

# **Regulation der Aktivität und Lokalisation von Antiterminatorproteinen der BglG-Familie**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Fabian Rothe  
aus Hannover

Göttingen 2012

**Prof. Dr. Jörg Stülke (Betreuer und 1<sup>er</sup> Referent)**

(Institut für Mikrobiologie und Genetik/ Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie/ Georg-August-Universität zu Göttingen)

**Prof. Dr. Kai Tittmann (2<sup>er</sup> Referent)**

(Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften/ Abteilung für Bioanalytik/ Georg-August-Universität zu Göttingen)

**Dr. Stephan Seiler**

(Institut für Mikrobiologie und Genetik/ Abteilung für Molekulare Mikrobiologie und Genetik/ Georg-August-Universität zu Göttingen)

Tag der mündliche Prüfung: 23.10.2012

Ich versichere, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel: „Regulation der Aktivität und Lokalisation von Antiterminatorproteinen der BglG-Familie“ selbständig verfasst und keine anderen als angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Fabian Rothe

### **Danksagung**

Als Erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Stülke bedanken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anzufertigen. Vielen Dank auch für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragend fachliche Betreuung und die zielführenden Anregungen. Auch die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die motivierende Unterstützung in den schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit haben mir sehr geholfen.

Ganz herzlichen Dank auch an meinen „Zweitbetreuer“, Herrn Dr. Boris Görke, für die gute erfolgreiche Zusammenarbeit und für die vielen Ideen und Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Kai Tittmann für die Übernahme des Koreferates danken. Ihm, Herrn Dr. Stephan Seiler und Dr. Boris Görke danke ich auch für die Teilnahme an meinem „Thesis Committee“. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf Ficner und Herrn Dr. Michael Hoppert dafür, dass sie an meiner Prüfungskommission teilnehmen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Oskar Kuipers aus Groningen, Frau Dr. Dörte Becher aus Greifswald und deren Arbeitsgruppen. In ihren Laboren durfte ich weiterführende Arbeiten verrichten und habe mich dort immer sehr wohl gefühlt. Bei Frau Dr. Elke Hammer aus Greifswald bedanke ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit. Auch bei allen SysMo-Kollegen bedanke ich mich für die sehr angenehmen Tagungen und die gute Zusammenarbeit.

Es ist mir ein Bedürfnis mich auch bei meinen Laborkollegen zu bedanken. Martin Lehnik, Nico Pietack und Frederik Meyer danke ich nicht nur für Unterstützung durch Ratschläge und Ideen, sondern auch für die unterhaltsame und entspannte Zeit im Büro. Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitstreitern Arne Schmeisky, Felix Mehne, Jan Gerwig, Stephanie Großhennig und Fabian Commichau für die gemeinsam verbrachte Zeit im Laboralltag bedanken. Katrin Gunka danke ich für Unterstützung im Labor, Christine Diethmaier für die Hilfe und Einführung in mein neues Thema. Natürlich bedanke ich mich auch bei Christina Herzberg. Sie musste so oft meine vielen Fragen, die ständigen Bitten um Puffer und meine kleinen Scherze ertragen.

Außerdem möchte ich mich noch bei allen hier nicht genannten ehemaligen und aktuellen Kolleginnen/Kollegen bedanken, die mich auf meinem Arbeitsweg begleitet haben.

## Danksagung

---

Ein großes Dankeschön geht auch an Sabine Lentes. Sie hat mir bei zahlreichen Experimenten geholfen und stand mir immer hilfsbereit zur Seite. Einen wichtigen Beitrag hat auch Bärbel Herbst geleistet. Dank ihrer Arbeit wurde nicht nur mir der Laboralltag enorm erleichtert.

Letztendlich bedanke ich mich bei meinen Praktikanten Tillmann Künzel, Ute Wünn und Vanessa Otten für die Hilfestellung bei verschiedenen Experimenten.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an meine Familie. Sie hat mich während der letzten Jahre immer wieder motiviert und war mir auch in schwierigen Zeiten immer eine verlässliche Stütze.

Ein ganz lieber Dank gilt meiner Lebenspartnerin Meike. Durch ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft war sie für mich besonders in kritischen Phasen meiner Doktorarbeit stets ein großer Rückhalt.

Danke!

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>2</b>
1.1. Genregulation in Bakterien.....	2
1.2. RNA-Schalter .....	3
1.3. Regulation durch RNA-Thermometer .....	5
1.4. RNA-Metabolit-abhängige regulatorische Systeme.....	6
1.5. RNA-RNA-abhängige regulatorische Systeme.....	9
1.6. RNA-Protein-abhängige regulatorische Systeme.....	10
1.7. PTS-Zucker kontrollierte Transkriptionsantitermination in Bakterien ....	12
1.7.1. Das Phosphotransferasesystem .....	12
1.7.2. Die BglG/ SacY-Familie.....	13
1.8. LicT und die Regulation der <i>bgl</i> -Gene von <i>B. subtilis</i> .....	16
1.9. BglG: Antitermination am <i>bgl</i> -Operon von <i>E. coli</i> .....	18
1.10. Subzelluläre RNA- und Proteinlokalisierung in Bakterien .....	20
1.11. Ziel der Arbeit .....	24
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1. Bakterienstämme und Plasmide .....	25
2.2. Medien.....	25
2.3. Methoden .....	28
2.3.1. Allgemeine Methoden .....	28
2.3.2. Anzucht von Bakterien.....	28
2.3.3. Stammkonservierung .....	29

2.3.4.	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation .....	29
2.3.5.	Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	30
2.3.6.	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen .....	31
2.3.7.	Präparation und Nachweis von DNA.....	32
2.3.8.	Arbeiten mit Proteinen.....	40
2.3.9.	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	48
2.3.10.	Arbeiten mit Radioaktivität.....	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.</b>	<b><i>In vitro</i> Phosphorylierung von BglG .....</b>	<b>53</b>
3.1.1.	Ziel der Untersuchung.....	53
3.1.2.	Aufreinigung von EI, HPr, FruB und BglG .....	53
3.1.3.	Optimierung der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von BglG .....	55
3.1.4.	PEP, EI und HPr-abhängige <i>in vitro</i> Phosphorylierung von BglG .....	57
3.1.5.	FruB kann HPr <i>in vitro</i> im BglG Phosphorylierungsassay ersetzen.....	60
3.1.6.	EI <sub>Bs</sub> und HPr <sub>Bs</sub> von <i>B. subtilis</i> phosphorylieren BglG <i>in vitro</i> .....	61
3.1.7.	Die essentielle Bedeutung der Phosphorylierungsstelle His208 in BglG.....	63
<b>3.2.</b>	<b>Die dynamische Lokalisation des Transkriptionsfaktors LicT.....</b>	<b>64</b>
3.2.1.	Ziel der Untersuchung.....	64
3.2.2.	Die räumliche Verteilung der $\beta$ -Glukosid aufnehmenden PTS-Komponenten..	65
3.2.3.	<i>In vivo</i> Aktivität von LicT-GFP und LicT-YFP Fusionsproteinen .....	67
3.2.4.	Die zuckerabhängige subzelluläre Verteilung von LicT.....	68
3.2.5.	$\beta$ -Glukosid abhängige dynamische Re-Lokalisation von LicT .....	70
3.2.6.	Ist die Lokalisation der LicT-Bindestellen (RATs) verantwortlich für die Lokalisation in den äußeren Bereichen? .....	72
3.2.7.	Die Bedeutung der PTS-Komponenten bei der Induktor-abhängigen LicT-Lokalisation.....	73
3.2.8.	Ist die Phosphorylierung von LicT verantwortlich für die Lokalisation in den äußeren Bereichen? .....	75
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1.</b>	<b>Phosphorylierungsabhängige Aktivierung des Antiterminators BglG .....</b>	<b>79</b>
4.1.1.	Welche Phosphorylierungsstellen regulieren BglG?.....	82
4.1.2.	Das Regulationsmodell von BglG .....	82
<b>4.2.</b>	<b>Lokalisation der allgemeinen PTS Komponenten und des Antiterminatorproteins LicT in <i>B. subtilis</i>.....</b>	<b>84</b>
4.2.1.	Die subzelluläre Organisation des PTS von <i>B. subtilis</i> .....	85
4.2.2.	Die dynamische Lokalisation von LicT .....	87

---

4.2.3.	Phosphorylierungsabhängige Lokalisation von LicT .....	90
<b>4.3.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>92</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>109</b>
<b>6.1.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>109</b>
6.1.1.	Chemikalien .....	109
6.1.2.	Im Labor verwendete Hilfsmittel.....	110
6.1.3.	Geräte und Apparaturen .....	110
6.1.4.	Kommerziell erhältliche Systeme .....	112
6.1.5.	Antikörper und Enzyme .....	112
<b>6.2.</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>113</b>
<b>6.3.</b>	<b>Stämme.....</b>	<b>127</b>
<b>6.4.</b>	<b>Plasmide .....</b>	<b>131</b>
<b>6.5.</b>	<b>Verwendete Internetangebote und Computerprogramme.....</b>	<b>138</b>
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>140</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>
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CAA	Casamino acids
CCR	Combined chain reaction
CFP	cyan fluorescent protein
deion. Wasser	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
erm	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
fwd	forward
GFP	green fluorescent protein
Glc	Glukose
IPTG	Isoprpyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
LB	Luria Bertani (Medium)
LFH	Long-Flanking-Homology
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
ORF	Offener Leserahmen
<i>ori</i>	Replikationsursprung
<i>P</i>	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PTS	Phosphotransferasesystem
RAT	Ribonukleotid-Antiterminator-Bindestelle
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Succinat
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SD	Shine Dalgarno
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SP	Sporulationsmedium
spc	Spektinomycin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
ÜN	über Nacht
$V_{\max}$	Miichaeliskonstante
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
xyl	Xylose
YFP	yellow fluorescent protein
ZAP	Zellaufschlusspuffer

**Einheiten****Vorsätze**

A	Ampere	k	kilo	$10^3$
bp	Basenpaare	m	milli	$10^{-3}$
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	$\mu$	mikro	$10^{-6}$
Da	Dalton	n	nano	$10^{-9}$
g	Gramm			
h	Stunde			
l	Liter			
m	Meter	A	Adenin	
M	molar (mol/l)	C	Cytosin	
min	Minute	G	Guanin	
sek	Sekunde	T	Thymin	
rpm	Umdrehungen pro Minute	U	Uracil	
V	Volt			
W	Watt			

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

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

## Zusammenfassung

Die Regulation der Genexpression ist essentiell für alle Bakterien und ermöglicht die Anpassung an sich verändernde Lebensbedingungen. Verschiedene Transkriptions- und Translationsfaktoren haben bei dieser Regulation eine große Bedeutung. Die Antiterminationsproteine der BglG/ SacY-Familie sind in Bakterien weit verbreitet und steuern die Expression von Genen und Operons, die an der Aufnahme und Verwertung von Kohlenstoffquellen beteiligt sind. Die substrat- und phosphorylierungsabhängige Aktivierung der Proteine der BglG/ SacY-Familie erlaubt es ihnen, an ihre Ziel-RNA zu binden und ermöglicht das Fortschreiten der blockierten Transkription. Der Transkriptionsfaktor BglG aus *E. coli* ist Äquivalent zu LicT aus *B. subtilis*. Zurzeit wird diskutiert, ob die beiden Antiterminationsproteine sich in ihrem Organismus identisch verhalten und in gleicher Weise reguliert werden. Im Unterschied zu LicT konnte der Aktivierungsmechanismus von BglG bisher nicht aufgeklärt werden und die Lokalisation von aktivem und inaktivem LicT im Vergleich zu BglG ist noch unbekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BglG durch HPr bzw. durch das zu HPr homologe FruB phosphoryliert und aktiviert wird. Des Weiteren konnte die phosphorylierungsabhängige dynamische Lokalisation von LicT nachgewiesen werden.

In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass BglG durch HPr (bzw. FruB) am Histidin-208 phosphoryliert und damit aktiviert wird. Es konnte außerdem fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden, dass LicT im inaktiven Zustand (ohne  $\beta$ -Glukoside) gleichmäßig im Zytoplasma verteilt ist und im aktiven Zustand, nach der Zugabe von  $\beta$ -Glukosiden, an den Zellpolen akkumuliert. Mutationsanalysen der konservierten Phosphorylierungsstellen von LicT konnten zeigen, dass der Phosphorylierungszustand unabhängig von der LicT-Aktivität einen Einfluss auf die dynamische Lokalisation von LicT hat. Die Ergebnisse zeigen, dass der BglG-Regulationsmechanismus von *E. coli* identisch zu dem von LicT aus *B. subtilis* und zu den anderen Mitgliedern der BglG/ SacY-Familie ist. Außerdem konnte festgestellt werden, dass es sich bei der von LicT kontrollierten Regulation der Genexpression nicht um einen einfachen Mechanismus, sondern um einen hoch dynamischen Prozess handelt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass noch weitere dynamische Lokalisationsprozesse unter den zahlreichen Regulationsmechanismen zu finden sind. Weitere Untersuchungen können aufklären, welche Faktoren und posttranslationalen Modifikationen die dynamische Proteinlokalisierung letztendlich beeinflussen.

## 1. Einleitung

### 1.1. Genregulation in Bakterien

Bakterien haben sich im Laufe der Evolution an viele unterschiedliche ökologische Nischen angepasst und einige Arten entwickelten sich zu Spezialisten in ihrem Lebensraum. Durch ihre Eigenschaft, extreme Lebensräume zu besiedeln, konnten letztendlich extremophile Bakterien entstehen. Zu solchen Spezialisten gehören zum Beispiel die thermophilen, halophilen, psychophilen, acidophilen und alkalophilen Bakterien, sowie noch viele andere extremophile Bakterien. In den einzelnen unterschiedlichen Nischen sind die Bakterien häufig stark schwankenden Umwelteinflüssen ausgesetzt und stehen in Konkurrenz mit anderen Organismen. Daher ist es wichtig, dass die Organismen neue Umweltbedingungen bzw. Nährstoffveränderungen wahrnehmen können und schnell auf die neuen Bedingungen reagieren, ohne dabei zu viel Energie und Nährstoffe zu verbrauchen. Das Bodenbakterium *Bacillus subtilis* oder auch die Enterobakterien wie *Escherichia coli* sind einer Vielzahl von sich verändernden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Bodenbakterien müssen sich auf Temperaturschwankungen, veränderte Sauerstoffbedingungen oder wechselnde Nährstoffverfügbarkeit einstellen können. *B. subtilis* ist in der Lage, eine Vielzahl von verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu verwerten und für ein effizientes Wachstum zu nutzen. Aufgrund der großen Zahl an konkurrierenden Bakterien im Boden kann sich *B. subtilis* mit dieser Fähigkeit gegenüber anderen Bakterien durchsetzen. Wichtig dabei ist, die energiereichen Kohlenstoffquellen zuerst zu verwerten. Dieser Regulationsmechanismus wird auch Katabolitenrepression genannt (Deutscher, 2008; Görke & Stülke, 2008). Auch *E. coli* muss in seinem Habitat mit großen Schwankungen zurechtkommen, z.B. mit sich stark ändernden pH-Werten, mit wechselnden Nährstoffbedingungen oder im Konkurrenzkampf mit anderen Mikroorganismen.

Bakterien haben verschiedene Strategien und Mechanismen entwickelt, um die physikalischen und chemischen Umweltsignale wahrzunehmen und in Änderungen von Enzymaktivitäten bzw. der Genexpression umzuwandeln. Diese Prozesse bezeichnet man auch als Signaltransduktion (Parkinson, 1993; Stock *et al.*, 2000). Die notwendige Regulation kann dabei auf verschiedenen Ebenen stattfinden.

Proteine haben eine große Bedeutung bei der Regulation und Kontrolle der Stressantwort. Proteinkinasen und die Proteinphosphorylierung, sowie alternative Sigmafaktoren sind nur

zwei bedeutende Beispiele (Krämer & Jung, 2010). Des Weiteren ist das Zweikomponentensystem mit einer Histidinkinase (Sensor kinase) und einem Antwortregulator ein weit verbreitetes Transduktionssystem in Bakterien (Stock *et al.*, 2000). In Bakterien wird hauptsächlich die Transkription reguliert, wobei es sich dabei meistens um einen einfachen "Ein/ Aus"-Schalter handelt.

Mit dem Auftreten der RNA-Welt-Theorie wurde schnell deutlich, dass die RNA, neben den Proteinen, auch viele sensorische und regulatorische Eigenschaften besitzt (Serganov & Patel, 2007). Eine Vielzahl von RNA-Schaltern, die sich meistens im 5'-untranslatierten Bereich verschiedener Gene befinden, können die Expression ganzer Operons kontrollieren. Kleine Metabolite verursachen eine Veränderung in der Konformation der RNA-Schalter und bewirken das Ein- und Ausschalten der Transkription (Winkler & Breaker, 2005). Des Weiteren regulieren viele kleine RNAs die Genexpression durch RNA-RNA oder RNA-Proteininteraktion (Majdalani *et al.*, 2005). Die Feinabstimmungen der vielen Regulationen erfolgen meist posttranskriptional, dazu gehört unter anderem auch die RNA- und Proteinstabilität.

## 1.2. RNA-Schalter

Bei RNA-Schaltern handelt es sich um nicht kodierende sensorische RNAs. Durch das Binden von Metaboliten, RNAs oder Proteinen können RNA-Schalter die Genexpression maßgeblich regulieren. Aber auch auf pH-Werte und Temperaturunterschiede können RNA-Schalter reagieren (Klinkert & Narberhaus, 2009). RNA-Schalter befinden sich hauptsächlich im nicht translatierten 5' Bereich (5'-UTR) ihres zu regulierenden Gens und konnten schon in allen drei Domänen des Leben identifiziert werden (Tucker & Breaker, 2005; Winkler & Breaker, 2005). Die „cis“ kodierten RNAs modifizieren meistens die Expression von Transportersystemen oder die Gene verschiedener Biosyntheseprozesse. RNA-Schalter bestehen meist aus zwei funktionalen Domänen. Die Aptamer-Domäne ist für die Ligandenbindung zuständig und die Expressionsplattform ist mit RNA-Elementen gekoppelt, die an der Genregulation beteiligt sind (Winkler & Breaker, 2003). Die Aptamer-Domäne ist stark strukturiert und bildet eine selektive Bindetasche für das Zielmolekül (Effektor) und ist unabhängig von der Expressionsplattform. Die Aptamerregion ist ca. 70-170 Basen lang und ist mit der Expressionsplattform überlagert.

Die Effektoren der RNA-Schalter werden in Protein-RNA, RNA-RNA und Metabolit-RNA regulatorische System aufgeteilt (Winkler, 2005). Einige typische Effektoren der RNA-

Schalter sind Metallionen ( $Mg^{2+}$ ), Aminosäuren, Koenzyme, Purine, der sekundäre Messenger c-di-GMP, Kohlenhydrate, Proteine oder tRNAs (Bastet *et al.*, 2011).

Durch die Bindung eines Effektors an das Aptamer findet eine strukturelle Veränderung statt, die auch zu einer Konformationsänderung in der Expressionsplattform führt. Die Neuordnung in der Expressionsplattform bestimmt, ob das zu regulierende Gen exprimiert wird.

In Bakterien findet die Regulation durch RNA-Schalter entweder auf der translationalen oder der transkriptionalen Ebene statt (Nudler & Mironov, 2004; Waters & Storz, 2009). In einem transkriptional regulierenden RNA-Schalter bewirkt die Bindung des Effektors und die damit verbundene Strukturveränderung entweder die Ausbildung oder die Unterdrückung eines Terminators. Translationale RNA-Schalter hingegen kontrollieren die Zugänglichkeit der Shine Dalgarno (SD) Sequenz bzw. des Startkodons für die Ribosomen (Nudler & Mironov, 2004; Winkler, 2005). Ob der RNA-Schalter nach der Bindung des Effektors die Translation des Gens reprimiert oder aktiviert, ist jeweils von Struktur und Aufbau abhängig. In vielen Organismen wurden schon Beispiele für beide Möglichkeiten gefunden, aber zusätzlich zu diesen beiden Mechanismen der Genregulation wurde der *glmS* Riboswitch in *B. subtilis* entdeckt. Nach der Bindung von Glukosamin-6-phosphat schneidet der Riboswitch sich selbst und wird zum Ziel der RNase J1 (Collins *et al.*, 2007). Die RNA-Schalter können auch kombiniert oder als Tandem auftreten, um bei der Regulation mehr Komplexität zu erreichen (Coppins *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2004). RNA-Schalter sind nur einmal in der Lage, ihre Struktur in Abhängigkeit vom Liganden zu verändern. Ein Hin- und Herwechseln zwischen den einzelnen Konformationen ist daher nicht möglich.

Die genetische Kontrolle durch RNA-Schalter ist ein weit verbreitetes Phänomen und wurde schon in einer Vielzahl von verschiedenen Organismen entdeckt (Nahvi *et al.*, 2002). In Archaeen konnten Riboswitch-ähnliche Strukturen beschrieben werden und sogar in Pilzen und Pflanzen konnten Metabolit-bindende RNA-Elemente identifiziert werden (Mandal *et al.*, 2003; Rodionov *et al.*, 2002; Sudarsan *et al.*, 2003). Besonders die Ligand-bindenden Aptamere sind stark über alle Domänen des Lebens konserviert. Die Expressionsplattformen variieren dafür häufiger und unterscheiden sich in der Sequenz oder auch in der genetischen Regulation (Breaker, 2012; Thore *et al.*, 2006; Winkler *et al.*, 2002).

*E. coli* und *B. subtilis* sind die am intensivsten untersuchten Modellorganismen und gleichzeitig sind auch dort die RNA-Schalter am besten untersucht. In *B. subtilis* und in den Gram-positiven Bakterien wird die Genregulation häufig auf der Ebene der frühzeitigen Transkriptionstermination reguliert. Bei Gram-negativen Bakterien hingegen wird meistens

die Translationsinitiation kontrolliert und in Eukaryonten wirken die Metabolit-bindenden Riboswitche als Regulatoren des Splicing (Nudler & Mironov, 2004).

In *B. subtilis* konnte bisher für 4,1% der Gene eine Kontrolle durch RNA-vermittelte Regulation nachgewiesen werden (Tab. 1.1.). Bisher bleibt aber unklar, wie viele der vorhergesagten 4106 offenen Leserahmen unter der Kontrolle von nicht kodierenden sensorischen RNAs sind (Winkler, 2005). In den nächsten Kapiteln werden Beispiele für RNA-Schalter und deren Mechanismen aus den einzelnen Gruppen der Effektormoleküle (Tab. 1.1.) beschrieben.

**Tab. 1.1.: RNA abhängige genetische Kontrolle in *B. subtilis*<sup>a</sup>**

Effektorklasse	Anzahl der regulierten Transkriptionseinheiten (Genanzahl; ORFs in Prozent)	Regulation der Gene und Operons zur Synthese und Verwertung von:
Protein	21 (45; 1,1%)	Tryptophan, Folat, Glycerol, Histidin und Pyrimidinmetabolismus; Zucker Katabolismus; Rho-Synthese; Kälteschock-Antwort
RNA	19 (33; 0,8%)	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen; Aminosäurebiosynthese und Transport
Metabolite	36 (89; 2,2%)	Lysin, Guanin, Adenin, Glycin, TPP <sup>b</sup> , FMN <sup>b</sup> , Adenosylcobalamin, SAM <sup>b</sup> und Glucosamin-6-phosphat

<sup>a</sup> (Nach Winkler & Breaker, 2005); <sup>b</sup> Thiaminpyrophosphat (TPP); Flavin-Mononukleotid (FMN); S-Adenosylmethionin (SAM)

### 1.3. Regulation durch RNA-Thermometer

Alle bisher bekannten RNA-Thermometer regulieren die Initiation der Translation. Anders als die RNA-Schalter detektieren die RNA-Thermometer ein physikalisches Signal (Temperatur) und nicht die Konzentration von chemischen, RNA oder Proteinsignalen (Klinkert & Narberhaus, 2009; Narberhaus *et al.*, 2006). In den meisten dieser regulatorischen Systeme befinden sich die SD-Sequenz und das Startkodon bei niedrigen Temperaturen in einer Haarnadelstruktur. Ansteigende Temperaturen schmelzen und destabilisieren die Haarnadelstruktur und die Ribosombindestelle sowie das Startcodon werden wieder zugänglich. Dadurch erhöht sich die Effizienz der Translationsinitiation und die Proteinbiosynthese kann stattfinden. Die RNA-Thermometer befinden sich in der 5'-UTR von mRNAs und regulieren hauptsächlich Prozesse der Kälte- und Hitzeschock-Antwort (Kortmann & Narberhaus, 2012). Auch Virulenzgene werden durch Thermosensoren

reguliert, da bei der Infektion eines warmblütigen Wirtes Bakterien einem Temperaturanstieg bis zu 37°C ausgesetzt sind (Klinkert & Narberhaus, 2009). Ein Beispiel ist die Regulation des Transkriptionsregulators PrfA des Gram-positiven Humanpathogen *Listeria monocytogenes*. PrfA reguliert die Expression der Virulenzfaktoren und wird durch einen Thermosensor in der 5'-UTR reguliert. Bei niedrigen Temperaturen (<30°C) ist die SD-Sequenz durch eine Haarnadelstruktur blockiert und die Expression von *prfA* wird verhindert. Nach der Infektion eines Wirtes ist *L. monocytogenes* höheren Temperaturen (37°C) ausgesetzt und muss sich zugleich an seine neue Umgebung anpassen. Bei steigenden Temperaturen verändert sich die RNA-Struktur des Thermosensors in der 5'-UTR von *prfA* und die SD-Sequenz kann wieder von den Ribosomen gebunden werden. Das exprimierte PrfA ist jetzt in der Lage, die Virulenzgene positiv zu regulieren und ermöglicht *L. monocytogenes* die Kolonisierung der Wirtszellen (de las Heras *et al.*, 2011; Johansson *et al.*, 2002).

Eines der ersten RNA-Thermometer wurde für das *E. coli* Gen *rpoH* entdeckt, das für einen alternativen Sigmafaktor ( $\sigma^{32}$ ) kodiert (Morita *et al.*, 1999a; Morita *et al.*, 1999b). Die RNA-Struktur schließt die SD-Sequenz mit ein und blockiert das Ribosom. Besonders an diesem Thermometer ist, dass ein Teil der regulierenden RNA im ORF kodiert ist. Durch Temperaturerhöhung kommt es zum Schmelzen der RNA-Struktur und die Translation des Sigmafaktor  $\sigma^{32}$  beginnt. Der exprimierte Sigmafaktor kann nun die Gene der Hitzeschock-Antwort aktivieren.

In *B. subtilis* wurde bisher keine Regulation durch RNA-Thermometer nachgewiesen.

#### **1.4. RNA-Metabolit-abhängige regulatorische Systeme**

Die Metabolit-bindenden RNA-Schalter werden auch als Riboswitche bezeichnet und sind in Bakterien weit verbreitet. Riboswitche können verschiedene Signale (Effektoren) in der Zelle wahrnehmen und ermöglichen durch die Expression der betroffenen Gene und Operons, unabhängig von regulatorischen Proteinen, eine direkte Antwort auf metabolischen Stress.

Wie schon in Kapitel 1.2. beschrieben, bestehen die Riboswitche aus einer Expressionsplattform und einer Metabolit-bindenden Aptamerregion. Der Terminator der Expressionsplattform von Metaboliten-bindenden Riboswitches besteht meistens aus einem GC reichen Stamm mit einem Poly-U-Schwanz. Der Terminator destabilisiert die RNA-Polymerase und blockiert die Transkription der weiteren Gene (Nudler & Mironov, 2004; Winkler & Breaker, 2003)



Die stark konservierten Sequenzen und Strukturen der Aptamere ermöglichen eine Klassifizierung der verschiedenen Riboswitche abhängig vom interagierenden Signal. Bisher wurden durch Experimente und bioinformatische Untersuchungen 17 Riboswitchklassen identifiziert (Breaker, 2012). Zu den interagierenden Signalen gehören z.B. Aminosäuren und deren Derivate [Lysin, Glycin, S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosylhomocystein (SAH)], Kohlenhydrate (Glukosamin-6-Phosphat), Koenzyme [Flavin-Mononukleotide (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotide (FAD), Thiaminpyrophosphat (TPP) und Koenzym B<sub>12</sub>], Nukleotide und deren Derivate [Adenin, Guanin, zyklisches di-GMP und Queuosine (preQ1)] und Metallionen (Magnesium, Molybdän und Wolfram) (Bastet *et al.*, 2011).

Die meisten Riboswitche in den Bakterien und *B. subtilis* verhindern die Expression durch das Binden eines Metaboliten werden deshalb auch als „AUS-Schalter“ bezeichnet. So kann die Menge des Metaboliten direkt gemessen und die Expression daran angepasst werden. Dadurch wird verhindert, dass bei hoher Metabolitenkonzentration keine unnötigen Ressourcen verschwendet werden. Der TPP-Riboswitch (*thi*-Box) von *B. subtilis* ist ein typisches Beispiel für diese Art der Regulation. Hier wird die Expression der Gene für die Thiaminbiosynthese durch das Blockieren der SD-Sequenz reguliert. Interagiert kein TPP mit dem Riboswitch, dann wird die SD-Sequenz freigegeben (Nudler & Mironov, 2004). Diese Art der Regulation ist weit verbreitet und konnte schon in ca. 100 weiteren Bakterien beobachtet werden (Rodionov *et al.*, 2002).

In *B. subtilis* wurden auch positiv regulierende Riboswitche identifiziert („AN-Schalter“). Bindet der Metabolit an den Riboswitch, dann wird die Terminatorstruktur destabilisiert und die Transkription der regulierten Gene kann stattfinden. Der *pbuE*-Riboswitch ist ein Beispiel für einen sogenannten „AN-Schalter“. Der *pbuE*-Riboswitch bindet Adenin und reguliert dadurch die Verfügbarkeit eines Purin-Exporters (Mandal & Breaker, 2004). Ein weiteres Beispiel ist der Glycin-Riboswitch des *gcvT* Gens. Besonders an diesem Riboswitch ist, dass hier durch zwei Glycin Aptamere hintereinander das katabolische Glycin-Operon reguliert wird. Nur wenn an beiden Aptameren Glycin gebunden ist, wird die Struktur des Transkriptionsterminators gestört und die Transkription durch die RNA-Polymerase kann fortgesetzt werden. Die zwei Aptamere ermöglichen eine Feinregulierung der Glycinmenge in der Zelle und sorgen für eine ausgewogene Konzentration an Glycin für die Proteinsynthese (Mandal *et al.*, 2004).

Die Guanin und Adenin Riboswitche sind in *B. subtilis* am besten untersucht und regulieren fünf Operons der Purinbioynthese, des Transportes und der Umwandlung (Mandal *et al.*, 2003). Die Expression der 12 Gene des *pur*-Operons, das die Enzyme der de-novo-

Biosynthese von Purinen beherbergt, wird durch die Interaktion des Guanin-Riboswitches (G-Box) mit Guanin und den verwandten Stoffen Xanthin und Hypoxanthin reguliert. Hohe Konzentrationen der Metabolite interagieren mit der G-Box und lösen die Transkriptionstermination aus (Winkler & Breaker, 2005). Der Guanin-Riboswitch des *xpt-pbuX*-Operons, das auch die Purinsynthese reguliert, ist ein transkriptionaler „AUS-Schalter“. Der Riboswitch des *xpt-pbuX*-Operons und der *pbuE*-Riboswitch sind sich in ihrer Sequenz und Struktur sehr ähnlich, allerdings sind sie in ihrer Art der Regulation unterschiedlich. Außerdem haben Analysen der 5'-UTR des *xpt-pbuX*-Operons und der Adenin-bindenden 5'-UTR des *pbuE*-Gens gezeigt, dass die Riboswitche hochselektive Bindetaschen bilden und genau zwischen Guanin und Adenin Bindung unterscheiden können (Mandal *et al.*, 2003; Mandal & Breaker, 2004). Interessant an diesen beiden Riboswitchen ist, dass durch das Austauschen von einem Cytosin- zu einem Uracil-Ribonukleotid die Spezifität des Riboswitches von Guanin zu Adenin wechseln kann (Lescoute & Westhof, 2005; Mandal & Breaker, 2004; Noeske *et al.*, 2005).

Der FMN-Riboswitch bzw. das *rfn*-Element hat die komplizierteste Aptamer-Struktur in den Bakterien. Der Riboswitch ist in Bakterien weit verbreitet und kontrolliert die Gene der Biosynthese und des Transportes von Riboflavin, einem Vorläufer von FMN bzw. FAD (Gelfand *et al.*, 1999; Vitreschak *et al.*, 2002). Riboflavin unterscheidet sich von FMN nur durch das Fehlen einer Phosphatgruppe, aber trotzdem kann der transkriptional regulierende FMN-Riboswitch des *ribDEATH*-Operons von *B. subtilis* das FMN 100-mal stärker als das Riboflavin binden (Winkler *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass die komplexe Struktur des FMN-Riboswitch, für die spezifische Interaktion mit dem FMN-Phosphatmotiv benötigt wird (Winkler & Breaker, 2005).

Der SAM-Riboswitch und der Lysin-Riboswitch gehören neben dem schon beschriebenen Glycin-Riboswitch zu den Aminosäuren-abhängigen RNA-Schaltern. Der SAM-Riboswitch (S-Box) wurde hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien identifiziert und alleine in *B. subtilis* sind 11 Operons unter der Kontrolle der S-Box (Grundy & Henkin, 1998). Der SAM-Riboswitch kontrolliert in *B. subtilis* den Metabolismus von Aminosäuren und ist direkt am Schwefelmetabolismus sowie an den Biosynthesen von Cystein, Methionin und S-Adenosylmethionin beteiligt. SAM ist ein wichtiges Koenzym und eine wichtige Methylgruppenquelle für die Modifikation von Nukleinsäuren und Proteinen (Nudler & Mironov, 2004). Sobald SAM in großen Mengen in der Zelle vorliegt, bindet SAM an den RNA-Schalter und stört die Antiterminationsstruktur.

Der Lysin-Riboswitch von *B. subtilis* bindet spezifisch L-Lysin und kontrolliert *lysC*, ein Gen der Lysinbiosynthese. Der Lysin-Riboswitch ist ein gutes Beispiel dafür, dass sich RNA-Schalter gut als Ziel für Medikamente eignen. Es konnten Lysin-Analoga identifiziert werden, die zu einer permanenten Termination führen und somit *B. subtilis* abtöten (Lu *et al.*, 1992; Winkler & Breaker, 2005). Synthetisch hergestellte analoge Metabolite, die an der Aptamerdomäne eines „Aus-Schalters“ binden, könnten als antimikrobielle Stoffe verwendet werden.

Die Struktur der Riboswitche in *B. subtilis* ist sehr vielfältig. Zu der Gruppe der Metabolit-bindenden RNA-Schalter gehört z. B. auch das GlnS-Ribozym (s. Kap. 1.5.), obwohl es sich hier um ein sich selbst schneidendes Ribozym handelt.

Riboswitche sind sehr komplex in ihrer Struktur und viele Einzelheiten in ihrer Entstehung sowie ihrer Funktion sind noch unbekannt. Es ist auch davon auszugehen, dass durch fortschreitende Genomsequenzierungen und bioinformatische Untersuchungen immer mehr Riboswitch-Gruppen identifiziert werden.

### 1.5. RNA-RNA-abhängige regulatorische Systeme

Neben verschiedenen Metaboliten und Proteinen können auch RNAs RNA-Schalter regulieren. Dieser Mechanismus wird in *B. subtilis* und in Gram-positiven Bakterien auch als T-Box-Antitermination bezeichnet. Die Regulation durch T-Box-RNAs ist in *B. subtilis* schon gut untersucht und beeinflusst die Expression von vielen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und von Genen der Aminosäurebiosynthese (Grundy & Henkin, 2003). Bei tRNAs bindenden RNA-Schaltern werden zum Beispiel die Synthetasegene von Tyrosin (*tyrS*), Threonin (*thrS*, *thrZ*), Cystein (*cysES*), Glycin (*glyQS*), Leucin (*leuS*), Phenylalanin (*pheS*) und des *ilv-leu*-Operon reguliert (Grundy & Henkin, 2003). Die T-Boxen befinden sich in der 5'-UTR der jeweiligen mRNAs. Die T-Box bindet ungeladene tRNAs durch eine hochkonservierte Sequenz, die komplementär zu dem 5'-NCCA-3'-Ende der tRNA ist und stabilisiert eine Antiterminatorsequenz (Grundy & Henkin, 1993; Putzer *et al.*, 1995). Durch die Antitermination ist die Expression der nachfolgenden Gene jetzt möglich (Putzer *et al.*, 2002). Befinden sich zum Beispiel nur geringe Mengen an Tyrosin in der Zelle, dann sinkt gleichzeitig das Verhältnis von geladener tRNA<sup>Tyr</sup> zu ungeladener tRNA<sup>Tyr</sup>. Die ungeladenen tRNAs<sup>Tyr</sup> binden die entsprechenden T-Box-RNAs und induzieren die Expression der Gene für die Tyrosinsynthese (Grundy *et al.*, 1997; Winkler & Breaker, 2005).

Die Spezifität der Regulation wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen bei der RNA-RNA-Interaktion ermöglicht. Zum einen interagieren drei konservierte Nukleotide der T-Box-RNA mit dem Antikodon der tRNA und zum anderen interagiert das 3'-Ende der tRNA spezifisch mit dem Antiterminator. Diese Interaktion stabilisiert den Antiterminator und ermöglicht die Expression der Gene (Grundy *et al.*, 1994; Winkler, 2005).

### 1.6. RNA-Protein-abhängige regulatorische Systeme

Die Regulation der Genexpression durch RNA-bindende Proteine wurde schon über viele Jahre erforscht (Houman *et al.*, 1990). Es wurde gezeigt, dass Protein-bindende RNA-Schalter, im Vergleich zu den Riboswitchen, eine einfache Struktur haben. In diesem Fall bildet das Protein die Bindetasche für die Effektor-RNA Interaktion.

Die regulatorischen RNA-bindenden Proteine werden in zwei Gruppen eingeteilt. Es wird unterschieden zwischen Proteinen, die ohne einen Effektor an die RNA binden und durch verschiedene Proteinkonzentration die Expression regulieren („Feedback-Hemmung“) oder deren Bindungsaktivität durch intrazelluläre Signale ausgelöst wird (Schlax & Worchunsky, 2003; Stülke, 2002). Viele RNA-bindende Proteine können durch das Binden eines Liganden (Effektors) allosterisch reagieren und können die Genregulation beeinflussen. Im Gegensatz dazu binden Riboswitche den Effektor direkt und haben deshalb viel komplexere Sequenzen und Strukturen (Winkler & Breaker, 2005).

Zu der ersten Gruppe gehören RNA-bindende Proteine die sich selbst durch „Feedback-Hemmung“ regulieren. Ein Beispiel ist die Regulation der Expression des Operons von ribosomalen Proteinen (r-Proteine) in Bakterien. r-Proteine interagieren normalerweise mit ribosomaler RNA, sind aber r-Proteine im Überfluss in der Zelle vorhanden, dann können die r-Proteine auch am RNA-Schalter in der 5'-UTR der ribosomalen Operons binden (Winkler, 2005). Diese Art der „Feedback-Hemmung“ hat einen negativen Effekt auf die eigene Expression und reguliert die benötigten Mengen an ribosomalen Proteinen. In *B. subtilis* konnte „Feedback-Hemmung“ durch das ribosomale Proteine L20 nachgewiesen werden. L20 reguliert das *infC-rpmI-rplT* Operon. Dieses Operon kodiert für den Translationsfaktor IF3 und für die r-Proteine L35 und L20. Ähnlich wie bei Metabolit-regulierten RNA-Schaltern bindet L20 in der 5'-UTR von *infC* und verhindert die frühzeitige Transkriptionstermination (Choonee *et al.*, 2007).

Zur zweiten Gruppe gehören RNA-bindende Proteine, deren Bindungsaktivität durch niedermolekulare Effektoren, regulatorische Proteine und Proteinmodifikation reguliert wird.

Durch einen Effektor oder Proteinmodifikationen wird entweder die Bindungsaffinität der Regulatorproteine erhöht oder herabgesenkt. Die regulatorischen Proteine werden abhängig von ihrer Funktion auch als Terminator- oder Antiterminatorprotein bezeichnet. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das TRAP-Protein (*trp* RNA bindendes Attenuationsprotein) aus *B. subtilis*. Das TRAP-Protein bindet an einer (G/C)AG Wiederholung in der 5'-UTR der RNA und bildet eine Ringstruktur aus 11 Monomeren, die das Tryptophanoperon *trpEDCFBA* kontrollieren (Babitzke, 2004). Bei steigender Tryptophankonzentration bindet Tryptophan an allen Untereinheiten des TRAP-Proteins und wird aktiviert. Das aktivierte TRAP bindet mit jedem einzelnen Monomer an die (G/C)AG Nukleotide der 5'-UTR-RNA und verhindert die Bildung einer Antiterminatorstruktur.

Weitere Beispiele sind die Regulation der Histidin-Verwertung und der Pyrimidin-Synthese. Das *hut*-Operon, wo die Proteine für die Histidin Verwertung kodiert sind, wird durch das Protein HutP reguliert (Kumar *et al.*, 2006; Kumarevel, 2007). *hutP* ist das erste Gen des *hut*-Operons und zwischen *hutP* und den anderen Genen befindet sich ein stabiler Terminator. Bei erhöhten Mengen von L-Histidin in der Zelle bindet HutP Histidin und wird aktiviert. Das aktive HutP kann nun am RNA-Schalter binden und stabilisiert dadurch eine Antiterminatorstruktur. Die *hut*-Gene für die Verwertung von Histidin können nun exprimiert werden. Das zweite Beispiel ist die Regulation des *pyr*-Operons in *B. subtilis*, das für die Gene der UMP-Synthese kodiert. Das erste Gen des Operons kodiert für das bifunktionale und RNA-bindende Protein PyrR. PyrR ist der Regulator des *pyr*-Operon und ist gleichzeitig eine Uracil-Phosphoribosyltransferase (Turner *et al.*, 1994). Die Bindestellen von PyrR liegen in der 5'-UTR vor *pyrR*, zwischen *pyrR* und dem zweiten Gen *pyrP* sowie zwischen *pyrP* und dem dritten Gen *pyrB* (Hobl & Mack, 2007). PyrR wird durch die Anwesenheit von UMP, UDP und UTP stimuliert und bindet jeweils unabhängig voneinander an eine der Bindestellen in der 5'-UTR. Die Bindung von PyrR mit dem RNA-Schalter bewirkt die Ausbildung einer Anti-Antiterminatorstruktur und reduziert die Expression der Gene des *pyr*-Operons.

