

**Die Rolle von Chaperonen und Proteasen in  
hitzeinduzierter Proteinaggregation  
und Stressantwort in *Bacillus subtilis*.**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Stephanie Cornelia Runde**

aus München

2014

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 1. September 2009 bis zum 31. Juli 2013 am Institut für Pflanzenphysiologie, Pflanzenbiochemie und Mikrobiologie der FU Berlin unter der Anleitung von Prof. Dr. Kürşad Turgay durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Kürşad Turgay

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 25. April 2014

*Für Marie und Dominik*

## Zusammenfassung

Durch Hitze ausgelöster Stress führt zur Fehlfaltung und Aggregation von zellulären Proteinen. Inwiefern das Proteinqualitätskontrollsystem bestehend aus Proteasen und Chaperonen das Gleichgewicht zwischen gefalteten und beschädigten, fehlgefalteten oder sogar aggregierten Proteinen unter Hitzestressbedingungen wiederherstellt, ist von großem Interesse.

In diesem Sinne wurde in dem Modellorganismus *Bacillus subtilis* die Thermotoleranzentwicklung im Hinblick auf die Entstehung von Proteinaggregaten in stark hitzestressenden Zellen, die zuvor einem milden Hitzeschock ausgesetzt worden waren, untersucht. Zellen, in denen das ClpXP-Proteasesystem fehlte, wiesen deutlich weniger hitzeinduzierte Proteinaggregate auf, während Chaperone wie DnaK oder die AAA+ ATPase ClpC nur wenig Einfluss darauf hatten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Spx, der durch das ClpXP Proteasesystem reguliert wird, eine bedeutende Rolle für die Thermotoleranzentwicklung spielt, indem er die Expression redoxaktiver Enzyme, wie zum Beispiel Thioredoxin veranlasst. Demzufolge waren anaerob wachsende *B. subtilis* Zellen unter starker Hitzeeinwirkung weniger anfällig gegenüber Proteinaggregation als Zellen, die Sauerstoff ausgesetzt waren.

Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, dass der Schutz fehlgefalteter Proteine vor Oxidation eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Proteinaggregation unter Hitzestress spielt.

Molekulare Chaperone, wie zum Beispiel Hsp90, scheinen in Eukaryoten einen bedeutenden Einfluss auf die Evolution zu haben, indem sie in der Lage sind als genetischer Puffer zu agieren, um Organismen trotz genetischer Variation eine normale Entwicklung zu ermöglichen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin, das Chaperon HtpG aus *B. subtilis*, welches das bakterielle Homolog zu Hsp90 darstellt, genauer zu betrachten und im Hinblick auf seine Rolle in evolutionären Prozessen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Anwesenheit von HtpG und ClpC notwendig für die Aufrechterhaltung des Wachstums sowohl unter normalen, als auch unter Hitzestressbedingungen ist. Wechselwirkungen konnten jedoch nicht mit ClpC, dafür mit Stoffwechselproteinen, mit ribosomalen Proteinen, Triggerfaktor und der RNA-Polymerase nachgewiesen werden. Ein Einfluss von HtpG auf die Adaptation an einen bestimmten exogenen oder endogenen Stress

konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Auch wurde ausgeschlossen, dass HtpG Auswirkungen auf bistabile Systeme in *B. subtilis* hat.

Mit den hier gezeigten Ergebnissen ist eine endgültige Aussage über die Bedeutung von HtpG in *B. subtilis* und dementsprechend dessen Rolle in evolutionären Prozessen ohne weitere Studien nicht möglich.

## Abstract

Heat induced stress leads to misfolding and aggregation of cellular proteins. It is of great interest how the quality control system, consisting of proteases and chaperones, restores the balance between folded and damaged, misfolded or even aggregated proteins under heat stress conditions.

According to that, thermotolerance development regarding the formation of protein aggregates in severely heat shocked cells primed by a mild heat shock, using *Bacillus subtilis* as model organism, was examined. Cells lacking the ClpXP protease system showed significantly less heat induced protein aggregates whereas chaperones like DnaK or the AAA+ ATPase ClpC revealed only little influence. In this thesis it was confirmed that the transcription factor Spx, regulated by ClpXP, is important for thermotolerance development by initiating the expression of redoxactive enzymes, such as thioredoxin. Consequently, *B. subtilis* cells growing anaerobic were less vulnerable to protein aggregation under severe heat stress than cells exposed to oxygen.

The presented data suggest that protection of misfolded proteins from thiol oxidation during heat stress plays a significant role in prevention of protein aggregation.

Within eukaryotes, molecular chaperons like Hsp90, seem to greatly influence evolutionary processes evolution by acting as a genetic buffer to enable organisms having a normal development despite of genetic variation.

Another aspect of this work was the analysis of the chaperone HtpG in *B. subtilis*, which is the bacterial homolog to Hsp90 and studying its impact on evolutionary processes. It was shown that the simultaneous presence of HtpG and ClpC is necessary for maintaining growth under normal as well as heat stress conditions. However, no interaction was revealed with ClpC but with housekeeping and ribosomal proteins, trigger factor and RNA polymerase. An influence of HtpG on the adaptation to a distinct exogenic and endogenic stress could not be clearly determined. Also, HtpG playing a role in bistable systems was excluded.

In conjunction with the presented results, a conclusive statement about the significance of HtpG for the bacterial cell and accordingly its role regarding evolutionary processes in *B. subtilis* can't be made without further study.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAA+	ATPase assoziiert mit verschiedenen Aktivitäten
AB-3	3x Acrylamid-Bisacrylamid
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CFP	„cyan fluorescent protein“
CFU	Koloniebildende Einheit
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat
CTD/C-Terminus	Carboxyterminale Region
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
G	Guanosin
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
LB	„lysogeny broth“
MDH	Malatdehydrogenase
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

Ni-NTA	Nickel Nitrilotriessigsäure
NTD/N-Terminus	Aminoterninale Region
OD	optische Dichte (Extinktion)
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	DNA-abhängige RNA-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
STM	Saccharose-Tris-Magnesium
T	Thymidin
TAE	Trisacetat EDTA
TBS	Mit Tris gepufferte Salzlösung
TBS-M	TBS mit Milch
TBS-T	TBS mit Tween
TCA	Trichloroesigsäure
TE	Tris EDTA
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyl Ethylen Diamin
TES	Tris EDTA Salz
TM	Tris Magnesium
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	„yellow fluorescent protein“

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Zelluläre Stressantwort in Bakterien</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Hitzeschockantwort in <i>B. subtilis</i> .....	2
1.1.2 Oxidative Stressantwort.....	18
1.1.3 Stressantwort auf hochosmolare Umweltbedingungen.....	24
<b>1.2 Die Rolle von Chaperonen in der Evolution</b> .....	<b>27</b>
1.2.1 Experimentelle Evolution .....	27
1.2.2 Bistabilität.....	31
1.2.3 Hsp90 und seine Rolle in der Evolution .....	33
<b>1.3 Zielsetzung</b> .....	<b>36</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>38</b>
2.1.1 Chemikalien.....	38
2.1.2 Enzyme .....	41
2.1.3 Antikörper.....	42
2.1.4 Größenstandards und Kits .....	42
2.1.5 Chromatographie-Säulen .....	42
2.1.6 Sonstige Materialien .....	43
2.1.7 Geräte .....	43
2.1.8 Organismen.....	46
2.1.9 Plasmide .....	49
2.1.10 Oligonukleotide.....	51
2.1.11 Nährmedien .....	53
2.1.12 Antibiotika.....	54
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>55</b>
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	55
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	58
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	70
2.2.4 Mikroskopie.....	87
2.2.5 Experimentelle Evolution .....	87

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>92</b>
<b>3.1</b>	<b>Thermotoleranz und Proteinaggregation .....</b>	<b>92</b>
3.1.1	Proteinaggregation in <i>B. subtilis</i> Wildtyp.....	92
3.1.2	Einfluss einer Erholungsphase nach dem letalen Hitzeschock in Bezug auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen.....	103
3.1.3	Der Einfluss von Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen.....	107
3.1.4	Der Effekt der <i>clpP</i> und <i>clpX</i> Deletion auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen basiert hauptsächlich auf Spx .....	128
3.1.5	Ein erhöhtes Level an Spx schützt die Zelle vor hitzeinduzierter Proteinaggregation.....	134
3.1.6	Die Induktion von Spx verhindert Proteinoxidation unter Hitzestress .....	141
3.1.7	TrxA ist in der Lage zelluläre Proteinaggregation zu verhindern .....	146
3.1.8	Anaerobes Wachstum schützt <i>B. subtilis</i> Zellen vor Hitze-induzierter Aggregation ....	148
<b>3.2</b>	<b>Die Rolle des Chaperons HtpG und seine Bedeutung für die Evolution in Prokaryoten.....</b>	<b>152</b>
3.2.1	Biochemische Charakterisierung von HtpG aus <i>B. subtilis</i> .....	152
3.2.2	Charakterisierung der generellen Rolle des Chaperons HtpG für <i>B. subtilis</i> .....	156
3.2.3	Die Rolle von HtpG in evolutionären Prozessen.....	166
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>190</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Charakterisierung der Thermotoleranzentwicklung in <i>B. subtilis</i> .....</b>	<b>190</b>
4.1.1	Die Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen.....	190
4.1.2	Der Einfluss des Proteinqualitätskontrollsystems auf die Entwicklung der Thermotoleranz im Hinblick auf Proteinaggregation .....	192
4.1.3	Der Transkriptionsfaktor Spx und die Rolle von oxidativen Stress in der Entstehung von Proteinaggregaten unter Hitzestress .....	197
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle des Chaperons HtpG und seine Bedeutung für die Evolution in Prokaryoten.....</b>	<b>203</b>
4.2.1	Biochemische Charakterisierung des molekularen Chaperons HtpG.....	204
4.2.2	Die Bedeutung des molekularen Chaperons HtpG für <i>B. subtilis</i> .....	206
4.2.3	Der Einfluss von HtpG auf evolutionäre Prozesse in <i>B. subtilis</i> .....	207
<b>4.3</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>212</b>
<b>5.</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>216</b>

# 1. Einleitung

Jede Zelle kann im Laufe ihres Lebens durch physische oder chemische Veränderungen ihrer Umgebung Stress ausgesetzt werden, der ihre generellen Funktionen beeinträchtigt und Proteine, Membranlipide sowie DNA beschädigen kann (1, 2).

Aus diesem Grund haben Zellen aller Lebewesen eine zelluläre Stressantwort entwickelt, die von großer physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung ist. Ein Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung der durch Hitze ausgelösten Stressantwort auf die Entstehung von Proteinaggregation im Hinblick auf das Protease- und Chaperonsystem in dem grampositiven Modellorganismus *Bacillus subtilis*. Als Bodenbakterium ist dieses Bakterium in seinem Habitat sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt und muss entsprechend auf diese reagieren können. Darüber hinaus ist *B. subtilis* das am besten untersuchte grampositive Bakterium und ist aus diesen Gründen bestens geeignet für diese Experimente. Hitzestress führt zu Fehlfaltung von Proteinen, die daraufhin nicht mehr in der Lage sind ihre Funktion auszuüben. Hydrophobe Reste, die normalerweise im Inneren der nativen Struktur verborgen sind, werden aufgrund der Fehlfaltung exponiert und können zur toxischen Aggregation von Proteinen führen (1). Molekulare Chaperone schützen ungefaltete Proteine vor Aggregation, unterstützen die Proteinfaltung und sind in der Lage Aggregate aufzulösen. Proteasen hingegen sind verantwortlich für die Degradierung von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen und tragen zusammen mit den Chaperonen bedeutend zu der Proteinqualitätskontrolle bei (3, 4). Des Weiteren können Proteasen über die kontrollierte Degradierung von Schlüsselregulatoren eine wichtige Rolle bei der Genregulation und der Signalverarbeitung spielen (5).

In einem weiteren Aspekt wurden evolutionäre Prozesse, die zur Adaptation an sich ändernde Umweltbedingungen und Stress führen genauer untersucht. Während der Evolution werden durch Selektion bestimmte Varianten begünstigt, die sich innerhalb einer Population durch zufällige Mutationen unterscheiden. Jedoch existieren Systeme, die trotz genetischer Variabilität eine normale Entwicklung der Organismen und phänotypische Robustheit garantieren (Kanalisation) (6), wobei in diesem Zusammenhang vermutet wurde, dass molekulare Chaperone diese puffernde Funktion übernehmen können (7). Es konnte gezeigt werden, dass das „*Heat Shock Protein 90*“ Hsp90 neben seiner Rolle als Chaperon eine bedeutende Funktion in der Evolution von Eukaryoten hat (8), indem es in der Lage ist

genetische Polymorphismen abzupuffern (9). Daher wurde die Bedeutung des „High Temperature Protein G“ HtpG, das bakterielle Homolog von Hsp90 im Hinblick auf seine Fähigkeit, an evolutionären Prozessen in *B. subtilis* beteiligt zu sein, diskutiert.

## **1.1 Zelluläre Stressantwort in Bakterien**

In ihrer natürlichen Umgebung sind Bakterien ständig sehr unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, die sich negativ auf ihr Wachstum auswirken können. Um trotz physischer Stressbelastungen oder Nahrungsmangel dem Zelltod oder der Zellyse entkommen zu können, haben Bakterien ein hoch komplexes regulatorisches Netzwerk entwickelt (10). Eine der ersten Antworten auf verschiedene stressreiche Bedingungen ist die erhöhte Herstellung charakteristischer Stressproteine (10, 11). Da diese Proteine sowohl nach Hitze-, Salz- oder Säure- oder oxidativem Stress als auch auf Grund von Glukose- oder Phosphatmangel eine erhöhte Expression aufweisen, wird angenommen, dass sie eine generelle und unspezifische Schutzfunktion gegenüber verschiedenen Stressfaktoren ausüben können (10). Neben diesen generellen Stressproteinen, löst jeder Stressfaktor die Expression spezifischer Stressproteine aus (11).

### **1.1.1 Hitzeschockantwort in *B. subtilis***

Alle Organismen reagieren auf eine Erhöhung der Umgebungstemperatur mit der transienten Induktion einer bestimmten Gruppe von Genen, die für die sogenannten Hitzeschockproteine kodieren. Die Primärstruktur dieser Proteine scheint zwischen den verschiedenen Organismen hoch konserviert zu sein, so dass eine ähnliche Funktionsweise erwartet werden kann (12). Die meisten Hitzeschockproteine können dem Proteinqualitätskontrollsystem, bestehend aus molekularen Chaperonen und den ATP-abhängigen Proteasen, zugeordnet werden (4). Während sie unter normalen Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle bei der *de novo* Faltung von neusynthetisierten Proteinen und bei der Proteinhomöostase spielen, werden Chaperone und Proteasen unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitzestress, für die Zelle unersetzlich (3, 13–16). Durch Hitze ausgelöster Stress hat in der Zelle weitreichende Konsequenzen, die auf Proteinebene zu Fehlfaltung und Aggregation von thermolabilen Proteinen führen (17, 18), wobei aber nicht bekannt ist, ob Proteindenaturierung der Grund für die Letalität durch Hitze ist oder eine Konsequenz andere einleitender Ereignisse (19).

