 1% Blockingreagenz in 1x Puffer I   |
| <b>Puffer III</b>            | 0,1 M Tris/HCl<br>0,1 M NaCl<br>pH 9,5 mit HCl eingestellt  |

---

|  |  |
|--|--|
| <b>RNA-Probenpuffer</b>                      | 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                              |
| <b>SSC (20 x)</b>                            | 3 M NaCl                                       |
|  | 0,3 M Na-Citrat                                |
|  | mit HCl auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert   |
| <b>Vorhybridisierungs-Lösung</b><br>(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                                 |
| <b>Prähybridisierungs-Lösung</b><br>(400 ml) | 200 ml Formamid                                |
|  | 100 ml 20xSSC                                  |
|  | 4 ml 10 % N-Laurocylsarcosin                   |
|  | 8 g Blocking-Reagenz                           |
|  | 28 g SDS                                       |
|  | ad 400 ml H <sub>2</sub> O, nicht autoklaviert |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>Waschlösung 0,1 x SSC</b>       | 0,1 x SSC<br>0,1% SDS   |
| <b>Waschlösung 2 x SSC</b>         | 2 x SSC<br>0,1% SDS   |
| <b>12% Natives Tris-Acetat-Gel</b> | 3,6 ml 40% PAA<br>1,2 ml 250 mM Tris-Acetat pH 5,5<br>7,2 ml H <sub>2</sub> O<br>200 µl 10% APS (frisch angesetzt)<br>10 µl TEMED |
| <b>10 x Tris-Acetat Laufpuffer</b> | 250 mM Tris-Acetat<br>pH 5,5 eingestellt mit konzentrierter Essigsäure<br>autoklaviert  |

### 3.3.9. Mutagenese mit *E. coli* XL1-Red

Herstellung von kompetenten Zellen von *E. coli* XL1-Red

Zur Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* XL1-Red wurde über Nacht eine 4 ml Kultur in LB-Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 2 ml der Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 geschüttelt. Dann wurde die Kultur auf zwei 50 ml Polyethylenröhrchen aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 5000 U min<sup>-1</sup> (4°C) abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 1/3 des Originalvolumens (~16 ml) in Lösung RF1 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurden die Pellets in 1/12,5 des





### **3.3.9. Plasmid-Mutagenese in *E. coli* XL1-Red**

Nach der Transformation wurden die LB-Selektionsplatten für 36 h bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien deutlich zu sehen waren. Mit sterilen Zahnstochern wurden 200 Klone gepickt und 10 ml LB-Medium (mit Ampicillin) mit je 10 Klonen beimpft. Die Kulturen wurden für 48 h bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide isoliert (s. Kap. 3.5.) und *B. subtilis* wurde mit den Plasmiden transformiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchung der Struktur des Komplexes aus GlcT und der *ptsG*-mRNA

#### 4.1.1. Ziel der Untersuchung

Yang *et al.* haben 2002 die Struktur des Antiterminationsproteins LicT im Komplex mit der dazugehörigen Antiterminationsstruktur der *bgIP*-mRNA geklärt. Aus dieser Struktur geht hervor, welche Aminosäuren für den direkten Kontakt mit der RAT-Struktur verantwortlich sind (Abb. 4.1.).

|      |         |          |        |                 |       |     |           |
|------|---------|----------|--------|-----------------|-------|-----|-----------|
| LicT | ----    | MKIA     | KVINNN | VISVVNEQGKELVVM | GRGLA | FQ  | KKSGDDV   |
| SacT | ----    | LKIYKVLN | NNAA   | -LIKEDDQEKIVMGP | GIA   | FQ  | KKKNDLI   |
| SacY | ----    | MKIKRILN | HNAI   | -VVKDQNEEKILLG  | GIA   | FN  | KKKNDIV   |
| GlcT | MNGSFTV | KKVLN    | NNVLI  | ASHHKYSEVVL     | IGK   | GIG | FGKKQDDVI |

Abb. 4.1.: Alignment der RNA-bindenden Domänen der Antiterminationsproteine aus *B. subtilis*

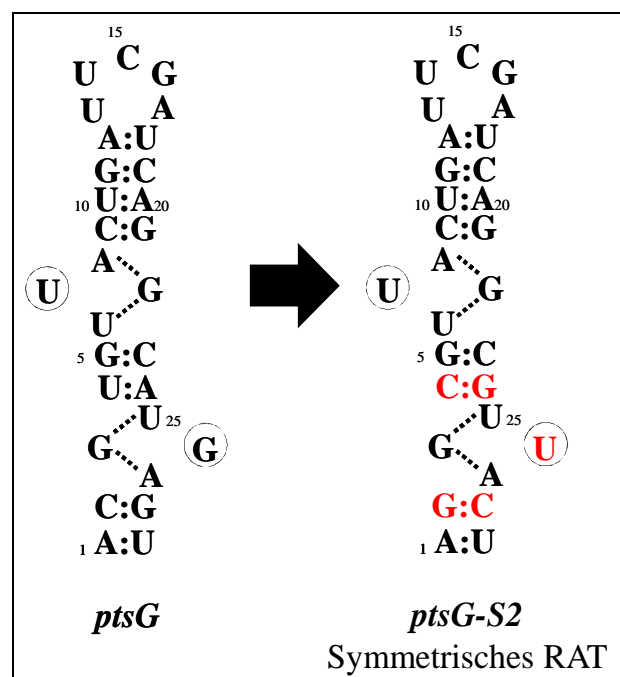
Gezeigt sind die ersten ca. 40 Aminosäuren der Proteine LicT, SacT, SacY und GlcT. Dieser Bereich beinhaltet alle für die RNA Bindung wichtigen Aminosäuren. Die rot markierten Aminosäuren in LicT sind direkt am Kontakt mit der RNA beteiligt (Yang *et al.* 2002). Rot umrandet sind die an der RNA-Bindung beteiligten Bereiche der Antiterminationsproteine.

Die Aminosäuren 5 bis 10 sowie die Aminosäuren 26, 27, 31 und 32 sind direkt an der Interaktion beteiligt. Da fast alle Aminosäuren, die am direkten Kontakt mit der RNA beteiligt sind, konserviert sind, wäre es möglich, dass andere Aminosäuren für die korrekte Erkennung der RAT-Strukturen verantwortlich sind. Möglicherweise geschieht dies über eine unterschiedliche Positionierung der am Kontakt beteiligten Aminosäuren gegenüber der RNA. Nur so wäre zu erklären, warum es trotz der sehr ähnlichen Sequenz der RBDs zu absolut keiner Interaktion zwischen dem GlcT / *ptsG*-RAT System mit den anderen Antiterminationssystemen kommt. Da die RAT-Struktur des *ptsG*-Promotors sich drastisch von denen der anderen Systeme unterscheidet, könnte in dieser Positionierung der Grund dafür liegen, dass es absolut keine Erkennung der *ptsG* Sequenz durch andere Antiterminationsproteine gibt. Wohingegen die recht ähnlichen Strukturen der *sacB*, *sacPA*, *bgIP* und *licS* RAT-Strukturen auch durch fremde Antiterminationsproteine erkannt werden können. Es kommt zum sogenannten Crosstalk. Daher mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse

herausgefunden werden, inwiefern sich die Bindung von GlcT an die *ptsG*-mRNA von der LicT-Bindung an die *bglP*-RNA unterscheidet.

#### 4.1.2. Herstellung einer perfekt symmetrischen RAT-Struktur

Für die Strukturanalyse wurden sowohl das komplette GlcT Protein, als auch eine gekürzte Version, die nur noch die RNA bindende Domäne enthält, benutzt. Außerdem sollte eine möglichst symmetrische RNA für die Untersuchung der Bindung verwendet werden. Diese symmetrische RNA hatte mehrere Vorteile.



**Abb. 4.2.: Konstruktion einer perfekt symmetrischen RAT-Struktur**

Um die RAT-Struktur von *ptsG* perfekt symmetrisch zu machen, sind die in rot markierten Mutationen notwendig.

Symmetrische RNAs lassen sich in Kristallen leichter auswerten. Außerdem sollte nur eine kurze RNA von maximal 10 Basen synthetisiert werden. Wenn diese mit sich selbst revers komplementär paaren kann, ist so eine Rekonstruktion der RAT-Struktur aus zwei gleichen kleinen RNAs möglich. Da der Top-Loop der *ptsG*-RAT-Struktur nicht an der Bindung beteiligt ist, sollten die ersten zehn Basen der Sequenz ausreichen, um die RAT-Struktur zu rekonstruieren. Um die *ptsG*-RAT-Struktur symmetrisch zu machen, mussten an drei Stellen Veränderungen vorgenommen werden (Abb. 4.2.). Es sollten die Basen 2 und 28 im unteren Stamm vertauscht werden, und somit aus der C:G Basenpaarungen eine G:C Paarung gemacht

werden. Aus der U:A Basenpaarung an Position 4 und 24 musste eine C:G Paarung gemacht werden. Außerdem sollte die herausstehende Base 26 in ein Uracil mutiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Uracil an dieser Stelle die Bindung von GlcT verbessert. Durch diese Mutationen entstand eine RNA mit der Sequenz AGGCGUUACU. Diese kann nun mit sich selbst gepaart die RAT-Struktur *in vitro* nachahmen.

Die Mutationen wurden schrittweise durch die Methode der Combined Chain Reaction in den *ptsG*-Promotorbereich eingebracht, welcher dann vor ein promotorloses *lacZ* Gen kloniert wurde (Abb. 4.3.). Zunächst sollte der Einfluss der Mutation im mittleren Stammbereich untersucht werden. Hier findet der Austausch einer schwachen U:A Paarung zu einer starken C:G Paarung statt. Diese Basen werden laut der LicT-*bglP* Struktur direkt vom Antiterminationsprotein gebunden. Da alle RAT-Strukturen in *B. subtilis* an dieser Stelle über eine U:A Paarung verfügen musste ausgeschlossen werden, dass diese für die Erkennung der RNA essentiell ist. Diese Mutationen wurden mit zwei Mutageneseprimern eingeführt. Ein Primer (SHU24) umfasste die komplette RAT-Struktur und führt das C:G Paar ein, während der zweite Primer (SHU25) eine kompensatorische Mutation in den Terminator einführt. Diese kompensatorischen Mutationen sind notwendig, da die RAT-Struktur im hinteren Bereich mit der Terminatorstruktur überlappt. Um die Struktur des Terminators nicht zu beeinflussen, muss auch diese mutiert werden. Es war zu vermuten, dass durch den Austausch einer schwachen gegen eine starke Paarung eine erhöhte Stabilität der RAT-Struktur erreicht wird. Dadurch ist mit einem erhöhten Durchlesen der RNA-Polymerase zu rechnen. Im nächsten Schritt wurden dann die anderen Mutationen eingeführt. Der Primer SHU26 änderte das Cytosin 4 in ein Guanin. Die Basen Guanin 26 und Guanin 27 wurden durch den Primer SHU27 geändert. Die notwendigen kompensatorischen Mutationen wurden durch den Primer SHU28 eingeführt. Die entstandenen Plasmide pGP422 und pGP423 wurden anschließend dem Restriktionsenzym *PstI* behandelt und in das Chromosom des *B. subtilis* Wildtyp Stammes integriert.

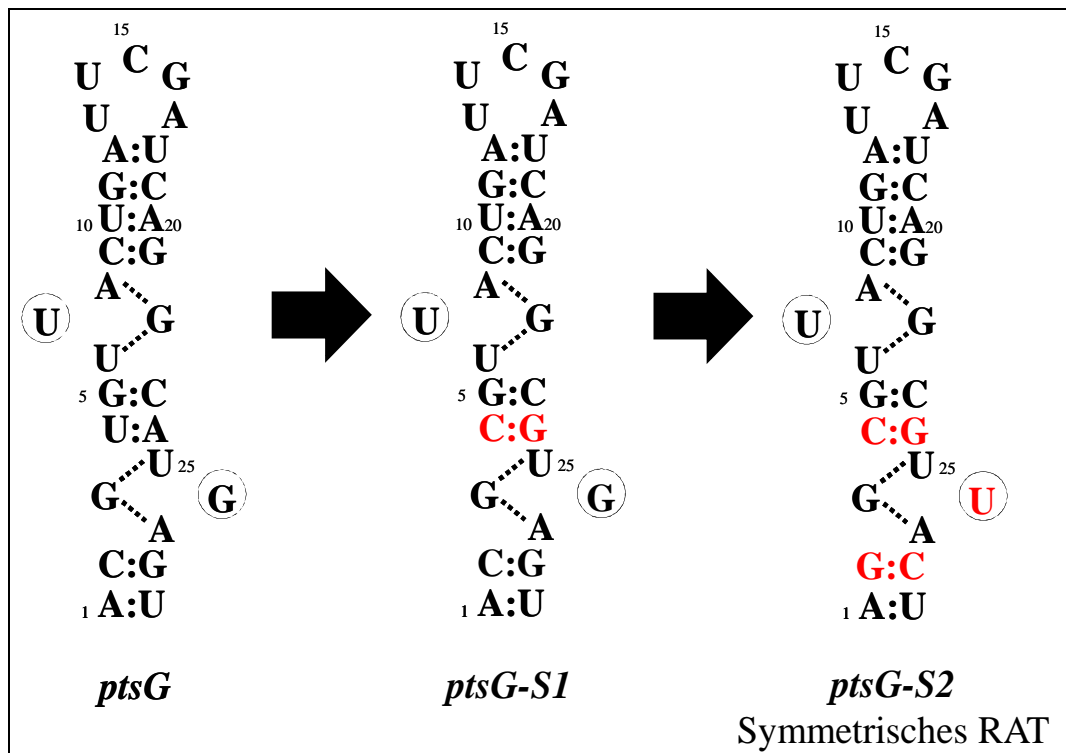


Abb. 4.3.: Schrittweise Konstruktion der symmetrischen RAT-Struktur

Durch Mutageneseprimer werden in einer CCR die Mutationen in die RAT-Sequenz eingebaut. Für *ptsG-S1* wurde die Primer SHU24 und SHU25 verwendet. Diese ändern den mittleren Stamm und die Terminator Sequenz. Die Primer SHU26-28 wurden für *ptsG-S2* verwendet. Sie führen die restlichen Mutationen ein, die für die symmetrische RAT-Struktur notwendig sind. Der Wildtypstamm 168 wurde anschließend mit den so konstruierten Plasmiden (pGP422 und pGP423) transformiert. Es entstanden die Stämme GP67 und GP68.

#### 4.1.3. Bindet GlcT die symmetrische RAT-Struktur *in vivo*?

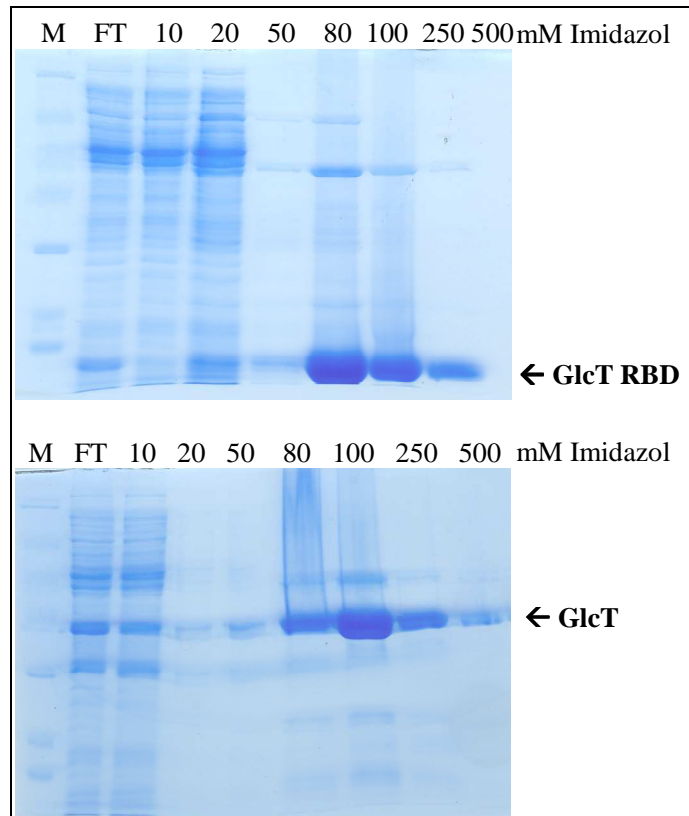
Um zu kontrollieren, ob GlcT *in vivo* noch an diese RAT-Strukturen binden kann, wurden die konstruierten Stämme GP67 (*ptsG-S1*) und GP68 (*ptsG-S2*) in CSE-Medium mit und ohne 0,5% Glukose angezogen. Als Kontrolle wurde die Wildtyp *ptsG-lacZ*-Fusion mit untersucht. Die *ptsG-S1* Mutation verstärkt den mittleren Stamm durch das starke C:G Basenpaar. Wie zu erwarten war, führt dies zu einer leicht erhöhten Antitermination in CSE-Medium ohne Glukose, also auch ohne aktives GlcT (Tab. 4.1.). Bei Zugabe von Glukose zum Medium steigt die Expression. Dies zeigt, dass GlcT die *ptsG-S1* RAT-Struktur binden kann. Die Mutationen in *ptsG-S2* führen zu einer weiteren Erhöhung der Aktivität in CSE-Medium. Die Änderung führt also zu einer weiteren Stabilisierung der RAT-Struktur. In CSE-Medium mit Glukose ist die Aktivität gegenüber dem Wildtyp um etwa die Hälfte reduziert. GlcT kann die symmetrische RAT-Struktur *in vivo* binden.

|                | CSE | CSE + Glukose |
|----------------|-----|---------------|
| <i>ptsG</i>    | 10  | 512           |
| <i>ptsG-S1</i> | 17  | 645           |
| <i>ptsG-S2</i> | 53  | 287           |

Tab. 4.1.: Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der Stämme *ptsG-S1* und *ptsG-S2*

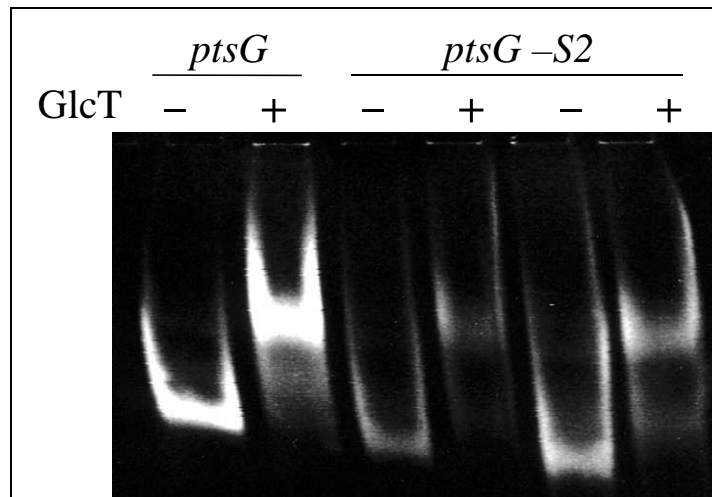
#### 4.1.4. Bindet GlcT die symmetrische RAT-Struktur *in vitro*?

Da die kristallographischen Untersuchungen *in vitro* stattfinden, musste noch überprüft werden, ob GlcT beziehungsweise die GlcT-RBD auch unter diesen Bedingungen an die symmetrische RAT-Struktur binden kann. Zu diesem Zweck wurde mit den Primern OS25 und OS26 eine *in vitro* Transkription an dem Plasmid pGP423 durchgeführt. Die so entstandenen 99 Basen langen Transkripte wurden für Gelshift-Analysen eingesetzt. Dazu wurde mit Hilfe der Plasmide pGP230 und pGP817 die GlcT-RBD beziehungsweise das komplette GlcT aufgereinigt. In diesen Plasmiden wurde jeweils ein 6x His-Tag an die Proteine angefügt, so dass diese mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt werden konnten. Des Weiteren verfügen diese Plasmide über eine Thrombin Schnittstelle zwischen dem Gen und dem His-Tag, so dass der Tag nach der Aufreinigung abgespalten werden kann. Dies ist notwendig, da bereits bekannt war, dass die Histidine die RNA-Bindung negativ beeinflussen. In Abb. 4.4. sind die Aufreinigungen von GlcT beziehungsweise der GlcT-RBD gezeigt. Die Gelshift-Analysen wurden auf nativen Polyacrylamid-Gelen durchgeführt. Kommt es zu einer Bindung des Proteins an die RNA, wird diese im Lauf verzögert. In Abb. 4.5. ist das Ergebnis dieser Untersuchungen dargestellt. Die Wildtyp *ptsG*-mRNA wurde als Kontrolle verwendet (pGP66). Diese zeigt bei Zugabe der GlcT-RBD den zu erwartenden Shift (Abb. 4.5., Spur 1 und 2). Die *ptsG-S2*-RNA wurde auf Grund der reduzierten *in vivo* Aktivität in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Damit sollte sichergestellt werden, dass man auch einen leichten Shift erkennen kann. Auch hier findet bei Zugabe der GlcT-RBD der Shift statt (Abb. 4.5., Spur 3-6).



**Abb. 4.4.: Aufreinigung von GlcT und der RBD von GlcT**

GlcT beziehungsweise die RBD wurden über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt. Die Fraktionen 80 und 100 mM Imidazol wurden jeweils vereinigt und zur weiteren Aufbereitung an das MPI für biophysikalische Chemie abgegeben.

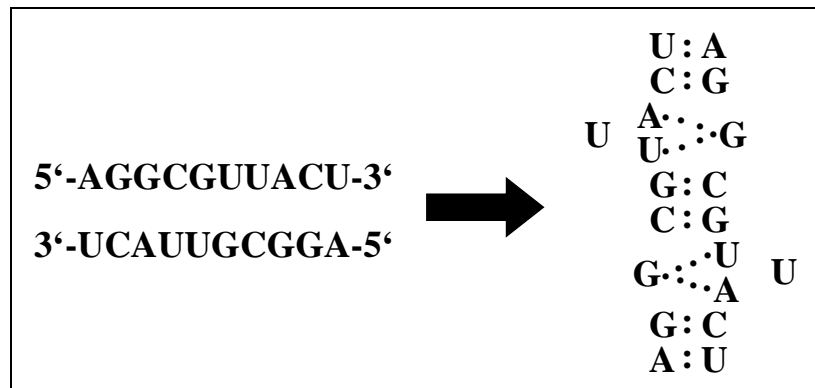


**Abb. 4.5.: Gel-Shift-Analyse der symmetrischen RAT-Struktur**

Für die Gel-Shifts wurden 99 Basen lange Transkripte des *ptsG*- und des *ptsG-S2*-Promotors mit den Primern OS25 und OS26 hergestellt. Diese wurden dann mit 3  $\mu$ g GlcT-RBD gemischt und auf ein 12%iges Polyacrylamidgel geladen.

#### 4.1.5. Kontrolle der 10 Basen langen synthetischen RAT-RNA

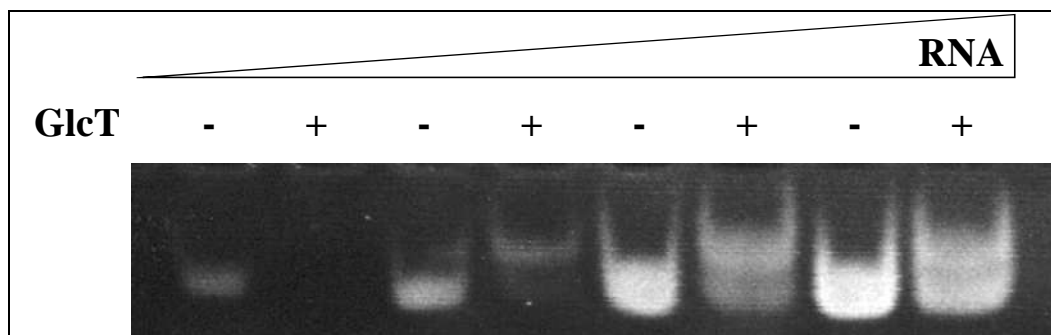
Wie bereits erwähnt, sollte für die kristallographischen Untersuchungen eine RNA synthetisiert werden, die nur 10 Basen lang ist. Diese sollte dann *in vitro* als Dimer die RAT-Struktur simulieren. Das Prinzip dieser Dimerisierung der kleinen RNA ist in Abb. 4.6. schematisch dargestellt.



**Abb. 4.6.: Dimerisierung der kleinen synthetischen RNA**

Es wurde eine RNA mit der Sequenz AGGCGUUACU synthetisch hergestellt. Diese RNA kann mit sich selbst paaren und so die symmetrische RAT simulieren.

Um die Bindung von GlcT an diese RNA zu überprüfen, wurde erneut eine Gelshift-Analyse durchgeführt. In Abb. 4.7. ist die kleine synthetische RNA in steigenden Mengen mit und ohne GlcT aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Shift stattfindet. Das heißt, GlcT bindet die RNA. GlcT braucht für die Bindung



**Abb. 4.7.: Gel Shift Analyse mit der 10 Basen langen RNA**

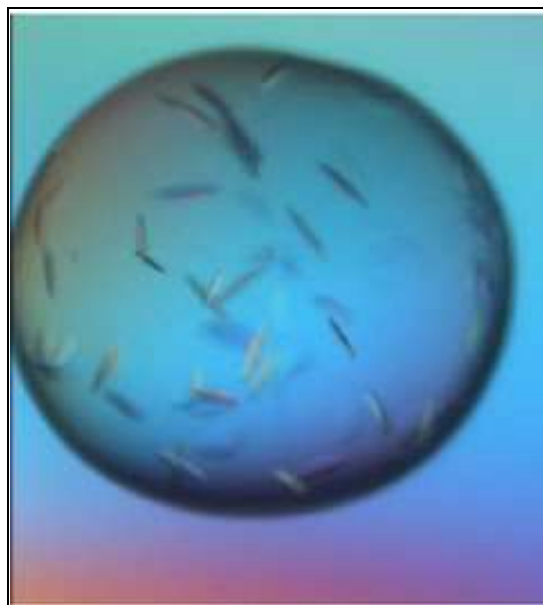
Die kleine RNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen mit der GlcT-RBD inkubiert. Danach wurde je eine Probe mit und eine ohne Protein auf ein 12%iges Polyacrylamidgel geladen. Das Gel wurde nach dem Lauf mit Ethidiumbromid eingefärbt und unter UV-Licht fotografiert.



zwingend ein Dimer der RNA, da nur so die RAT-Struktur simuliert wird. Dies bedeutet, dass in den Testbedingungen bei Raumtemperatur eine Bindung stattfinden kann. Die RNA bildet Dimere. Somit waren alle Vorarbeiten erfolgreich abgeschlossen.

#### 4.1.6. Suche nach Kristallen

Die Kristallisationsexperimente wurden am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen von Dr. Stefan Becker durchgeführt. Für den Screen wurde das Protein zunächst auf eine Konzentration von 20 mg/ml gebracht. Die RNA wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml verwendet. Sie wurde in einem 1,5 fachen Überschuss zum Protein gegeben. Es wurde ein Hampton-Natrix-Screen durchgeführt. Unter folgender Bedingung wurden kleine Kristalle gefunden: 50 mM Na-Cacodylat, pH 6.5; 17.14% PEG400; 80 mM Mg-Acetat; 200 nl Tropfen (Abb. 4.8.). Die durchschnittliche Größe der Kristalle betrug 75 x 20 x 20  $\mu\text{m}$ . Leider waren die Kristalle für genauere Analysen zu klein und konnten nicht reproduziert werden. Es wurden noch verschiedene andere Screens durchgeführt. Unter anderem sollte auch die Struktur von GlcT ohne RNA gelöst werden. Diese Versuche verliefen allerdings auch ohne Erfolg.



**Abb. 8: Kristalle des GlcT RBD~RNA Komplexes**

Diese Aufnahme zeigt den Tropfen Puffer, in dem die vermeintlichen GlcT-RBD Kristalle gewachsen sind.