Zusätzlich zu den RNA-bindenden Proteinen, die kleine Moleküle binden, gibt es noch RNA-bindende Proteine, die durch Proteinphosphorylierungen reguliert werden. Solche Proteine wurden hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien identifiziert und kontrollieren unter anderem den Saccharose-,  $\beta$ -Glukosid-, Glukose- und Laktosekatabolismus (Stülke *et al.*, 1998; Stülke, 2002). Diese RNA-bindenden Proteine enthalten meistens zwei regulatorische Domänen (PRDI und PRDII), die unabhängig voneinander, unter verschiedenen Bedingungen, phosphoryliert werden (s. Kapitel 1.8.2.).

Neben den oben genannten Beispielen für RNA-bindende Proteine, gibt es in Bakterien eine Vielzahl von weiteren Operons die durch proteinabhängige Antitermination reguliert werden. Dazu gehören z.B. das *glp*-Regulon in *B. subtilis*, das *nas*-Regulon in *Klebsiella pneumoniae* oder auch das *ami*-Operon in *Pseudomonas aeruginosa* (Kumarevel, 2007; Rutberg, 1997).

## 1.7. PTS-Zucker kontrollierte Transkriptionsantitermination in Bakterien

Das Antiterminationsprotein BglG von *E. coli* ist das erste beschriebene RNA-bindende Protein, das durch die PTS-Komponenten phosphoryliert und kontrolliert wird. Es bindet in Anwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden an der 5'-UTR der mRNA und unterstützt die Ausbildung der einer Antiterminationsstruktur und die Expression des *bgl*-Operons wird aktiviert (Amster-Choder *et al.*, 1989; Amster-Choder & Wright, 1990; Amster-Choder & Wright, 1992; Amster-Choder & Wright, 1993). In *B. subtilis* wurden vier solcher Antiterminationsproteine (GlcT, LicT, SacY und SacT) identifiziert und gehören zusammen mit BglG in die Gruppe der BglG/ SacY-Familie.

### 1.7.1. Das Phosphotransferasesystem

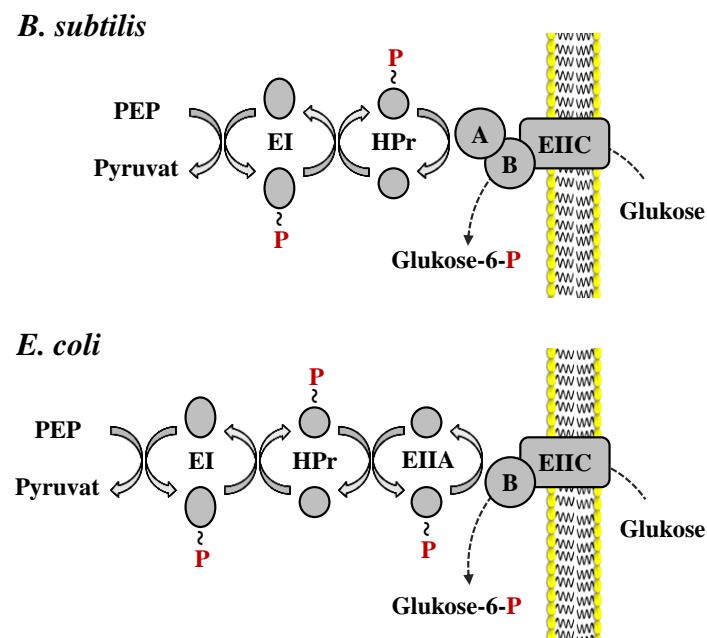
In *E. coli*, *B. subtilis* und anderen Bakterien spielt das PTS eine zentrale Rolle bei der Regulation von katabolischen Operons und bei der Aufnahme von Zuckern. Die PTS-gesteuerte Zuckeraufnahme wurde zuerst in *E. coli* identifiziert und ist nahezu in allen Bakterien identisch (Deutscher *et al.*, 2006; Kundig *et al.*, 1964).

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. Das PTS besteht aus den zwei allgemeinen zytoplasmatischen Komponenten Enzym I (EI) und HPr und aus einer für jeden Zucker spezifischen Permease. Das zytoplasmatische EI und HPr wird für die Aufnahme sämtlicher PTS-abhängiger Kohlenstoffquellen benötigt. Die Permeasen bestehen aus ein oder zwei hydrophoben Membrandomänen (Domäne C und D) und aus zwei hydrophilen zytoplasmatischen Domänen (Domäne A und B). Der EII-Komplex besteht entweder aus einem einzelnen Protein oder aus einem „Fusions-Komplex“ aus zum Teil löslichen Proteinen. In *E. coli* besteht der EII<sup>Glc</sup>-Komplex aus dem in der Membran gebundenen Transporterprotein EIIC und aus dem Phosphattransferprotein EIIB. Das EIIA ist nicht an den Komplex gebunden und kann sich frei im Zytoplasma bewegen. In *B. subtilis*

sind alle Domänen der Glukose-Permease zu einem Polypeptid (EIICBA) fusioniert (Schmalisch *et al.*, 2003; Stülke & Hillen, 2000).

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. Das EI transferiert energiereiches Phosphat vom Phosphoenolpyruvat (PEP) zum HPr. HPr hat zwei Phosphorylierungsstellen und wird durch das EI ausschließlich am His-15 phosphoryliert. Phosphoryliertes HPr überträgt das Phosphat anschließend auf die EIIA-Domäne des EII-Komplexes und von der EIIA-Domäne wird das Phosphat an die EIIB-Domäne weitergeleitet.

Der Ablauf der Phosphorylierungskaskade des PTS in *B. subtilis* und *E. coli* ist in Abb. 1.1. schematisch für Glukose dargestellt.



**Abb. 1.1.:** Das Glukose-spezifische Phosphotransferasesystem von *B. subtilis* und *E. coli*

Das Phosphat (~P) wird über eine Phosphorylierungskaskade vom PEP über das EI, HPr, EIIA<sup>Glc</sup> und EIIB<sup>Glc</sup> auf die aufgenommene Glukose übertragen. Das Glukose-6-Phosphat kann dann in die Glykolyse gelangen, um daraus Energie zu gewinnen Metabolismus. Das EIIC<sup>Glc</sup> ist nur für den Glukosetransport zuständig. In *E. coli* ist das EIIA<sup>Glc</sup> cytoplasmatisch und nicht Teil eines Komplexes wie bei *B. subtilis*.

### 1.7.2. Die BglG/ SacY-Familie

Die Proteine der BglG/ SacY-Familie kontrollieren die Expression von verschiedenen Genen und Operons, die an der Aufnahme und Verwertung von spezifischen Zuckern beteiligt sind. Zu diesen Zuckern gehören z.B. Glukose, Saccharose, Laktose und  $\beta$ -Glukoside (Deutscher

*et al.*, 2006). Wie schon beschrieben, ist das Antiterminatorprotein BglG das erste beschriebene RNA-bindende Protein, das durch die PTS-Komponenten phosphoryliert und kontrolliert wird. SacY ist das erste beschriebene Antiterminationsprotein aus *B. subtilis* und gibt zusammen mit dem BglG der BglG/ SacY-Familie seinen Namen. Des Weiteren gehören mit GlcT, SacT und LicT noch drei weitere homologe Proteine zu der BglG/ SacY-Familie.

Die Regulation durch die Antiterminationsproteine findet in der 5'-UTR mRNA der zu regulierenden Gene und Operons statt. Die Antiterminationsproteine binden im aktiven Zustand am RNA-Schalter und sind maßgeblich an der Ausbildung von zwei unterschiedlichen RNA-Strukturen beteiligt (Langbein *et al.*, 1999; Schilling *et al.*, 2004). Ist kein spezifischer Zucker vorhanden bzw. ist der Antiterminator nicht aktiv, dann ist die Transkription durch eine thermodynamisch bevorzugte Terminatorstruktur blockiert. Der aktive Antiterminator bindet an die Ribonukleotid-Antiterminator-Bindestelle (RAT) und bildet die RAT-Struktur. Die kleine RAT-Struktur (29 bp) überlappt mit dem Stammbereich des Terminators, was zur Folge hat, dass sich die beiden Strukturen gegenseitig ausschließen. Letztendlich kann nur eine der beiden Strukturen gebildet werden.

Die transkriptionalen Antiterminatoren der BglG/ SacY-Familie haben alle den gleichen Aufbau. Sie bestehen aus einer N-terminalen RNA-Bindedomäne (RBD) mit 60 Aminosäuren und aus zwei sich wiederholenden PTS-Regulationsdomänen (PRDs) (Görke & Stülke, 2008; Greenberg *et al.*, 2002). Die PRDI und PRDII der Antiterminatoren besitzen bis zu vier stark konservierte Histidinreste, die durch das PTS phosphoryliert werden. Bei allen Regulatoren der BglG/ SacY Familie bewirkt die Phosphorylierung in der PRDI eine Inaktivierung des Antiterminators. Die Phosphorylierung der PRDI am ersten Histidinrest erfolgt durch den EII-Komplex (bzw. EIIB) und benötigt funktionales EI und HPr. Ist ein spezifischer PTS-Zucker verfügbar, dann wird das Phosphat nicht mehr auf den Antiterminator übertragen und stattdessen wird der PTS-Zucker phosphoryliert.

Antiterminatoren, die nicht in der PRDI phosphoryliert sind, können ein Dimer bilden und an der RAT-Sequenz binden. Die Bindung in der 5'-UTR verhindert die Bildung der Terminatorstruktur und die Gene, die für die Aufnahme und Verwertung der Zucker kodieren, können vollständig transkribiert werden. Einige Antiterminatoren müssen erst durch die Phosphorylierung in der PRDII aktiviert werden, bevor sie an der RAT-Sequenz binden können. Wegen der unterschiedlichen Aktivierung wurden die Antiterminatoren in zwei Gruppen unterteilt. Zur ersten Gruppe gehört das SacY und GlcT von *B. subtilis*, die keine Aktivierung in der PRDII benötigen. Zur zweiten Gruppe gehört das BglG von *E. coli* und das SacT und LicT von *B. subtilis*. Die drei Proteine benötigen die Phosphorylierung in der



PRDII, damit die Antiterminationsproteine aktiviert werden und an die regulatorische RNA binden können. Die HPr-vermittelte Phosphorylierung in der PRDII hat auch einen zusätzlichen aktivierenden Einfluss auf GlcT und SacY, ist aber nicht essentiell für die Aktivität (Bachem & Stülke, 1998; Schmalisch *et al.*, 2003; Tortosa *et al.*, 1997). Die aktivierende HPr-vermittelte Phosphorylierung in der PRDII hat auch einen Einfluss auf die CcpA unabhängige Katabolitenrepression. Ist ein vom PTS schneller verwertbares und energiereiches Kohlenhydrat (z. B. Glukose) zusätzlich zu einem zweiten Zucker (z.B.  $\beta$ -Glukoside) vorhanden, dann kommt es zum Konkurrenzkampf um das HPr-His15-Phosphat zwischen der EIIA<sup>Glc</sup>-Domäne und der PRDII der Antiterminatoren (Deutscher *et al.*, 2006). Das Phosphat wird bei der Anwesenheit von Glukose hauptsächlich auf das EIIA<sup>Glc</sup> übertragen und führt zur fehlenden Phosphorylierung in der PRDII des Antiterminators (z. B. LicT). Ohne die Aktivierung in der PRDII ist LicT nicht aktiv und die Transkription der  $\beta$ -Glukosid verwertenden Gene wird blockiert. In Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wird bei der Anwesenheit von schnell verwertbaren Kohlenstoffen das HPr durch die HPr-Kinase (HPrK) am Serin-46 phosphoryliert. Die Phosphorylierung im Serin-46 reduziert die PEP-abhängige Phosphorylierung am HPr-His15 und mindert zusätzlich die Aktivierung von LicT (Deutscher *et al.*, 2006).

Die Aufnahme und Verwertung von Saccharose wird durch die zwei Antiterminationsproteine SacT und SacY reguliert. SacT kontrolliert das *sacPA*-Operon, das für die Saccharose-Permease SacP und die Saccharase SacA kodiert. In Abwesenheit von Saccharose phosphoryliert und inaktiviert die Permease SacT (Arnaud *et al.*, 1992; Arnaud *et al.*, 1996). Die Aktivität von SacY wird von SacX, einer Saccharose-Permease mit geringer Affinität zum Substrat, kontrolliert. Nur wenn Saccharose in hohen Konzentrationen vorhanden ist, wird SacY aktiviert und bindet an die Ribonukleotid-Antiterminator-Bindestelle (RAT) in der 5'-UTR des *sacB*-Gens (extrazelluläre Levan-Saccharase) und des *sacXY*-Operons (Arnaud *et al.*, 1996).

GlcT reguliert die Expression des *ptsGHI*-Operons, das für die spezifische Permease EII<sup>Glc</sup> und die PTS-Komponenten EI und HPr kodiert. GlcT wird in Anwesenheit von Glukose aktiviert, bindet die RAT-Struktur in der 5'-UTR des *ptsG*-Gens und das *ptsGHI*-Operon kann komplett transkribiert werden.

Ähnlich wie GlcT reguliert LicT durch transkriptionale Antitermination die Expression des *bglPH*-Operons und des *bglS*-Gens (Le Coq *et al.*, 1995). Die Gene sind an der Aufnahme (BglP bzw. EII<sup>Bgl</sup>) und Verwertung von Aryl- $\beta$ -Glukosiden beteiligt und werden in der Anwesenheit von  $\beta$ -Glukosid-Zuckern transkribiert (s. Kapitel 1.9.). BglG reguliert das *bgl*-

Operon für die Aryl- $\beta$ -Glukosid-Verwertung in *E. coli* und ist das homologe Gegenstück zum LicT aus *B. subtilis* (s. Kapitel 1.10.).

Nicht nur die homologen Proteine sind sich sehr ähnlich, sondern auch die die RAT-Strukturen der einzelnen Regulationsmechanismen ähneln sich in der Struktur und Sequenz (Aymerich & Steinmetz, 1992; 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 & Steinmetz, 1992). LicT hingegen kann nicht an die Saccharose abhängigen RAT-Strukturen binden. Die RAT-Struktur von *ptsG* unterscheidet sich deutlich von den anderen und kein anderes Antiterminationsprotein, außer GlcT, ist deshalb in der Lage, an die 5'-UTR mRNA von *ptsG* zu binden (Schilling *et al.*, 2004).

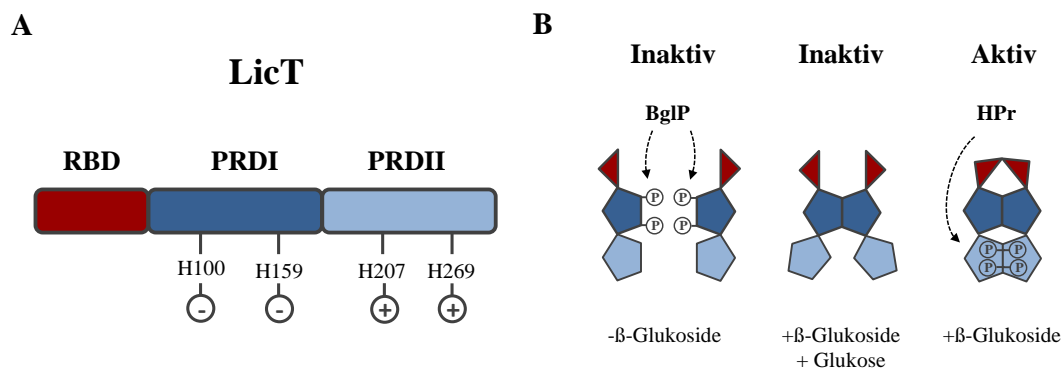
### 1.8. LicT und die Regulation der *bgl*-Gene von *B. subtilis*

Eines der am besten beschriebenen Mitglieder der BglG/ SacY-Familie ist das LicT aus *B. subtilis*. LicT reguliert die Expression des *bglPH*-Operons und des *bglS*-Gens, das zusammen mit *licT* in einem Operon liegt (Krüger & Hecker, 1995; Lindner *et al.*, 1999; Schnetz *et al.*, 1996). Die Gene sind an der Verwertung von Aryl- $\beta$ -Glukosiden beteiligt und kodieren für eine extrazelluläre  $\beta$ -Glukanase (*bglS*). *bglP* kodiert für das Aryl- $\beta$ -Glukosid spezifische Enzym EIIBCA und *bglH* kodiert für eine 6-Phosphat- $\beta$ -Glukosidase (Le Coq *et al.*, 1995). Die RAT-Strukturen befinden sich in der 5'-UTR des *bglP* und in der 5'-UTR zwischen dem *licT*- und *bglS*-Gen. Wie schon in Kapitel 1.7. beschrieben, wird die Aktivität des Antiterminationsproteins LicT abhängig von der  $\beta$ -Glukosid-Verfügbarkeit und durch die PEP-abhängige Phosphorylierung durch EI, HPr und EII in den PRDs reguliert (Lindner *et al.*, 1999).

LicT besteht aus einer 59 Aminosäuren großen N-terminalen RNA-Bindedomäne und aus zwei regulatorischen C-terminalen PRDs (221 Aminosäuren) (van Tilbeurgh *et al.*, 2001). Beide PRDs haben zwei konservierte Histidinreste und können durch das PTS phosphoryliert werden (s. Abb. 1.2. A). Die Phosphorylierungsstellen in der PRDI, His100 und His159, sind verantwortlich für die negative Regulation (Tortosa *et al.*, 2001). In Abwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden phosphoryliert das EIIB (BglP) LicT in der PRDI und inaktiviert den Antiterminator (s. Kap. 1.8.). In *licT*-Mutanten (LicT-H100A und LicT-H159A) konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsstelle His100 eine essentielle Bedeutung bei der

negativen Regulation hat, wobei das His159 nur einen geringen Einfluss auf die negative Regulation von LicT hat (Tortosa *et al.*, 2001). Die positive Regulation von LicT erfolgt durch die Phosphorylierung in der PRDII durch HPr am His207 und His269, bei der Anwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden. Das His207 wird am stärksten phosphoryliert, aber trotzdem sind beide Phosphorylierungsstellen der PRDII essentiell für die Aktivierung von LicT. Ein Aminosäureaustausch gegen Alanin (H207A bzw. H269A) führt zum kompletten Verlust der Aktivität von LicT (Deutscher *et al.*, 2006; Tortosa *et al.*, 2001).

LicT ist in Anwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden nicht mehr in der PRDI phosphoryliert und kann ohne die Phosphatgruppen ein inaktives Dimer bilden. Erst die Phosphorylierung in der PRDII führt zur Aktivierung von LicT (s. Abb. 1.2. B). Durch die Phosphorylierung in der PRDII können konservierte Bereiche mit den negativen Phosphatgruppen interagieren und ermöglichen einen Konformationswechsel der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Helix im LicT-Monomer (Declerck *et al.*, 2001; Lindner *et al.*, 2002). Der Konformationswechsel stabilisiert das Homodimer und durch die tertiäre und quartäre Neuordnung in den PRDs wird ein aktives RBD-Dimer gebildet (Graille *et al.*, 2005; van Tilbeurgh *et al.*, 2001). Durch die Aktivierung des LicT-RBD-Dimers kann die RAT-Struktur gebunden werden, eine Antiterminator-Struktur wird gebildet und die Gene der  $\beta$ -Glukosidverwertung können transkribiert werden.



**Abb. 1.2.: Die Regulation von LicT**

(a) Die Organisation der Domänen des Transkriptionsregulators LicT von *B. subtilis*. Die stimulierenden (+) und sich negativ (-) auswirkenden Phosphorylierungsstellen sind im Modell markiert. Die Phosphorylierungen werden durch das PTS katalysiert. (B) Ohne spezifischen Zucker ( $\beta$ -Glukoside) wird LicT in der PRDI vom EII<sup>bgl</sup> (BglP) phosphoryliert und inaktiviert LicT. Mit  $\beta$ -Glukosiden und mit einem zusätzlichen energiereichen Kohlenstoff wird LicT nicht mehr in der PRDI sowie in der PRDII phosphoryliert. LicT bildet ein Dimer, aber wegen der Katabolitenrepression ist der RBD-Dimer von LicT in diesem Zustand nicht aktiviert (s. Kap. 1.8.). Sind nur  $\beta$ -Glukoside verfügbar, dann wird die PRDII durch HPr phosphoryliert und Konformationsänderungen aktivieren die LicT-RBD. LicT bindet mit der aktiven RBD an die RAT-Struktur und unterstützt die Bildung eines Antiterminators (nach Graille *et al.*, 2005).

### 1.9. BglG: Antitermination am *bgl*-Operon von *E. coli*

Das BglG von *E. coli* ist der Prototyp der Antiterminatorproteine aus der BglG/ SacY-Familie. BglG reguliert die Expression des *bglGFBH*-Operon, das nur von einem Promotor aus exprimiert wird (Schaefer, 1967; Schnetz *et al.*, 1987). Das erste Gen des Operons kodiert für den Antiterminator BglG und ist von zwei *rho* unabhängigen transkriptionalen Terminatoren (*t1* und *t2*) umgeben. Die weiteren Gene kodieren für den Aryl- $\beta$ -Glukosidtransporter BglF (EII<sup>Bgl</sup>) und für zwei weitere Proteine der  $\beta$ -Glukosidverwertung (Andersen *et al.*, 1999; Schnetz *et al.*, 1987).

BglG ist das Homolog von LicT aus *B. subtilis* und wie schon in Kapitel 1.7. und 1.8. beschrieben, wird die Aktivität von BglG durch das PTS und durch die Verfügbarkeit von  $\beta$ -Glukosiden reguliert. Wie die zuvor beschriebenen Antiterminatoren besteht BglG aus einer N-terminalen RBD und aus zwei regulatorischen PRDs mit jeweils zwei Phosphorylierungsstellen (s. Abb. 1.2.). Auch hier bindet aktives BglG die konservierten RAT-Sequenzen in der 5'-UTR und verhindert die Bildung eines mit der RAT überlappenden Terminators (Aymerich & Steinmetz, 1992; Mahadevan & Wright, 1987; Schnetz & Rak, 1988). Außerdem wird BglG, wie LicT, durch seine spezifische Permease (EII<sup>Bgl</sup>) negativ reguliert. Im Gegensatz zu LicT wird BglG, wenn keine  $\beta$ -Glukoside verfügbar sind, durch das EII<sup>Bgl</sup> an die Membran rekrutiert. Die Permease bindet BglG an der Membran und phosphoryliert die PRDI mit den Phosphatgruppen aus dem PTS (Amster-Choder & Wright, 1990; Lopian *et al.*, 2010; Schnetz & Rak, 1990). In der PRDI phosphoryliertes und an die Membran gebundenes BglG kann kein aktives Dimer bilden und dementsprechend nicht an die RAT-Sequenzen binden. In Anwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden wird der Zucker über das EIIC<sup>Bgl</sup> aufgenommen und das freie Phosphat wird auf den PTS-Zucker übertragen. Bei der Zuckeraufnahme kommt es zu Konformationsänderungen im EII<sup>Bgl</sup>-Komplex und das unphosphorylierte BglG wird ins Zytoplasma entlassen. BglG ist jetzt in der Lage, ein aktives Dimer zu bilden und kann in der 5'-UTR des *bgl*-Operons die Antiterminatorstruktur bilden (Amster-Choder & Wright, 1992; Görke, 2003).

In den Gram-positiven Bakterien haben viele zu BglG homologe Antiterminationsproteine eine zusätzliche Kontrolle der ihrer Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass die HPr abhängige Phosphorylierung in der PRDII für die Aktivierung zahlreicher Antiterminatoren notwendig ist (Arnaud *et al.*, 1992; Gosalbes *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1996).

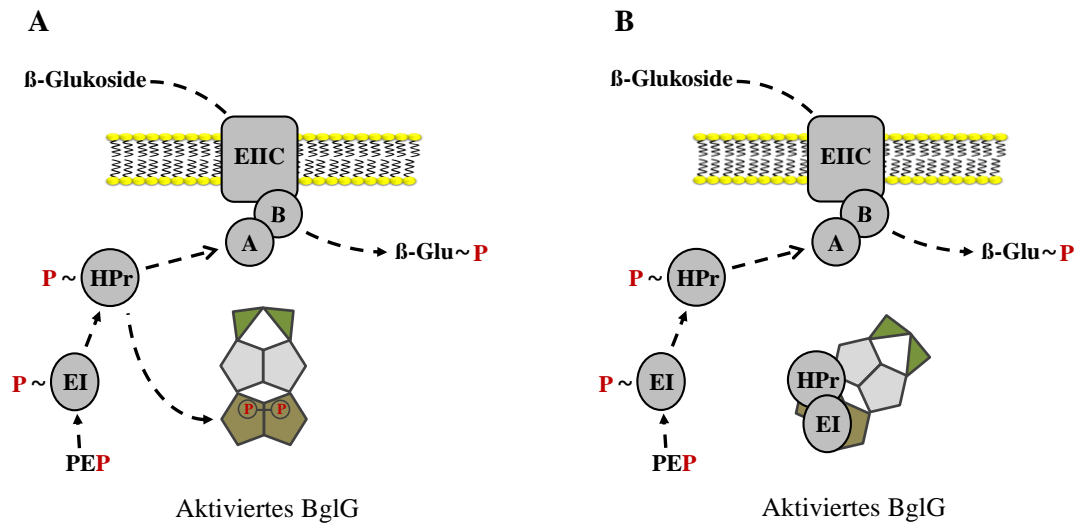
In *E. coli* konnte der Mechanismus für die Aktivierung von BglG noch nicht eindeutig aufgeklärt werden und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Zum einen konnte für BglG *in vivo* gezeigt werden, dass für die Aktivität des Antiterminators die allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr und die Phosphorylierung in der PRDII benötigt wird (s. Abb. 1.3. A). Diese Aktivierung ist unabhängig von der negativen Regulation des  $EII^{Bgl}$  (BglF) und funktioniert auch in Abwesenheit der Permease (Görke & Rak, 1999; Raveh *et al.*, 2009). Interessanterweise konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Protein FruB BglG phosphorylieren bzw. aktivieren und HPr in diesem Mechanismus ersetzen kann. FruB ist ein Fusionsprotein mit einer  $EIIA^{Fru}$ -Einheit und einer zu HPr ähnlichen Domäne (Geerse *et al.*, 1986; Görke & Rak, 1999). *In vivo* Analysen von Mutanten mit Mutationen in den konservierten Phosphorylierungsstellen ergaben, dass das His101 und/oder His160 aus der PRDI durch BglF phosphoryliert wird. Die HPr-abhängige Phosphorylierungsstelle wurde am His208 identifiziert und BglG-His208-Mutanten können nicht mehr durch EI und HPr phosphoryliert bzw. aktiviert werden (Görke, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass wie bei den Gram-positiven homologen Proteinen, BglG vom PTS durch die antagonistisch wirkenden Phosphorylierungen reguliert wird (Görke & Rak, 1999; Görke & Stülke, 2008; Lindner *et al.*, 2002).

Nichtsdestotrotz wurde ein zweites Aktivierungsmodell für BglG vorgeschlagen. Dieses Modell ist unabhängig von der Phosphorylierung durch HPr und BglG wird nur durch die Interaktion von EI und HPr aktiviert (s. Abb. 1.3. B). Analysen der zellulären Lokalisation von BglG und den PTS-Komponenten hatten gezeigt, dass BglG in Abwesenheit von spezifischen Zuckern durch BglF an die Zellmembran gebunden wird. Nach der Zugabe von Substrat wird BglG von BglF losgelassen und BglG wird an die Zellpole rekrutiert. An den Polen interagiert BglG mit HPr und EI und wird anschließend ins Zytoplasma freigelassen. Es wird vermutet, dass das BglG-Dimer durch HPr und EI an den Zellpolen stabilisiert wird (Lopian *et al.*, 2010). Dieses Modell zur Aktivierung von BglG wird durch zwei entscheidende Beobachtungen unterstützt (Raveh *et al.*, 2009). Zum einen konnte gezeigt werden, dass BglG in einem Stamm mit einer HPr-His15-Mutante noch aktiviert werden kann und zum anderen konnte die HPr-abhängige Phosphorylierung von BglG *in vitro* nicht nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1997; Chen & Amster-Choder, 1998).

Im zweiten Aktivierungsmodell wurde das zu HPr homologe FruB nicht berücksichtigt und außerdem konnte BglG nur mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) aufgereinigt werden. BglG ist nach seiner Überexpression schwer in Lösung zu halten und benötigte für die Aufreinigung das große MBP (Chen *et al.*, 1997; Chen & Amster-Choder, 1998; Chen *et al.*, 2000). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass das MBP die Phosphorylierung des

Fusionsproteins MBP-BglG beeinflusst. Die Diskrepanzen zwischen diesen beiden Modellen konnten bisher nicht geklärt werden.



**Abb. 1.3.: Die unterschiedlichen Aktivierungsmodelle von BglG**

Die EIIA Domäne von BglF, die β-Glukosid-Permease, erhält durch das allgemeine PTS (EI und HPr) den Phosphatrest vom PEP. Bei der Aufnahme von β-Glukosiden durch die EIIC Domäne wird das erhaltene Phosphat auf den Zucker übertragen und BglG wird nicht mehr negativ in der PRDI phosphoryliert. (A) BglG bildet ein Dimer und wird durch das HPr-His15-P in der PRDII phosphoryliert. Konformationsänderungen führen zur Stabilisierung des RBD-Dimers des Antiterminators und dessen Aktivierung. (B) Das unphosphorylierte BglG kann nicht mehr mit der Permease interagieren, wird an die Zellpole rekrutiert und bildet ein Dimer (s. Kap. 1.10.). Das Dimer wird an den Zellpolen durch die Interaktion mit EI und HPr stabilisiert, aktiviert und anschließend ins Zytoplasma entlassen (Görke & Rak, 1999; Lopian *et al.*, 2010).

### 1.10. Subzelluläre RNA- und Proteinlokalisierung in Bakterien

Bakterien wurden lange Zeit als unorganisierte und chaotische Reaktionsräume betrachtet. Außerdem wurde angenommen, dass sich die Chromosomen frei in der Zelle bewegen und gleichmäßig über die Zelle verteilt sind (Govindarajan *et al.*, 2012; Shapiro *et al.*, 2009). Durch neue Fluoreszenzreporter und mikroskopische Techniken konnten zum ersten Mal *in vivo* Makromoleküle in der Zelle beobachtet werden. Sehr schnell wurde gezeigt, dass Bakterienzellen eine sehr komplexe und gut kontrollierte innere Organisation besitzen. Proteine, Chromosomen, Ribosomen, Lipide und RNA haben definierte Strukturen und Lokalisationsmuster und sind nicht nur einfach über die gesamte Zelle verteilt (Broude, 2011; Lewis *et al.*, 2000; Montero Llopis *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2009; Toro & Shapiro, 2010). Die Synthese und die posttranskriptionale Modifikation der RNA finden in den Eukaryonten im Nukleus und Zytoplasma getrennt statt. Außerdem wurde lange angenommen, dass

räumlich getrennte Lokalisation von RNA nur in eukaryontischen Zellen vorkommt (Nevo-Dinur *et al.*, 2011). In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien gezeigt, dass verschiedene RNA-Moleküle auch an spezifischen subzellulären Regionen in Bakterienzellen lokalisiert sind (Keiler, 2011; Montero Llopis *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2009). Die Studien haben ergeben, dass die RNAs von Bakterien nicht willkürlich in der Zelle lokalisiert sind und dass sich das RNA-Lokalisationsmuster, abhängig von den Bedingungen, räumlich verändern kann (Nevo-Dinur *et al.*, 2011). mRNAs konnten bisher in der Nähe der Zellpole, der in der Nähe der transkribierten Gene, in einer Helix-ähnlichen Anordnung im Zytoplasma und an bzw. in der Nähe der Zellmembran nachgewiesen werden. Die Bedeutung für die räumlich getrennte Expression von Genen ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. RNAs, die in der Nähe ihres Syntheseortes am Chromosom lokalisiert sind, könnten die Hypothese unterstützen, dass die Expression von konservierten Gen-Clustern essentiell für die Bildung von Proteinkomplexen ist (Defeu Soufo & Graumann, 2004; Jones *et al.*, 2001). Durch die räumliche Nähe der Transkripte und der sich anschließenden Translation könnten sich die Genprodukte gleich zu funktionsfähigen Proteinkomplexen zusammenfinden. Die bei der Transkription und Translation von Genen in Zellen beteiligten Schritte sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. In prokaryotischen Zellen sind Transkription und Translation „gekoppelt“, was bedeutet, dass an der RNA, während es von der DNA transkribiert wird, gleichzeitig die Translation der Proteine stattfindet. Die verschiedenen RNA-Lokalisationsmuster könnten im Zusammenhang mit einer Lokalisation der Translation stehen, was zur Folge hat, dass die Proteine direkt an ihrem Bestimmungsort translatiert werden (Nevo-Dinur *et al.*, 2012). Diese Theorie würde auch mit den Ergebnissen übereinstimmen, dass die Ribosomen in *B. subtilis* und *E. coli* auch außerhalb des Nukleoid, in der Nähe der Pole und Zellperipherie lokalisiert sind (Azam *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000). Ein Beispiel für die räumliche Lokalisation von RNA-Transkripten ist die mRNA des Antiterminatorproteins BglG. Es ist schon länger bekannt, dass BglG an der Membran lokalisiert ist und mit der spezifischen Permease (BglF) interagiert (s. Kap. 1.9.). Erst vor kurzen wurde gezeigt, dass die *bglG*-mRNA ebenfalls an der Membran lokalisiert ist (Nevo-Dinur *et al.*, 2011).

Die Untersuchung der Proteinlokalisationen in Bakterien ist schon weit fortgeschrittener als die Lokalisationsstudien von RNA. Auch hier konnten durch Fortschritte in der Mikroskopie und durch neue Proteinlokalisierungstechniken in den letzten Jahren viele neue Eindrücke über die Komplexität der bakteriellen Zelle gewonnen werden. Obwohl Bakterien Organellen fehlen, besitzen sie auf der Ebene der Proteinlokalisation eine eindrucksvolle subzelluläre

Organisation (Lybarger & Maddock, 2001). Des Weiteren konnten immer mehr Beispiele für bakterielle Proteine identifiziert werden, deren spezifische intrazelluläre Lokalisation essentiell für die Funktion und Regulation ist. Offensichtlich sind Bakterien in der Lage, Proteine bzw. Proteinkomplexe in der Zelle zu navigieren und sie dynamisch an ihren Bestimmungsort zu positionieren (Nevo-Dinur *et al.*, 2012). Seitdem es immer mehr Anzeichen gibt, dass die Proteine in Bakterien nicht chaotisch lokalisiert sind und in verschiedenen Kompartimenten der Zelle auftreten können, wird vermutet, dass es verschiedene Faktoren und bevorzugte Lokalisationsorte für die Proteinlokalisierung gibt. Mögliche Faktoren für die subzelluläre Orientierung von Proteinen in der Zelle sind vermutlich die Membrankrümmung, das Membranpotential oder auch bestimmte Fettsäurezusammensetzungen in der Membran (Ramamurthi, 2010; Romantsov *et al.*, 2007; Strahl & Hamoen, 2010).

Es konnten Proteinlokalisationsmuster entlang der Zellmembran nachgewiesen werden. Entweder handelt es sich dabei um integrale Membranproteine oder um Proteine, die mit selbigen Proteinen assoziiert sind. Es wird angenommen, dass fast ein Drittel der zellulären Proteine an der Membran lokalisiert sind (Bibi, 2011; Yuan *et al.*, 2010).

Proteine und Lipide sind nicht gleichmäßig in der Membran verteilt, stattdessen gibt es Bereiche, in denen manche Moleküle in höherer Konzentration vorliegen. Es wurden schließlich dynamische Einheiten (Mikrodomänen) identifiziert, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind. Außerdem wird vermutet, dass Mikrodomänen („Lipid-Rafts“) auch an der Proteinlokalisierung beteiligt sind und dadurch wahrscheinlich viele verschiedene zelluläre Prozesse regulieren.

Des Weiteren wurden eine Vielzahl von integralen Membranproteinen sowie lösliche Proteine in den Zellpolen identifiziert. Die bakteriellen Zellpole sind in ihrer chemischen und physikalischen Struktur einzigartig und charakterisieren sich durch die Membrankrümmung und Fettsäurezusammensetzung. Die subzelluläre Lokalisation des vor Osmose schützenden Prolinsymporters ProP aus *E. coli* ist z. B. abhängig von vorwiegend an den Zellpolen konzentrierten Cardiolipinen (Mileykovskaya, 2007). Ein weiteres Beispiel ist das DivIVA Protein von *B. subtilis*. DivIVA erkennt die negative Membrankrümmung in den Zellpolen, sowie die sich bildenden Septen bei sich teilenden Zellen (Lenarcic *et al.*, 2009; Ramamurthi & Losick, 2009).

Die am häufigsten beobachteten Proteinlokalisationen wurden an den Zellpolen gemacht, aber die Mechanismen für die gezielte Orientierung zu den Zellpolen sind meistens noch unklar. Es scheint, dass einige bakterielle Proteine physikalische Signale (z. B.



Membrankrümmung und Membranpotential) wahrnehmen können und folglich an diesen Orten lokalisiert sind.

Im Laufe der Jahre konnten immer mehr dynamische Prozesse bei der subzellulären Lokalisation von Proteinen beobachtet werden. BglG von *E. coli*, das Antiterminatorprotein für die Gene der  $\beta$ -Glukosidverwertung, ist in Abwesenheit eines Induktors, durch die  $\beta$ -Glukosid spezifische Permease BglF, an der Membran gebunden. In Anwesenheit des Induktors wird aktives BglG ins Zytoplasma entlassen und kann die Expression der Gene für die  $\beta$ -Glukosidverwertung regulieren (s. Kap. 1.9.). Ähnliche regulatorische Prozesse wurden auch für den Transkriptionsaktivator MalT und für den Transkriptionsrepressor Mlc aus *E. coli* beobachtet. Fluoreszenzmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass MalT zwischen den an der Membran gebundenen Maltose-Transporter und dem Reaktionsort im Chromosom hin und her pendelt (Richtel *et al.*, 2012). In Anwesenheit von spezifischem Substrat (Maltose) wird es vom periplasmatischen Bindeprotein MalE gebunden, zum Transporter gebracht und in die Zelle aufgenommen. Der Transport von Maltose durch die Permease führt zu Konformationsänderungen im Maltose-Transporter und stört die Interaktion zwischen MalT und dem Transporter (Böhm & Boos, 2004; Joly *et al.*, 2004). Das freie MalT kann nun seinen Induktor Maltotriose und ATP binden. Am Zielort im Chromosom bildet MalT ein Oligomer und aktiviert die Transkription der *mal*-Gene (Richtel *et al.*, 2012). Ein weiterer an die Membran gebundener Transkriptionsregulator ist das Mlc Protein von *E. coli*. Mlc wird auch vom PTS reguliert und kontrolliert die Expression der Kohlenstoffverwertung sowie der Untereinheit EIIA<sup>Glc</sup> des Glukosetransporters PtsG. In Anwesenheit von Glukose ist Mlc an der unphosphorylierten EIIB<sup>Glc</sup>-Untereinheit des Transporters gebunden. Erst in Abwesenheit von Glukose wird Mlc ins Zytoplasma entlassen und kann als Tetramer an die DNA binden und blockiert die Transkription der Gene für die Kohlenstoffverwertung (Lee *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2000).

Es ist davon auszugehen, dass die dynamische Proteinlokalisierung in einer Bakterienzelle immer erst durch Interaktionen mit RNA, DNA, Proteinen oder anderen Makromolekülen ermöglicht wird. Dynamische Lokalisationen sind schwer mit biochemischen und genetischen Ansätzen zu untersuchen, aber durch neue Ansätze in der Fluoreszenzmikroskopie sowie durch technische Fortschritte in der Mikroskopie sollten immer mehr dynamische Prozesse identifiziert werden und helfen, regulatorische Mechanismen zu verstehen.

### 1.11. Ziel dieser Arbeit

Thema dieser Arbeit ist die Regulation der Aktivität und Lokalisation von Antiterminationsproteinen der BglG-Familie.

BglG von *E. coli* und LicT von *B. subtilis* sind homologe Antiterminationsproteine der BglG-Familie und regulieren die Expression der *bgl*-Gene, die für die Verwertung von Aryl- $\beta$ -Glukosiden und  $\beta$ -Glucanen verantwortlich sind (Lindner *et al.*, 2002). Die beiden Antiterminatorproteine werden durch ihre spezifischen  $\beta$ -Glukosid-Transporter negativ (EII) und durch die allgemeine PTS-Komponente HPr positiv reguliert. Damit die Antiterminatoren aktiv sein können, müssen die Proteine durch den Phosphatdonor PEP und die PTS-Komponenten EI und HPr an der PRDII phosphoryliert werden (Lindner *et al.*, 2002; Schmalisch *et al.*, 2003; Stülke *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde in zwei Projekten die Lokalisation von LicT und der Mechanismus zur Aktivierung von BglG untersucht. BglG ist während der negativen Regulation an der Membran lokalisiert und wird nach der Aktivierung durch Salicin ins Zytoplasma entlassen (Lopian *et al.*, 2003). Für das homologe Protein LicT wurden bisher keine Lokalisationsuntersuchungen durchgeführt und um besser zu verstehen, wie an die Membran gebundene Sensoren (Permeasen) mit Signalproteinen (Transkriptionsfaktoren) kommunizieren, sollte auch die dynamische Lokalisation des Transkriptionsfaktors LicT untersucht werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte die dynamische Lokalisation von LicT durch unterschiedliche Stimuli (Kohlenstoffquellen) verfolgt werden.

Für die Aktivierung von BglG wurde in der Literatur noch ein zweites Modell vorgeschlagen, nach dem BglG lediglich durch die Interaktion mit EI und HPr aktiviert wird (Raveh *et al.*, 2009). Diese Annahme wurde gemacht, da gezeigt werden konnte, dass BglG in einem Stamm ohne phosphoryliertes HPr immer noch aktiv ist.

Ziel in diesem Teil der Arbeit war es zu zeigen, ob BglG wie das homologe LicT durch die Phosphorylierung von HPr aktiviert wird. *In vitro*-Experimente sollten zeigen, ob BglG durch HPr und das HPr-Homolog FruB phosphoryliert werden kann. Außerdem sollte gezeigt werden, ob BglG von HPr bzw. FruB an der Phosphorylierungsstelle Histidin-208 phosphoryliert wird.