Chaperone sind in der Lage ein oder mehrere kurze Peptidsegmente, die reich an hydrophoben Aminosäuren sind, zu binden. Solche Peptidsegmente kommen in nativ gefalteten Proteinen meist im Innern, dem hydrophoben Kern, vor. Bei noch nicht gefalteten oder missgefalteten Proteinen werden diese Segmente exponiert und können von Chaperonen gebunden werden. Dadurch wird verhindert, dass sich mehrere solcher Segmente von verschiedenen Polypeptidketten aneinanderlagern und zur Aggregation führen. Diese Aktivität der Chaperone wird als „Halter“-Funktion bezeichnet und kann ATP-unabhängig erfolgen (zum Beispiel kleine Hitzeschockproteine). Die Rückfaltung in die aktive dreidimensionale Struktur erfordert die „Falter“-Funktion, welche ATP-abhängig ist. Das DnaK- und das GroEL/ES Chaperonsystem gehören zu der Gruppe der „Falter“. Wiederum andere Chaperone sind in der Lage Proteinaggregate ATP-abhängig zu resolubilisieren (zum Beispiel ClpB). Proteasen hingegen sind verantwortlich für die Degradation fehlgefalteter und aggregierter Proteine (1).

#### **1.1.1.1 Funktionsweise des Chaperon- und Proteasesystems in *B. subtilis***

Einige Vertreter des Chaperon- und Proteasesystems, die in der Hitzeschockantwort von *B. subtilis* eine zentrale Rolle spielen, werden im Folgenden näher betrachtet.

##### *1.1.1.1.1 Das GroEL/ES Chaperonsystem*

Das molekulare Chaperon GroEL wird zu der Klasse der Chaperonine gezählt und erscheint als Homooligomer aus zwei Ringen zu je 7 Untereinheiten, die jeweils eine große, zentrale Kammer bilden. Fehlgefaltete Proteine können mit den hydrophoben Resten an der offenen Kammer interagieren (20). Das Ko-Chaperonin GroES, ein Ring aus ebenfalls 7 Untereinheiten, bindet in Abhängigkeit von ATP als „Deckel“ an eines der Enden von GroEL. Dadurch wird die Kammer geschlossen und erhält aufgrund von Konformationsänderungen einen hydrophilen Charakter, der dem Protein nun ein Ablösen von der Kammerwand erlaubt, so dass dieses in seinen nativen Zustand falten kann (21–26). Dabei wird vermutet, dass GroEL nicht aktiv an der Faltung des eingeschlossenen Proteins teilnimmt. Eher agiert die Kammer als „Anfinsens Käfig“, der die sich faltenden Monomere vor multimolekularer Aggregation schützt, indem er das Protein von der Umgebung isoliert (27). Anschließende Hydrolyse des an GroEL gebundenen ATP ermöglicht die Bindung eines neuen Substrats und

ATP an dem gegenüberliegenden GroEL-Ring. Zeitgleich löst sich GroES von der ersten Kammer und gibt das Protein frei (21–26).

Das GroEL/ES Chaperonsystem ist sowohl in *Escherichia coli* (28) als auch in *B. subtilis* (29) unter allen Wachstumsbedingungen essentiell.

#### 1.1.1.1.2 Das DnaK Chaperonsystem

Das Chaperon DnaK ist ein bakterielles Homolog der Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)-Familie, die in der Evolution sehr stark konserviert wurde und eine zentrale Komponente des Chaperonsystems darstellt. Besonders gut wurde es in *E. coli* charakterisiert. Es unterstützt die Faltung und Assemblierung neu synthetisierter Proteine, die Rückfaltung fehlgefalteter und aggregierter Proteine (30–34) und verhindert die Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen (35). Mit seiner C-terminalen Substratbindedomäne bindet DnaK seine Substrate über einen, im nicht-nativen Zustand exponierten, hydrophoben Bereich und verhindert dadurch Aggregation oder unterstützt die korrekte Faltung des Substrats. ATP-Bindung an die N-terminale Nukleotidbindedomäne verursacht Konformationsänderungen in der benachbarten Substratbindedomäne, durch welche sich die Substratbindetasche öffnet. Sein Co-Chaperon DnaJ, das ein ähnliches Bindemotiv wie DnaK aufweist (36), führt DnaK Substrate zu und stimuliert zugleich zusammen mit dem Substrat die Hydrolyse des an die Nukleotidbindedomäne gebundenen ATPs. Dadurch schließt sich die Substratbindedomäne und das gebundene Substrat bleibt gefangen. Durch die Aktivität des Nukleotidaustauschfaktor GrpE wird die Freilassung von ADP verursacht. Dies erlaubt eine erneute Bindung von ATP, die Freilassung des Substrats und damit kann der Chaperonzyklus von vorne beginnen (4, 37). In *E. coli* arbeitet DnaK sowohl mit Triggerfaktor, um, wie bereits beschrieben, die Faltung von neusynthetisierten Proteinen bei der Proteintranslation zu unterstützen (38–41), als auch mit dem AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) Chaperon ClpB, einem Protein der Hsp100 Klasse und den kleinen Hitzeschockproteinen (IpbA und IpbB) zusammen, um große Proteinaggregate aufzulösen und rückzufalten (42). Protein-Disaggregation wird durch die Bindung von DnaK und DnaJ an den Aggregaten in Gang gesetzt (43, 44). Dies ermöglicht ClpB auch mit den Aggregaten zu interagieren (45, 46). Nach Substratbindung ist es in der Lage fehlgefaltete Proteine ATP-abhängig und einzeln aus dem Aggregat herauszuziehen (44, 47, 48). Die Rolle von DnaK beschränkt sich dabei wahrscheinlich nicht nur auf die ersten Schritte des

Disaggregationsprozesses. Es wird vermutet, dass es möglicherweise die solubilisierten Polypeptidketten an der Re-Assoziation mit dem Aggregat hindert und somit effizient die Proteinrückfaltung unterstützt (42, 46, 49, 50). Außerdem wird angenommen, dass die kleinen Hitzeschockproteine durch Bindung an Aggregate ihre chemischen Eigenschaften so verändern, dass die Chaperon-vermittelte Disaggregation und Rückfaltung effizienter werden (16, 51). In *B. subtilis* existiert weder ein Homolog für ClpB noch für die kleinen Hitzeschockproteine IbpA und IbpB. Interessanterweise zeigt eine *dnaK* Deletion einen nur moderaten temperatursensitiven Phänotyp in *B. subtilis* (52), während dies in *E. coli* zu einem signifikanten Wachstumsdefekt führt (53). Dieses Phänomen ist teilweise darauf zurückzuführen, dass in *E. coli* DnaK an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt ist (54, 55), während in *B. subtilis* der Repressor HrcA über GroEL/GroES diese Regulation ausübt (56). Auf die Hitzeschockregulation wird jedoch später noch genauer eingegangen werden. Auch zeigt ein Doppelknockout des Gens *tig*, welches für Triggerfaktor kodiert und von *dnaK* in *B. subtilis* (57) keinen besonders starken Phänotyp im Vergleich zum Organismus *E. coli*, der mit dem Fehlen dieser zwei Gene nicht lebensfähig ist (38, 41). In *B. subtilis* verursacht dahingegen die Deletion der Proteasen einen weitaus stärkeren Phänotyp (58–61). Dies lässt vermuten, dass das Proteinqualitätskontrollsystem in *B. subtilis* anders als in *E. coli* gestaltet ist. Proteasen und damit die Degradation von fehlgefalteten Proteinen und Aggregaten scheinen in *B. subtilis* eine weitaus relevantere Rolle zu spielen als das Chaperonsystem und damit die Rückfaltung von denaturierten und aggregierten Proteinen, was das Fehlen der Disaggregase ClpB zusätzlich bestätigt (5).

#### 1.1.1.1.3 Das Proteasesystem

Proteasen spielen neben dem Chaperonsystem eine wichtige Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle. Wenn, aufgrund von zum Beispiel andauernden Stress, das Chaperonsystem mit der Rückfaltung der vielen ungefalteten und aggregierten Proteine ausgelastet ist, wächst die Bedeutung des Proteasesystems, das das Cytoplasma irreversibel von aggregierten Polypeptiden bereinigen kann (4, 62).

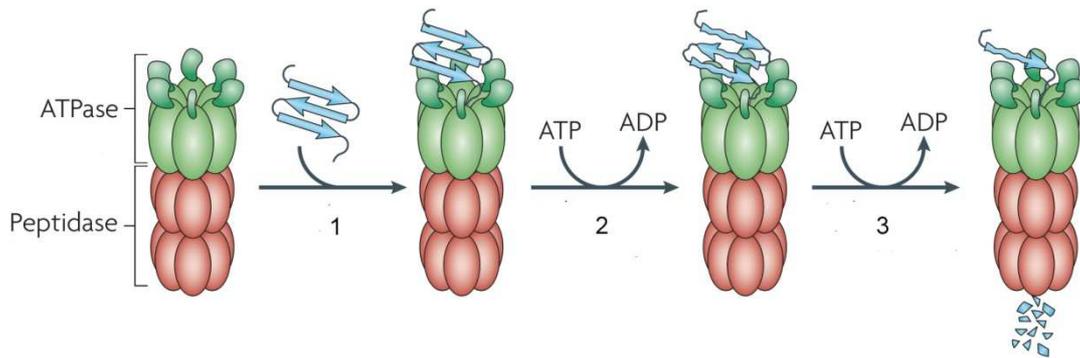
Hinzu kommt, dass wichtige regulatorische Proteine, die den Zellzyklus und die bakterielle Adaption oder Entwicklung kontrollieren, durch Proteolyse strikt reguliert werden (regulatorische Proteolyse) (5, 63). Weiterhin könnte Proteolyse durch die Bereitstellung von

Peptiden, die weiter in Aminosäuren zerlegt werden können, dem Zellmetabolismus zugutekommen.

Im eukaryotischen Cytosol wird die ATP-abhängige Proteindegradation durch das 26S Proteasom ausgeübt (64). In Bakterien übernehmen verschiedene Proteasekomplexe, wie zum Beispiel Clp, Lon, ClpYP und FtsH diese Rolle (65), wobei die Clp Proteasen das wichtigste Proteasesystem in *B. subtilis* darstellen. Von entscheidender Bedeutung ist, dass Proteasen im Cytosol die Fähigkeit haben müssen Substrate von Proteinen, die nicht degradiert werden sollen, zu unterscheiden. Ansonsten würden wahrscheinlich denaturierte und aggregierte Protein im Cytosol zurückbleiben, während aktiv funktionierende Proteine degradiert werden. Um diese unerwünschte Degradation zu vermeiden, wurden während der Evolution Proteasen mit einer speziell kompartimentalisierten Architektur geschaffen, wobei sie einen zylindrischen Komplex mit einer zentralen Pore bilden. Die aktiven Reste liegen dabei im Inneren dieser Pore verborgen, um die zufällige Interaktion von cytosolischen Proteinen mit diesen Resten zu verhindern. Spezielle ringförmige ATPase Komplexe der AAA+-Familie erkennen, binden und entfalten Substrate und translozieren sie anschließend unter ATP-Hydrolyse in die Pore der Protease, die sie daraufhin in kleine Peptide zerlegt (Abbildung 1) (63, 66, 67).

### **Clp Proteasesysteme in genereller und regulatorischer Proteolyse:**

Die Protease ClpP setzt sich aus 14 Untereinheiten zusammen, die zwei heptamere Ringe bilden. Die aktiven Reste von ClpP entsprechen denen einer Serinprotease (68), jedoch ist sie nicht in der Lage größere Peptide oder gefaltete Proteine zu degradieren (69). Um ihre vollständige Aktivität zu erhalten muss ClpP mit den AAA+ ATPasen ClpA und ClpX in *E. coli* oder ClpC, ClpE und ClpX in *B. subtilis* assoziieren. Diese Clp/Hsp100 Proteine zeichnen sich durch eine oder zwei konservierte AAA-Domäne (Nukleotidbindedomäne) aus, die unter anderem ein Walker A- und Walker B-Motiv enthält, welches für die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse benötigt wird. ClpC, ClpE, ClpA und ClpB weisen dabei zwei AAA Domänen auf, während ClpX nur eine besitzt (63). Zusätzlich besitzen sie eine variabelere N-terminale Domäne, die unter anderem für die Substraterkennung dienen kann und in manchen Fällen (zum Beispiel bei ClpC und ClpB) eine weitere Domäne, einen Linker, der sich in der Nähe von der Verbindung der zwei ATPase Domänen befindet (67, 70). Für eine hohe ATPase-Aktivität und somit das Ausüben ihrer Funktion müssen diese AAA+ Proteine in einen hexameren Komplex assemblieren.



**Abbildung 1: Mechanismus des AAA+ Chaperon Proteasekomplexes.** Substrate werden erkannt und durch das hexamere AAA+ Protein entfaltet. Das entfaltete Substrat wird in die Kammer der assoziierten Peptidase, in der die Proteolyse über die aktiven Seiten, die im Inneren der Kammer liegen, durchgeführt wird, transferiert (aus (63)).

Substrate werden nicht, wie in Eukaryoten durch das Proteasom am „Ubiquitin-tag“ erkannt, sondern an kurzen Peptidsequenzen im Substrat, die „Degron“ oder Degradierungstag genannt werden (70). Diese „Degrons“ können am N-Terminus, am C-Terminus und im Inneren verborgen sein (71, 72). Wird das Protein zum Beispiel durch Stress entfaltet, liegt das Degron zur Erkennung frei und das Protein kann dem jeweiligen Proteasekomplex zur Degradation zugeführt werden (63, 70). Spezielle Adapterproteine (73) können an der Substraterkennung beteiligt sein und diese modulieren. Dadurch kann das Substratspektrum erweitert und mannigfacher gestaltet werden (74).

Ein konservierter Loop am C-Terminus sorgt für die Interaktion des AAA+ Proteins mit dem ClpP-Komplex und somit zu der Ausbildung des ATPase/Protease Komplexes (75, 76). In diesem aktiven Chaperon-Proteasekomplex erkennen die hexameren Clp ATPasen ihre Substrate und entfalten sie ATP-abhängig, um sie als entfaltetete Polypeptidketten in die proteolytische Kammer von ClpP zu translozieren, in der sie anschließend degradiert werden (Abbildung 1) (74). Jedoch interagieren nicht alle Clp/Hsp100 mit einem Proteasekomplex, wie zum Beispiel das schon erwähnte AAA+Protein ClpB aus *E. coli*.

In *B. subtilis* spielt ClpP zusammen mit seinen Clp/Hsp100 ATPasen eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle, indem es an der Degradation von fehlgefalteten Proteinen beteiligt ist (5, 63, 77, 78). Dazu wurde der Effekt, den die Clp Proteasen auf die Proteinaggregation haben, untersucht, indem die zeitabhängige Zunahme von radiogelabelten fehlerhaften Translationsprodukten, die durch die Zugabe von dem Antibiotikum Puromycin induziert wurde, beobachtet. Fehlte das Gen für *clpP*, *clpC* oder *clpX* war der Abbau dieser radioaktiven Produkte im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt. Dies lässt vermuten, dass ClpCP und ClpXP an der Degradation von Proteinaggregaten in *B. subtilis* beteiligt sind (77).

In zwei weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass ClpP, ClpC und ClpX mit unlöslichen Proteinaggregaten interagieren (79–81). Diese Proteinaggregate oder „*Inclusion Bodies*“ entstanden durch die Zugabe von Puromycin (77) oder durch die heterologe Überexpression von PorA, ein äußeres Membranprotein von *Neisseria* (79). In diesen beiden Studien konnte eine Ko-Lokalisation der Clp-Proteasen mit den „*Inclusion Bodies*“ nachgewiesen werden (77, 79). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass ClpP, ClpC, ClpE und ClpX, die mit GFP markiert worden waren, fluoreszente Foci bilden, die hauptsächlich an den Zellpolen und an dem Ort, an dem sich die Zelle sich teilt, lokalisiert sind (80–82). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Clp Proteasen an Aggregatstrukturen lokalisiert sind und eine Rolle in der Proteinqualitätskontrolle spielen (80–82).