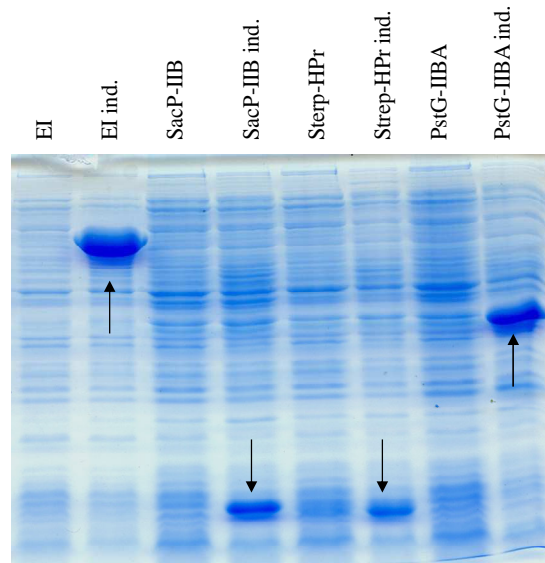
## 4.2. Interaktionen der Antiterminationsproteine GlcT und SacT mit PTS-Proteinen

### 4.2.1. Ziel der Untersuchung

Die Antiterminationsproteine GlcT und SacT werden durch die PTS-Komponenten HPr und das zuckerspezifische Enzym IIB (PtsG  $\rightarrow$  GlcT, SacP  $\rightarrow$  SacT) phosphoryliert. Die PRDI wird dabei je durch das entsprechende Enzym IIB phosphoryliert. Diese Phosphorylierung hat bei allen Antiterminationsproteinen einen negativen Einfluss auf die Aktivität. Die Phosphorylierung der PRDII durch das HPr aktiviert LicT und SacT und ermöglicht so die Antitermination. Bei GlcT und SacY muss diese Phosphorylierung nicht stattfinden, damit die Proteine aktiv werden. Sie führt allerdings zu einem Anstieg der Aktivität. Die PRDs verfügen über je zwei konservierte Histidinreste. Beide werden für die Phosphorylierung benötigt, wobei nur eines der Histidine letztendlich auch ein Phosphat trägt. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, warum HPr und Enzym IIB spezifisch die entsprechende PRD phosphorylieren können, obwohl diese sich in der Sequenz nur minimal unterscheiden. Außerdem sollte die Rolle der vier konservierten Histidine geklärt werden.

### 4.2.2. Rekonstruktion des PTS *in vitro*

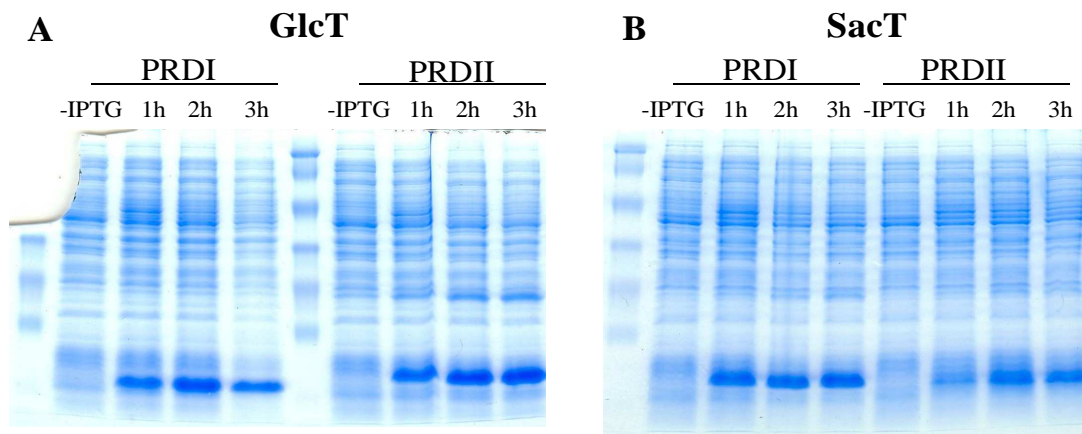
Die Untersuchung der Spezifität der Interaktionspartner erforderte die Rekonstruktion des kompletten PTS *in vitro*. Plasmide zur Aufreinigung von Enzym I, HPr und der Domäne BA von Enzym II lagen bereits vor. Alle diese Konstrukte basieren auf Vektoren, die die Inserts mit einem 6x His-Tag versehen und über einen IPTG induzierbaren Promotor verfügen. Die erfolgreiche Überproduktion vom Enzym I und PtsG IIBA ist in Abb. 1 gezeigt (Abb. 4.9., Spur 1 und 2 bzw. 7 und 8). Da HPr sowohl für die Phosphorylierung der PRDI als direkter Phosphodonor als auch für die Phosphorylierung der PRDI als Donor für das Enzym IIA gebraucht wird, musste ein weiteres HPr Plasmid kloniert werden. Dies war deshalb notwendig, da es *in vitro* zu einer unspezifischen Interaktion zwischen der PRDI und HPr kommen kann. Damit diese nicht störend im NMR Ansatz vorliegt, muss HPr aus diesem Ansatz entfernt werden. Mit diesem neuen Plasmid sollte die Aufreinigung des HPr über einen anderen Tag erfolgen. Die Klonierung von HPr erfolgte daher in den Vektor pGP172, der über einen N-terminalen Strep-Tag verfügt. Die erfolgreiche Überproduktion ist in Abb. 4.9. zu sehen (Abb. 4.9., Spur 5 und 6).



**Abb. 4.9.: Testüberproduktion von verschiedenen PTS-Proteinen**

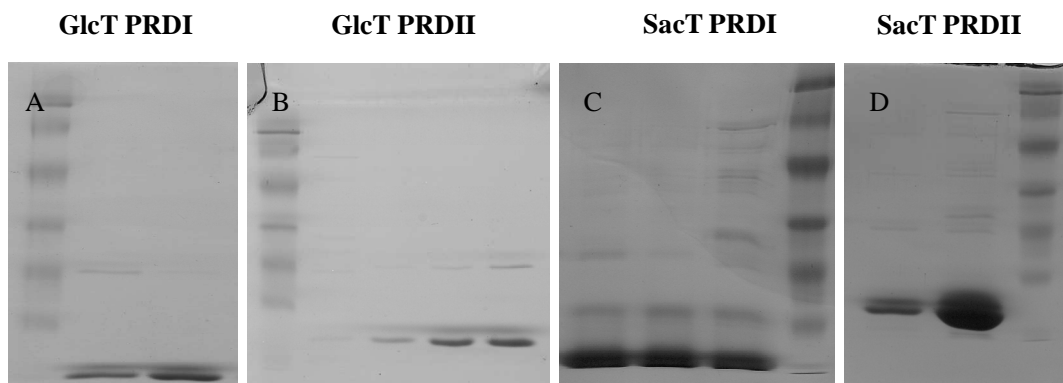
Es wurden 11 LB-Kulturen angezogen. Vor der Induktion mit IPTG wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 eine Probe entnommen. Nach 2-3 Stunden Inkubation wurde eine weitere Probe entnommen. Die Zellen wurden durch Zugabe von SDS und durch Aufkochen zerstört und die Proteine auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Die überproduzierten Proteine sind mit einem Pfeil markiert.

Die Aufreinigung der PRDs sollte mit einem His-Tag erfolgen. Da dieser Tag aber möglicherweise die NMR-Analyse stören könnte, wurden die PRDs sowohl in den Vektor pWH844 als auch pGP570 kloniert. Das Plasmid pWH844 besitzt einen IPTG induzierbaren Promotor sowie einen N-terminalen 6x His-Tag. Der Vektor pGP570 führt zudem eine Thrombin-Schnittstelle zwischen dem 6x His-Tag und dem Protein ein. Mit Hilfe dieser Schnittstelle können die sechs Histidine nach der Aufreinigung durch die Protease Thrombin abgespalten werden. Es entsteht ein nur zwei Aminosäuren großer Überhang, der weniger Einfluss auf die NMR-Untersuchungen haben sollte. Die erfolgreichen Überproduktionen sind exemplarisch für den Vektor pGP570 in der Abb. 4.10. A zu sehen. In der Diplomarbeit von Sabine Stauber (2000) wurde bereits festgestellt, dass sich die GlcT-PRDs nicht in großer Menge aufreinigen lassen. In der Arbeit wurde ein Konstrukt verwendet, das beide PRDs umfasste. Es bestand also die Möglichkeit, dass dies auch für die einzelnen PRDs gilt und diese sich nur in einem geringe Maße aufreinigen lassen. Da für NMR-Untersuchungen allerdings große Mengen Protein gebraucht werden, wurde ein zweites Antiterminationssystem für die Analyse der Interaktionen verwendet. Dazu wurden die PRDs des Antiterminationsproteins SacT ausgewählt. Wie bei GlcT wurden auch hier die PRDs in die Vektoren pWH844 und pGP570 kloniert. Die erfolgreichen Überproduktionen sind in Abb. 4.10. B zu sehen.



**Abb. 4.10.: Testüberproduktion der PRDs**

Es wurden 11 LB-Kulturen angezogen. Vor der Induktion mit IPTG wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 eine Probe entnommen. Nach 1h, 2h und 3h Inkubation wurde weitere Proben entnommen. Die Zellen wurden durch Zugabe von SDS und durch Aufkochen zerstört und die Proteine auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt.



**Abb. 4.11.: Aufreinigung der PRDs**

Die Zellextrakte wurden auf eine  $Ni^{2+}$ -NTA-Säule geladen. Die Säulen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Imidazol gewaschen. Abgebildet sind nur die Elutionsfraktionen, in denen sich das aufgereinigte Protein befand.

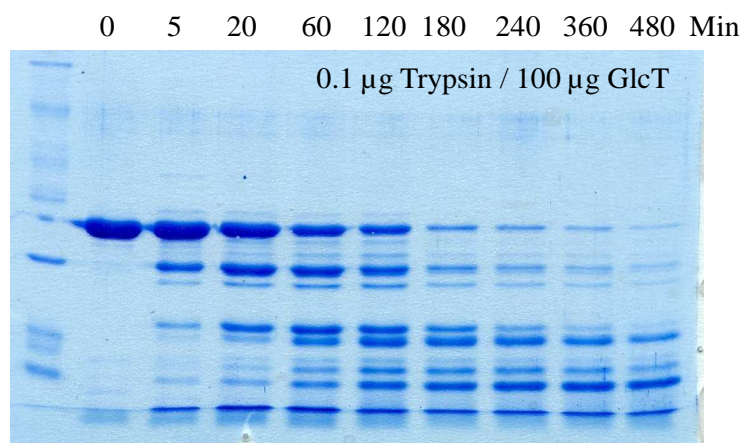
Die Aufreinigungen zeigten tatsächlich, dass die GlcT-PRDs nur in einem geringen Maßstab aufgereinigt werden konnten. Aus einer 11 LB Kultur, die 3 Stunden nach der Induktion geerntet wurde, konnten bei den GlcT-PRDs je ungefähr 4 mg Protein aufgereinigt werden (Abb. 4.11. A/B). Um die GlcT-PRDs für die NMR Untersuchungen einzusetzen, wären mindestens 3 Kulturen notwendig gewesen. Die SacT-PRDs lassen sich erheblich besser aufreinigen (Abb. 3 C/D). Die Ausbeute aus einem Liter Kultur betrug hier jeweils ungefähr 11 mg Protein.

Da die PRDI von SacT nicht direkt von PtsG phosphoryliert wird, musste zusätzlich das EII für Saccharose (SacP) kloniert werden. Für das Saccharose Aufnahmesystem existiert kein eigenes Enzym IIA. SacP besitzt nur die Enzym IIBC Domäne. Die Aufgabe des Enzym IIA übernimmt PtsG. Die erfolgreiche Überproduktion ist in Abb. 4.9. gezeigt (Abb. 4.9., Spur 3 und 4).

#### 4.2.3. Dimerisierung und Phosphorylierung der GlcT-PRDII

Für die ersten NMR-Analysen wurden die PRDs von SacT verwendet. Es stellte sich heraus, dass diese sich im NMR-Ansatz vermutlich nicht richtig gefaltet haben. Aus diesem Grund sollte versucht werden, die GlcT-PRDs mit einem anderen Tag aufzureinigen. Zunächst wurde allerdings überprüft, ob die Domänengrenzen richtig gewählt wurden. Dazu wurde das komplette GlcT mit Trypsin verdaut. Die so entstandenen Fragmente von GlcT konnten massenspektrometrisch untersucht werden. Das Ergebnis des Trypsinverdaus ist in Abb. 4.12. zu sehen. Die massenspektrometrischen Analysen ergaben, dass die Faltung der PRDs durch die gewählten Fragmente nicht beeinträchtigt wurde.

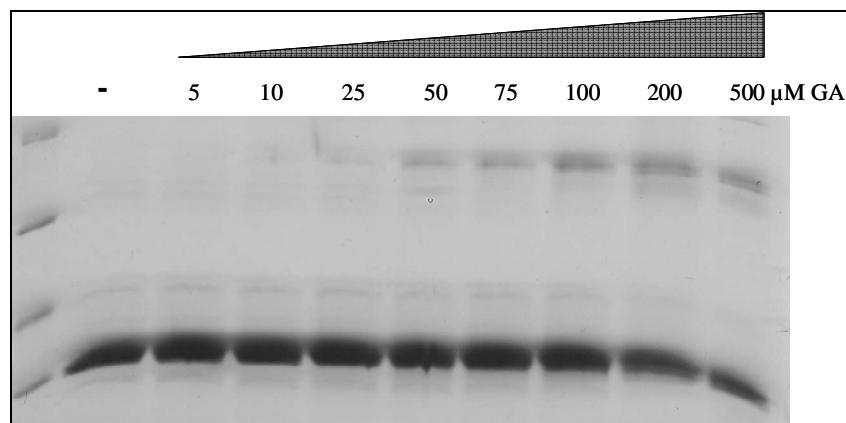
Die GlcT-PRDs wurden daraufhin von Sebastian Himmel im MPI für biophysikalische Chemie in einen Vektor kloniert, der die Aufreinigung mit einem GST-Tag ermöglicht. Dieser Tag erlaubte nicht nur die erfolgreiche Überproduktion der PRDs, sondern auch die Ausbeute an Protein nach der Aufreinigung wurde drastisch gesteigert.



**Abb. 4.12.: Trypsinverdau von GlcT**

Je 100 µg GlcT wurde mit 0,1 µg Trypsin bei 37°C für die angegebene Zeit inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS gestoppt. Die Proben wurden auf einen 12%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Zunächst wurde mit der Analyse der PRDII begonnen. Die ersten NMR Analysen zeigten, dass sich zwei Arten von PRDII im Ansatz befanden. Um zu kontrollieren, ob die PRDII unphosphoryliert Dimere bildet, wurden zwei Versuche durchgeführt. Zunächst wurde die GlcT PRDII mit Glutaraldehyd inkubiert. Diese Chemikalie stabilisiert Dimere und ermöglicht so die Analyse auf einem denaturierenden SDS-Gel. Das Gel ist in Abb. 4.13. zu sehen. Mit steigender Menge Glutaraldehyd, steigt auch die Menge der Dimerbande. Die PRDII bildet also auch Dimere *in vitro*, wenn sie unphosphoryliert vorliegt.

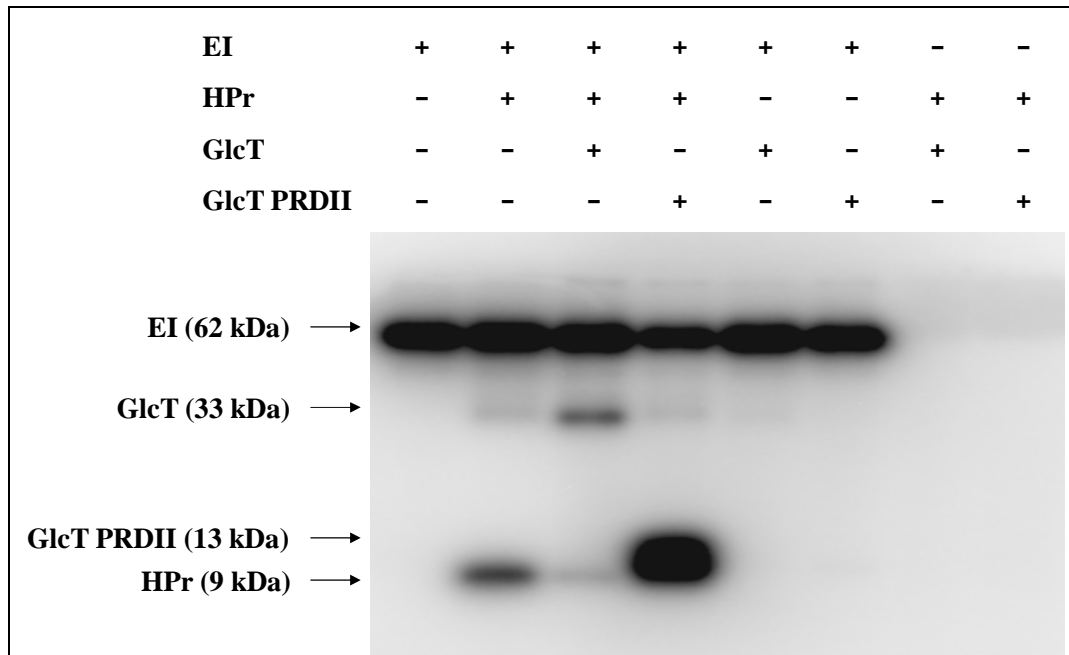


**Abb. 4.13.: Dimerbildung der GlcT PRDII**

Die GlcT PRDII wurde mit den angegebenen Mengen Glutaraldehyd inkubiert. Ab 50  $\mu\text{M}$  GA ist die Dimerbande zu erkennen.

Diese Dimerisierung wurde auch von Sebastian Himmel in Gelfiltrationsexperimenten festgestellt.

Nach dem Modell, wie die Phosphorylierung durch HPr die PRDII beeinflusst, sollte die PRDII im phosphorylierten Zustand stabile Dimere bilden. Dies würde eine Analyse der NMR-Ansätze ermöglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass HPr die PRDII *in vitro* phosphoryliert (Schmalisch *et al.*, 2003). Dort wurde allerdings das komplette GlcT verwendet. Es sollte nun überprüft werden, ob auch nur die PRDII phosphoryliert werden kann. Dazu wurde mit Hilfe von  $\text{P}^{32}$ -markiertem ATP markiertes Phosphoenolpyruvat hergestellt. Dies wurde dann mit Enzym I, HPr, dem kompletten GlcT sowie der GlcT-PRDII inkubiert. Die Proben wurden dann auf ein SDS-Gel geladen und damit ein Autoradiogramm erstellt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.15. zu sehen.

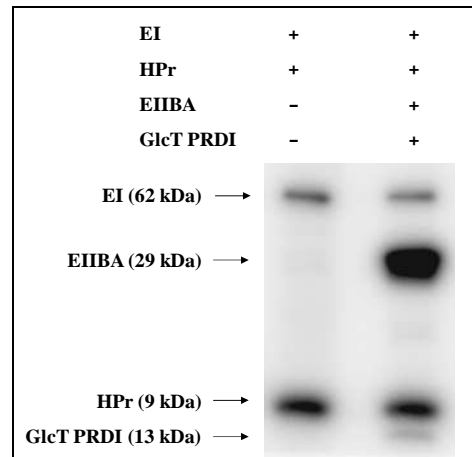


**Abb. 4.15.: Autoradiogramm der GlcT-PRDII Phosphorylierung**

Die Proben wurden nach der Inkubation mit SDS-Ladepuffer versehen und auf ein 12%iges SDS-Gel geladen. Das Autoradiogramm wurde dann durch Inkubation über Nacht erstellt.

In Spur 1 ist der Ansatz aufgetragen, in dem nur Enzym I inkubiert wurde. Enzym I phosphoryliert sich selbst mit dem radioaktiv markierten PEP. In Spur zwei wurden Enzym I und HPr inkubiert. Hier ist zu erkennen, dass der Phosphotransfer von EI auf das HPr funktioniert. In Spur 3 konnte gezeigt werden, dass das komplette GlcT von HPr(His15)-P phosphoryliert wird. Der entscheidende Ansatz ist in Spur 4 gezeigt. Dort wurde die GlcT-PRDII verwendet, die zur NMR Analyse eingesetzt werden sollte. Man kann erkennen, dass über dem HPr eine weitere Bande auftritt. Dabei handelt es sich um die GlcT-PRDII. Die PRDII von GlcT kann also von HPr phosphoryliert werden.

Für die Analyse der PRDI wurden auch Phosphorylierungstests durchgeführt. Die PRDI sollte zwar immer stabile Dimere bilden, aber um die Interaktion der PRDII mit dem EIIB von PtsG zu untersuchen, war es notwendig zu beweisen, dass auch dieser Phosphotransfer funktioniert. Die Ansätze wurden identisch zu denen der PRDII behandelt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.16. zu sehen. In Spur 2 ist zu erkennen, dass das EIIBA von HPr(His15)-P phosphoryliert werden kann. Der Phosphotransfer auf die GlcT-PRDI funktioniert ebenfalls. Die GlcT-PRDI ist zwar läuft im Gel etwas schneller als HPr, obwohl sie ein höheres Molekulargewicht hat. Dieses Verhalten wurde ebenfalls in SDS-Gele festgestellt, die mit Coomassie gefärbt wurden.



**Abb. 9: Autoradiogramm der GlcT-PRDI Phosphorylierung**

Die Proben wurden nach der Inkubation mit SDS-Ladepuffer versehen und auf ein 12%iges SDS-Gel geladen. Das Autoradiogramm wurde dann durch Inkubation über Nacht erstellt.

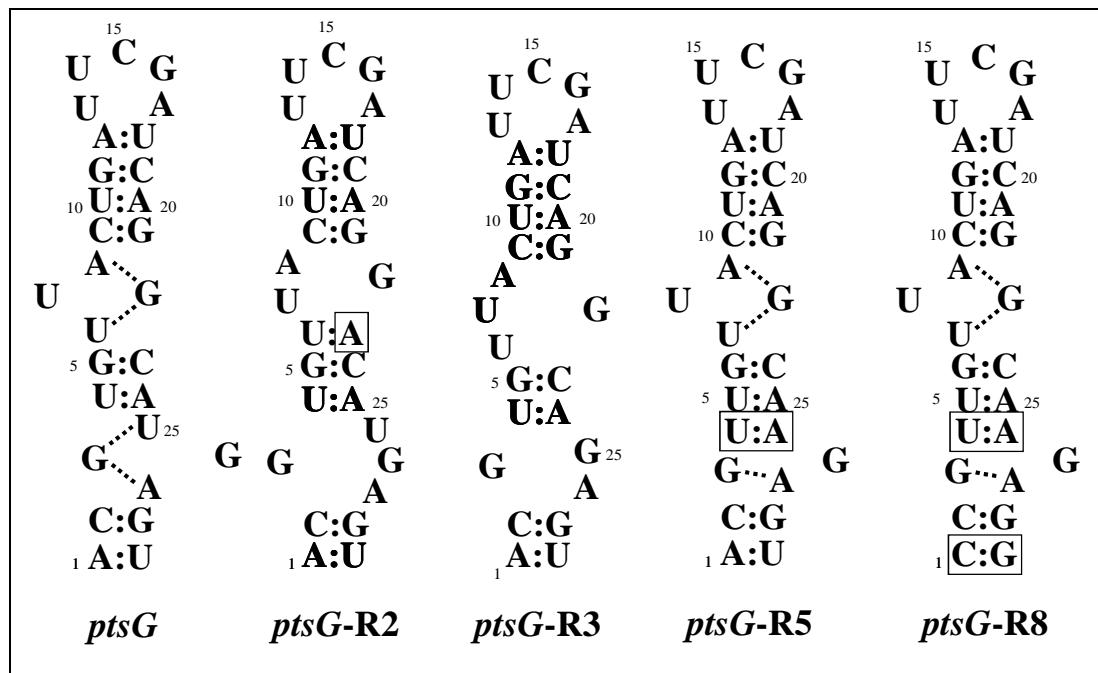
Die Analyse der beiden GlcT-PRDs hat gezeigt, dass sie *in vitro* richtig gefaltet sind. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die PRDs auch als einzelne Domänen spezifisch phosphorylierbar bleiben. Damit sind alle Voraussetzungen geschaffen, erfolgreiche NMR-Analysen durchführen zu können.



### 4.3. Analyse von verschiedenen RAT-Strukturen mit Hilfe von Northern Blots

#### 4.3.1. Ziel der Untersuchung

In der Doktorarbeit von Oliver Schilling (Schilling *et al.* 2004 & 2006) wurden die Strukturen der *ptsG*- und der *sacB*-Antiterminatoren durch Mutationen sehr genau untersucht. Dies geschah *in vivo* mittels  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäts-Messungen und *in vitro* mit Gel Shift Analysen. In dieser Arbeit sollten die gemessenen Aktivitäten mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen bestätigt werden. Es wurde eine RNA-Sonde verwendet, die spezifisch an die mRNA des *lacZ*-Gens bindet. Aus der Doktorarbeit von Oliver Schilling wurden die zu untersuchenden Stämme ausgewählt (Abb. 4.17.).



**Abb. 4.17.:** RAT-Strukturen der für die Northern Blot-Analyse ausgewählten Stämme

Die untersuchten Stämme enthalten jeweils den *ptsG*-Promotor vor einem promotorlosen *lacZ*-Gen. In die Stämme *ptsG*-R2, R3, R5 und R8 wurden Mutationen in die *ptsG*-RAT-Struktur eingebracht. Die Mutationen sind durch Kästchen gekennzeichnet.

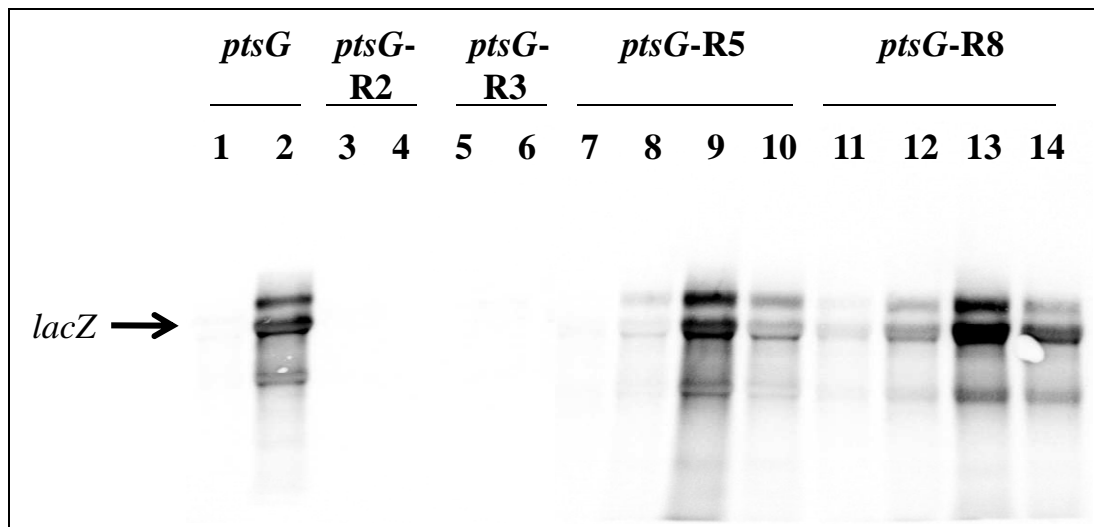
Alle ausgewählten Stämme enthalten *lacZ*-Fusionen mit dem *ptsG*-Promotor. Dieser *ptsG*-Promotor wurde in den als *ptsG*-R2, R3, R5 und R8 bezeichneten RAT-Strukturen mutiert. Als Kontrolle wurde der Wildtyp-Promotor von *ptsG* verwendet. In der *ptsG*-R2-RAT-Struktur befindet sich eine Insertion eines Adenin im oberen Loop Bereich. Diese Insertion führt dazu, dass die Triple-Basenpaarung im oberen Loop aufgelöst wird. Die Struktur im

oberen Loop entspricht dadurch der in den unteren Loops anderer RAT-Strukturen wie z.B. *sacB*. Da die Antiterminationsproteine als Dimer an die RNA binden, kann so überprüft werden, ob diese Bindung auch stattfindet, wenn der obere und der untere Loop vertauscht sind. In *ptsG-R3* wurde das Uracil an Position 25 deletiert. Durch diese Mutation wird der untere Loop zerstört und die drei Basenpaarungen im mittleren Stamm verhindert. Dies diente zur Kontrolle, welchen Einfluss die drei Basenpaarungen im mittleren Stamm haben. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Insertion eines Adenins an Position 4 der *ptsG*-RAT dazuführt, dass diese Struktur dann nicht mehr von GlcT aber dafür sehr gut von LicT erkannt wird. In *ptsG-R5* wurde ein Uracil an Position 4 eingeführt und das Uracil an Position 25 in ein Adenin geändert. So entsteht zwischen diesen beiden Basen eine Paarung. Diese Basenpaarung befindet sich auch in den RAT-Strukturen von *sacB*, *sacPA*, *licS* und *bglP*. In *ptsG-R8* ist zusätzlich im unteren Stamm die A:U Paarung durch eine C:G Paarung ersetzt. Es sollte untersucht werden, ob diese Stabilisierung des Stammes einen Einfluss auf die Expression hat.