## 2. Material und Methoden

**Materialien:** Chemikalien, Hilfsmittel, Geräte, Apparaturen, kommerziell erhältliche Systeme sowie Proteine, Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide (Tab. 6.1.) sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme (s. Kap. 6.3.) und Plasmide (s. Kap 6.4.) sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

### 2.2. 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 (Hübner, 2008).

#### Bakterienmedien und fakultative Zusätze

<b>LB-Medium</b> (1 l)	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
<b>5 x C-Salze</b> (1 l)	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</b> (1 l)	0,232 g $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
	12,3 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

<b>1x CSE-Medium</b>	100 ml 1 x C-Salze
(Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1995)	1 ml Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> )
	1 ml Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )
	1 ml III <sup>-</sup> -Salze
	2 ml Kaliumglutamat (40%)
	2 ml Natriumsuccinat (30%)
<b>SP-Medium (1 l)</b>	8 g Nutrient Broth
(Lereclus <i>et al.</i> , 1995)	0,25 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	1 g KCl
	ad. 1000 ml deion. Wasser
	anschließende Zugabe von:
	1 ml CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)
	1 ml MnCl <sub>2</sub> (10 mM)
	2 ml Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )
<b>MNGE (10 ml)</b>	9,2 ml 1x MN-Medium
	1 ml Glukose (20%)
	50 µl Kaliumglutamat (40%)
	50 µl Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )
	100 µl Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> )
	30 µl MgSO <sub>4</sub> (1 M)
	+/- 100 µl CAA (10%)
<b>CAA</b>	10% (w/v) Caseinhydrolysat
<b>10 x MN-Medium (1 l)</b>	136 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O
	60 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 g Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O

<b>SOB –Mg (1l)</b>	20 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	0,58 g NaCl
	0,186 g KCl
<b>SOB</b>	250 ml SOB -Mg (autoklaviert)
	2,5 ml MgCl <sub>2</sub> (1M)
	2,5 ml MgSO <sub>4</sub> (1M)

### Antibiotika

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

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

Ampicillin 100 µg ml<sup>-1</sup>

Kanamycin 50 µg ml<sup>-1</sup>

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

Kanamycin 10 µg ml<sup>-1</sup>

Chloramphenicol 5 µg ml<sup>-1</sup>

Erythromycin<sup>1</sup> 2 µg ml<sup>-1</sup>

Lincomycin<sup>1</sup> 25 µg ml<sup>-1</sup>

Spectinomycin 150 µg ml<sup>-1</sup>

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

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. Allgemeine Methoden

In Tab. 2.1. sind die allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit angewendet wurden, aufgelistet.

**Tab. 2.1.: Allgemeine Methoden**

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

### 2.3.2. Anzucht von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> in Reagenzglasern oder Schikanekolben angezogen. Wenn nötig wurde IPTG (0,5 mM) zugesetzt. Für die Anzucht von *B. subtilis* wurden LB-Medium, CSE-Medium oder MNGE-Medium verwendet. In CSE-Minimalmedium wurden neben Glukose (0,5% w/v) die Zusätze Sorbitol (0,5% w/v) oder Salicin (0,1% w/v) verwendet. Die Verwendung der Zusätze ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Die Zellen wuchsen bei 37°C in Reagenzglasern, Erlenmeyerkolben oder Eppendorf-Reaktionsgefäßen (2 ml oder 1,5 ml). Beimpft wurde von frischen Vereinzlungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Diese wurde mit einem Photometer mit geeigneten Verdünnungen der Zellkulturen gegen eine Leerkontrolle mit dem jeweils

verwendeten Medium durchgeführt. Die Messung erfolgte in Plastikküvetten (Schichtdicke 1 cm).

### **2.3.3. Stammkonservierung**

Zur Langzeitkonservierung von Stämmen wurden 900 µl einer Übernachtskultur mit 100 µl DMSO (>99%) verdünnt und in Schraubdeckelröhrchen bei -70°C eingefroren. *B. subtilis*-Stämme wurden zusätzlich in SP-Schrägagarröhrchen mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen, zwei Tage bei 37°C bebrütet und dann bei RT gelagert.

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

#### **Präparation kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>)**

Eine 4 ml Vorkultur wurde mit dem zu transformierenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml LB in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit der Vorkultur auf OD<sub>600</sub> 0.1 angeimpft. Die 10 ml LB-Kultur wurde bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 wachsen gelassen. Die Kultur wurde in ein Falconröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Von diesem Zeitpunkt an müssen die Zellen bis zum Hitzeschock permanent kalt bleiben. Die Kultur wurde in einer vorgekühlten Zentrifuge für 6 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurden die Bakterien vorsichtig in 5 ml vorgekühltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte. Das Pellet wurde in 1 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

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

Der zu transformierende Stamm wurde auf eine LB-Platte (mit Selektionsmedien) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer großen Kolonie (2-3 mm Durchmesser) wurde 20 ml LB-Medium in einem 300 ml Kolben angeimpft und für 20 h bei 28°C geschüttelt (200-250 U min<sup>-1</sup>). 6 ml LB-Medium mit dem zu transformierenden Stamm wurden in 250 ml SOB-Medium (2 l Kolben) überimpft und schüttelnd (200-250 U min<sup>-1</sup>)

bei 18°C inkubiert. Bei OD<sub>600</sub> von 0,5-0,9 (nach 20-24 h) wurde der Kolben auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 30 min mit 2500 g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zentrifugiert und mit 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Vorsichtig wurde eine DMSO-Konzentration von 7% eingestellt. Aliquots von 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert (Rothe, 2009).

### **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 100 µl und der abzentrifugierte Rest auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin bzw. Kanamycin) ausplattiert (Rothe, 2009).

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

<b>TB-Puffer pH 6,7</b>	10 mM Pipes
	55 mM MnCl <sub>2</sub>
	15 mM CaCl <sub>2</sub>
	250 mM KCl

### **2.3.5. 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  $\mu\text{l}$  wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert (Hübner, 2008).

### **Transformation der kompetenten Zellen**

Die zu 300  $\mu\text{l}$  aliquotierten Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und mit folgender vorpipettierten Lösung versetzt:

1,7 ml 1 x MN

43  $\mu\text{l}$  20% Glukose

34  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgSO}_4$

Zu 400  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurde 0,1-1  $\mu\text{g}$  DNA gegeben und 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  Expressionslösung (500  $\mu\text{l}$  Hefeextrakt (5%), 250  $\mu\text{l}$  CAA (10%), 250  $\mu\text{l}$  deion. Wasser, 50  $\mu\text{l}$  Tryptophan (5 mg/ml)), zupipettiert und für weitere 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Dann wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert (Hübner, 2008).

### **2.3.6. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen**

Zur Anfertigung von Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen wurden 4 ml LB mit einer Kryokultur beimpft und unter Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach ca. 8 h wurden CSE-Übernachtskulturen mit unterschiedlichen C-Quellen von der LB-Kultur angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 20 ml frisches CSE-Medium auf eine  $\text{OD}_{600}$  0,05 eingestellt. Das Wachstum der Zellen erfolgte, wie alle darauf folgenden Schritte, möglichst ohne direkten Lichteinfall auf die Zellen. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3-0,4 wurde 1 ml der Zellen geerntet. Die anschließende Zentrifugation der Zellen erfolgte bei  $13.000 \text{ U min}^{-1}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 1 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 80  $\mu\text{l}$  PBS (50mM, pH 7,5) resuspendiert. Um die Zellen auf den Objektträgern fixieren zu können, wurden diese mit 700  $\mu\text{l}$  1%iger Agarose (in  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt) beschichtet. 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden auf den vorbereiteten Objektträger pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40 FL) untersucht und fotografiert. Es wurden folgende Filter für die Untersuchung verwendet: eGFP HC-Filterset (BP: 472/30, FT 495, LP 520/35; AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany) für die GFP Detektion, YFP HC-Filterset (BP:

500/24, 232 FT 520, LP 542/27; AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany) für die YFP Detektion und Filterset 47 (BP: 233 436/20, FT 455, LP: 480/40; Carl Zeiss) für die CFP-Fusionen. Zur Auswertung wurde die Software AxioVision Rel 4,8 und die Kamera AcioCam MRm verwendet. Für alle Bilder wurde eine Belichtungszeit von 2-3 Sekunden verwendet (Diethmaier, 2008).

### **Lösungen für die Herstellung von Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen**

<b>PBS-Puffer pH 7,5</b>	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	2,7 mM $\text{KCl}$
	8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	137 mM $\text{NaCl}$

### **2.3.7. 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 (Hübner, 2008).

#### **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 ÜN-Kultur 1 min bei  $13000 \text{ U min}^{-1}$  abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 180  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer resuspendiert und 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde für 10-15 min 5  $\mu\text{l}$  RNase A hinzugegeben. Die weiteren Schritte zur Isolation der chromosomalen DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers (Hübner, 2008).

### **Aufreinigung von DNA und Gelelution**

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit. Zur Gelextraktion wurde die DNA mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und die Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die weiteren Extraktionsschritte erfolgten mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 30 oder 50 µl H<sub>2</sub>O (Landmann, 2008).

### **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit dem Nanodrop ND-1000 (Peqlab) wie vom Hersteller beschrieben gemessen (Landmann, 2008).

### **DNA-Gelelektrophorese**

Zur Größenbestimmung und zur präparativen Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit 1% Agarosegelen durchgeführt. Die Agarosegele hatten eine Dimension von 8,5 cm Länge, 10 cm Breite und waren 3-5 mm dick. Die Agarosegele wurden nach dem Gießen (60°C) durch Abkühlen auf RT verfestigt, die Proben mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100-130 V, bis der DNA-Farbmarker das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Danach wurden die Gele in Ethidiumbromid 5 min gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und anschließend unter UV Licht (254 nm) fotografiert. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der λ-DNA-Marker verwendet. Bei 365 nm konnten DNA-Banden aus präparativen Gelen ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die Elution der DNA erfolgte mit dem Nucleospin Extrakt 2 in 1 nach Anleitung des Herstellers (Hübner, 2008).

### **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 16°C (Hübner, 2008).

## **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 folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kits aufgereinigt. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden (Hübner, 2008).

## **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 μl 10 x *Accuzyme*-Polymerase Puffer
- 2 μl *Accuzyme*-Polymerase (2,5 U μl<sup>-1</sup>)
- 2 μl dNTPs (12,5 μmol ml<sup>-1</sup>)
- 78 μl deion. Wasser


Reaktionsansatz für die *Phusion*-Polymerase (100 µl):

2 µl Primer 1 (20 pmol)  
 2 µl Primer 2 (20 pmol)  
 4 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)  
 10 µl 5 x *Phusion* HF Puffer  
 1 µl *Phusion*-Polymerase (2 U µl<sup>-1</sup>)  
 2 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)  
 79 µl deion. Wasser

Reaktionsansatz für die *Taq*-Polymerase (100 µl):

2 µl Primer 1 (100 µM)  
 2 µl Primer 2 (100 µM)  
 3 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)  
 10 µl 10 x *Taq*-Polymerase Puffer  
 2 µl *Taq*-Polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>)  
 2 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)  
 79 µl deionisiertes Wasser

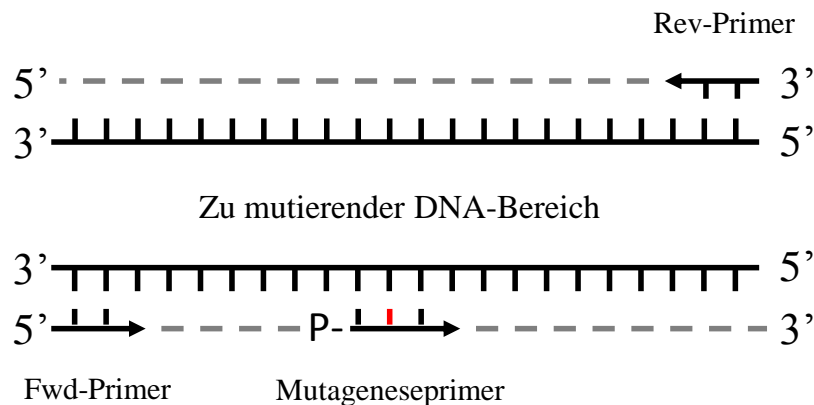
Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	98°C	5 Min
30		Denaturierung	98°C
		Annealing	50-60°C
		Primer Extension	72°C
1	Endlauf	72°C	10 Min

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

### Einfügen von Genmutationen mittels kombinierter Kettenreaktion (CCR)

Die kombinierte Kettenreaktion ist eine Methode zur Einführung von einer oder zwei Punktmutationen (Bi & Stambrook, 1998). Da bei dieser Methode die Einführung der Mutation und die Amplifikation des mutagenisierten Fragments in nur einem Schritt erfolgt, entfallen dazwischenliegende Aufreinigungsschritte. Es erfolgt sowohl eine Polymerasekettenreaktion als auch eine Ligation. Zur Ligationsreaktion werden am 5'-Ende phosphorylierte Mutageneseoligonukletide verwendet und eine thermostabile Ligase (Ampligase, Biozym) benötigt (s. Abb. 2.1.) (Hübner, 2008).



**Abb. 2.1.: Kombinierte Kettenreaktion**

Der Mutageneseprimer ist phosphoryliert und hat ein nicht komplementäres Nucleotid in der Mitte (siehe rote Markierung).

#### Reaktionsansatz für die *Accuzyme*-Polymerase (50 µl):

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

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

#### Programm der CCR für *Accuzyme*-Polymerase

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

#### Long Flanking Homology PCR (LFH-PCR)

Die Long Flanking Homology (LFH)-PCR dient der Herstellung linearer DNA-Fragmente zur Konstruktion von Deletionsmutanten oder zur Integration von Fremd-DNA ins Chromosom mittels sogenannter Allelic-Replacement-Mutagenese (Wach, 1996). Eine schematische Darstellung zur Herstellung einer Deletionsmutante ist in Abb. 2.2. dargestellt. Für die Konstruktion einzelner Mutanten wurde jeweils die Resistenzkassette für Chloramphenicol, Erythromycin oder Kanamycin vom Plasmid pGEM-cat, pDG646 oder pDG780 amplifiziert (Guérout-Fleury *et al.*, 1995). Resistenzkassetten die innerhalb eines Operons integrieren sollten, wurden mit Primern amplifiziert, die sich vor dem Terminator des Resistenzgens anlagern. Die Expression der Gene hinter der Resistenzkassette konnte so gewährleistet werden und polare Effekte wurden vermieden.

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

Reaktionsansatz für die LFH-PCR (50µl):

10 µl 5 x *Phusion* HF Puffer  
 0,5 µl *Phusion*-Polymerase (2 U µl<sup>-1</sup>)  
 1 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)  
 2 µl (150 ng) oberes Fragment  
 2 µl (150 ng) unteres Fragment  
 4 µl (300 ng) Resistenzkassette  
 22,5 µl deion. Wasser

Die Primer wurden nach dem ersten PCR-Schritt dazugegeben.

4 µl Primer 1 (20 pmol)

4 µl Primer 2 (20 pmol)

**Programm der LFH für *Phusion*-Polymerase**

	Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion	
	1	Vorlauf	98°C	1 Min	
<b>Schritt 1</b>	10	}	Denaturierung	98°C	10 Sek
			Annealing	50-60°C	30 Sek
			Primer Extension	72°C	1-3 Min
			Pause	15°C	∞

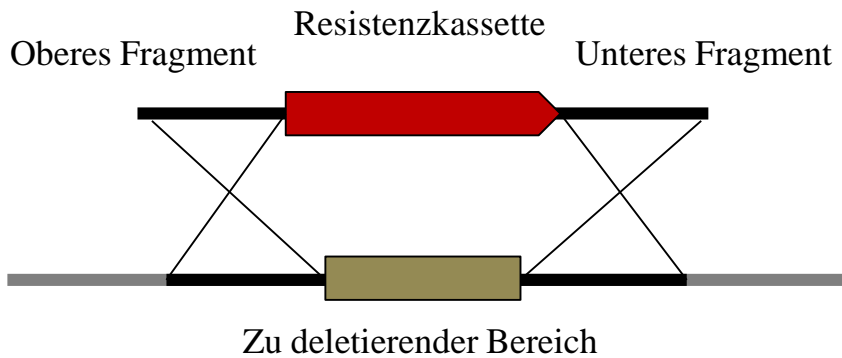
Zugabe der Primer.

<b>Schritt 2</b>	21	}	Denaturierung	98°C	10 Sek
			Annealing	50-60°C	30 Sek
			Primer Extension	72°C	1-3 Min
	1	Primer Extension	72°C	10 Min	
	1	Pause	15°C	∞	

*B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten (20 ml) transformiert und die Zellen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert. 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 (Diethmaier, 2008).



**Abb. 2.2.: Konstruktion einer Deletionsmutante mit Hilfe der LFH-PCR.** Durch doppelt homologe Rekombination wird die zu deletierende Sequenz durch eine Resistenzkassette ersetzt.

### Lösungen für das Arbeiten mit DNA

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

<b>Lyse-Puffer</b>	50 mg Lysozym
für Isolation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i>	50 µl Tris-HCl pH 8,0 (1 M)
	10 µl EDTA pH 8,0 (0,5 M)
	2,5 ml Millipore-Wasser
<b>RNase A</b>	50 mg/ml
<b>CCR-Puffer</b>	200 mM Tris-HCl pH 8,5
	30 mM MgCl <sub>2</sub>
	500 mM KCl
	5 mM NAD <sup>+</sup>

### 2.3.8. Arbeiten mit Proteinen

#### Zellaufschluss durch Lysozym

Bakterienkulturen wurden für 2 min bei 13000 U min<sup>-1</sup> und RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 75 µl einer Lösung aus Z-Puffer/ LD-Mix (1 ml Z-Puffer + 25 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>, 2 min, RT) (Hübner, 2008).

#### Zellaufschluss durch Ultraschall

Das Zellpellet wurde in kaltem ZAP-Puffer bzw. Puffer W resuspendiert. Der Aufschluss wurde dreimal mit einer Ultraschallsonde bei 80% für je 2 min durchgeführt. Das Intervall betrug 0,8 sec. Die Probe wurde stets gekühlt. Nach dem Aufschluss erfolgte zum Abtrennen der Zelltrümmer eine Zentrifugation (20 min, 4 °C, 1300 rpm).

#### Zellaufschluss mit der French Press

Für den Zellaufschluss mit der French Pressure Cell wurden die Bakterienpellets aus unterschiedlichen Kulturvolumen in 10-15 ml kaltem ZAP-Puffer bzw. Puffer W resuspendiert. Die gekühlte Bombe wurde mit der Bakteriensuspension gefüllt, anschließend

verschlossen und nach dem Herausdrücken der Luft und der Schließung des Ablassventils in die French Pressure Cell eingespannt. Bei *E. coli*-Stämmen wurden zwei und bei *Bacillus*-Stämmen mindestens drei Aufschlussvorgänge durchgeführt. Der Aufschluss erfolgte entweder in der SLM Aminco 2-FA-078-E1 French Pressure Cell (SLM Aminco) oder der HTU-Digi-French Pressure Cell F-10 (Fa. G. Heinemann). Der Druck wurde auf 1000 psi eingestellt. Wurden Proteinaufreinigungen durchgeführt, so erfolgte nach dem Aufschluss ein Zentrifugationsschritt mit der Heraeus-Tischzentrifuge (20 min, 4 °C, 8000 rpm) und eine Ultrazentrifugation (FiberLite Rotor F50L-8×39,1 h, 4 °C, 35000 rpm) (Landmann, 2008).

### **Überproduktion von Proteinen**

Zur Überexpression von Proteinen wurde 1 Liter LB-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 0,5-0,6 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 15 min bei 5000 rpm mit der Zentrifuge RC6+ (Sorvall) in dem Rotor F9-4x1000y (FiberLite) abzentrifugiert. Die Pellets wurden mit 15 ml eiskaltem ZAP-Puffer bzw. Puffer W gewaschen und das Zellgemisch nochmals mit der Heraeus-Tischzentrifuge (20 min, 4 °C, 8000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren (Hübner, 2008).

### **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 2,5 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Superflow (QIAGEN) beladen und dann mit 20 ml ZAP äquilibriert. Das Proteinrohlysat wurde über die Matrix gegeben und es folgte ein Waschschritt mit 15 ml ZAP-Puffer. Die Chromatographie-Säule wurde anschließend mit je 8 ml Imidazol-Puffer mit steigender Imidazolkonzentration (5 mM, 10 mM, 20 mM) und darauf mit je 5 ml Imidazol-Puffer mit steigender Imidazolkonzentration (50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM) beladen. Mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer wurden zunächst unspezifisch bindende Proteine

abgewaschen und danach das His-tag-tragende Protein eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden auf einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die aufgereinigtes Protein enthielten, wurden ÜN dialysiert und anschließend mittels Bradford-Reagenz auf ihre Proteinkonzentrationen getestet (Bradford, 1976; Hübner, 2008).

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

Die Überexpression und der Zellaufschluss mittels French Press 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 isoliert werden. Zuerst wurde die Säule mit 10 ml Puffer W äquilibriert. Dann konnte die Säule mit dem Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 4 mal 2,5 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 1x 0,5 ml und 3x 1 ml eluiert werden. Die bei der Elution erhaltenen Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, überprüft (Hübner, 2008).

### **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: 3,5 kDa) gegen 1 x ZAP dialysiert. Die Dialyse wurde zweimal für ca. 24 h bei 4°C durchgeführt. Das Volumen des Dialysepuffers betrug das 1000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung (Hübner, 2008).

## Denaturierende Polyacrylamid-Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierende Proteingele wurden nach der Methode von Laemmli (1970) hergestellt. Zur Herstellung der Gele wurde das Mini-Protean®-System von Bio-Rad verwendet. Die denaturierenden Gele bestanden jeweils aus Trenn- und Sammelgel (s. Tab. 3.6.) und die Gele wurden mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Diese Gele hatten eine Größe von 10,1 x 7,3 cm. Die Länge des Trenngels betrug hierbei ca. 6 cm und die des Sammelgels ca. 1 cm. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (2x) versetzt und vor der Auftragung 10 min auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei max. 130 V. Abhängig von der Größe wurden für die Auftrennung von Proteinen 12 oder 15%-ige Gele genutzt (Hübner, 2008).

## Westernblot

Der Blot von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Semi Dry Blot Apparatur. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst 30 Sekunden in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol (100%) und anschließend 5 min. in Transferpuffer inkubiert. Nach dem einstündigen Transfer bei 0,8 mA / cm<sup>2</sup> wurde die PVDF-Membran drei Stunden in Milchblockinglösung (Blotto) geschwenkt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit polyklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Protein. Der GFP-Tag Antikörper wurde 1:10000 in Blotto verdünnt eingesetzt. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach zwei Waschschritten von je 30 min in Blotto erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt), der 1:100000 in Blotto verdünnt zum Einsatz kam. Nach drei weiteren 20-minütigen Waschschritten mit Blotto wurde die Membran in deion. Wasser gespült und anschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 min in Puffer III inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP\*. Das Chemilumineszenz-System mit dem Chemi-Smart 5000 Lumineszenzdetektor (Peqlab) oder dem Chemocam Lumineszenzdetektor (Intas) wurde verwendet (Commichau, 2006).

## Blotto

1 x TBS

2,5% Magermilchpulver

0,1% Tween 20

<b>TBS 10 x</b>	60 g Tris 90 g NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen ad 1 l mit deion.Wasser
<b>Transferpuffer</b>	15,2 g Tris 72,1 g Glycin 750 ml Methanol (100%) ad 5 l mit deion.Wasser
<b>Puffer III</b>	0,1 M Tris 0,1 M NaCl pH 9,5 mit HCl eingestellt

### **Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen**

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

<b>Wasch- und Fixierlösung</b>	45% Methanol 10% Essigsäure 45% H <sub>2</sub> O
<b>Färbelösung</b>	0,5% Coomassie Brillant Blue R250 10% Essigsäure 45% Methanol 44,5% H <sub>2</sub> O
<b>Entfärbelösung</b>	10% Essigsäure

### Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine der sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele, die sich besonders zur Überprüfung der Reinheit und zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eignet. Ihr Vorteil liegt in der hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze ca. 5 ng Protein pro Bande). Die Nachteile der Silberfärbung bestehen jedoch darin, dass sie nicht genau reproduzierbar und nicht quantifizierbar ist, was mit der Physik der Anhäufung von Silberpartikeln zusammenhängt (Butcher & Tomkins, 1985). Die Proteinbanden wurden in Anlehnung an die Methode nach Nesterenko (Nesterenko *et al.*, 1994) Silber gefärbt. Dazu wurden die Polyacrylamid-Gele mit folgenden Lösungen in angegebener Reihenfolge auf dem Schüttler inkubiert (Commichau *et al.*, 2006).

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixieren	Fixierer	1 bis 24h
Waschen	Ethanol 50%	3 x 20 min
Reduzieren	Thiosulfatlösung	1 min 30 sek
Waschen	deion. Wasser	3 x 20 sek
Färben	Imprägnierer	25 min
Waschen	deion. Wasser	2 x 20 sek
Entwickeln	Entwickler	bis zur ausreichenden Färbung
Waschen	deion. Wasser	20 sek
Abstoppen	Stopplösung	5 min

#### Fixierer (100 ml)

50 ml Methanol (100%)  
 12 ml Essigsäure (100%)  
 100 µl Formaldehyd (37%)  
 ad 100 ml deion. H<sub>2</sub>O

#### Thiosulfatlösung (100 ml)

20 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O  
 ad 100 ml deion. H<sub>2</sub>O

**Imprägnierer** (100 ml)            0,2 g AgNO<sub>3</sub>  
    37 µl Formaldehyd  
    ad 100 ml deion. H<sub>2</sub>O

**Entwickler** (100 ml)            6 g NaCO<sub>3</sub>  
    2 ml Thiosulfatlösung  
    50 µl Formaldehyd  
    ad 100 ml deion. H<sub>2</sub>O

**Stopplösung** (100 ml)            1,86 g EDTA  
    ad 100 ml deion. H<sub>2</sub>O

### **Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen**

**Entfärbelösung**                    10% Essigsäure  
für Proteingelektrophorese

**Färbelösung**                        0,5% Coomassie Brilliant Blue R250  
für Proteingelektrophorese        10% Essigsäure  
    45% Methanol  
    44,5% H<sub>2</sub>O

**IPTG**                                    1 M IPTG  
steril filtriert

**Puffer E**                                100 mM Tris-HCl pH 8  
    150 mM NaCl  
    1 mM EDTA  
    2,5 mM Desthiobiotin

**Puffer W**                                100 mM Tris-HCl pH 8  
    150 mM NaCl bzw. 1 M NaCl  
    1 mM EDTA



**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 2x**

für denaturierende Proteingelektrophorese

1,4 ml Tris-HCl pH 7,0 (1 M)  
3 ml Glycerin (100%)  
2 ml SDS (20%)  
1,6 ml β-Mercaptoethanol (100%)  
0,01 g Bromphenolblau  
2 ml deion. H<sub>2</sub>O

**Trenngel (12,5%)**

für denaturierende Proteingelektrophorese

4 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30%)  
2,5 ml Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)  
3,3 ml deion. Wasser  
100 µl SDS (10%)  
100 µl APS (10%)  
4 µl TEMED

**Trenngel (15%)**

für denaturierende Proteingelektrophorese

5 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30%)  
2,5 ml Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)  
2,3 ml deion. Wasser  
100 µl SDS (2%)  
100 µl APS (10%)  
4 µl TEMED

**Waschlösung**

für Proteingelektrophorese	45% Methanol
	10% Essigsäure
	45% H <sub>2</sub> O

<b>Zellaufschlusspuffer ZAP</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	200 mM NaCl

**2.3.9. Bestimmung von Enzymaktivitäten****Amylasetest auf Stärkeplatten**

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

<b>Iod-Kaliumiodidlösung</b>	100 g KI
	50 g J
	ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O

**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 und anschließend 1,5 ml der Kultur 5 min mit 13000 U min<sup>-1</sup> bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 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 (Hübner, 2008).

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

A <sub>420</sub>	Absorption von o-Nitrophenol
$\Delta t$	Zeitdifferenz zwischen Start und Stopp der Reaktion in min
V	eingesetztes Volumen an Zellkultur in ml
A <sub>595</sub> x 1,7	Proteingehalt des Zellextraktes in mg ml <sup>-1</sup>

**Lysozym/ DNase (LD)**                    100 mg Lysozym in 10 ml deion. H<sub>2</sub>O gelöst  
     10 mg DNaseI zugegeben  
     à 500  $\mu$ l aliquotiert, bei -20°C gelagert

**Z-Puffer**                                        60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
     40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
     10 mM KCl  
     1 mM MgSO<sub>4</sub>  
     50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 2.3.10. Arbeiten mit Radioaktivität

#### Enzymabhängige Synthese von $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-PEP

Pyruvat wurde in einer enzymabhängigen Reaktion mit  $^{32}\text{P}$  markiert (Roossien *et al.*, 1983). Das Enzym Pyruvatkinase katalysiert folgende Reaktion:  $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pyruvat} + \text{ATP}$ . *In vivo* ist die Reaktion praktisch irreversibel. *In vitro* wird die Rückreaktion durch einen Überschuss an Pyruvat und ATP bei gleichzeitigem Fehlen des Phosphorylgruppenakzeptors ADP erzwungen.

Folgender Reaktionsansatz wurde dazu verwendet (Endvolumen 250  $\mu\text{l}$ ):

25  $\mu\text{l}$  1 M Triethylamin/HCl pH 7,6

25  $\mu\text{l}$  150 mM KCl

12,5  $\mu\text{l}$  3 mM PEP

25  $\mu\text{l}$  30 mM  $\text{MgCl}_2$

25  $\mu\text{l}$  10 mM Pyruvat

25  $\mu\text{l}$  Pyruvatkinase [400 U/ml]

94  $\mu\text{l}$  Millipore- $\text{H}_2\text{O}$

12,5  $\mu\text{l}$  100 mM ATP

6  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP [5000 Ci/mmol]

→ Das kalte ATP und das  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP werden im letzten Schritt dazugegeben.

Der Ansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert, die Pyruvatkinase (Sigma) in einem anschließenden fünfminütigen Hitzeschritt bei 70°C inaktiviert. Das  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-PEP wurde bei -20°C aufbewahrt (Schmalisch, 2004).

#### Aufreinigung von $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-PEP

Um das  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-PEP vom nicht verbrauchten  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP zu trennen, wurde eine chromatographische Auftrennung durchgeführt. Die Separierung der im Ansatz enthaltenen Bestandteile erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie mit Dowex AG1-X8 Resin (BioRad; Netzgröße 100-200) in PolyPrep-Säulen von BioRad (Mattoo and Waygood, 1982; Roossien *et al.*, 1983). Hierzu wurden 2 g des Resins mit 5 ml destilliertem Wasser

aufgeschlämmt, auf die Säule gegeben, mit 5 ml 1,5 M Triethylamin (TEA)/Formiat pH 7,6 äquilibriert und mit 2x 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde der gesamte  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP-Reaktionsansatz mit 750  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 4 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe steigender Konzentrationen TEA/Formiat pH 7,6 (0,3 M, 0,6 M und 1,5 M). Das Eluat wurde in je 1 ml Fraktionen gesammelt:

0,3 M Triethylamin/Formiat pH 7,6 → Elution 1-34

0,6 M Triethylamin/Formiat pH 7,6 → Elution 35-55

1,5 M Triethylamin/Formiat pH 7,6 → Elution 56-85

Die Aktivität der einzelnen Elutionen wurde mit einem  $\beta$ -Kontaminationsmonitor (Berthold) gemessen. Es ergaben sich 2-3 Aktivitätsmaxima unter den gesamten Elutionen. Von jedem Aktivitätsmaxima wurden 5  $\mu$ l der höchsten Peakfraktionen zur Ermittlung der Zerfälle pro Zeiteinheit (cpm) im Szintillationszähler (Perkin Elmer) gemessen. Anschließend wurden von jeden der drei Aktivitätsmaxima die Proben mit den höchsten cpm Werten zusammengeführt. Die Proben wurden abschließend auf das Vorhandensein von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP durch Kontrollphosphorylierungsansätze überprüft.

### Lösungen zum Arbeiten mit Radioaktivität

#### 1 M Triethylamin (TEA)/ HCl pH 7,6

5,06 g TEA-Lösung (Sigma)  
pH 7,6 vorsichtig mit  
Formiat einstellen  
ad 50 ml mit deion.Wasse

#### 1,5 M Triethylamin/ Formiat pH 7,6

7,59 g TEA-Lösung (Sigma)  
pH 7,6 vorsichtig mit  
Formiat einstellen  
ad 50 ml mit deion.Wasser

## Radioaktive *in vitro* Phosphorylierung von BglG und der PTS-Komponenten

Der *in vitro* Phosphorylierungsassay wurde wie schon beschrieben durchgeführt (Lindner *et al.*, 1999). Im Reaktionsansatz sind 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 µl γ-[<sup>32</sup>P]-PEP enthalten. Die unterschiedlichen Proteine wurden jeweils in folgenden Mengen hinzugegeben: 80 pmol EI, 300 pmol HPr, 100 pmol FruB, 250 pmol BglG. Alle Reaktionsansätze wurden zweimal durchgeführt, aber nur in einem Ansatz wurde γ-[<sup>32</sup>P]-PEP verwendet.

### Phosphorylierungsansatz von BglG mit HPr

300 pmol HPr

80 pmol EI

100 pmol BglG

2 µl Master Mix Puffer 10x

ad. 19 µl deionisiertes Wasser

1 µl γ-[<sup>32</sup>P]-PEP

Nach der Zugabe von γ-[<sup>32</sup>P]-PEP bzw. kaltem PEP wurden die Ansätze 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden 5 min bei 40°C erhitzt und in einem 12% bzw. 15% SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Gele mit dem γ-[<sup>32</sup>P]-PEP wurden 2 h bei 100V laufen gelassen und anschließend mit dem Geltrockner Modell 583 (BioRad) für 2 h getrocknet. Nach dem Trocknen wurden Phosphoimager-Schirme für 7-10 Tage auf den Gelen exponiert und die Signale anschließend mit Hilfe des Phosphoimagers Storm 860 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

Die Gele mit kaltem PEP wurden mit Coomassie gefärbt, um zu kontrollieren, ob in den verschiedenen Reaktionsansätzen identische Proteinkonzentrationen verwendet wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *In vitro* Phosphorylierung von BglG

##### 3.1.1. Ziel der Untersuchung

In vielen Gram-positiven Bakterien werden die Antiterminatoren durch den spezifischen Transporter negativ (EII) und positiv durch HPr reguliert. Damit der Antiterminator aktiv sein kann, muss das Protein durch den Phosphatdonor PEP und die PTS-Komponenten EI und HPr an der PRDII phosphoryliert werden (Lindner *et al.*, 2002; Schmalisch *et al.*, 2003; Stülke *et al.*, 1998).

Ein ähnliches Modell wurde auch schon für BglG von *E. coli* vorgeschlagen und auch die Phosphorylierung des Antiterminators BglG in den beiden PRDs konnte *in vivo* bereits nachgewiesen werden (Görke & Rak, 1999). Jedoch gibt es noch ein zweites Modell für die Aktivierung von BglG. Dort wurde vorgeschlagen, dass BglG lediglich durch die Interaktion mit EI und HPr aktiviert wird (Raveh *et al.*, 2009). Diese Annahme wurde gemacht, da gezeigt werden konnte, dass BglG in einem Stamm ohne phosphoryliertes HPr immer noch aktiv ist.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass BglG *in vitro* durch HPr und das HPr-Homolog FruB phosphoryliert werden kann. Außerdem sollte gezeigt werden, dass BglG von HPr bzw. FruB in der Phosphorylierungsstelle Histidin-208 phosphoryliert wird.

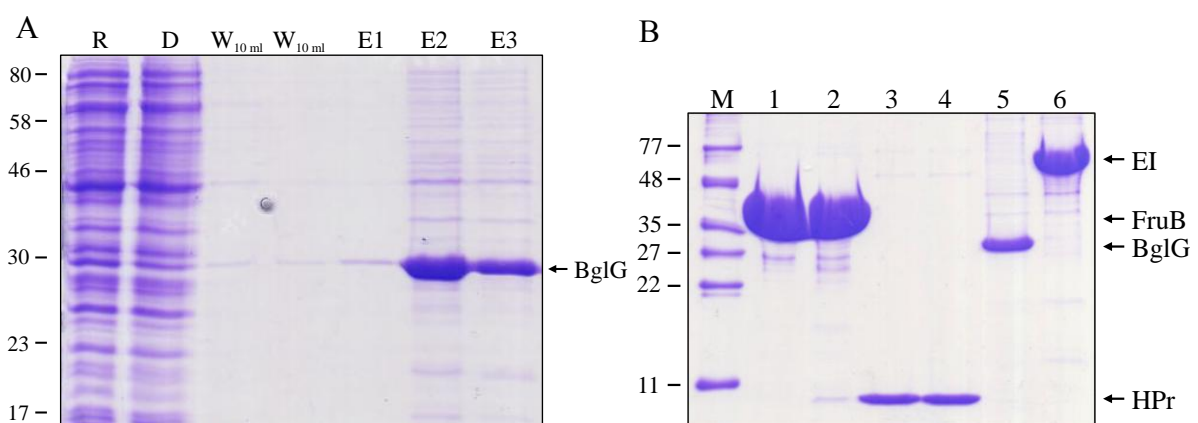
##### 3.1.2. Aufreinigung von EI, HPr, FruB und BglG

Für die Aufreinigung der verschiedenen PTS-Komponenten wurden verschiedene Plasmide hergestellt. Das PCR-Produkt von *bglG* wurden über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sac*I mit dem Vektor pGP172 ligiert (Merzbacher *et al.*, 2004). Der Vektor wird für die Expression von Strep-Tag-Proteinen in *E. coli* BL21 genutzt. Das Protein wird N-terminal mit einem Strep-Tag fusioniert (pGP1286 (Strep-BglG)). Mit Hilfe der CCR (combined chain reaction) wurde die Aminosäuren Histidin H101 oder H208 von *bglG* durch einen Basenaustausch durch die Aminosäure Lysin bzw. Alanin ersetzt. Die PCR-Fragmente der beiden BglG-Varianten und einer Doppelmutante wurden ebenfalls über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sac*I in den Vektor pGP172 kloniert (pGP1309 (Strep-BglG-H208A), pGP1310 (Strep-BglG-H101L) und pGP1311 (Strep-BglG-H208A/H101L)). Außerdem wurde zwei Plasmide konstruiert, in

denen *bglG* und *bglG<sub>H208A</sub>* mit der für einen S-Tag kodierenden Sequenz fusioniert sind. Der S-Tag wurde N-terminal über einen Primer angefügt und über *Bam*HI und *Sac*I in den Vektor pGP172 kloniert (pGP1319 (Strep-S<sub>tag</sub>-BglG) und pGP1320 (Strep-S<sub>tag</sub>-BglG-H208A)). Die Gene *ptsH*, *fruB* und *ptsI* wurden über die Schnittstellen *Nhe*I und *Xba*I in den Vektor pBGG190 (Lüttmann *et al.*, 2009) kloniert (pGP1287 (His<sub>10</sub>-HPr), pGP1288 (His<sub>10</sub>-FruB) und pGP1299 (His<sub>10</sub>-EI)). Der Vektor ermöglicht die Überexpression und Aufreinigung der Proteine durch einen N-terminal fusionierten 10x His-Tag. Für die Aufreinigung der Proteine EI und HPr von *B. subtilis* wurden die Plasmide pAG3 (His<sub>6</sub>-EI<sub>Bs</sub>) und pGP438 (Strep-HPr<sub>Bs</sub>) (Galiniér *et al.*, 1997; Hübner, 2008). Die Strep- und His-Tag Proteine wurden wie schon beschrieben aufgereinigt (siehe Kap. 2.3.8.).

Um sicherzustellen, dass bei der Affinitätschromatographie keine zusätzlichen Komponenten des Phosphotransferasesystems aufgereinigt werden, wurde der Überexpressionsstamm *E. coli* FT1/ pLysS verwendet (Parche *et al.*, 1999). In diesem Stamm wurden die Gene für HPr und EI ( $\Delta$ *ptsHI*) gegen eine Kanamycin Resistenzkassette ausgetauscht.

In Abb. 3.1. (A) ist die Aufreinigung von BglG<sub>WT</sub> zu sehen. Für die Dialyse wurde die Fraktion E3 verwendet und anschließend auch im Phosphorylierungs-Assay eingesetzt. Die höher konzentrierte Fraktion E2 konnte nicht für die Dialyse verwendet werden, da BglG bei zu hohen Konzentrationen nicht stabil in Lösung blieb. Die BglG-Mutanten wurden wie schon oben beschrieben behandelt.



**Abb. 3.1.: Aufreinigung von BglG und der Komponenten des Phosphotransferasesystems**

(A) Aufreinigung von Strep-BglG in einem 12% SDS-Gel (Rohextrakt (R), Durchfluss (D), Waschen (W), Elution (E)). (B) Die aufgereinigten PTS Komponenten nach der Dialyse (15% SDS-Gel): FruB 100 mM Imidazol (1), FruB 200 mM Imidazol (2), HPr 100 mM Imidazol (3), HPr 200 mM Imidazol (4), BglG Elution E3 (5) und EI 50 mM Imidazol (6).



Die weiteren aufgereinigten Komponenten des Phosphotransferasesystems sind in Abb. 3.1. (B) zu sehen. Die mittels His-Tag aufgereinigten Proteine FruB, HPr und EI wurden mit Imidazol eluiert. Für die weiteren Experimente wurde für FruB und HPr die Proteinfraktion mit 200 mM Imidazol und für EI die 50 mM Imidazolfraktion verwendet.

Bei den PTS Komponenten von *B. subtilis* wurde für EI<sub>Bs</sub> die 100 mM Imidazolfraktion und für HPr<sub>Bs</sub> Elution E2 verwendet.

### 3.1.3. Optimierung der *in vitro* Phosphorylierung von BglG

In  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP abhängigen Phosphorylierungsassays sollte gezeigt werden, ob BglG in Abwesenheit von EII (BglF) durch einen Phosphattransfer über EI und HPr bzw. FruB phosphoryliert wird. Dazu wurden EI, HPr und BglG in unterschiedlichen Kombinationen im Assay vermischt und in einem Autoradiogramm analysiert (siehe Abb. 3.2.).

Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen PTS Komponenten durch einen Phosphattransfer vom EI zum BglG über das HPr phosphoryliert werden (Abb. 3.2. Spur 1- 2 und Spur 5). Fehlt in den Ansätzen eine oder beide PTS Komponenten EI und HPr, dann sollte der Phosphattransfer an der jeweiligen Position unterbrochen werden (Abb. 3.2. Spur 3-4 und Spur 6-7).

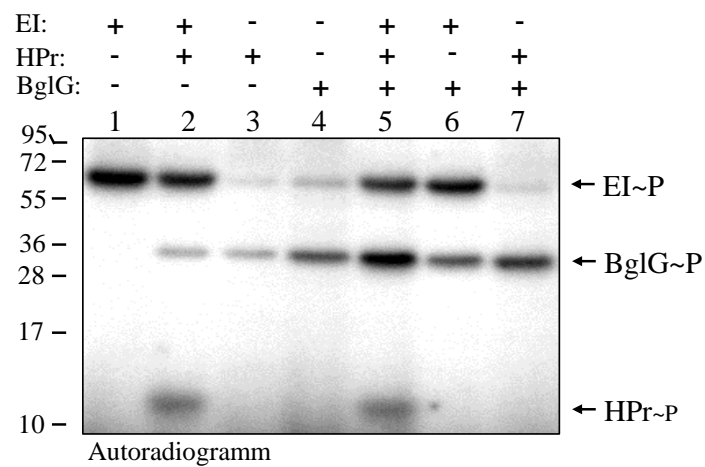
Die ersten Ergebnisse zeigten aber, obwohl der Phosphattransfer unterbrochen war, dass in den Ansätzen mit BglG ein deutliches Signal auf der Höhe von BglG zu sehen war (Abb. 3.2. Spur 4 und Spur 6-7). In Proben, in denen kein BglG vorhanden war, konnte dieses Signal ebenfalls beobachtet werden (Abb. 3.2. Spur 2-3).