Zusätzlich sind Clp Proteasen auch an der Kontrolle vieler regulatorischer Prozesse, wie zum Beispiel das Wachstum bei hohen Temperaturen, bei Salz- und Ethanolstress und bei der Entwicklung der Motilität, Kompetenz und Sporulation, beteiligt (58).

#### Der ClpCP-Proteasekomplex

Der ClpCP-Proteasekomplex übernimmt in *B. subtilis* eine Reihe verschiedener Funktionen. Die Aktivität von ClpC wird im Gegensatz zu anderen AAA+ ATPasen durch seine Adaptorproteine wie zum Beispiel MecA, McsB und YpbH reguliert, die seine Oligomerisierung zum aktiven Hexamer ermöglichen (73). Zusätzlich spielen diese Adaptoren eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung. Es konnte gezeigt werden, dass ClpCP zusammen mit MecA aggregierte Modellproteine *in vitro* degradieren kann (83). Daher scheint es nicht verwunderlich, dass ClpC für das Wachstum bei hohen Temperaturen in *B. subtilis* benötigt wird (84). Außerdem wurde beobachtet, dass ClpC in Gegenwart von MecA oder seinem Paralog YpbH, einem weiteren Adaptorprotein von ClpC, in der Lage ist, Aggregation zu verhindern und sogar ähnlich zu ClpB in *E. coli* Aggregate aufzulösen und rückzufalten, wobei dieser Prozess langsamer als die Degradation abläuft (83). Dies deutet erneut daraufhin, dass in *B. subtilis* Degradation eine größere Rolle als die Rückfaltung spielen könnte. Weiterhin ist ClpCP zusammen mit MecA auch an der Kompetenzentwicklung beteiligt. Natürliche Kompetenz bedeutet, dass eine Subpopulation von *B. subtilis* Zellen in der stationären Phase in der Lage ist, aktiv DNA zu importieren (85). In nicht-kompetenten Zellen inhibiert MecA die Aktivität des Transkriptionsfaktors ComK (86), indem er ihn ClpCP zur Degradation zuführt. Initiiert wird die Kompetenzentwicklung durch einen Pheromon-vermittelten „Quorum sensing“ Mechanismus, der in der Synthese von dem Anti-Adaptor ComS resultiert (87, 88), der durch Bindung an MecA die Freilassung von

ComK verursacht und seine Degradation verhindert (89–91). Dies und die positive Autoregulation von ComK führt zu einem raschen Konzentrationsanstieg des Transkriptionsfaktors und somit zur Expression von Genen, die wichtig für die Kompetenzentwicklung sind (91).

In Zusammenarbeit mit einem weiteren Adaptorprotein, der Protein Argininkinase McsB, ist der ClpCP-Komplex an der Regulation der Klasse III Hitzeschockgene über den globalen Repressor CtsR und somit an seiner eigenen Regulation beteiligt. Dies wird unter 1.1.1.2.3 detailliert beschrieben werden. Jedoch scheint diese Kinase auch noch eine andere Funktion aufzuweisen.

Kompetenzentwicklung ist in *B. subtilis* gekennzeichnet durch die Synthese von zahlreichen cytosolischen und Membran-lokalisierten Proteinen, die an den Zellpolen zu einer molekularen Maschine assemblieren. Diese molekulare Maschine ist verantwortlich für die Internalisierung, die Prozessierung und chromosomale Integration transformierter DNA (92). Nun konnte gezeigt werden, dass sowohl die Proteinkinasen McsA und McsB, als auch ClpP und eine der beiden AAA+ ATPasen, ClpC oder ClpE eine Rolle bei der Auflösung dieses DNA Rezeptors- und Translokasekomplex zu spielen scheinen. Zudem sind McsB, ClpC und ClpP in kompetenten Zellen an den Zellpolen lokalisiert. Es wird vermutet, dass diese Delokalisierung durch die Degradation eines unbekanntes Ankerproteins durch ClpCP oder ClpEP über McsB, das autophosphoryliert und durch McsA aktiviert wurde, in einem ATP-abhängigen Prozess verursacht wird (92).

Weiterhin ist ClpC an der Regulation der Sporulation, durch spezifische Degradierung des anti-sigma Faktors SpoIIAB, der Zellwandsynthese, durch die Degradation von MurAA, ein Enzym, das in den ersten Schritten der Zellwandbiosynthese involviert ist, der Motilität, der Chemotaxis sowie der Autolysin-Synthese beteiligt (58, 93–95).

### Der ClpXP Proteasekomplex

Die ATPase ClpX besitzt neben der AAA+ Domäne und der ClpP-Bindestelle ein N-terminales Zinkfinger-Motiv. Eine Struktur-Funktionsanalyse der *E. coli* ClpX ATPase zeigte, dass eine Zink-defiziente Mutante weder ATP binden, noch oligomerisieren oder mit ClpP interagieren konnte (96).

Seine Expression wird durch Hitze und schwach durch Salzstress induziert (61). ClpX ist essentiell für das Wachstum von *B. subtilis* bei hohen Temperaturen (60). Im Komplex mit ClpP ist ClpX wie ClpC auch an der Proteinqualitätskontrolle in *B. subtilis* beteiligt, indem es SsrA-getaggte Proteine mit Hilfe des Adpaterproteins SspB entfaltet und degradiert. Die

SsrA-Erkennungssequenz ist eine kurze, unstrukturierte Peptidsequenz, die an den C-Terminus unvollständig translaterter Proteine an arretierten Ribosomen angehängt wird und diese somit für die Degradation markiert (97, 98). Zusätzlich spielt ClpXP in regulatorischen Prozessen eine wichtige Rolle. Bei Untersuchungen von *clpX* und *clpP* Deletionsmutanten traten viele phänotypische Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auf, darunter auch eine Störung der Kompetenzentwicklung. Untersuchungen von Suppressormutanten ergaben, dass eine *Loss-of-Function* Mutation des *spx* Gens in *clpX* und *clpP* Kompetenzentwicklung wiederum ermöglicht (65, 86, 99). Später konnte gezeigt werden, dass Spx durch ClpXP degradiert wird (100). Diese Degradation kann durch das Adapterprotein YjbH beschleunigt werden (101). Spx ist ein globaler Regulator der oxidativen Stressantwort in *B. subtilis*, der als Transkriptionsfaktor die Transkription mehrerer hundert Gene reguliert (102–105). Während Spx dabei als positiver Regulator Gene aktiviert, die in der Thiolhomöostase eine Rolle spielen, reprimiert es gleichzeitig die Expression von Genen, die im Metabolismus sowie in Entwicklungsprozessen involviert sind (103, 104). Unter diesen ist auch das *srf* Operon, das für ComS kodiert und somit eine Rolle in der Kompetenzentwicklung spielt. Dies erklärt nun auch den Kompetenzeffekt in den *clpP* und *clpX* Mutanten, die zu einer massiven Akkumulation von Spx führen, was zur Folge hat, dass das *srf* Operon nicht abgelesen und damit ComS nicht exprimiert werden kann (104). Man benötigt also ClpXP für die Degradation von Spx, wobei dies auch die Kompetenzentwicklung ermöglicht.

Auf Spx wird im Abschnitt 1.1.2.1 noch genauer eingegangen werden, jedoch kann an diesem Beispiel gezeigt werden, wie eng einzelne Stressantworten miteinander verknüpft sind und wie wichtig Proteasesysteme bei der Regulation äußerst verschiedener Entwicklungsprozesse ist.

### Der ClpEP-Proteasekomplex

Wie schon erwähnt besitzt ClpE zwei AAA+ Domänen. Außerdem weist es, wie ClpX ein N-terminales Zink-Finger Motiv auf, das essentiell für die ATPase-Aktivität ist (106). Es konnte gezeigt werden, dass ClpE, wie ClpC auch Teil des Hitze-induzierten CtsR-Regulons ist (107). Jedoch scheint ClpE nicht, wie ClpC, ClpX oder ClpP essentiell für das Wachstum bei hohen Temperaturen zu sein (107). ClpE scheint ein sehr kurzlebige Protein zu sein, dass sehr strikt durch CtsR reguliert und nur unter Hitzestress exprimiert wird, um daraufhin nach kurzer Zeit durch ClpCP über das Adapterprotein McsB wieder degradiert zu werden (5, 108). Neben ClpCP scheint auch ClpEP bei der Regulation der Klasse III Hitzeschockgene beteiligt zu sein (106). Dies wird jedoch in Abschnitt 1.1.1.2.3 näher erläutert werden. Weiterhin

konnte beobachtet werden, dass ClpE mit Hitze-induzierten „*Inclusion Bodies*“ interagiert und vermutlich zusammen mit ClpP auch am Abbau von aggregierten Proteinen beteiligt. Es ist vorstellbar, dass ClpCP und ClpEP synergistisch bei der Disaggregation nach Hitzestress agieren. Beide Systeme könnten weiterhin einander im Disaggregationsprozess ersetzen (106).

### **ClpYQ, Lon, FtsH:**

Der Proteasekomplex ClpYQ setzt sich in *E. coli* aus der hexameren Serinprotease ClpQ (HslV) und der AAA+ ATPase ClpY (HslU) zusammen (109–111) und lokalisiert an der cytoplasmatischen Membran (70). Zu seiner Funktion ist darüber hinaus noch nicht sehr viel bekannt. In *B. subtilis* weisen CodW und CodX eine Übereinstimmung von 52 % in ihrer Aminosäuresequenz zu HslV und HslU aus *E. coli* auf und können zusammen als ATP-abhängige Protease agieren (112).

In der hexameren Lon und FtsH Protease sind die AAA+ ATPase und die Protease Domänen auf einer einzelnen Polypeptidkette fusioniert (63). Während Lon als cytosolische Serinprotease agiert (113), ist FtsH eine Zink-Metalloprotease mit einer Transmembrandomäne (114). *B. subtilis* kodiert für zwei *lon* Gene, *lonA* und *lonB*. Beide Gene spielen eine Rolle bei der Sporulation (115, 116), jedoch wird *lonA* bei Hitze-, osmotischem und oxidativem Stress induziert (117), während LonB in der frühen Spore während der Sporulation exprimiert wird (118). *FtsH* konnte als generelles Stressgen identifiziert werden, das aufgrund von osmotischem- oder Hitzestress vorübergehend induziert wird (119).

Im Gegensatz zu *E. coli* ist *ftsH* in *B. subtilis* nicht essentiell, zeigt jedoch einen sehr vielfältigen Phänotyp. Fehlt *ftsH* sind die Zellen sehr anfällig gegenüber Hitze- und Salzstress, jedoch scheint es nicht an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt zu sein. Des Weiteren ist FtsH in der Sporulation und in der Sekretion von Exoproteinen involviert (120).

#### *1.1.1.1.4 Das Chaperon HtpG*

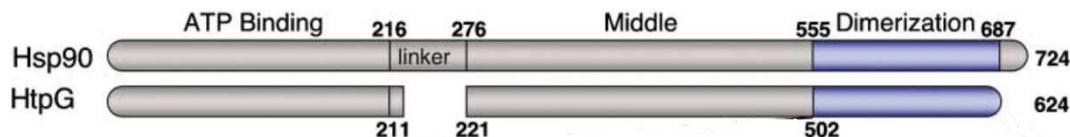
### **Proteinexpression und Domänenorganisation:**

HtpG ist das bakterielle Homolog von eukaryotischem Hsp90. In *E. coli* ist die Expression von HtpG durch den Sigmafaktor ( $\sigma$ )  $\sigma^{32}$ , der für die Expression der Hitzeschockgene

zuständig ist, kontrolliert (121). In *B. subtilis* wird *htpG* durch einen  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor und zusätzlich durch eine DNA Sequenz (GAAAAGG), die „*downstream*“ des  $\sigma^A$ -abhängigen Promotors lokalisiert ist, reguliert (122, 123). Es wird vermutet, dass *htpG* durch einen transkriptionalen Aktivator über diese Sequenz, die für die Induktion durch Hitze essentiell ist, positiv reguliert wird (122).

HtpG und Hsp90 sind in ihrer dreidimensionalen Struktur hochkonserviert und in drei globuläre Domänen gegliedert: Eine N-terminale, eine mittlere und einer C-terminale Domäne (Abbildung 2).

Die N-terminale Domäne besitzt eine ATP- Bindestelle und ist bei Hsp90 verantwortlich für die Interaktion mit Ko-Chaperonen und den Inhibitoren Geldanamycin und Radicolol.



**Abbildung 2: Organisation der Domänen der Hsp90 Proteine.** Hsp90 Proteine bestehen aus einer ATP-Binde- („*ATP Binding*“), einer mittleren („*Middle*“) und einer Dimerisierungsdomäne („*Dimerization*“). Prokaryotische Homologe (HtpG) besitzen einen sehr viel kürzeren Linker zwischen der aminoterminalen- und mittleren Domäne. Außerdem fehlt ihnen der ungefähr 40 Aminosäurereste lange, carboxyterminale Schwanz, der auf MEEVD endet und für die Bindung von Ko-Chaperonen mit einer TRP-Domäne verantwortlich ist (aus (124).

Während in Hsp90 die mittlere Domäne für die Bindung von Substraten (Clients) verantwortlich zu sein scheint (124), ermöglicht die C-terminale Domäne die Dimerisierung von Hsp90 bzw. bakteriellem HtpG. In Hsp90 ist diese Domäne notwendig für die Bindung einiger Ko-Chaperone (125, 126). Kürzlich konnte auch für HtpG gezeigt werden, dass Aminosäurereste der mittleren und der C-terminalen Domäne, die an der Oberfläche der Furche liegen, welche durch das HtpG-Dimer gebildet wird eine wichtige Rolle bei der Bindung von Clients spielen (127).

Im Gegensatz zu Hsp90 fehlt HtpG der flexible, hoch geladene Linker zwischen N-terminaler und mittlerer Domäne. Es wird vermutet, dass dieser durch die Bindung des  $\gamma$ -Phosphats des ATP-Moleküls die ATPase von Hsp90 stimulieren kann.

Ebenso fehlt der ungefähr 40 Aminosäurereste lange, carboxyterminale Schwanz, der bei Hsp90 für die Bindung von Ko-Chaperonen mit einer TRP-Domäne benötigt wird (126).

### **ATPase-Aktivität und HtpG Trap:**

Vergleichbar zu Hsp90 sind auch in HtpG die Konformationsänderungen eng an ATP-Bindung und Hydrolyse geknüpft, wobei beide eine sehr schwache ATPase-Aktivität aufweisen (125, 126, 128, 129).

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität essentiell für die *in vivo* Aktivität von Hsp90 ist (130–132). ATP Bindung und Hydrolyse führen zu hoch dynamischen Konformationsänderungen, die essentiell für die Interaktion mit Ko-Faktoren und für die Erkennung und Faltung der Clients sind (133).