#### 4.3.2. Wie beeinflussen die eingeführten Mutationen die Transkription?

Die Stämme, die die *lacZ*-Fusionen *ptsG*, *ptsG-R1* und *ptsG-R2* enthalten wurden in CSE-Medium und in CSE-Medium mit Glukose angezogen. Die Stämme, die die *lacZ*-Fusionen *ptsG-R5* und *ptsG-R8* enthalten, wurden zusätzlich mit Salicin und Saccharose angezogen. Anschließend wurde eine Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durchgeführt und parallel die Gesamt-RNA für die Northern Blots isoliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.18. und Tab. 4.2. dargestellt. In Spur 1 des Northern Blots ist zu sehen, dass in CSE-Medium kein *lacZ*-Transkript gebildet wird. Da unter diesen Umständen GlcT an der PRDI phosphoryliert vorliegt und somit inaktiv ist, kann es nicht an die RAT-Struktur des *ptsG*-Promotors binden. Es findet keine Antitermination statt und die Transkription wird abgebrochen. Werden die Zellen jedoch mit Glukose angezogen, findet diese Phosphorylierung nicht statt und GlcT ist aktiv. Es kommt zur Antitermination und das *lacZ*-Transkript entsteht. Bei dem *ptsG-R2*-Promotor ist zu erkennen, dass sich dieses Konstrukt in CSE-Medium genauso wie der Wildtyp verhält. Aber selbst bei der Zugabe von Glukose findet hier keine Antitermination mehr statt (Abb. 4.18., Spur 4). Das bedeutet, dass durch die eingeführten Mutationen GlcT diese RAT-Struktur nicht mehr erkennt und nicht binden kann. Genauso verhält es sich mit *ptsG-R3*, auch hier ist keine Antitermination durch GlcT mehr möglich (Abb. 4.18., Spur 5 und 6). Die Mutationen *ptsG-R5* und *ptsG-R8* sorgen für eine

Änderung der *ptsG*-RAT-Struktur, so dass diese nun von anderen Antiterminationsproteinen gebunden werden kann.



**Abb. 4.18.: Northern Blot mit den ausgewählten *ptsG*-Promotor-Mutanten**

Für den Northern Blot wurden die Stämme in CSE-Medium angezogen. In den Kulturen 2, 4, 6, 8 und 12 wurde Glukose zugegeben. In 9 und 13 Salicin und in 10 und 14 Saccharose. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 wurden die Zellen geerntet und die Gesamt RNA isoliert. Es wurden pro Probe 5  $\mu$ g der Gesamt RNA auf einem 1%igen Agarose Gel mit Formaldehyd aufgetrennt. Die Bande der *lacZ*-mRNA ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Bei *ptsG*-R5 erkennt man in CSE-Medium und in Medium mit Glukose kein Transkript (Abb. 4.18., Spur 7 und 8). Bei Zugabe von Salicin zum Medium hingegen ist eine erhöhte Menge an *lacZ*-Transkript detektierbar (Abb. 4.18., Spur 9). Unter diesen Bedingungen liegt LicT aktiviert vor. Dies bedeutet, dass *ptsG*-R5 von LicT erkannt wird und es so zur Antitermination kommt. Auch bei Zugabe von Saccharose zum Medium ist das *lacZ*-Transkript nachweisbar, allerdings in einem sehr viel geringeren Maße als mit Salicin (Abb. 4.18., Spur 10). Da unter diesen Bedingungen nur SacT und SacY aktiv sind, bedeutet dies, dass auch diese die *ptsG*-R5 Struktur binden können. Die Situation in der *ptsG*-R8 Mutante ist ähnlich wie in der *ptsG*-R5 Mutante. Auch hier können sowohl LicT als auch SacT und SacY binden (Abb. 4.18., Spur 13 und 14). In Spur 11 und 12 ist allerdings zu erkennen, dass das Einführen einer starken G:C Basenpaarung in den unteren Stamm zu einer erhöhten Durchleseaktivität führt. Das bedeutet, dass sich auch ohne aktives Antiterminationsprotein die RAT-Struktur ausbilden kann und es somit zur Antitermination kommt. Dies erkennt man daran, dass selbst im CSE-Medium ohne zusätzlichen Zucker das *lacZ*-Transkript nachweisbar ist (Abb. 4.18., Spur 11).

Aus den gleichen Kulturen wie für die Isolation der Gesamt RNA wurden Bestimmungen der

$\beta$ -Galaktosidaseaktivität durchgeführt. Die Ergebnisse stehen im perfekten Einklang mit den Ergebnissen der Northern Blot-Analyse. Der Wildtyp *ptsG*-Promotor wird durch Glukose vollständig aktiviert (Tab. 4.2., Zeile 1). Die Mutanten *ptsG*-R2 und *ptsG*-R3 werden von keinem Antiterminationsprotein mehr erkannt (Tab. 4.2., Zeile 1 und 2 und Schilling *et al.*, 2006). Bei *ptsG*-R5 bestätigen die Werte ebenfalls die Beobachtungen aus dem Northern Blot. Diese RAT-Struktur wird nun stark von LicT und in einem geringeren Maße von SacT/SacY gebunden (Tab. 4.2., Zeile 4). Dies ist auch bei *ptsG*-R8 der Fall. Außerdem ist hier auch die erhöhte Durchleseaktivität ohne Antiterminationsprotein festzustellen (Tab. 4.2., Zeile 5).

|                 | CSE | Glukose | Salicin | Saccharose |
|-----------------|-----|---------|---------|------------|
| <i>ptsG</i>     | 9   | 548     | -       | -          |
| <i>ptsG</i> -R2 | 3   | 2       | -       | -          |
| <i>ptsG</i> -R3 | 14  | 11      | -       | -          |
| <i>ptsG</i> -R5 | 34  | 33      | 887     | 174        |
| <i>ptsG</i> -R8 | 147 | 188     | 1038    | 157        |

**Tab. 4.2.: Auswertung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der *ptsG*-Promotor-Mutanten**

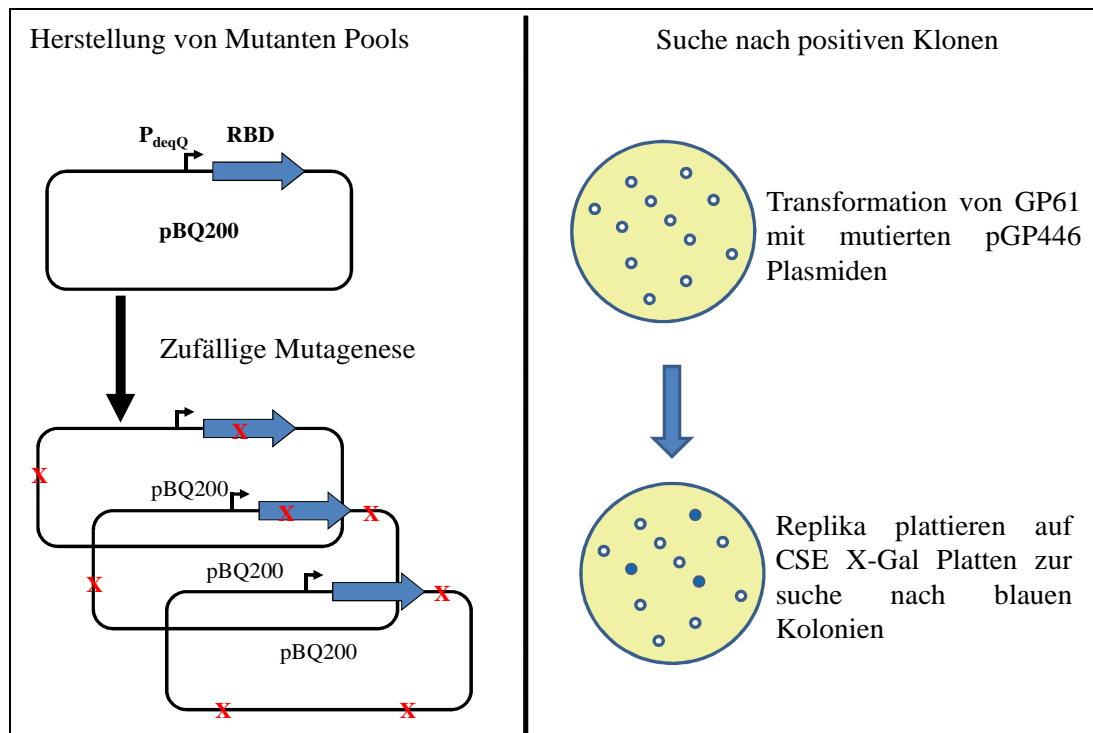
Die Zellen wurden in CSE-Medium mit 0,5% des angegebenen Zuckers angezogen. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erfolgte aus den gleichen Kulturen aus denen die Gesamt RNA für die Northern Blot Analyse isoliert wurde. Es ist eine repräsentative Messung dargestellt. Alle Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse konnten die durch die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und die Gel-Shift-Analysen gewonnenen Erkenntnisse komplett bestätigen.

## 4.4. Spezifität der RNA bindenden Domäne von SacT

### 4.4.1. Ziel der Untersuchung

Durch die Arbeiten von Oliver Schilling wurden die für die Interaktion zwischen RNA und Antiterminationsprotein wichtigen Basen der RAT-Struktur identifiziert. In dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, welche Aminosäuren der RBD wichtig sind zur Erkennung der RNA und zur Aufrechterhaltung der Spezifität. Für diese Untersuchungen wurde die RNA RBD von SacT ausgewählt. SacT ist das Antiterminationsprotein in *B. subtilis* mit der lockersten Spezifität. Diese Eigenschaft bietet optimale Voraussetzungen, um Mutanten zu erschaffen, die ihre Spezifität komplett geändert haben. Die SacT-RBD sollte so modifiziert werden, dass sie RAT-Strukturen erkennt, die sonst ausschließlich von LicT gebunden werden. Ein Schema, wie diese Suche nach SacT-Mutanten ablaufen sollte, ist in Abb. 4.19. gezeigt. Zunächst sollte die SacT-RBD in einen Vektor kloniert werden, der diese im Zielstamm überproduziert. Anschließend sollte dieses Plasmid durch mehrere Methoden mutagenisiert werden. Der Zielstamm sollte mit den so generierten Pools von Mutanten transformiert werden. Nach der Transformation auf Vollmedium werden die Kolonien auf Minimalmedium übertragen. Positive Klone werden durch die Zugabe von X-Gal blau und stehen zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung. Für eine erfolgreiche Suche waren daher einige Voraussetzungen notwendig. Es musste ein Vektor ausgewählt werden, in dem die SacT-RBD in ausreichender Menge produziert wurde, der aber auch leicht zu mutagenisieren ist. Des Weiteren musste ein Stamm ausgewählt werden, der über eine optimale *lacZ*-Fusion verfügt, die komplett LicT-abhängig ist. Das heißt, es darf in diesem Stamm keine Hintergrundaktivität oder unspezifische Bindungen an die RAT-Struktur geben. Und schlussendlich musste eine Methode gefunden werden, die ein schnelles und effektives Mutagenisieren der RBD ermöglicht.



**Abb. 4.19.:** Schema zur Suche nach SacT-RBD-Mutanten

Das Schema der Suche nach den RBD-Mutanten wird im Text (Kapitel 4.4.1.) erklärt.

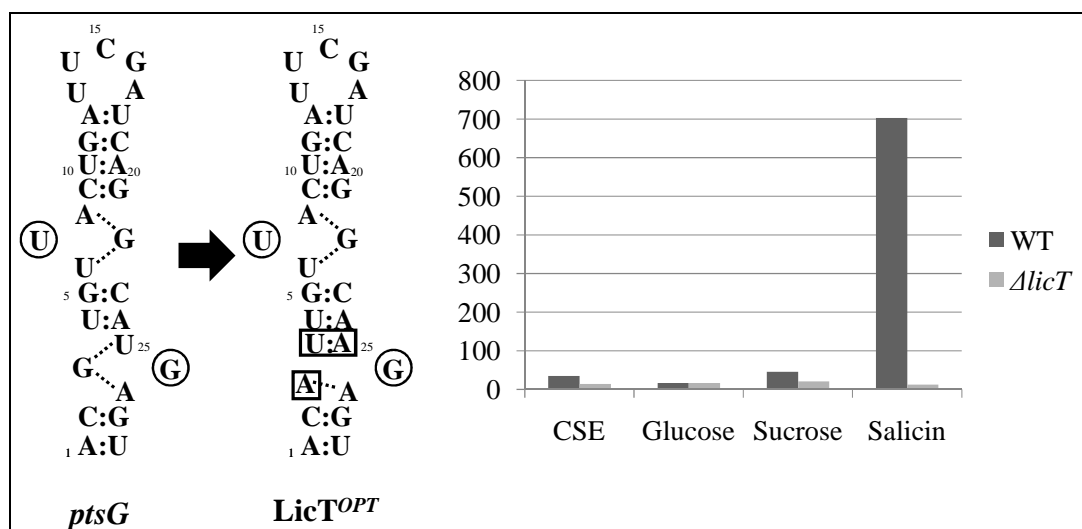
#### 4.4.2. Auswahl des Vektors

Durch den Vektor muss sichergestellt werden, dass die SacT-RBD stark überproduziert wird. Dies notwendig, da nur durch die Überproduktion die RBD auch ohne die PRDs aktiv wird. Für GlcT RBD konnte dies bereits gezeigt werden. Die Überproduktion erleichtert vermutlich die Dimerbildung, die für die RNA-Erkennung notwendig ist. Der Vektor pBQ200 verfügt über einen modifizierten Promotor des Genes *degQ*. Dieser Promotor ist stark konstitutiv aktiv. So wird eine ausreichende Überproduktion der SacT-RBD erreicht. Das konstruierte Plasmid trägt die Bezeichnung pGP446.

#### 4.4.3. Auswahl der für LicT optimalen *lacZ*-Fusion

Die zweite entscheidende Eigenschaft, über die der Stamm verfügen muss, ist eine *lacZ*-Fusion, die ausschließlich durch LicT erkannt und aktiviert wird. Außerdem sollte die Aktivität sehr hoch sein, damit in den mutierten Stämmen eine starke Blaufärbung auf X-Gal-Platten stattfinden kann. Eine entsprechende Fusion wurde aus der Doktorarbeit von Oliver Schilling ausgewählt. Diese im Folgenden als LicT<sup>OPT</sup> bezeichnete RAT-Struktur ist eine

mutierte *ptsG* RAT-RNA (*ptsG*-R6, Schilling *et al.*, 2006). An Position 3 ist das Guanin durch ein Adenin ersetzt und an Position 4 wurde ein Uracil eingefügt (Abb. 4.20.). Diese Änderungen führen dazu, dass die RAT-Struktur ausschließlich von LicT erkannt werden kann (Abb. 4.20.). Es gibt im Wildtyp sowie in einer *licT*-Deletionsmutante keinerlei Aktivität, wenn kein Salicin in Medium ist. Dies bedeutet, dass auch auf X-Gal Platten keine unspezifische Blaufärbung stattfindet. Wird jedoch Salicin hinzugegeben, zeigt der Wildtyp eine hohe Aktivität von über 700 Units. Dass diese Aktivität komplett abhängig von LicT ist, zeigt die *licT*-Mutante. Hier ist wiederum keine Aktivität festzustellen. Diese *lacZ*-Fusion ist also perfekt für die Suche nach SacT-Mutanten geeignet.



**Abb. 4.20.: Charakterisierung der LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*-Fusion**

In der linken Hälfte der Abb. sind die Mutationen gekennzeichnet, die in die *ptsG*-RAT-Struktur eingebracht wurden, um die LicT<sup>OPT</sup>-Struktur zu erzeugen. In der rechten Hälfte sind die Ergebnisse der Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität gezeigt. Der Stämme GP408 (LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*) und GP409 (LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*  $\Delta licT$ ) wurden in CSE-Medium mit und ohne Salicin bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,6 angezogen, um anschließend die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten zu bestimmen. Angaben in Units / mg Protein.

#### 4.4.4. Die Auswahl des richtigen Stammes

Für den Screen sollte eine *licT*-Mutante benutzt werden. Dadurch sollte verhindert werden, dass es zur Aktivierung dieses Proteins kommt und damit zur Blaufärbung der Kolonien. Alle existierenden  $\Delta licT$ -Stämme verwenden Erythromycin und Lincomycin als Resistenzmarker. Da der Vektor pBQ200 ebenfalls diese Antibiotika zur Selektion benötigt, musste eine neue  $\Delta licT$ -Mutante hergestellt werden. Dieses geschah mit Hilfe der Long

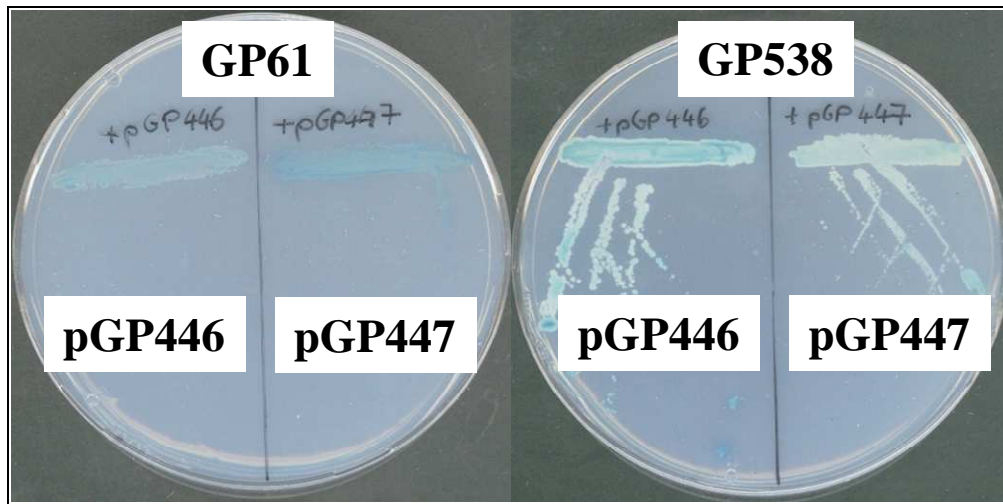
Flanking Homology PCR (zu Details siehe Kapitel 2.14.). Mit dem Produkt der LFH-PCR wurde anschließend der Stamm GP408 transformiert. Dieser Stamm enthält in seinem *amyE*-Gen die oben beschriebene LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*-Fusion. Der so konstruierte Stamm trägt den Namen GP61. In diesem Stamm sollte die Suche nach den SacT-RBD-Mutanten stattfinden.

#### 4.4.5. Untersuchung der Funktionalität der SacT-RBD

Bevor die Mutagenese begonnen werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die überproduzierte SacT-RBD aktiv ist. Außerdem muss sie ihre Spezifität beibehalten haben und darf nicht unspezifisch andere RAT-Strukturen binden. Dazu wurde der Stamm GP61 mit dem Plasmid pGP446 transformiert. Außerdem wurde zur Kontrolle das Plasmid pGP447 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein pBQ200 Derivat, welches die LicT-RBD enthält. Diese beiden Plasmide wurden außerdem in den Stamm GP538 gebracht. Dieser Stamm ist eine SacT-Deletionsmutante, die eine *lacZ*-Fusion enthält, die SacT-abhängig reguliert ist. Die Stämme wurden anschließend auf CSE-Platten ausgestrichen, die X-Gal enthalten. Außerdem wurden sie in CSE-Medium mit verschiedenen Zuckern angezogen, um die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu bestimmen.

In Abb. 4.21. sind die CSE X-Gal-Platten gezeigt. Der Stamm GP61 zeigt eine deutliche Blaufärbung, wenn er das Plasmid pGP447 enthält. Hier wird die LicT RBD überproduziert und bindet an die RNA der *licT*<sup>OPT</sup>-*lacZ*-Fusion. Es findet Antitermination statt. Das gleiche Ergebnis liefert auch die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (Tab. 4.3.). In CSE-Medium ist eine hohe Aktivität messbar.





**Abb. 4.21.: Überprüfung der Funktionalität der SacT-RBD**

Die Stämme GP61 und GP538 wurden auf CSE-Platten mit X-Gal vereinzelt, um die Blaufärbung zu bestimmen und damit die Spezifität der RBDs zu erkennen.

| Stamm | RBD  | Medium           | Farbe der Kolonie | $\beta$ -Galaktosidase Aktivität |
|-------|------|------------------|-------------------|----------------------------------|
| GP61  | LicT | CSE              | Blau              | 828                              |
|       | LicT | CSE + Salicin    | Blau              | 656                              |
|       | SacT | CSE              | Weiß              | 20                               |
|       | SacT | CSE + Salicin    | Weiß              | 17                               |
| GP538 | LicT | CSE              | Weiß              | 2                                |
|       | LicT | CSE + Saccharose | Weiß              | 5                                |
|       | SacT | CSE              | Blau              | 265                              |
|       | SacT | CSE + Saccharose | Blau              | 417                              |

**Tab. 4.3.: Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Stämmen GP61 und GP538**

Zusätzlich wurden die Zellen noch in Medium mit Salicin angezogen. Auch hier ist eine hohe Aktivität messbar. Das die Aktivitäten sowohl mit Zucker als auch ohne übereinstimmen, liegt an der Abwesenheit der PRDs. Die RBDs sind immer aktiv, gleichgültig, welche Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Die Aktivität wird durch die Überproduktion der RBDs sichergestellt. Die Auswertung der Platten und der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität für die Kombination GP61 mit dem Plasmid pGP446 zeigt, dass es dort keinerlei Antiterminationsaktivität gibt. Die SacT-RBD bindet die RNA der  $licT^{OPT}$ - $lacZ$ -Fusion nicht, wenn sie überproduziert vorliegt. Die Messungen der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Stamm

GP538 dienen der Überprüfung der Aktivität der SacT RBD. In diesem Stamm ist nur eine Aktivität festzustellen, wenn das Plasmid pGP446, also die SacT-RBD, vorliegt. Das zeigt, dass die SacT-RBD ohne die PRDs Dimere bilden kann und aktiv ist. Diese Aktivität ist wiederum Zucker unabhängig.

Nach diesen abschließenden Tests konnte mit der Mutagenese der SacT-RBD begonnen werden.

#### 4.4.6. Mutagenese durch Error-Prone-PCR

Das Prinzip der Error Prone PCR beruht auf einem Ungleichgewicht in der Konzentration der verschiedenen dNTPs. Das führt dazu, dass die dNTPs besonders häufig falsch eingebaut werden, die in höherer Konzentration vorliegen. Dazu verwendet man eine Polymerase ohne Proof-Reading-Aktivität, wie zum Beispiel die Taq-Polymerase. Um Mutationen in die SacT-RBD einzubauen, wurde eine Error-Prone-PCR mit den Primern SHU59 und SHU65 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die gleichen Primer, mit denen auch der Vektor pGP446 konstruiert wurden. Das PCR-Produkt sowie der Vektor wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert, um Religation zu vermeiden. Die geschnittenen Fragmente wurden anschließend ligiert und *E. coli* DH5 $\alpha$  damit transformiert. Wenn das Verhältnis Ligation zu Religation sehr gut war, wurden die erhaltenen *E. coli* Transformanten mit 3 ml LB von den Platten abgeschwemmt und für 2 Stunden in 15 ml LB Medium mit Ampicillin angezogen. Anschließend wurden diese Kulturen geerntet und die Plasmide isoliert. So erhielt man einen Pool von mutierten pGP446 Plasmiden. Mit diesen Pools wurden anschließend der Stamm GP61 transformiert und auf SP Erythromycin und Lincomycin Platten ausgestrichen. Einen Tag später wurden die Klone auf CSE Platten mit X-Gal und Ribose gestempelt. Ribose wurde dem Medium zugegeben, um das Wachstum auf dem Minimalmedium zu beschleunigen. Da mit Hilfe dieser Methode keine positiven Mutanten isoliert werden konnten, musste eine neue Methode gewählt werden, die SacT RBD zu mutieren.

#### 4.4.7. Mutagenese im *E. coli*-Stamm XL1-Red

Für diese Art der Mutagenese wird der besondere Phänotyp des *E. coli* Stammes XL1-Red ausgenutzt. Dieser besitzt Mutationen im Mut-Reparatur System. Dadurch baut er bei der Replikation Fehler in die DNA Sequenz ein. Da dieses auch auf die Replikation von Plasmiden zutrifft, konnte das Plasmid pGP446 direkt in diesem Stamm mutagenisiert werden. Dazu wurde der *E. coli* Stamm kompetent gemacht und mit dem Plasmid transformiert. Anschließend wurden Einzelkolonien gepickt und in 15 ml LB mit Ampicillin für ca. 72 Stunden angezogen. Durch dieses Animpfen von nur einer kleinen Kolonie wird gewährleistet, dass die Zellen sich möglichst häufig teilen können, bevor die Kultur optisch dicht gewachsen ist. Sobald die optische Dichte erreicht ist, werden die Kulturen geerntet und die Plasmide isoliert. So entstehen erneut Pools von mutierten pGP446 Plasmiden. Die folgende Prozedur entspricht der in Kapitel 4.4.6. beschriebenen Selektion auf positive Klone. Durch diese Methode konnte ein positives Plasmid mit einer mutierten SacT-RBD isoliert werden. Diese RBD wird im Nachfolgenden als XL1\*1 bezeichnet.

#### 4.4.8. Charakterisierung der SacT RBD Mutante XL1\*1

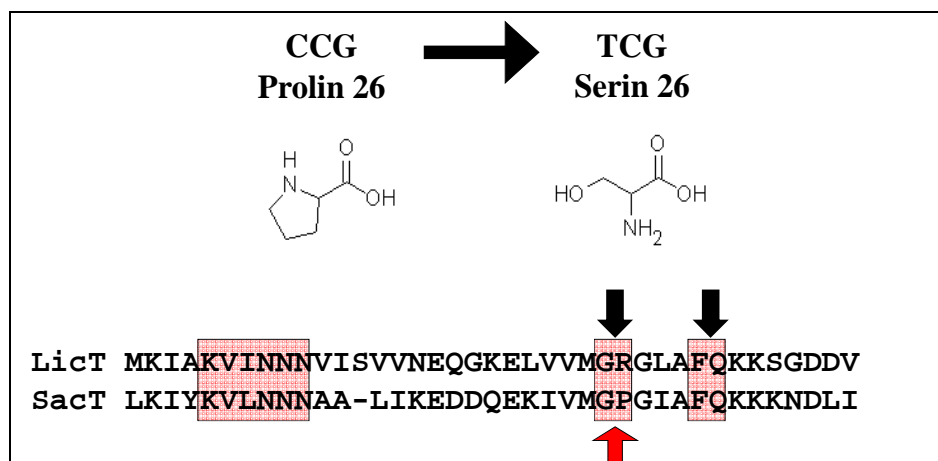


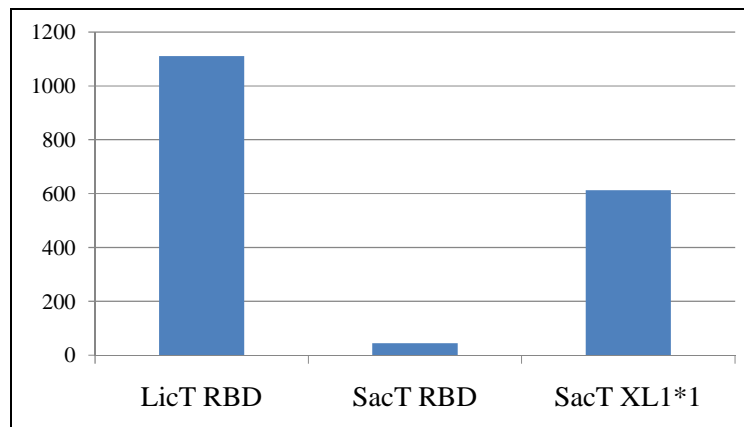
Abb. 4.22.: Sequenz der SacT RBD Mutante XL1\*1

In der Mutante XL1\*1 wurde durch einen Basenaustausch das Prolin 26 zu einem Serin. Nach der Struktur von LicT mit der RAT-Struktur von *bglP* hat diese Aminosäure direkten Kontakt zur RNA. Position 26 ist die einzige Aminosäure mit direktem Kontakt zur RNA an der sich SacT und LicT unterscheiden.

Zunächst wurden aus dem positiven Stamm das Plasmid isoliert. Dieses wurde anschließend, nach einer Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ , erneut in den Stamm GP61

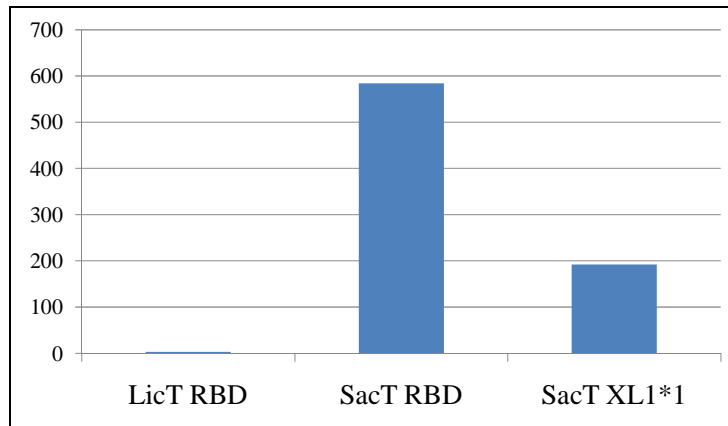
eingbracht. Damit wurde der blaue Phänotyp auf CSE-X-Gal-Platten bestätigt. Anschließend wurde die offensichtlich mutierte SacT-RBD sequenziert.