Diese nicht eindeutigen Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass sich BglG autophosphorylieren kann oder dass es sich bei den Signalen auf der Höhe von BglG um Abbauprodukte von EI handelt. Am wahrscheinlichsten ist aber die Vermutung, dass bei den Aufreinigungen Proteine ko-eluiert wurden, die sich autophosphorylieren konnten oder von einem zweiten Protein phosphoryliert wurden.

Verschiedene Versuchsansätze wurden durchgeführt, um die kontaminierenden Signale von den Autoradiogrammen zu entfernen.

Als erstes wurde überprüft, ob es sich bei den Kontaminationen um BglG oder um ein ko-eluiertes Protein handelt. Dazu wurde BglG N-Terminal mit einem S-Tag fusioniert. Durch den Tag wurde das Molekulargewicht von BglG erhöht, damit das Protein im SDS-Gel im höhermolekularen Bereich identifiziert werden konnte. Es konnte im Radiogramm gezeigt werden, dass das Signal für S-Tag-BglG über dem Signal der Kontamination liegt (Daten

nicht gezeigt). Damit konnte bewiesen werden, dass es sich bei den unerwünschten Signalen um ko-eluiertes Protein und nicht um BglG handelt.



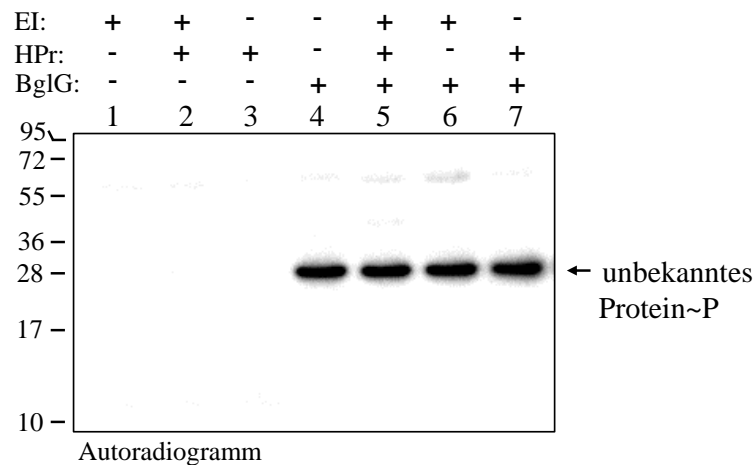
**Abb. 3.2.: Test *in vitro* Phosphorylierung von BglG durch HPr**

Der PEP abhängige Phosphorylierungsassay wurde mit aufgereinigten His<sub>10</sub>-EI, His<sub>10</sub>-Hpr und Strep-BglG in verschiedenen Kombinationen durchgeführt. Die Assays wurden mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP durchgeführt. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einem Phosphoimager analysiert. Die Größen des Molekulargewicht Markers sind auf der linken Seite zu sehen.

Da bei der Herstellung von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP nicht das komplette  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP umgewandelt wird, sind in den Phosphorylierungsassays geringe Mengen  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP vorhanden. Deshalb wurde im nächsten Schritt getestet, ob es sich bei den Kontaminationen um eine  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP oder  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP abhängige Phosphorylierung handelt. Dazu wurden die Phosphorylierungsansätze nur mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt (Abb. 3.3.). In den Ansätzen, wo Strep-Tag aufgereinigtes BglG vorhanden ist (Abb. 3.3. Spur 4-7), ist ein Signal auf der Höhe von BglG sichtbar. Diese Ergebnisse konnten zeigen, dass es sich bei den Kontaminationen um Proteine handelt, die durch  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP autophosphoryliert werden. Die Signale deuten auch darauf hin, dass das kontaminierende Protein hauptsächlich bei Strep-Tag Aufreinigungen ko-eluiert wurde.

Zusätzlich wurden wie in Abb. 3.2. Phosphorylierungsassays mit steigenden Konzentrationen von kaltem ATP durchgeführt. Durch die hohen ATP Konzentrationen sollte das  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP bei der Autophosphorylierungsreaktion verdrängt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die erhöhte ATP Konzentration die kontaminierenden Signale (Abb. 3.2. Spur 2-4 und Spur 6-7) nicht mehr auf dem Autoradiogramm zu sehen sind (Daten nicht gezeigt). Damit

konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Kontaminationen um autophosphoryliertes Protein handelt und dass die Proteine keinen Einfluss auf die BglG Phosphorylierung haben. Um die zusätzlichen Signale aus den Radiogrammen zu entfernen, wurde versucht, das  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP vom  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -PEP (siehe Kap. 2.3.10.) zu trennen. Die Separierung der Bestandteile durch Anionenaustauschchromatographie hat nicht funktioniert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.3.:  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP abhängige *in vitro* Phosphorylierung der aufgereinigten PTS Komponenten**

Die Phosphorylierungsassays wurden anstelle von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -PEP mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt. In diesen Assays war His<sub>10</sub>-EI, His<sub>10</sub>-HPr und Strep-BglG in den Kombinationen wie angegeben vorhanden. Nach dem Assay wurden die Proteine in 15% SDS-Polyacrylamidgelen durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde durch einen Phosphoimager analysiert. Die Größen des Molekulargewicht Markers sind auf der linken Seite angegeben.

Letztendlich wurden bei allen Strep-Tag Aufreinigungen die Salzkonzentration in den Puffern erhöht, damit die Kontamination durch nicht kovalent gebundene Proteine vermieden wird. Durch die neuen Puffer und durch stringentes Waschen wurde kein Protein mehr ko-eluiert und die Kontaminationen in den Radiogrammen traten nicht mehr auf.

### 3.1.4. PEP, EI und HPr-abhängige *in vitro* Phosphorylierung von BglG

Auf transkriptioneller sowie auf post-transkriptioneller Ebene unterliegt das *bgl* Operon mehreren Ebenen der Regulation (Radde *et al.*, 2008; Venkatesh *et al.*, 2010). BglG ist ein Antiterminatorprotein und reguliert das *bgl*-Operon auf transkriptioneller Ebene. Durch *in vivo* Experimente und durch Vergleiche mit homologen Systemen wurde vermutet, dass BglG durch einen Phosphorylgruppentransfer vom PEP über EI und HPr phosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Görke & Rak, 1999). Die Experimente wurden in Stämmen

durchgeführt, in denen eine BglF-unabhängige Phosphorylierungsreaktion möglich war ( $\Delta bglF$ ).

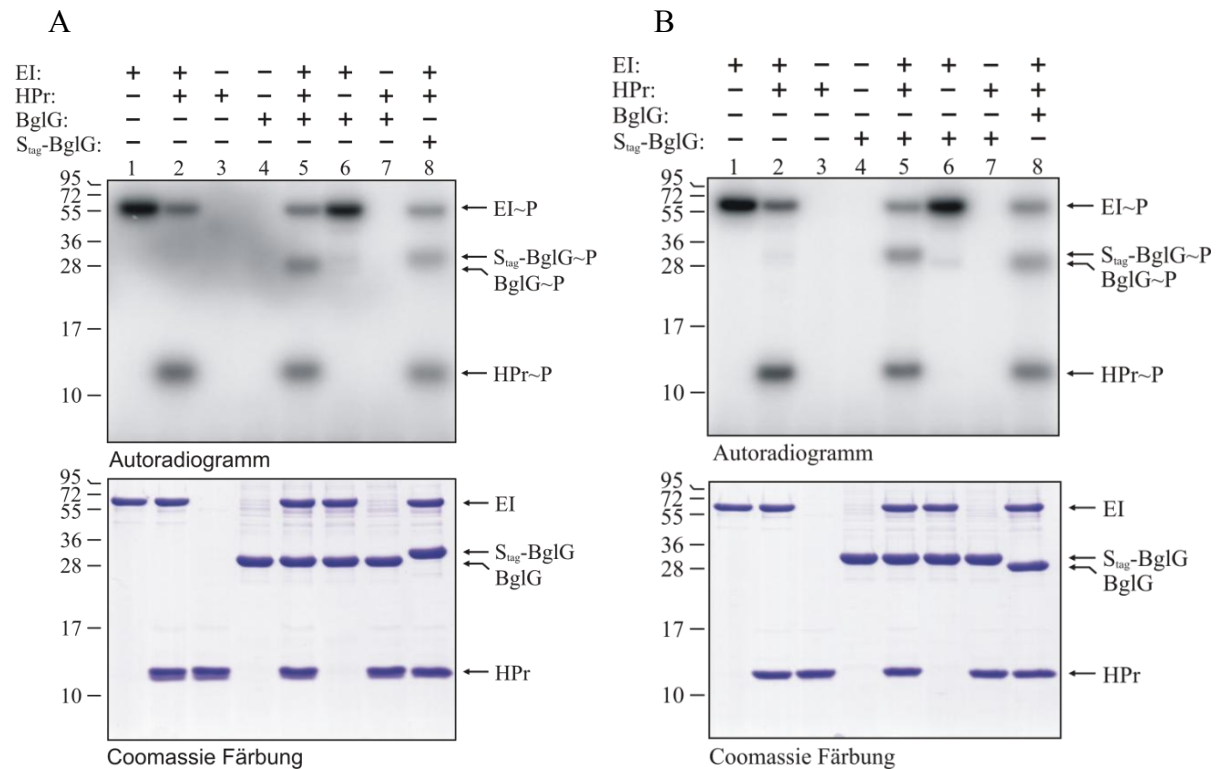
Durch die bisherigen *in vivo* Ergebnisse konnte jedoch nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass der Phosphorylgruppentransfer indirekt zwischen HPr bzw. FruB und BglG stattfindet. Ein unbekanntes Protein könnte die BglG Phosphorylierung katalysieren und Phosphorylgruppen von HPr~P oder FruB~P übertragen.

Mit Hilfe einer C-terminalen Strep-Tag-Fusion ist es gelungen, BglG aufzureinigen und in Lösung zu halten. Dies bot die Gelegenheit, die Phosphorylierung von Strep-BglG *in vitro* zu studieren. Zu diesem Zweck wurden rekombinante His<sub>10</sub>-EI und His<sub>10</sub>-HPr Proteine durch Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Kapp. 3.1.1.). Die aufgereinigten Proteine wurden in einem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP abhängigen Phosphorylierungassay getestet und in einem Autoradiogramm analysiert. Wie schon in Kap. 3.1.2. beschrieben, wurden die Assays in allen möglichen Proteinkombinationen durchgeführt (Abb. 3.4.).

Wie erwartet, konnte für EI eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden, wenn es alleine mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP inkubiert wurde (Abb. 3.4. A Spur 1). Für HPr war es nicht möglich, ein Signal zu detektieren, wenn es alleine im Assay getestet wurde (Abb. 3.4. A Spur 3). Befanden sich EI und HPr im Assay, konnte gezeigt werden, dass das radioaktiv markierte Phosphat von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP über EI auf das HPr übertragen wurde (Abb. 3.4. A Spur 2). Ein Signal für phosphoryliertes BglG konnte nicht nachgewiesen werden, wenn BglG alleine mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP, HPr oder EI inkubiert wurde, da der Transfer einer Phosphorylgruppe auf das BglG unterbrochen ist (Abb. 3.4. A Spur 4, 6 und 7). Befinden sich jedoch HPr und EI zusammen mit BglG im Reaktionsansatz, dann konnte ein Signal identifiziert werden, das dem phosphorylierten BglG entspricht (Abb. 3.4. A Spur 5). Um herauszufinden, ob es sich bei dem Signal wirklich um phosphoryliertes BglG handelt, wurde aufgereinigtes BglG mit erhöhtem Molekulargewicht verwendet. Dazu wurde, wie schon in Kap. 3.2. beschrieben, BglG N-Terminal mit einem S-Tag fusioniert, was eine Erhöhung des Molekulargewicht um 1,75 kDa bewirkte. Das veränderte Molekulargewicht führte dazu, dass sich S-Tag-BglG langsamer durchs SDS Gel bewegte als Strep-BglG (Abb. 3.4. A, Coomassiefärbung, Spur 7 und 8). Wenn S-Tag-BglG mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP, HPr oder EI inkubiert wurde konnte an der erwarteten Position ein Signal für  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-S-Tag-BglG nachgewiesen werden (Abb. 3.4. A Spur 8).

Der S-Tag konnte sich nicht autophosphorylieren oder alleine durch ein zweites Protein phosphoryliert werden (Abb. 3.4. B). Genauso wie das Strep-BglG benötigt das Strep-S-Tag-BglG die Anwesenheit von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP, HPr und EI für die Phosphorylierung (Abb. 3.4. B

Spur 5). Fehlte auch hier eines oder beide Proteine, dann konnte kein Signal für S-Tag-BglG beobachtet werden. Dadurch konnte belegt werden, dass es sich bei dem identifizierten Signal, wenn BglG, HPr und EI zusammen inkubiert wurden, um phosphoryliertes BglG handelt. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Phosphorylgruppen vom PEP über EI und HPr auf BglG übertragen werden und dass HPr in der Lage ist, BglG direkt zu phosphorylieren.



**Abb. 3.4.: In vitro Phosphorylierung von BglG (A) und S-Tag-BglG (B) durch HPr**

PEP abhängige Phosphorylierungsassays wurden mit aufgereinigten His<sub>10</sub>-EI, His<sub>10</sub>-Hpr, Strep-BglG (A) oder Strep-S-Tag-BglG (B) durchgeführt. In den Assays wurden verschiedene BglG Varianten, Strep-S-Tag-BglG (A) und Strep-BglG (B), als Kontrolle verwendet um das unterschiedliche Molekulargewicht anzudeuten. Die Assays wurden mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP (oben) oder kalten PEP (unten) durchgeführt. Die Proteine wurden in 15% SDS-Polyacrylamidgelen durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden durch einen Phosphoimager (oben) oder durch das Färben mit Coomassie brilliant blue analysiert. Die Größen des Molekulargewicht Markers sind jeweils auf der linken Seite angegeben.

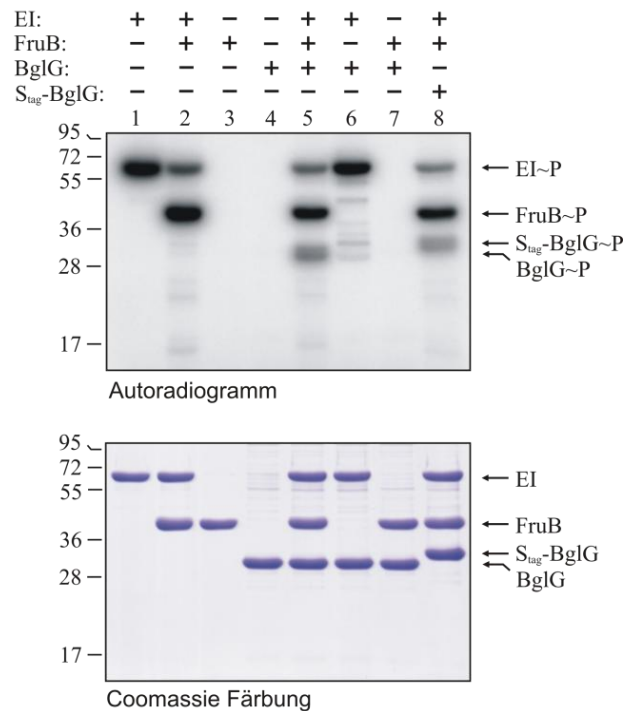
### 3.1.5. FruB kann HPr *in vitro* im BglG Phosphorylierungsassay ersetzen

*In vivo* Experimente mit FruB konnten zeigen, dass in der Abwesenheit von HPr FruB in der Lage ist, BglG zu phosphorylieren und es gleichzeitig zu aktivieren (Görke & Rak, 1999). Um zu testen, ob FruB BglG direkt phosphoryliert und somit HPr ersetzen kann, wurden wieder  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP abhängige Phosphorylierungsassays durchgeführt. Alle möglichen Proteinkombinationen wurden wie schon in Kap. 3.1.2 und 3.1.3. im Assay analysiert, nur mit der Ausnahme, das His<sub>10</sub>-HPr durch His<sub>10</sub>-FruB ausgetauscht wurde. Wie schon in früheren Studien gezeigt werden konnte, wird ein starkes Signal für FruB sichtbar, wenn es zusammen mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP und EI inkubiert wurde (Abb. 3.5. Spur 2). Das Signal war nicht mehr sichtbar, wenn EI im Assay fehlte (Abb. 3.5. Spur 3).

Das Protein FruB setzt sich aus zwei Domänen zusammen, die HPr ähnliche C-terminale Domäne und die N-terminale IIA Domäne. EI phosphoryliert FruB erst in der C-terminalen Domäne und von dort wird die Phosphorylgruppe auf die IIA Domäne übertragen (Postma *et al.*, 1993). EI ist also in der Lage, FruB doppelt in der N- und C-terminalen Domäne zu phosphorylieren. Dadurch konnte erklärt werden, warum die FruB Signale im Autoradiogramm viel stärker sind als bei nur einfach phosphorylierten HPr (Vergleiche Abb. 3.4. und Abb. 3.5.).

Auf dem Autoradiogramm konnte ein drittes Signal identifiziert werden, wenn zusätzliches Strep-BglG in den Assay gegeben wurde (Abb. 3.5. Spur 5). Bei diesem Signal handelte es sich eindeutig um  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]- Strep-BglG. Das gleiche war auch nach der Zugabe von Strep-S-Tag-BglG zu beobachten (Abb. 3.5. Spur 8). Waren EI und FruB nicht im Reaktionsansatz, dann konnte keine Phosphorylierung von BglG nachgewiesen werden (Abb. 3.5. Spur 4, 6 und 7).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass wie beim HPr die Phosphorylgruppe von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP über EI und FruB auf das BglG übertragen wird und dass FruB BglG mit ähnlicher Effizienz wie HPr phosphorylieren kann (Vergleiche Spur 5 Abb.3.4. und Abb. 3.5.).



**Abb. 3.5.: *In vitro* Phosphorylierung von BglG durch FruB**

Die PEP abhängigen Phosphorylierungsassays wurden entweder mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP (oben) oder kalten PEP (unten) durchgeführt. In den Assays wurde, wie beschriftet, aufgereinigtes His<sub>10</sub>-EI, His<sub>10</sub>-FruB, Strep-BglG eingesetzt. In der letzten Spur wurde Strep-S-Tag-BglG, wegen seinem veränderten Molekulargewicht, als Kontrolle verwendet. Die Proteine wurden in 15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend durch einen Phosphoimager (oben) oder durch das Färben mit Coomassie brilliant blue analysiert. Die Größen des Molekulargewicht Markers sind jeweils auf der linken Seite angegeben.

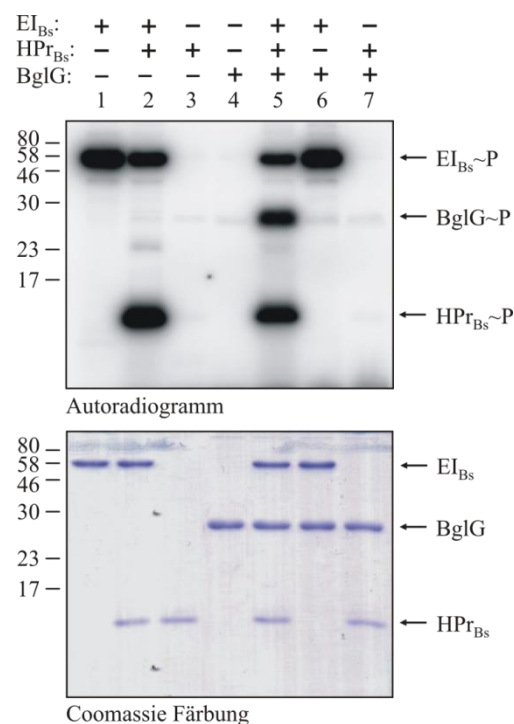
### 3.1.6. EI<sub>Bs</sub> und HPr<sub>Bs</sub> von *B. subtilis* phosphorylieren BglG *in vitro*

In früheren *in vivo* Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass BglG von den zu *E. coli* homologen EI und HPr von *B. subtilis* phosphoryliert und damit aktiviert wird. Die Aktivierung von BglG wurde in Stämmen ohne das *fruBKA* Operon beobachtet und es konnte festgestellt werden, dass für die Aktivierung die His15 Phosphorylierungsstelle in HPr benötigt wird. Diese Ergebnisse deuten an, dass das HPr von *B. subtilis* das HPr-Homolog von *E. coli* ersetzen kann und in der Lage ist, BglG durch seine Phosphorylierung zu aktivieren (Reichenbach *et al.*, 2007).

Um zu überprüfen, ob Phosphorylgruppen vom *B. subtilis* HPr auf das BglG übertragen werden, wurden erneut  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP abhängige *in vitro* Phosphorylierungsassays durchgeführt (Kap. 3.1.3.). In den Reaktionsansätzen wurde das EI und HPr von *E. coli* gegen aufgereinigtes *B. subtilis* His<sub>6</sub>-EI und *B. subtilis* Strep-HPr ausgetauscht (EI<sub>Bs</sub> und HPr<sub>Bs</sub>).

EI<sub>Bs</sub> und HPr<sub>Bs</sub> wurden beide phosphoryliert, wenn sie zusammen im Ansatz mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP inkubiert wurden (Abb. 3.6. Spur 2). Befand sich noch zusätzlich Strep-BglG im Ansatz, dann konnte auch die Phosphorylierung von BglG festgestellt werden (Abb. 3.6. Spur 5). Fehlte jedoch im Reaktionsansatz EI<sub>Bs</sub>, HPr<sub>Bs</sub> oder beide, dann war kein Signal mehr für BglG zu detektieren (Abb. 3.6. Spur 4, 6 und 7).

Zusammenfassend wurde deutlich, dass BglG auch von *B. subtilis* HPr phosphoryliert werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, EI<sub>Bs</sub> und HPr<sub>Bs</sub> nicht nur in *B. subtilis* die transkriptionalen Antiterminatoren aktivieren können (Arnaud *et al.*, 1992; Gosalbes *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 1999).



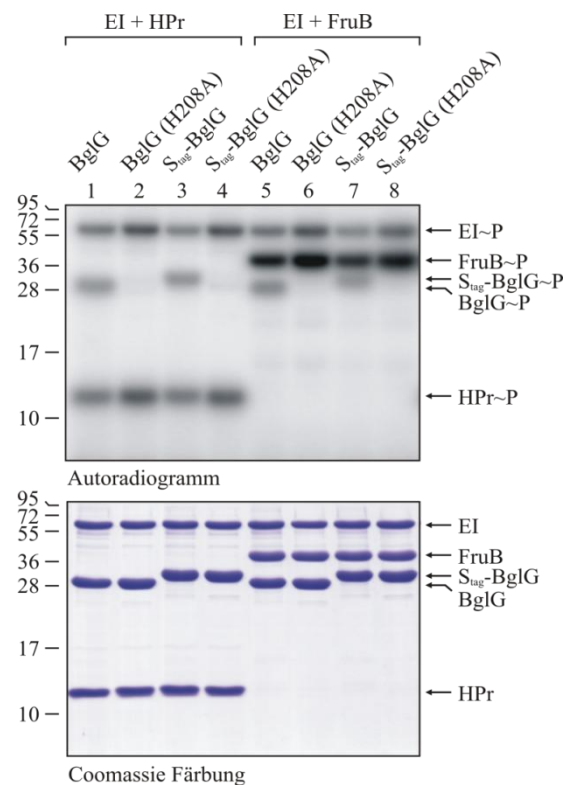
**Abb. 3.6.: In vitro Phosphorylierung von BglG durch EI und HPr von *B. subtilis***

Die PEP abhängigen Phosphorylierungsassays von Strep-BglG wurden mit aufgereinigten His<sub>6</sub>-EI und Strep-Hpr von *B. subtilis* durchgeführt. Die Assays wurden mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP (oben) oder kalten PEP (unten) durchgeführt. In den Assays wurden die Proteine in verschiedene Kombinationen getestet. Die Proteine wurden in 15% SDS-Polyacrylamidgelen durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden durch einen Phosphoimager (oben) oder durch das Färben mit Coomassie brilliant blue analysiert. Die Größen des Molekulargewicht Markers sind jeweils auf der linken Seite angegeben.



### 3.1.7. Die essentielle Bedeutung der Phosphorylierungsstelle His208 in BglG

In *in vivo* Studien konnten die Phosphorylierungsstellen von BglG festgestellt werden. BglG wird durch BglF am konservierten Histidin 101 in der PRDI phosphoryliert. Außerdem wird vermutet, dass sich die HPr abhängige Phosphorylierungsstelle am Histidin 208 in der PRDII befindet (van Tilbeurgh and Declerck, 2001). Um zu bestätigen, dass die *in vivo* Ergebnisse auch mit den *in vitro* Ergebnissen übereinstimmen, wurden durch die Methode der CCR verschiedene Strep-Tag Plasmide hergestellt: pGP1309 (Strep-BglG-H208A), pGP1310 (Strep-BglG-H101L), pGP1311 (Strep-BglG-H101L/ H208A). Das Strep-BglG-H101L und Strep-BglG-H101L/ H208A konnte nicht aufgereinigt werden, da die beiden Proteinmutanten unlöslich waren (Daten nicht gezeigt). Strep-BglG-H208A hingegen konnte ohne Probleme aufgereinigt werden (Abb. 3.7. unten Spur 2 und 6).



**Abb. 3.7.: Das BglG Histidin 208 ist essentiell für die Phosphorylierung durch HPr und FruB**

Die PEP abhängigen Phosphorylierungsassays enthielten His<sub>10</sub>-EI und His<sub>10</sub>-HPr (Spur 1-4) oder His<sub>10</sub>-EI und His<sub>10</sub>-FruB (Spur 5-8). Zusätzlich waren noch folgende BglG Varianten im Assay: Strep-BglG (Spur 1, 5), Strep-BglG-H208A (Spur 2, 6), Strep-S-Tag-BglG (Spur 3, 7) und Strep-S-Tag-BglG-H208A (Spur 4, 8). Die Proteine wurden in 15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend durch einen Phosphoimager (oben) oder durch das Färben mit Coomassie brilliant blue analysiert. Die Größen des Molekulargewicht Markers sind jeweils auf der linken Seite angegeben.

Im nächsten Schritt wurde die BglG-H208A Mutante darauf überprüft, ob sie noch durch HPr und FruB in Anwesenheit von EI und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP phosphoryliert wird (Abb. 3.7.).

Unabhängig ob HPr oder EI im Assay vorhanden war, es konnte kein Phosphorylierungssignal für die BglG-H208A Variante festgestellt werden (Abb. 3.7. Spur 2 und 4). Im Vergleich dazu war für das Wildtyp-Strep-BglG ein deutliches Signal sichtbar (Abb. 3.7. Spur 1 und 5). Um das Ergebnis eindeutig zu bestätigen, wurde das Experiment mit S-Tag fusionierten BglG Varianten wiederholt. Auch hier war für die H208A Mutante kein Signal zu erkennen, aber für den dazu passenden Wildtyp konnte Phosphorylierung durch HPr und FruB festgestellt werden (Abb. 3.7. Spur 3, 4, 7 und 8).

Mit diesen Ergebnissen konnte bestätigt werden, dass das BglG Histidin 208 essentiell für die Phosphorylierung durch HPr und FruB ist.

### **3.2. Die dynamische Lokalisation des Transkriptionsfaktors LicT**

#### **3.2.1. Ziel der Untersuchung**

LicT aus *B. subtilis* ist ein Antiterminationsprotein der BglG/ SacY-Familie und reguliert die Expression der *bgl*-Gene, die für die Verwertung von Aryl- $\beta$ -Glukosiden und  $\beta$ -Glucanen verantwortlich sind (Lindner *et al.*, 2002). Zu LicT homologe Proteine wurden in zahlreichen Bakterienarten identifiziert und es wurde nachgewiesen, dass die Aktivität der Antiterminationsproteine durch das PTS reguliert wird (Deutscher *et al.*, 2006; Stülke *et al.*, 1998). Diese Antiterminationsproteine werden durch ihre spezifischen Zuckerpermeasen negativ reguliert und durch die allgemeine PTS-Komponente HPr positiv stimuliert (van Tilbeurgh & Declerck, 2001).

Das zu LicT homologe BglG aus *E. coli* ist während der negativen Regulation an der Membran lokalisiert und wird nach der Aktivierung durch Salicin ins Zytoplasma entlassen (Lopian *et al.*, 2003).

Um besser zu verstehen, wie an die Membran gebundene Sensoren (Permeasen) mit Signalproteinen (Transkriptionsfaktoren) kommunizieren, sollte die dynamische Lokalisation des Transkriptionsfaktors LicT untersucht werden.

Durch unterschiedliche äußere Stimuli (spezifische Permeasezucker) und Fluoreszenzmikroskopie sollte die Lokalisation von LicT verfolgt werden.

### 3.2.2. Die räumliche Verteilung der $\beta$ -Glukosid aufnehmenden PTS-Komponenten

In vielen Bakterien wird eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen über das PTS aufgenommen. Das PTS von *B. subtilis* besteht aus den allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr und aus 15 spezifischen PTS-Zucker-Permeasen (s. Kap. 1.8.1.).

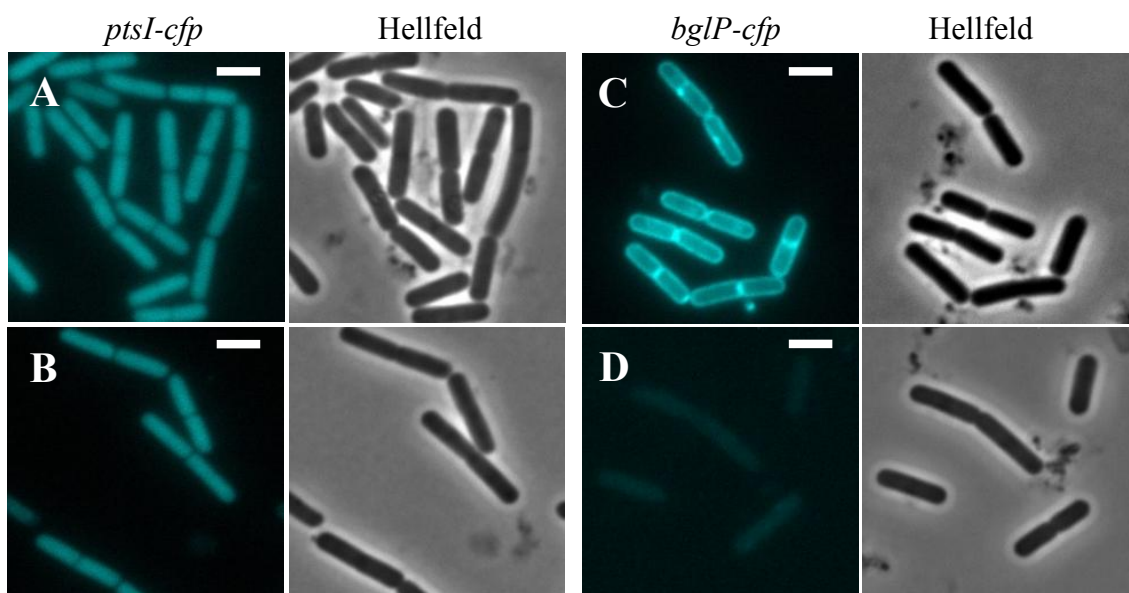
Bei der Translokation von Salicin ( $\beta$ -Glukosid) durch die Zytoplasmamembran wird Salicin von der  $\beta$ -Glukosid spezifischen Permease BglP aufgenommen und phosphoryliert. Um die subzelluläre Lokalisation der PTS-Komponenten bei der Zuckeraufnahme zu beobachten, wurden die Proteine mit Hilfe der LFH-Methode (s. Kap. 2.3.7.) C-terminal mit dem Cyan-Fluoreszenzprotein (CFP) fusioniert. Es entstanden die Stämme GP1266 (*bglP-cfp*), GP1267 (*ptsH-cfp*) und GP1268 (*ptsI-cfp*). Um die biologische Aktivität der entstandenen Fusionsproteine zu überprüfen, wurde das Wachstum der konstruierten Stämme auf Minimal-Medium mit Salicin, Sorbitol und Glukose beobachtet. Mit der Kohlenstoffquelle Sorbitol, der kein PTS-Zucker ist, wuchsen alle Stämme im Vergleich zum Wildtyp identisch. Im Gegensatz dazu konnte der Stamm mit einer HPr-CFP Fusion (GP1267) nicht mehr auf Minimal-Medium mit PTS-Zuckern (Salicin und Glukose) wachsen. Die Stämme mit den Proteinen EI-CFP (GP1268) und BglP-CFP (GP1266) konnten mit allen Kohlenstoffquellen gut wachsen (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Fusionsproteine EI-CFP und BglP-CFP weiterhin aktiv sind und dementsprechend am Transport der PTS-Zucker Glukose (EI) und Salicin (EI und BglP) beteiligt sind. Bakterien mit dem Fusionsprotein HPr-CFP sind sehr wahrscheinlich nicht mehr in der Lage, PTS-Zucker aufzunehmen und können deshalb nur noch auf Minimal-Medium ohne PTS-Zucker als Kohlenstoffquelle wachsen. Es ist anzunehmen, dass die Proteinfusion HPr-CFP inaktiv ist und deshalb wurden für die weiteren Experimente der Stamm GP1267 (*ptsH-cfp*) nicht mehr berücksichtigt.

Um die Lokalisation von EI und BglP in der Zelle zu bestimmen, wurden die Stämme GP1266 und GP1268 in Minimal-Medium mit Salicin bzw. Sorbitol als Kohlenstoffquelle angezogen. Das Fluoreszenzsignal für EI-CFP ist unter beiden Bedingungen gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt (s. Abb. 3.8. A). Dieses Ergebnis passt gut zu den etablierten Daten, dass das *ptsHI*-Operon konstitutiv exprimiert wird (Stülke *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EI keine Bindungsaffinität zur Zellmembran oder zu den Zellpolen besitzt. Das Signal für BglP-CFP ist nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt. Das Fluoreszenzsignal des Proteins ist in Anwesenheit von Salicin, dem Substrat von BglP, in der Zellmembran lokalisiert. In Zellen, die in Anwesenheit von Sorbitol gewachsen sind, kann

lediglich ein Hintergrundsignal identifiziert werden (s. Abb. 3.8. B). Die Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei BglP um eine membranständige und Salicin aufnehmende Permease handelt (Le Coq *et al.*, 1995). Die Expression der Permease wird durch den transkriptionalen Antiterminator LicT kontrolliert und wie schon oben beschrieben ist die Detektion von BglP-CFP abhängig von der Anwesenheit des PTS-Zuckers Salicin. In Anwesenheit von Salicin bindet aktives LicT an die RAT-Sequenz in der 5'-UTR von *bglP* und ermöglicht die Fortsetzung der Transkription hinter dem Terminator in der 5'-UTR (s. Kap. 1.9.). Die Ergebnisse in Abbildung 3.8. C und D zeigen, dass LicT nur in Anwesenheit seines spezifischen Substrates aktiviert wird.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass neben den PTS-Kompetenten auch LicT eine wichtige Bedeutung bei der Aufnahme von Salicin hat. Um den Regulationsmechanismus der  $\beta$ -Glukosidaufnahme besser zu verstehen ist es wichtig, die Lokalisation des Antiterminators LicT zu untersuchen.



**Abb. 3.8.: Zelluläre Verteilung von EI und BglP in An- und Abwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden**

Die Stämme GP1268 (*ptsI-cfp*) und GP1266 (*bglP-cfp*) wurden fluoreszenzmikroskopisch in Anwesenheit von verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Die Zellen wurden in CSE Minimal-Medium mit 0,1% Salicin (A und C) und in CSE Minimal-Medium mit 0,1% Sorbitol (B-D) angezogen. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und bei einer  $OD_{600}$  0,3-0,4 von geerntet. Die Maßstabsleiste entspricht 2  $\mu$ m.

### 3.2.3. *In vivo* Aktivität von LicT-GFP und LicT-YFP Fusionsproteinen

Um die LicT-Lokalisation in *B. subtilis* zu untersuchen, wurde das Gen *licT* im natürlichen Lokus C-terminal mit den Fluorophoren *gfp* und *yfp* fusioniert. Für die Integration ins Chromosom wurden die Integrationsplasmide pGP1270 (*gfp*) und pGP1271 (*yfp*) verwendet. In den Plasmiden wurden 600 bp des *licT* Gens an das *gfp* bzw. *yfp* fusioniert. Die konstruierten Plasmide erhielten die Bezeichnung pGP1292 (*licT*<sub>600</sub>-*gfp*) und pGP1296 (*licT*<sub>600</sub>-*yfp*). Die konstruierten Plasmide wurden in den Wildtyp-Stamm *B. subtilis* 168 transformiert und durch sich anschließende einfache homologe Integration entstanden die Stämme GP1225 (*licT-gfp*) und GP1229 (*licT-yfp*).

Um zu kontrollieren, ob LicT-GFP und LicT-YFP *in vivo* aktiv sind, wurden die Stämme mit einer *bglP-lacZ* Fusion untersucht. In diesen Stämmen ist das promotorlose *lacZ*-Gen, das für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, an den Promotor von *bglP* fusioniert. Die *bglP-lacZ* Fusion wurde mit chromosomaler DNA von QB5335 in die Stämme GP1225 und GP1229 transformiert und durch doppelte homologe Rekombination wurde die *lacZ*-Fusion ins Chromosom integriert. Die entstandenen Stämme wurden als GP1242 und GP1243 bezeichnet (Tab. 3.1.). Als Kontrollen wurde eine  $\Delta$ *licT* Mutante (GP1245) und der Wildtyp (QB5335) mit einer *bglP-lacZ* Fusion verwendet. Die Stämme wurden in CSE Minimal-Medium mit und ohne Salicin sowie in CSE Minimal-Medium den beiden PTS-Zuckern Glukose und Salicin angezogen. Im Wildtyp-Stamm konnte ohne den Induktor Salicin keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität gemessen werden (Tab. 3.1.). In Anwesenheit von Salicin wurde die *lacZ*-Expression auf über 1800 U/mg Protein erhöht. Befanden sich Glukose und Salicin in Medium, erhöhte sich die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf 113 U. Ist kein funktionierendes *licT* vorhanden (GP1245) dann ist unter allen Bedingungen keine Expression von *bglP-lacZ* festzustellen. Diese erhobenen Daten sind vergleichbar mit schon identisch durchgeführten Experimenten und zeigen die von Salicin abhängige Induktion und die von Glukose verursachte Katabolitenrepression (Krüger *et al.*, 1996). Für die beiden Stämme mit den Fluorophorfusionen (GP1242 und GP1243) konnte eine ähnliche Expression wie beim Wildtyp-Stamm festgestellt werden (Tab. 3.1.).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die LicT-GFP und LicT-YFP Fusionen keinen Einfluss auf die *in vivo* Aktivität haben und weiterhin durch die PTS-Komponenten reguliert werden können.

**Tab. 3.1.: Analyse der *bglP-lacZ* Expression**

Stamm	Relevanter Genotyp	β-Galaktosidaseaktivität (U/mg Protein) <sup>a</sup>		
		CSE	CSE-Sal	CSE-Sal/Glc
QB5335	Wildtyp	0,5 (±0,5)	1840 (±61)	113 (±10)
GP1245	<i>ΔlicT</i>	2 (±1)	2 (±0)	1,5 (±0,5)
GP1242	<i>licT-gfp</i>	3 (±1)	1620 (±100)	75 (±14)
GP1243	<i>licT-yfp</i>	2,5 (±0,5)	1490 (±85)	90 (±13)

<sup>a</sup> Die Bakterien wurden in CSE Minimal-Medium angezogen. In das Medium wurde Salicin (Sal) mit 0,1% und Glukose (Glc) mit einer Endkonzentration von 0,5% hinzugegeben. Die Experimente wurden dreimal wiederholt. In den Klammern sind die Werte der Standardabweichung angegeben.

### 3.2.4. Die zuckerabhängige subzelluläre Verteilung von LicT

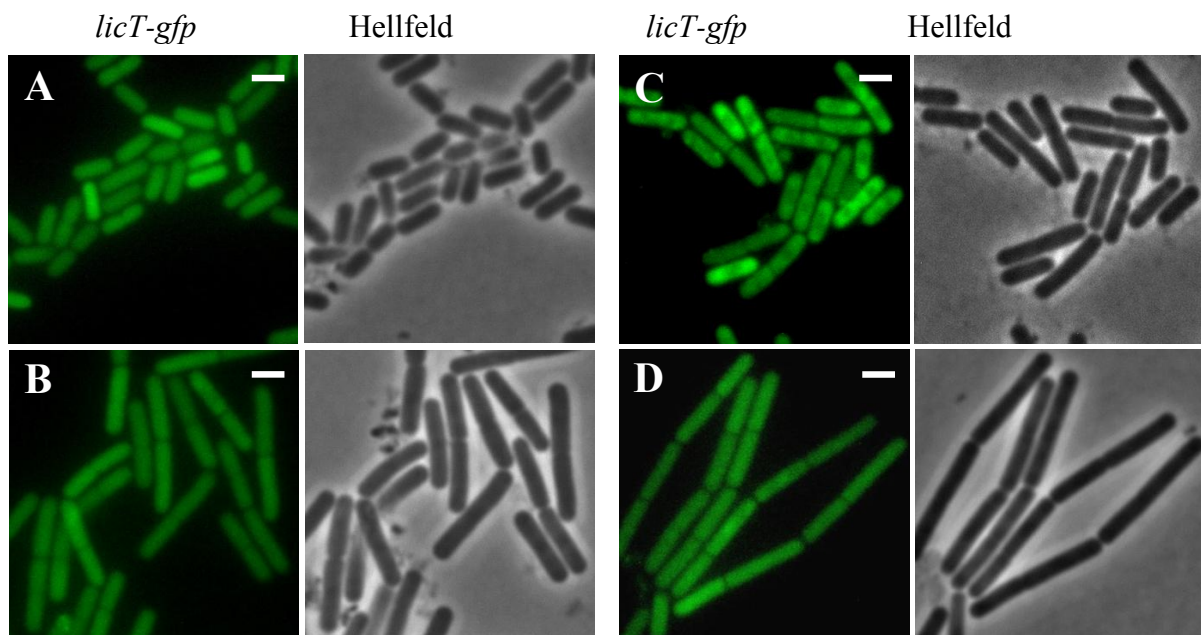
Schon vor einiger Zeit wurde gezeigt, dass Proteine sich in eukaryontischen und prokaryontischen Zellen dynamisch verteilen können. Desweiteren wurden verschiedene Lokalisationsorte für Proteine festgestellt und es wird vermutet, dass die Proteinlokalisierung in der Zelle wichtig für verschiedene regulatorische Prozesse ist (Nevo-Dinur *et al.*, 2012).