Eine in dieser Arbeit verwendete Variante von HtpG, im folgenden HtpG Trap genannt, zeichnet sich durch einen einzelnen Basenaustausch in der ATPase Domäne von HtpG aus. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 31 von Glutamat zu Alanin. Im Wildtyp Protein fungiert das Glutamat als katalytische Base: Nach Abzug eines Protons vom Wassermolekül ist dieses nun in der Lage das  $\gamma$ -Phosphat von ATP anzugreifen und somit die Hydrolyse von ATP zu ermöglichen. HtpG Trap ist daher zwar in der Lage ATP zu binden, jedoch nicht zu hydrolysieren. Die Verwendung dieser Mutante basiert auf der Hypothese, dass mögliche Substrate, die mit HtpG unter ATP-Bindung interagieren nicht mehr freigesetzt werden können sondern gefangen bleiben und ihre Funktion ebenfalls nicht mehr ausüben können. Somit wäre es möglich, dass ein Effekt, der durch HtpG verursacht wird, mittels dieser Variante verstärkt wird.

### **Funktionen von HtpG:**

Während in Eukaryoten Hsp90 essentiell ist und zusammen mit seinen Ko-Chaperonen einen wichtigen Regulator der Zellfunktion darstellt (134), ist die Funktion von HtpG in Bakterien noch nicht eindeutig geklärt. Es scheint weder unter normalen Bedingungen noch unter Stress essentiell zu sein (135).

Die Transkription von *htpG* wird in *B. subtilis* nicht durch osmotischen Stress, durch Ethanol oder durch Sauerstoffmangel induziert, jedoch kann eine Induktion um das zehnfache auf dem Level der Transkription und Translation durch einen plötzlichen Temperaturanstieg beobachtet werden (123). Trotzdem übt *htpG* weder Einfluss auf die Thermotoleranzentwicklung aus, noch agiert es als Thermometer der Zelle (135). Zusätzlich zeigte die Überproduktion von HtpG in *B. subtilis* keinen Effekt und ist auch nicht in der Lage den Wachstumsdefizit einer *ftsh* Deletionsmutante auszugleichen (123), wie es für *E. coli* berichtet werden konnte (136).

Überexpression von HtpG in *E. coli* führt zu filamentösem Wachstum, das einen Zellteilungsdefekt vermuten lässt und zu einer Detergenz-Sensitivität. Die Mechanismen, die zu diesen Phänotypen in *E. coli* führen sind bisher noch nicht annähernd geklärt (127). Demgegenüber bewirkt die Deletion des *htpG* Gens in *E. coli* einen leichten Wachstumsdefizit bei hohen Temperaturen (137). Weiterführend beobachteten Genest et al., dass HtpG zusammen mit dem DnaK Chaperonsystem die durch Hitze inaktivierte Modellsubstrate Luziferase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aufgrund ihrer ATP-abhängigen „*Remodeling*“ Aktivität reaktivieren konnten. Da andere Modellsubstrate, wie GFP oder MDH jedoch nicht durch die Zusammenarbeit dieser zwei Systeme reaktiviert werden konnten, schlossen sie daraus, dass die Kollaboration dieser zwei Chaperone eine Substratspezifität aufweist (138). Zudem ist HtpG in der Lage durch Hitze inaktivierte Citratsynthasen zu stabilisieren und die Aggregation dieser unter Hitzestressbedingungen zu verhindern (139).

In Cyanobakterien konnte eine essentielle Rolle für HtpG unter Hitzestress nachgewiesen werden. Cyanobakterien sind Bakterien, die oxygene Photosynthese betreiben und Ähnlichkeiten zu Chloroplasten photosynthetischer Eukaryoten aufweisen. Während die Inaktivierung von HtpG keinen Einfluss auf das Wachstum unter normalen Temperaturen hatte, verursachte die Deletion des Gens schon bei moderat hohen Temperaturen den Zelltod dieser Bakterien (140).

### **Bakterielle Clients und Ko-Chaperone von HtpG:**

Sehr wenig ist bekannt über potentielle Clients und Ko-Chaperone von HtpG in Bakterien. Bis jetzt konnte für *E. coli* das Protein L2, eine Komponente der 50S ribosomalen Untereinheit als Client identifiziert werden. Hiernach erkennt HtpG L2 sehr spezifisch und seine ATPase-Aktivität wurde in Abhängigkeit dieses ribosomalen Proteins um das zehnfache gesteigert (141).

Yosef et al., konnten in ihrer Studie zeigen, dass HtpG das CRISPR („*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*“) System in *E. coli* positiv reguliert und essentiell für Funktion des Cas3 Proteins, einer Komponente des CRISPR Systems, ist (142). Dieses System spielt zusammen mit den *cas* Genen in Prokaryoten eine überaus wichtige Rolle bei der Abwehr von Viren, Phagen, horizontal transferierter DNA (143–145) und RNA (146), wobei Cas3 für die Abwehr eintreffender DNA benötigt wird (145).

Im Fall des Cyanobakteriums *Synechococcus elongatus* PCC 7942 konnte gezeigt werden, dass HtpG mit der Uroporphyrinogen Decarboxylase interagiert, ihre Aktivität reprimiert und

somit in der Regulation der Tetrapyrrol Biosynthese involviert sein könnte (147, 148). Im gleichen Modellorganismus konnten Sato et al. darlegen, dass cyanobakterielles HtpG eine wichtige Rolle bei der Assemblierung und Stabilität von Phycobilisomen spielt. Dies sind große Proteinkomplexe, die an der Absorption von elektromagnetischer Energie in Form von Licht geeigneter Wellenlänge beteiligt sind (149).

Über die Bindestellen der Clients sowohl für eukaryotisches Hsp90 als auch für sein prokaryotisches Homolog ist jedoch sehr wenig bekannt (s. Abbildung 2) (132).

### 1.1.1.2 Regulation der Hitzeschockgene

Die Hitzeschockgene von *B. subtilis* werden aufgrund der Regulation der Genexpression in 5 verschiedene Klassen unterteilt und bilden zusammen das Hitzeschockstimulon (10, 12). Dieses ist Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks, auf das in dem folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

#### 1.1.1.2.1 Klasse I Hitzeschockgene

Insgesamt gibt es neun Klasse I Hitzeschockgene, die in zwei Operons unterteilt werden können. Während das heptacistronische *dnaK*-Operon die Gene *hrcA*, *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*, *yqeT*, *yqeU* und *yqeV* beinhaltet, umfasst das bicistronische *groE*-Operon die Gene, die für GroES und GroEL kodieren (150, 151). Die Expression dieser Operons wird über einen  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor sowie durch CIRCE-Elemente („*controlling inverted repeat of chaperone expression*“) (152), Operatorsequenzen, die aus einem perfekt invertierten Repeat von 9 Bp, getrennt durch einen 9 Bp Spacer, bestehen, kontrolliert (153). HrcA, der Repressor der Klasse I Hitzeschockgene (154) interagiert als Oligomer über sein Helix-Turn-Helix DNA-Bindemotiv mit dem CIRCE Element und verhindert somit die Expression des *dnaK* und *groE* Operons (155).

Das GroE-Chaperonsystem ermöglicht die Interaktion von HrcA mit der DNA und reguliert somit die Expression der Klasse I Hitzeschockgene. Steigt die Konzentration fehlgefalteter Proteine aufgrund eines Hitzeschockes, wird der Pool an GroE Proteinen vorübergehend verringert, wodurch HrcA inaktiviert wird. Dies hat eine Induktion der Klasse I Hitzeschockgene zur Folge (156).

#### 1.1.1.2.2 Klasse II Regulon

Ungefähr 150 Gene der generellen Stressantwort werden dem Klasse II Regulon zugeordnet. Ihre Expression wird zumeist durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  reguliert. Einige besitzen zusätzliche Promotoren, die zum Beispiel von  $\sigma^A$ -abhängig sind. Zusätzlich tragen Repressoren und Aktivatoren zur Regulation des Klasse II Regulons bei, wobei zu diesen Genen unter anderem Vertreter der Klasse III Hitzeschockgene gehören. Das Klasse II Regulon wird beim Übergang in die stationäre Phase sowie durch eine Reihe von verschiedenen Stresssituationen induziert. Dazu gehören hohe und niedrige Temperaturen, Salz, Ethanol und Säurestress. Diese generelle Stressantwort schützt auch vorbeugend vor verschiedenen Stresssituationen, denen die Zelle noch nicht ausgesetzt war (157). Einige der  $\sigma^B$ -abhängigen Gene kodieren für Masterregulatoren, die ihrerseits die Expression von Genen regulieren, welche zur generellen Stressantwort beitragen (158).

#### 1.1.1.2.3 Klasse III Hitzeschockgene

Vertreter der Klasse III Hitzeschockgene sind unter anderem *clpP*, *clpE* und das *clpC* Operon, welches die Gene umfasst, die für CtsR, McsA, McsB und ClpC kodieren (5, 66, 107). Die Expression wird durch  $\sigma^A$ - und  $\sigma^B$ -abhängige Promotoren und den globalen Repressor CtsR reguliert. Dieser besitzt eine DNA bindende Domäne mit einem Helix-Turn-Helix Motiv, einer Dimerisierungsdomäne sowie einer Hitzesensordomäne. Während CtsR unter normalen Bedingungen die Expression der Klasse III Hitzeschockgene durch Bindung an den  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor verhindert, löst sich CtsR bei Hitzestress von der DNA und wird über die Bindung der autophosphorylierten und durch McsA aktivierten Proteinkinase McsB (159, 160) inhibiert und der Degradierung durch ClpCP zugeführt. Man vermutet, dass eine Phosphorylierung von zwei Argininresten in ClpC (R5 und R245) durch McsB für die McsB-vermittelte Aktivierung von ClpC benötigt werden (161). In nichtgestressten Zellen ist die Aktivität von McsB durch ClpC und der Phosphatase YwIE inhibiert (162). Damit ist ClpC ein positiver Regulator der Hitzeschockantwort als auch seiner eigenen Expression (160, 163, 164).

Es wird vermutet, dass ClpE ebenfalls bei der Regulation dieser Gruppe von Hitzeschockgenen eine Rolle spielt. Mutanten, in denen das *clpE* Gen deletiert wurde, weisen eine weniger effektive De-Repression und Re-Repression durch CtsR bei Hitzestress auf

(106). Auch scheint ClpE bei der Degradierung von CtsR beteiligt zu sein, wobei McsB als Adaptor dienen könnte (5).

#### 1.1.1.2.4 Klasse IV Hitzeschockgene

Der Klasse IV der Hitzeschockgene wird eine Gruppe von Genen zugeordnet, deren Expression auch als Antwort auf Stress geschieht. Die Regulation dieser Gene, zu denen unter anderem auch *clpX*, *htpG*, *tig*, *lonA* und *lonB* zählen (5), ist jedoch weitgehend unbekannt. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass „*upstream*“ von *clpX* ein durch Hitze induzierbarer,  $\sigma^A$ -ähnlicher Promotor existiert (61).

#### 1.1.1.2.5 Klasse V Hitzeschockgene

Vertreter der Klasse V Hitzeschockgene sind in *B. subtilis* zwei Membran-assoziierte Proteasen, HtrA und HtrB, die eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf Hitze- und Sekretionsstress spielen. Ihre Expression wird über das Zwei-Komponenten-System CsrR-CssS, welches als Sensor für extracytoplasmatischen Faltungsstress agiert, kontrolliert (165, 166).

### 1.1.1.3 Thermotoleranz

Bestimmte Arten von Stress, wobei milder Hitzestress eingeschlossen wird, konditionieren Zellen und Organismen, um sehr hohe Temperaturen, die sonst letal wären, zu überleben. Dieses Phänomen wird induzierte Thermotoleranz genannt. Da alle Arten von Stress, die Thermotoleranz auslösen können, auch die Synthese von Hitzeschockproteinen induzieren, wird vermutet, dass diese Proteine die Zellen vor den extremen Temperaturen schützen können. In *Saccharomyces cerevisiae* sowie in *Arabidopsis thaliana* konnte demonstriert werden, dass Hsp104, das Homolog der AAA+ ATPase ClpB in Eukaryoten für die Ausbildung der Thermotoleranz benötigt wird (167, 168). Auch in *E. coli* scheint vor allem die Disaggregation und Rückfaltung von Proteinen durch ClpB, das DnaK-Chaperonsystem und durch die kleinen Hitzeschockproteine IpbA und IpbB eine übergeordnete Rolle bei der Entwicklung der Thermotoleranz zu spielen (16). Dabei sind die Auflösung der

Proteinaggregate und damit die Eliminierung möglicher toxischer Effekte nicht ausreichend für das Überleben der Zelle während des Hitzestresses. Stattdessen sind die Solubilisierung und nachfolgende Reaktivierung denaturierter und damit funktionsloser Proteine durch ClpB essentiell für das Überleben der Zelle während sehr hohen Temperaturen und damit für die Ausbildung der Thermotoleranz (44).

Wie schon erwähnt existiert in *B. subtilis* kein Homolog zu ClpB und auch darüber hinaus ist wenig bekannt darüber, welche Gene an der Ausbildung der Thermotoleranz beteiligt sind. In einigen Studien konnte kein (107), beziehungsweise nur ein schwacher Effekt (57, 169) einzelner Gene auf die Ausbildung der Thermotoleranz beobachtet werden. Eine Studie von Versteeg et al. beschäftigte sich mit der Rolle von *htpG*, *dnaJ* und *groELS* bei der Thermotoleranzentwicklung. Während *htpG* bei der Ausbildung der Thermotoleranz nicht involviert ist, scheinen Proteine des DnaK -und GroELS Chaperonsystem unabdingbar zu sein. Jedoch konnte Überexpression dieser Chaperone, die durch die Deletion des Repressores HrcA verursacht wurde, anstatt des Ausübens des milden Hitzeschocks vor dem letalen Hitzeschock nicht zur Thermotoleranzentwicklung beitragen (135).

### **1.1.2 Oxidative Stressantwort**

Oxidativer Stress ist verbunden mit der erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, „*reactive oxygen species*“). Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen entstehen als Nebenprodukt des Atmungsprozesses und bei enzymatischen Prozessen und können DNA, Fettsäuren und Proteine angreifen (170, 171). Proteine sind von dieser Attacke am häufigsten betroffen, wobei die Oxidation von Aminosäuren nicht-native Cysteindisulfidbrücken (170) und Methioninsulfoxide (172) entstehen lassen und zur Carbonylierung von Lysinen, Argininen und Prolinen führen kann (173, 174). Diese Modifizierungen können Proteinaktivitäten inhibieren oder verändern. Zusätzlich wird vermutet, dass diese oxidativen Veränderungen bewirken, dass die Proteine anfälliger für den proteolytischen Abbau werden oder schneller aggregieren (175, 176). Als Schutz vor diesen reaktiven Sauerstoffspezies haben Zellen daher ein antioxidatives Abwehrsystem entwickelt. Zusätzlich wird vermutet, dass zahlreiche Stresssituationen wie zum Beispiel Hitze-, Säure-, oder Antibiotikastress entweder durch Störung der intrazellulären Redoxbalance zu oxidativem Stress führen können (157, 177, 178) oder Substrate wie zum Beispiel fehlgefaltete Proteine hervorbringen, die anfälliger gegenüber oxidativen Angriffen, die auch unter normalen Bedingungen vorkommen

können, sind (179, 180). Die Idee für diesen sogenannten sekundären oxidativen Stress, entstand mit der Identifizierung von MgsR, einem Paralog von Spx, dem globalen Regulator der Diamid Stressantwort. Die Expression von MgsR wird durch  $\sigma^B$  aktiviert und ist notwendig für die Induktion eines Subregulons von Genen, dessen Proteine eine Rolle bei der oxidativen Stressantwort spielen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass als Antwort auf Ethanolstress die Expression von MgsR über  $\sigma^B$  induziert wird und es, durch sekundären Redoxstress aktiviert, an der Induktion der oxidativen Stressantwort beteiligt ist (181). Daher ist es nicht erstaunlich, dass die generelle Stressantwort in Bakterien auch Schutz gegenüber oxidativem Stress bieten kann. In *B. subtilis* wird diese Rolle von dem alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  übernommen (siehe 1.1.1.2.2), dessen Aktivität bei harten Umweltbedingungen oder Störungen des Energiehaushaltes erhöht wird (157, 182). Zusätzlich konnten in *B. subtilis* zu  $\sigma^B$  drei Faktoren, die die oxidative Stressantwort regulieren, identifiziert werden. Dabei spielen PerR und OhrR eine Rolle bei der oxidativen Stressantwort, die durch Peroxide ausgelöst wird (182). Das RNA-Polymerase-bindende Protein Spx, auf das im Folgenden näher eingegangen wird, scheint darüber hinaus Schutz gegenüber toxischen Oxidantien zu bieten (102).