Die Sequenzierung ergab, dass die SacT-RBD einen Basenaustausch von einem Cytosin zu einem Thymin hat. Dadurch wird aus dem Prolin an Position 26 ein Serin (Abb. 4.22.). Um die Folgen dieser Mutation und das Ergebnis der Plattentests genauer zu betrachten, wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt und mit der Aktivität der SacT und LicT Wildtyp-RBDs zu vergleichen. Das Ergebnis ist in Abb. 4.23. dargestellt. Der Wert der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der Wildtyp LicT-RBD liegt bei ca. 1110. Die SacT Wildtyp RBD bindet wie beschrieben gar nicht an die LicT<sup>OPT</sup> RAT-Struktur. Die SacT-RBD-XL1\*1 hingegen führt zu einer Aktivität von 631. Die Aktivität liegt also bei ca. 60% der von LicT-RBD.



**Abb. 4.23.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten verschiedener RBDs im Stamm GP61**

Der Stamm GP61 mit den Plasmiden pGP446 (SacT-RBD), pGP447 (LicT-RBD) oder pGP448 (SacT-Pro26Ser) wurde in CSE-Medium mit 0,5% Ribose bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 angezogen, um anschließend die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten zu bestimmen. Angaben in Units / mg Protein.

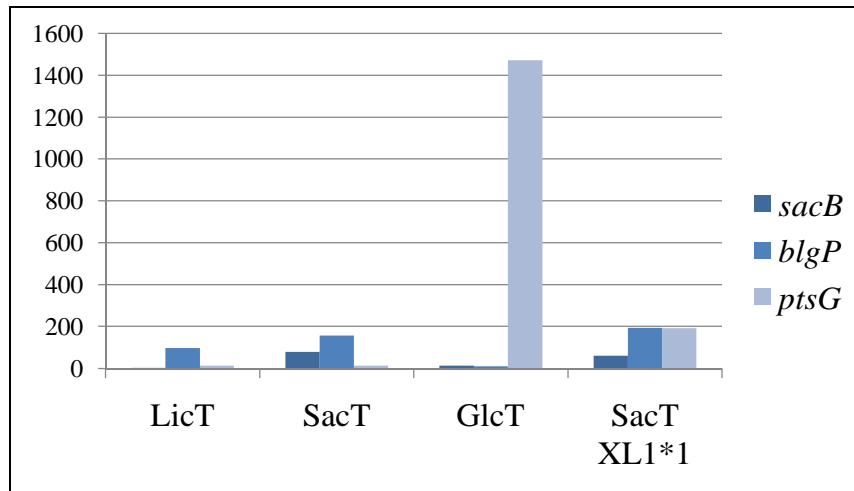


**Abb. 4.24.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten verschiedener RBDs im Stamm GP538**

Der Stamm GP538 mit den Plasmiden pGP446 (SacT-RBD), pGP447 (LicT-RBD) oder pGP448 (SacT-Pro26Ser) wurde in CSE-Medium mit 0,5% Ribose bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 angezogen, um anschließend die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten zu bestimmen. Angaben in Units / mg Protein.

In einem weiteren Schritt sollte nun überprüft werden, ob die SacT XL1\*1 Mutante auch weiterhin an ihr ursprüngliches Ziel, die *sacPA*-RAT-Struktur, binden kann. Dazu wurden erneut die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten des Stammes GP538 mit den verschiedenen RBDs bestimmt. In Abb. 4.24. zeigen die ersten beiden Messungen, dass die *sacPA*-RAT-Struktur nicht von LicT, aber sehr gut von SacT erkannt werden kann. Die Analyse der SacT-XL1\*1-Mutante zeigt, dass der Austausch von Prolin 26 zu Serin keine komplette Spezifitätsänderung hervorruft. Diese RBD kann immer noch die RAT-Struktur von *sacPA* erkennen. Dies macht sie mit ungefähr 33% der Aktivität vom Wildtyp SacT. Diese RBD kann also sowohl RAT-Strukturen erkennen, welche von LicT gebunden werden, als auch welche die normalerweise von SacT erkannt werden.

Nach diesen Ergebnissen war es nun interessant zu überprüfen, ob die SacT-XL1\*1-Mutante auch die anderen RAT-Strukturen aus *B. subtilis* binden kann. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide mit den RBDs in die Stämme GP440 (*sacB*-RAT), GP487 (*bglP*-RAT) und GP109 (*ptsG*-RAT) gebracht. Anschließend wurden erneut die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten in CSE-Ribose-Medium bestimmt.



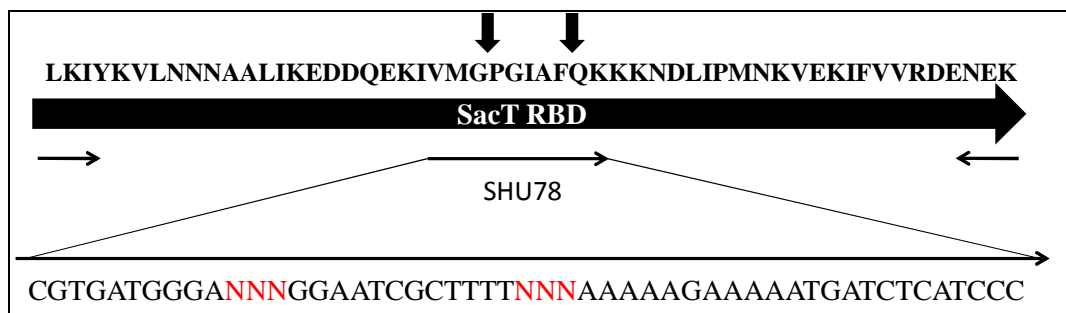
**Abb. 4.25.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten verschiedener RBDs**

Die Stämme GP109, GP440 und GP487 wurden mit den Plasmiden pGP446 (SacT-RBD), pGP447 (LicT-RBD), pGP118 (GlcT-RBD) und pGP448 (SacT Pro26Ser-RBD) in CSE-Medium mit 0,5% Ribose bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 angezogen, um anschließend die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten zu bestimmen. Angaben in Units / mg Protein.

Abb. 4.25. zeigt, dass die LicT-RBD nur spezifisch die *bglP*-RAT-Struktur erkennen kann. Die SacT-RBD hingegen bindet hingegen sowohl die *sacB*-RAT-Struktur als auch die *bglP*-RAT-Struktur. Dies funktioniert, da die klonierten RBDs über keine PRDs verfügen und somit nicht zuckerabhängig reguliert sind und daher ständig aktiv sind. Die GlcT-RBD löst nur bei der *ptsG*-RAT-Struktur Antitermination aus. Keine der anderen Wildtyp-RBDs kann diese erkennen. Dies bestätigt, dass es absolut keinen Crosstalk zwischen dem Aufnahmesystem für Glukose und den anderen Systemen gibt. Dass die SacT-XL1\*1-RBD sowohl die *sacB* als auch die *bglP*-RAT-Strukturen binden kann, war zu erwarten nach den Ergebnissen der vorangegangenen Bestimmungen der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten. Sie zeigt im Falle vom *bglP* sogar eine höhere Aktivität als LicT oder SacT. Überraschenderweise kann aber auch die *ptsG*-RAT-Struktur von dieser Mutante gebunden werden. Zwar nur mit ca. 10% der Aktivität verglichen zur GlcT-RBD, aber dies ist das erste Beispiel für eine Überschreitung der Grenze zwischen Glukose-Antiterminationssystem und den restlichen Systemen. Damit führt der Austausch der einen Aminosäure Prolin 26 zu einem Serin zu einem kompletten Verlust der Spezifität. Die SacT-RBD-XL1\*1 kann jede RAT-Struktur aus *B. subtilis* binden.

#### 4.4.9. Zielgerichtete Mutagenese der SacT- RBD durch CCR

Es reicht offensichtlich aus, eine einzelne Aminosäure in SacT auszutauschen, um einen Verlust der Spezifität hervorzurufen. Aus diesem Grund sollte nun diese Aminosäure gezielt aber unspezifisch mutiert werden. Im gleichen Schritt sollte auch das Glutamin 31 mutiert werden. Das Glutamin ist mit dem Prolin 26 die einzige Aminosäure, die an der RNA Bindung beteiligt ist, aber unter den Antiterminationsproteinen nicht konserviert ist. Um diese Aminosäuren zu mutieren, sollte die Methode der Combined Chain Reaction angewendet werden. Diese beruht darauf, dass zu einer normalen PCR zusätzlich Mutageneseprimer zugegeben werden, die im dem zu amplifizierenden Bereich liegen. Diese sind am 5'-Ende phosphoryliert und können so durch eine thermostabile Ligase, die sich ebenfalls im CCR-Ansatz befindet, mit den anderen Fragmenten verbunden werden (Hames *et al.*, 2005). Der hier benutzte Mutageneseprimer SHU78 besitzt zusätzlich eine Besonderheit. Er lagert sich an der DNA Sequenz der SacT-RBD so an, dass er die Aminosäuren 26 und 31 überspannt. Die je drei Basen, die für das Prolin beziehungsweise für das Glutamin kodieren, sind im Primer degeneriert. Das bedeutet, dass bei der Primersynthese eine zufällige Abfolge an Basen eingebaut wird. So kommt es bei der CCR zu jeder möglichen Kombination von Aminosäurepaaren. Das Prinzip dieser Mutagenese ist in Abb. 4.26. dargestellt.



**Abb. 4.26.: Mutagenese der SacT-RBD mit Hilfe der CCR**

Die SacT RBD wurde durch eine CCR mit den Primern SHU59/65 und dem Mutageneseprimer SHU78 an den Positionen 26 und 31 mutiert.

Die so mutierten SacT-RBDs wurden dann wie das Wildtyp-Fragment in den Vektor pBQ200 kloniert. Der Stamm GP61 wurde wie im vorangegangenen Screen mit diesen Pools transformiert und blaue Kolonien auf CSE X-Gal Platten gepickt. Es wurden auf diese Weise 22 blaue Klone gefunden, die diesen Phänotyp auch nach der Retransformation noch

aufwiesen. Diese Klone wurden anschließend sequenziert. Eine Übersicht der erhaltenen Allele ist in Tab. 4.4. gezeigt.

Es fällt auf, dass fast alle erhaltenen Allele, mit Ausnahme von CCR\*5, mindestens eine geladenen oder polare Aminosäure haben. Insgesamt vier der neun Allele verfügen sogar über zwei solche Aminosäuren.

Jedes dieser Allele wurde nach der Sequenzierung charakterisiert. Das heißt, die Stämme GP61, GP538, GP109, GP440 und GP487 wurden mit diesen Plasmiden transformiert. Außerdem wurden die Wildtyp-RBDs von SacT, LicT und GlcT als Kontrolle verwendet. Alle Messungen erfolgten bei 37°C in CSE-Medium mit 0,5% Ribose.

| Mutation          | Plasmid | Bezeichnung |
|-------------------|---------|-------------|
| Serin / Arginin   | pGP449  | CCR*1       |
| Cystein / Leucin  | pGP450  | CCR*2       |
| Arginin / Arginin | pGP451  | CCR*3       |
| Cystein / Arginin | pGP452  | CCR*4       |
| Serin / Glycin    | pGP453  | CCR*5       |
| Valin / Glycin    | pGP454  | CCR*6       |
| Cystein / Serin   | pGP455  | CCR*7       |
| Alanin / Lysin    | pGP456  | CCR*8       |
| Arginin / Alanin  | pGP457  | CCR*9       |

**Tab. 4.4.: SacT RBD-Allele**

In Spalte 1 der Tab. sind die Aminosäuren gezeigt, die das Prolin 26 und das Glutamin 31 ersetzen. In Spalte 2 ist der dazugehörige Plasmidname angegeben. In Spalte 3 sind die Bezeichnungen angegeben, die im weiteren Text für diese Allele verwendet werden.

#### 4.4.10. Bindung der CCR\* Allele an die LicT<sup>OPT</sup>-lacZ-Fusion

Da die Suche nach den SacT-RBD-Mutanten in dem Stamm durchgeführt wurde, der diese *lacZ*-Fusion trägt, zeigen natürlich alle isolierten Allele eine Aktivität in diesem Stamm. Allerdings zeigten sich schon bei der Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-Platten, dass sich die Aktivitäten teilweise drastisch unterscheiden. Die Allele CCR\*2, \*5 und \*9 zeigen eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zur LicT-RBD.



Bei CCR\*2 und \*9 beträgt die Steigerung ca. 30%, während die Aktivität des CCR\*9 Allels sogar fast auf das doppelte ansteigt. CCR\*3, \*4 haben eine ähnliche Aktivität wie LicT. CCR\*7 ist in seiner Aktivität etwa um die Hälfte reduziert. Die Allele CCR\*1, \*6 und \*8 binden die LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*-Fusion nur schlecht und haben daher eine sehr geringe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.

| Allel | $\beta$ -Galaktosidaseaktivität | Aktivität im Vergleich zur LicT RBD in % |
|-------|---------------------------------|--|
| GlcT  | 36                              | 6  |
| SacT  | 48                              | 7  |
| LicT  | 645                             | 100                                      |
| CCR*1 | 132                             | 20                                       |
| CCR*2 | 808                             | 125                                      |
| CCR*3 | 469                             | 73                                       |
| CCR*4 | 666                             | 103                                      |
| CCR*5 | 1210                            | 188                                      |
| CCR*6 | 134                             | 21                                       |
| CCR*7 | 329                             | 51                                       |
| CCR*8 | 68                              | 11                                       |
| CCR*9 | 843                             | 131                                      |

**Tab. 4.5.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der RBD-Allele mit der LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*-Fusion**

Der Stamm GP61 wurde mit den entsprechenden Plasmiden angezogen und bei eine OD<sub>600</sub> von 0,6 geerntet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitäten in Units / mg Protein gezeigt. In der rechten Spalte ist die Aktivität im Vergleich zur LicT-RBD angegeben.

#### 4.4.11. Bindung der CCR\* Allele an die *sacPA-lacZ*-Fusion

Die *sacPA*-RAT-Struktur ist das eigentliche Ziel der der SacT-RBD. Im Stamm GP538 sollte überprüft werden, ob die mutierten SacT-RBDs noch an die ursprüngliche RAT-Struktur binden können. CCR\*5 zeigt als einziges Allel praktisch keine Änderung der Aktivität gegenüber dieser *lacZ*-Fusion. Die meisten anderen Allele haben noch 1/3 bis 2/3 der Aktivität des Wildtyp SacTs. Die RBDs CCR\*1 und CCR\*7 hingegen können diese RAT-Struktur überhaupt nicht mehr erkennen.

| Allel | $\beta$ -Galaktosidaseaktivität | Aktivität im Vergleich zur SacT RBD in % |
|-------|---------------------------------|--|
| GlcT  | 38                              | 11                                       |
| SacT  | 350                             | 100                                      |
| LicT  | 2                               | 1  |
| CCR*1 | 12                              | 3  |
| CCR*2 | 138                             | 39                                       |
| CCR*3 | 195                             | 56                                       |
| CCR*4 | 122                             | 35                                       |
| CCR*5 | 338                             | 97                                       |
| CCR*6 | 229                             | 65                                       |
| CCR*7 | 41                              | 12                                       |
| CCR*8 | 149                             | 43                                       |
| CCR*9 | 135                             | 39                                       |

**Tab. 4.6.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der RBD-Allele mit der *sacPA-lacZ*-Fusion**

Der Stamm GP538 wurde mit den entsprechenden Plasmiden angezogen und bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 geerntet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitäten in Units / mg Protein gezeigt. In der rechten Spalte ist die Aktivität im Vergleich zur SacT-RBD angegeben.

#### 4.4.12. Bindung der CCR\* Allele an die *sacB-lacZ*-Fusion

Die *sacB*-RAT-Struktur wird in dem hier verwendeten System selbst von SacT nur sehr schlecht erkannt. Diese geringe Affinität der RBD zur RNA führt dazu, dass nur eine sehr geringe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von 27 Units / mg Protein messbar ist. Von daher ist es überraschend, dass alle isolierten Allele eine extrem erhöhte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität aufweisen. Teilweise liegt diese über 1000% über der Wildtyp-SacT-RBD. Warum dieser drastische Effekt auftritt, kann nicht erklärt werden.

| Allel | $\beta$ -Galaktosidaseaktivität | Aktivität im Vergleich zur SacT RBD in % |
|-------|---------------------------------|--|
| GlcT  | 2                               | 7  |
| SacT  | 27                              | 100                                      |
| LicT  | 3                               | 11                                       |
| CCR*1 | 40                              | 148                                      |
| CCR*2 | 316                             | 1170                                     |
| CCR*3 | 149                             | 552                                      |
| CCR*4 | 232                             | 859                                      |
| CCR*5 | 309                             | 1144                                     |
| CCR*6 | 286                             | 1059                                     |
| CCR*7 | 66                              | 244                                      |
| CCR*8 | 75                              | 278                                      |
| CCR*9 | 408                             | 1511                                     |

**Tab. 4.7:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der RBD-Allele mit der *sacB-lacZ*-Fusion**

Der Stamm GP440 wurde mit den entsprechenden Plasmiden angezogen und bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 geerntet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitäten in Units / mg Protein gezeigt. In der rechten Spalte ist die Aktivität im Vergleich zur SacT-RBD angegeben.

#### 4.4.13. Bindung der CCR\* Allele an die *bglP-lacZ*-Fusion

Da die RBDs ohne die dazugehörigen PRDs nicht mehr durch Zucker reguliert werden, sind sie ständig aktiv. Dies führt dazu, dass in CSE-Medium mit Ribose die SacT-RBD besser an die RAT-Struktur von *bglP* binden kann als LicT. Unter normalen Umständen ist SacT nicht aktiv, wenn  $\beta$ -Glukoside im Medium vorhanden sind. Es kommt dann auch nicht zu Antitermination. In Tab. 6 sind die Ergebnisse der Messungen der in der CCR erhaltenen Mutanten dargestellt. Alle RBD Allele können die *bglP* RAT-Struktur erkennen. Manche (CCR\*3, \*5, \*6 und \*8) sogar besser als LicT. Nur das Allel CCR\*7 hat nur ca. 25% der Aktivität von LicT und ist damit die RBD, die am schlechtesten diese RNA binden kann.

| Allel | $\beta$ -Galaktosidaseaktivität | Aktivität im Vergleich zur LicT RBD in % |
|-------|---------------------------------|--|
| GlcT  | 3                               | 2  |
| SacT  | 213                             | 145                                      |
| LicT  | 147                             | 100                                      |
| CCR*1 | 111                             | 76                                       |
| CCR*2 | 128                             | 87                                       |
| CCR*3 | 243                             | 165                                      |
| CCR*4 | 131                             | 89                                       |
| CCR*5 | 204                             | 139                                      |
| CCR*6 | 268                             | 182                                      |
| CCR*7 | 33                              | 22                                       |
| CCR*8 | 161                             | 110                                      |
| CCR*9 | 106                             | 72                                       |

**Tab. 4.8.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der RBD-Allele mit der *bgIP-lacZ*-Fusion**

Der Stamm GP487 wurde mit den entsprechenden Plasmiden angezogen und bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 geerntet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitäten in Units / mg Protein gezeigt. In der rechten Spalte ist die Aktivität im Vergleich zur LicT-RBD angegeben.

#### 4.4.14. Bindung der CCR\* Allele an die *ptsG-lacZ*-Fusion

Dass die mutierte SacT-RBD-XL1\*1 die *ptsG*-RAT-Struktur erkennt und zur Antitermination führt, war auf Grund der strikten Trennung der Antiterminationssysteme überraschend. Die Analysen der Aktivität der neu isolierten Allele ergaben, dass mehrere Proteine aus dieser Gruppe der neuen RBDs die *ptsG*-RAT-Struktur sogar noch besser erkennen können als die ursprünglich isolierte XL1\*1-Mutante (Tab. 7). Bei allen anderen getesteten RAT-Strukturen, war zu beobachten, dass es immer Allele gab, die eine ähnlich oder sogar eine höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als die entsprechende Wildtyp-RBD hatten. Dies ist bei der *ptsG-lacZ*-Fusion nicht der Fall. Hier erreicht die beste RBD ungefähr 70% der Aktivität von GlcT.

| Allel | $\beta$ -Galaktosidaseaktivität | Aktivität im Vergleich zur GlcT RBD in % |
|-------|---------------------------------|--|
| GlcT  | 919                             | 100                                      |
| SacT  | 11                              | 1  |
| LicT  | 8                               | 1  |
| CCR*1 | 75                              | 8  |
| CCR*2 | 512                             | 56                                       |
| CCR*3 | 428                             | 47                                       |
| CCR*4 | 568                             | 62                                       |
| CCR*5 | 630                             | 69                                       |
| CCR*6 | 654                             | 71                                       |
| CCR*7 | 220                             | 24                                       |
| CCR*8 | 50                              | 5  |
| CCR*9 | 498                             | 54                                       |

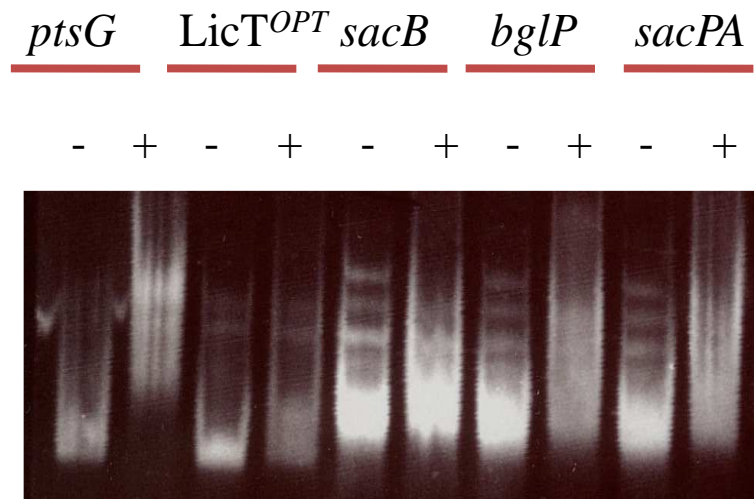
**Tab. 4.9.:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der RBD Allele mit der *ptsG-lacZ*-Fusion**

Der Stamm GP109 wurde mit den entsprechenden Plasmiden angezogen und bei eine  $OD_{600}$  von 0,6 geerntet. In der mittleren Spalte sind die Aktivitäten in Units / mg Protein gezeigt. In der rechten Spalte ist die Aktivität im Vergleich zur GlcT-RBD angegeben.

#### 4.4.15. Gel-Shift-Analysen mit ausgewählten RBD-Allelen

Um diese *in vivo* Analysen der isolierten RBDs zu bestätigen, sollten Gel-Shift-Analysen durchgeführt werden. Da alle Allele ähnliche Eigenschaften aufwiesen, wurden drei zur Klonierung ausgewählt. Bei diesen drei RBDs handelte es sich um CCR\*3 (Arginin / Arginin), \*4 (Serin / Arginin) und \*5 (Serin / Glycin). Die RBDs von GlcT, LicT und SacT lagen in der Arbeitsgruppe schon in einem Überexpressionsvektor vor. Dabei handelte es sich um den Vektor pGP574. Dieser besitzt zur Überproduktion einen IPTG-induzierbaren Promotor sowie eine Strep-Tag-Sequenz, die C-terminal an die RBDs kloniert ist. In diesen Vektor sollten auch die ausgewählten RBDs kloniert werden. Dazu wurden die Primer OS97 und OS98 verwendet. Diese verfügen über Schnittstellen für *NdeI* beziehungsweise *BamHI*. Mit diesen Restriktionsenzymen wurden dann die PCR Produkte und der Vektor pGP574 geschnitten. Es erfolgte eine Ligation der Fragmente mit anschließender Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ . Positiv getestete und sequenziert Plasmide wurden dann zur Überproduktion und Aufreinigung der RBDs benutzt. Die RNA für die Gel-Shift-Analysen wurde mit spezifischen Primern von den Plasmiden amplifiziert, die die getesteten *lacZ*-Fusionen tragen.

In Abb. 4.27. ist der Gel Shift mit der GlcT-RBD zu sehen. Wie zu erwarten war, gibt hier nur die *ptsG*-mRNA eine Verzögerung im Laufverhalten. GlcT bindet spezifisch an die *ptsG*-mRNA.

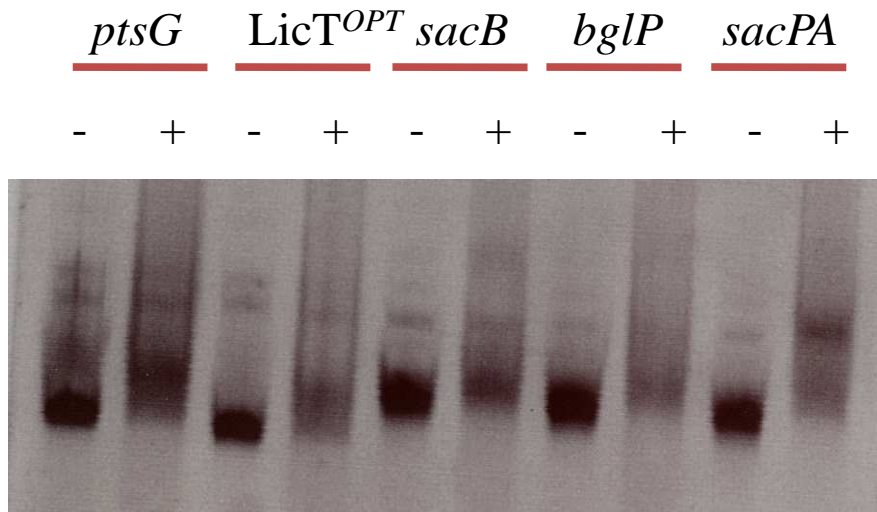


**Abb. 4.27.: Gel-Shift mit der GlcT-RBD**

Die RAT-RNAs wurden mit und ohne 1 µg GlcT-RBD inkubiert und auf einen 12%igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Verzögerung im Laufverhalten ist nur bei der *ptsG* mRNA zu beobachten.

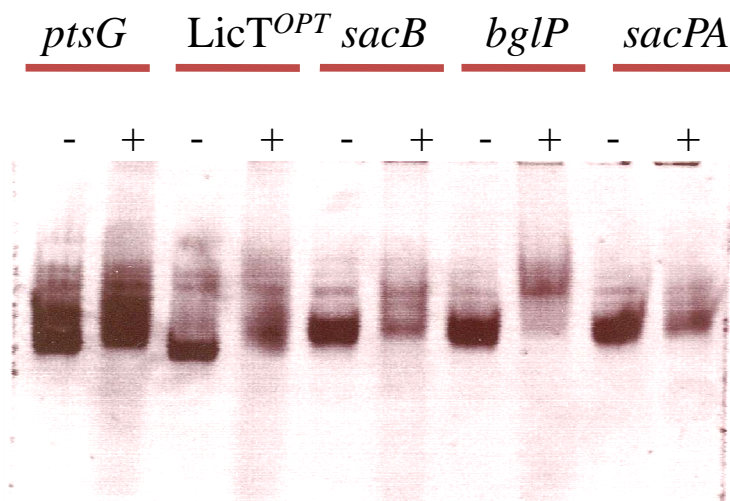
Die SacT-RBD bindet *in vivo* an ihre eigenen Ziele, *sacB* und *sacPA*, aber auch an die LicT abhängige *bglP*-RAT-Struktur. Dies belegt auch der Gel-Shift (Abb. 4.28.). Die entsprechenden RNAs sind im Lauf verzögert.

Die Kontrolle der LicT RBD zeigt auch das erwartete Ergebnis. Die LicT-RBD bindet an die LicT<sup>OPT</sup>-RNA und an die *bglP*-RNA (Abb. 4.29.)



**Abb. 4.28.: Gel-Shift mit der SacT-RBD**

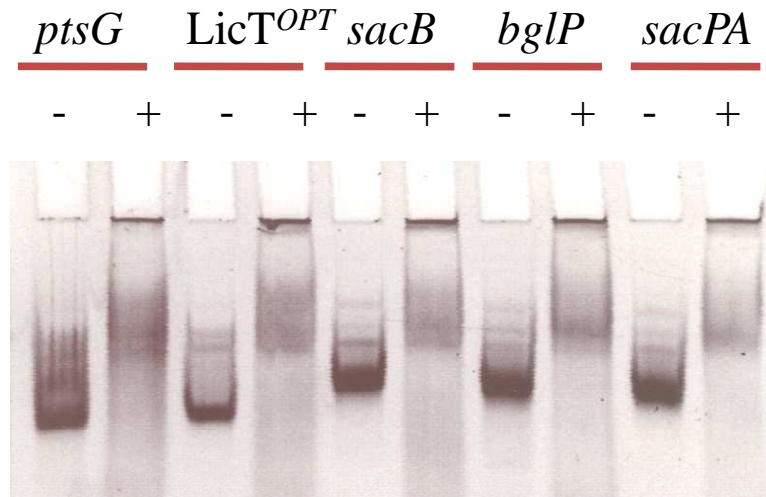
Die RAT-RNAs wurden mit und ohne 1 µg SacT-RBD inkubiert und auf einen 12%igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Verzögerung im Laufverhalten ist bei den mRNA von *sacB*, *bglP* und *sacPA* zu beobachten.