Für *E. coli* konnten schon verschiedene subzelluläre Verteilungen von EI und HPr unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gezeigt werden. Außerdem war es möglich, eine dynamische Lokalisation für das Antiterminationsprotein BglG zu zeigen (Lopian *et al.*, 2003; Lopian *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2004). BglG ist in seinem inaktiven Zustand an der Membran lokalisiert und nach der Stimulierung durch seinen Induktor wird BglG ins Zytoplasma entlassen.

In *B. subtilis* gibt es vier Antiterminationsproteine der BglG/ SacY-Familie und bisher war über die Lokalisation der Antiterminationsproteine nichts bekannt.

Für die Untersuchung der dynamischen Lokalisation des Transkriptionsfaktors LicT von *B. subtilis* wurde der in 3.2.2. beschriebene Stamm GP1225 (LicT-GFP) verwendet. Zur Anfertigung der Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen in CSE Minimal-Medium mit verschiedenen Zuckern bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 angezogen. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln, um das lichtempfindliche Fluoreszenzprotein zu schützen (s. Kap. 2.3.6.). In den Fluoreszenzbildern ist zu sehen, dass bei allen gewählten Wachstumsbedingungen LicT exprimiert wird (Abb. 3.8. A-D). Die beobachteten Fluoreszenzsignale waren im Vergleich zu anderen Proteinfusionen sehr schwach. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit dem schwachen Transkriptionslevel von *licT* (Nicolas

*et al.*, 2012). Befinden sich keine LicT aktivierenden  $\beta$ -Glukosid-Zucker (Sorbitol und Glukose) oder überhaupt keine Kohlenstoffquellen im Medium, dann ist LicT-GFP gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 3.9. A, B und D). Befindet sich bei der Kultivierung jedoch ein Induktor (Salicin bzw.  $\beta$ -Glukoside) im Medium, dann konnte eine Verlagerung und Akkumulation des LicT-GFP in die äußeren Bereiche der Zelle beobachtet werden (Abb. 3.9. C). In Anwesenheit von Salicin ist das LicT-GFP aktiv und reguliert das *bglS*-Gen und das *bglPH*-Operon. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die LicT-YFP Fusion erhalten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.9.: Zelluläre Verteilung von LicT unter verschiedenen Wachstumsbedingungen**

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit einer chromosomalen *licT-gfp* Fusion. Die Zellen wurden in (A) CSE, (B) CSE mit 0,5% Sorbitol, (C) CSE mit 0,1% Salicin und in (D) CSE mit 0,1% Salicin und 0,5% Glukose angezogen. Die Proben wurden bei  $OD_{600}$  0,3-0,4 geerntet. In allen Proben wird LicT-GFP exprimiert (A-D). LicT ist in den Zellengleichmäßig verteilt, außer im CSE-Medium mit 0,1% Salicin ist LicT dezentral lokalisiert (C). Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Die Maßstabsleiste entspricht 2  $\mu$ m.

Neben dem Antiterminator LicT wurden auch die anderen Transkriptionsfaktoren der BglG/SacY-Familie mit einer *gfp* Fusion untersucht. Für GlcT, SacT und SacY konnten mit und ohne Induktor keine relevanten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivität von LicT im engen Zusammenhang mit der zellulären Lokalisation steht.

### 3.2.5. $\beta$ -Glukosid abhängige dynamische Re-Lokalisation von LicT

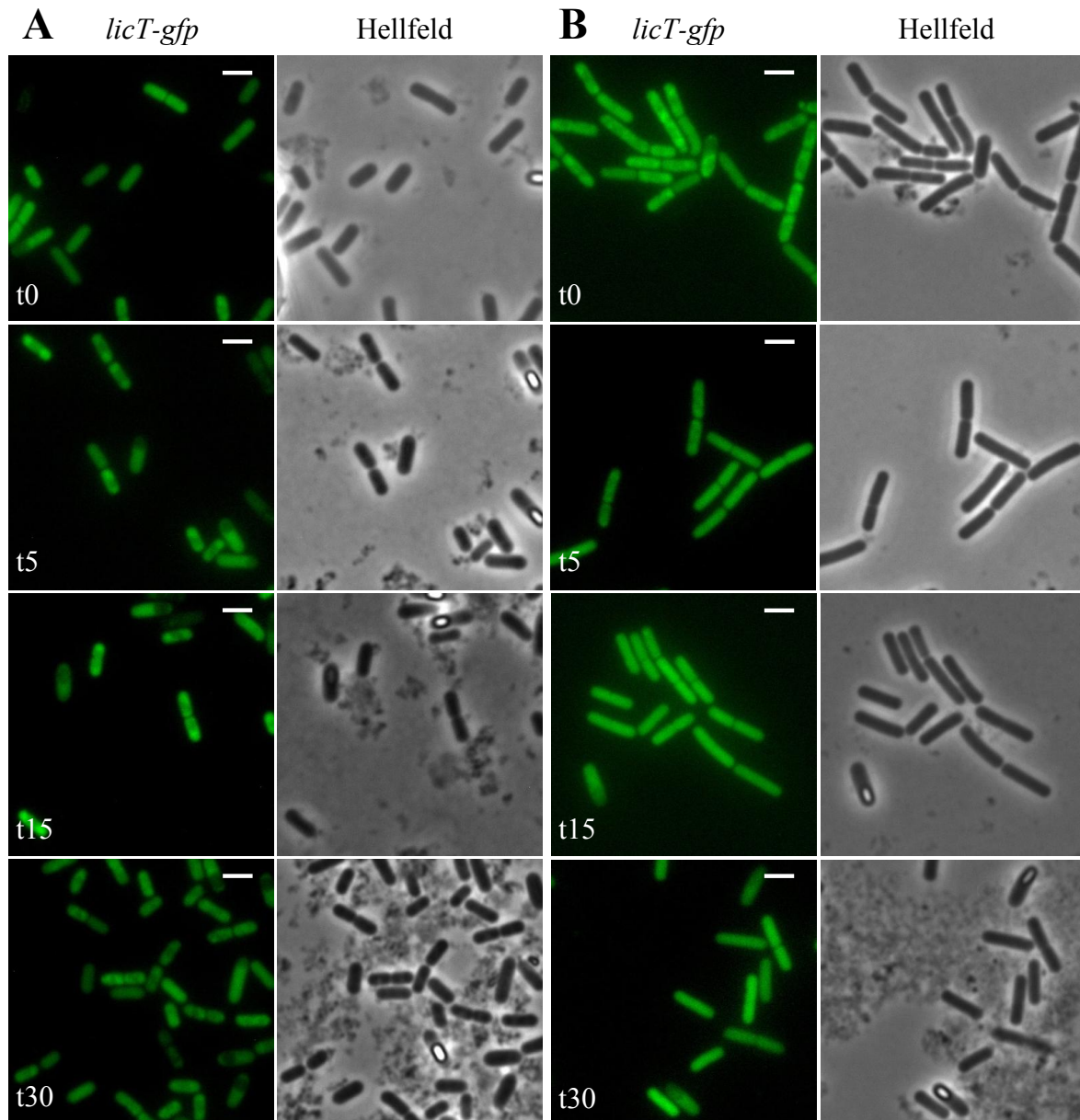
Wie schon in Abschnitt 3.2.3. beschrieben, ist die subzelluläre Lokalisation von transkriptionalen regulatorischen Proteinen schon seit langem bekannt (Lopian *et al.*, 2003; Lopian *et al.*, 2010). Unklar war bisher, wo die Proteine unter verschiedenen regulatorischen Bedingungen lokalisiert sind und wie schnell sie sich in der Zelle neu lokalisieren.

Um die von Salicin kontrollierte LicT-GFP Lokalisation aus Abschnitt 3.2.3. zu bestätigen, wurde der Stamm GP1225 (*licT-gfp*) in CSE Minimal-Medium ohne Induktor kultiviert und bis zu einer  $OD_{600}$  0,3-0,4 angezogen. Um die dynamische Lokalisation des LicT-GFP zu untersuchen, wurden die Zellen anschließend gewaschen und in Medium mit Induktor (Salicin) überführt (CSE  $\rightarrow$  CSE-Salicin). Die Zellen wurden vor dem Mediumwechsel und nach 5, 15 und 30 Minuten nach der Zugabe von Salicin fluoreszenzmikroskopisch untersucht ( $t_0$ ,  $t_5$ ,  $t_{15}$  und  $t_{30}$ ). In Medium mit CSE ist inaktives LicT-GFP über die gesamte Zelle verteilt (s. Abb. 3.10.). Diese Lokalisation ist übereinstimmend mit früheren Beobachtungen (s. Abb. 3.9. A). Nachdem die Zellen von Medium ohne Induktor in Medium mit Induktor überimpft wurden, war schon nach 5 min in mehr als 50% der Zellen zu sehen, dass sich das LicT-GFP in den äußeren Bereichen akkumuliert (Abb. 3.10. A,  $t_5$ ). Nach 15 min im Medium mit Induktor ist LicT-GFP in fast allen Zellen in den äußeren Bereichen der Zelle lokalisiert (Abb. 3.10. A,  $t_{15}$ ). Die gleiche Lokalisation von LicT konnte auch nach 30 min beobachtet werden (Abb. 3.10. A,  $t_{30}$ ). Im nächsten Schritt wurden GP1225 aus Medium mit dem Induktor Salicin in ein Medium ohne Induktor überführt. Die Zellen wurden in CSE Minimal-Medium mit Induktor bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3-0,4 angezogen und geerntet. Die Zellen wurden in frischem Minimal-Medium, das Sorbitol enthielt, gewaschen und resuspendiert. Wie im ersten Experiment, wurden die Zellen vor und nach dem Medienwechsel fluoreszenzmikroskopisch untersucht ( $t_0$ ,  $t_5$ ,  $t_{15}$  und  $t_{30}$ ). Wie schon zuvor beobachtet, ist in Medium mit Salicin das aktive LicT in den äußeren Bereichen der Zelle lokalisiert (Abb. 3.10. B,  $t_0$ ). In den Zellen, die von Medium mit Induktor in das Minimal-Medium ohne Induktor umgesetzt wurden (CSE-Salicin  $\rightarrow$  CSE-Sorbitol), konnte festgestellt werden, dass das LicT-GFP beginnt, sich gleichmäßig über die Zelle zu verteilen (Abb. 3.10. B,  $t_5$ ). Wie in den vorherigen Versuchen ist inaktiviertes LicT gleichmäßig über die Zelle verteilt (s. Abb. 3.9. C). In mehr als 50% der Zellen konnte aber noch eine Lokalisation in den äußeren Bereichen identifiziert werden. Die homogene Verteilung von LicT verläuft langsamer als die Akkumulation in den äußeren Bereichen. Erst nach 15 min war das LicT-



GFP in fast allen Zellen über die ganze Zelle verteilt (Abb. 3.10. B, t15). Die neue Lokalisierung von LicT war nach 30 min abgeschlossen (Abb. 3.10. B, t30).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LicT-GFP abhängig vom Induktor Salicin und seiner Aktivität sich sehr schnell neu in der Zelle umorientieren kann.



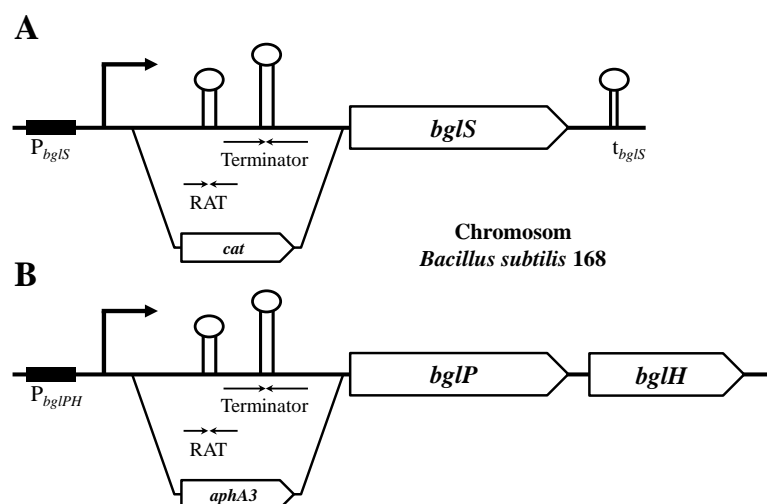
**Abb. 3.10.: Dynamische Re-Lokalisation von LicT**

Untersuchung der dynamischen Lokalisation von LicT-GFP (GP1225) in Anwesenheit und Abwesenheit eines Induktors ( $\beta$ -Glukoside). Die Zellen wurden von CSE Minimal-Medium in CSE-Medium mit 0,1% Salicin (A) und von CSE-Medium mit 0,1% Salicin in ein CSE-Medium mit 0,5% Sorbitol (B) gewechselt. Die Bilder wurden vor (t0) dem Mediumwechsel und 5, 15 und 30 min (t5, t15 und t30) danach aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Die Maßstabsleiste entspricht 2  $\mu$ m.

### 3.2.6. Ist die Lokalisation der LicT-Bindestellen (RATs) verantwortlich für die Lokalisation in den äußeren Bereichen?

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von der RNA-Lokalisation in Prokaryonten vermehrt untersucht (Broude, 2011; Keiler, 2011; Nevo-Dinur *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass eine Verknüpfung zwischen den Lokalisationsmustern von RNAs und Proteinen besteht. Diese Verknüpfung könnte die Koordination von räumlichen und zeitlichen Prozessen, wie die lokalisierte Translation oder den Aufbau von Proteinkomplexen erhöhen (Nevo-Dinur *et al.*, 2012).

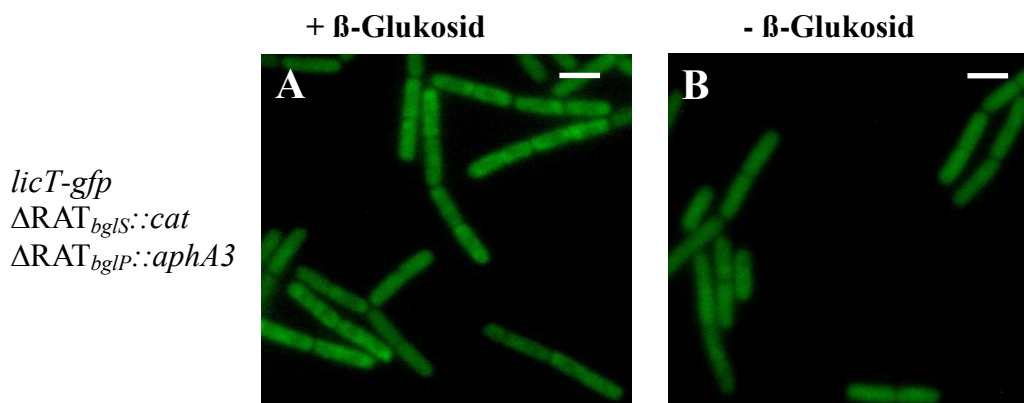
Wie schon zuvor beschrieben, ist aktiviertes LicT in den Zellpolen akkumuliert und inaktives LicT ist gleichmäßig über die Zelle verteilt. Das aktive LicT bindet an die RAT-Strukturen in den 5'-UTRs der *bglS*- und *bglPH*-mRNAs und verhindert das Blockieren der Transkription (Declerck *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1996; Schnetz *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob die Lokalisation der *bglS*- und *bglPH*-mRNAs im Zusammenhang mit der LicT Lokalisation steht, wurden Mutanten ohne die 5'-UTRs der mRNAs hergestellt. Dazu wurden die 5'-UTRs gegen Resistenzkassetten ausgetauscht (Abb. 3.11. A und B). Der konstruierte Stamm, der keine Bindestellen (RATs) für LicT mehr enthielt (GP1263), wurde anschließend mit dem Integrationsplasmid pGP1292 (*licT*<sub>600</sub>-*gfp*) transformiert. Der erhaltene Stamm GP1264 (*trpC2*  $\Delta$ RAT<sub>*bglS*</sub>::*cat*  $\Delta$ RAT<sub>*bglP*</sub>::*aphA3* *licT*-GFP *spc*) wurde für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet.



**Abb. 3.11.: Konstruktion einer  $\Delta$ RAT<sub>*bglS*</sub>::*cat*  $\Delta$ RAT<sub>*bglP*</sub>::*aphA3* Mutante**

Die Bindestellen (RATs) des Antiterminationsproteins LicT wurden durch doppelte homologe Rekombination (LFH-Methode) entfernt. Die LicT Bindestelle (RAT) und der Terminator von *bglS* wurde gegen eine *cat*-Resistenzkassette (A) und die *bglPH*-RAT sowie der Terminator wurden gegen eine *aphA3* Resistenzkassette (B) ausgetauscht. Der konstruierte Stamm erhielt die Bezeichnung GP1263.

Die Zellen wurden wie schon in Abschnitt 3.2.3. beschrieben behandelt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3-0,4 angezogen. Der Stamm GP1264 wurde dabei mit Induktor (CSE-Salicin) und in Minimal-Medium ohne Induktor (CSE-Sorbitol) kultiviert (Abb. 3.12. A und B). Wie schon in Abschnitt 3.2.4. und 3.2.5. für den Wildtyp gezeigt wurde, ist LicT-GFP in Anwesenheit des Induktors weiterhin an den äußeren Bereichen der Zelle lokalisiert (Abb. 3.12. A). Ebenso konnte gezeigt werden, dass im Medium ohne Induktor das LicT-GFP weiterhin über die ganze Zelle verteilt vorliegt (Abb. 3.12. B). Zwischen dem Wildtyp-Stamm GP1225 und der Mutante GP1264 konnte kein Unterschied in der Lokalisation von LicT-GFP festgestellt werden (Vergleiche Abb. 3.9. B und C mit Abb. 3.12. A und B). Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass die RNA-Lokalisation der 5'-UTRs von *bglS* und *bglPH* nicht im Zusammenhang mit der Lokalisation von LicT-GFP steht.



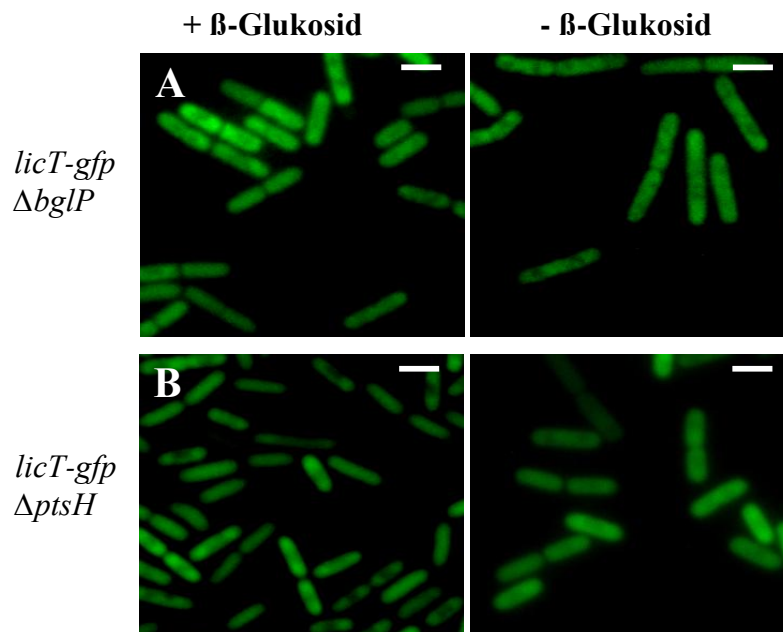
**Abb. 3.12.: Lokalisation von LicT in einer  $\Delta RAT_{bglS}::cat \Delta RAT_{bglP}::aphA3$  Mutante**

Untersuchung der RNA-abhängigen Lokalisation von LicT. Die Lokalisation von LicT-GFP wurde in einem Stamm ohne Ziel-RNA (GP1264) analysiert. Der Stamm GP1264 ( $\Delta RAT_{bglS}::cat \Delta RAT_{bglP}::aphA3 licT-gfp spc$ ) wurden in CSE mit 0,1% Salicin(A) und in CSE mit 0,5% Sorbitol (B) angezogen. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und bei einer  $OD_{600}$  von 0,3-0,4 geerntet. Die Maßstabsleiste entspricht 2  $\mu m$ .

### 3.2.7. Die Bedeutung der PTS-Komponenten bei der Induktor-abhängigen LicT-Lokalisation

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass die Lokalisation von LicT im engen Zusammenhang mit der Aktivität des Antiterminators steht. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Lokalisation von LicT nicht abhängig von der Lokalisation seiner Ziel-RNA ist. Nichtsdestotrotz ist unklar, welche Faktoren für die dynamische Lokalisation von LicT mitverantwortlich sind.

Die Aktivität von LicT wird durch verschiedene Phosphorylierungsereignisse durch die PTS-Komponenten reguliert. LicT wird durch die PTS-Komponenten BglP (EII) und durch HPr in der PRDI bzw. PRDII phosphoryliert (Tortosa *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung durch BglP hat einen negativen Einfluss auf die Aktivität von LicT in Abwesenheit eines Induktors. Die Phosphorylierung durch HPr stimuliert, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, die Aktivität von LicT.



**Abb. 3.13.: Lokalisation von LicT in  $\Delta bglP$  und  $\Delta ptsH$  Mutanten**

Fluoreszenzbilder von einer *licT-gfp* Fusion in *B. subtilis* GP1236  $\Delta bglP$  (A-B) und GP1257  $\Delta ptsH$  (C-D). Die Zellen wurden in CSE Medium mit 0,1% Salicin (A; C) und in CSE Medium mit 0,5% Sorbitol kultiviert. Die Proben wurden bei einer  $OD_{600}$  0,3-0,4 mikroskopiert. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Die Maßstabsleiste entspricht 2  $\mu$ m.

Um zu testen, ob die PTS-Komponenten einen Einfluss auf die Lokalisation von LicT-GFP haben, wurden Stämme mit einer *bglP*- (GP1236) und *ptsH*-Deletion (GP1257) konstruiert. Die Mutanten wurden in Minimal-Medium mit Salicin oder mit Sorbitol kultiviert. In einem Stamm ohne BglP (GP1236) ist LicT-GFP in beiden Medien an den äußeren Bereichen der Zelle akkumuliert (Abb. 3.13. A). Ohne BglP kann LicT nicht mehr in der PRDI phosphoryliert sein und ist deshalb immer aktiv in der Zelle. Wie schon zuvor beschrieben, ist auch hier aktives LicT in den äußeren Bereichen der Zelle lokalisiert. In der *ptsH*-Mutante (GP1257) kann LicT nicht mehr in der PRDI und PRDII phosphoryliert werden und ist immer inaktiv. In dieser Mutante ist LicT wie bei *bglP*-Mutante in beiden Medien an den äußeren Bereichen der Zelle lokalisiert (Vergleiche Abb. 3.13. B und D).

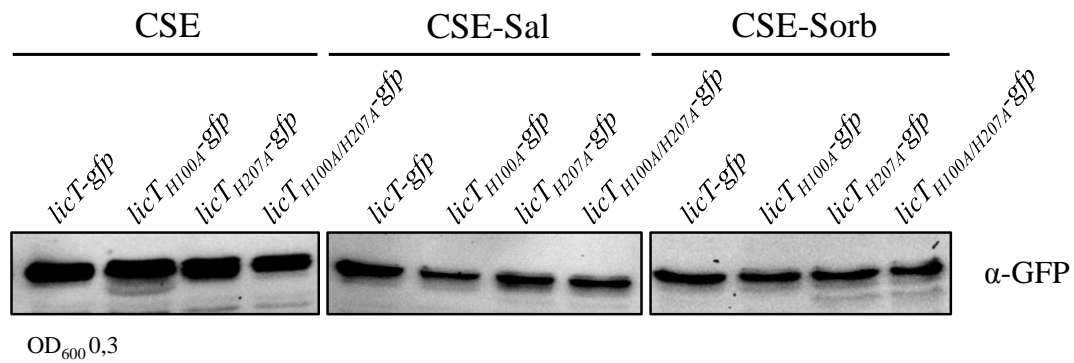
Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von LicT-GFP im Zusammenhang mit der Phosphorylierung der PRDI und PRDII steht. Kann eine der beiden Domänen nicht mehr durch BglP oder HPr phosphoryliert werden, dann ist LicT in den äußeren Bereichen der Zelle akkumuliert. Einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation von LicT und der Aktivität konnte nicht festgestellt werden.

### **3.2.8. Ist die Phosphorylierung von LicT verantwortlich für die Lokalisation in den äußeren Bereichen?**

Erst vor kurzem wurde bewiesen, dass Proteinphosphorylierung in Bakterien nicht nur Auswirkungen auf die Aktivität und Interaktion von Proteinen haben, sondern auch Einfluss auf die intrazelluläre Proteinlokalisierung besitzt (Jers *et al.*, 2010).

Um zu überprüfen, ob die konservierten Phosphorylierungsstellen aus der PRDI und PRDII an der dynamischen Lokalisation von LicT beteiligt sind, wurden verschiedene Mutanten in den Phosphorylierungsstellen von LicT hergestellt. Mit der Hilfe von Mutageneseprimern wurde das erste Histidin der PRDI und PRDII von LicT durch ein Alanin ausgetauscht und anschließend in das Integrationsplasmid pGP1270 (*gfp*) kloniert. In den erhaltenen Plasmiden sind die *licT* Mutanten mit dem Fluorophor *gfp* C-terminal fusioniert. Die konstruierten Plasmide erhielten die Bezeichnung pGP1306 (*licT<sub>H100A</sub>-gfp*), pGP1307 (*licT<sub>H207A</sub>-gfp*) und pGP1308 (*licT<sub>H100A/H207A</sub>-gfp*). Der Wildtyp wurde mit den Plasmiden transformiert und die Stämme GP1258 (*licT<sub>H100A</sub>-gfp*), GP1259 (*licT<sub>H207A</sub>-gfp*) und GP1260 (*licT<sub>H100A/H207A</sub>-gfp*) sind entstanden.

Um zu kontrollieren, ob die Mutationen einen Einfluss auf die Expression und Proteinstabilität haben, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Mutanten und der Wildtyp-Stamm (*licT-gfp*) wurden in Minimal-Medium ohne Zucker, mit Salicin oder mit Sorbitol kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 wurde jeweils die gleiche Zellmenge geerntet und bei 95°C aufgeköcht. Die Zellextrakte wurden auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen und geblottet. Für die Detektion der LicT-GFP-Mutanten stand der spezifische Antikörper  $\alpha$ -GFP zur Verfügung. Die Western Blots zeigen, dass die Proteinmengen der LicT Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied aufweisen (s. Abb. 3.14.). Die Proteinmenge von LicT bleibt in den unterschiedlichen Minimal-Medien konstant. Lediglich im Medium ohne Kohlenstoffe scheint die Expression von LicT leicht erhöht zu sein (s. Abb. 3.14.). Die Ergebnisse zeigten, dass die Mutationen in den Phosphorylierungsstellen von LicT keinen Einfluss auf die Expression oder Stabilität von LicT haben.



**Abb. 3.14.: Vergleich der Proteinestabilität von LicT, LicT<sub>H100A</sub>, LicT<sub>H207A</sub> und LicT<sub>H100A/H207A</sub> mit Hilfe der Western Blot Analyse**

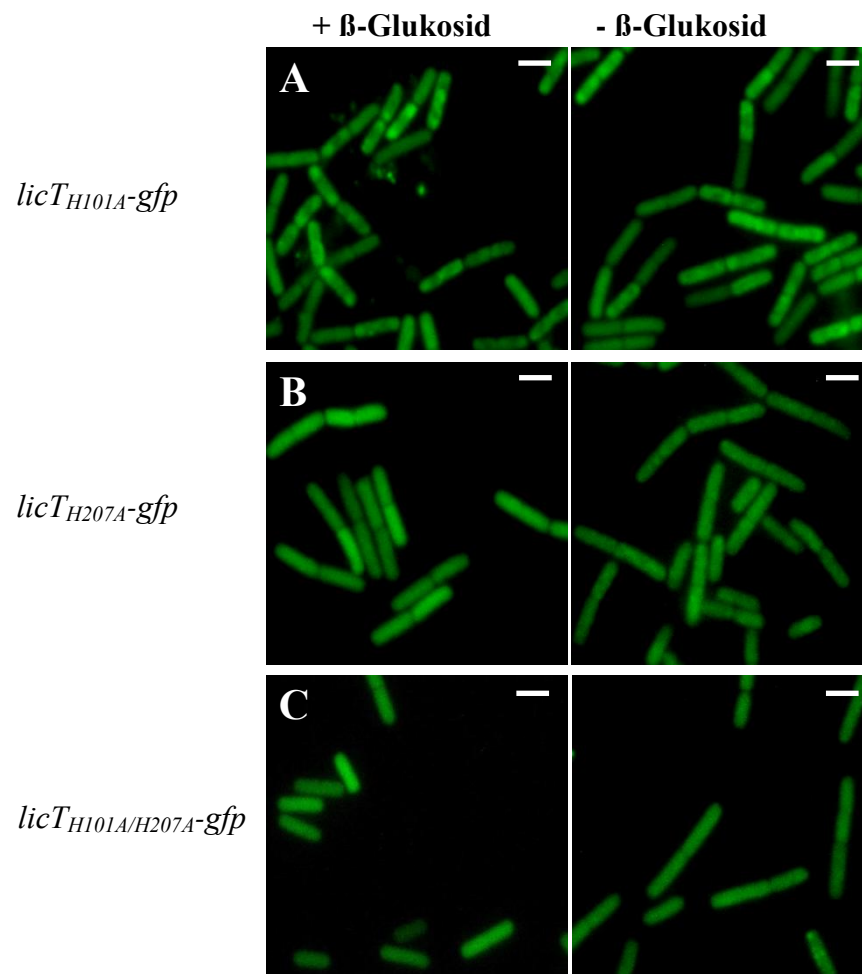
Die Stämme GP1258 (*licT<sub>H100A</sub>-gfp*), GP1259 (*licT<sub>H207A</sub>-gfp*) und GP1260 (*licT<sub>H100A/H207A</sub>-gfp*) wurden in CSE Minimal-Medium ohne Kohlenstoffe und in CSE-Medium mit Salicin (Sal) oder Sorbitol (Sorb) angezogen. Die gleichen Zellmengen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 geerntet. Der Aufgekochte Zellextrakt wurde jeweils auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blottern auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen GFP detektiert. Der Antikörper wurden aufgereinigt und 1:10000 verdünnt eingesetzt.

Um die Lokalisation der LicT-GFP Mutanten zu untersuchen, wurden die Stämme GP1258 (*licT<sub>H100A</sub>-gfp*), GP1259 (*licT<sub>H207A</sub>-gfp*) und GP1260 (*licT<sub>H100A/H207A</sub>-gfp*) in CSE Minimal-Medium mit Salicin oder Sorbitol angezogen. Für die *licT<sub>H100A</sub>* Mutante konnte in beiden Medien eine subpolare Lokalisation von LicT festgestellt werden (s. Abb. 3.15. A). Wie bei der *bglP* Mutante ist LicT<sub>H100A</sub> immer aktiv, da eine negative Regulation in der PRDI von nicht mehr möglich ist. Unabhängig vom Induktor Salicin ist LicT<sub>H100A</sub> in beiden Medien aktiv und an den Polen akkumuliert.

In der *licT<sub>H207A</sub>* Mutante ist LicT<sub>H207</sub> immer inaktiv, da die PRDII nicht mehr von HPr phosphoryliert und aktiviert werden kann. LicT<sub>H207</sub> kann aber noch durch BglP (EII<sup>Bgl</sup>) in Abwesenheit von Salicin phosphoryliert werden. Das inaktive LicT<sub>H207</sub> ist in beiden Medien gleichmäßig in der Zelle verteilt und ähnelt dem Lokalisationsmuster von inaktiven Wildtyp-LicT (s. Abb. 3.15. B). Auch LicT<sub>H100A/H207A</sub> ist immer inaktiv, kann aber im Vergleich LicT<sub>H207</sub> zu nicht mehr durch BglP in der PRDI phosphoryliert werden. Wie LicT<sub>H207A</sub> und inaktives Wildtyp LicT ist LicT<sub>H100A/H207A</sub> gleichmäßig über die Zelle verteilt (s. Abb. 3.15. C).

Die Ergebnisse mit den Mutanten in den Phosphorylierungsstellen von LicT deuten an, dass die Aktivität von LicT mitverantwortlich für die Lokalisation ist. Nur konstitutiv aktives LicT konnte in den polaren Regionen der Zelle identifiziert werden.

Zusammenfassend kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Aktivität von LicT entscheidend für die intrazelluläre Lokalisation ist, da die Lokalisationsmuster von inaktiven LicT<sub>H207A</sub> und LicT<sub>H100A/H207A</sub> sich mit dem inaktiven LicT aus einer *ptsH*-Mutante unterscheiden. Es hat den Anschein, dass spezielle Phosphorylierungen die Lokalisation von LicT kontrollieren oder ein weiterer unbekannter Faktor Einfluss auf die dynamische Lokalisation von LicT hat.



**Abb. 3.15.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von LicT-Mutanten mit Mutationen in den Phosphorylierungsstellen**

Die Stämme GP1258 (*licT<sub>H100A</sub>-gfp*), GP1259 (*licT<sub>H207A</sub>-gfp*) und GP1260 (*licT<sub>H100A/H207A</sub>-gfp*) wurden in CSE Minimal-Medium ohne Kohlenstoffe und in CSE-Medium mit dem  $\beta$ -Glukosid Salicin oder mit dem PTS unabhängigen Zucker Sorbitol angezogen. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 mikroskopiert. Die Maßstabsleiste entspricht 2  $\mu$ m.

#### 4. Diskussion

Um sich bestmöglich an die vorherrschenden Bedingungen ihrer Lebensräume anzupassen, sind *B. subtilis* und *E. coli* in der Lage, verschiedene Kohlenstoffquellen zu nutzen. Die bevorzugte Aufnahme und Verwertung von energiereichen Kohlenstoffquellen ist dabei essentiell und ermöglicht den Bakterien, sich gegen andere Organismen durchzusetzen. In Anwesenheit einer bevorzugten Kohlenstoffquelle werden die Gene für die Aufnahme und Verwertung von schlechteren Kohlenstoffquellen nicht exprimiert. Die Zellen sparen wichtige Energie im Überlebenskampf, wenn die Expression von nicht benötigten Genen und Operons eingestellt wird. Die Aufnahme und Verwertung von Kohlenstoffen wird über verschiedene Regulationsmechanismen reguliert. Ein entscheidender Mechanismus ist die Kohlenstoff-Katabolitenrepression (CCR), der die Expression der Gene des Zuckerstoffwechsels kontrolliert (Görke & Stülke, 2008).

In *E. coli* und *B. subtilis* werden mehrere katabole Operons, die für die Verwertung von PTS-Zuckern kodieren, durch Transkriptionsregulatoren mit zwei PTS-Regulationsdomänen (PRDs) kontrolliert (s. Kap. 1.9.). Bei diesen regulatorischen Proteinen handelt es sich um Transkriptionsaktivatoren oder um RNA-bindende Antiterminationsproteine. Die Aktivität der Proteine wird durch ihr spezifisches Substrat und durch den Mechanismus der CCR kontrolliert (s. Kap. 1.8.2.).

In dieser Arbeit wurden zwei Antiterminationsproteine aus der BglG/ SacY Familie untersucht. Das Antiterminationsprotein BglG aus *E. coli* reguliert die Genexpression für die Verwertung von  $\beta$ -Glukosiden und ist das Homolog zum Antiterminationsprotein LicT aus *B. subtilis*. In *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten konnte der Mechanismus für die Aktivierung von BglG geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die allgemeinen PTS-Komponenten HPr und EI sowie das HPr-Homolog FruB für die Aktivierung von BglG benötigt werden.

LicT aus *B. subtilis* wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auf seine subzelluläre Lokalisation in Anwesenheit und Abwesenheit seines spezifischen Substrates Salicin untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass LicT im Zytoplasma gleichmäßig verteilt ist und nach der Zugabe von Salicin akkumuliert LicT in den äußeren Bereichen der Zelle. Mutationen in den Phosphorylierungsstellen der PRDs haben gezeigt, dass der Phosphorylierungszustand von LicT einen Einfluss auf die räumliche Orientierung von LicT hat. Des Weiteren wurde die räumliche Verteilung der PTS-Komponenten in *B. subtilis*



untersucht. Dabei konnte kein Zusammenhang mit der dynamischen Lokalisation von LicT festgestellt werden.

#### 4.1. Phosphorylierungsabhängige Aktivierung des Antiterminators BglG

Das Ziel im diesen Teil der Arbeit war, den Aktivierungsmechanismus des Antiterminatorproteins BglG durch die allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr aufzuklären (s. Kap. 1.10.). BglG ist das bekannteste PRDs enthaltende Antiterminationsprotein und reguliert die  $\beta$ -Glukosidverwertung in *E. coli* (Amster-Choder *et al.*, 1989; Schnetz & Rak, 1988). Die Aktivität des Antiterminatorproteins wird negativ durch die spezifische Permease EII<sup>Bgl</sup> reguliert. Die negative Phosphorylierung von BglG konnte *in vivo* nachgewiesen werden (Amster-Choder *et al.*, 1989; Schnetz & Rak, 1990). Außerdem konnte auch für viele Antiterminatoren der BglG/ SacY-Familie gezeigt werden, dass die spezifischen Permeasen (EII) die Antiterminatorproteine in der PRDI phosphorylieren und dadurch inaktivieren (s. Kap. 1.8.). In *B. subtilis* wurde auch gezeigt, dass die aktiven Antiterminatorproteine (GlcT, LicT, SacT und SacY) in der PRDI nicht mehr phosphoryliert sind, aber noch zusätzlich an einem konservierten Histidin in der PRDII phosphoryliert sein müssen. Für LicT und SacT ist die Aktivierung in der PRDII durch die allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr essentiell für die Aktivität (Arnaud *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 1999). GlcT und SacY können auch durch HPr in der PRDII phosphoryliert werden, wobei die zusätzliche Phosphorylierung für die Aktivität nicht notwendig ist (Schmalisch *et al.*, 2003; Tortosa *et al.*, 2001). Für BglG aus *E. coli* konnte dieser Aktivierungsmechanismus noch nicht eindeutig geklärt werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass BglG durch die Phosphorylierung am Histidin-208 in der PRDII Domäne aktiviert wird. Es konnte durch *in vivo* Daten gezeigt werden, dass BglG durch EI und HPr bzw. durch das zu HPr homologe FruB phosphoryliert und aktiviert wird (Rothe *et al.*, 2012).

Bisher waren *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit aufgereinigten BglG nicht möglich gewesen, aber in dieser Arbeit konnte die Phosphorylierung von BglG zum ersten Mal *in vitro* nachgewiesen werden. Außerdem konnte interessanterweise festgestellt werden, dass eine BglG-H208A Mutante nicht mehr durch aufgereinigtes EI und HPr bzw. FruB phosphoryliert werden kann. Die Daten zeigten deutlich, dass die Aktivierung von BglG durch die PTS-Komponenten EI und HPr sehr ähnlich der Aktivierung der

Antiterminatorproteine aus der BglG/ SacY-Familie von Gram-positiven Bakterien ist (s. Kap. 1.8.2.).

Schon in früheren Arbeiten konnte *in vivo* gezeigt werden, dass BglG durch die PTS-Komponenten EI und HPr aktiviert wird und auch die Komplementation einer *AptsH*-Mutante mit dem HPr-Homolog FruB war schon bekannt (Görke & Rak, 1999; Görke, 2003; Reichenbach *et al.*, 2007). Nichtsdestotrotz wurde erst vor kurzem ein Mechanismus vorgeschlagen, wodurch BglG unabhängig von seiner Phosphorylierung aktiviert wird (Raveh *et al.*, 2009). Es wurde behauptet, dass lediglich die Interaktion zwischen BglG und den nicht phosphorylierten HPr und EI zur Aktivierung des BglG-Dimers führt (s. Abb. 1.3. B). Des Weiteren wurde in zellulären Proteinlokalisationsanalysen festgestellt, dass BglG in Anwesenheit seines Induktors mit HPr und EI an den Zellpolen interagiert und anschließend ins Zytoplasma entlassen wird. Es wurde angenommen, dass die Interaktion mit den PTS-Komponenten Konformationsänderungen verursacht und das BglG-Dimer stabilisiert (Lopian *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde die Theorie des phosphorylierungsunabhängigen Aktivierungsmodells dadurch unterstützt, dass in einem Stamm mit einer HPr-His15-Mutante immer noch BglG-Aktivität messbar war (Raveh *et al.*, 2009). In diesen Daten wurde nicht berücksichtigt, dass das FruB Protein eine zu HPr homologe Domäne besitzt und die Aktivierung von BglG übernehmen kann (Görke & Rak, 1999). In einem Stamm ohne FruB können eine unphosphorylierte HPr-His15-Mutante und EI BglG jedoch nicht mehr aktivieren. Zusätzlich demonstrieren die *in vitro* Daten dieser Arbeit, dass BglG von FruB phosphoryliert werden kann (s. Abb. 3.5.). Die Daten bestätigen, dass FruB in der Lage ist, HPr bei der Aktivierung von BglG zu komplementieren und erklären die in Raveh *et al.* (2009) falsch interpretierten BglG-Aktivitäten in einer HPr-His15-Mutante. Außerdem kann FruB HPr auch beim BglF abhängigen  $\beta$ -Glukosidtransport ersetzen. Auf MacConkey-Medium mit  $\beta$ -Glukosiden wurde gezeigt, dass ein *ptsH*-H15A Stamm durch FruB komplementiert werden kann. Ohne FruB konnte dieser Stamm keine  $\beta$ -Glukoside verwerten und war nicht in der Lage, auf Minimalmedium zu überleben (Rothe *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass FruB EII<sup>Bgl</sup> (BglF) phosphoryliert und HPr vollständig im PTS ersetzen kann.

Ein weiterer unterstützender Hinweis für das phosphorylierungsunabhängige Aktivierungsmodell von Raveh *et al.* (2009) war die schwache Aktivierung von BglG in einem Stamm ohne EI und HPr, der lediglich mit plasmidständigen EI komplementiert wurde. Im Gegensatz dazu konnten Görke & Rak (1999) sowie Rothe *et al.* (2012) *in vivo*

nachweisen, dass BglG in einer mit EI komplementierten  $\Delta ptsHI$ -Mutante immer noch aktiv ist, da FruB die  $\Delta ptsH$ -Mutante komplementieren kann.