### **1.1.2.1 Der globale Transkriptionsfaktor Spx**

Spx, ein Regulator, der Redoxstress fühlen kann, kontrolliert, wie bereits unter 1.1.1.1.3 erwähnt, als untypischer, globaler Transkriptionsfaktor ein großes Regulon von Genen, wobei er als positiver, als auch als negativer Regulator wirken kann (102, 104, 183, 184). Spx ist unter den grampositiven Bakterien hochkonserviert und zeigt Verwandtschaft zu den Mitgliedern der Arsenat Reduktase (ArsC)-Familie (104). Er ist essentiell für das Überleben unter oxidativen Stress (103). Komplexe transkriptionale und posttranslationale Kontrollmechanismen sind bei der Aktivierung von Spx durch oxidativen Stress notwendig.

#### *1.1.2.1.1 Die transkriptionale und posttranskriptionale Regulation von Spx*

Die Transkription des bizistronischen *yjbC-spx* Operons wird an mindestens vier Promotoren initiiert, wobei drei „*upstream*“ des *yjbC* Gens liegen. Mindestens drei unterschiedliche Formen der RNA-Polymerase (RNAP) sind für die Transkription des *yjbC-spx* Operons verantwortlich. Die  $\sigma^B$ - und  $\sigma^M$ - RNAP verwenden die Promotoren des *yjbC* Gens, während

das  $\sigma^A$ -Holoenzym Promotoren im *yjbC*-Gen und in der Region, die zwischen den kodierenden Sequenzen der beiden Gene liegt, benutzt (185). Die Transkriptionsinitiation über drei Sigmafaktoren stellt die Induktion von Spx in Abhängigkeit von vielen verschiedenen Stressbedingungen sicher (105). Sowohl Hitzestress (186) als auch Phosphatmangel (187) führen zu einer Induktion von *spx*. In Übereinstimmung dazu konnte durch 2D-Gelelektrophorese gezeigt werden, dass die Expression des Spx-Regulons auch durch Ethanol, Hitze, und hohe Osmolarität induziert wird (188). Aufgrund dieser Studien könnte man vermuten, dass Spx eher als genereller Stressregulator fungiert und nicht spezifisch für die oxidative Stressantwort ist.

Zusätzlich wird das Gen für Spx durch zwei Repressoren, YodB und PerR negativ reguliert, die ihrerseits durch oxidativen Stress inaktiviert werden (189). Jedoch scheint die posttranslationale Regulation von Spx wichtiger für die Stressinduktion als die transkriptionale zu sein (190).

Herrscht kein Stress, wird Spx über die Interaktion mit dem Adaptorprotein YjbH von dem ClpXP-Proteasesystem degradiert (100), wobei YjbH die Proteolyse vermutlich nur beschleunigt (101, 191). Somit wird unter reduzierenden Bedingungen die zelluläre Konzentration von Spx auf einem niedrigen Level gehalten. Als Degradationstag fungiert dabei eine Sequenz aus Alanin und Asparagin, die sich am äußeren C-Terminus befindet. Mutiert man diese zu einer Sequenz aus zwei Aspartaten kann Spx nicht mehr durch ClpXP degradiert werden (103).

Reaktive Sauerstoffspezies und Elektrophile inaktivieren ClpX und YjbH, indem sie die Oxidation und Freilassung des Zinks der cysteinreichen Zinkfingerdomänen von ClpX und YjbH veranlassen (101, 190). Demzufolge wird Spx, aufgrund der verringerten Proteolyse, vorübergehend stabilisiert (103). Kürzlich wurde gezeigt, dass das kleine Protein YirB als Anti-Adaptor YjbH bindet und somit die Degradation von Spx über ClpXP verhindert. Bis jetzt ist jedoch nicht bekannt, ob YirB zur Stabilität von Spx unter oxidativen Stressbedingungen beitragen kann (192).

#### *1.1.2.1.2 Die Aktivierung von Spx unter oxidativem Thiolstress*

Die Aktivität von Spx kann direkt durch thioispezifischen oxidativen Stress induziert werden (184). Es besitzt zwei konservierte Cysteine, das CxxC-Motiv, die unter oxidierenden Bedingungen eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden können, eine Voraussetzung, um Spx als transkriptionellen Aktivator zu aktivieren (184, 193). Die Bildung der Disulfidbrücke

führt zu Konformationsänderungen in Spx, die möglicherweise die Aktivierung und DNA-Bindung veranlassen (194).

#### *1.1.2.1.3 Möglicher Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch Spx*

Die positive Regulation ist noch nicht eindeutig verstanden. Es wird vermutet, dass durch Thiolstress aktiviertes Spx mit der  $\alpha$ -CTD der RNAP interagiert, um die Expression von Genen, die in der thiol-spezifischen oxidativen Stressantwort, wie zum Beispiel das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktasesystem (TrxA/TrxB) oder Superoxiddismutase, eine Rolle spielen, zu induzieren (103). Bisher konnte jedoch noch nicht beobachtet werden, dass Spx selbst an die DNA bindet, um die RNAP zu rekrutieren (184, 195). DNA-Protein „Crosslinking“-Experimente konnten keine Spx-DNA-Interaktion nachweisen (195). Jedoch zeigte der Vergleich der Kristallstrukturen des Spx-RNAP-Komplex in oxidierter und reduzierter Form eine Verlagerung einer  $\alpha$ -Helix, die möglicherweise verursacht, dass ein Argininrest so positioniert wird, dass eine DNA-Bindung möglich wird. Eine Mutation dieses Restes inhibiert die Aktivität von Spx als Transkriptionsaktivator *in vivo*, jedoch nicht seine reprimierende Eigenschaft, woraus geschlossen werden kann, dass die Bindung von Spx an RNAP hierdurch nicht gestört wird (194).

Kürzlich wurden mittels Chromatin Immunopräzipitation von Spx genomweit Bindestellen des Spx-RNAP-Komplexes identifiziert und untersucht. Eine große Anzahl dieser Bindestellen befindet sich in der Nähe von SigmaA-abhängigen Promotoren. Dabei weisen Spx-kontrollierte Promotoren zwar kein einheitliches Sequenzmotiv, jedoch eine Verlängerung der -10- und -35-Regionen auf. Dies lässt vermuten, dass verschiedene Kombinationen dieser Basen an mehreren Positionen in diesen Verlängerungen die Stärke der Regulation durch Spx bestimmen. Die Basenzusammensetzung an Position -43 scheint besonders wichtig für die Spx-vermittelte Aktivierung zu sein (105).

#### *1.1.2.1.4 Mechanismus der Transkriptionsrepression durch Spx*

Wie schon erwähnt spielt Spx auch eine wichtige Rolle als negativer Regulator der Genexpression. Man vermutet, dass durch Bindung von Spx an die RNAP die Kontaktflächen für andere Aktivatoren verdeckt werden und somit eine große Anzahl an Genen, die unter oxidativen Stressbedingungen nicht benötigt werden, herunter reguliert wird (103).

#### 1.1.2.1.5 Durch Spx regulierte Gene

Als globaler Regulator spielt Spx in der Interaktion mit der RNAP somit eine wichtige Rolle bei Regulation der Thiolhomöostase, wobei bisher direkte regulatorische Effekte nicht von indirekten unterschieden werden konnten. Erst vor kurzem gelang es Rochat et al. 144 Transkriptionseinheiten, die 275 Gene umfassen und unter direkter Kontrolle von Spx stehen, zu identifizieren, wobei sie zwei unterschiedliche Methoden kombinierten. Sie korrelierten die Stellen, mit denen der Spx-RNAP-Komplex auf dem Chromosom vor und nach einem subletalen oxidativen Stress, der durch Diamid ausgelöst wurde, interagiert, mit den Genen, die im Vergleich von Wildtyp und der *spx* Deletionsmutante unter den gleichen Stressbedingungen unterschiedlich exprimiert wurden. Dadurch konnten sie zeigen, dass Spx neben dem Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktasesystem oder der Superoxiddismutase Gene direkt kontrolliert, die im Cystein- und Bacillithiolbiosynthese *Pathway* eine Rolle spielen. Sowohl Cysteine als auch Bacillithiol agieren als Redoxpuffer, die unter oxidativem- oder Thiolstress die Redoxhomeostase aufrechterhalten können (105). Auch andere Stressregulons werden nach Rochat et al. direkt durch Spx reguliert. So konnten sie zeigen, dass Spx die Expression der Hitzeschockgene *clpX*, *clpE* und *clpC* und *clpP* möglicherweise induziert (105). Wie schon erwähnt, spielen ClpC und möglicherweise auch ClpE zusammen mit ClpP durch die Degradation des Repressors CtsR eine Rolle bei der Induktion dieser Hitzeschockgene. Jedoch scheint McsA für die Aktivierung dieser Gene unter oxidativen Stressbedingungen bedeutender zu sein, da es, über einen Redoxswitch aktiviert, zu einer starken De-Repression und damit Inaktivierung von CtsR führt (163).

Hingegen könnte die Induktion der Clp Proteasen durch Spx notwendig sein, um durch oxidativen Stress geschädigte Proteine schnell zu entfernen. Die Spx-abhängige Expression von ClpX und seinem Adapterprotein YjbH könnte zu einem negativen regulatorischen Loop führen, der hilft die ClpXP-Aktivität, die eigentlich unter oxidativem Stress beeinträchtigt ist, aufrechtzuerhalten und die Spx-vermittelte Antwort durch Reduktion der zellulären Konzentration zu beenden. Zusätzlich scheint Spx auch für die Basalaktivität einiger Promotoren unter Nicht-Stress-Bedingungen von Bedeutung zu sein (105).

### 1.1.2.2 Das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase System

Dieses System, das durch Spx direkt reguliert und aktiviert wird, besteht aus dem Thioredoxin TrxA und der NADPH-abhängigen Thioredoxin-Reduktase TrxB. Thioredoxine sind ziemlich kleine, Hitze-stabile und ubiquitär vorkommende Proteine, die durch ein konserviertes Aminosäuremotiv (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys) gekennzeichnet sind, wobei die Cysteine reversibel reduziert und oxidiert werden können und somit effiziente Reduktionsmittel für Disulfide in Proteinen darstellen (196). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sind (197). Damit spielen sie eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxstatus. Oxidierte Thioredoxine können anschließend wieder durch die Thioredoxin-Reduktase in Abhängigkeit von NADPH reduziert werden (196). Zusätzlich wird vermutet, dass Thioredoxine oxidativen Stress abwehren können, indem sie durch oxidativen Stress geschädigte Proteine reaktivieren (198). TrxA aus *B. subtilis* scheint ein für das Überleben der Zelle essentielles Protein zu sein und es wird vermutet, dass es zusammen mit TrxB für die spezifische und generelle Reduktion von Disulfiden verantwortlich ist. Seine Transkription wird an einem  $\sigma^B$ -abhängigen und einem vermutlich  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor initiiert und seine Expression wird durch verschiedene Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitze-, Salz-, Ethanol- Wasserstoffperoxidstress, ausgelöst (199). Nach einem Hitzeschock wird die Transkription über den  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor induziert, während oxidativer Stress die Expression von *trxA* über Spx und den vegetativen Promotor aktiviert.

Smits et al. untersuchten die genaue Rolle von TrxA in *B. subtilis*, indem sie durch Verwendung von DNA Microarrays die Effekte, die eine minimale Expression von TrxA auslöst, auf Transkriptionsebene bestimmten. Dabei beeinflusste eine Verringerung des TrxA-Levels einige Prozesse der Stationärphase, wie zum Beispiel die Kompetenzentwicklung und Sporulation. Zusätzlich konnte eine Induktion von Genen, die sowohl eine Rolle bei der oxidativen Stressantwort als auch bei der Schwefelaufnahme und Schwefelweiterverarbeitung zu Cystein und Methionin spielen, beobachtet werden (200). Mostertz et al. konnten zeigen, dass Störungen in der Schwefelaufnahme, ausgelöst durch den Mangel an TrxA zur Aktivierung der oxidativen Stressantwort führt. Auch die veränderte Expression von Sporulations-abhängigen Genen scheint mit der gestörten Schwefelaufnahme zusammenzuhängen (201).

### **1.1.3 Stressantwort auf hochosmolare Umweltbedingungen**

Werden Mikroorganismen hochosmolaren Bedingungen ausgesetzt, tritt aufgrund von Osmose Wasser über die semipermeable Membran der Zelle nach außen, was somit zu einer Dehydrierung des Cytoplasmas führt. Daher haben Mikroorganismen eine Stressantwort entwickelt, die auf Veränderung der Osmolarität der Umgebung reagiert und ihnen über schnellen Einstrom von Wasser ermöglicht das Volumen innerhalb der Zelle aufrechtzuerhalten (202). Da jedoch Mikroorganismen keinen aktiven Transportmechanismen für Wasser haben, wird das Zellvolumen durch einen Pool von osmotisch aktiven Substanzen reguliert, wobei in diesem Zusammenhang zwei unterschiedliche Mechanismen identifiziert werden konnten.

Zum einen kann durch die Akkumulation einer hohen intrazellulären Konzentration von Ionen das osmotische Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und der Umgebung wieder hergestellt werden („Salt-in“-Strategie) (203, 204). Dabei werden in erster Linie Kalium- und Chloridionen aufgenommen, wodurch die intrazelluläre Salzkonzentration stark ansteigt (205). Da sich eine zu hohe intrazelluläre Salzkonzentration schädlich auf die Makromoleküle der Zelle auswirken kann, ist diese Strategie zeitlich begrenzt. Dauerhaft wird die „Salt-in“-Strategie nur von halophilen („Salz liebenden“) Bakterien oder Archaeen angewandt. Diese sind derart an das Leben unter hochosmolaren Bedingungen angepasst, dass sie das Wachstum einstellen oder sterben, wenn die Salzkonzentration in der Umgebung unter einen bestimmten Schwellenwert sinkt. Das liegt daran, dass sich die Makromoleküle halophiler Mikroorganismen strukturell an die hohen intrazellulären Salzkonzentrationen angepasst haben, dass ihre Funktionalität bei abnehmender Salzkonzentration verloren geht. Die meisten Proteine halophiler Bakterien oder Archaeen bestehen aus einem Überschuss an sauren und einer kleinen Anzahl basischer Aminosäuren (206) und sind daher unter physiologischen pH-Bedingungen negativ geladen (205). Hydratisierte Ionen binden an diese negativ geladenen Reste und können vermutlich dadurch das Protein stabilisieren (206).