**Abb. 4.29.: Gel-Shift mit der LicT-RBD**

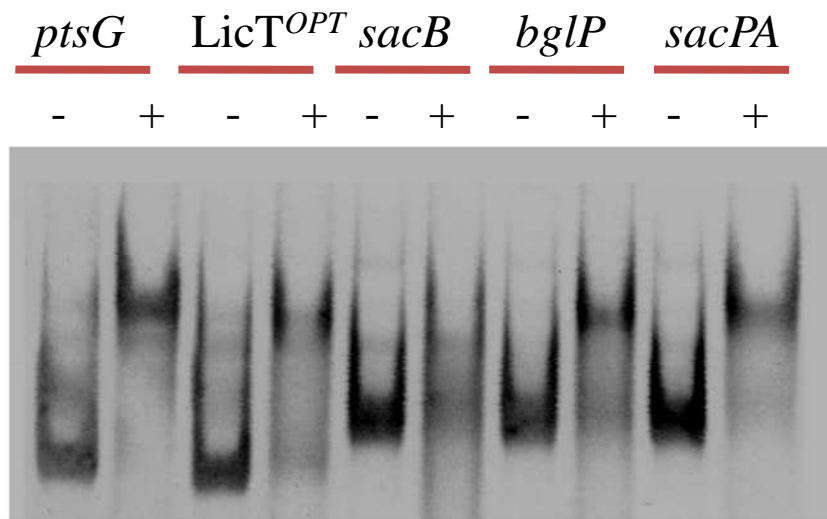
Die RAT-RNAs wurden mit und ohne 1 µg SacT-RBD inkubiert und auf einen 12%igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Verzögerung im Laufverhalten ist nur bei der mRNA *bglP* zu beobachten.

Die mutierten SacT RBD Allele CCR\*3-\*5 zeigen *in vivo* an allen RAT-*lacZ*-Fusionen eine mehr oder weniger starke Aktivität (siehe Tab. 4.5.-4.9.). Es war zu erwarten, dass diese alle mRNAs im Lauf verzögern können. Genau dieses Ergebnis wurde bei den Gel-Shift-Analysen auch erzielt. Die RBD-Mutanten binden an alle RAT-Strukturen (Abb. 4.30.-4.32.).



**Abb. 4.30.: Gel Shift mit der CCR\*3-RBD**

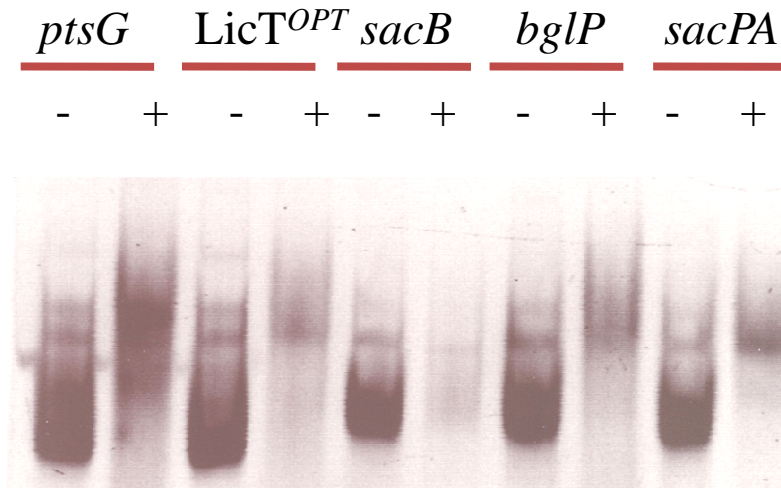
Die RAT-RNAs wurden mit und ohne 1 µg CCR\*3-RBD inkubiert und auf einen 12%igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Verzögerung im Laufverhalten ist bei allen mRNAs zu beobachten.



**Abb. 4.31.:Gel-Shift mit der CCR\*4-RBD**

Die RAT-RNAs wurden mit und ohne 1 µg CCR\*4-RBD inkubiert und auf einen 12%igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Verzögerung im Laufverhalten ist bei allen mRNAs zu beobachten.





**Abb. 4.32.: Gel-Shift mit der CCR\*5-RBD**

Die RAT-RNAs wurden mit und ohne 1 µg CCR\*5-RBD inkubiert und auf einen 12%igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Verzögerung im Laufverhalten ist bei allen mRNAs zu beobachten.

#### 4.4.16. Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass eine RBD so mutiert werden kann, dass sie ihre Spezifität ändert. Allerdings konnte die SacT-RBD nicht dazu gebracht werden spezifisch andere RAT-Strukturen zu binden. Die selektierten Mutationen führten immer zu einem kompletten Verlust der Spezifität. Die mutierten Allele können an allen RAT-Strukturen in *B. subtilis* Antitermination auslösen. Sogar die strikte Grenze zwischen dem *ptsG*-RAT und dem Rest der BglG-Familie durchbrechen diese mutierten SacT-RBDs.

## 5. Diskussion

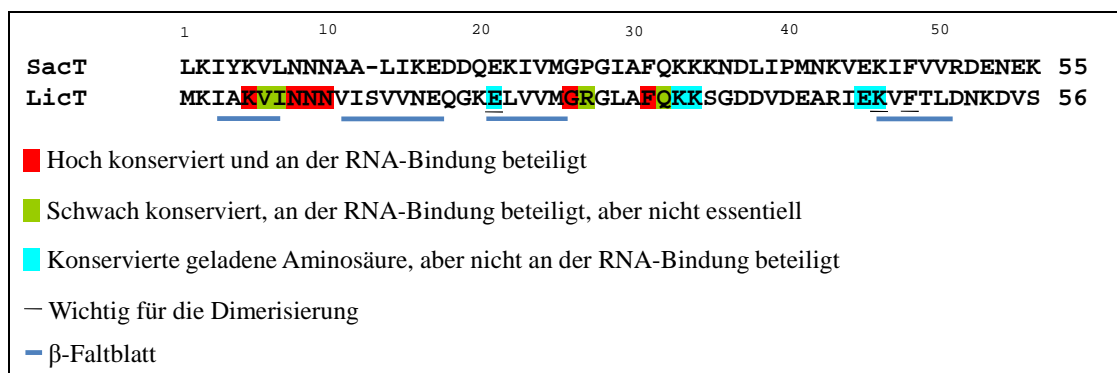
### 5.1. Spezifität der Zuckeraufnahme

*B. subtilis* ist ein Bodenbakterium. Durch diesen Lebensraum muss *B. subtilis* darauf eingestellt sein, sich schnell auf andere Lebensumstände einstellen zu können. Die Aufnahme der Kohlenstoffquelle, die am meisten Energie liefert, ist dabei von entscheidender Bedeutung. Nur so kann sichergestellt werden, dass der *B. subtilis* die Möglichkeit besitzt, sich gegen andere Organismen durchzusetzen und das Überleben zu sichern. Um keine Energie bei der Synthese von Proteinen zu verschwenden, die nicht benötigt werden, ist die Regulation der Aufnahme von Zuckern durch verschiedene Systeme sichergestellt. Zum einen wird die Synthese der Gene des Zuckerstoffwechsels durch die Kohlenstoff-Kataboliten-Repression kontrolliert (Deutscher *et al.*, 2006; Görke und Stülke, 2008). Die Aufnahme einiger PTS-Zucker wird durch Antitermination kontrolliert. In dieser Arbeit wurde die Spezifität dieser Systeme genauer untersucht. Dazu wurde die RNA-bindende Domäne von SacT mutiert. Diese mutierten SacT-RBDs wurden dahingehend untersucht, ob sie die Aufgaben der LicT-RBD übernehmen können. Es konnte eine Mutante isoliert werden, die diese Eigenschaft besitzt. Diese Mutante (XL1\*1) besitzt eine Mutation in der Aminosäure 26. Es wurde ein Prolin gegen ein Serin ausgetauscht. Diese Mutation war ausreichend, dass die SacT-RBD die Aufgaben von LicT übernehmen kann. Überraschenderweise führte diese Mutation aber nicht zu einer kompletten Änderung der Spezifität der SacT-RBD. Die Mutation führte dazu, dass diese RBD nun alle RAT-Sequenzen aus *B. subtilis* binden konnte. Die Auswirkungen der Mutationen werden im Folgenden diskutiert.

#### 5.1.1. Die Struktur der RNA-bindenden Domänen der BglG-Familie von Antiterminationsproteinen

Die Interaktionen zwischen den RAT-RNAs und den RNA-bindenden Domänen sind sehr gut untersucht (Langbein *et al.*, 1999; Schilling *et al.*, 2004 und 2006; Yang *et al.*, 2002). Die Struktur der RNA-bindenden Domänen von SacY und LicT sind dabei aufgeklärt worden (Manival *et al.*, 1997; Declerck *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 55 Aminosäuren von SacY ausreichen, um spezifisch für Antitermination zu sorgen. Das verkürzte SacY zeigt weder einen Unterschied in der Spezifität noch in der Affinität

verglichen mit dem kompletten SacY (Manival *et al.*, 1997). Gleiches gilt auch für GlcT. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Aussage auch auf die RBDs von SacT und LicT zutrifft. Die Aktivität ist aufgrund der fehlenden regulatorischen PRDs komplett zuckerunabhängig. Die RBDs von SacY und LicT bilden dabei symmetrische Dimere (Manival *et al.*, 1997;). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der RBDs kann davon ausgegangen werden, dass sich alle RBDs der BglG-Familie gleich falten. Um die Auswirkung der in dieser Arbeit erhaltenen Mutationen in der RBD von SacT besser zu verstehen, wird im Folgenden genauer auf die Struktur der RBDs eingegangen und die Lage bzw. die Interaktionen der einzelnen Aminosäuren genauer analysiert.

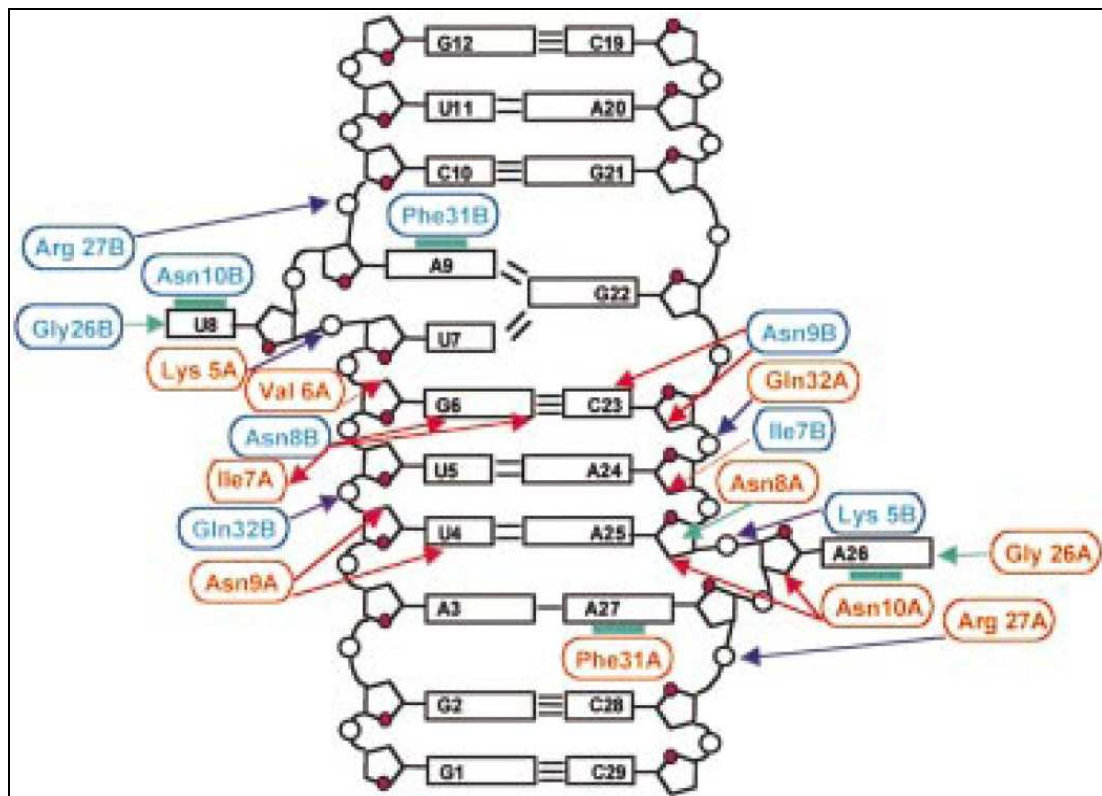


**Abb. 5.1.: Schematische Darstellung der Regionen der LicT-RBD (nach Yang *et al.*, 2002) im Vergleich zur SacT-RBD**

Die Struktur der Antiterminationsproteine ist sehr stark konserviert. Dies gilt für die  $\beta$ -Faltblätter sogar noch stärker als für die Aminosäuren, die für den RNA-Kontakt sorgen.

Ein Monomer der RBDs von SacY und LicT bildet vier  $\beta$ -Faltblätter, die durch Loopregionen miteinander verbunden sind. Diese  $\beta$ -Faltblätter sind in ihrer Sequenz extrem konserviert (van Tilbeurgh *et al.*, 1997). Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Strukturen aller RBDs sehr ähnlich sind. Die beiden Monomere, die das aktive Antiterminationsprotein bilden, lagern sich asymmetrisch aneinander. Die  $\beta$ -Faltblätter bilden dabei eine hydrophobe Tasche. Diese Anordnung von  $\beta$ -Faltblättern ist von einigen anderen Proteinen bekannt, die doppelsträngige RNAs binden oder über eine sogenannte KH-Domäne verfügen (Bycroft *et al.*, 1995; Kharrat *et al.*, 1995; Musco *et al.*, 1996). Die Loopregionen sind nicht so stark konserviert und ragen am Ende des Dimeres hinaus. Diese Loopregionen stellen den Kontakt mit der RAT-RNA her. In Abb. 5.1. sind die verschiedenen Bereiche der RBD von LicT gezeigt. In dem Loop zwischen dem ersten und dem zweiten  $\beta$ -Faltblatt liegen die Aminosäuren 7-10. Im Loop zwischen dem dritten  $\beta$ -Faltblatt und dem vierten liegen die

Aminosäuren 26 und 27 sowie 21 und 32. Diese Aminosäuren sind an der Front des Proteins lokalisiert und interagieren direkt mit der RAT-RNA. Die genaue Art der Interaktion ist in Abb. 5.2. dargestellt. Es kommt zu Wasserstoffbrückenbindungen sowie zu van der Waals-Interaktionen (Yang *et al.*, 2002). Die Zusammensetzung der am Kontakt beteiligten Aminosäuren ist etwas überraschend. Normalerweise geht man davon aus, dass der Kontakt zur negativ geladenen RNA über positiv geladene Aminosäuren stattfindet.



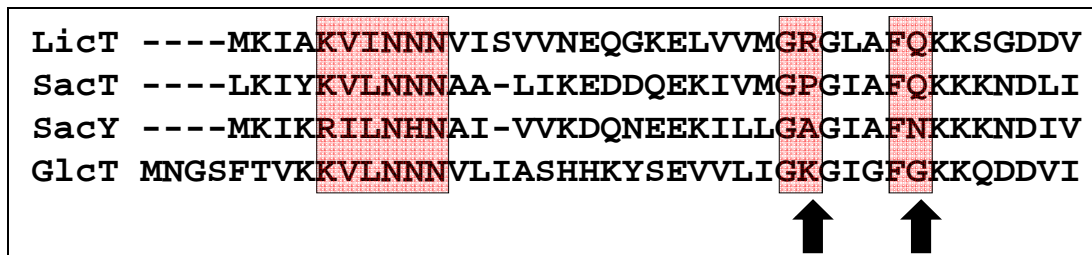
**Abb. 5.2.: Schema der Protein-RNA Interaktion**

Aminosäuren in Blau gehören zu einer Untereinheit des Dimers, die in Rot zum anderen. Rote Pfeile: Wasserstoffbrückenbindungen mit Seitenketten der Aminosäuren; Unterbrochene rote Pfeile: Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Proteinrückgrat; Grüne Pfeile: Van der Waals Interaktionen; Lila Pfeile: Mögliche Interaktionen mit dem RNA-Phosphodiester-Rückgrat. (Yang *et al.*, 2002)

Dies ist hier nicht der Fall. Der Kontakt wird hauptsächlich über Asparagine sowie über Glycin und Phenylalanin hergestellt. Lediglich bei Lysin 5 und Arginin 27 handelt es sich um positiv geladene Aminosäuren.

### 5.1.2. Der Einfluss der Pro26Ser Mutation auf die Struktur und die Aktivität der SacT-RBD

Durch die Mutagenese mit dem *E. coli* Stamm XL1-Red konnte ein mutiertes SacT-Allel isoliert werden, welches in der Lage ist, alle RAT-Strukturen in *B. subtilis* zu binden. Die Mutation änderte das Prolin 26 in ein Serin. Laut Alignment (Abb. 5.3.) sitzt das Prolin 26 in SacT an der gleichen Position wie das Arginin 27 in LicT. Diese Aminosäure ist neben dem Glutamin 32, die einzige, die nicht konserviert ist, obwohl sie direkt an der RNA-Bindung beteiligt ist. SacY besitzt an dieser Stelle ein Alanin. Declerck *et al.* (1999) konnten zeigen, dass diese Aminosäure in SacY nicht an der RNA-Bindung beteiligt ist. Man kann davon ausgehen, dass dies auch auf das Prolin in SacT zutrifft. Dieser Unterschied zwischen LicT und SacY/SacT ist vermutlich mit der Größe der Aminosäuren zu erklären. Die kleinen Seitenketten von Alanin und Prolin reichen nicht aus, um den Kontakt mit der RNA herzustellen. Arginin hingegen gehört zu den größeren Aminosäuren und so kann die Seitenkette hier direkt das Phosphatrückgrat der RNA zwischen den Basen A9 und C10 binden. Es wurde daher vermutet, dass das Arginin direkten Einfluß auf die Spezifität von LicT hat (Yang *et al.*, 2002). Dies wird dadurch unterstützt, dass alle Mitglieder der BglG-Familie, die an Position 27 ein Arginin haben, die gleichen RAT-Strukturen binden. Dies gilt für die RBDs der Proteine ArbG aus *Erwinia chrysanthemi* und für BglG aus *E. coli*. Jedes dieser drei Proteine bindet an RAT-Strukturen, deren unterer Loop aus einer Adenin-Dreifach-Basenpaarung besteht (Yang *et al.*, 2002). Frühere Untersuchungen der Funktion des Alanins in SacY deuteten allerdings daraufhin, dass diese Aminosäure nicht notwendig ist für die korrekte Erkennung der RAT-Struktur (Declerck *et al.*, 1999). Ein Austausch des Alanins gegen ein Arginin führt hier zu einer Verbesserung der Bindung. Es konnte allerdings ebenfalls gezeigt werden, dass dieser Effekt auch durch ein Serin erzielt werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt des Austausches zu einem Serin in SacT anders äußert als in SacY. Hier führt der Austausch nicht zu einer Verbesserung der Bindung an die eigentliche RAT-Struktur (*sacPA*). Allerdings verhält sich diese Mutante nun völlig unspezifisch und bindet jede RAT-Struktur in *B. subtilis*. Dabei wird besonders gut die LicT<sup>OPT</sup>-*lacZ*-Fusion erkannt. Die Erkennung anderer RAT-Strukturen durch die verschiedenen SacY-Mutanten wurde von Declerck *et al.* nicht untersucht. Es wäre allerdings zu erwarten, dass sich diese Mutanten ähnlich unspezifisch verhalten, wie die hier isolierten SacT-Allele.



**Abbildung 5.3.: Alignment der Sequenzen der RNA-bindenden Domänen der Antiterminationsproteine LicT, SacT, SacY und GlcT.**

In rot markiert sind die Aminosäuren, die laut LicT-*bglP*-Struktur direkt an der RNA-Bindung beteiligt sind. Die zwei Pfeile markieren die Aminosäuren in SacT, die in dieser Arbeit mutiert wurden.

### 5.1.3. Warum sind die SacT-Varianten unspezifisch?

Um die Effekte von Mutationen an der Position 26 der SacT-RBD weiter zu untersuchen, wurden durch eine CCR gezielt Mutationen an dieser Stelle eingefügt. Da es an der Position 32 in LicT eine weitere Aminosäure gibt, die an der RNA-Bindung beteiligt ist, aber nicht konserviert ist, wurde diese ebenfalls mutiert. Überraschenderweise konnte eine große Anzahl verschiedener Allele mit komplett unterschiedlichen Zusammensetzungen von Aminosäuren an diesen Positionen isoliert werden. Es konnten neben den erwarteten Aminosäuren Serin und Arginin auch Valin, Cystein, und Alanin an der Position 26 isoliert werden. An der Position 31 wurden Allele mit den Aminosäuren Arginin, Leucin, Glycin, Serin, Lysin und Alanin gefunden. Im klassischen Fall der RNA-Bindung müsste man davon ausgehen, dass hauptsächlich positiv geladene Aminosäuren selektiert werden, da diese die negativ geladene RNA besser binden können. Da dies allerdings nicht der Fall ist, unterstützt das die These, dass die Bindung der RAT-RNA nicht auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert.

In Tab. 5.1. sind die Ergebnisse der Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität noch einmal vereinfacht aufgeführt. Man erkennt deutlich, dass alle isolierten Allele unspezifisch die RAT-Strukturen erkennen können. Einzige Ausnahme davon bildet das Allel mit der Kombination Cystein/Serin. Dieses bindet nur schwach an die LicT<sup>OPT</sup>-Sequenz und gut die *sacB*-RAT-Struktur. Ansonsten lassen sich keinerlei Rückschlüsse aus der Zusammensetzung der Allele bezüglich ihrer Spezifität ziehen.

| RBD   | Mutation | LicT <sup>OPT</sup> | sacPA | sacB | bglP | ptsG |                |
|-------|----------|---------------------|-------|------|------|------|----------------|
| GlcT  | K/G      | -                   | -     | -    | -    | +++  |                |
| SacT  | P/Q      | -                   | +++   | +++  | +++  | -    |                |
| LicT  | R/Q      | +++                 | -     | -    | +++  | -    |                |
| XL*1  | S/Q      | ++                  | +     | ++   | +++  | -    | 0-25%<br>-     |
| CCR*1 | S/R      | +                   | ++    | +    | +    | -    | 26-50%<br>+    |
| CCR*2 | C/L      | +++                 | +     | +++  | +++  | ++   | 51 - 99%<br>++ |
| CCR*3 | R/R      | ++                  | +     | +++  | ++   | +    | ≥ 100%<br>+++  |
| CCR*4 | C/R      | +                   | +     | +++  | ++   | +    |                |
| CCR*5 | S/G      | ++                  | +++   | +++  | +++  | ++   |                |
| CCR*6 | V/G      | -                   | -     | +++  | +++  | ++   |                |
| CCR*7 | C/S      | +                   | -     | +++  | -    | -    |                |
| CCR*8 | A/K      | -                   | ++    | +++  | +++  | -    |                |
| CCR*9 | R/A      | ++                  | +     | +++  | ++   | ++   |                |

**Tab. 5.1. Schema der erhaltenen SacT-RBD Allele**

Angaben in % der jeweiligen Aktivität der Wildtyp-RBD.

#### 5.1.4. Wie wird die Spezifität der RNA-Bindung erreicht?

Aus allen in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und den vorangegangenen Untersuchungen der Strukturen von SacY und LicT lassen sich Rückschlüsse auf die Spezifität der Antiterminationsproteine bezüglich ihrer RNA-Bindung ziehen. Die stark konservierten Asparagine 8-10 sind absolut essentiell für die RNA-Bindung und können nicht mutiert werden (van Tilbeurgh *et al.*, 2001). Dies gilt ebenfalls für die beiden Glycine, die die Position 26/27 umgeben. Das zweite Glycin ist allerdings nicht direkt an der Bindung der RNA beteiligt, sondern sorgt dafür, dass die für die Bindung wichtigste Aminosäure richtig positioniert wird. Dabei handelt es sich um das Phenylalanin 30/31. Diese Aminosäure trägt am meisten zur Stabilität des RNA-Protein-Komplexes bei. Da diese Aminosäuren aber universell konserviert sind, können sie nicht für Spezifität sorgen. Hinter den Aminosäuren 30/31 kommen noch Gruppen von positiv geladenen Aminosäuren vor. Diese können allerdings gegen nicht geladene ausgetauscht werden, ohne dass die RNA-Bindeaktivität verloren geht. Sie spielen vermutlich eine Rolle bei intramolekularen Interaktionen. Hier konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den Aminosäuren 26 und 31 in SacT die Spezifität beeinflussen. Die Spezifität geht verloren. Es bleibt also zu klären, wie die RBDs es schaffen, spezifisch zu bleiben. Es ist allerdings auch zu beobachten, dass es mit SacT und SacY auch

RBDs gibt, die schon im Wildtypzustand relativ unspezifisch sind und die LicT-abhängigen RAT-Strukturen binden können. Dieser Verlust von Spezifität, besonders im Fall von SacY, liegt vermutlich an der Anhäufung von aromatischen oder positiv geladenen Aminosäuren. Dies gilt hauptsächlich für die Position 4. Dort befindet sich in SacT ein Tyrosin und in SacY ein Lysin. Diese verstärken vermutlich unspezifisch die Bindung an die RNA. Es konnte ebenfalls für SacY gezeigt werden, dass die drei Lysine 15, 21 und 50 die RNA-Bindung verbessern. Diese Lysine sind nur in SacT und SacY vorhanden. Sie fehlen in LicT und GlcT. In Kombination mit den hier isolierten Mutationen wird die Bindung der SacT-RBD vermutlich noch verstärkt. Dadurch werden alle RAT-Strukturen unspezifisch gebunden.

### 5.1.5. Wie wird die Spezifität aufrecht erhalten?

Die Spezifität der einzelnen RBDs reicht nicht aus, um die notwendige Kontrolle der Expression aufrecht zu erhalten. Die PRDs sind zwangsläufig notwendig, damit nur der beste Zucker aufgenommen wird. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsgrade der PRDs geben die Information an die RBD weiter. Obwohl die RBDs alleine aktiv sind, konnte für LicT gezeigt werden, dass die LicT-RBD *in vitro* die Aktivität verliert, wenn nur die PRDI angehängt wird (Déméné *et al.*, 2008). Auch *in vivo* ist ein RBD-PRDI Konstrukt nicht in der Lage, Antitermination zu vermitteln (Tortosa *et al.*, 2001). Dies ist insofern überraschend, da die PRDI im unphosphorylierten Zustand aktiv ist. Entscheidend für Übermittlung der Information zur RBD und damit für die Spezifität ist also der Dimerisierungszustand der beiden PRDs. Nur wenn beide PRDs vorhanden sind, kann die Regulation spezifisch ablaufen. Im inaktiven Zustand bildet die PRDII keine Dimere. Die PRDII vollzieht dabei drastische Bewegungen im Raum und verhindert so die Dimerisierung der PRDI. Durch die HPr-abhängige Phosphorylierung wird die korrekte Dimerbildung stabilisiert (Declerck *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung sorgt dafür, dass die Helices der PRDII enger zusammenkommen und dadurch Salzbrücken entstehen können. Der Effekt dieser Dimerisierung ist, dass eine kurze Aminosäuresequenz aus dem Raum zwischen den beiden PRDI-Untereinheiten entfernt wird (Graille *et al.*, 2005). So kann die PRDI festere Dimere bilden. Dies hat wiederum eine Veränderung in der verbindenden Region zwischen der RBD und der PRDI zur Folge. Diese Region bildet im inaktiven Zustand eine  $\alpha$ -Helix. Sobald die PRDI dimerisiert, verliert diese Region die Struktur und die RBD kann ebenfalls Dimere bilden (Déméné *et al.*, 2008). Für diese Änderung entscheidend ist die Aminosäure 65. Von



dieser Aminosäure hängt ab, ob die Information des Zuckerangebotes die RBD erreicht. Es gibt keine sonstigen Interaktionen zwischen der RBD und der PRDI. Die RBD bildet zwar auch im inaktiven Zustand schon Dimere, ist aber nicht in der Lage, die RAT-Strukturen zu binden. Das Dimer im aktiven Zustand ist dann identisch mit dem der überproduzierten RBD allein. Diese Aktivierungskaskade konnte auch mit ständig aktiven PRDII-Allelen gezeigt werden (Declerck *et al.*, 2001; van Tilbeurgh *et al.*, 2001; Tortosa *et al.*, 2001). In diesen Mutanten wird die Phosphorylierung der Histidine durch Aspartate vorgetäuscht. Diese LicT-Allele sind dann ständig aktiv und nicht mehr abhängig vom Zuckerangebot. Sie werden, wie die Allele in dieser Arbeit, unspezifisch.