Des Weiteren wurde von Raveh *et al.* (2009) behauptet, dass die von Görke & Rak (1999) beobachtete *in vivo* Phosphorylierung von BglG, in einem  $\Delta bglF$ -Stamm nicht von HPr stammen kann. Stattdessen wurde angenommen, dass BglG von einem weiteren EII-Komplex (TreB) phosphoryliert wird (Raveh *et al.*, 2009). Der Trehalose Transporter TreB ist von seiner Struktur und seiner Funktion sehr ähnlich zu BglF, aber im Gegensatz zu BglF ist die Phosphorylierung von TreB abhängig von der zytoplasmatischen EIIA<sup>Glc</sup>-Domäne (Boos *et al.*, 1990). Jetzt konnte die Phosphorylierung von BglG durch TreB oder andere EII-Komplexe widerlegt werden. In *in vivo* Phosphorylierungsexperimenten war bei der Aktivierung von BglG durch EI und FruB kein EIIA<sup>Glc</sup> anwesend. Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die EIIA<sup>Glc</sup> benötigten EII-Komplexe (PtsG, MalX oder MurP) sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Regulation von BglG haben (Rothe *et al.*, 2012).

In bisherigen *in vitro* Experimenten wurde das BglG-Protein mit der großen MBP-Domäne (Maltose-Binde-Protein; 43,4 kDa) fusioniert, da natives BglG nach der Überexpression nicht löslich war. In diesen Experimenten konnte sowohl mit den allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr von *E. coli* als auch mit den allgemeinen PTS-Komponenten von *B. subtilis* keine Phosphorylierung des MBP-BglG-Fusionsprotein festgestellt werden (Chen *et al.*, 1997; Chen & Amster-Choder, 1998; Chen *et al.*, 2000). Bei diesen Experimenten kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die große MBP-Domäne die Phosphorylierung von BglG beeinflusst. In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, BglG mit Hilfe eines acht Aminosäuren großen Strep-Tags aufzureinigen. In  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP abhängigen Phosphorylierungsassays konnte gezeigt werden, dass BglG auch *in vitro* von EI und HPr oder EI und FruB phosphoryliert wird (s. Abb. 3.4. und Abb. 3.5.).

Zusammenfassend ist die spekulierte phosphorylierungsunabhängige Regulation von BglG eher unwahrscheinlich, da die Phosphorylierung von BglG und BglF von FruB komplementiert werden konnte. Außerdem konnte *in vitro* klar gezeigt werden, dass BglG über den gleichen Reaktionsweg (PEP→EI→HPr (FruB)→BglG) wie die Mitglieder aus der BglG/ SacY-Familie von den Gram-positiven Bakterien phosphoryliert wird.

Unabhängig vom spekulierten Aktivierungsmodell von BglG sind die Daten von Raveh *et al.* (2009) mit den *in vitro* Daten dieser Arbeit und den *in vivo* Daten von Rothe *et al.* (2012) meistens in einen Zusammenhang zu bringen. Es wurde lediglich in den Experimenten das HPr-Homolog FruB nicht berücksichtigt. Weitere HPr-Homologe, wie z. B. das NPR des PTS<sup>Ntr</sup>, sind sehr wahrscheinlich nicht zusätzlich an der Aktivierung von BglG beteiligt. In

*in vivo* Experimente konnten zeigen, dass BglG in einem Stamm ohne HPr und FruB nicht mehr aktiviert werden kann (Rothe *et al.*, 2012).

#### 4.1.1. Welche Phosphorylierungsstellen regulieren BglG?

Das Antiterminatorprotein LicT aus *B. subtilis* ist das zu BglG ähnlichste Homolog aus der BglG/ SacY-Familie. In genetischen und biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass LicT in der PRDI am konservierten His100 und/ oder His159 durch BglP negativ reguliert wird (s. Kap. 1.9.; Tortosa *et al.*, 2001). In Abwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden phosphoryliert BglP LicT in der PRDI und inaktiviert LicT. Die konservierten Histidine (His-207 und/ oder His269) in der PRDII von LicT werden durch HPr phosphoryliert und sind entscheidend für die Aktivierung von LicT (Lindner *et al.*, 1999; Tortosa *et al.*, 2001). Für die Aktivierung von BglG wurde ein ähnliches Modell vorgeschlagen, aber es fehlt dort die zweite konservierte Phosphorylierungsstelle in der PRDII. Es wurde herausgefunden, dass für die negative Regulation das konservierte Histidin His101, mit der Unterstützung vom His160, verantwortlich ist (Görke, 2003). Die Phosphorylierungsstellen von BglG sind identisch mit den Phosphorylierungsstellen von LicT. Die positive Regulation von BglG findet durch die Phosphorylierung am His208 in der PRDII statt. Die BglG-H208A Mutante konnte *in vivo* und *in vitro* nicht mehr durch EI und HPr bzw. FruB phosphoryliert werden (s. Abb. 3.7.; Görke, 2003). Die bisherigen Daten konnten mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das His208 essentiell für die BglG Phosphorylierung durch HPr bzw. FruB ist (s. Abb. 3.7.).

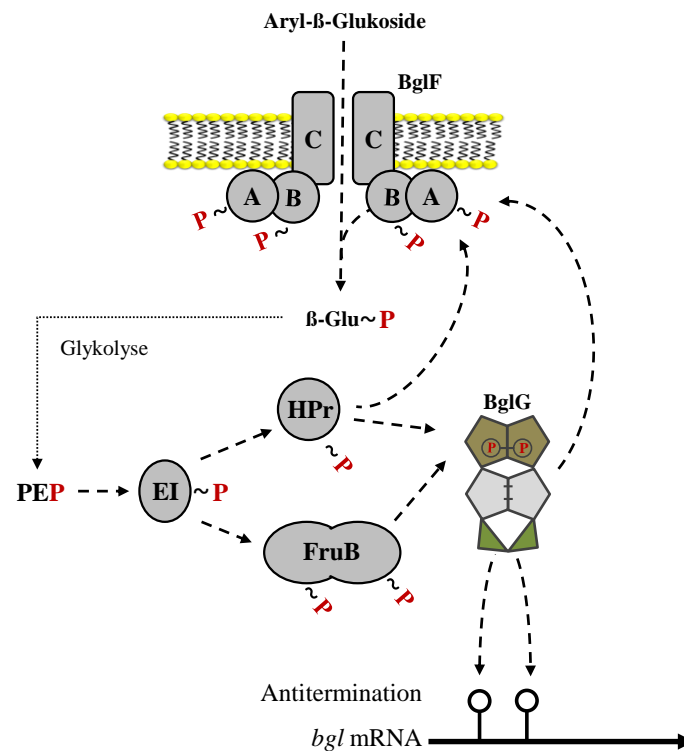
Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die konservierten Histidine von LicT, BglG und der gesamten BglG/ SacY-Familie sehr ähnliche Funktionen haben. Die PRDI wird vom jeweiligen EII am ersten Histidin phosphoryliert und das zweite Histidin unterstützt diese Reaktion. Die aktivierende Phosphorylierung wird von HPr (bzw. FruB) an den Histidinen in der PRDII durchgeführt.

#### 4.1.2. Das Regulationsmodell von BglG

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und durch bereits publizierte Daten konnte folgendes Regulationsmodell für BglG erstellt werden (Görke & Rak, 1999; Görke, 2003; Rothe *et al.*, 2012).

Sind keine  $\beta$ -Glukoside vorhanden, dann befindet sich BglG an der Membran (Lopian *et al.*, 2003). Dort interagiert BglG mit der spezifischen  $\beta$ -Glukosid-Permease BglF und wird durch die Phosphorylierung in der PRDI-Domäne am His101 inaktiviert. Die Zugabe von  $\beta$ -Glukosiden bewirkt, dass BglG nicht mehr an der Membran lokalisiert ist und nicht mehr phosphoryliert wird (Amster-Choder & Wright, 1990; Chen *et al.*, 1997; Görke, 2003; Schnetz & Rak, 1990). Die Aufnahme von  $\beta$ -Glukosiden führt bei BglF zu Konformationsänderungen und bewirkt die Entlassung von BglG ins Zytoplasma. BglF überträgt jetzt die vom PTS bereitgestellten Phosphatgruppen auf die aufgenommenen  $\beta$ -Glukoside und nicht mehr auf BglG. BglG ist in der Lage, ohne die Phosphorylierung in der PRDI ein inaktives Dimer zu bilden. Durch die Phosphorylierung in der PRDII (His-208) wird BglG von HPr bzw. FruB aktiviert und das aktivierte BglG kann jetzt an der RAT-Sequenz in der 5'-UTR des *bgl*-Operons binden. Durch die Interaktion mit der RNA wird die Ausbildung einer Antiterminatorstruktur begünstigt und die Transkription der Gene für die  $\beta$ -Glukosidverwertung ermöglicht. Sind keine  $\beta$ -Glukoside mehr vorhanden, dann wird BglG wieder an die Membran rekrutiert und durch BglF inaktiviert.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Aktivierung des Antiterminatorproteins BglG von *E. coli* identisch zu der schon gut beschriebenen Aktivierung von den Antiterminatorproteinen aus der BglG/ SacY-Familie der Gram-positiven Bakterien ist. Diese Schlussfolgerung wird dadurch unterstützt, dass HPr und EI von *B. subtilis* auch in der Lage sind, BglG zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Abb. 3.6. und Reichenbach *et al.*, 2007). Die Mechanismen zur Aktivierung der Antiterminatorproteine der BglG/ SacY-Familie von *E. coli* und den Gram-positiven Bakterien sind sehr ähnlich und es ist anzunehmen, dass die Enterobakterien im Laufe der Evolution das *bgl*-Operon durch horizontalen Gentransfer von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt erhalten haben (Sankar *et al.*, 2009).



**Abb. 4.1.: Das Aktivierungsmodell von BglG**

Inaktives BglG ist in Abwesenheit von β-Glukosiden zusammen mit dem EII<sup>Bgl</sup>-Komplex (BglF) an der Zyttoplasmamembran lokalisiert und wird durch die EIIB-Domäne in der PRDI phosphoryliert. In Anwesenheit von β-Glukosiden wird der PTS-Zucker von der Permease BglF ins Zyttoplasmamembran aufgenommen und phosphoryliert. Die benötigten Phosphatgruppen erhält BglF vom Phosphoenolpyruvat (PEP) und werden über das allgemeine PTS (EI und HPr) auf BglF übertragen. Das Antiterminationsprotein BglG wird bei der Aufnahme von β-Glukosiden nicht mehr durch BglF phosphoryliert und die Phosphatgruppen (~P) aus der PRDI werden zurück zum EII<sup>Bgl</sup>-Komplex rekrutiert. Die Aufnahme des PTS-Zuckers führt zu Konformationsänderungen in BglF und BglG wird dadurch ins Zytoplasma entlassen. BglG bildet ohne die Phosphorylierung in der PRDI ein Dimer und wird von den PTS-Komponenten EI und HPr bzw. FruB in der PRDII phosphoryliert. Die Phosphorylierung in der PRDII führt zu Konformationsänderungen im BglG-Dimer und aktiviert die RBD-Domäne. Das aktivierte BglG bindet an die RAT-Sequenz und unterstützt die Ausbildung einer Antiterminatorstruktur. Die Transkription der von BglG regulierten Gene kann jetzt fortgesetzt werden (nach Rothe *et al.*, 2012).

## 4.2. Lokalisation der allgemeinen PTS Komponenten und des Antiterminatorproteins

### LicT in *B. subtilis*

Das Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit war, herauszufinden, am welchen Lokalisationsort in der Zelle sich die einzelnen PTS-Komponenten und das Antiterminationsprotein LicT in Anwesenheit und Abwesenheit von β-Glukosiden befinden. Wie schon in Kapitel 1.7. und 1.8. beschrieben, wird der Transkriptionsfaktor LicT durch das PTS reguliert. In Abwesenheit

von  $\beta$ -Glukosiden oder bei der Verfügbarkeit eines energiereicheren PTS-Zuckers ist LicT inaktiv. Im inaktiven Zustand wird LicT durch die  $\beta$ -Glukosid spezifische Permease BglP in der PRDI phosphoryliert. Sind  $\beta$ -Glukoside verfügbar, dann wird LicT nicht mehr in der PRDI phosphoryliert und ist in der Lage, ein Dimer zu bilden. Durch die HPr-Phosphorylierung in der PRDII wird LicT aktiviert und kann die Transkription der  $\beta$ -Glukosid verwertenden Gene positiv regulieren.

In *E. coli* konnte schon in mehreren Studien die Lokalisation von einzelnen PTS-Komponenten untersucht werden (Lopian *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2004). EI konnte in beiden Polen der Zelle beobachtet werden, in der Zelle gleichmäßig verteilt oder als in mehreren über die Zelle verteilten Punkten (Lopian *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2004). Die verschiedenen Lokalisationsmuster von EI waren abhängig von der Kohlenstoffquelle, Zelldichte, Wachstumsphase und auch von der Zusammensetzung des Mediums. In den Ergebnissen von Lopian *et al.* (2010) wurde fluoreszenzmikroskopisch für das zu LicT homologe BglG von *E. coli* gezeigt, dass BglG im inaktiven Zustand an die Membran rekrutiert wird, in Anwesenheit eines Induktors in den Zellpolen lokalisiert ist und später ins Zytoplasma entlassen wird. Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte keine eindeutige Lokalisation der allgemeinen PTS-Komponenten beschrieben werden.

Für die allgemeinen PTS-Komponenten (EI und HPr), die spezifische  $\beta$ -Glukosid-Permease (BglP) und das Antiterminatorprotein LicT von *B. subtilis* wurden die Lokalisationsmuster noch nicht fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

#### **4.2.1. Die subzelluläre Organisation des PTS von *B. subtilis***

Das PEP-abhängige PTS kontrolliert in Bakterien die bevorzugte Verwendung von Kohlenstoffquellen. Es ist an der Aufnahme von einer Vielzahl an energetisch bevorzugten PTS-Zuckern beteiligt und funktioniert wie ein Sensor für energiereiche PTS-Zucker. Gleichzeitig reguliert das PTS die Anpassung des Metabolismus und die Bewegung zu den Kohlenstoffquellen (Chemotaxis) (Deutscher *et al.*, 2006). Das PTS kommuniziert mit verschiedenen globalen und spezialisierten Signalsystemen, aber die Strategie und Koordination dieser Mechanismen ist nicht vollständig bekannt.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Lokalisation der allgemeinen PTS-Komponente Enzym I und der PTS-Permease BglP in *B. subtilis* nachgewiesen werden. BglP konnte ohne Induktor nicht nachgewiesen werden und wurde erst in Anwesenheit des Induktors Salicin in der Zelle nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen war BglP an der Membran lokalisiert.

Diese Beobachtung entsprach den Erwartungen, da bekannt ist, dass es sich bei BglP um eine  $\beta$ -Glukoside aufnehmende Permease handelt. Die Daten bestätigen, dass die Expression von BglP abhängig vom Induktor und dem aktiven Transkriptionsregulator LicT ist (Le Coq *et al.*, 1995). LicT wird in Anwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden aktiviert und kontrolliert die Expression des *bgPHI*-Operons (Lindner *et al.*, 1999).

Enzym I zeigte eine starke Fluoreszenz unter allen getesteten Bedingungen und war gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Die Ergebnisse bestätigen die schon etablierten Daten, dass das *ptsHI*-Operon konstitutiv exprimiert wird (Stülke *et al.* 1997). Ob HPr ähnlich wie das EI gleichmäßig in der Zelle lokalisiert ist, muss noch getestet werden. Die allgemeinen PTS-Komponenten sind an mehreren regulatorischen Prozessen beteiligt und werden sehr wahrscheinlich immer wieder an verschiedenen Orten in der Zelle benötigt. Außerdem sind die PTS-Komponenten nicht nur maßgeblich an der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus beteiligt, sondern sie beeinflussen indirekt auch die Chemotaxis (Deutscher *et al.*, 2006; Kristich *et al.*, 2003). Anhand der Tatsache, dass EI (und sehr wahrscheinlich HPr) unter verschiedenen Bedingungen gleichmäßig in der Zelle verteilt ist, wird die Theorie bestätigt, dass die PTS-Komponenten überall in der Zelle zur Verfügung stehen. Die Zelle ist so in der Lage, auf sich verändernde Bedingungen schnell zu reagieren.

Die Proteine des PTS von *B. subtilis* sind homolog mit dem PTS von *E. coli* und beide Systeme sind an der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus beteiligt. Nichtsdestotrotz sind die zuvor beschriebenen und vermuteten Lokalisationsmuster vom EI und HPr aus *B. subtilis* nicht immer identisch mit den beschriebenen Lokalisationsorten der allgemeinen PTS-Komponenten aus *E. coli* (Lopian *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2004). Zum einen wurde für EI aus *E. coli* gezeigt, dass es in der exponentiellen Phase in den Zellen gleichmäßig verteilt vorkommt. Jedoch befindet sich EI in der stationären Phase bzw. bei hohen Zelldichten an den Zellpolen oder ist in kleinen Spots über die Zelle verteilt. Nach der Zugabe von frischen Kohlenstoffquellen war EI wieder über die Zelle verteilt (Patel *et al.*, 2004). Es hat den Anschein, dass der Phosphattransfer im PTS, ausgelöst von neuen Kohlenstoffquellen, die gleichmäßige Verteilung der allgemeinen PTS-Komponenten ermöglicht. Ähnliche Lokalisationsmuster von EI und HPr aus *E. coli* wurden auch in weiteren Lokalisationsstudien beobachtet. In Anwesenheit von Glukose konnten in der exponentiellen Phase EI und HPr gleichmäßig im Zytoplasma beobachtet werden (Neumann *et al.*, 2012). Die Ergebnisse aus den Studien von Neumann *et al.* (2012) und Patel *et al.* (2004) sind identisch mit den Lokalisationsmustern von EI aus *B. subtilis* und bestätigen dass die PTS-Komponenten gleichmäßig im Zytoplasma verteilt sind. Ob sich das



Lokalisationsmuster von EI von *B. subtilis* bei höheren Zelldichten bzw. in der stationären Phase ebenfalls verändert, muss noch überprüft werden.

Interessanterweise wurde in den Ergebnissen von Lopian *et al.* (2010) gezeigt, dass die allgemeinen PTS-Komponenten aus *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen an der Zellmembran, an den Zellpolen oder im Zytoplasma lokalisiert sind. Die von Lopian *et al.* (2010) beobachtete dynamische Lokalisation der allgemeinen PTS-Komponenten von *E. coli* widerspricht den zuvor beschriebenen Daten von Neumann *et al.* (2012) und Patel *et al.* (2004). In der Studie von Lopian *et al.* (2010) wurde vermutet, dass die Lokalisationsunterschiede auf die Überexpression von EI zurückzuführen ist. In *B. subtilis* befanden sich die PTS-Komponenten unter ihrem natürlichen Promotor und dadurch kann ausgeschlossen werden, dass fehlerhafte Beobachtungen gemacht wurden. Des Weiteren konnte für die PTS-Komponente EI von *B. subtilis* keine Ko-Lokalisation mit der spezifischen  $\beta$ -Glukosid-Permease und mit dem Transkriptionsregulator (LicT) des *bglPH*-Operons beobachtet werden.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die allgemeinen PTS-Komponenten von *B. subtilis*, unabhängig von den Wachstumsbedingungen, gleichmäßig in der Zelle verteilt sind, wobei die Lokalisation der PTS-Komponenten von *E. coli* nicht eindeutig geklärt ist. Ob die bisher bekannten Lokalisationsmuster von EI und HPr aus *E. coli* und *B. subtilis* identisch sind, muss in weiteren Experimenten überprüft werden. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass in den unterschiedlichen Experimenten verschiedene Fluorophore und Expressionssysteme verwendet wurden. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass sich die Lokalisation der PTS-Komponenten auch in *B. subtilis* verändern kann. In dieser Arbeit wurde lediglich die Lokalisation der PTS-Komponenten in der exponentiellen Phase in An- und Abwesenheit von  $\beta$ -Glukosiden untersucht. Weitere Lokalisationsstudien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und bei unterschiedlichen Zelldichten sollten die räumliche Orientierung der allgemeinen PTS-Komponenten in *B. subtilis* aufklären.

#### **4.2.2. Die dynamische Lokalisation von LicT**

Bakterien besitzen eine komplizierte, dynamische und dreidimensionale Organisation in der Zelle. Diese Organisation ist eine essentielle Fähigkeit für die Zellen, um sich zu teilen, zu wachsen, um auf Umwelteinflüsse zu reagieren und um sich in spezialisierte Zellen umzuwandeln (z.B. Sporulation). Proteine haben in dieser Organisation eine wichtige Rolle und sind nicht nur frei diffundierende Makromoleküle. Außerdem sind Proteine

strukturenbende Elemente und folgen häufig einem bestimmten Lokalisationsmuster in der Zelle (s. Kap. 1.10.). Immer häufiger werden dabei dynamische Proteinlokalisationsprozesse in der Zelle beobachtet, um sich an wechselnde Bedingungen anzupassen, damit Proteine in definierten Bereichen der Zelle, mit verschiedenen Mechanismen bzw. Proteinen wechselwirken. Eine Vielzahl von dynamischen Prozessen konnten in letzter Zeit nachgewiesen werden und wurde durch die sich weiterentwickelnde Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

In dieser Arbeit konnte die dynamische Lokalisation des Transkriptionsfaktors LicT von *B. subtilis* nachgewiesen werden. Aktives LicT ist in den äußeren Bereichen der Zelle akkumuliert und im inaktiven Zustand ist LicT gleichmäßig über die Zelle verteilt (s. Abb. 3.9.). Die Lokalisation und Aktivität ist abhängig von der Verfügbarkeit von  $\beta$ -Glukosiden und der damit verbundenen Phosphorylierung in den PRDs (s. Kap. 3.2.8.). Sind  $\beta$ -Glukoside verfügbar, dann kann das aktive LicT an die RAT in der 5'-UTR binden und die Expression der  $\beta$ -Glukosid verwertenden Gene positiv regulieren.

Neben LicT sind bereits mehrere Transkriptionsfaktoren in den Bakterien bekannt, die abhängig von spezifischem Substrat oder von ihrem Phosphorylierungszustand sich neu in der Zelle orientieren. Gut untersuchte Beispiele sind die Transkriptionsfaktoren BglG, Mlc und MalT (s. Kap. 1.10.). Diese Transkriptionsfaktoren binden abhängig von der Verfügbarkeit von Substrat an ihre spezifischen Permeasen und regulieren die Transkription positiv oder negativ. Besonders interessant ist das zu LicT homologe Antiterminatorprotein BglG. Beide Antiterminationsproteine regulieren die Verwertung von  $\beta$ -Glukosiden und werden durch die spezifischen Komponenten des PTS kontrolliert. Diese beiden Regulationsmechanismen sind sich sehr ähnlich und es konnte sogar in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die allgemeinen PTS-Komponenten von *B. subtilis* in der Lage sind, BglG von *E. coli* zu aktivieren (s. Abb. 3.6.). Nichtsdestotrotz haben die Ergebnisse gezeigt, dass sich die Lokalisation der beiden Antiterminatoren unterscheidet. BglG wird durch die Phosphorylierung in der PRDI negativ von  $EII^{Bgl}$  reguliert und befindet sich durch die Interaktion mit dem  $EII^{Bgl}$ -Komplex an der Membran. LicT hingegen ist im inaktiven Zustand gleichmäßig über die Zelle verteilt und akkumuliert im aktiven Zustand in den äußeren Bereichen der Zelle. Abgesehen von den Lokalisationsmustern ist die Regulation und Funktion der Antiterminationsproteine LicT und BglG identisch. Außerdem konnten Evolutionsuntersuchungen zeigen, dass die Gram-negativen Enterobakterien im Laufe der Evolution das *bgl*-Operon von den Gram-positiven Bakterien mit niedrigen GC-Gehalt erhalten haben (Sankar *et al.*, 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die beiden Regulationssysteme von BglG und LicT sich im Laufe der Evolution noch nicht weit voneinander entfernt haben. Die unterschiedlichen Lokalisationsmuster von LicT und BglG können sich im Laufe der Evolution entwickelt haben. Unterschiedliche Faktoren (z. B. Proteininteraktionen, Proteinmodifikation und Zellbeschaffenheit) in *B. subtilis* und *E. coli* könnten die dynamische Lokalisation der beiden Antiterminationsproteine beeinflussen.

Offen bleibt noch die Frage, warum aktives LicT in den äußeren Bereichen der Zelle akkumuliert. Es ist bekannt, dass in prokaryotischen Zellen die Transkription und Translation miteinander „gekoppelt“ sind. Die Transkription wird begleitet von der gleichzeitig stattfindenden Translation der Proteine. Durch diese Verbindung zwischen Transkription und Translation müssen die RNA-bindenden Antiterminationsproteine sehr schnell an die RNA binden, um die Blockade der Transkription zu verhindern und um die sich anschließende Translation zu ermöglichen. Interessanterweise konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass die Ribosomen in *B. subtilis* auch außerhalb des Nukleoid, in der Nähe der Pole und der Zellperipherie lokalisiert sind (Azam *et al.*, 2000; Lehnik-Habrink *et al.*, unpublizierte Daten; Lewis *et al.*, 2000). Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass LicT in Anwesenheit eines Induktors sehr schnell in den Zellpolen akkumuliert (s. Abb. 3.10.). Es ist anzunehmen, dass aktives LicT mit den Ribosomen ko-lokalisiert ist um die Expression der  $\beta$ -Glukosid verwertenden Gene zu ermöglichen.

Doch wieso findet die Transkription und Translation außerhalb des Nukleoid statt und wie können Transkriptionsregulatoren, die an der Membran lokalisiert sind (MalT, BglG und Mlc) so schnell die Transkription beeinflussen? Wie schon für LicT wird vermutet, dass die Mechanismen der Translation und Transkription nicht im Nukleoid stattfinden. Am Beispiel von BglG konnte gezeigt werden, dass aktives in der Membran verankertes BglG noch in der Lage ist, die Transkription des *bgl*-Operons zu regulieren (Görke & Rak, 2001). Es wird spekuliert, dass die chromosomale DNA Ausstülpungen bildet und so dem Transkriptionsmechanismus ermöglicht, die Gene direkt an ihrem Bestimmungsort zu transkribieren und translatieren. Die dadurch entstandene räumliche Nähe von Transkriptionsregulator und RNA könnte die schnellen dynamischen Prozesse in der Zelle erklären. Diese Theorie ist auch gut in den Zusammenhang zu bringen mit der dynamischen Lokalisation von LicT. Doch wie die einzelnen Mechanismen untereinander interagieren und wie die Prozesse verknüpft sind, muss noch geklärt werden.

Aber nicht nur die Bindung und Aktivierung durch Transportproteine verursacht dynamische Lokalisationen von Proteinen. Erst vor kurzen konnte für den *lac*-Repressor aus *E. coli*

gezeigt werden, dass Proteine auch unabhängig von Effektoren oder Modifikationen sich dynamisch in der Zelle bewegen. LacI rutscht auf der chromosomalen DNA in seine Operatoren, damit er die Regulationsorte schneller findet (Hammar *et al.*, 2012). LacI findet dabei nicht immer direkt die Operatorstellen, sondern rutscht häufig an den Bindestellen vorbei. Die Bewegung, entlang der DNA, ist hochdynamisch und kann durch verschiedene Faktoren (z. B. DNA-Bindeproteine) beeinflusst werden.

Des Weiteren gibt es in Bakterien mehrere von Zellpol zu Zellpol oszillierende Systeme. Die Min Proteine, die im Zellzyklus den Ort der Zellteilung bestimmen, und das Par-System, das die Auftrennung der DNA vor der Zellteilung kontrolliert, wurden schon intensiv untersucht (Gerdes *et al.*, 2010; Loose *et al.*, 2011).

Auch für die Glukosyltransferase UgtP, einen metabolischer Sensor von *B. subtilis*, konnte kürzlich die dynamische Lokalisation in Abhängigkeit von UDP-Glukose nachgewiesen werden (Chien *et al.*, 2012). UDP-Glukose ist ein Sensor für Nährstoffverfügbarkeit. In Vollmedium ist UgtP in geringen Mengen gleichmäßig im Zytoplasma verteilt und konnte gleichzeitig auch am entstehenden Septum beobachtet werden. UgtP bindet an FtsZ und blockiert die Zellteilung in nährstoffreichen Medien. In nährstoffarmem Medium, mit wenig UDP-Glukose, ist UgtP in kleinen Spots in der Zelle verteilt. Abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit lokalisiert UgtP mit FtsZ oder mit sich selbst in kleinen Punkten. Dieser Mechanismus sorgt dafür, dass die Zellgröße von *B. subtilis* genau mit der Wachstumsrate und Nährstoffverfügbarkeit koordiniert wird (Chien *et al.*, 2012).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass dynamische Lokalisationsprozesse wichtig für die Regulation und Organisation in der Bakterienzelle sind. Der Transkriptionsregulator LicT ist ein gutes Beispiel für die dynamische Lokalisation von Proteinen in *B. subtilis* und wird in seinem aktiven Zustand an seinen Wirkungsort rekrutiert. Offen bleibt noch, wodurch LicT in den Zellpolen akkumuliert wird. Da beim Wechsel von aktivem zu inaktivem LicT unterschiedliche Phosphorylierungsstellen phosphoryliert werden, ist anzunehmen, dass der Phosphorylierungszustand an der dynamischen Lokalisation von LicT beteiligt ist. Diese Behauptung wird in Kapitel 4.2.3. diskutiert.

#### **4.2.3. Phosphorylierungsabhängige Lokalisation von LicT**

Lange wurde durch Fluoreszenzmikroskopie lediglich untersucht, wo einzelne Proteine unter verschiedenen Umwelteinflüssen lokalisiert sind, aber welche Faktoren an der dynamischen Proteinlokalisierung in der Zelle beteiligt sind, bleibt häufig ungeklärt.

Die Daten dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Aktivität und der Phosphorylierungszustand die Lokalisation von LicT beeinflusst. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierungen an den konservierten Phosphorylierungsstellen in den PRDs den Lokalisationsort von LicT bestimmen. Jedoch konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die Aktivität von LicT essentiell für die intrazelluläre Lokalisation ist. Die Lokalisationsmuster von inaktiven LicT<sub>H207A</sub> und LicT<sub>H100A/H207A</sub> unterscheiden sich vom inaktiven LicT aus einer *ptsH*-Mutante. Ohne HPr in der Zelle, kann LicT, wie bei einer *licT*<sub>H207A</sub>- und *licT*<sub>H100A/H207A</sub>-Mutante nicht mehr aktiviert werden. Anhand der unterschiedlichen Lokalisationsmuster konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung bzw. die Phosphorylierung am His207 nicht verantwortlich für die dynamische Lokalisation in den Bereichen der Zellpole ist. Stattdessen hat es den Anschein, dass spezielle Phosphorylierungen bzw. der Phosphorylierungszustand, unabhängig von der Aktivität, die Lokalisation von LicT kontrolliert. Des Weiteren ist es möglich, dass unbekannte Faktoren die dynamische Lokalisation von LicT beeinflussen und/ oder regulieren.

Dass Proteinphosphorylierungen nicht nur die Aktivität von Proteinen beeinflussen, sondern auch Proteinlokalisierung konnte in der Studie von Jers *et al.* (2010) nachgewiesen werden. Anhand mehrerer Beispiele konnte in *B. subtilis* gezeigt werden, dass die Proteinphosphorylierung durch die Tyrosinkinase PtkA die Lokalisationsorte der untersuchten Proteine beeinflusst. Ein Beispiel ist die Enolase von *B. subtilis*. Die Enolase ist während der exponentiellen Wachstumsphase gleichmäßig über die Zelle verteilt, wobei in der stationären Phase die Enolase an den Zellpolen lokalisiert ist (Jers *et al.*, 2010). In Zellen ohne PtkA ist die Enolase entweder gleichmäßig verteilt oder bildet unabhängig von der Wachstumsphase anormale Ansammlungen in den Zellpolen. Auch in Eukaryonten wurden schon mehrere Proteinlokalisationen beschrieben, die abhängig von Tyrosin-Phosphorylierungen sind (Madeo *et al.*, 1998).

Natürlich stellt sich die Frage warum Proteine unterschiedliche Lokalisationsorte in der Zelle haben. Für LicT ist zu erwarten, dass der Transkriptionsfaktor durch Proteinmodifikation in dem Teil der Zelle lokalisiert ist, wo die Transkription der zu regulierenden Gene stattfindet. Eine schnelle Anpassung durch sich verändernde Umweltbedingungen wird so ermöglicht. Eine gute Antwort auf die zuvor gestellte Frage könnte hier die Enolase liefern. Die Enolase von *B. subtilis* hat verschiedene Funktionen. Sie ist an der Glykolyse, DNA-Replikation und an der RNA-Prozessierung beteiligt (Commichau *et al.*, 2009; Jannièrè *et al.*, 2007). Ähnlich wie bei der Enolase könnten Proteine durch sich ändernde Phosphorylierungszustände und/ oder durch die veränderte Lokalisation verschiedene Funktionen in der Zelle übernehmen.

Diese Fähigkeit von Proteinen mehrere Aufgaben übernehmen zu können bezeichnet man auch als „Moonlighting“ (Huberts & van der Klei, 2010).

Ob LicT ebenfalls mehrere Funktionen in der Zelle übernehmen kann, ist nicht auszuschließen, aber es ist davon auszugehen, dass die dynamische Lokalisation von LicT im Zusammenhang mit der Transkriptionsregulation steht.

Zusammenfassend konnte zum ersten Mal die phosphorylierungsabhängige dynamische Lokalisation eines Transkriptionsfaktors in *B. subtilis* beobachtet werden. Welche Faktoren für die Lokalisation in den äußeren Bereichen verantwortlich sind konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es ist aber davon auszugehen, dass die Phosphorylierung und der Aktivitätszustand von LicT im Zusammenhang mit den Lokalisationsorten stehen.

### 4.3. Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, den Aktivierungsmechanismus des Antiterminatorproteins BglG von *E. coli* aufzuklären, sowie die Lokalisation des Antiterminatorproteins LicT aus *B. subtilis* in seinem aktiven und inaktiven Zustand zu untersuchen.

Es wurde gezeigt, dass BglG durch HPr bzw. durch das zu HPr homologe FruB phosphoryliert und aktiviert wird. Außerdem konnte mit der Hilfe von *in vitro* Phosphorylierungen bewiesen werden, dass BglG in der PRDII am His208 phosphoryliert wird. Anhand der *in vitro* Phosphorylierungsdaten wurde bestätigt, dass BglG aus *E. coli*, wie die homologen Antiterminatorproteine aus der BglG/ SacY-Familie, an der PRDII phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass BglG nicht durch die bloße Interaktion mit EI und HPr aktiviert werden kann (Lopian *et al.*, 2010; Raveh *et al.* 2009). Anhand der beobachteten Ko-Lokalisation von BglG, EI und HPr kann vermutet werden, dass das BglG-Dimer am His208 durch EI und HPr (bzw. FruB) an den Zellpolen phosphoryliert wird und anschließend ins Zytoplasma entlassen wird. Ob die dynamische Lokalisation des BglG-Dimers im Zusammenhang mit seiner Aktivität steht, muss noch getestet werden.

Das Antiterminatorprotein LicT aus *B. subtilis* ist in der Zelle dynamisch lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass LicT in seinem aktiven Zustand an den Zellpolen, in der Nähe der Ribosomen, akkumuliert ist. Im inaktiven Zustand befindet sich das Antiterminatorprotein gleichmäßig über die Zelle verteilt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass der Phosphorylierungszustand und damit auch die Aktivität von LicT Einfluss auf die dynamische Lokalisation von LicT hat. Die genauen Ursachen für die Neuorientierung in der

---

Bakterienzelle sind weiterhin noch unklar. Weitere Lokalisationsexperimente mit Mutanten in den noch nicht untersuchten Phosphorylierungsstellen könnten Aufschluss über Ursache der dynamischen Lokalisation geben. Des Weiteren sollte getestet werden, ob weitere Faktoren (z. B. Proteininteraktionen, Proteinmodifikation und Zellbeschaffenheit) die dynamische Lokalisation von LicT beeinflussen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Adler, J. & Epstein, W. (1974).** Phosphotransferase-system enzymes as chemoreceptors for certain sugars in *Escherichia coli* chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **71**, 2895-2899.
- Amster-Choder, O., Houman, F. & Wright, A. (1989).** Protein phosphorylation regulates transcription of the beta-glucoside utilization operon in *E. coli*. *Cell.* **58**, 847-855.
- Amster-Choder, O. & Wright, A. (1990).** Regulation of activity of a transcriptional anti-terminator in *E. coli* by phosphorylation *in vivo*. *Science.* **249**, 540-542.
- Amster-Choder, O. & Wright, A. (1992).** Modulation of the dimerization of a transcriptional antiterminator protein by phosphorylation. *Science.* **257**, 1395-1398.
- Amster-Choder, O. & Wright, A. (1993).** Transcriptional regulation of the *bgl* operon of *Escherichia coli* involves phosphotransferase system-mediated phosphorylation of a transcriptional antiterminator. *J Cell Biochem.* **51**, 83-90.
- Andersen, C., Rak, B. & Benz, R. (1999).** The gene *bglH* present in the *bgl* operon of *Escherichia coli*, responsible for uptake and fermentation of beta-glucosides encodes for a carbohydrate-specific outer membrane porin. *Mol Microbiol.* **31**, 499-510.
- 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**, 3161-3170.
- Arnaud, M., Debarbouille, M., Rapoport, G., Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. (1996).** *In vitro* reconstitution of transcriptional antitermination by the SacT and SacY proteins of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* **271**, 18966-18972.
- Arnold, M. (2009).** *In vivo*-Relevanz der Phosphorylierung von glykolytischen Enzymen in *Bacillus subtilis*. Diploma thesis. University of Göttingen.
- Aymerich, S. & Steinmetz, M. (1992).** Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 10410-10414.
- Azam, T. A., Hiraga, S. & Ishihama, A. (2000).** Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells.* **5**, 613-626.
- Babitzke, P. (2004).** Regulation of transcription attenuation and translation initiation by allosteric control of an RNA-binding protein: the *Bacillus subtilis* TRAP protein. *Curr Opin Microbiol.* **7**, 132-139.
- Bachem, S. & Stülke, J. (1998).** Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the phosphotransferase system. *J Bacteriol.* **180**, 5319-5326.



- Bachmann, B. J. (1972).** Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev.* **36**, 525-557.
- Bastet, L., Dube, A., Masse, E. & Lafontaine, D. A. (2011).** New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol Microbiol.* **80**, 1148-1154.
- Benson, A. K. & Haldenwang, W. G. (1993).** Regulation of sigma B levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **175**, 2347-2356.
- Bi, W. & Stambrook, P. J. (1998).** Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Anal Biochem.* **256**, 137-140.
- Bibi, E. (2011).** Early targeting events during membrane protein biogenesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1808**, 841-850.
- Böhm, A. & Boos, W. (2004).** Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr Opin Microbiol.* **7**, 151-156.
- Boos, W., Ehmann, U., Forkl, H., Klein, W., Rimmel, M. & Postma, P. (1990).** Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **172**, 3450-3461.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Breaker, R. R. (2012).** Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**.
- Broude, N. E. (2011).** Analysis of RNA localization and metabolism in single live bacterial cells: achievements and challenges. *Mol Microbiol.* **80**, 1137-1147.
- Butcher, L. A. & Tomkins, J. K. (1985).** A comparison of silver staining methods for detecting proteins in ultrathin polyacrylamide gels on support film after isoelectric focusing. *Anal Biochem.* **148**, 384-388.
- Chen, Q., Arents, J. C., Bader, R., Postma, P. W. & Amster-Choder, O. (1997).** BglF, the sensor of the *E. coli* *bgl* system, uses the same site to phosphorylate both a sugar and a regulatory protein. *EMBO J.* **16**, 4617-4627.
- Chen, Q. & Amster-Choder, O. (1998).** The different functions of BglF, the *E. coli* beta-glucoside permease and sensor of the *bgl* system, have different structural requirements. *Biochemistry.* **37**, 17040-17047.
- Chen, Q., Postma, P. W. & Amster-Choder, O. (2000).** Dephosphorylation of the *Escherichia coli* transcriptional antiterminator BglG by the sugar sensor BglF is the reversal of its phosphorylation. *J Bacteriol.* **182**, 2033-2036.
- Chien, A. C., Zareh, S. K., Wang, Y. M. & Levin, P. A. (2012).** Changes in the oligomerization potential of the division inhibitor UgtP coordinate *Bacillus subtilis* cell size with nutrient availability. *Mol Microbiol.*

- Choonee, N., Even, S., Zig, L. & Putzer, H. (2007).** Ribosomal protein L20 controls expression of the *Bacillus subtilis* *infC* operon via a transcription attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1578-1588.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L. W., Daniel, R. A., Errington, J. & Edwards, D. H. (2008).** Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **68**, 1029-1046.
- Collins, J. A., Irnov, I., Baker, S. & Winkler, W. C. (2007).** Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme. *Genes Dev.* **21**, 3356-3368.
- Commichau, F. M. (2006).** Regulation der Glutamatsynthese in *Bacillus subtilis* durch die Glutamatdehydrogenase RocG und das Aktivatorprotein GltC Glutamatsynthese. Ph. D. thesis. University of Göttingen.
- Commichau, F. M., Forchhammer, K. & Stülke, J. (2006).** Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol.* **9**, 167-172.
- Commichau, F. M., Wacker, I., Schleider, J., Blencke, H. M., Reif, I., Tripal, P. & Stülke, J. (2007).** Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **12**, 106-113.
- Commichau, F. M., Rothe, F. M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Völker, U. & Stülke, J. (2009).** Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics.* **8**, 1350-1360.
- Coppins, R. L., Hall, K. B. & Groisman, E. A. (2007).** The intricate world of riboswitches. *Curr Opin Microbiol.* **10**, 176-181.
- de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K. & Vazquez-Boland, J. A. (2011).** Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol.* **14**, 118-127.
- 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**, 389-402.
- 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**, 671-681.
- Defeu Soufo, H. J. & Graumann, P. L. (2004).** Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep.* **5**, 789-794.
- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006).** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**, 939-1031.
- Deutscher, J. (2008).** The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **11**, 87-93.