Eine andere Strategie zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts beinhaltet die intrazelluläre Anreicherung osmotisch aktiver Verbindungen, der sogenannten kompatibel gelösten Substanzen (207). Durch Synthese oder durch Aufnahme werden diese in der Zelle aus der Umgebung akkumuliert um dem Wasserverlust unter hypertonen Wachstumsbedingungen entgegenzuwirken. Zu ihnen zählt nur eine begrenzte Anzahl von Komponenten, die sich durch eine hohe Löslichkeit auszeichnen und die bei physiologischen pH-Werten ungeladen sind. Dazu gehören Zucker (z.B. Trehalose), Polyole (z.B. Glycerol

und Glukosylglycerol), freie Aminosäuren (z.B. Prolin und Glutamat) oder deren Derivate (z.B. Prolin Betain), quartäre Amine und ihre Sulfoniumanaloga (z.B. Glycin Betain, Carnitin und Dimethylsulfoniopropionat), Sulfatester (Cholin-O-Sulfat), N-acetylierte Di-Aminosäuren und kleine Peptide (z.B. N $\delta$ -Acetylornithin und N-Acetylglutaminylglutamin Amid) (202). Diese kompatibel gelösten Substanzen können auf zwei Arten die Osmoregulation in den Zellen unterstützen. Zum einen binden sie Wasser und halten es demzufolge in der Zelle (203, 206). Im Gegensatz zu anorganischen Salzen können diese Substanzen nämlich in hohen Konzentrationen angereichert werden ohne zelluläre Funktionen wie zum Beispiel DNA-Replikation, DNA-Protein-Interaktionen oder den Metabolismus der Zelle zu stören (208). Zum anderen schützen sie Proteine und andere Zellkomponenten vor der durch hohe Ionenstärken ausgelösten Denaturierung.

Diese Strategie wird zur Anpassung an hohe Salzkonzentrationen von halotoleranten („Salz ertragenden“) Organismen bevorzugt, die dadurch auch unter salzarmen Bedingungen wachsen können.

### **Die osmotische Stressantwort in *B. subtilis***

*B. subtilis* ist ein fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges, begeißeltes Bakterium, das ubiquitär verbreitet ist. Bei plötzlichen osmotischen Veränderungen, versucht *B. subtilis* zuerst durch aktive Schwimmbewegungen (Osmotaxis) Bereiche erhöhter Osmolarität zu meiden und solche mit optimaler Osmolarität aufzusuchen (209). Zudem werden als Antwort auf einen plötzlichen Anstieg der externen Osmolarität vergleichbar zu *E. coli* Kaliumionen über die zwei unterschiedlichen Transportsysteme KtrAB und KtrCD aufgenommen und im Zellinneren akkumuliert (210–212). K<sup>+</sup>-Anreicherung ist für die Wiederaufnahme des Wachstums unter hochosmolaren Bedingungen essentiell. Außerdem führt die Kaliumaufnahme zu einer Neusynthese der kompatibel gelösten Substanz Prolin (*in E. coli*: Trehalose), die schließlich die Kaliumionen ersetzt (210, 211). Dies ist wichtig für den Organismus, da, wie schon unter 1.1.3 erwähnt, die Konzentration an Kaliumionen ab einem bestimmten Schwellenwert toxisch für das Bakterium werden kann. Außerdem helfen kompatibel gelöste Substanzen dem zerstörerischen Effekt der hypertonen Umgebung entgegenzuwirken und erlauben *B. subtilis* trotz hoher Osmolaritäten zu proliferieren. In *B. subtilis* kann Prolin aus Glutamat, Arginin oder Ornithin synthetisiert werden (213). Da Prolin jedoch auch als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in *B. subtilis* dient, sind zusätzliche, zelluläre Kontrollmechanismen, die den Abbau von Prolin während des Wachstums unter hochosmolaren Bedingungen verhindern, notwendig. Zusätzlich ist *B. subtilis* in der Lage

Prolin unter Benutzung des hoch-affinen und substratspezifischen Transporters OpuE aufzunehmen, wodurch die Aufnahme hoher Konzentrationen an Prolin, die für das Wachstum von *B. subtilis* nach einem osmotischen Schock notwendig ist, gesichert wird. Als weitere osmolytisch, aktive Substanz dient Glycin Betain, welches jedoch von *B. subtilis* nur synthetisiert werden kann, wenn die Vorläufersubstanz Cholin vorhanden ist (214). Aufgenommen wird Cholin durch die ABC-Transporter OpuC und OpuB (215), um dann in der Zelle zu Glycin-Betain umgesetzt zu werden (216). Alternativ kann Glycin-Betain auch direkt aus der Umgebung aufgenommen und in die Zelle transportiert werden. Hierfür sind die ABC-Transportsysteme OpuA und OpuC und der Transporter OpuD verantwortlich (215, 217). Verschiedene Substratspezifitäten der jeweiligen Transporter erlauben *B. subtilis* eine sehr flexible Adaption an verschiedene hochosmolare Bedingungen mit der Akkumulation eines unterschiedlichen Spektrums an kompatibel gelösten Substanzen (202).

Auf genetischer Ebene verursacht ein osmotischer Schock die Induktion des  $\sigma^B$ -abhängigen Stressregulons, das wie schon unter 1.1.1.2.2 erwähnt durch viele unterschiedliche Stressbedingungen aktiviert wird (10) und zur koordinierten Transkription von ungefähr 150 Genen führt. Dabei weisen 37 dieser generellen Stressproteine eine wichtige Schutzfunktion gegenüber Salzstress auf, da die Deletion der dazugehörigen Gene zu einem Salz-sensitiven Phänotyp führt (218). Unter den  $\sigma^B$ -kontrollierten Genen befinden sich unter anderem die, welche für OpuD und OpuE kodieren und somit für den Import der kompatibel gelösten Substanzen Glycin-Betain und Prolin verantwortlich sind (11).

Zusätzlich zum  $\sigma^B$ -Regulon werden die alternativen ECF-Sigmafaktoren (*extracytoplasmic function*)  $\sigma^M$ ,  $\sigma^W$  und  $\sigma^X$ , die für den Schutz der Zellhülle vor verschiedenen Stressarten verantwortlich sind, durch einen plötzlichen Anstieg in der Osmolarität induziert (218–220).

Auch Gene, die für die Proteinqualitätskontrolle von Bedeutung sind, werden nach einem osmotischen Schock verstärkt transkribiert. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass hyperosmotische Bedingungen Denaturierung und Fehlfaltung von Proteinen induzieren können (218).

Zusätzlich kommt es nach einem plötzlichen osmotischen Schock zu einer veränderten Transkription von mehreren salzspezifischen Genen. Transporter für kompatibel gelöste Substanzen und Gene für die Prolinsynthese werden zum Beispiel hochreguliert, während Gene, die im anabolen Abbau von Prolin involviert sind, reprimiert werden. Darüber hinaus scheint das DegS/DegU Zwei-Komponenten-System eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber Salzstress zu spielen. DegS könnte als Sensor kinase den Salzstress wahrnehmen

und DegU aktivieren, das als Regulatorprotein in der Lage ist, das Signal zum Transkriptionsapparat der Zelle weiterzuleiten. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass eine große Anzahl von Genen, die durch Hochsalzbedingungen eine veränderte Expression aufweisen, dem DegS/DegU-Regulon angehören (221).

## **1.2 Die Rolle von Chaperonen in der Evolution**

Evolution bezeichnet die phänotypische Veränderung einer Population von Generation zu Generation. Diese lässt sich durch die Verwendung von Organismen mit kurzen Generationszeiten in Echtzeit experimentell gut untersuchen. Durch zufällige Mutationen des Genpools entstehen neue Allele, die zu einer genetischen Variabilität zwischen einzelnen Individuen führen. Evolution findet aufgrund von natürlicher Selektion statt, wobei als natürliche Selektion ein Prozess bezeichnet wird, in dem sich die Allele, die für das Überleben und die Fortpflanzung vorteilhaft sind und damit einen Fitnessvorteil darstellen innerhalb einer Population durchsetzen. Phänotypische Variationen innerhalb einer Population geschehen jedoch nicht nur durch Veränderungen, die durch Mutationen oder durch epigenetische DNA-Veränderungen wie zum Methylierung hervorgerufen werden, sondern kann auch durch bistabile Genexpression, entstehen. Bistabilität beschreibt eine Situation, in der zwei stabile Zustände innerhalb der Individuen einer Population koexistieren, wobei dies durch die stochastischen Schwankungen in der Expression bestimmter Gene hervorgerufen wird. Zusätzlich müssen puffernde Systeme existieren, die trotz genetischer Variabilität für die Robustheit des Phänotyps garantieren und somit für eine normale Entwicklung des Organismus sorgen.

### **1.2.1 Experimentelle Evolution**

Die Lebensweise von Bakterien erfordert eine ständige Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen. Die Anpassung des Genotyps an neue Umweltsituationen (Adaptation) erfolgt aufgrund der Selektion vorteilhafter Mutationen und bringt neue Phänotypen hervor (222).

Durch die experimentelle Evolution von Mikroorganismen, die unter kontrollierten biotischen und abiotischen Bedingungen durchgeführt werden sollte, ist es möglich, diese vorteilhaften Mutationen zu identifizieren und zu untersuchen, inwiefern sie die biologische Fitness des

Organismus unter einem bestimmten Selektionsdruck beeinflussen. Eine Möglichkeit Evolution im Labor durchzuführen ist die sogenannte Batch-Kultur, in der die Organismen in einem festgelegten Volumen an Medium kultiviert werden. Da jedoch die Versorgung von Nährstoffen nicht gegeben ist, ist es nicht möglich, die Zellen für einen längeren Zeitraum in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten und damit adaptive Prozesse zu ermöglichen (223). Um die Zellen für einen längeren Zeitraum unter konstanten Bedingungen zu halten, wird bereits seit 1950 das System der kontinuierlichen Kultur eingesetzt (224, 225). Dabei wird im System des Chemostaten ein definiertes Volumen an Zellkultur in festgelegten Zeitabständen mit einem bestimmten Volumen an frischem Medium versetzt (226). Dadurch ist die Versorgung mit Nährstoffen gesichert und die Kultur kann über einen langen Zeitraum in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten werden. Gleichzeitig wird die gleiche Menge Zellkultur aus dem System abgelassen. Somit müssen sich die Zellen in Kultur so schnell reproduzieren, dass ihre Wachstumsrate nicht unter der Zuflussrate des Mediums liegt. Die Wachstumsrate wird hierbei durch die Verfügbarkeit eines limitierenden Wachstumsfaktors oder die Akkumulation eines wachstumshemmenden Faktors kontrolliert (227).

Im Turbidostaten, einem weiteren System der kontinuierlichen Kultur, wird das Wachstum durch einen internen Faktor, zum Beispiel die Zelldichte kontrolliert (226). Hier werden optimale Wachstumsbedingungen mit maximaler Wachstumsrate für den jeweiligen Organismus geschaffen, wodurch die Verdünnungsrate unter experimentell vorgewählten optimalen Wachstumsbedingungen abhängig von der Wachstumsrate der Organismen ist.

Durch Mutationen entstehen unterschiedliche Subpopulationen innerhalb einer Population mit verschiedenen Wachstumsraten. Subpopulationen, die eine höhere Wachstumsrate im Vergleich zu den anderen aufweisen, können sich in der kontinuierlichen Kultur etablieren, während andere, die sich langsamer teilen und schlechter angepasst sind, aus der Kultur ausgewaschen werden (227).

Ein Problem der kontinuierlichen Kultur liegt in der Bildung von Biofilmen an inneren Oberflächen der Kulturapparatur. Biofilme sind Oberflächen-assoziierte vielzellige Gemeinschaften von Mikroorganismen, die in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen eingebettet sind (228). Im ersten Schritt der Biofilmbildung heften sich die Zellen an eine Oberfläche. Dies induziert die Aktivierung von Biofilm-spezifischen Genen und Proteinen, die daraufhin interzelluläre Signalmoleküle synthetisieren und die Matrixbildung starten (228). Diese selbstproduzierte extrazelluläre Matrix, die vorwiegend aus Proteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden besteht, hält die Zellen zusammen und stabilisiert über

Aufrechterhaltung der Zell-Zell- und Zell-Oberfläche-Interaktionen den Biofilm (228, 229). Zellen innerhalb der Biofilme sind geschützt vor dem gesetzten Stressfaktor und unterliegen nicht mehr dem Selektionsdruck (230). Eine Möglichkeit, dies zu verhindern, ist die serielle Subkultur. Hierbei werden die Zellen regelmäßig in frische Kulturgefäße überführt und so die Entstehung der Biofilme verhindert (231). Bei dieser Methode besteht jedoch eine hohe Gefahr der Kontamination. Außerdem ist kein kontinuierliches Wachstum mehr möglich, da die Organismen lag-, logarithmische und stationäre Phasen durchlaufen müssen. Des Weiteren führt das Überimpfen von kleinen Individuenzahlen zum sogenannten „Flaschenhalseffekt“ und die Evolution wird verlangsamt.

Eine Lösung für die experimentelle Evolution in kontinuierlicher Kultur, welche die Bildung von Biofilmen und den „Flaschenhalseffekt“ umgeht, bietet die „*Genetic machine*“ (GM 2.1, Malière, Mutzel Pat: DE 2982168201) (232) (Abbildung 3). Diese automatisierte Apparatur ermöglicht die Züchtung von Organismen über unbestimmte Zeiträume, ohne dass eine Überimpfung in frisches Medium notwendig ist.

Mittels dieser Technologie gelang Rupert Mutzel die Adaptation von *E. coli* Zellen an einen durch die Deletion der Formyltransferase und Deformylase ausgelösten endogenen Wachstumsstress (unveröffentlicht). Das Enzym Formyltransferase spielt in Bakterien eine wichtige Rolle während der Proteinbiosynthese. Bakterien besitzen zwei verschiedene tRNA-Arten für Methionin: tRNA<sup>fMet</sup> und tRNA<sup>mMet</sup>. Beide werden zwar durch dieselbe Methionyl-tRNA-Synthetase beladen, aber nur die tRNA<sup>fMet</sup> wird durch Formyltransferase modifiziert. Es fügt eine Formylgruppe an die freie Aminogruppe der Methionin tragenden Initiations-tRNA<sup>fMet</sup> hinzu. So entstandene fMet·tRNA<sup>fMet</sup> funktioniert als Initiator für die Proteinbiosynthese (233). Das für die Formyltransferase kodierende Gen heißt *fmt* (234).