Auch die De-/Aktivierung der PRDI muss spezifisch durch die Phosphorylierung übermittelt werden. Die PRDI bildet im nicht phosphorylierten Zustand relativ kompakte Dimere. Diese Struktur macht es praktisch unmöglich, dass nachträglich eine Phosphorylierung durch das Enzym II stattfinden kann, da die Histidine nicht frei zugänglich sind. Es konnte gezeigt werden, dass das Antiterminationsprotein BglG aus *E. coli* im inaktiven Zustand an der Membran am Enzym II BglF lokalisiert ist (Lopian *et al.*, 2003). Durch die Aktivierung dephosphoryliert BglF die PRDI.

Die komplette Kontrolle der Expression der zuckerspezifischen Enzym II-Permeasen erfordert eine extreme Kopplung von hochspezifischen Aktionen. Die Bindung der PRDI an die Permease muss sehr spezifisch sein. Die aktivierende Phosphorylierung durch HPr muss spezifisch am richtigen Histidin der entsprechenden PRDII erfolgen. Ein besonders Maß an Spezifität erfordert allerdings der direkte Protein-RNA-Kontakt. Hier können kleinste Veränderungen in der RAT-Struktur dazu führen, dass „falsche“ Antiterminationsproteine binden (Schilling *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2006; Aymerich und Steinmetz, 1992). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch auf Proteinebene kleinste Veränderungen ausreichen, um das ganze System aus dem Gleichgewicht zu bringen.

### **5.1.6. Gibt es „unspezifische“ Allele in anderen Organismen?**

Durch die immer größer werdende Anzahl an vollständig sequenzierten Genomen liegt es nahe, zu überprüfen, ob die Allele, die in dieser Arbeit isoliert wurden, in der Natur auftreten. Es wurden Alignments mit allen bekannten RBD-Sequenzen erstellt und daraufhin analysiert, welche Varianten der RBDs bezüglich der Aminosäuren 26 und 31 vorkommen. Das Ergebnis ist in Tabelle 5.2. gezeigt.

| GlcT | LicT | SacT | SacY | XL1<br>*1 | CCR<br>*1 | CCR<br>*2 | CCR<br>*3 | CCR<br>*4 | CCR<br>*5 | CCR<br>*6 | CCR<br>*7 | CCR<br>*8 | CCR<br>*9 |
|------|------|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| K/G  | R/Q  | P/Q  | A/N  | S/Q       | S/R       | C/L       | R/R       | C/R       | S/G       | V/G       | C/S       | A/K       | R/A       |
| 52   | 37   | 6    | 1    | 2         | 0         | 0         | 2         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         |

**Tab. 5.2.: Natürliches Vorkommen der Kombinationen der Aminosäuren 26 und 31 in RBDs**

In der oberen Zeile sind die in dieser Arbeit isolierten und verwendeten Allele gezeigt, sowie die vier natürlich in *B. subtilis* vorkommenden RBDs. Die zweite Zeile gibt die Sequenz an, die die RBDs an den entsprechenden Positionen 26 und 31 (in SacT) haben. In der dritten Zeile ist die Anzahl des Auftretens in der Sequenzdatenbank angegeben.

Die Variante des Lysin/Glycin Paares, wie es in GlcT zu finden ist, ist mit Abstand die am häufigsten vorkommende Kombination. Danach folgt die in LicT vertretene Kombination Arginin/Glutamin. Die Paarung Lysin/Aspartat kommt in ungefähr 30 bekannten RBDs vor. Sie ist in *B. subtilis* nicht vertreten. Ein Beispiel für diese Kombination ist das Protein BvrA aus *Listeria monocytogenes*. Überraschenderweise findet man sonst nur wenige andere Kombinationen, die häufiger vertreten sind. Die meisten treten maximal 5-mal in der kompletten Datenbank auf. Dies ist ein eindeutiges Zeichen dafür, dass die RBDs hochspezifisch sind und nicht sehr tolerant gegenüber Mutationen. Es fällt allerdings auf, dass in den meisten anderen Allelen immer mindestens eine positiv geladene Aminosäure vorkommt. Am häufigsten treten Kombinationen mit einem Lysin auf. Die Kombinationen, wie sie in SacT und SacY vorkommen, sind in der Natur auch selten zu finden. Das deutet daraufhin, dass die relativ geringe Spezifität dieser beiden RBDs ein Selektionsnachteil ist. Auch alle in dieser Arbeit identifizierten unspezifischen Allele treten natürlich praktisch nicht auf. Es bleibt festzustellen, dass die beiden RBDs aus *B. subtilis*, die nicht in der Lage sind, andere RAT-Strukturen als ihre eigenen zu binden, sehr stark konserviert sind. Die Spezifität dieser RBDs setzt sich durch.

### 5.1.7. Spezifität in der PTS-Regulation

Obwohl viele Komponenten an der Regulation der Zuckeraufnahme beteiligt sind, können weitere unspezifische Interaktionen beobachtet werden. Dies geschieht nicht nur auf Ebene der RNA-Bindung, wie im Beispiel von SacT und SacY, sondern auch auf der Ebene der Phosphorylierung der PRDs, sowie bei der direkten Zuckeraufnahme durch die zuckerspezifischen Enzym II-Permeasen.

Wie bereits erwähnt wird die PRDI durch das Enzym II phosphoryliert und inaktiviert, während die PRDII durch Phosphorylierung durch HPr aktiviert wird. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass die LicT-PRDI *in vitro* durch HPr phosphoryliert werden kann (Lindner *et al.*, 1999; Tortosa *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich aber um ein *in vitro* Artefakt, das im direkten Zusammenhang mit der eingesetzten Konzentration steht. Dies Beispiel demonstriert aber wiederum, wie genau solche Interaktionen reguliert sein müssen, d.h. wie spezifisch sie sein müssen, damit die Regulation wie gewünscht abläuft.

Auch bei der Aufnahme der Zucker ist ein Mangel an Spezifität zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ptsG* auch mit den Zuckern Salicin und Saccharose induziert wird (Langbein *et al.*, 1999). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Induktion daher kommt, dass das Enzym II<sup>Glc</sup> unspezifisch Salicin und Saccharose in die Zelle transportiert und so GlcT aktiv ist und die Expression von *ptsG* ermöglicht. Hinzu kommt, dass beobachtet wurde, dass eine Deletion der Salicin-Permease BglP nicht zu einem Verlust der Fähigkeit Salicin zu verwerten führt. Für BglP konnte ein ähnlicher Effekt bei der Aufnahme von Glukose festgestellt werden (Schilling *et al.*, 2006). BglP ist in der Lage Glukose zu transportieren. Dies geschieht allerdings mit einer geringen Effizienz und setzt voraus, dass das *glcT* deletiert ist und somit PtsG als Permease nicht zur Verfügung steht. Im Wildtyp wird die Expression von *bglP* durch Glukose mittels Katabolitenrepression verhindert. Auch in *Staphylococcus carnosus* konnte gezeigt werden, dass die Glukosepermease GlcB neben Glukose auch Salicin transportieren kann (Christiansen und Hengstenberg, 1999). Das Phänomen des unspezifischen Zuckertransports ist nicht auf *B. subtilis* beschränkt.

Neben den Antiterminationsproteinen gibt es noch weitere Regulatoren, die durch den Phosphorylierungszustand von PRDs kontrolliert werden. Bei diesen Regulatoren handelt es sich um Transkriptionsaktivatoren wie LevR oder LicR.

LevR reguliert die Expression des *lev*-Operons, welches für Gene für die Aufnahme von Fructose und Mannose sowie eine extrazelluläre Levanase kodiert (Débarbouillé *et al.*, 1991; Charrier *et al.*, 1997; Martin-Verstraete *et al.*, 1990). LevR ist ein DNA-bindendes Protein, welches N-terminal über ein Helix-Turn-Helix-Motiv verfügt (Martin-Verstraete *et al.*, 1994). LevR verfügt über zwei getrennt liegende PRDs. Die PRDI besitzt beide konservierte Histidin-Reste. Es konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, ob und wodurch diese phosphoryliert werden (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). Die PRDII wird durch das

EIIB<sup>Lev</sup> LevE phosphoryliert (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). Wie bei den Antiterminationsproteinen hat die Phosphorylierung einen negativen Effekt auf die Aktivität.

Der Transkriptionsaktivator LicR besitzt ebenfalls zwei PRDs. Es kontrolliert die Expression des *licRBCAH*-Operons (Tobisch *et al.*, 1997). Auch dieser Regulator besitzt N-terminal eine DNA-bindende Domäne (Tobisch *et al.*, 1999). Die Aktivität wird auch hier durch negativ durch Phosphorylierung durch das entsprechende Enzym II LicA oder LicB gesteuert.

Auch in der Regulation der Pathogenität spielen PRDs eine Rolle. In *Bacillus anthracis* wird der Transkriptionsregulator AtxA durch die Phosphorylierung an PRDs kontrolliert (Tsvetanova *et al.*, 2007). Hier entscheidet das Zuckerangebot, ob *B. anthracis* seine Toxine exprimiert oder nicht. Die Phosphorylierung findet auch hier durch Enzyme des PTS an den konservierten Histidinen statt.

## 5.2. Spezifitätsdeterminanten von anderen Antiterminationsproteinen in *B. subtilis*

Auch bei anderen Antiterminationsproteinen aus *B. subtilis* wurde die Spezifität genauer untersucht.

Eine ähnliche Untersuchung wie für die RAT-RBD Interaktionen wurde auch für das Antiterminationsprotein HutP durchgeführt. Es wurden sowohl die wichtigen Reste der RNA als auch die des Proteins identifiziert (Kumarevel *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2004). Die Sequenz die HutP in der *hut*-mRNA bindet, ist eine dreifache Wiederholung der Basen UAG (Kumarevel *et al.*, 2004). Obwohl in allen dieser Triplets das Uracil an erster Stelle steht, kann es ohne Verlust von Aktivität, in jede andere Base mutiert werden. Die beiden nachfolgenden Basen hingegen können nicht mutiert werden, ohne dass die Bindung zerstört wird. Durch den Einsatz von Basenanalogen konnte gezeigt werden, dass die Aminogruppen der Basen, sowie die 2'-Hydroxylgruppe des Adenin die Erkennungsstellen des HutP sind. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde vorgeschlagen, dass das Glutamat 137 von HutP den Kontakt mit der RNA herstellt, da dieses über entsprechende chemische Gruppen verfügt, um den Kontakt herzustellen. Durch eine vollständige Alanin-Mutagenese des N-terminalen Bereichs von HutP konnten wichtige Aminosäuren identifiziert werden, die an der RNA-Bindung beteiligt sind (Oda *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um ein Histidin, ein Arginin, ein Isoleucin und ein Glutamin. Ähnlich wie in den Antiterminationsproteinen des PTS wird also auch hier der Kontakt nicht hauptsächlich über positiv geladene Aminosäuren hergestellt

sondern vermutlich auch eher durch spezifische Wechselwirkungen. Wie auch an der Position 26 in SacY wurden auch in dieser Studie gezielt Aminosäuren gegen positiv-geladene Aminosäuren ausgetauscht. Der Effekt ist der gleiche wie in SacY mit einem Arginin an Position 26. Die Bindung zur RNA wird verbessert. Ob diese nun allerdings unspezifisch ist, kann in diesem Fall nicht überprüft werden, da es kein weiteres Ziel für HutP gibt.

Das Antiterminationsprotein TRAP sorgt für die Regulation der Gene für die Tryptophanbiosynthese (siehe Einleitung Kapitel 2.3.5.1). Dies geschieht in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration von Tryptophan. TRAP bindet direkt Tryptophan und sorgt so für die Regulation. Für das TRAP-Protein wurden Experimente durchgeführt, die in der Isolation von Mutanten resultierten, die nicht mehr abhängig vom Tryptophanangebot sind (Yakhnin *et al.*, 2000). Auch in diesem Protein reicht ein Aminosäureaustausch aus, um die Regulation komplett unspezifisch werden zu lassen. In diesem Fall ändert sich aber nicht die Bindung der RNA, sondern die Wahrnehmung des Substrates wird verändert. Das ausgetauschte Tyrosin liegt direkt in der Bindetasche für Tryptophan und stellt Kontakt mit der Aminogruppe her. Wird dieses Tyrosin gegen ein Valin ausgetauscht, verhält sich das TRAP-Protein als wäre konstant Tryptophan gebunden. Dies führt zu nicht-regulierter Antitermination am *trp*-Operon. Selbst wenn kein Tryptophan vorhanden ist, kann *B. subtilis* nun kein Tryptophan mehr synthetisieren. Aber auch die RNA-Bindung wird durch diese Mutation beeinflusst (Li und Gollnick *et al.* 2004). Die RNA-Bindung ist stärker von Ionen abhängig als im Wildtyp TRAP. Die Affinität des Proteins zur RNA bleibt dabei aber unverändert. Die in dieser Arbeit isolierten Varianten der SacT-RBD haben eine stark veränderte Affinität zur RNA und werden dadurch unspezifisch. Man geht davon aus, dass die Struktur der RNA durch das mutierte TRAP leicht verändert wird. Genau wie die Regulation der Zuckeraufnahme ist auch die Regulation der Tryptophanbiosynthese auf vielen Ebenen auf extreme Spezifität angewiesen, damit es nicht zu Fehlern der Expression kommen kann. Interessanterweise läuft die Regulation in dem nahen Verwandten *B. halodurans* etwas anders ab (Szigeti *et al.*, 2003). Hier fehlt das AT und auch die RNA-Struktur des 5'-untranslatierten Bereichs der *trp*-mRNA ist komplett anders als in *B. subtilis*. Die Regulation ist nicht so stark konserviert wie die durch PTS-Zucker, wo sogar BglF aus *E. coli* das LicT aus *B. subtilis* spezifisch phosphorylieren kann (Schnetzer *et al.*, 1996).

Die Spezifität der RNA-Protein Interaktion ist im Falle der BglG-Familie besonders wichtig, da es hier mehrere Mitglieder der gleichen Proteinklasse in einem Organismus gibt, die sehr ähnliche Ziele binden. Im Falle der beiden anderen beschriebenen

Antiterminationsproteine ist dieser Druck nicht so groß, da jeweils nur ein Ziel kontrolliert wird. Es ist daher erstaunlich, dass auch in diesen Systeme kleinste Veränderung der Protein- oder RNA-Sequenz die Spezifität drastisch beeinflussen können.

### 5.3. Ausblick

Ausgehend von der Identifikation der Aminosäuren in SacT, die für die Spezifität der RNA-Bindung essentiell sind, können nun weitere Analysen durchgeführt werden. Die Aminosäuren 26 und 31 könnten gezielt gegen bestimmte andere ausgetauscht werden. Es könnte versucht werden, SacT so zu verändern, dass die Kombination der anderen Antiterminationsproteinen eingeführt wird. So könnte getestet werden, ob die Positionen 26 und 31 tatsächlich für die Spezifität zuständig sind oder ob diese nur die Stärke der Bindung an die RNA beeinflussen. In dieser Arbeit wurden ebenfalls Versuche unternommen, die RBD von LicT zu verändern. Es konnten allerdings keine Varianten isoliert werden, die die RAT-Struktur von *sacPA* binden. Es werden weitere Untersuchungen durchgeführt sowohl die RBD von LicT als auch die RBD von GlcT zu verändern, um die Rolle der Positionen 26 und 31 weiter zu charakterisieren.

Die Untersuchungen der Strukturen der Komplexe der Antiterminationsproteine mit den PTS-Proteinen HPr und Enzym II werden zurzeit im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie durchgeführt. Durch die erfolgreiche Rekonstruktion der kompletten Phosphorylierungskaskade des PTS *in vitro* konnten die Untersuchungen weit vorangetrieben werden, da so das Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer komplett auf eine Seite geschoben werden konnte. Die Analyse der Strukturen ist in Arbeit.

**Altuvia, S.; Kornitzer, D.; Teff, D. & Oppenheim, A. B.** (1989), 'Alternative mRNA structures of the *cIII* gene of bacteriophage lambda determine the rate of its translation initiation.', *J Mol Biol* **210**(2), 265--280.

**Amster-Choder, O.** (2005), 'The *bgl* sensory system: a transmembrane signaling pathway controlling transcriptional antitermination.', *Curr Opin Microbiol* **8**(2), 127--134.

**Amster-Choder, O.; Houman, F. & Wright, A.** (1989), 'Protein phosphorylation regulates transcription of the beta-glucoside utilization operon in *E. coli*.', *Cell* **58**(5), 847--855.

**Amster-Choder, O. & Wright, A.** (1992), 'Modulation of the dimerization of a transcriptional antiterminator protein by phosphorylation.', *Science* **257**(5075), 1395--1398.

**Arnaud, M.; Débarbouillé, M.; Rapoport, G.; Saier, M. H. & Reizer, J.** (1996), 'In vitro reconstitution of transcriptional antitermination by the SacT and SacY proteins of *Bacillus subtilis*.', *J Biol Chem* **271**(31), 18966--18972.

**Arnaud, M.; Vary, P.; Zagorec, M.; Klier, A.; Debarbouille, M.; Postma, P. & Rapoport, G.** (1992), 'Regulation of the *sacPA* operon of *Bacillus subtilis*: identification of phosphotransferase system components involved in SacT activity.', *J Bacteriol* **174**(10), 3161--3170.

**Aymerich, S. & Steinmetz, M.** (1992), 'Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21), 10410--10414.

**Babitzke, P.; Bear, D. G. & Yanofsky, C.** (1995), 'TRAP, the *trp* RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*, is a toroid-shaped molecule that binds transcripts containing GAG or UAG repeats separated by two nucleotides.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17), 7916--7920.



**Babitzke, P. & Yanofsky, C.** (1993), 'Reconstitution of *Bacillus subtilis* *trp* attenuation in vitro with TRAP, the *trp* RNA-binding attenuation protein.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1), 133--137.

**Babitzke, P.; Yealy, J. & Campanelli, D.** (1996), 'Interaction of the *trp* RNA-Binding attenuation protein (TRAP) of *Bacillus subtilis* with RNA: effects of the number of GAG repeats, the nucleotides separating adjacent repeats, and RNA secondary structure.', *J Bacteriol* **178**(17), 5159--5163.

**Bachem, S.; Faires, N. & Stülke, J.** (1997), 'Characterization of the presumptive phosphorylation sites of the *Bacillus subtilis* glucose permease by site-directed mutagenesis: implication in glucose transport and catabolite repression.', *FEMS Microbiol Lett* **156**(2), 233--238.

**Bachem, S. & Stülke, J.** (1998), 'Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the phosphotransferase system.', *J Bacteriol* **180**(20), 5319--5326.

**Barrick, J. E. & Breaker, R. R.** (2007), 'The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches.', *Genome Biol* **8**(11), R239.

**Barrick, J. E.; Corbino, K. A.; Winkler, W. C.; Nahvi, A.; Mandal, M.; Collins, J.; Lee, M.; Roth, A.; Sudarsan, N.; Jona, I.; Wickiser, J. K. & Breaker, R. R.** (2004), 'New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17), 6421--6426.

**Batey, R. T.; Gilbert, S. D. & Montange, R. K.** (2004), 'Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine.', *Nature* **432**(7015), 411--415.

**Blount, K. F.; Wang, J. X.; Lim, J.; Sudarsan, N. & Breaker, R. R.** (2007), 'Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches.', *Nat Chem Biol* **3**(1), 44--49.

**Buck, J.; Fürtig, B.; Noeske, J.; Wöhnert, J. & Schwalbe, H.** (2007), 'Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(40), 15699--15704.

**Bycroft, M.; Grünert, S.; Murzin, A. G.; Proctor, M. & Johnston, D. S.** (1995), 'NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufer protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5.', *EMBO J* **14**(14), 3563--3571.

**Carter, P.W.; Bartkus, J.M. & Calvo** (1986), 'Transcription attenuation in *Salmonella typhimurium*: the significance of rare leucine codons in the *leu* leader.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(21), 8127--8131.

**Charrier, V.; Deutscher, J.; Galinier, A. & Martin-Verstraete, I.** (1997), 'Protein phosphorylation chain of a *Bacillus subtilis* fructose-specific phosphotransferase system and its participation in regulation of the expression of the *lev* operon.', *Biochemistry* **36**(5), 1163--1172.

**Chasin, L. A. & Magasanik, B.** (1968), 'Induction and repression of the histidine-degrading enzymes of *Bacillus subtilis*.', *J Biol Chem* **243**(19), 5165--5178.

**Christiansen, I. & Hengstenberg, W.** (1999), 'Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system--two highly similar glucose permeases in *Staphylococcus carnosus* with different glucoside specificity: protein engineering *in vivo*?', *Microbiology* **145** ( Pt 10), 2881--2889.

**Cochrane, J. C.; Lipchock, S. V. & Strobel, S. A.** (2007), 'Structural investigation of the GlmS ribozyme bound to Its catalytic cofactor.', *Chem Biol* **14**(1), 97--105.

**Cochrane, J. C. & Strobel, S. A.** (2008), 'Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes.', *Acc Chem Res* **41**(8), 1027--1035.

**Cochrane, J. C. & Strobel, S. A.** (2008), 'Riboswitch effectors as protein enzyme cofactors.', *RNA* **14**(6), 993--1002.

**Collins, J. A.; Irnov, I.; Baker, S. & Winkler, W. C.** (2007), 'Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme.', *Genes Dev* **21**(24), 3356--3368.

**Coq, D. L.; Lindner, C.; Krüger, S.; Steinmetz, M. & Stülke, J.** (1995), 'New beta-glucoside (*bgl*) genes in *Bacillus subtilis*: the *bglP* gene product has both transport and regulatory functions similar to those of BglF, its *Escherichia coli* homolog.', *J Bacteriol* **177**(6), 1527--1535.

**Crick, F.** (1971), 'Central dogma of molecular biology', *Tsitologiya* **13**(7), 906--910.

**Crick, F. H.** (1968), 'The origin of the genetic code.', *J Mol Biol* **38**(3), 367--379.

**Crick, F. H.** (1958), 'On protein synthesis.', *Symp Soc Exp Biol* **12**, 138--163.

**Debarbouille, M.; Arnaud, M.; Fouet, A.; Klier, A. & Rapoport, G.** (1990), 'The *sacT* gene regulating the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators.', *J Bacteriol* **172**(7), 3966--3973.

**Declerck, N.; Dutartre, H.; Receveur, V.; Dubois, V.; Royer, C.; Aymerich, S. & van Tilbeurgh, H.** (2001), 'Dimer stabilization upon activation of the transcriptional antiterminator LicT.', *J Mol Biol* **314**(4), 671--681.

**Declerck, N.; Minh, N. L.; Yang, Y.; Bloch, V.; Kochoyan, M. & Aymerich, S.** (2002), 'RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: mapping of SacY RNA binding site.', *J Mol Biol* **319**(5), 1035--1048.

**Declerck, N.; Vincent, F.; Hoh, F.; Aymerich, S. & van Tilbeurgh, H.** (1999), 'RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: functional and structural comparison of the CAT domain from SacY and LicT.', *J Mol Biol* **294**(2), 389--402.

**Deutscher, J.; Francke, C. & Postma, P. W.** (2006), 'How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria.', *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(4), 939--1031.

**Du, H. & Babitzke, P.** (1998), 'trp RNA-binding attenuation protein-mediated long distance RNA refolding regulates translation of trpE in *Bacillus subtilis*.', *J Biol Chem* **273**(32), 20494--20503.

**Débarbouillé, M.; Martin-Verstraete, I.; Klier, A. & Rapoport, G.** (1991), 'The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both sigma 54- and phosphotransferase system-dependent regulators.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6), 2212--2216.

**Déméné, H.; Ducat, T.; Guillen, K. D.; Birck, C.; Aymerich, S.; Kochoyan, M. & Declerck, N.** (2008), 'Structural mechanism of signal transduction between the RNA-binding domain and the PTS-regulation domain of the LicT antiterminator.', *J Biol Chem*.

**Epshtein, V.; Mironov, A. S. & Nudler, E.** (2003), 'The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9), 5052--5056.

**Famulok, M.** (1999), 'Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules.', *Curr Opin Struct Biol* **9**(3), 324--329.

**Fauzi, H.; Jack, K. D. & Hines, J. V.** (2005), 'In vitro selection to identify determinants in tRNA for *Bacillus subtilis* tyrS T box antiterminator mRNA binding.', *Nucleic Acids Res* **33**(8), 2595--2602.

**Fedor, M. J. & Williamson, J. R.** (2005), 'The catalytic diversity of RNAs.', *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(5), 399--412.

**Ferré-D'Amaré, A. R.** (2004), 'The hairpin ribozyme.', *Biopolymers* **73**(1), 71--78.

**Fiammengo, R. & Jäschke, A.** (2005), 'Nucleic acid enzymes.', *Curr Opin Biotechnol* **16**(6), 614--621.

**Fuchs, R. T.; Grundy, F. J. & Henkin, T. M.** (2006), 'The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase.', *Nat Struct Mol Biol* **13**(3), 226--233.

**Garst, A. D.; Héroux, A.; Rambo, R. P. & Batey, R. T.** (2008), 'Crystal structure of the lysine riboswitch regulatory mRNA element.', *J Biol Chem* **283**(33), 22347--22351.

**Gilbert, S. D.; Love, C. E.; Edwards, A. L. & Batey, R. T.** (2007), 'Mutational analysis of the purine riboswitch aptamer domain.', *Biochemistry* **46**(46), 13297--13309.

**Gilbert, W.** (1986), 'Evolution of antibodies. The road not taken.', *Nature* **320**(6062), 485--486.

**Gold, L.; Polisky, B.; Uhlenbeck, O. & Yarus, M.** (1995), 'Diversity of oligonucleotide functions.', *Annu Rev Biochem* **64**, 763--797.

**Goldman, B. S.; Lin, J. T. & Stewart, V.** (1994), 'Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1.', *J Bacteriol* **176**(16), 5077--5085.

**Gollnick, P. und Babitzke, P.** (2002), 'Transcription attenuation.', *Biochim Biophys Acta* **1577**(2), 240--250.

**Graille, M.; Zhou, C.; Receveur-Bréchet, V.; Collinet, B.; Declerck, N. & van Tilbeurgh, H.** (2005), 'Activation of the LicT transcriptional antiterminator involves a domain swing/lock mechanism provoking massive structural changes.', *J Biol Chem* **280**(15), 14780--14789.

**Greenberg, D. B.; Stülke, J. & Saier, M. H.** (2002), 'Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains.', *Res Microbiol* **153**(8), 519--526.

**Grundy, F. J. & Henkin, T. M.** (2003), 'The T box and S box transcription termination control systems.', *Front Biosci* **8**, d20--d31.

**Grundy, F. J. & Henkin, T. M.** (1998), 'The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria.', *Mol Microbiol* **30**(4), 737--749.

**Grundy, F. J. & Henkin, T. M.** (1993), 'tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*.', *Cell* **74**(3), 475--482.

**Grundy, F. J.; Hodil, S. E.; Rollins, S. M. & Henkin, T. M.** (1997), 'Specificity of tRNA-mRNA interactions in *Bacillus subtilis tyrS* antitermination.', *J Bacteriol* **179**(8), 2587--2594.

**Grundy, F. J.; Rollins, S. M. & Henkin, T. M.** (1994), 'Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis tyrS* gene: a new role for the discriminator base.', *J Bacteriol* **176**(15), 4518--4526.

**Grundy, F. J.; Winkler, W. C. & Henkin, T. M.** (2002), 'tRNA-mediated transcription antitermination in vitro: codon-anticodon pairing independent of the ribosome.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17), 11121--11126.

**van de Guchte, M.; Ehrlich, D. S. & Chopin, A.** (1998), 'tRNA<sup>Trp</sup> as a key element of antitermination in the *Lactococcus lactis trp* operon.', *Mol Microbiol* **29**(1), 61--74.

**Görke, B. & Stülke, J.** (2008), 'Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.', *Nat Rev Microbiol* **6**(8), 613--624.

**Hames, C.; Halbedel, S.; Schilling, O. & Stülke, J.** (2005), 'Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*.', *Appl Environ Microbiol* **71**(7), 4097--4100.

**Hampel, K. J. & Tinsley, M. M.** (2006), 'Evidence for preorganization of the *glmS* ribozyme ligand binding pocket.', *Biochemistry* **45**(25), 7861--7871.

**Henkin, T. M. & Yanofsky, C.** (2002), 'Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions.', *Bioessays* **24**(8), 700--707.

**Hermann, T. & Patel, D. J.** (2000), 'Adaptive recognition by nucleic acid aptamers.', *Science* **287**(5454), 820--825.