- Diethmaier, C. (2008).** CsrA-abhängige Regulation in *Bacillus subtilis*. Diploma thesis. University of Göttingen.
- Diethmaier, C., Pietack, N., Gunka, K., Wrede, C., Lehnik-Habrink, M., Herzberg, C., Hübner, S. & Stülke, J. (2011).** A novel factor controlling bistability in *Bacillus subtilis*: the YmdB protein affects flagellin expression and biofilm formation. *J Bacteriol.* **193**, 5997-6007.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1997).** The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 8439-8444.
- Geerse, R. H., Ruig, C. R., Schuitema, A. R. & Postma, P. W. (1986).** Relationship between pseudo-HPr and the PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **203**, 435-444.
- Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Jomantas, J., Kozlov, Y. I. & Perumov, D. A. (1999).** A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends Genet.* **15**, 439-442.
- Gerdes, K., Howard, M. & Szardenings, F. (2010).** Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell.* **141**, 927-942.
- Görke, B. & Rak, B. (1999).** Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* **18**, 3370-3379.
- Görke, B. & Rak, B. (2001).** Efficient transcriptional antitermination from the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J Mol Biol.* **308**, 131-145.
- Görke, B. (2003).** Regulation of the *Escherichia coli* antiterminator protein BglG by phosphorylation at multiple sites and evidence for transfer of phosphoryl groups between monomers. *J Biol Chem.* **278**, 46219-46229.
- Görke, B. & Stülke, J. (2008).** Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 613-624.
- Gosalbes, M. J., Monedero, V. & Perez-Martinez, G. (1999).** Elements involved in catabolite repression and substrate induction of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol.* **181**, 3928-3934.
- Govindarajan, S., Nevo-Dinur, K. & Amster-Choder, O. (2012).** Compartmentalization And Spatio-Temporal Organization Of Macromolecules In Bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*
- Graille, M., Zhou, C. Z., Receveur-Brechot, 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**, 14780-14789.
- Greenberg, D. B., Stülke, J. & Saier, M. H., Jr. (2002).** Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res Microbiol.* **153**, 519-526.

- Grundy, F. J. & Henkin, T. M. (1993).** tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell*. **74**, 475-482.
- 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**, 4518-4526.
- 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**, 2587-2594.
- 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**, 737-749.
- Grundy, F. J. & Henkin, T. M. (2003).** The T box and S box transcription termination control systems. *Front Biosci.* **8**, d20-31.
- Guérout-Fleury, A. M., Shazand, K., Frandsen, N. & Stragier, P. (1995).** Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*. **167**, 335-336.
- Hammar, P., Leroy, P., Mahmutovic, A., Marklund, E. G., Berg, O. G. & Elf, J. (2012).** The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells. *Science*. **336**, 1595-1598.
- Hanson, K. G., Steinhauer, K., Reizer, J., Hillen, W. & Stülke, J. (2002).** HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology*. **148**, 1805-1811.
- Henstra, S. A., Duurkens, R. H. & Robillard, G. T. (2000).** Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the *Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J Biol Chem*. **275**, 7037-7044.
- Herzberg, C., Weidinger, L. A., Dorrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. & Commichau, F. M. (2007).** SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics*. **7**, 4032-4035.
- Himmel, S., Zschiedrich, C. P., Becker, S. & other authors (2012).** Determinants of interaction specificity of the *Bacillus subtilis* GlcT antitermination protein: Functionality and phosphorylation specificity depend on the arrangement of the regulatory domains. *J Biol Chem*.
- Hobl, B. & Mack, M. (2007).** The regulator protein PyrR of *Bacillus subtilis* specifically interacts *in vivo* with three untranslated regions within *pyr* mRNA of pyrimidine biosynthesis. *Microbiology*. **153**, 693-700.
- Houman, F., Diaz-Torres, M. R. & Wright, A. (1990).** Transcriptional antitermination in the *bgl* operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. *Cell*. **62**, 1153-1163.

- Huberts, D. H. & van der Klei, I. J. (2010).** Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta.* **1803**, 520-525.
- Hübner, S. (2008).** Untersuchung der Spezifität von Antiterminationsproteinen in *Bacillus subtilis*. Ph. D. Thesis. University of Göttingen.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**, 8-11.
- Jannièrè, L., Canceill, D., Suski, C. & other authors (2007).** Genetic evidence for a link between glycolysis and DNA replication. *PloS One.* **2**, e447.
- Jers, C., Pedersen, M. M., Paspaliari, D. K., Schütz, W., Johnsson, C., Soufi, B., Macek, B., Jensen, P. R. & Mijakovic, I. (2010).** *Bacillus subtilis* BY-kinase PtkA controls enzyme activity and localization of its protein substrates. *Mol Microbiol.* **77**, 287-299.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. & Cossart, P. (2002).** An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell.* **110**, 551-561.
- Joly, N., Böhm, A., Boos, W. & Richet, E. (2004).** MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator malt by antagonizing inducer binding. *J Biol Chem.* **279**, 33123-33130.
- Jones, L. J., Carballido-Lopez, R. & Errington, J. (2001).** Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **104**, 913-922.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998).** A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 5752-5756.
- Keiler, K. C. (2011).** RNA localization in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **14**, 155-159.
- Klinkert, B. & Narberhaus, F. (2009).** Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci.* **66**, 2661-2676.
- Kortmann, J. & Narberhaus, F. (2012).** Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol.* **10**, 255-265.
- Krämer, R. & Jung, K. (2010).** Bacterial Signaling. *Wiley-Blackwell.*
- Kristich, C. J., Glekas, G. D. & Ordal, G. W. (2003).** The conserved cytoplasmic module of the transmembrane chemoreceptor McpC mediates carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **47**, 1353-1366.
- Krüger, S. & Hecker, M. (1995).** Regulation of the putative *bgIPH* operon for aryl-beta-glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **177**, 5590-5597.

- Krüger, S., Gertz, S. & Hecker, M. (1996).** Transcriptional analysis of *bglPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J Bacteriol.* **178**, 2637-2644.
- Kumar, P. K., Kumarevel, T. & Mizuno, H. (2006).** Structural basis of HutP-mediated transcription anti-termination. *Curr Opin Struct Biol.* **16**, 18-26.
- Kumarevel, T. (2007).** Structural insights of HutP-mediated regulation of transcription of the hut operon in *Bacillus subtilis*. *Biophys Chem.* **128**, 1-12.
- Kundig, W., Ghosh, S. & Roseman, S. (1964).** Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **52**, 1067-1074.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Landmann, J. J. (2008).** Einfluss der Glutamatdehydrogenase RocG auf den Grundstoffwechsel von *Bacillus subtilis*. Diploma thesis. University of Göttingen.
- 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**, 795-805.
- Le Coq, D., 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**, 1527-1535.
- Lederberg, E. M. & Cohen, S. N. (1974).** Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* **119**, 1072-1074.
- Lee, S. J., Boos, W., Bouche, J. P. & Plumbridge, J. (2000).** Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **19**, 5353-5361.
- Lehnik-Habrink, M., Pförtner, H., Rempeters, L., Pietack, N., Herzberg, C. & Stülke, J. (2010).** The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol.*
- Lehnik-Habrink, M. (2011).** An mRNA degradation complex in *Bacillus subtilis*. Ph. D. thesis. University of Göttingen.
- Lehnik-Habrink, M., Newman, J., Rothe, F. M., Solovyova, A. S., Rodrigues, C., Herzberg, C., Commichau, F. M., Lewis, R. J. & Stülke, J. (2011).** RNase Y in *Bacillus subtilis*: a Natively disordered protein that is the functional equivalent of RNase E from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **193**, 5431-5441.

- Lehnik-Habrink, M., Lewis, R. J., Mäder, U. & Stülke, J. (2012).** RNA degradation in *Bacillus subtilis*: an interplay of essential endo- and exoribonucleases. *Mol Microbiol.* **84**, 1005-1017.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D. & Hamoen, L. W. (2009).** Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J.* **28**, 2272-2282.
- Lengeler, J., Auburger, A. M., Mayer, R. & Pecher, A. (1981).** The phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate: phosphotransferase system enzymes II as chemoreceptors in chemotaxis of *Escherichia coli* K 12. *Mol Gen Genet.* **183**, 163-170.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. & Chaufaux, J. (1995).** Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Biotechnology (N Y).* **13**, 67-71.
- Lescoute, A. & Westhof, E. (2005).** Riboswitch structures: purine ligands replace tertiary contacts. *Chem Biol.* **12**, 10-13.
- Lewis, P. J., Thaker, S. D. & Errington, J. (2000).** Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **19**, 710-718.
- 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**, 995-1006.
- Lindner, C., Hecker, M., Le Coq, D. & Deutscher, J. (2002).** *Bacillus subtilis* mutant LicT antiterminators exhibiting enzyme I- and HPr-independent antitermination affect catabolite repression of the *bglPH* operon. *J Bacteriol.* **184**, 4819-4828.
- Loose, M., Kruse, K. & Schwille, P. (2011).** Protein self-organization: lessons from the min system. *Annu Rev Biophys.* **40**, 315-336.
- 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**, 7099-7104.
- Lopian, L., Elisha, Y., Nussbaum-Shochat, A. & Amster-Choder, O. (2010).** Spatial and temporal organization of the *E. coli* PTS components. *EMBO J.* **29**, 3630-3645.
- Lovingshimer, M. R., Siegle, D. & Reinhart, G. D. (2006).** Construction of an inducible, *pfkA* and *pfkB* deficient strain of *Escherichia coli* for the expression and purification of phosphofructokinase from bacterial sources. *Protein Expr Purif.* **46**, 475-482.
- 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**, 23-27.
- Ludwig, H. & Stülke, J. (2001).** The *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA exerts all its regulatory functions by DNA-binding. *FEMS Microbiol Lett.* **203**, 125-129.

- Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K. & Görke, B. (2009).** Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **72**, 978-994.
- Lybarger, S. R. & Maddock, J. R. (2001).** Polarity in action: asymmetric protein localization in bacteria. *J Bacteriol.* **183**, 3261-3267.
- Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D. & Fröhlich, K. U. (1998).** Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell.* **9**, 131-141.
- 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**, 485-494.
- Majdalani, N., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. (2005).** Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **40**, 93-113.
- 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**, 577-586.
- Mandal, M. & Breaker, R. R. (2004).** Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 29-35.
- 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**, 275-279.
- 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**, 178-192.
- Martin-Verstraete, I., Stülke, J., Klier, A. & Rapoport, G. (1995).** Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol.* **177**, 6919-6927.
- Merzbacher, M., Detsch, C., Hillen, W. & Stülke, J. (2004).** *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphorylase. *Eur J Biochem.* **271**, 367-374.
- Meyer, F. M., Jules, M., Mehne, F. M., Le Coq, D., Landmann, J. J., Görke, B., Aymerich, S. & Stülke, J. (2011).** Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. *J Bacteriol.* **193**, 6939-6949.
- Mileykovskaya, E. (2007).** Subcellular localization of *Escherichia coli* osmosensory transporter ProP: focus on cardiolipin membrane domains. *Mol Microbiol.* **64**, 1419-1422.



- Montero Llopis, P., Jackson, A. F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T. & Jacobs-Wagner, C. (2010).** Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*. **466**, 77-81.
- Morita, M., Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1999a).** Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol.* **181**, 401-410.
- Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Kyogoku, Y., Yanagi, H. & Yura, T. (1999b).** Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* **13**, 655-665.
- Morita, T., Maki, K. & Aiba, H. (2005).** RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* **19**, 2176-2186.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L. & Breaker, R. R. (2002).** Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol.* **9**, 1043.
- Nam, T. W., Cho, S. H., Shin, D. & other authors (2001).** The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *EMBO J.* **20**, 491-498.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T. & Chowdhury, S. (2006).** RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev.* **30**, 3-16.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. & Upton, S. J. (1994).** A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* **28**, 239-242.
- Neumann, S., Grosse, K. & Sourjik, V. (2012).** Chemotactic signaling via carbohydrate phosphotransferase systems in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 12159-12164.
- Nevo-Dinur, K., Nussbaum-Shochat, A., Ben-Yehuda, S. & Amster-Choder, O. (2011).** Translation-independent localization of mRNA in *E. coli*. *Science.* **331**, 1081-1084.
- Nevo-Dinur, K., Govindarajan, S. & Amster-Choder, O. (2012).** Subcellular localization of RNA and proteins in prokaryotes. *Trends Genet.* **28**, 314-322.
- Nicolas, P., Mader, U., Dervyn, E. & other authors (2012).** Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science.* **335**, 1103-1106.
- Noeske, J., Richter, C., Grundl, M. A., Nasiri, H. R., Schwalbe, H. & Wohnert, J. (2005).** An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 1372-1377.
- Nudler, E. & Mironov, A. S. (2004).** The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci.* **29**, 11-17.

- Parche, S., Schmid, R. & Titgemeyer, F. (1999).** The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur J Biochem.* **265**, 308-317.
- Parkinson, J. S. (1993).** Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* **73**, 857-871.
- Patel, H. V., Vyas, K. A., Li, X., Savtchenko, R. & Roseman, S. (2004).** Subcellular distribution of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system depends on growth conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 17486-17491.
- Pietack, N. (2010).** Investigation of glycolysis in *Bacillus subtilis*. Ph. D. thesis. University of Göttingen.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993).** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* **57**, 543-594.
- 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**, 709-718.
- Putzer, H., Condon, C., Brechemier-Baey, D., Brito, R. & Grunberg-Manago, M. (2002).** Transfer RNA-mediated antitermination *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3026-3033.
- Radde, N., Gebert, J., Faigle, U., Schrader, R. & Schnetz, K. (2008).** Modeling feedback loops in the H-NS-mediated regulation of the *Escherichia coli* *bgl* operon. *J Theor Biol.* **250**, 298-306.
- Ramamurthi, K. S. & Losick, R. (2009).** Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 13541-13545.
- Ramamurthi, K. S. (2010).** Protein localization by recognition of membrane curvature. *Curr Opin Microbiol.* **13**, 753-757.
- Raveh, H., Lopian, L., Nussbaum-Shochat, A., Wright, A. & Amster-Choder, O. (2009).** Modulation of transcription antitermination in the *bgl* operon of *Escherichia coli* by the PTS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 13523-13528.
- 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**, 4603-4613.
- Richet, E., Davidson, A. L. & Joly, N. (2012).** The ABC transporter MalFGK<sub>2</sub> sequesters the MalT transcription factor at the membrane in the absence of cognate substrate. *Mol Microbiol.* **85**, 632-647.

- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2002).** Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* **277**, 48949-48959.
- Romantsov, T., Helbig, S., Culham, D. E., Gill, C., Stalker, L. & Wood, J. M. (2007).** Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **64**, 1455-1465.
- Rothe, F. (2009).** Funktionelle Analyse der Domänen der essentiellen RNase Y in *Bacillus subtilis*. Diploma thesis. University of Göttingen.
- Rothe, F. M., Bahr, T., Stülke, J., Rak, B. & Görke, B. (2012).** Activation of *Escherichia coli* antiterminator BglG requires its phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Rutberg, B. (1997).** Antitermination of transcription of catabolic operons. *Mol Microbiol.* **23**, 413-421.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harb Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 5463-5467.
- Sankar, T. S., Neelakanta, G., Sangal, V., Plum, G., Achtman, M. & Schnetz, K. (2009).** Fate of the H-NS-repressed *bgl* operon in evolution of *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **5**, e1000405.
- Schaeffler, S. (1967).** Inducible system for the utilization of beta-glucosides in *Escherichia coli*. I. Active transport and utilization of beta-glucosides. *J Bacteriol.* **93**, 254-263.
- 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**, 2853-2864.
- Schilling, O., Herzberg, C., Hertrich, T., Vorsmann, 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**, 6102-6115.
- Schilling, O. (2007).** Carbon Catabolism in *Bacillus subtilis*: Global and Molecular Views on the Control of Gene Expression. Ph. D. thesis. University of Göttingen.
- Schlax, P. J. & Worhunsky, D. J. (2003).** Translational repression mechanisms in prokaryotes. *Mol Microbiol.* **48**, 1157-1169.
- Schmalisch, G. (2004).** Regulation der Glucoseaufnahme und -verwertung in *Bacillus subtilis* durch reversible Proteinphosphorylierungen. Ph. D. thesis. University of Erlangen.

- Schmalisch, M. H., Bachem, S. & Stülke, J. (2003).** Control of the *Bacillus subtilis* antiterminator protein GlcT by phosphorylation. Elucidation of the phosphorylation chain leading to inactivation of GlcT. *J Biol Chem.* **278**, 51108-51115.
- Schnetz, K., Toloczyki, C. & Rak, B. (1987).** Beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J Bacteriol.* **169**, 2579-2590.
- Schnetz, K. & Rak, B. (1988).** Regulation of the *bgl* operon of *Escherichia coli* by transcriptional antitermination. *EMBO J.* **7**, 3271-3277.
- Schnetz, K. & Rak, B. (1990).** Beta-glucoside permease represses the *bgl* operon of *Escherichia coli* by phosphorylation of the antiterminator protein and also interacts with glucose-specific enzyme III, the key element in catabolite control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 5074-5078.
- Schnetz, K., Stülke, J., Gertz, S., Krüger, S., Krieg, M., Hecker, M. & Rak, B. (1996).** LicT, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator protein of the BglG family. *J Bacteriol.* **178**, 1971-1979.
- Serganov, A. & Patel, D. J. (2007).** Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat Rev Genet.* **8**, 776-790.
- Shapiro, L., McAdams, H. H. & Losick, R. (2009).** Why and how bacteria localize proteins. *Science.* **326**, 1225-1228.
- Singh, K. D., Schmalisch, M. H., Stülke, J. & Görke, B. (2008).** Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J Bacteriol.* **190**, 7275-7284.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000).** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **69**, 183-215.
- Strahl, H. & Hamoen, L. W. (2010).** Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 12281-12286.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Klier, A., Deutscher, J. & Rapoport, G. (1995).** The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol.* **177**, 6928-6936.
- 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**, 65-78.
- Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G. & Martin-Verstraete, I. (1998).** PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol.* **28**, 865-874.
- Stülke, J. & Hillen, W. (2000).** Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol.* **54**, 849-880.

- Stülke, J. (2002).** Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch Microbiol.* **177**, 433-440.
- Sudarsan, N., Barrick, J. E. & Breaker, R. R. (2003).** Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA.* **9**, 644-647.
- Tanaka, Y., Kimata, K. & Aiba, H. (2000).** A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J.* **19**, 5344-5352.
- Thore, S., Leibundgut, M. & Ban, N. (2006).** Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science.* **312**, 1208-1211.
- Toro, E. & Shapiro, L. (2010).** Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, a000349.
- Tortosa, P., Aymerich, S., Lindner, C., Saier, M. H., Jr., Reizer, J. & Le Coq, D. (1997).** Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Biol Chem.* **272**, 17230-17237.
- Tortosa, P., Declerck, N., Dutartre, H., Lindner, C., Deutscher, J. & Le Coq, D. (2001).** Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY. *Mol Microbiol.* **41**, 1381-1393.
- Tucker, B. J. & Breaker, R. R. (2005).** Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 342-348.
- 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**, 3708-3722.
- van Tilbeurgh, H. & Declerck, N. (2001).** Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Curr Opin Struct Biol.* **11**, 685-693.
- van Tilbeurgh, H., Le Coq, D. & Declerck, N. (2001).** Crystal structure of an activated form of the PTS regulation domain from the LicT transcriptional antiterminator. *EMBO J.* **20**, 3789-3799.
- Venkatesh, G. R., Kembou Koungni, F. C., Paukner, A., Stratmann, T., Blissenbach, B. & Schnetz, K. (2010).** BglJ-RcsB heterodimers relieve repression of the *Escherichia coli* *bgl* operon by H-NS. *J Bacteriol.* **192**, 6456-6464.
- 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**, 3141-3151.
- Wach, A. (1996).** PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **12**, 259-265.
- Waters, L. S. & Storz, G. (2009).** Regulatory RNAs in bacteria. *Cell.* **136**, 615-628.

- Weinrauch, Y., Msadek, T., Kunst, F. & Dubnau, D. (1991).** Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **173**, 5685-5693.
- 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**, 15908-15913.
- Winkler, W. C. & Breaker, R. R. (2003).** Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem.* **4**, 1024-1032.
- Winkler, W. C. (2005).** Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. *Arch Microbiol.* **183**, 151-159.
- Winkler, W. C. & Breaker, R. R. (2005).** Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 487-517.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989).** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3469-3478.
- Yang, Y., Declerck, N., Manival, X., Aymerich, S. & Kochoyan, M. (2002).** Solution structure of the LicT-RNA antitermination complex: CAT clamping RAT. *EMBO J.* **21**, 1987-1997.
- Yuan, J., Zweers, J. C., van Dijl, J. M. & Dalbey, R. E. (2010).** Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell Mol Life Sci.* **67**, 179-199.

## 6. Anhang

### 6.1. Materialien

#### 6.1.1. Chemikalien

Agarose	Peqlab, Erlangen
Antibiotika	Sigma, München
Adenosin 5'-triphosphate (ATP)	Sigma, München
CDP*	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue, R350	Amersham, Freiburg
Desthiobiotin	Iba, Göttingen
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Dowex AG1-X8 Resin	BioRad, München
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
$\gamma$ -[P <sup>32</sup> ]-Adenosin 5'-triphosphate (ATP)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid	Peqlap, Erlangen
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose Superflow	Qiagen, Hilden
Nutrient Broth	Merck, Darmstadt
o-Nitrophenyl--D-Galaktopyranosid	Sigma, München
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Sigma, München
Pyruvat	Sigma, München
Salicin	Sigma, München
Sorbitol	Sigma, München
<i>Strep</i> -Tactin Sepharose	Iba, Göttingen
Triethylamin (TEA)	Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Oxoid, Heidelberg

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

### 6.1.2. Im Labor verwendete Hilfsmittel

Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Drogheda, Irland
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Eppendorfgefäße	Greiner, Nürtingen
Falcon-Tubes	Sarstedt, Nürmbrecht
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Glaspipetten	Brand, Wertheim
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	BioRad Laboratories GmbH, München
Zentrifugenbecher	Beckmann, München
96-Well-Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

### 6.1.3. Geräte und Apparaturen

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Biofuge fresco	Heraeus Christ, Osterode
Chemilumineszenzsystem ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40FL + Kamera (AxioCam MRm)	Zeiss, Göttingen
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
French Press HTU-Digi	Heinemann (Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd)



---

Geldokumentationsanlage	BioRad Laboratories GmbH, München
Molecular Imager Gel Doc XR+	
Gelelektrophoreseapparaturen	Waasetec, Göttingen EasyCast <sup>TM</sup> Minigelsystem, Peqlab, Erlangen
Geltrocknungsanlage 583	BioRad Laboratories GmbH, München
Heizblock Thermo	Waasetec, Göttingen
Horizontalschüttler 3006	GFL, Burgwedel
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Kulturschüttler-Inkubator Innova 42	New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler-Inkubator Innova 44	New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler Innova 2300	New Brunswick, Neu-Isenburg
Lumineszenzgerät Chemocam	Intas, Göttingen
Magnetrührer reo basic C	IKA Werk, Staufen
Magnetrührer RET basic C	IKA Werk, Staufen
Magnetrührer KMO 2 basic	IKA Werk, Staufen
Mikroprozessor pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Mikrowelle 8020	Privileg
Nanodrop ND-1000	Thermoscientific, Bonn
Phosphoimager Storm 860	Molecular Dynamics
Phosphoscreen	Amersham Bioscience
Phosphoscreen Image Eraser	Molecular Dynamics
Spannungsgerät Power Pac Basic	BioRad Laboratories California USA
Spannungsgerät Power Pac 200	BioRad Laboratories California USA
Spannungsgerät Power Pac P25T	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer Ultraspec 2100 pro	Amersham, Freiburg
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific, Bonn
Szintillationszähler	Perkin Elmer
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
LabCycler	SensorQuest, Göttingen
Ultraschallgerät Labsonic U	Braun, Melsungen
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman, München

Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80	Thermo Scientific, Bonn
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam
Vertikalgelelektrophoreseapparatur	BioRad Laboratories, California USA
Mini Protean III System	
Vortexer Genius 3	IKA Werk, Staufen
Waage Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbadschüttler Innova 3100	New Brunswick, Neu-Isenburg
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach
Western Blot-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge Biofuge pico 21	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Sorval RC6+	Thermo Scientific, Bonn

#### 6.1.4. Kommerziell erhältliche Systeme

DNeasy Blood & Tissue Kit 50	Qiagen, Hilden
Gene Ruler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Nucleospin Plasmid-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Prestained Protein Marker ColorPlus	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
Prestained Protein Marker PageRuler Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
Unstained Protein Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 6.1.5. Antikörper und Enzyme

Accuzyme-Polymerase	Bioline
Ampligase	Epicentre, Medison (Wisconsin)
Antikörper -Acetyliertes-Lysin	Cell Signaling
Antikörper -Flag	Sigma, München
Antikörper -GFP	Biozol, Eiching
Extender DNA Polymerase	5 Prime, Hamburg

Lysozym aus Hühnereiweiß (178000 U/mg)	Merck, Darmstadt
Phusion™ DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo Finland
Pyruvatkinase Typ II	Sigma, München
Restriktionsendonukleasen	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

## 6.2. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofin (Köln) bzw. von der Firma Sigma (München) bezogen.

**Tab. 6.1.: Oligonukleotide**

Name	Sequenz (Schnittstellen unterstrichen, Mutationen in Fettschrift, Promotoren kursiv)	Gen / Zweck
FR27	5'- AAATCTAGAGATGTCCAAAATCGT AAAAATCATCGG	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) in die B2H- Plasmide (fwd) / <i>XbaI</i>
FR28	5'- TTTCTGCAGCGTGCCTGGCCTTTG ATCTC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) in die B2H- Plasmide (rev) / Ohne Stopcodon / <i>PstI</i>
FR29	5'- TTTGGTACCCGCTTGTCGTCATCG TCTTTGTAG	Klonierung von <i>eno-3xflag</i> ( <i>E. coli</i> ) in die B2H- Plasmide (rev) / Ohne Stopcodon / <i>KpnI</i>
FR30	5'- TTTGGTACCCGTCCTGGCCTTTG ATCTC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) in die B2H- Plasmide (rev) / Ohne Stopcodon / <i>KpnI</i>
FR31	5'- AAAGGTACCAAATCAAAGGAGA	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) mit der RBS von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (fwd) / <i>KpnI</i>

	GACAAAACATCATGTCCAAAATCGT AAAAATCATCGG	
FR32	5'- TTTTCTAGATGCCTGGCCTTTGATC TC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>XbaI</i>
FR33	5'- AAAGGTACCAAATCAAAGGAGA GACAAAACATCATG	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit der RBS von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (fwd) / <i>KpnI</i>
FR34	5'- TTTTCTAGACTTGTTTAAGTTGTA GAAAGAGTTGATAC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>XbaI</i>
FR35	5'-AAACAATTGACGAAAGCGGCTA CTCTAAC	Klonierung der <i>pgk</i> -Promoterregion in pGP882 (fwd) / <i>MfeI</i>
FR36	5'-TTTATCGATAGTCCGTCCCCTT CCC	Klonierung der <i>pgk</i> -Promoterregion in pGP882 (rev) / <i>ClaI</i>
FR37	5'-AAAATCGATGAATTCGAGCTCG GTACC	Klonierung der pUC19 MCS in pGP882 (fwd) / <i>ClaI</i>
FR38	5'-TTTAGATCTAAGCTTTTATCACT TGTCGTCATCG	Klonierung der pUC19 MCS-3xflag in pGP882 (rev) / <i>BglIII</i>
FR39	5'-TTTAGATCTAAGCTTGCATGCC TGCAG	Klonierung der pUC19 MCS in pGP882 (rev) / <i>BglIII</i>
FR40	5'- TTTTCTAGATTATGCCTGGCCTTTG ATCTC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) (rev) / Mit Stopcodon / <i>XbaI</i>
FR41	5'- TTTTCTAGATTACTTGTTTAAGTTG TAGAAAGAGTTGATAC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Mit Stopcodon / <i>XbaI</i>
FR42	5'-CCGATGATGAACATCATCAACG	Sequenzierprimer von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> )
FR43	5'-TTTGGATCC TCTAGA GAATTC GGTACCGCATACAGCACGAAAAAC GTG	Klonierung der <i>pgk</i> -Promoterregion mit MCS in pAC7 (rev) / <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> / <i>EcoRI</i> / <i>KpnI</i>
FR44	5'-AAAGGATCCCTGCAGGCATGC AAGCTTG	Klonierung von 3xflag in pAC7 / <i>BamHI</i>

FR45	5'- AAACAATTGCTCACTTATTTAAAG GAGGAAACAATCATGTCCAAAAT CGTAAAAATCATCGGTCG	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP1243 und pGP1244 mit RBS von <i>gapA</i> (fwd) / <i>MfeI</i>
FR46	5'- TTTGGATCCTTATGCCTGGCCTTT GATCTC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) (rev) / Mit Stopcodon / <i>BamHI</i>
FR47	5'- TTTGGATCCTGCCTGGCCTTTGAT CTC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) / Ohne Stopcodon / <i>BamHI</i>
FR48	5'-AAACAATTGCTCACTTATTTAA AGGAGGAAACAATCATGCCATACA TTGTTGATGTTTATGCAC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit RBS von <i>gapA</i> (fwd) / <i>MfeI</i>
FR49	5'- TTTGGATCCTTACTTGTTTAAGTTG TAGAAAGAGTTGATAC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / <i>BamHI</i>
FR50	5'-TTTGGATCCCTTGTTTAAGTTG TAGAAAGAGTTGATAC	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>BamHI</i>
FR51	5'-AAAGGATCCCTCACTTATTTAA AGGAGGAAACAATCATGATTAAG AAAATCGGTGTGTTGAC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) mit RBS von <i>gapA</i> (fwd) / <i>BamHI</i>
FR52	5'-TTTGTTCGACTTAATACAGTTTT TTCGCGCAGTCC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) (rev) / <i>Sall</i>
FR53	5'- AAATCTAGAGATGATTAAGAAAAT CGGTGTGTTGAC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) in die B2H-Plasmide (fwd) / <i>XbaI</i>
FR54	5'- TTGGTACCCGATACAGTTTTTTC GCGCAGTCC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) in die B2H-Plasmide (rev) / Ohne Stopcodon / <i>KpnI</i>
FR55	5'-GGTGACGGTTCCTACATG	Sequenzierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> )
FR56	5'-AAACAATTGCTCACTTATTTAA AGGAGGAAACAATCATGATTAAG AAAATCGGTGTGTTGAC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) mit RBS von <i>gapA</i> (fwd) / <i>MfeI</i>

FR57	5'- TTTGGATCCTTAATACAGTTTTTTC GCGCAGTCC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) (rev) / <i>BamHI</i>
FR58	5'- TTTGGATCCATACAGTTTTTTCGC GCAGTCC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>BamHI</i>
FR59	5'-AAAGGTACCCTCACTTATTTAA AGGAGGAAACAATCATGAAACGA ATAGGGGTATTAACGAG	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit RBS von <i>gapA</i> (fwd) / <i>KpnI</i>
FR60	5'- TTTGGATCCTTAGATAGACAGTTC TTTTGAAAGCTG	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / <i>BamHI</i>
FR61	5'- TTTGGATCCGATAGACAGTTCTTT TGAAAGCTGATAC	Klonierung von <i>pfkA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>BamHI</i>
FR62	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTCGC TGCCCTTCTATCAGTAAAGAGCC	LFH-PCR ( <i>acuA</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR63	5'-CCGAGCGCCTACGAGGAATTT GTATCGGTCAGCCAAGAATCAATT GAGC	LFH-PCR ( <i>acuA</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR64	5'-CAGTCTGCGGCCGTTAAAGT	LFH-PCR ( <i>acuA</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR65	5'-ATGCAGAATCCTGATGCTCTC	LFH-PCR ( <i>acuA</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR66	5'-CTGTTCAATCGTTCCATAACCAG	LFH-PCR ( <i>acuA</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR67	5'-GTGAAGTTAGATCATATTTTCGC AGC	LFH-PCR ( <i>acuA</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR68	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTCGC TGGGTACGTTTCTTCATAGTTTTTT AAGTTATG	LFH-PCR ( <i>acsA</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR69	5'-CCGAGCGCCTACGAGGAATTT GTATCGCCAGAAGCGGAAAGATC	LFH-PCR ( <i>acsA</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)

	ATGAG	
FR70	5'-GTGACAAGCGGAATCGTTAGG	LFH-PCR ( <i>acsA</i> ) / „upstream“- Fragment (rev)
FR71	5'-CTTTATCAAGCCAGATCGCG	LFH-PCR ( <i>acsA</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR72	5'-GTCTGTAATCATGCCGATCAC	LFH-PCR ( <i>acsA</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd)
FR73	5'-GCGCAGACAACATCCTTTTTC	LFH-PCR ( <i>acsA</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR74	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTTCG TGCTGATTCTGTGCTCATTCCCG	LFH-PCR ( <i>srtN</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR75	5'-CCGAGCGCCTACGAGGAATTT GTATCGGCTTGTTTGACATGGTCA TCC	LFH-PCR ( <i>srtN</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR76	5'-CCTGCTGTACAGCATTATGTAG	LFH-PCR ( <i>srtN</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR77	5'-GATGAGCAAATGCCGGTCATC	LFH-PCR ( <i>srtN</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR78	5'-GTGGTTCTGGCGTTTGATAAG	LFH-PCR ( <i>srtN</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR79	5'-CAAGAGATCTATAGCGGAAA GG	LFH-PCR ( <i>srtN</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR80	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTTCG TGGATGCTCCTGATGAAACATATA GG	LFH-PCR ( <i>acuC</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR81	5'-CCGAGCGCCTACGAGGAATTTG TATCGGCCCAAACACTGTCAGCAAA GC	LFH-PCR ( <i>acuC</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR82	5'-CATATGCTCGGACCAAACATG	LFH-PCR ( <i>acuC</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR83	5'-CGTCAGCATGATGGATGAAC	LFH-PCR ( <i>acuC</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)

FR84	5'-CGTATTTATATCCTGACCCGC	LFH-PCR ( <i>acuC</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR85	5'-CATGGGGAATGATCGGAACAC	LFH-PCR ( <i>acuC</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR86	5'-TTT <u>GTCGACCTT</u> GTTTAAGTTG TAGAAAGAGTTGATACCGTGG	Klonierung von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR87	5'- TTT <u>GTCGACCT</u> CATATTGACCTTCC TCCAATAATTGAACGAATG	Klonierung von <i>tpiA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR88	5'-TTT <u>GTCGACT</u> TTTTTGAATTA GATGTTCTGTCAATTTCTTTCGGTT TTTC	Klonierung von <i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR89	5'-TTT <u>GTCGACT</u> TTTATCGTTCAGT GCAGTACCCCTGGAA	Klonierung von <i>pgk</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR90	5'-AAAGGATCCCGCTTCAAACAA TCGTTGAAGC	Klonierung von 600 bp <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR91	5'-TTT <u>GTCGACA</u> AAGACCTTTTTTT GCGATGTAAGCTGCAAGGTC	Klonierung von <i>gapA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR92	5'- AAAGGATCCCAACAATCGTTATGGG TGTTAACG	Klonierung von 600 bp <i>gapA</i> ( <i>B.</i> <i>subtilis</i> ) in pGP1331 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR93	5'- AAAGGATCCTGAAAATCAAAGG AGAGACAAAACCTC	Klonierung von <i>eno</i> -Mutante ( <i>B.</i> <i>subtilis</i> ) in pBlueskript II KS+ (fwd) / <i>BamHI</i>
FR94	5'- <b>GAAGCGTTTTTGAGCCTGGTGTG</b> CCGTTGAATCCTCCAAGGTATTGG	LFH-PCR <i>eno</i> -Mutante (rev) ( <i>B.</i> <i>subtilis</i> ) / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 / Mit WT-Überhang (grün)
FR95	5'- <b>TGGAGGATTCAACGGCACACCAG</b> GCTCAAAAACGCTTCCTGTACCG	LFH-PCR <i>eno</i> -Mutante (fwd) ( <i>B.</i> <i>subtilis</i> ) / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414/ Mit WT-Überhang (grün)
FR96	5'-	Klonierung von <i>eno</i> -Mutante ( <i>B.</i>



	TTTCTGCAGGATCTCTGAAAGCAT AAAAAAGCCG	<i>subtilis</i> ) in pBlueskript II KS+ (rev) / <i>PstI</i>
FR97	5'-TTCAACGGCACACCAGGC	Kontrollprimer <i>eno</i> -Mutante (fwd) ( <i>B. subtilis</i> ) (Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414)
FR98	5'-TTTTGAGCCTGGTGTGCC	Kontrollprimer <i>eno</i> - Mutante (rev) ( <i>B. subtilis</i> ) (Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414)
FR99	5'- GAGCCTGGTGTGCCGTTTAATTC TCCAAGGTATTGGTAAAGAGGAAT C	LFH-PCR <i>eno</i> - Mutante (rev) ( <i>B. subtilis</i> ) / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 und Aminosäurenaustausch an Position 405 bp (F <sup>136</sup> →L;G <sup>137</sup> →E)
FR100	5'- TGGAGAATTAACGGCACACCA GGCTCAAAAACGCTTCCTGTACC G	LFH-PCR <i>eno</i> - Mutante (fwd) ( <i>B. subtilis</i> ) / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 und Aminosäurenaustausch an Position 405 bp (F <sup>136</sup> →L;G <sup>137</sup> →E)
FR101	5'-CCTGGTGTGCCGTTTAATTC	Kontrollprimer <i>eno</i> - Mutante (rev) ( <i>B. subtilis</i> ) (Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 und Aminosäurenaustausch an Position 405 bp (F <sup>136</sup> →L;G <sup>137</sup> →E))
FR102	5'- AAAGAGCTCGATGCCATACATTGT TGATGTTTATGCACGCGAAG	Klonierung von <i>eno</i> in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR103	5'- TTTGGATCCTCATTACTTGTTTAAG TTGTAGAAAGAGTTGATA	Klonierung von <i>eno</i> in pGP172 (rev) / <i>BamHI</i>

FR104	5'- GAAAATCAAAAGGAGAGACAAA ACTCATGTCCAAAATCGTAAAAAT CATCGGTCG	LFH-Primer von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) mit komplementärer Sequenz zu der „upstream“ Region von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (fwd)
FR105	5'-GAGTTTTGTCTCTCCTTTTGAT TTTC	LFH-Primer der 5'-UTR von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit komplementärer Sequenz zu der „upstream“ Region von <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (fwd) (Komplementär zu FR104)
FR106	5'-AAAGAGCTCGACGTTACTACTC TATGGACC	LFH-PCR ( <i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ) <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) / „upstream“-Fragment (fwd) / 1000bp vor dem <i>eno</i> ATG / <i>SacI</i>
FR107	5'-CTGATTACAGAATCAGGCGAAC	Sepenzierprimer der <i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ) <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) Region
FR108	5'- AAAGAGCTCGATGAACATGCAAA TCACCAAATTCTC	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR109	5'-TTTGGATCCTCAGTGTTCTTTGC GCACG	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (rev) / <i>BamHI</i>
FR110	5'-AAAGAGCTCGATGATTCAGGC ATTTTAGCATCCC	Klonierung von <i>ptsI</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR111	5'- TTTGGATCCTTAGCAGATTGTTTTT TCTTCAATG	Klonierung von <i>ptsI</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (rev) / <i>BamHI</i>
FR112	5'-AAAGGATCCCTTGACTATGTTG ATGAAAAGCTC	Klonierung von 600 bp <i>glcT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR113	5'- TTTGTCTGACTGAAATTTTATTGGTT AATCGGTACAGATG	Klonierung von <i>glcT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR114	5'- AAAGGATCCCCGATCGAGTGTATG GAAG	Klonierung von 600 bp <i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (fwd) / <i>BamHI</i>

FR115	5'- TTT <u>GTCGACT</u> GCTTGTTTAACTAC CCTTTCTATG	Klonierung von <i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR116	5'- AAAGGATCCCTGAGCAAATTATCT CTCATGCC	Klonierung von 600 bp <i>sacY</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR117	5'- TTT <u>GTCGACG</u> CGTGCGACTGACC GTTG	Klonierung von <i>sacY</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR118	5'- AAAGGATCCGCTGAGGATATCATC AGCTATG	Klonierung von 600 bp <i>sacT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR119	5'- TTT <u>GTCGACT</u> TCCGAGAGATCTTG AAGACG	Klonierung von <i>sacT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1331 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR120	5'- AAAGCTAGCATGTTCCAGCAAGA AGTTACCATTAC	Klonierung von <i>ptsH</i> ( <i>E. coli</i> ) in pBGG190 (fwd) / <i>NheI</i>
FR121	5'- TTTT <u>CTAGATT</u> ACTCGAGTTCCGC CATCA	Klonierung von <i>ptsH</i> ( <i>E. coli</i> ) in pBGG190 (rev) / <i>XbaI</i>
FR122	5'- AAAGCTAGCATGTTCCAGTTATCC GTACAGG	Klonierung von <i>fruB</i> ( <i>E. coli</i> ) in pBGG190 (fwd) / <i>NheI</i>
FR123	5'- TTTT <u>CTAGATT</u> ATGCGCCCTCCCCA AG	Klonierung von <i>fruB</i> ( <i>E. coli</i> ) in pBGG190 (rev) / <i>XbaI</i>
FR124	5'- AAATCTAGATTGTCTCAGCAATCG ATACAAAAAGT	Klonierung von <i>pycA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP380 (fwd) / <i>XbaI</i>
FR125	5'- TTTGCATGCTTATGCTTTTTCAATT TCAAGGAGCAG	Klonierung von <i>pycA</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP380 (rev) / <i>SphI</i>

FR126	5'-GCACAGCTGAACCTGAAG	Sequenzierprimer von <i>ptsI</i> (fwd)
FR127	5'-GCGCAGTTCCTGTTTGTAG	Sequenzierprimer von <i>ptsI</i> (rev)
FR128	5'- AAAGCTAGCATGATTTTCAGGCATT TTAGCATCCCCGGGTATC	Klonierung von <i>ptsI</i> ( <i>E. coli</i> ) in pBGG190 (fwd) / <i>NheI</i>
FR129	5'- TTTTCTAGATTAGCAGATTGTTTTT TCTTCAATGAACTTGTTAACCAG	Klonierung von <i>ptsI</i> ( <i>E. coli</i> ) in pBGG190 (rev) / <i>XbaI</i>
FR130	5'- AAAGAGCTCGATGTTCCAGCAAG AAGTTACCATTAC	Klonierung von <i>ptsH</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR131	5'- TTTGGATCCTTACTCGAGTTCCGC CATCA	Klonierung von <i>ptsH</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (rev) / <i>BamHI</i>
FR132	5'- AAAGAGCTCGATGTTCCAGTTATC CGTACAGG	Klonierung von <i>fruB</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR133	5'- TTTGGATCCTTATGCGCCCTCCCC AAG	Klonierung von <i>fruB</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (rev) / <i>BamHI</i>
FR134	5'-AAAGGATCCCTCACTTATTTAA AGGAGGAAACAATCATGGATTATG ATAAATTATCGAAGGAC	Klonierung von <i>bglP</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit RBS von <i>gapA</i> in pBQ200 oder pGP382 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR135	5'-TTTGTTCGACAGATAAAGCAAGC AGCGCTTC	Klonierung von <i>bglP</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit RBS von <i>gapA</i> in pGP382 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR136	5'-GTTGGAACAGTGCTTGGCA	LFH-PCR ( <i>yjcK</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR137	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTTCGC TGGATTTTCGCTTTGCAGCCC	LFH-PCR ( <i>yjcK</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR138	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGGTTTGGGAGGATCATCAAGT C	LFH-PCR ( <i>yjcK</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)