Bevor das neusynthetisierte Protein gefaltet werden kann, trennt die Peptid-Deformylase die Formyl-Gruppe des Formyl-Methionins ab (235). Während *E. coli* nur eine Peptiddeformylase mit dem kodierenden Gen *def* besitzt, weist *B. subtilis* zwei Peptiddeformylasen mit den kodierenden Genen *def* und *ykrB* auf. Deletionen der Peptiddeformylasen sind letal, aber nur, wenn die Formyltransferase nicht gleichzeitig deletiert wird (236). In diesem Fall sind die Zellen, in denen der N-Terminus neusynthetisierter Polypeptidketten nicht formyliert wird, zwar überlebensfähig, zeigen jedoch ein stark verlangsamtes Wachstum. In der „*Genetic machine*“ wurde die *def/fmt E. coli* Mutante auf schnelleres Wachstum selektiert und wies nach einem Monat (ca. 300 Generationen) zum Wildtyp vergleichbare Generationszeiten und damit auch ähnliche Geschwindigkeiten in der Proteinsynthese auf. Die Selektion und Fixierung von

aufeinanderfolgenden, sich an die Deletion anpassenden Mutationen führte zu einem stufenweisen Anstieg in der Wachstumsrate der evolvierenden Population (unveröffentlicht). Der Vorteil des normalen Wachstums dieser Mutante verhalf Sandikci et al. zu einem gekoppeltem in vitro Transkriptions-Translationssystem, in dem die naszierenden Polypeptidketten nicht formyliert werden. Dieses konnte zu Untersuchungen, welche die Prozessierung neusynthetisierter Polypeptidketten am Ribosom betreffen, herangezogen werden (237).

Außerdem gelang es kürzlich mittels der „Genetic machine“ die kanonische Base Thymin im Genom von *E. coli* durch das in der Natur nicht vorkommende 5-Chlor-Uracil zu ersetzen (232).

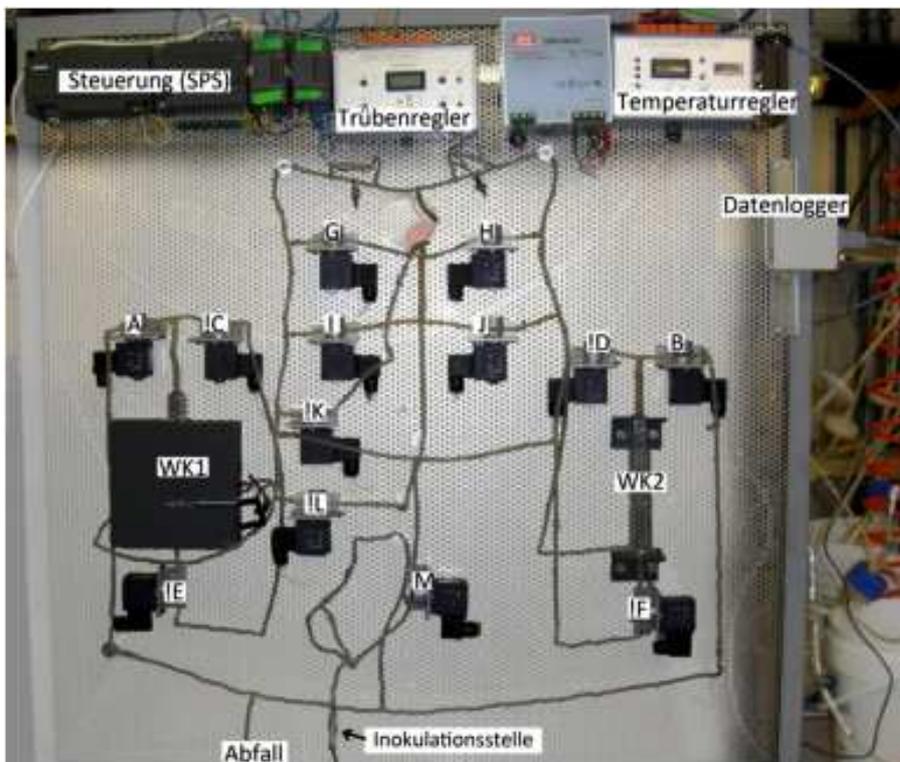


Abbildung 3: Die genetische Maschine (GM 2.1).

### 1.2.2 Bistabilität

Üblicherweise wird bakterielles Wachstum als das Ergebnis symmetrischer Zellteilung, das zwei genetisch identische Zellen hervorbringt, angesehen (238). Jedoch weisen Bakterien einer identischen Population Variationen in der Expression eines bestimmten Genes auf, die auf zufällige Schwankungen in der Synthese- und Abbaurate dieses Genprodukts beruhen (239). Dieses stochastische „Rauschen“ ist ein Schlüsselfaktor der phänotypischen Variation, die zur Bistabilität führen kann (238). Genauer ausgedrückt entsteht Bistabilität durch unimodales Rauschen in der Expression eines Masterregulatorgens, die den Schwellenwert überschreitet. Somit wird die quantitative Veränderung qualitativ und ein neues Expressionsmuster entsteht, das zu einer Zweiteilung der Population in ko-existierende Zelltypen führt. Somit bedeutet Bistabilität, dass ein regulatorisches System zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen umschalten kann, wobei dies zufällig geschieht (239). Um jedoch überhaupt einen bistabilen Output zu generieren, benötigt das genetische Netzwerk einen spezifischen Feedbackmechanismus in Kombination mit einer nichtlinearen und hypersensitiven Antwort (240). Ein spezifisches Feedback kann auf die positive Autoregulation des Masterregulatorgens zurückzuführen sein. Zellen, in denen die Konzentration des Masterregulators den Schwellenwert übersteigt, werden aufgrund der positiven Autorregulation eine noch größere Menge von diesem Regulator akkumulieren. Jedoch ist für diesen Mechanismus notwendig, dass der Masterregulator auf sich selbst nicht-linear antwortet (239). Nicht-Linearität kann erfolgen, wenn der Masterregulator ein Multimer bilden muss, um aktiv zu werden oder wenn die Bindung an die DNA kooperativ erfolgt (240), wodurch die Antwort auf Veränderungen der Regulatorkonzentration hypersensitiv reagieren kann (239).

Der zweite Mechanismus, der zu Bistabilität führen kann, benötigt die Anwesenheit von zwei sich gegenseitig reprimierenden Repressoren. Wird der zweite Repressor R2 zum Beispiel durch ein induzierendes Protein (Ind) inaktiviert kann Repressor R1 generiert werden und inhibiert die Synthese von R2. Dies ist dem Mechanismus der positiven Autoregulation sehr ähnlich, da ein Anstieg der R1 Konzentration zu einer gesteigerten R1 Produktion führt. Reprimiert nun R2 eine bestimmte Gruppe von Genen, werden diese nun exprimiert. Wird das induzierende Protein zurückgenommen, bleibt das System in diesem Zustand, in dem R1 an- und R2 abgeschaltet ist. Ist jedoch in einem Teil der Population die Konzentration an induzierendem Protein zu gering gewesen, werden zwei Zelltypen nebeneinander ko-

existieren bis zufällige Schwankungen in der Repressorkonzentration den Schalter wieder umschalten (239).

Da Bistabilität damit zu einer größeren Heterogenität und Variabilität innerhalb einer Population führt, schafft sie eine bessere Anpassung an umgebungsbedingte Schwankungen und steigert somit die Fitness der Spezies.

Kompetenzentwicklung, Motilität und Sporulation sind Beispiele für bistabile Systeme in *B. subtilis*.

### **1.2.2.1 Genetische Kompetenz**

Der Masterregulator der Kompetenzentwicklung ist der transkriptionale Aktivator ComK, der die Expression von Kompetenz-spezifischen Genen und seine eigene aktiviert. Außerdem bindet ComK an den *comK*-Promotor als ein Dimer von Dimeren und somit erscheint die Transkription hypersensitiv gegenüber der Konzentration an ComK zu sein (241). Durch diese zwei Eigenschaften werden somit die Bedingungen erfüllt, die Bistabilität ermöglichen. Die *comK* Expression unterliegt einer sehr komplexen Regulation. Während der exponentiellen Phase wird synthetisiertes ComK degradiert. In der stationären Phase ermöglicht ein „*quorum-sensing*“ Mechanismus, wobei ein extrazelluläres Pheromon mit einer membranständigen Histidinkinase interagiert und somit eine Phosphorylierungskaskade auslöst, die die Synthese von ComS, das den Abbau von ComK unterbindet (91). Man vermutet, dass Rauschen in der Expression von *comK* Zellen für die Kompetenzentwicklung auswählt. Aufgrund dieses Rauschens, welches auf intrinsische und zufällige Vorkommnisse von Transkription und mRNA-Abbau zurückzuführen ist (242), überschreitet die Konzentration an ComK in einigen Zellen einen bestimmten Schwellenwert. Dies führt zur Aktivierung des positiven Loops und befähigt die Zellen zur Kompetenzentwicklung (239).

### **1.2.2.2 Motilität**

Während der exponentiellen Wachstumsphase von *B. subtilis* besteht die Population aus sowohl aktiv schwimmenden als auch nicht motilen Zellen. Nicht motile Zellen liegen als lange Ketten vor, die sich nach der Zellteilung nicht voneinander getrennt haben, während motile Zellen einzeln oder als Dupletts erscheinen. Dieses motile Verhalten eines Teils der Population spiegelt ein weiteres bistabiles System wider. Der Masterregulator, der für die

Motilitätsentwicklung und für die Trennung von Zellen verantwortlich ist, ist der alternative Sigmafaktor  $\sigma^D$ . Dieser induziert die Transkription von Genen, die sowohl für die Flagellum Biosynthese und für Motilität von Bedeutung sind, als auch für Autolysine kodieren, Enzyme, welche die Verbindung zwischen den Zellwänden gerade geteilter Zellen degradieren (243, 244). In schwimmenden Zellen ist  $\sigma^D$  somit aktiv und in nicht-motilen inaktiv. Im Gegensatz zu dem Beispiel von ComK scheint sich das Umschalten, das zur Aktivierung von  $\sigma^D$  führt, nicht auf dem Level der Transkription des alternativen Sigmafaktors abzuspielen. Es scheint eher ein bisher noch nicht bekannter Mechanismus dahinter zu stecken, der auf dem Level der Stabilität oder Aktivität des Proteins operiert (239).

### 1.2.2.3 Sporulation

Die Aktivierung der Sporulation ist ein weiteres Beispiel für Bistabilität in *B. subtilis* und kann in einem Teil der Population unter nährstoffarmen Bedingungen induziert werden, wobei ein Zelltyp entsteht, auch bekannt als Spore, der extrem resistent gegenüber zahlreichen Umweltstressen ist. Reguliert wird der Eintritt in die Sporulation durch einen so genannten „Phosphorelay“, eine Serie von konsekutiven Reaktionen, die durch Phosphotransferasen katalysiert werden und zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des Masterregulators für die Sporenbildung, Spo0A führen. Phosphoryliertes Spo0A stimuliert daraufhin die Synthese des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^H$ , wobei  $\sigma^H$  unter anderem die Transkription des Gens für Spo0A selbst und für Gene, die am Phosphorelay beteiligt sind aktiviert. Dadurch verstärkt phosphoryliertes Spo0A seine eigene Synthese und Phosphorylierung. Schwankungen in der Konzentration von einer oder mehreren Komponenten, die zur Aktivierung von Spo0A führen, entscheiden, ob Spo0A in einer bestimmten Zelle aktiviert wird oder nicht (240).

### 1.2.3 Hsp90 und seine Rolle in der Evolution

Das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) ist, wie schon unter 1.1.1.1.4 erwähnt, im Gegensatz zu seinem prokaryotischen Ortholog HtpG in seiner Funktion als Regulator der Zellfunktion essentiell (245). In vielen Eukaryoten kommen mehrere Isoformen von Hsp90 vor, wobei neben der cytosolischen Form noch solche zu finden sind, die spezifisch für das Endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien oder die Chloroplasten sind (246). Unter

normalen Bedingungen ist zum Ausüben seiner Funktion nur eine geringe Konzentration an Hsp90 notwendig. Trotzdem wird es im Überschuss exprimiert und ist mit einer Konzentration von 1 bis 2 % des gesamten zellulären Proteingehalts das am häufigsten vertretene Chaperon im Cytoplasma der Zelle (124). Somit wird sichergestellt, dass bei einem unerwartet auftretenden Stress Hsp90 sofort zur Stelle sein kann. Die Funktion von Hsp90 hängt von den mehr als 20 Ko-Chaperonen ab, die zum einen das Zusammenspiel des Hsp90 Chaperonsystems mit anderen Chaperonsystemen, zum Beispiel dem Hsp70 Chaperonsystem koordinieren, zum anderen die ATPase-Aktivität von Hsp90 regulieren oder die Interaktion von Hsp90 mit seinen Clients veranlassen (247). Zusätzlich wird Hsp90 auch durch zahlreiche post-translationale Modifikationen, wie zum Beispiel Acetylierung, Phosphorylierung und Nitrosylierung reguliert (124).

Im Gegensatz zu anderen Chaperonen spielt Hsp90 eine Rolle bei der Faltung von spezifischen regulatorischen Proteinen, die ihrerseits in den größeren Signaltransduktionswegen involviert sind. Üblicherweise sind diese Clients metastabile Proteine, die erst in ihre stabile Konformation falten können, wenn sie zum Beispiel durch Ligandenbindung oder Phosphorylierung aktiviert wurden (9). Hsp90 bindet und stabilisiert diese Proteine in einem späten Stadium ihrer Faltung, während sie in ihrer teilweise gefalteten, intermediären Konformation (248) auf ihre Aktivierung durch Ligandbindung, Phosphorylierung oder Translokation durch die Membran warten. Somit erweisen sich Komplexe aus Hsp90 und seinen Clients hochdynamisch und als sehr anfällig gegenüber Stress (9). Zu den Clients von Hsp90 gehören Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Rezeptoren, die ihrerseits essentielle Rollen in der Wachstumskontrolle, dem Zellüberleben und bei Entwicklungsprozessen spielen (248). Über die Interaktion mit diesen Clients reguliert Hsp90 somit indirekt diverse zelluläre Prozesse. Es wird vermutet, dass Hsp90, vermutlich als Konsequenz der Effekte, die es auf die Genexpression oder Signaltransduktion ausübt, eine wichtige Rolle bei evolutionären Prozessen spielt (125). In diesem Zusammenhang konnten Rutherford und Lindquist zeigen, dass eine verminderte Hsp90-Funktion in *Drosophila melanogaster* zu phänotypischen Abnormitäten in fast allen morphologischen Strukturen führt (249). Auch in *Arabidopsis thaliana* führt eine Reduzierung des Hsp90 Levels zu einer starken phänotypischen Variation (250, 251). Jedoch ist anzumerken, dass diese entwicklungsgemäßen Anomalitäten in den Genomen der Organismen schon vorher vorhanden, also genetisch kodiert waren, jedoch im Falle eines funktionierenden Hsp90 Chaperons phänotypisch nicht zum Vorschein kamen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass sich unter normalen Bedingungen verschiedene

Polymorphismen im Genom ansammeln können, ohne phänotypisch in Erscheinung zu treten, da Hsp90, das im Normalfall im Überschuss in der Zelle vorliegt, diese abpuffert. In Stresssituationen werden die Clients von Hsp90 noch zusätzlich destabilisiert und auch andere zelluläre Proteine entfalten, was die Kapazität des Puffers erschöpfen kann. Daraus folgt, dass diese akkumulierten Polymorphismen nun phänotypisch sichtbar werden. Dies geschieht auch, wenn die Hsp90-Expression vermindert wird. Hsp90 erlaubt demnach die Speicherung und kontrollierte Freilassung genetischer Variation. Unter Stressbedingungen könnte damit eine vorteilhafte Mutation, die zuvor in der Zelle unterdrückt wurde, nun exprimiert werden und zu neuen und möglicherweise besser angepassten Phänotypen führen (249, 251).