**Holliday, G. L.; Almonacid, D. E.; Mitchell, J. B. O. & Thornton, J. M.** (2007), 'The chemistry of protein catalysis.', *J Mol Biol* **372**(5), 1261--1277.

**Holmberg, C.; Beijer, L.; Rutberg, B. & Rutberg, L.** (1990), 'Glycerol catabolism in *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of the genes encoding glycerol kinase (*glpK*) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*).', *J Gen Microbiol* **136**(12), 2367--2375.

**Huang, H.; Harrison, S. C. & Verdine, G. L.** (2000), 'Trapping of a catalytic HIV reverse transcriptase\*template:primer complex through a disulfide bond.', *Chem Biol* **7**(5), 355--364.

**Jacob, F. & Monod, J.** (1961), 'Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.', *J Mol Biol* **3**, 318--356.

**Jank, T.; Pack, U.; Giesemann, T.; Schmidt, G. & Aktories, K.** (2006), 'Exchange of a single amino acid switches the substrate properties of RhoA and RhoD toward glucosylating and transglutaminating toxins.', *J Biol Chem* **281**(28), 19527--19535.

**Johnston, W. K.; Unrau, P. J.; Lawrence, M. S.; Glasner, M. E. & Bartel, D. P.** (2001), 'RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension.', *Science* **292**(5520), 1319--1325.

**Kharrat, A.; Macias, M. J.; Gibson, T. J.; Nilges, M. & Pastore, A.** (1995), 'Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III.', *EMBO J* **14**(14), 3572--3584.

**Klein, D. J. & Ferré-D'Amaré, A. R.** (2006), 'Structural basis of *glmS* ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate.', *Science* **313**(5794), 1752--1756.

**Kumar, P. K. R.; Kumarevel, T. & Mizuno, H.** (2006), 'Structural basis of HutP-mediated transcription anti-termination.', *Curr Opin Struct Biol* **16**(1), 18--26.

**Kumarevel, T.** (2007), 'Structural insights of HutP-mediated regulation of transcription of the *hut* operon in *Bacillus subtilis*.', *Biophys Chem* **128**(1), 1--12.

**Kundig, W.; Ghosh, S. & Roseman, S.** (1964), 'Phosphate bound to histidine in a protein as a intermediate in a novel phosphor-transferase system.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 1067--1074.

**Langbein, I.; Bachem, S. & Stülke, J.** (1999), 'Specific interaction of the RNA-binding domain of the *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator GlcT with its RNA target, RAT.', *J Mol Biol* **293**(4), 795--805.

**Lin, J. T.; Goldman, B. S. & Stewart, V.** (1993), 'Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5al.', *J Bacteriol* **175**(8), 2370--2378.

**Lin, J. T. & Stewart, V.** (1996), 'Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al.', *J Mol Biol* **256**(3), 423--435.

**Lindner, C.; Galinier, A.; Hecker, M. & Deutscher, J.** (1999), 'Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation.', *Mol Microbiol* **31**(3), 995--1006.

**Lopian, L.; Nussbaum-Shochat, A.; O'Day-Kerstein, K.; Wright, A. & Amster-Choder, O.** (2003), 'The BglF sensor recruits the BglG transcription regulator to the membrane and releases it on stimulation.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12), 7099--7104.

**Lozada-Chávez, I.; Angarica, V. E.; Collado-Vides, J. & Contreras-Moreira, B.** (2008), 'The role of DNA-binding specificity in the evolution of bacterial regulatory networks.', *J Mol Biol* **379**(3), 627--643.



**Lu, Y.; Shevtchenko, T. N. & Paulus, H.** (1992), 'Fine-structure mapping of cis-acting control sites in the *lysC* operon of *Bacillus subtilis*.', *FEMS Microbiol Lett* **71**(1), 23--27.

**Mahadevan, S. & Wright, A.** (1987), 'A bacterial gene involved in transcription antitermination: regulation at a rho-independent terminator in the *bgl* operon of *E. coli*.', *Cell* **50**(3), 485--494.

**Mandal, M.; Boese, B.; Barrick, J. E.; Winkler, W. C. & Breaker, R. R.** (2003), 'Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria.', *Cell* **113**(5), 577--586.

**Mandal, M.; Lee, M.; Barrick, J. E.; Weinberg, Z.; Emilsson, G. M.; Ruzzo, W. L. & Breaker, R. R.** (2004), 'A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression.', *Science* **306**(5694), 275--279.

**Manival, X.; Aymerich, S.; Strub, M. P.; Dumas, C.; Kochoyan, M. & van Tilbeurgh, H.** (1997), 'Crystallization of the RNA-binding domain of the transcriptional antiterminator protein SacY from *Bacillus subtilis*.', *Proteins* **28**(4), 590--594.

**Manival, X.; Yang, Y.; Strub, M. P.; Kochoyan, M.; Steinmetz, M. & Aymerich, S.** (1997), 'From genetic to structural characterization of a new class of RNA-binding domain within the SacY/BglG family of antiterminator proteins.', *EMBO J* **16**(16), 5019--5029.

**Marta, P. T.; Ladner, R. D. & Grandoni, J. A.** (1996), 'A CUC triplet confers leucine-dependent regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon.', *J Bacteriol* **178**(7), 2150--2153.

**Martin-Verstraete, I.; Charrier, V.; Stülke, J.; Galinier, A.; Erni, B.; Rapoport, G. & Deutscher, J.** (1998), 'Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR.', *Mol Microbiol* **28**(2), 293--303.

**Martin-Verstraete, I.; Débarbouillé, M.; Klier, A. & Rapoport, G.** (1994), 'Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon.', *J Mol Biol* **241**(2), 178--192.

**Martin-Verstraete, I.; Débarbouillé, M.; Klier, A. & Rapoport, G.** (1990), 'Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon.', *J Mol Biol* **214**(3), 657--671.

**McCarthy, T. J.; Plog, M. A.; Floy, S. A.; Jansen, J. A.; Soukup, J. K. & Soukup, G. A.** (2005), 'Ligand requirements for *glmS* ribozyme self-cleavage.', *Chem Biol* **12**(11), 1221--1226.

**McDaniel, B. A.; Grundy, F. J.; Kurlekar, V. P.; Tomsic, J. & Henkin, T. M.** (2006), 'Identification of a mutation in the *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase gene that results in derepression of S-box gene expression.', *J Bacteriol* **188**(10), 3674--3681.

**Merino, E. & Yanofsky, C.** (2005), 'Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria.', *Trends Genet* **21**(5), 260--264.

**Morita, M. T.; Tanaka, Y.; Kodama, T. S.; Kyogoku, Y.; Yanagi, H. & Yura, T.** (1999), 'Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor.', *Genes Dev* **13**(6), 655--665.

**Musco, G.; Stier, G.; Joseph, C.; Morelli, M. A. C.; Nilges, M.; Gibson, T. J. & Pastore, A.** (1996), 'Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome.', *Cell* **85**(2), 237--245.

**Nahvi, A.; Barrick, J. E. & Breaker, R. R.** (2004), 'Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes.', *Nucleic Acids Res* **32**(1), 143--150.

**Narberhaus, F.; Käser, R.; Nocker, A. & Hennecke, H.** (1998), 'A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression.', *Mol Microbiol* **28**(2), 315--323.

**Narberhaus, F.; Waldminghaus, T. & Chowdhury, S.** (2006), 'RNA thermometers.', *FEMS Microbiol Rev* **30**(1), 3--16.

**Newman, J. R. S. & Keating, A. E.** (2003), 'Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays.', *Science* **300**(5628), 2097--2101.

**Nocker, A.; Hausherr, T.; Balsiger, S.; Krstulovic, N. P.; Hennecke, H. & Narberhaus, F.** (2001), 'A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes.', *Nucleic Acids Res* **29**(23), 4800--4807.

**Noller, H. F.** (1991), 'Ribosomes. Drugs and the RNA world.', *Nature* **353**(6342), 302--303.

**Norman, R. A.; Poh, C. L.; Pearl, L. H.; O'Hara, B. P. & Drew, R. E.** (2000), 'Steric hindrance regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* amidase operon.', *J Biol Chem* **275**(39), 30660--30667.

**Oda, M.; Katagai, T.; Tomura, D.; Shoun, H.; Hoshino, T. & Furukawa, K.** (1992), 'Analysis of the transcriptional activity of the *hut* promoter in *Bacillus subtilis* and identification of a cis-acting regulatory region associated with catabolite repression downstream from the site of transcription.', *Mol Microbiol* **6**(18), 2573--2582.

**Otridge, J. & Gollnick, P.** (1993), 'MtrB from *Bacillus subtilis* binds specifically to *trp* leader RNA in a tryptophan-dependent manner.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1), 128--132.

**Ottink, O. M.; Rampersad, S. M.; Tessari, M.; Zaman, G. J. R.; Heus, H. A. & Wijmenga, S. S.** (2007), 'Ligand-induced folding of the guanine-sensing riboswitch is controlled by a combined predetermined induced fit mechanism.', *RNA* **13**(12), 2202--2212.

**Paulus, T. J.; McGarry, T. J.; Shekelle, P. G.; Rosenzweig, S. & Switzer, R. L.** (1982), 'Coordinate synthesis of the enzymes of pyrimidine biosynthesis in *Bacillus subtilis*.', *J Bacteriol* **149**(2), 775--778.

**Payal, V. & Gollnick, P.** (2006), 'Substitutions of Thr30 provide mechanistic insight into tryptophan-mediated activation of TRAP binding to RNA.', *Nucleic Acids Res* **34**(10), 2933--2942.

**Postma, P. W.; Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R.** (1993), 'Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.', *Microbiol Rev* **57**(3), 543--594.

**Prudent, J. R.; Uno, T. & Schultz, P. G.** (1994), 'Expanding the scope of RNA catalysis.', *Science* **264**(5167), 1924--1927.

**Putzer, H.; Laalami, S.; Brakhage, A. A.; Condon, C. & Grunberg-Manago, M.** (1995), 'Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation.', *Mol Microbiol* **16**(4), 709--718.

**Regulski, E. E.; Moy, R. H.; Weinberg, Z.; Barrick, J. E.; Yao, Z.; Ruzzo, W. L. & Breaker, R. R.** (2008), 'A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism.', *Mol Microbiol* **68**(4), 918--932.

**Reichenbach, B.; Breustedt, D. A.; Stülke, J.; Rak, B. & Görke, B.** (2007), 'Genetic dissection of specificity determinants in the interaction of HPr with enzymes II of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli*.', *J Bacteriol* **189**(13), 4603--4613.

**Rodionov, D. A.; Vitreschak, A. G.; Mironov, A. A. & Gelfand, M. S.** (2003), 'Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch?', *Nucleic Acids Res* **31**(23), 6748--6757.

**Schilling, O.; Herzberg, C.; Hertrich, T.; Vörsmann, H.; Jessen, D.; Hübner, S.; Titgemeyer, F. & Stülke, J.** (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**(21), 6102--6115.

**Schilling, O.; Langbein, I.; Müller, M.; Schmalisch, M. H. & Stülke, J.** (2004), 'A protein-dependent riboswitch controlling ptsGHI operon expression in *Bacillus subtilis*: RNA structure rather than sequence provides interaction specificity.', *Nucleic Acids Res* **32**(9), 2853--2864.

**Schmalisch, M.; Langbein, I. & Stülke, J.** (2002), 'The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein.', *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(5), 495--501.

**Schmeing, T. M.; Seila, A. C.; Hansen, J. L.; Freeborn, B.; Soukup, J. K.; Scaringe, S. A.; Strobel, S. A.; Moore, P. B. & Steitz, T. A.** (2002), 'A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits.', *Nat Struct Biol* **9**(3), 225--230.

**Seelig, B. & Jäschke, A.** (1999), 'A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity.', *Chem Biol* **6**(3), 167--176.

**Skerker, J. M.; Perchuk, B. S.; Siryaporn, A.; Lubin, E. A.; Ashenberg, O.; Goulian, M. & Laub, M. T.** (2008), 'Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems.', *Cell* **133**(6), 1043--1054.

**Skerker, J. M.; Prasol, M. S.; Perchuk, B. S.; Biondi, E. G. & Laub, M. T.** (2005), 'Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis.', *PLoS Biol* **3**(10), e334.

**Stiffler, M. A.; Chen, J. R.; Grantcharova, V. P.; Lei, Y.; Fuchs, D.; Allen, J. E.; Zaslavskaja, L. A. & MacBeath, G.** (2007), 'PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome.', *Science* **317**(5836), 364--369.

**Stülke, J.; Martin-Verstraete, I.; Zagorec, M.; Rose, M.; Klier, A. & Rapoport, G.** (1997), 'Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT.', *Mol Microbiol* **25**(1), 65--78.

**Sudarsan, N.; Barrick, J. E. & Breaker, R. R.** (2003), 'Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes.', *RNA* **9**(6), 644--647.

**Sudarsan, N.; Hammond, M. C.; Block, K. F.; Welz, R.; Barrick, J. E.; Roth, A. & Breaker, R. R.** (2006), 'Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions.', *Science* **314**(5797), 300--304.

**Sudarsan, N.; Lee, E. R.; Weinberg, Z.; Moy, R. H.; Kim, J. N.; Link, K. H. & Breaker, R. R.** (2008), 'Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP.', *Science* **321**(5887), 411--413.

**Sudarsan, N.; Wickiser, J. K.; Nakamura, S.; Ebert, M. S. & Breaker, R. R.** (2003), 'An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine.', *Genes Dev* **17**(21), 2688--2697.

**van Tilbeurgh, H.; Coq, D. L. & Declerck, N.** (2001), 'Crystal structure of an activated form of the PTS regulation domain from the LicT transcriptional antiterminator.', *EMBO J* **20**(14), 3789--3799.

**van Tilbeurgh, H.; Manival, X.; Aymerich, S.; Lhoste, J. M.; Dumas, C. & Kochoyan, M.** (1997), 'Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*.', *EMBO J* **16**(16), 5030--5036.

**Tobisch, S.; Glaser, P.; Krüger, S. & Hecker, M.** (1997), 'Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*.', *J Bacteriol* **179**(2), 496--506.

**Tobisch, S.; Stülke, J. & Hecker, M.** (1999), 'Regulation of the *lic* operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis.', *J Bacteriol* **181**(16), 4995--5003.

**Tortosa, P.; Aymerich, S.; Lindner, C.; Saier, M. H.; Reizer, J. & Coq, D. L.** (1997), 'Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system.', *J Biol Chem* **272**(27), 17230--17237.

**Tortosa, P.; Declerck, N.; Dutartre, H.; Lindner, C.; Deutscher, J. & Coq, D. L.** (2001), 'Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY.', *Mol Microbiol* **41**(6), 1381--1393.

**Tsukiji, S.; Pattnaik, S. B. & Suga, H.** (2003), 'An alcohol dehydrogenase ribozyme.', *Nat Struct Biol* **10**(9), 713--717.

**Tsvetanova, B.; Wilson, A. C.; Bongiorno, C.; Chiang, C.; Hoch, J. A. & Perego, M.** (2007), 'Opposing effects of histidine phosphorylation regulate the AtxA virulence transcription factor in *Bacillus anthracis*.', *Mol Microbiol* **63**(3), 644--655.

**Turnbough, C. L. & Switzer, R. L.** (2008), 'Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors.', *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(2), 266-300, table of contents.

**Turner, R. J.; Lu, Y. & Switzer, R. L.** (1994), 'Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism.', *J Bacteriol* **176**(12), 3708--3722.

**Vitreschak, A. G.; Mironov, A. A.; Lyubetsky, V. A. & Gelfand, M. S.** (2008), 'Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria.', *RNA* **14**(4), 717-735.

**Vitreschak, A. G.; Rodionov, D. A.; Mironov, A. A. & Gelfand, M. S.** (2004), 'Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression?', *Trends Genet* **20**(1), 44--50.

- Vitreschak, A. G.; Rodionov, D. A.; Mironov, A. A. & Gelfand, M. S.** (2002), 'Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation.', *Nucleic Acids Res* **30**(14), 3141--3151.
- Wilson, S. A.; Wachira, S. J.; Norman, R. A.; Pearl, L. H. & Drew, R. E.** (1996), 'Transcription antitermination regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* amidase operon.', *EMBO J* **15**(21), 5907--5916.
- Winkler, W.; Nahvi, A. & Breaker, R. R.** (2002), 'Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression.', *Nature* **419**(6910), 952--956.
- Winkler, W. C. & Breaker, R. R.** (2005), 'Regulation of bacterial gene expression by riboswitches.', *Annu Rev Microbiol* **59**, 487--517.
- Winkler, W. C. & Breaker, R. R.** (2003), 'Genetic control by metabolite-binding riboswitches.', *Chembiochem* **4**(10), 1024--1032.
- Winkler, W. C.; Cohen-Chalamish, S. & Breaker, R. R.** (2002), 'An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25), 15908--15913.
- Winkler, W. C.; Nahvi, A.; Roth, A.; Collins, J. A. & Breaker, R. R.** (2004), 'Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme.', *Nature* **428**(6980), 281--286.
- Yang, Y.; Declerck, N.; Manival, X.; Aymerich, S. & Kochoyan, M.** (2002), 'Solution structure of the LicT-RNA antitermination complex: CAT clamping RAT.', *EMBO J* **21**(8), 1987--1997.
- Yousef, M. R.; Grundy, F. J. & Henkin, T. M.** (2005), 'Structural transitions induced by the interaction between tRNA(Gly) and the *Bacillus subtilis* glyQS T box leader RNA.', *J Mol Biol* **349**(2), 273--287.
- Zarrinpar, A.; Bhattacharyya, R. P. & Lim, W. A.** (2003), 'The structure and function of proline recognition domains.', *Sci STKE* **2003**(179), RE8.



## Anhang

### 7.1. Materialien

#### 7.1.1. Chemikalien

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Acrylamid                                  | Roth, Karlsruhe             |
| Agar                                       | Roth, Karlsruhe             |
| Agarose                                    | Peqlab, Erlangen            |
| Ammoniumeisen(III)citrat                   | Sigma, München              |
| Ammoniumpersulfat                          | Sigma, München              |
| Antibiotika                                | Sigma, München              |
| Blockingreagenz                            | Roche Diagnostics, Mannheim |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                   | Merck, Darmstadt            |
| Bromphenolblau                             | Serva, Heidelberg           |
| Casein, sauer hydrolysiert                 | Sigma, München              |
| CDP*                                       | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Coomassie Brilliant Blue, R350             | Amersham, Freiburg          |
| D(+)-Glukose                               | Merck, Darmstadt            |
| Desthiobiotin                              | Iba, Göttingen              |
| Dimethylformamid                           | Sigma, München              |
| DIG-RNA-Labeling-Mix                       | Roche Diagnostics, Mannheim |
| dNTPs                                      | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Ethidiumbromid                             | Merck, Darmstadt            |
| Formamid                                   | Fluka, Buchs, Schweiz       |
| Glycerin                                   | Merck, Darmstadt            |
| Hefeextrakt                                | Oxoid, Heidelberg           |
| Imidazol                                   | Roth, Karlsruhe             |
| Iod-Kaliumiodidlösung nach Lugol           | Roth, Karlsruhe             |
| Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid | Peqlab, Erlangen            |
| Natriumazid                                | Merck, Darmstadt            |
| Natriumdodecylsulfat                       | Serva, Heidelberg           |
| Natriumsuccinat                            | Fluka, Buchs, Schweiz       |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose Superflow  | Qiagen, Hilden              |
| Nutrient Broth   | Merck, Darmstadt            |
| o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid   | Sigma, München              |
| Stärke   | Sigma, München              |
| <i>Strep</i> -Tactin Sepharose   | Iba, Göttingen              |
| TEMED  | Merck, Darmstadt            |
| Transkriptionspuffer   | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan   | Roth, Karlsruhe             |
| Trypton  | Oxoid, Heidelberg           |
| Alle sonstigen verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden von Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen. |                             |

### 7.1.2. Hilfsmittel

|                                  |                                    |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Dialyseschläuche                 | Serva, Heidelberg                  |
| Eppendorfgefäße                  | Greiner, Nürtingen                 |
| Falcon-Tubes                     | Sarstedt, Nürmbrecht               |
| Gene Amp Reaction Tubes (PCR)    | Perkin Elmer, Weiterstadt          |
| Glaspipetten                     | Brand, Wertheim                    |
| Halbmikroküvetten aus Kunststoff | Greiner, Nürtingen                 |
| Kunststoffpetrischalen           | Greiner, Nürtingen                 |
| Membranfilter                    | Schleicher und Schüll, Dassel      |
| NC45 (0,2µm Porengröße)          |                                    |
| Mikroliterpipetten               | Gilson, Düsseldorf                 |
| (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)       | 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                  |
| 96-Well-Platten                  | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |

### 7.1.3. Geräte und Apparaturen

---

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Autoklav                             | Zirbus, Bad Grund   |
| Binokular Olympus SZX12              | Olympus, Frankfurt  |
| Biofuge fresco                       | Heraeus Christ, Osterode  |
| Blottingapparatur VacuGene™XI        | Amersham, Freiburg  |
| Chemilumineszenzsystem ChemiSmart    | Peqlab, Erlangen  |
| Elektronenmikroskop                  | Philips, Amsterdam  |
| Feinwaage Sartorius                  | Sartorius, Göttingen  |
| French Press                         | Spectonic Unicam, England   |
| Gelelektrophoreseapparaturen         | Waasetec, Göttingen<br>EasyCast™ Minigelsystem, Peqlab,<br>Erlangen |
| Heizblock Dri Block DB3              | Waasetec, Göttingen   |
| Horizontalschüttler 3006             | GFL, Burgwedel  |
| Hybridisierungssofen                 | Biometra, Göttingen   |
| Kühlzentrifuge PrimoR                | Heraeus Christ, Osterode  |
| Kulturschüttler Innova 2300          | New Brunswick, Neu-Isenburg   |
| Magnet-Heizrührer                    | JAK Werk, Staufen   |
| Mikrodismembrator                    | Sartorius, Göttingen  |
| Mikroprozessor pH-Meter Calimatic    | Knick, Berlin   |
| Nanodrop ND-1000                     | Thermoscientific, Bonn  |
| One-Shot Cell Disrupter              | IUL Instruments, Königswinter                                       |
| Spannungsgerät                       | Bio-Rad Laboratories California USA                                 |
| Spektralphotometer Ultraspec 2000    | Amersham, Freiburg  |
| Thermocycler Tpersonal               | Biometra, Göttingen   |
| LabCycler                            | SensorQuest, Göttingen  |
| Ultraschallgerät Labsonic U          | Braun, Melsungen  |
| Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80 | Thermoscientific, Bonn  |
| UV-Stratalinker 1800                 | Stratagene, Amsterdam   |
| Vertikalgelelektrophoreseapparatur   | Bio-Rad Laboratories, California USA                                |
| Mini Protean III System              |   |
| Waage Sartorius universal            | Sartorius, Göttingen  |
| Wasservollentsalzungsanlage          | Millipore, Schwalbach   |

#### 7.1.4. Kommerziell erhältliche Systeme

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Gene Ruler DNA Ladder Mix                     | MBI Fermentas, St. Leon-Rot          |
| iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green | Bio Rad Laboratories, California USA |
| Nucleospin                                    | Macherey-Nagel, Düren                |
| QIAquick PCR-Purification Kit                 | Qiagen, Hilden                       |
| QIAamp Tissue Kit (250)                       | Qiagen, Hilden                       |
| RNA-Standard                                  | Invitrogen, Karlsruhe                |
| RNeasy-Mini-Kit                               | Qiagen, Hilden                       |
| Unstained Protein Marker                      | MBI Fermentas, St. Leon-Rot          |

#### 7.1.5. Antikörper und Enzyme

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Accuzyme-Polymerase                       | Bioline                        |
| Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente        | Roche Diagnostics, Mannheim    |
| DNase I                                   | Roche Diagnostics, Mannheim    |
| Lysozym aus Hühnereiweiß<br>(178000 U/mg) | Merck, Darmstadt               |
| Phusion™ DNA Polymerase                   | Finnzymes, Espoo Finnland      |
| Restriktionsendonukleasen                 | NEB Biolabs, Frankfurt am Main |
|   | MBI Fermentas, St. Leon-Rot    |
| Calf-Intestinal-Alkaline-Phosphatase      | MBI Fermentas, St. Leon-Rot    |
| T4-DNA-Ligase                             | MBI Fermentas, St. Leon-Rot    |
| Taq-DNA-Polymerase                        | Roche Diagnostics, Mannheim    |

#### 7.2. Oligonukleotide

Die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide und die restlichen Oligonukleotide wurden von der Firma Operon Köln bezogen.

**Tab. 7.1. Oligonukleotide**

| Nr.   | Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>                               | Schnittstelle | Verwendung   |
|-------|--|---------------|--|
| SHU1  | TTGGATCCATATTTATATTGA<br>GGGATTGTTTCATCCC                  | <i>Bam</i> HI | Amplifikation von <i>cggR</i><br>aus pGP231 (reverse)                                      |
| SHU2  | TTGGATCCATATTTATATTGA<br>CCGATTGTTTCATCCC                  | <i>Bam</i> HI | Amplifikation von <i>cggR</i><br>aus pGP234 (reverse)                                      |
| SHU3  | TTGGATCCAAAGTATTGGAG<br>TTATGAGCGG                         | <i>Bam</i> HI | Amplifikation von <i>rnjA</i><br>von chromosomaler DNA<br>aus <i>B. subtilis</i> (forward) |
| SHU4  | TTGGATCCGTTGTTCTGAAGA<br>ATGACACAG                         | <i>Bam</i> HI | Amplifikation von <i>rnjA</i><br>von chromosomaler DNA<br>aus <i>B. subtilis</i> (reverse) |
| SHU5  | AAAGAATTCCATTATCCACA<br>AGATAAGATCTTAC                     | <i>Eco</i> RI | Amplifikation von <i>xynP</i><br>von chromosomaler DNA<br>aus <i>B. subtilis</i> (forward) |
| SHU6  | TTGGATCCGTGTATGTAAGCG<br>ACAAGC                            | <i>Bam</i> HI | Amplifikation von <i>xynP</i><br>von chromosomaler DNA<br>aus <i>B. subtilis</i> (reverse) |
| SHU7  | CCTGTGATGAGACAGTTG   | -             | Sequenzierung von<br>pGP415  |
| SHU8  | GGGCGGCGTTTTTACAAC   | -             | Sequenzierung von<br>pGP415  |
| SHU9  | GGAACGGATTCTTTAGTAGT<br>AGCGG                              | -             | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>ymfA</i>  |
| SHU10 | CCTATCACCTCAAATGGTTCG<br>CTGCGACACCGCCAAGGGCG              | -             | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>ymfA</i><br>(Funktioniert nicht)                            |
| SHU11 | CGAGCGCCTACGAGGAATTT<br>GTATCGGGCAATGCGGGATG<br>CTTTGAAC   | -             | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>ymfA</i>  |
| SHU12 | GCTCATGTGCGCTTGTCTCTT<br>G                                 | -             | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>ymfA</i>  |
| SHU13 | CCTATCACCTCAAATGGTTCG<br>CTGCTGAGTCAATTTCAATGA<br>CATAAAGG | -             | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>ymfA</i>  |

| Nr.   | Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>   | Schnittstelle   | Verwendung  |
|-------|--|-----------------|---|
| SHU14 | CTAATACGACTCACTATAGG<br>GAGAGGCTACTATTTAACG<br>CGG                           | T7              | <i>cggR-gapA</i> Schnittstelle<br>RNA                 |
| SHU15 | CTAATACGACTCACTATAGG<br>GAGAGATCGCGTTCTGCAGA<br>AAC                          | T7              | <i>cggR-gapA</i> Schnittstelle<br>RNA                 |
| SHU16 | GATCGGATCCATGAGACTAG<br>GAGGATATAG   | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>ymfa</i> in<br>pBQ200               |
| SHU17 | AGCTAAGCTTCCGGTCTTTAG<br>TCAGTCATTA  | <i>Hind</i> III | Klonierung von <i>ymfa</i> in<br>pBQ200               |
| SHU18 | GATCGGATCCGCAGTCTGAT<br>CATTTTTTAC   | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>ykqC</i> in<br>pAC7                 |
| SHU19 | AATTGAATTCGCTCCAGTCAA<br>AACAGCG   | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>ykqC</i> und<br><i>yzkG</i> in pAC7 |
| SHU20 | GATCGGATCCACGTTTTCTGT<br>ATTTTCTTTTC   | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>yzkG</i> in<br>pAC7                 |
| SHU21 | AATTGAATTCGTCATTCAGCA<br>AACAATTTTCG   | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>ymfA</i> in<br>pAC7                 |
| SHU22 | GATCGGATCCTGATAAAATA<br>CCTTATAAATCATTCC                                     | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>ymfA</i> in<br>pAC7                 |
| SHU23 | CGACATTGGCGAGATCG  | -               | Sequenzierung von <i>ymfA</i>                         |
| SHU24 | GTTTATCCTTATAACGCGTTA<br>CTGATTCGATCAGGCGTGAG<br>TGATTGAGG                   | -               | Mutageneseprimer für<br><i>ptsG</i> - RAT             |
| SHU25 | GCGCACCCAATTTTGCTCACG<br>CCTTTTTGTTGTG                                       | -               | Mutageneseprimer für<br><i>ptsG</i> - RAT             |
| SHU26 | GCGCACCCAATTTTGCTCACG<br>CCTTTTTGTTGTG                                       | -               | Mutageneseprimer für<br><i>ptsG</i> - RAT             |
| SHU27 | GATTCGATCAGGCGT <u>T</u> ACTG<br>ATTGAGGG                                    | -               | Mutageneseprimer für<br><i>ptsG</i> - RAT             |
| SHU28 | GCGCACCCAATTTTG <u>G</u> TAA <u>C</u><br>GCCTTTTTGTTGTGTA <u>A</u> AAGG<br>G | -               | Mutageneseprimer für<br><i>ptsG</i> - RAT             |