FR139	5'-CTTTCAGTTCAGGCATGGC	LFH-PCR ( <i>yjcK</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR140	5'-CTTATGTGGTACCGCTGG	LFH-PCR ( <i>yjcK</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR141	5'-GTTCGGGGCATATGATTACAG	LFH-PCR ( <i>yjcK</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR142	5'-GTTATAACCGGTATAATAAGGG GA	LFH-PCR ( <i>ynaD</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR143	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTTCGC TGGATGTATACTCATATACTGCTTG C	LFH-PCR ( <i>ynaD</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR144	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGGGCAATGAATGGTGGGATG	LFH-PCR ( <i>ynaD</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR145	5'-GTAATTCAGTTACACGTAAGTC TC	LFH-PCR ( <i>ynaD</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR146	5'-GATCAATGAGTTGGTTTCACCT C	LFH-PCR ( <i>ynaD</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR147	5'-CATCCGCGGTCATCATAGA	LFH-PCR ( <i>ynaD</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR148	5'-ACCGCAGCTGAAGTGAAAG	LFH-PCR ( <i>yoaA</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR149	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTTCGC TGCGCATCCTGATCTGTGATTTG	LFH-PCR ( <i>yoaA</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR150	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGGGGACTCCATATGATACAAA TGTG	LFH-PCR ( <i>yoaA</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR151	5'-CTTCGTAAAAGGGTTAGGTTA CC	LFH-PCR ( <i>yoaA</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR152	5'-CTTTCCTCTGTTACGCAGG	LFH-PCR ( <i>yoaA</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR153	5'-GATGTTTATGGGGCTGTTGTTTT ATG	LFH-PCR ( <i>yoaA</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer

FR154	5'-TTT <u>GTCTGACTCAAGATAAAAGCA</u> AGCAGCGC	Klonierungsprimer von <i>bglP</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pBQ200 (rev) / <i>Sall</i>
FR155	5'-AAAGAGCTCGATGTCCAAAATC GTAAAATCATCGG	Klonierungsprimer von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR156	5'-TTT <u>GGATCCTTATGCCTGGCCTT</u> TGATCTC	Klonierungsprimer von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP172 (rev) / <i>BamHI</i>
FR157	5'-AAAGGATCCATGAACATGCAA ATCACCAAATTCTC	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP380 (fwd) / <i>BamHI</i>
FR158	5'-TTT <u>GTCTGACTCAGTGTTCTTTG</u> CGCACG	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP380 (rev) / <i>Sall</i>
FR159	5'-TTT <u>GTCTGACGTGTTCTTTGCGC</u> ACGCG	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) in pGP382 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>
FR160	5'-GATGCTGGCTACACTGCA	Sequenzierprimer von <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ) (fwd)
FR161	5'-CTGTTCGTGGAAGCGTTAC	Sequenzierprimer von <i>bglP</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (fwd)
FR162	5'-AAAGGATCCATGAAAATTGCGA AGGTGATCAACAAT	Klonierungsprimer von <i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (fwd) / <i>BamHI</i>
FR163	5'- TCGGTTCGTCACCGCGTTAAAGTT TTTC	CCR-Primer <i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) H207A (fwd)
FR164	5'- TCGCTGACCGACGCGATTAAC TTT GCC	CCR-Primer <i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ) H100A (fwd)
FR165	5'- CGCTAACTGACCTTTGCCAGTTTG C	CCR-Primer <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) H101L (fwd)
FR166	5'- AGCGACTGGTTACAGCTCTGAAG TTTTTATC	CCR-Primer <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) H208A (fwd)
FR167	5'-AGCTTCCGTCTTTCCCTGAT	Sequenzierprimer von <i>licT</i> (fwd)
FR168	5'-CCGTCTTTCCCTGATGATATTG	LFH-PCR ( <i>licT</i> -RAT-Mutante) „upstream“-Fragment (fwd)

FR169	5'-GCTGACAAGGCATCATTTGAAC	LFH-PCR ( <i>licT</i> -RAT-Mutante) / „upstream“-Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR170	5'- CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTG CATATGTGAATGTAAGAAAAAGTG AACAC	LFH-PCR ( <i>licT</i> -RAT-Mutante) / „upstream“-Fragment (rev) / <i>kan</i> - Fähnchen (grün)
FR171	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGCAGAGGGAAGATGATGATA GTTA	LFH-PCR ( <i>licT</i> -RAT-Mutante) / „downstream“-Fragment (fwd) / <i>kan</i> - Fähnchen (grün)
FR172	5'-CTTTCTAAATGTATGAGCTTGAT CG	LFH-PCR ( <i>licT</i> -RAT-Mutante) / „downstream“-Fragment (rev)
FR173	5'-GCGACCATCAAAAATTCACTAT TAAATG	LFH-PCR ( <i>licT</i> -RAT-Mutante) / „downstream“-Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR174	5'-GTACAGGCTCACCAGCAAAT	LFH-PCR ( <i>bglP</i> -RAT-Mutante) / „upstream“-Fragment (fwd)
FR175	5'-GGGATAAGTATGATGCTCACC	LFH-PCR ( <i>bglP</i> -RAT-Mutante) / „upstream“-Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR176	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTCGCG TGTGACGGGTCGTTTTATTTGTTT G	LFH-PCR ( <i>bglP</i> -RAT-Mutante) / „upstream“-Fragment (rev) / <i>kan</i> - Fähnchen (grün)
FR177	5'-ATATTTTACTGGATGAATTGTTT TAGTAAAGGAGGTGATGCAGCATT TGA	LFH-PCR ( <i>bglP</i> -RAT-Mutante) / „downstream“-Fragment (fwd) / <i>kan</i> - Fähnchen (grün) / Ohne Terminator
FR178	5'-CACAAAGGCATAGTGCATGC	LFH-PCR ( <i>bglP</i> -RAT-Mutante) / „downstream“-Fragment (rev)
FR179	5'-CGAAGGAAGACGGCAAATGA	LFH-PCR ( <i>bglP</i> -RAT-Mutante) / „downstream“-Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR180	5'-AAAGAGCTCGCTGGTTCGCGT GGTTCATGAACATGCAAATCACC	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) mit Thrombinschnittstelle (rot) in pGP172

	AAAATTCTC	(fwd) / <i>SacI</i>
FR181	5'-AAAGAGCTCGAAAGAAACCGC GGCGAAATTTGAACGTCAGCATAT GGATAGCATGAACATGCAAATCAC CAAAATTCTC	Klonierung von <i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ) mit N- Terminalen S-Tag (grün) in pGP172 (fwd) / <i>SacI</i>
FR182	5'- AGTGTTTGAGGCAATGGAATCATT	LFH-PCR ( <i>glcT</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR183	5'- CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTG GAAGCAATTAATACGTTATTATTCA GTACC	LFH-PCR ( <i>glcT</i> ) / „upstream“- Fragment (rev) / <i>kan</i> - Fähnchen (grün)
FR184	5'- CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTAT CGGTTTATCTGACGCTTCATCTGTA	LFH-PCR ( <i>glcT</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> - Fähnchen (grün)
FR185	5'-TTATAGCTGAAGAATTCATACCA GAAC	LFH-PCR ( <i>glcT</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR186	5'-TGAACGTACCTGCCGTTAAC	LFH-PCR ( <i>glcT</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR187	5'-CATTGCAGAGAAAGCCGGT	LFH-PCR ( <i>glcT</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR188	5'-GGAGGCGGAAGCGGCGGAGGC TCAATGGTTTCAAAGGCGAAGA ACTG	LFH-PCR ( <i>cfp</i> ) mit (GGGS) <sub>2</sub> -Überhang (rot) (fwd)
FR189	5'-GGAGGCGGAAGCGGCGGAGGC TCAATGGATTCAATAGAAAAGGTA AGCGAA	LFH-PCR ( <i>yfp</i> ) mit (GGGS) <sub>2</sub> -Überhang (rot) (fwd)
FR190	5'-GATTGTGGTTCCGACATTCAC	LFH-PCR ( <i>bglP</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR191	5'-CTTGTCTTCTGGGGTCAATTATT TG	LFH-PCR ( <i>bglP</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR192	5'-TGAGCCTCCGCCGCTTCCGCCT CCAGATAAAGCAAGCAGCGCTTC	LFH-PCR ( <i>bglP</i> ) mit (GGGS) <sub>2</sub> Überhang (rot) / „upstream“-Fragment (fwd)



FR193	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGAAAACTAATGGGGTGATCA ATATGAGTTC	LFH-PCR ( <i>bglP</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR194	5'-CCATTCTGATGATTTGAGGTAA GG	LFH-PCR ( <i>bglP</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR195	5'-CCTTGTCTACAGCGCCAA	LFH-PCR ( <i>bglP</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR196	5'-CAGGTGAAGCAGGAGATCTT	LFH-PCR ( <i>ptsH</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR197	5'-TATCACTCGTCTGCGTGTGA	LFH-PCR ( <i>ptsH</i> ) / „upstream“- Fragment (fwd)
FR198	5'-TGAGCCTCCGCCGCTTCCGCCT CCCTCGCCGAGTCCTTCGCT	LFH-PCR ( <i>ptsH</i> ) mit (GGGS) <sub>2</sub> Überhang (rot) / „upstream“-Fragment (fwd)
FR199	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGATGCAAGAATTAAAAGGGAT TGGTG	LFH-PCR ( <i>ptsH</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR200	5'-GTAAGGAAGCTCTTTGTCTCC	LFH-PCR ( <i>ptsH</i> ) / „downstream“- Fragment (rev)
FR201	5'-GCGAAGCTGTGTTCTGAAG	LFH-PCR ( <i>ptsH</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR202	5'-GCACGTTCTCTTGAGATTCCA	LFH-PCR ( <i>ptsI</i> ) / „upstream“-Fragment (fwd) → Sequenzierprimer
FR203	5'-CGATGTCATTATTGACCCATCTG	LFH-PCR ( <i>ptsI</i> ) / „upstream“-Fragment (fwd)
FR204	5'-TGAGCCTCCGCCGCTTCCGCCT CCCTTGAATGTTTCTTTTACGAAC GC	LFH-PCR ( <i>ptsI</i> ) mit (GGGS) <sub>2</sub> Überhang (rot) / „upstream“-Fragment (fwd)
FR205	5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGT ATCGTGTACAAAACCAGACGGC C	LFH-PCR ( <i>ptsI</i> ) / „downstream“- Fragment (fwd) / <i>kan</i> -Fähnchen (grün)
FR206	5'-GCTTATCAAGAGGTGAAGTTCC	LFH-PCR ( <i>ptsI</i> ) / „downstream“-

		Fragment (rev)
FR207	5'-CCCAGCCTTCATGAATATAAATC G	LFH-PCR ( <i>ptsI</i> ) / „downstream“- Fragment (rev) → Sequenzierprimer
FR208	5'-AAAGGATCCTAGAGCGATTCGT CTTTGCC	Klonierung von 600 bp <i>ptsI</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1871 (rev) / <i>BamHI</i>
FR209	5'-TTTGTCGACCTTGAATGTTTCTT TTACGAACGC	Klonierung von <i>ptsI</i> ( <i>B. subtilis</i> ) in pGP1871 (rev) / Ohne Stopcodon / <i>Sall</i>

### 6.3. Stämme

**Tab. 6.2.: Stämme**

Name	Genotyp	Konstruktion, Referenz
GP1201	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno</i> <i>B. subtilis</i> )	pGP1250 → 168
GP1202	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno</i> <i>E. coli</i> )	pGP1251 → 168
GP1203	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno-3×flag</i> <i>B. subtilis</i> )	pGP1252 → 168
GP1204	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno-3×flag</i> <i>E. coli</i> )	pGP1253 → 168
GP1205	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno</i> <i>B. subtilis</i> ) Δ <i>eno</i> :: <i>cat</i>	GP594 → GP1201
GP1206	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno</i> <i>E. coli</i> ) Δ <i>eno</i> :: <i>cat</i>	GP594 → GP1202
GP1207	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno-3×flag</i> <i>B. subtilis</i> ) Δ <i>eno</i> :: <i>cat</i>	GP594 → GP1203
GP1208	<i>trpC2 amyE</i> :: (P <sub>pgk</sub> :: <i>eno-3×flag</i> <i>E. coli</i> ) Δ <i>eno</i> :: <i>cat</i>	GP594 → GP1204
GP1209	<i>trpC2</i> Δ <i>acuC</i> :: <i>kan</i>	LFH → 168
GP1210	<i>trpC2</i> Δ <i>srtN</i> :: <i>cat</i>	LFH → 168
GP1211	<i>trpC2</i> Δ <i>acuA</i> :: <i>kan</i>	LFH → 168
GP1212	<i>trpC2</i> Δ <i>acsA</i> :: <i>kan</i>	LFH → 168
GP1213	<i>trpC2</i> Δ <i>acuC</i> :: <i>kan</i> Δ <i>srtN</i> :: <i>cat</i>	GP1210 → GP1209
GP1214	<i>trpC2 eno-3×flag</i> <i>spc</i>	pGP1264 → 168
GP1215	<i>trpC2 eno-strep</i> <i>spc</i>	pGP1265 → 168
GP1216	<i>trpC2 eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ) <i>spc</i>	pGP1277 → 168
GP1217	<i>trpC2 eno</i> ( <i>E. coli</i> ) <i>spc</i>	pGP1278 → 168
GP1218	<i>trpC2 eno-3×flag</i> ( <i>E. coli</i> ) <i>spc</i>	pGP1279 → 168
GP1219	<i>trpC2 eno-strep</i> ( <i>E. coli</i> ) <i>spc</i>	pGP1280 → 168

GP1220	<i>trpC2 glcT-3×flag spc</i>	pGP1281 → 168
GP1221	<i>trpC2 licT-3×flag spc</i>	pGP1282 → 168
GP1222	<i>trpC2 sacY-3×flag spc</i>	pGP1283 → 168
GP1223	<i>trpC2 sacT-3×flag spc</i>	pGP1284 → 168
GP1224	<i>trpC2 glcT-gfp spc</i>	pGP1291 → 168
GP1225	<i>trpC2 licT- gfp spc</i>	pGP1292 → 168
GP1226	<i>trpC2 sacY- gfp spc</i>	pGP1293 → 168
GP1227	<i>trpC2 sacT- gfp spc</i>	pGP1294 → 168
GP1228	<i>trpC2 glcT- yfp spc</i>	pGP1295 → 168
GP1229	<i>trpC2 licT- yfp spc</i>	pGP1296 → 168
GP1230	<i>trpC2 sacY- yfp spc</i>	pGP1297 → 168
GP1231	<i>trpC2 sacT- yfp spc</i>	pGP1298 → 168
GP1232	<i>trpC2 ΔptsG::cat glcT-3×flag spc</i>	GP1220 → GP474
GP1233	<i>trpC2 ΔptsG::cat glcT-gfp spc</i>	GP1224 → GP474
GP1234	<i>trpC2 ΔptsG::cat glcT-yfp spc</i>	GP1228 → GP474
GP1235	<i>trpC2 ΔbglP::ermC licT-3×flag spc</i>	GP1221 → GP475
GP1236	<i>trpC2 ΔbglP::ermC licT-gfp spc</i>	GP475 → GP1225
GP1237	<i>trpC2 ΔbglP::ermC licT-yfp spc</i>	GP1229 → GP475
GP1238	<i>trpC2 amyE::(ptsG-lacZ cat) glcT-3×flag spc</i>	GP1220 → QB7035
GP1239	<i>trpC2 amyE::(ptsG-lacZ cat) glcT-gfp spc</i>	GP1224 → QB7035
GP1240	<i>trpC2 amyE::(ptsG-lacZ cat) glcT-yfp spc</i>	GP1228 → QB7035
GP1241	<i>trpC2 amyE::(bglP-lacZ phl) licT-3×flag spc</i>	GP1221 → QB5335
GP1242	<i>trpC2 amyE::(bglP-lacZ phl) licT-gfp spc</i>	GP1225 → QB5335
GP1243	<i>trpC2 amyE::(bglP-lacZ phl) licT-yfp spc</i>	GP1229 → QB5335
GP1244	<i>trpC2 amyE::(ΔLA ptsG-lacZ cat) glcT::ΔK58-T215 (ΔglcT8)</i>	GP109 → QB7035
GP1245	<i>trpC2 amyE::(bglP-lacZ phl) ΔlicTS::ermC</i>	GP427 → QB5335
GP1246	<i>trpC2 ΔyjcK::cat</i>	LFH → 168
GP1247	<i>trpC2 ΔynaD::spc</i>	LFH → 168
GP1248	<i>trpC2 ΔyoaA::tet</i>	LFH → 168
GP1249	<i>trpC ΔacuA::kan ΔyjcK::cat</i>	LFH → GP1211
GP1250	<i>trpC ΔacuA::kan ΔynaD::spc</i>	LFH → GP1211
GP1251	<i>trpC ΔacuA::kan ΔyoaA::tet</i>	LFH → GP1211

GP1252	<i>trpC ΔacuA::kan ΔynaD::spec ΔyooA::tet</i>	GP1247 → GP1251
GP1253	<i>trpC ΔacuA::kan ΔyjcK::cat ΔynaD::spc</i>	GP1247 → GP1246
GP1254	<i>trpC ΔacuA::kan ΔyjcK::cat ΔyooA::tet</i>	GP1248 → GP1249
GP1255	<i>trpC ΔacuA::kan ΔyjcK::cat ΔynaD::spc ΔyooA::tet</i>	GP1248 → GP1253
GP1256	<i>trpC2 ptsI::ermC licT-gfp spc</i>	pGP1292 → GP864
GP1257	<i>ΔptsH ::cat licT-gfp spc</i>	pGP1292 → MZ303
GP1258	<i>trpC2 licT (H100A) -gfp spc</i>	pGP1306 → 168
GP1259	<i>trpC2 licT (H207A) -gfp spc</i>	pGP1307 → 168
GP1260	<i>trpC2 licT (H100A/ H207A) -gfp spc</i>	pGP1308 → 168
GP1261	<i>trpC2 ΔRAT<sub>bglS</sub>::cat</i>	LFH → 168
GP1262	<i>trpC2 ΔRAT<sub>bglP</sub>::kan</i>	LFH → 168
GP1263	<i>trpC2 ΔRAT<sub>bglS</sub>::cat ΔRAT<sub>bglP</sub>::kan</i>	GP1262 → GP1261
GP1264	<i>trpC2 ΔRAT<sub>bglS</sub>::cat ΔRAT<sub>bglP</sub>::kan licT-gfp spc</i>	pGP1292 → GP1263
GP1265	<i>trpC2 ΔRAT<sub>bglS</sub>::cat licT-gfp spc</i>	pGP1292 → GP1261
GP1266	<i>trpC2 bglP-cfp ermC (ohne Terminator)</i>	LFH → 168
GP1267	<i>trpC2 ptsH-cfp ermC (ohne Terminator)</i>	LFH → 168
GP1268	<i>trpC2 ptsI-cfp ermC</i>	LFH → 168
GP1269	<i>trpC2 bglP-cfp ermC (ohne Terminator) licT-yfp spc</i>	pGP1296 → GP1266
GP1270	<i>trpC2 ptsH-cfp ermC (ohne Terminator) licT-yfp spc</i>	pGP1296 → GP1267
GP1271	<i>trpC2 ptsI-cfp ermC licT-yfp spc</i>	pGP1296 → GP1268
GP1272	<i>trpC2 bglP-cfp ermC (ohne Terminator) ptsI-yfp spc</i>	pGP1323 → GP1266
GP1273	<i>trpC2 ptsH-cfp ermC (ohne Terminator) ptsI-yfp spc</i>	pGP1323 → GP1267
GP1274	<i>trpC2 bglP-yfp ermC (ohne Terminator)</i>	LFH → 168
GP1275	<i>trpC2 ptsH-yfp ermC (ohne Terminator)</i>	LFH → 168
GP1276	<i>trpC2 ptsI-yfp ermC</i>	LFH → 168

---

**Tab. 6.3.: Fremdstämme**
*E. coli*

Name	Genotyp	Paper bzw. erhalten von
BTH101	F <sup>-</sup> , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galk16</i> , <i>rspL1</i> (Str <sup>r</sup> ), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Euromedex, BACTH-System D.Ladant, PNAS , 95, 5752-5756
BL21	F, <i>lon ompT r<sub>BMB</sub> hsdS gal(cI<sub>857</sub> indl</i> Sam7 <i>nin5 lacUV5-T7 gene1</i> )	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
DH5α	<i>80dlacZΔM15</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK,mK+</i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR,ΔlacZYAargF)U169</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
FT1	F, <i>lon ompT r<sub>BMB</sub> hsdS gal(cI<sub>857</sub> indl</i> Sam7 <i>nin5 lacUV-T7 gene1</i> ) Δ ( <i>ptsHI</i> <i>crr</i> )	(Parche <i>et al.</i> , 1999)
RL257	F <sup>-</sup> , [ <i>araD139</i> ], <i>lacIp-4000(lacI<sup>Q</sup>)</i> , <i>e14-</i> , <i>pfkB205(del-ins)::FRT</i> , <i>flhD5301</i> , Δ( <i>fruK-yeiR</i> )725( <i>fruA25</i> ), <i>relA1</i> , <i>rpsL150(strR)</i> , <i>rbsR22</i> , <i>pfkA203(del-</i> <i>ins)::FRT</i> , Δ( <i>fimB-fimE</i> )632( <i>::IS1</i> ), <i>deoC1</i>	(Lovingshimer <i>et al.</i> , 2006)
TM447	<i>cat-P<sub>BAD</sub>-eno</i>	(Morita <i>et al.</i> , 2005)
W3110	F <sup>-</sup> lambda <sup>-</sup> IN( <i>rrnD-rrnE</i> )1 <i>rph-1</i>	(Bachmann, 1972)
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> (F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ZΔ</i> (M15 Tn10 ( <i>Tet<sup>R</sup></i> ))	Stratagene
XL1 Red	<i>endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> ; <i>relA1 lac mutD5 mutS mutT Tn10 (tet<sup>r</sup>)</i>	Stratagene
X L10 Gold	Tet <sup>R</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> Tn10 ( <i>Tet<sup>R</sup></i> ) Amy Cam <sup>R</sup> ]	Stratagene

**B. subtilis**

168	<i>trpC2</i>	Laborsammlung
GP59	<i>trpC2 ΔlicT::cat</i>	(Hübner, 2008)
GP109	<i>trpC2 amyE::(ΔLA ptsG-lacZ aphA3) glcT::ΔK58-T215 (ΔglcT8)</i>	(Bachem & Stülke, 1998)
GP202	<i>ptsK::spc</i>	(Hanson <i>et al.</i> , 2002)
GP302	<i>trpC2 ccpA::Tn917 ermC</i>	(Ludwig & Stülke, 2001)
GP427	<i>trpC2 ΔlicTS::ermC</i>	(Schilling <i>et al.</i> , 2006)
GP474	<i>trpC2 ΔptsG::cat</i>	(Schilling, 2007)
GP475	<i>trpC2 ΔbglP::ermC</i>	(Schilling, 2007)
GP507	<i>trpC2 ptsH1 S46A, amyE::(gltA-lacZ aphA3)</i>	(Schmalisch, 2004)
GP583	<i>trpC2 ΔymdB::spc</i>	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
GP589	<i>trpC2 Δpyk::cat</i>	(Pietack, 2010)
GP590	<i>trpC2 ΔpfkA::cat</i>	(Pietack, 2010)
GP593	<i>trpC2 Δpgm::cat</i>	(Pietack, 2010)
GP594	<i>trpC2 Δeno::cat</i>	(Pietack, 2010)
GP699	<i>trpC2 Δpgk::cat</i>	(Arnold, 2009)
GP700	<i>trpC2 ΔtpiA::cat</i>	(Arnold, 2009)
GP778	<i>trpC2 ΔglcT-ΔptsGHI::spc</i>	(Himmel <i>et al.</i> , 2012)
GP864	<i>trpC2 ptsI::ermC</i>	(Singh <i>et al.</i> , 2008)
GP1010	<i>trpC2 cshA-3×flag spc</i>	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2012)
GP1019	<i>trpC2 pfkA-3×flag spc</i>	(Lehnik-Habrink, 2011)
GP1032	<i>trpC2 cshA-strep aphA3 ytsJ-3×flag spc</i>	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2012)
GP1131	<i>trpC2 ytsJ-3×flag spc</i>	(Meyer <i>et al.</i> , 2011)
MZ303	<i>ΔptsH::cat</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 1992)
QB5335	<i>trpC2 amyE::(bglP-lacZ phl)</i>	(Stülke <i>et al.</i> , 1997)
QB5350	<i>trpC2 ptsH-H15A amyE::(levD-lacZ aphA3)</i>	(Stülke <i>et al.</i> , 1995)
QB5448	<i>trpC2 amyE::(ΔLA ptsG'-lacZ aphA3)</i>	(Stülke <i>et al.</i> , 1997)
QB7035	<i>trpC2 amyE::(ΔLA ptsG'-lacZ cat)</i>	(Stülke <i>et al.</i> , 1997)

#### 6.4. Plasmide

**Tab. 6.4.: Plasmide**

Name	Vektor	Insert (Reference)
pGP1243	pAC7/ BamHI + EcoRI	Promotorregion von <i>pgk</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit neuer MCS, FR35 + FR43
pGP1244	pAC7/ BamHI + EcoRI	LFH-Prod. von <i>pgk</i> ( <i>B. subtilis</i> ) mit neuer MCS und 3× <i>flag</i> , FR35 + FR43 - FR44 + FR38
pGP1245	pUT18/ KpnI + XbaI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR27 + FR30 von chr. DNA
pGP1246	pUT18C/ KpnI + XbaI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR27 + FR30 von chr. DNA
pGP1247	p25-N/ KpnI + XbaI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR27 + FR30 von chr. DNA
pGP1248	pKT25/ KpnI + XbaI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR27 + FR30 von chr. DNA
pGP1249	pBQ200/ BamHI + Sall	<i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ), FR51 + FR52 von chr. DNA
pGP1250	pGP1243/ BamHI + EcoRI	<i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR48 + FR49 von chr. DNA
pGP1251	pGP1243/ BamHI + EcoRI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR45 + FR46 von chr. DNA
pGP1252	pGP1244/ BamHI + EcoRI	<i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR48 + FR50 von chr. DNA
pGP1253	pGP1244/ BamHI + EcoRI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR45 + FR47 von chr. DNA
pGP1254	pUT18/ KpnI + XbaI	<i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ), FR53 + FR54 von chr. DNA
pGP1255	pUT18C/ KpnI + XbaI	<i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ), FR53 + FR54 von chr. DNA
pGP1256	pKT25/ KpnI + XbaI	<i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ), FR53 + FR54 von chr. DNA
pGP1257	p25-N/ KpnI + XbaI	<i>pfkA</i> ( <i>E. coli</i> ), FR53-FR54 von chr. DNA
pGP1258	pGP1370/ BamHI + Sall	<i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), NP158 + FR86 von chr. DNA
pGP1259	pGP1370/ BamHI + Sall	<i>gapA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), NP139 + FR91 von chr. DNA
pGP1260	pGP1370/ BamHI + Sall	<i>tpiA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), MA12 + FR87 von chr. DNA
pGP1261	pGP1370/ BamHI + Sall	<i>pgk</i> ( <i>B. subtilis</i> ), MA14 + FR89 von chr. DNA
pGP1262	pGP1370/ BamHI + Sall	<i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ), MA4 + FR88 von chr. DNA
pGP1263	pGP1370/ BamHI + Sall	<i>pfkA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), NP157 + ML56 von chr. DNA
pGP1264	pGP1331/ BamHI + Sall	600 bp <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR90 + FR86 von chr. DNA (Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2011)
pGP1265	pGP1389/ BamHI + Sall	600 bp <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR90 + FR86 von chr. DNA
pGP1266	pGP382/ BamHI + Sall	<i>pfkA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), NP157 + ML56 von chr. DNA
pGP1267	pGP1389/ BamHI + Sall	600 bp <i>pfkA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), ML57 + ML56 von chr. DNA
pGP1268	pGP1331/ BamHI + Sall	600 bp <i>gapA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR92 + FR91 von chr. DNA

pGP1269	pGP1389/ BamHI + SalI	600 bp <i>gapA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR92 + FR91 von chr. DNA
pGP1270	pBlueskript II KS+ / BamHI + PstI	LFH-Prod. <i>eno</i> -Mutante ( <i>B.subtilis</i> ) / Insertion von 12 bp ( AA→AWCA) an Position 414, FR93 + FR96
pGP1271	pBlueskript II KS+ / BamHI + PstI	LFH-Prod. <i>eno</i> -Mutante ( <i>B.subtilis</i> ) / Insertion von 12 bp ( AA→AWCA) an Position 414 und Aminosäureaustausch (F <sup>136</sup> →L;G <sup>137</sup> →E) an Position 405, FR93 + FR96
pGP1272	pBQ200/ BamHI + SalI	<i>eno</i> -Mutante ( <i>B.subtilis</i> ) von pGP1270 / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414, NP158 + EW14
pGP1273	pBQ200/ BamHI + SalI	<i>eno</i> - Mutante von pGP1271 / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 und Aminosäureaustausch (F <sup>136</sup> →L;G <sup>137</sup> →E) an Position 405 bp ( <i>B.subtilis</i> ), NP158 + EW14
pGP1274	pGP172/ BamHI + SacI	<i>eno</i> - Mutante von pGP1270 / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 ( <i>B.subtilis</i> ), FR102 + FR103
pGP1275	pGP172/ BamHI + SacI	<i>eno</i> - Mutante von pGP1271 / Insertion von 12 bp (AA→AWCA) an Position 414 und Aminosäureaustausch (F <sup>136</sup> →L;G <sup>137</sup> →E) an Position 405 bp ( <i>B. subtilis</i> ), FR102 + FR103
pGP1276	pGP172/ BamHI + SacI	<i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR102 + FR103 von chr. DNA
pGP1277	pUS19/ BamHI + SacI	LFH von <i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ) + <i>eno</i> ( <i>E.coli</i> ), FR106 + FR46
pGP1278	pUS19/ BamHI + SacI	<i>pgm</i> ( <i>B.subtilis</i> ) + <i>eno</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR106 + FR49 von chr. DNA
pGP1279	pGP1331/ BamHI + SacI	LFH von <i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ) + <i>eno</i> ( <i>E.coli</i> ), FR106 + FR47
pGP1280	pGP1389/ BamHI + SacI	LFH von <i>pgm</i> ( <i>B. subtilis</i> ) + <i>eno</i> ( <i>E.coli</i> ), FR106 + FR47



pGP1281	pGP1331/ BamHI + Sall	<i>glcT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR112 + FR113 von chr. DNA
pGP1282	pGP1331/ BamHI + Sall	<i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR114 + FR115 von chr. DNA
pGP1283	pGP1331/ BamHI + Sall	<i>sacY</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR116 + FR117 von chr. DNA
pGP1284	pGP1331/ BamHI + Sall	<i>sacT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR118 + FR119 von chr. DNA
pGP1285	pGP172/BamHI + SacI	<i>ptsI</i> ( <i>E. coli</i> ), FR108 + FR109 von chr. DNA
pGP1286	pGP172/BamHI + SacI	<i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ), FR110 + FR111 von chr. DNA
pGP1287	pBGG190/NheI + XbaI	<i>ptsH</i> ( <i>E. coli</i> ), FR120 + FR121 von chr. DNA
pGP1288	pBGG190/NheI + XbaI	<i>fruB</i> ( <i>E. coli</i> ), FR122 + FR123 von chr. DNA
pGP1289	pGP380/ XbaI + SphI	<i>pycA</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR124 + FR125 von chr. DNA
pGP1290	pGP382/ BamHI + Sall	<i>bglP</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR134 + FR135 von chr. DNA
pGP1291	pGP1870/ BamHI + SacI	<i>glcT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR112 + FR113 von chr. DNA
pGP1292	pGP1870/ BamHI + SacI	<i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR114 + FR115 von chr. DNA
pGP1293	pGP1870/ BamHI + SacI	<i>sacY</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR116 + FR117 von chr. DNA
pGP1294	pGP1870/ BamHI + SacI	<i>sacT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR118 + FR119 von chr. DNA
pGP1295	pGP1871/ BamHI + SacI	<i>glcT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR112 + FR113 von chr. DNA
pGP1296	pGP1871/ BamHI + SacI	<i>licT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR114 + FR115 von chr. DNA
pGP1297	pGP1871/ BamHI + SacI	<i>sacY</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR116 + FR117 von chr. DNA
pGP1298	pGP1871/ BamHI + SacI	<i>sacT</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR118 + FR119 von chr. DNA
pGP1299	pBGG190/NheI + XbaI	<i>ptsI</i> ( <i>E. coli</i> ), FR128 + FR129 von chr. DNA
pGP1300	pBQ200/ BamHI + Sall	<i>bglP</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR134 + FR154 von chr. DNA
pGP1302	pGP172/ BamHI + SacI	<i>eno</i> ( <i>E. coli</i> ), FR155 + FR156 von chr. DNA
pGP1303	pGP380/ BamHI + Sall	<i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ), FR157 + FR158 von chr. DNA
pGP1305	pGP382/ BamHI + Sall	<i>bglG</i> ( <i>E. coli</i> ), FR157 + FR159 von chr. DNA
pGP1306	pGP1870/ BamHI + Sall	<i>licT</i> (H100A) ( <i>B. subtilis</i> ), FR162 + FR164 + FR115 (CCR)
pGP1307	pGP1870/ BamHI + Sall	<i>licT</i> (H207A) ( <i>B. subtilis</i> ), FR162 + FR163 + FR115 (CCR)
pGP1308	pGP1870/ BamHI + Sall	<i>licT</i> (H100A und H207A) ( <i>B. subtilis</i> ), FR162 + FR163 + FR115 (CCR)
pGP1309	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H208A) ( <i>E. coli</i> ), FR110 + FR111
pGP1310	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H101L) ( <i>E. coli</i> ), FR110 + FR111
pGP1311	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H208A und H101L) ( <i>E. coli</i> ), FR110 + FR111 (CCR)

pGP1312	pGP380/ BamHI + SalI	<i>bglG</i> (H208A) ( <i>E. coli</i> ), FR157 + FR158 (CCR)
pGP1313	pGP380/ BamHI + SalI	<i>bglG</i> (H101L) ( <i>E. coli</i> ), FR157 + FR158 (CCR)
pGP1314	pGP380/ BamHI + SalI	<i>bglG</i> (H208A und H101L) ( <i>E. coli</i> ), FR157 + FR158 (CCR)
pGP1315	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> mit N-terminaler Thrombinschnittstelle ( <i>E. coli</i> ), FR180 + FR111
pGP1316	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H208A) mit N-terminaler Thrombinschnittstelle ( <i>E. coli</i> ), FR180 + FR111
pGP1317	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H101L) mit N-terminaler Thrombinschnittstelle ( <i>E. coli</i> ), FR180 + FR111
pGP1318	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H208A und H101L) mit N-Terminaler Thrombinschnittstelle ( <i>E. coli</i> ), FR180 + FR111
pGP1319	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> mit N-terminalem S-Tag ( <i>E. coli</i> ), FR181 + FR111
pGP1320	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H208A) mit N-terminalem S-Tag ( <i>E. coli</i> ), FR181 + FR111
pGP1321	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H101L) mit N-terminalem S-Tag ( <i>E. coli</i> ), FR181 + FR111
pGP1322	pGP172/ BamHI + SacI	<i>bglG</i> (H208A und H101L) mit N-terminalem S-Tag ( <i>E. coli</i> ), FR181 + FR111
pGP1323	pGP1871/ BamHI + SalI	600 bp <i>ptsI</i> ( <i>B. subtilis</i> ), FR208 + FR209

**Tab. 6.5.: Fremdplasmide**

Name	Zweck	Paper bzw. erhalten von
pAC7	Translationale Promotor- <i>lacZ</i> Fusion, Rekombination in <i>amyE</i> -Lokus	(Weinrauch <i>et al.</i> , 1991)
pAG3	Ap <sup>R</sup> , pQE30-Derivat, His <sub>6</sub> -EI ( <i>B. subtilis</i> ) mit T5 Promotor, <i>ori</i> ColEI	(Galinier <i>et al.</i> , 1997)
pBGG190	His <sub>10</sub> - <i>ptsN</i> ( <i>E. coli</i> ) unter Kontrolle von P <sub><i>tac</i></sub> , <i>bla</i> , <i>ori</i> ColEI	(Mahadevan & Wright, 1987)
pBlueskript II KS+	Klonierungsvektor	(Stratagene)

---

pBP19	<i>yfp</i> mit 2xStop für C-Terminale YFP-Fusion für <i>lacA::ermC</i>	(Gunka, unveröffentlicht)
pBP20	<i>cfp</i> mit 2xStop für C-Terminale YFP-Fusion für <i>lacA::ermC</i>	(Gunka, unveröffentlicht)
pBQ200	Überproduktion von Proteinen in <i>B. subtilis</i>	(Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1994)
pDG646	Amplifikation der Erythromycin - Resistenzkassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995)
pDG780	Amplifikation der Kanamycin- Resistenzkassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995)
pFDX3780	<i>bglG</i> - (H101L Mutation) + <i>bglF</i> unter $P_{tac}$ Kontrolle; MCS zwischen <i>bglG</i> und <i>bglF</i> ( <i>tet</i> , <i>ori</i> , p15A)	(Görke, 2003)
pFDX4221	<i>bglG</i> - (H208A Mutation) + <i>bglF</i> unter $P_{tac}$ Kontrolle; MCS zwischen <i>bglG</i> und <i>bglF</i> ( <i>tet</i> , <i>ori</i> , p15A)	(Görke, 2003)
pGEM-cat	Amplifikation der Chloramphenicol- Resistenzkassette	(Thorsten Mascher)
pGP87	pGP380+ <i>pfkA</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP88	pGP380+ <i>fbaA</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP89	pGP380+ <i>tpiA</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP90	pGP380+ <i>gapA</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP91	pGP380+ <i>pgk</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP92	pGP380+ <i>pgm</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP93	pGP380+ <i>eno</i>	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP172	Überexpression von N-terminalen Strep-Tag Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BL21	(Merzbacher <i>et al.</i> , 2004)
pGP380	Überproduktion von N-terminalen Strep-Tag Fusionsproteinen in <i>B. subtilis</i>	(Herzberg <i>et al.</i> , 2007)
pGP382	Überproduktion von N-terminalen Strep-Tag Fusionsproteinen in <i>B. subtilis</i>	(Herzberg <i>et al.</i> , 2007)
pGP399	pBQ200+ <i>eno</i> ( <i>E. coli</i> )	(Pietack, 2010)
pGP438	pGP172+ <i>ptsH</i> ( <i>B. subtilis</i> ) (HPr mit	(Rothe <i>et al.</i> , 2012)

---

---

	Strep-Tag)	
pGP902	pGP172+rocG	(Commichau <i>et al.</i> , 2007)
pGP972	pUT18+eno	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP973	pUT18C+eno	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP979	pKT25+rny	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP1062	pAC6+pgk Promotor + ymdB	(Diethmaier, 2008)
pGP1107	pUT18+pfk	(Commichau <i>et al.</i> , 2009)
pGP1331	Integrations-Plasmid für 3xFLAG-Tag	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2010)
	Proteine	
pGP1370	pBQ200+3xFLAG-Tag	(Diethmaier <i>et al.</i> , 2011)
pGP1389	pUS19+Strep-Tag (PstI/HindIII)	(Lehnik-Habrink <i>et al.</i> , 2011)
pGP1410	pGP382+pyk	(Pietack, 2010)
pGP1411	pBQ200+pyk	(Pietack, 2010)
pGP1422	pBQ200+pfk	(Pietack, 2010)
pGP1424	pBQ200+gapA	(Pietack, 2010)
pGP1426	pBQ200+eno	(Pietack, 2010)
pGP1500	pBQ200+pgm/eno	(Pietack, 2010)
pGP1870	pUS19+gfp spc	(Lehnik-Habrink, 2011)
pGP1871	pUS19+yfp spc	(Lehnik-Habrink, 2011)
pKT25	Kan <sup>R</sup> C-terminale T25-Fusion (Two Hybrid)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pKT25zip	Kan <sup>R</sup> Kontrollplasmid mit Leucin-Zipper am T25-Fragment von pKT25 fusioniert (Two Hybrid)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
p25-N	Kan <sup>R</sup> N-terminale T25-Fusion (Two Hybrid)	(Claessen <i>et al.</i> , 2008)
pUS19	Integrationsplasmid	(Benson & Haldenwang, 1993)
pUT18	Amp <sup>R</sup> N-terminale T18-Fusion (Two Hybrid)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18C	Amp <sup>R</sup> C-terminale T18-Fusion (Two Hybrid)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18zip	Amp <sup>R</sup> Kontrollplasmid mit Leucin-Zipper am T25-Fragment von pUT18	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)

---

---

 fusioniert (Two Hybrid)
 

---

## 6.5. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

**Tab. 6.6.: Internetangebote**

URL	Anbieter	Anwendung
<a href="http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/">http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/</a>	Institut Pasteur, Paris	Sequenzrecherche im Genom von <i>B. subtilis</i>
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Literraturrecherche
<a href="http://www.molecularcloning.com">http://www.molecularcloning.com</a>	Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA	Molekularbiologische Protokolle
<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>	New England Biolabs	Erkennung von Restriktionsschnittstellen
<a href="http://subtiwiki.uni-goettingen.de/">http://subtiwiki.uni-goettingen.de/</a>	Institut für allgemeine Mikrobiologie der Universität Göttingen	Sequenzrecherche und Informationen über <i>B. subtilis</i>
<a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a>	RCSB	Proteindatenbank
<a href="http://dbtbs.hgc.jp/">http://dbtbs.hgc.jp/</a>	Human Genome Center, Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo	Informationen über regulierte Operons und Transkriptionsfaktoren
<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	European Bioinformatics Institute	Erstellen von Alignments
<a href="http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html">http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html</a>	University of Pittsburgh	Primer Herstellung

---

<a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>	Swiss Institute of Bioinformatics	Modifizieren von Alignments
<a href="http://ecocyc.org/">http://ecocyc.org/</a>	SRI International	Sequenzrecherche und Informationen über <i>E. coli</i>

---

**Tab. 6.7.: Computerprogramme**


---

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Geneious 5.0.4	Biomatters Ltd.	Auswertung von Sequenzierdateien
Bio1D	Vilber Lourmat	Auswertung von Chemilumineszenzsignalen
Microsoft Office XP	Microsoft Inc.	Text- und Datenverarbeitung
PubMed		Literaturrecherche
EndNote x5	ISI ResearchSoft	Literaturrecherche und -verwaltung
ImageQuant Tools Vers. 3.0	Amersham Bioscience	Bildbearbeitung von Phosphorylierungs Daten
Image J		Quantifizierung von Northern Blots
Axio Vision Software Rel 4,8	Zeiss	Bearbeitung von Mikroskopischen Aufnahmen

---