| Nr.   | Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>               | Schnittstelle   | Verwendung  |
|-------|--|-----------------|---|
| SHU29 | TTTAAGCTTTCACTGATTGAC<br>CTCGGACAGCGGACG   | <i>Hind</i> III | Klonierung von <i>glcT</i><br>PRDI in pWH844        |
| SHU30 | AAAGTCGACCGTCCGCTGTC<br>CGAGGTCAATCAG      | <i>Sal</i> I    | Klonierung von <i>glcT</i><br>PRDII in pWH844       |
| SHU31 | TTTAAGCTTTCACTTCAGCGC<br>TGAATACATGCTCTC   | <i>Hind</i> III | Klonierung von <i>sacT</i><br>PRDI in pWH844        |
| SHU32 | AAAGTCGACGAGAGCATGTA<br>TTCAGCGCTGAAG      | <i>Sal</i> I    | Klonierung von <i>sacT</i><br>PRDII in pWH844       |
| SHU33 | TTTGTCGACTCACCTCTTGAG<br>CAGATGTTTTTCGGCTC | <i>Sal</i> I    | Klonierung von EIIBGlc<br>( <i>ptsG</i> ) in pWH844 |
| SHU34 | AAAGTCGACATGGATTACAA<br>AGAGACTGCAAAACG    | <i>Sal</i> I    | Klonierung von EIIBSac<br>( <i>sacP</i> ) in pWH844 |
| SHU35 | TTTAAGCTTTCACAAATCTCG<br>CAGCGGGATTC       | <i>Hind</i> III | Klonierung von EIIBSac<br>( <i>sacP</i> ) in pWH844 |
| SHU36 | AAAGAATTCCGGGAATTTTT<br>ATTTTCAGCC         | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>xpt</i> B.s. in<br>pAC7           |
| SHU37 | AAAGGATCCCGTTTCAGTGCT<br>TCCATCC           | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>xpt</i> B.s. in<br>pAC7           |
| SHU38 | AAAGAATTCCGTAGATCATTT<br>CTGTATTCATTGC     | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>gcvT</i> B.s.<br>in pAC7          |
| SHU39 | AAAGGATCCGGCGTTCTTTTC<br>AGCATC            | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>gcvT</i> B.s.<br>in pAC7          |
| SHU40 | AAAGAATTCCGGCTTGAAAT<br>CAGCGGTC           | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>metK</i> B.s.<br>in pAC7          |
| SHU41 | AAAGGATCCCCCTCCGTAAC<br>AGATTCTGATG        | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>metK</i> B.s.<br>in pAC7          |
| SHU42 | AAAGAATTCGATAAATGATT<br>TACAGATCGAAGTCC    | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>gcvT</i> O.ih.<br>in pAC7         |
| SHU43 | AAAGGATCCAGTTTGATGAA<br>AGAAAAGCGC         | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>gcvT</i> O.ih.<br>in pAC7         |
| SHU44 | AAAGAATTCGTGCTACCGAT<br>AGATTGTGG          | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>metK</i><br>O.ih. in pAC7         |
| SHU45 | AAAGGATCCCGATTTGCAGC<br>CATAAGGC           | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>metK</i><br>O.ih. in pAC7         |
| SHU46 | AAAGAATTCGCTTGTTTTTTT<br>GCCTGCAAATGC      | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>xpt</i> O.ih.<br>in pAC7          |

| Nr.   | Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>                                     | Schnittstelle   | Verwendung   |
|-------|--|-----------------|--|
| SHU47 | AAAGGATCCTTCTTTAGTAAC<br>TCCATGCTTCC                             | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>xpt</i> O.ih.<br>in pAC7               |
| SHU48 | AAAGAATTCGTTTATATAGAT<br>TGCATGTGG                               | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>gcvT</i><br>G.ka. in pAC7              |
| SHU49 | AAAGGATCCCGCTTTAGCAT<br>CTGATTC                                  | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>gcvT</i><br>G.ka. in pAC7              |
| SHU50 | AAAGAATTC <del>CC</del> CATATTCAA<br>AACCTGCC                    | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>metK</i><br>G.ka. in pAC7              |
| SHU51 | AAAGGATCCTCTGAAGTAAA<br>CAAGCGGC                                 | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>metK</i><br>G.ka. in pAC7              |
| SHU52 | AAAGAATTCCTAATTGCCAT<br>GAAAGTTCG                                | <i>Eco</i> RI   | Klonierung von <i>xpt</i> G.ka.<br>in pAC7               |
| SHU53 | AAAGGATCCCGCTTTAGCAT<br>CTGATTCCC                                | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>xpt</i> G.ka.<br>in pAC7               |
| SHU54 | AAAGAGCTCGATGGCACAAA<br>AAACATTTAAAGTAACTGC                      | <i>Sac</i> I    | Klonierung von HPr in<br>pGP570 (mit SB46)               |
| SHU55 | GTTTTACAACGTCGTGACTGG  |                 | Herstellung der <i>lacZ</i> -<br>Sonde                   |
| SHU56 | <u>CTAATACGACTCACTATAGG</u><br><u>GAGGTGTGCAGTTCAACCAC</u><br>CG | T7-Promotor     | Herstellung der <i>lacZ</i> -<br>Sonde                   |
| SHU57 | AAAAGGATCCGTAGATTTGG<br>AGGGACATGCC                              | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>licT</i> RBD<br>in pHCMC04 / pBQ200    |
| SHU58 | AAAACCCGGGTCATGATACA<br>TCCTTGTTATCGAGC                          | <i>Sma</i> I    | Klonierung von <i>licT</i> RBD<br>in pHCMC04             |
| SHU59 | AAAGGATCCCAAATTGGCGG<br>GAGAGATAACCTC                            | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>sacT</i><br>RBD in pHCMC04 /<br>pBQ200 |
| SHU60 | AAACCCGGGTCACTTTTCATT<br>CTCGTCGCGCAC                            | <i>Sma</i> I    | Klonierung von <i>sacT</i><br>RBD in pHCMC04             |
| SHU61 | AAAGGTACCCATGACCCCAA<br>TTATGGTTCTC                              | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>ymdA</i> in<br>pGP172                  |
| SHU62 | AAAGGATCCTTATCATTTTGC<br>ATACTCTACGGCTCG                         | <i>Bam</i> HI   | Klonierung von <i>ymdA</i> in<br>pGP172                  |
| SHU63 | CCGTGCGAAAGAAGAGGCGG   |                 | Sequenzierung von <i>ymdA</i>                            |
| SHU64 | AAAAAGCTTTCATGATACAT<br>CCTTGTTATCGAGC                           | <i>Hind</i> III | Klonierung von <i>licT</i> RBD<br>in pBQ200              |



| Nr.   | Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>                                   | Schnittstelle   | Verwendung                                  |
|-------|--|-----------------|---|
| SHU65 | AAA <u>AGCTT</u> TCAC <del>TTT</del> CATT<br>CTCGTCGCGCAC      | <i>Hind</i> III | Klonierung von <i>sacT</i><br>RBD in pBQ200 |
| SHU66 | CATCATCAGAGCCCCTCTCCG<br>G                                     | -               | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>licT</i>     |
| SHU67 | CCTATCACCTCAAATGGTTCG<br>CTGCCTTCGCAATTTTCATGG<br>CATG         | -               | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>licT</i>     |
| SHU68 | CGAGCGCCTACGAGGAATTT<br>GTATCGTTAACCATTACATA<br>GAAAGGG        | -               | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>licT</i>     |
| SHU69 | CCATTGTAGGAGCCAAGCCA<br>TTC                                    | -               | LFH-PCR zum Knockout<br>von <i>licT</i>     |
| SHU70 | AAAGAATTCGAACAGCTTTA<br>GCAAATCTGGGC                           | <i>Eco</i> RI   | <i>ymdA lacZ</i> Fusion                     |
| SHU71 | AAAGGATCCGAGATGAGAAC<br>CATCATAATTGGGG                         | <i>Bam</i> HI   | <i>ymdA lacZ</i> Fusion                     |
| SHU72 | AAAGAATTCGAAGAGTCATT<br>CGCGCACTGG                             | <i>Eco</i> RI   | <i>hfq lacZ</i> Fusion                      |
| SHU73 | AAAGGATCCCGGATTTGATT<br>CAAAAAC <del>T</del> GATCC             | <i>Bam</i> HI   | <i>hfq lacZ</i> Fusion                      |
| SHU74 | AAAGAATTCATTCATACGA<br>AGTACCATGGCC                            | <i>Eco</i> RI   | <i>csrA lacZ</i> Fusion                     |
| SHU75 | AAAGGATCCTGAATCGCTTC<br>GTTTATTTCCGCG                          | <i>Bam</i> HI   | <i>csrA lacZ</i> Fusion                     |
| SHU76 | GGGGAATTCATTTGGAACAG<br>C                                      | <i>Eco</i> RI   | <i>rsmY lacZ</i> Fusion                     |
| SHU77 | AAAGGATCCCCACCTTCATA<br>ATGAAAAGCATCC                          | <i>Bam</i> HI   | <i>rsmY lacZ</i> Fusion                     |
| SHU78 | CGTGATGGGANNNNGGAATCG<br>CTTTNNNAAAAGAAAAT<br>GATCTCATCCC      |                 | Mutagenese-Primer für<br>SacT-RBD           |
| SHU79 | CAATAGAGGAAAACGGCACA<br>CAGG                                   |                 | Herstellung einer <i>rsmY</i><br>Sonde      |
| SHU80 | <u>CTAATACGACTCACTATAGG</u><br>GAGGCATCAAAGAATCGGCC<br>CGTCCCC | T7 Promotor     | Herstellung einer <i>rsmY</i><br>Sonde      |
| SHU81 | CCGATTGGAGGAGAATCATG<br>C                                      |                 | Herstellung einer <i>csrA</i><br>Sonde      |

| Nr.   | Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>                                    | Schnittstelle | Verwendung                          |
|-------|---|---------------|-------------------------------------|
| SHU82 | <u>CTAATACGACTCACTATAGG</u><br>GAGGCACTTTTTTGTGAGGA<br>TAATGCCG | T7 Promotor   | Herstellung einer <i>csrA</i> Sonde |

<sup>1</sup>Die angefügten Schnittstellen oder der T7-Promotor sind unterstrichen und Mutationen **fett** gedruckt.

### 7.3. Plasmide

Tab. 7.2. Plasmide

| Plasmid | Resistenz        | Referenz bzw. Konstruktion            | Zweck   |
|---------|------------------|---------------------------------------|---|
| pWH844  | Amp <sup>R</sup> | Schirmer <i>et al.</i> , 1997         | Überexpressionsvektor   |
| pGP172  | Amp <sup>R</sup> | Merzbacher <i>et al.</i> , 2004       | Überexpressionsvektor   |
| pDG1727 | Spc <sup>R</sup> | Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995   | Isolierung der Spc-Resistenzkassette                                    |
| pBQ200  | E/L <sup>R</sup> | Martin-Verstaete <i>et al.</i> , 1994 | Expression von Proteinen in <i>B. subtilis</i>                          |
| pAG2    | Amp <sup>R</sup> | Galinier <i>et al.</i> , 1997         | Überexpression von His <sub>6</sub> -HPr aus <i>B. subtilis</i>         |
| pAG3    | Amp <sup>R</sup> | Galinier <i>et al.</i> , 1997         | Überexpression von His <sub>6</sub> -EI aus <i>B. subtilis</i>          |
| pGP230  | Amp <sup>R</sup> | Michael Müller, Diplom                | Überexpression von His <sub>6</sub> -GlcT-RBD mit Thrombinschnittstelle |
| pGP817  | Amp <sup>R</sup> | Matthias Schmalisch, Doktorarbeit     | Überexpression von His <sub>6</sub> -GlcT mit Thrombinschnittstelle     |

| <b>Plasmid</b>                      | <b>Resistenz</b> | <b>Referenz bzw. Konstruktion</b>  | <b>Zweck</b>                                       |
|-------------------------------------|------------------|--|--|
| pGP570                              | Amp <sup>R</sup> | Oliver Schilling Doktorarbeit  | Klonierung von Proteinen mit Thrombinschnittstelle |
| pGP574                              | Amp <sup>R</sup> | Schilling <i>et al.</i> , 2006   | Strep-Tag in pET3C                                 |
| pGP575                              | Amp <sup>R</sup> | Schilling <i>et al.</i> , 2006   | Überexpression der GlcT-RBD mit Strep-Tag          |
| pGP576                              | Amp <sup>R</sup> | Schilling <i>et al.</i> , 2006   | Überexpression der LicT-RBD mit Strep-Tag          |
| pGP577                              | Amp <sup>R</sup> | Schilling <i>et al.</i> , 2006   | Überexpression der SacT-RBD mit Strep-Tag          |
| <b>In dieser Arbeit konstruiert</b> |                  |  |  |
| pGP417                              | Amp <sup>R</sup> | <i>xynP-lacz</i> Fusion aus QB7144 mit <i>pac5F</i> und <i>pac5R</i> in pAC7 | Expressionsmessung von <i>xynP</i>                 |
| pGP418                              | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt vom <i>mjA</i> -Promotor mit SHU18 und SHU22 in pAC7             | Expressionsmessung von <i>mjA</i>                  |
| pGP419                              | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt vom <i>mjB</i> -Promotor mit SHU19 und SHU20 in pAC7             | Expressionsmessung von <i>mjB</i>                  |
| pGP420                              | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt vom <i>ykzG</i> -Promotor mit SHU21 und SHU22 in pAC7            | Expressionsmessung von <i>ykqZ</i>                 |

| <b>Plasmid</b> | <b>Resistenz</b> | <b>Referenz bzw. Konstruktion</b>  | <b>Zweck</b>                         |
|----------------|------------------|--|--------------------------------------|
| pGP421         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>rnjB</i> zur Überexpression in <i>B. subtilis</i> in pBQ200   | Expression von RnjB                  |
| pGP422         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt mit IL5 und JS11 von pGP66 dazu<br>Mutageneseprimer SHU24 und SHU25 U4→C; A24→G und Terminatormutation                       | Mutagenese von <i>ptsG</i> -Promotor |
| pGP423         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>ptsG</i> -RAT mit IL5 und JS11 von pGP423 mit Mutageneseprimern SHU26, SHU27 und SHU28<br>C2→G; G26→T; G28→C + Terminator | Mutagenese von <i>ptsG</i> -Promotor |
| pGP424         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>glcT</i> PRDI mit SS1 und SHU29 in pWH844   | Überexpression von GlcT-PRDI         |
| pGP425         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>glcT</i> PRDII mit SS2 und SHU30 in pWH844  | Überexpression von GlcT-PRDII        |
| pGP426         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacT</i> PRDI mit SS7 und SHU31 in pWH844   | Überexpression von SacT-PRDI         |
| pGP427         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacT</i> PRDII mit SS8 und SHU32 in pWH844  | Überexpression von SacT-PRDII        |
| pGP428         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>ptsG</i> EIIBGlc mit SB25 und SHU33 in pWH844   | Überexpression von EIIBGlc           |
| pGP429         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacP</i> EIIB mit SHU34 und SHU35 in pWH844   | Überexpression von SacP              |

| <b>Plasmid</b> | <b>Resistenz</b> | <b>Referenz bzw. Konstruktion</b>   | <b>Zweck</b>                       |
|----------------|------------------|---|------------------------------------|
| pGP430         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>xpt</i> (B.su.) SHU36 + 37 in pAC7   | Expressionsmessung von <i>xpt</i>  |
| pGP431         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>gcvT</i> (B.su.) SHU38 + 39 in pAC7  | Expressionsmessung von <i>gcvT</i> |
| pGP432         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>metK</i> (B.su.) SHU40 + 41 in pAC7  | Expressionsmessung von <i>metK</i> |
| pGP433         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>gcvT</i> (Oceanobacillus iheyensis) SHU42 + 43 in pAC7   | Expressionsmessung von <i>gcvT</i> |
| pGP434         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>metK</i> (O. ih.) SHU44 + 45 in pAC7   | Expressionsmessung von <i>metK</i> |
| pGP435         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt <i>xpt</i> (O. ih.) SHU46 + 47 in pAC7  | Expressionsmessung von <i>xpt</i>  |
| pGP436         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacP</i> EIIB mit SHU34 + SHU35 (EIIB <sup>Sac</sup> mit abspaltbarem His-Tag) in pGP570                 | Überexpression von SacP            |
| pGP437         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>ptsG</i> EIIBA <sup>Glc</sup> mit SB2 und SB25 (EIIBA <sup>Glc</sup> mit abspaltbarem His-Tag) in pGP570 | Überexpression von PtsG            |
| pGP438         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von HPr ( <i>ptsH</i> ) mit SHU54 und SB46 (HPr mit Strep-Tag) in pGP172  | Überexpression von HPr             |
| pGP439         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacT</i> PRDI mit SS7 und SHU31 in pGP570  | Überexpression von SacT-PRDI       |

| <b>Plasmid</b> | <b>Resistenz</b> | <b>Referenz bzw. Konstruktion</b>   | <b>Zweck</b>                  |
|----------------|------------------|---|-------------------------------|
| pGP440         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacT</i> PRDII mit SS8 und SHU32 in pGP570                     | Überexpression von SacT-PRDII |
| pGP441         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>ymdA</i> mit SHU61 + SHU62 in pGP172                           | Überexpression von YmdA       |
| pGP442         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>glcT</i> PRDI mit SS1 und SHU29 in pGP570                      | Überexpression von GlcT-PRDI  |
| pGP443         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>glcT</i> PRDII mit SS2 und SHU30 in pGP570                     | Überexpression von GlcT-PRDII |
| pGP444         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU60 in pHMCM04                    | Expression von SacT-RBD       |
| pGP445         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>licT</i> RBD mit SHU57 und SHU58 in pHMCM04                    | Expression von LicT-RBD       |
| pGP446         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65 in pBQ200                     | Expression von SacT-RBD       |
| pGP447         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt von <i>licT</i> RBD mit SHU57 und SHU64 in pBQ200                     | Expression von LicT-RBD       |
| pGP448         | Amp <sup>R</sup> | Pro26Ser  | Expression von SacT-RBD       |
| pGP449         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65 Pro26Ser / Gln31Arg in pBQ200 | Expression von SacT-RBD       |
| pGP450         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65 Pro26Cys / Gln31Lys in pBQ200 | Expression von SacT-RBD       |

| <b>Plasmid</b> | <b>Resistenz</b> | <b>Referenz bzw. Konstruktion</b>   | <b>Zweck</b>                          |
|----------------|------------------|---|---------------------------------------|
| pGP451         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Arg / Gln31Arg in<br>pBQ200 | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP452         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Cys / Gln31Arg in<br>pBQ200 | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP453         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Ser / Gln31Gly in pBQ200    | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP454         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Val / Gln31Gly in<br>pBQ200 | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP455         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Cys / Gln31Ser in pBQ200    | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP456         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Ala/ Gln31Lys in pBQ200     | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP457         | Amp <sup>R</sup> | CCR-Produkt von <i>sacT</i> RBD mit SHU59 und SHU65<br>Pro26Arg/ Gln31Ala in pBQ200     | Expression von SacT-<br>RBD           |
| pGP458         | Amp <sup>R</sup> | PCR Produkt <i>rsmY</i> mit den<br>Primern SHU76 und SHU77 in<br>pAC6                   | Expressionsmessung von<br><i>rsmY</i> |

| <b>Plasmid</b> | <b>Resistenz</b> | <b>Referenz bzw. Konstruktion</b>                        | <b>Zweck</b>                       |
|----------------|------------------|--|------------------------------------|
| pGP459         | Amp <sup>R</sup> | PCR Produkt <i>ymdA</i> mit den Primern SHU70/71 in pAC7 | Expressionsmessung von <i>ymdA</i> |
| pGP460         | Amp <sup>R</sup> | PCR Produkt <i>hfq</i> den Primern SHU72/73 in pAC7      | Expressionsmessung von <i>hfq</i>  |
| pGP461         | Amp <sup>R</sup> | PCR Produkt <i>csrA</i> den Primern SHU74/75 in pAC7     | Expressionsmessung von <i>csrA</i> |
| pGP462         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt OS97/98 von pGP448 in pGP574                 | Überexpression der SacT-RBD        |
| pGP463         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt OS97/98 von pGP451 in pGP574                 | Überexpression der SacT-RBD        |
| pGP464         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt OS97/98 von pGP452 in pGP574                 | Überexpression der SacT-RBD        |
| pGP465         | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt OS97/98 von pGP453 in pGP574                 | Überexpression der SacT-RBD        |



## 7.4. Stämme

Tab. 7.3. Bakterienstämme

| Stamm                                | relevanter Genotyp  | Referenz bzw. Konstruktion <sup>1</sup> |
|--------------------------------------|---|---|
| <i>E. coli</i>                       |   |   |
| DH5 $\alpha$                         | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17rK<sup>-</sup><br/>mK<sup>+</sup>relA1 supE44 <math>\Phi</math>80<math>\Delta</math>lacZ<math>\Delta</math>M15<br/><math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169</i> | Sambrook <i>et al.</i> , 1989           |
| BL21<br>(DE3)                        | <i>F<sup>-</sup>,lon ompT r<sub>B</sub>m<sub>B</sub> hsdS gal (cI<sub>ts857</sub> ind1<br/>Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>   | Sambrook <i>et al.</i> , 1989           |
| <i>B. subtilis</i>                   |   |   |
| 168                                  | <i>trpC2</i>  | Laborsammlung                           |
| GP109                                | <i>trpC2 <math>\Delta</math>glcT8</i>   |   |
| GP538                                | <i>trpC2 amyE::(<math>\Delta</math>LA sacB-R6'- 'lacZ<br/>aphA3) <math>\Delta</math>sacT::spec</i>  | Schilling <i>et al.</i> , 2006          |
| GP440                                | <i>trpC2 amyE::(<math>\Delta</math>LA sacB'- 'lacZ aphA3)<br/><math>\Delta</math>sacT ::spec</i>  | Schilling <i>et al.</i> , 2006          |
| GP487                                | <i>trpC2 amyE::(<math>\Delta</math>LA sacB-R8'- 'lacZ<br/>aphA3) sacT::spec</i>   | Schilling <i>et al.</i> , 2006          |
| GP408                                | <i>trpC2 amyE ::(<math>\Delta</math>LA ptsG-R6' - 'lacZ<br/>aphA3)</i>  | Schilling <i>et al.</i> , 2006          |
| <b>in dieser Arbeit konstruiert:</b> |   |   |
| <i>B. subtilis</i>                   |   |   |
| GP44                                 | <i>trpC2 amyE::(xynP- 'lacZ aphA3)<br/>p<sub>xylA</sub>::rnjA cat</i>   | pGP417 $\rightarrow$ GP41               |
| GP45                                 | <i>trpC2 rnjB::spec</i>   | LFH $\rightarrow$ 168                   |
| GP46                                 | <i>trpC2 rnjB::spec p<sub>xylA</sub>::rnjA cat</i>  | LFH $\rightarrow$ GP41                  |

| <b>Stamm</b> | <b>relevanter Genotyp</b>                           | <b>Referenz bzw. Konstruktion<sup>1</sup></b> |
|--------------|---|---|
| GP47         | <i>trpC2 xylR::mIs (xynP-'lacZ aphA3)</i>           | pGP417 → GP517                                |
| GP48         | <i>trpC2 amyE:: (rnjA-'lacZ aphA3)</i>              | pGP418 → 168                                  |
| GP49         | <i>trpC2 amyE:: (rnjB-'lacZ aphA3)</i>              | pGP419 → 168                                  |
| GP50         | <i>trpC2 amyE::(ykcG-'lacZ aphA3)</i>               | pGP420 → 168                                  |
| GP51         | <i>trpC2 amyE::(ptsG-S1-'lacZ aphA3)</i>            | pGP422 → 168                                  |
| GP52         | <i>trpC2 amyE::(ptsG-S2-'lacZ aphA3)</i>            | pGP423 → 168                                  |
| GP53         | <i>trpC2 amyE::(xpt B.s.-'lacZ aphA3)</i>           | pGP430 → 168                                  |
| GP54         | <i>trpC2 amyE::(gcvT B.s.-'lacZ aphA3)</i>          | pGP431 → 168                                  |
| GP55         | <i>trpC2 amyE::(metK B.s.-'lacZ aphA3)</i>          | pGP432 → 168                                  |
| GP56         | <i>trpC2 amyE::(gcvT O. i.-'lacZ aphA3)</i>         | pGP433 → 168                                  |
| GP57         | <i>trpC2 amyE::( metK O. i.-'lacZ aphA3)</i>        | pGP434 → 168                                  |
| GP58         | <i>trpC2 amyE::(xpt O. i.-'lacZ aphA3)</i>          | pGP435 → 168                                  |
| GP59         | <i>trpC2 Δlict::cat</i>                             | LFH → 168                                     |
| GP60         | <i>trpC2 ΔglpD::spec</i>                            | LFH → 168                                     |
| GP61         | <i>trpC2 Δlict::cat amyE::(ptsG-R6-'lacZ aphA3)</i> | LFH → 168                                     |
| GP62         | NCIB3610 Δ <i>csrA</i>                              | GP469 → NCIB3610                              |
| GP63         | <i>trpC2 amyE::ymdA-lacZ aphA3</i>                  | pGP459 → 168                                  |
| GP64         | <i>trpC2 amyE::hfq-lacZ aphA3</i>                   | pGP460 → 168                                  |
| GP65         | <i>trpC2 amyE ::csrA-lacZ aphA3</i>                 | pGP461 → 168                                  |
| GP66         | <i>trpC2 amyE::rsmY-lacZ cat</i>                    | pGP458 → 168                                  |

1 Der Pfeil (→) steht für eine Transformation

## 7.5 Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

**Tab. 7.4. Genutzte Internetangebote**

| URL   | Anbieter                                     | Anwendung                            |
|---|--|--------------------------------------|
| <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>                     | National Institutes of Health, Bethesda, USA | Literaturrecherche                   |
| <a href="http://genolist.pasteur.fr/Subtilis/t/">http://genolist.pasteur.fr/Subtilis/t/</a> | Pasteur Institut Paris                       | Genomrecherche in <i>B. subtilis</i> |
| <a href="http://www.genome.jp/kegg/kegg.html">http://www.genome.jp/kegg/kegg.html</a>       | Kanehisa Laboratories                        | Sequenzrecherche                     |
| <a href="http://www.tigr.org/tdb/index.shtml">http://www.tigr.org/tdb/index.shtml</a>       | The Institute for Genomic Research           | Sequenzrecherche                     |
| <a href="http://au.expasy.org/tools/">http://au.expasy.org/tools/</a>                       | Swiss Institute of Bioinformatics            | Recherchen zu Proteineigenschaften   |
| <a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>                 | European Bioinformatics Institute            | Erstellen von Alignments             |

**Tab. 7.5. Genutzte Computerprogramme**

| Programm                     | Hersteller     | Anwendung                             |
|------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| ChemiCapt Version 11.07      |                | Aufnahme von Chemilumineszenzsignalen |
| SeqMan <sup>TM</sup> II 5.07 | DNASTAR        | Auswertung von Sequenzierdateien      |
| Microsoft Office XP          | Microsoft Inc. | Text- und Datenverarbeitung           |

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| Name                | Sebastian Hübner                    |
| Geburtsdatum,-ort   | 05.06.1980, Neumünster              |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                             |
| Familienstand       | ledig                               |
| Eltern              | Barbara Hübner<br>Hans-Peter Hübner |

### Schulausbildung

|           |   |
|-----------|---|
| 1986-1990 | Besuch der Gartenstadtschule in Neumünster    |
| 1990-1999 | Besuch der Immanuel-Kant-Schule in Neumünster |

### Studium

|           |  |
|-----------|--|
| 2000-2005 | Studium der Biologie an der Georg-August Universität<br>Göttingen      |
| 2002      | Vordiplom  |
| 2005      | Diplom, Göttingen im September 2005                                    |
| 2005-2008 | Promotion an der Georg-August Universität Göttingen<br>im Oktober 2008 |