Dabei wird vermutet, dass die Pufferfunktion von Hsp90 auf einem epigenetischen Mechanismus beruhen könnte (252, 253). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Hsp90 in *D. melanogaster* mit Trx, einem Protein der Trithorax-Gruppe, die über Chromatin-„*Remodeling*“ den aktiven Transkriptionsstatus von Entwicklungsgenen aufrecht erhalten, interagiert und es stabilisiert. Ein vermindertes Hsp90-Level führt demzufolge zu einer Destabilisierung und Degradierung von Trx und somit zu einer veränderten Expression von Entwicklungsgenen, wodurch phänotypische Veränderungen entstehen können (253).

Studien an *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* konnten zeigen, dass ein normales Hsp90 Level die Entwicklung neuer Resistenzen gegenüber Antimykotika ermöglicht. Wird die Hsp90-Aktivität pharmakologisch oder genetisch vermindert, ist die Fähigkeit der Zellen Resistenzen zu entwickeln stark reduziert. Das in diesem Experiment verwendete Antimykotikum verhindert das Wachstum von Pilzen durch Inhibierung von Erg11, einem Protein, das in der Ergosterol-Biosynthese benötigt wird. Ergosterol stellt eines der wichtigsten Sterole in den Membranen von Pilzen dar. Die Inhibierung führt zu einer Akkumulation toxischer Intermediate (254). Resistenz kann durch Mutationen von Erg3, die die Akkumulation toxischer Intermediate verhindern kann, geschaffen werden (255). Jedoch führt normalerweise auch das Fehlen von Erg3, einem Protein, das in der Sterolbiosynthese involviert ist zum Tod des Pilzes.

Hsp90 sichert vermutlich durch Bereitstellung von Calcineurin, einem Client von Hsp90, das an vielen Schutzmechanismen beteiligt ist, das Überleben des Pilzes.

Dieses Beispiel zeigt, wie Hsp90 evolutionäre Neuerungen durch die Faltung von Proteinen, die auf Mutationen, die zwar in einer Umgebung einen selektiven Vorteil bieten können, sich ansonsten nachteilig auf den Organismus auswirken, reagieren und den negativen Effekt vermindern kann (256).

Auch in Krebszellen konnten Beispiele für das evolutionäre Potential von Hsp90 gefunden

werden. Dabei scheint das Chaperon der Zelle zu helfen Mutationen in entscheidenden Zellregulatoren, die eigentlich zu Fehlfaltung und damit zur Letalität der Zelle führen, zu tolerieren und somit ihr onkogenes Potential zu unterstützen, indem Hsp90 diese in ihrer Konformation hält und somit den Zelltod verhindert (257, 258).

Die Hypothese, dass Hsp90 schon bestehende genetische Variationen abpuffern kann, so dass diese nicht exprimiert und sich im Genom anhäufen können, wird jedoch durch Studien von Specchia et al. in ein anderes Licht gerückt. Hier konnte gezeigt werden, dass funktionale Veränderungen von Hsp90 den Piwi-interagierenden RNA (piRNA) „silencing“ Mechanismus in *D. melanogaster* beeinflussen. Die piRNA ist eine kleine, für die Keimbahn spezifische RNA in wirbellosen- und Wirbeltieren und man vermutet, dass sie zusammen mit den Piwi Proteinen, die der Argonaut Protein Familie zugeordnet werden können, eine Rolle bei der Stilllegung („silencing“) von Genen, besonders von Transposons spielt. Eine Reduktion des zellulären Levels von Hsp90 führte vermutlich durch eine veränderte piRNA Biogenese zu einer Stressantwort-ähnlichen Aktivierung und Transposition mobiler Elemente und somit zu neuer Variation.

Jedoch konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden, ob Hsp90 direkt in der piRNA Biogenese involviert ist oder nur an der Stressantwort die zur Transposonaktivierung führt, beteiligt ist. Möglicherweise zeigen diese Daten auch einen zusätzlichen oder sogar alternativen Mechanismus, inwiefern eine verminderte Hsp90-Funktion neue Phänotypen hervorbringen kann (259).

### **1.3 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die durch Hitze ausgelöste Stressantwort und der Effekt der Thermotoleranz im Hinblick auf das Proteinqualitätssystem in dem grampositiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* studiert. Insbesondere die Clp Proteasen spielen in diesem Organismus eine bedeutende Rolle in der Proteinqualitätskontrolle, sind jedoch auch in der regulatorischen Proteolyse involviert. Die Bedeutung dieser für die Thermotoleranzentwicklung ist bisher jedoch noch weitgehend unbekannt. Daher sollte in diesem Zusammenhang der Einfluss bestimmter Clp Proteasen und Chaperone auf die Entstehung und Lokalisation von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen untersucht werden.

In einem weiteren Aspekt dieser Arbeit wurde das Chaperon HtpG von *B. subtilis*, welches das bakterielle Homolog zu Hsp90 darstellt, genauer betrachtet und im Hinblick auf seine Rolle in evolutionären Prozessen untersucht. In diesem Sinne sollte HtpG biochemisch und seine Bedeutung für die bakterielle Zelle unter Verwendung von *B. subtilis* als Modellorganismus geklärt werden. Nachdem dem Chaperon Hsp90 ein bedeutender Einfluss auf die eukaryotische Evolution nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob das auch für HtpG, dessen Rolle in Prokaryoten noch weitgehend unbekannt ist, auch zutreffen könnte. Somit wurde der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an einen bestimmten endogenen und exogenen Stress und auf bistabile Systeme näher untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
3-N-(Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -Casein from bovine milk	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 4K Lösung (30 %), Mix 37,5:1	Applichem, Darmstadt
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche applied Science, Mannheim
Agar-Agar (bakteriologisch)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar (Kobe I)	Roth, Karlsruhe
Agarose Standard (ROTI@GAROSE)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniummolybdat Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Bacto nutrient broth	BD difco, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Na-Salz	Roth, Karlsruhe

Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Calciumnitrat	Roth, Karlsruhe
Caseinhydrolysat, säurehydrolysiert (Casaminoacids)	Roth, Karlsruhe
Chitin Beads (in 20 % Ethanol)	NEB, Ipswich, USA
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform, p.a.	Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
complete (EDTA free)	Roche applied Science, Penzberg
Coomassie-Brilliantblau R250	Neolab, Heidelberg
D-(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
D-(+)-Mannit	Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
D-(+)-Xylose	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
dNTP mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
ECF™ Substrat	GE Healthcare, Uppsala,
Eisen(III)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Eisen(II)-sulfat	Roth, Karlsruhe
Erythromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure, 96 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 95 % (vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 99 % (reinst)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung, 1 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin, 99 %	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe

Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Lactatdehydrogenase (LDH) in APS	Roche applied Science, Mannheim
Lincomycin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
NADH	Roche applied Science, Mannheim
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin)	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
N-(Tri(-hydroxymethyl)-methyl)-glycin (Tricin)	Roth, Karlsruhe
p-Nitrotetrazoliumblausulfat	Roth, Karlsruhe
Phenol solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Applichem, Darmstadt
Protein A/G Magnetic Beads	Thermo Scientific, Schwerte
Protino Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel, Düren
Pyruvatkinase (PK) in 50 % Glycerin	Roche applied Science, Mannheim

Radicicol <i>Biochemica</i>	Applichem, Darmstadt
ROTI®Quant	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Roth, Karlsruhe
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetrazyklin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein (proteolytisch verdaut)	Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe

Alle nicht angegebenen Chemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fermentas (St. Leon-Rot), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erworben. Die Chemikalien entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „*pro analysis*“.

### **2.1.2 Enzyme**

Dreamtaq™ DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I, rekombinant	Applichem, Darmstadt
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Phusion® High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes Reagents, Vantaa, Finnland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyruvatkinase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fast-Digest Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	USB, High Wycombe, GB
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	Fermentas, St. Leon-Rot

### **2.1.3 Antikörper**

Polyklonale Antikörper

Pineda Antikörper Service,  
Berlin

Rabbit IgG

Antikörper-Online, Aachen

GFP Mouse

Enzo Life Sciences, Lörrach

Mouse IgG

Antikörper-Online, Aachen

McsB

Ulf Gerth

TrxA

JM van Dijl

YjbH

von Wachenfeld

### **2.1.4 Größenstandards und Kits**

DNA Clean & Concentrator™ -5 Kit

Zymo Research, Irvine, USA

Lambda DNA/ Eco130I (StyI) Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit

Merck Millipore, Darmstadt

Prestained Protein Molecular Weight Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

QIAprep® Spin Miniprep Kit

QIAGEN, Hilden

Quickchange site-directed mutagenesis Kit

Stratagene, Heidelberg

Unstained Protein Molecular Weight Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit

Zymo Research, Irvine, USA

### **2.1.5 Chromatographie-Säulen**

HiLoad 16/60 SuperDex 75 Pepgrade

GE Healthcare, Uppsala,  
Schweden

Resource Q (1 ml)

GE Healthcare, Uppsala,  
Schweden

Superose 6 10/300 GL

GE Healthcare, Uppsala,  
Schweden

High Trap Desalting (5 ml)

GE Healthcare, Uppsala,  
Schweden

## **2.1.6 Sonstige Materialien**

Glasware	VWR, Darmstadt
Mikrotestplatte 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosefilter	Merck Millipore, Darmstadt
PCR-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Roti®-PVDF (Porengröße 0,45 µm, hydrophobe Bindung)	Roth, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapier	Roth, Karlsruhe
Safe-Seal Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht / Eppendorf, Hamburg
Spectra/Por® Dialyse Membran, MWCO 6-8 kDa	Spectrum Europe B.V., Breda, Niederlande
Vivaspin 20, 10 kDa	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

## **2.1.7 Geräte**

### **2.1.7.1 Zentrifugen**

Biofuge fresco	Heraeus Laboratory Centrifuges, Buckinghamshire, England
Biofuge pico	Heraeus Laboratory Centrifuges, Buckinghamshire, England
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SORVALL® RC6+ Centrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
SORVALL® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Thermo Scientific, Schwerte

### **2.1.7.2 Waagen**

Feinwaage XB220A

Precisa Gravimetrics AG, Dietikon,  
Schweiz

Waage Sartorius BP3100P

Sartorius AG, Goettingen

### **2.1.7.3 Brutschrank**

Heraeus Function Line

Kendro Laboratory Products GmbH,  
Langenselbold

### **2.1.7.4 Spannungsquellen**

Power-Pac 300

Bio-Rad, München

Consort EV243

Consort, Turnhout, Belgien

### **2.1.7.5 Inkubationsschüttler**

Wasserbadschüttler Aquatron®

Infors GmbH, Einsbach

Inkubationsschüttler Ecotron®

Infors GmbH, Einsbach

Inkubationsschüttler Unitron®

Infors GmbH, Einsbach

### **2.1.7.6 Mikroskopie**

Eclipse 90i

Nikon Instruments Europe B.V., Surrey,  
England

Camera Controller C4742-95

Hamamatsu Phototonics Deutschland  
GmbH,  
Herrsching am Ammersee

### 2.1.7.7 weitere Geräte

ÄKTA purifier	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg
Geldokumentation AlphaImager™ EP	Cell Bioscience, Santa Clara, USA
Thermocycler Biometra® Tpersonal	Biometra GmbH, Goettingen
SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
French® Pressure Cell Press	Thermo Scientific, Schwerte
Heizmagnetrührer RCT basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad, München
PROTEAN® II xi Cell	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System	Bio-Rad, München
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Schwerte
µQuant	Biotek Instruments, Vermont, USA
pH-Meter SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Sonifikator SONIFIER® Cell Disruptor B-15	Branson, Danbury, USA
Plattenphotometer Tecan Sunrise Plate Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Kulturröller TC-7	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Thermoschüttler Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Kontaktlampe Chroma 4	Vetter GmbH, Wiesloch
Vakuumpumpe Vacuubrand	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz
Vortexer Vortex Reagenzglasnischer ,semi-dry' Elektrobloetter (Graphit-Elektroden)	neolab®, Heidelberg
Pipetman Pipetten	Eigenbau Gilson, Villiers le bel, France

## 2.1.8 Organismen

### 2.1.8.1 *E. coli* Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/ Referenz
XL 1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <i>proAB lacIqZM15</i> Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene, La Jolla, USA
ER2566	F- $\lambda$ - <i>fhuA2</i> [ <i>lon</i> ] <i>ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11</i> $\Delta$ ( <i>mcrC-mrr</i> )114:: <i>IS10</i> R( <i>mcr-73::miniTn10-Tet<sup>r</sup></i> )2 R( <i>zgb-210::Tn10</i> )(Tet <sup>r</sup> ) <i>endA1</i> [ <i>dcm</i> ]	NEB, Ipswich, USA
FI1202	<i>lacI<sup>q</sup> lacL8 glnG::Tn5</i> $\lambda$ 202	(260)

Tabelle 1: *E. coli*-Stämme

### 2.1.8.2 *B. subtilis* Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis* Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt. Pfeile in der Spalte „Herkunft/Referenz“ bedeuten, dass die chromosomale DNA des erstgenannten Stammes in den Zweitgenannten transformiert wurde. Die hergestellten Stämme wurden durch Test-PCR mit den entsprechenden Primern und Selektion auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Platten auf ihre Identität überprüft.

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	(261)
BNM103	$\Delta$ <i>clpP::spc</i>	BUG1 $\rightarrow$ <i>B. subtilis</i> 168 (60)
BNM105	$\Delta$ <i>clpC::tet</i>	QBP418 $\rightarrow$ <i>B. subtilis</i> (94)
BNM107	$\Delta$ <i>clpX::kan</i>	BEK90 $\rightarrow$ <i>B. subtilis</i> 168 (60)
BNM111	$\Delta$ <i>spx::kan</i>	ORB3834 $\rightarrow$ <i>B. subtilis</i> 168 (65)
BNM117	$\Delta$ <i>mcsB::kan</i>	N. Molière
BSR2	<i>mdh-gfp spec</i>	Diese Arbeit
BNM118	$\Delta$ <i>dnaK::cat</i>	BT02 $\rightarrow$ <i>B. subtilis</i> 168 (150)

BNM119	<i>ΔdnaK::tet</i>	N. Molière
BNM216	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-gfp spec</i>	N. Molière
BNM224	<i>mdh-gfp cat</i>	N. Molière
BSR26	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-gfp spec</i>	Diese Arbeit
BNM229	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-cfp spec</i>	N. Molière, eingereichtes Manuskript
BSR3	<i>mdh-yfp cat</i>	Diese Arbeit
BNM810	<i>amyE::P<sub>hyperspank(Hy)</sub>- spx<sup>DD</sup> spec</i>	pSN56 → <i>B. subtilis</i> 168 wild type (104)
BSR31	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-gfp spec</i> <i>ΔclpP::tet</i>	BSR92 → BNM216
BEM5	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-gfp spec</i> <i>ΔclpX::kan</i>	BNM107 → BNM216
BEM4	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-gfp spec</i> <i>ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BNM216
BSR30	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-gfp spec</i> <i>Δspx::kan</i>	BNM111 → BNM216
BAH42	<i>ΔhrcA</i>	A. Heinz
BSR92	<i>ΔclpP::tet</i>	Diese Arbeit
BSR110	<i>Δspx::kan ΔclpP::spec</i>	BNM103 → BNM111
BSR109	<i>Δspx::kan ΔclpX::spec</i>	BNM107 → BNM111
BSR117	<i>ΔdnaK::cat ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BNM118
BSR97	<i>ItrxA (trxA::pMutin2)</i>	BIG1 → <i>B. subtilis</i> 168 (199)
BSR5	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-cfp spec</i> <i>mdh-yfp::cat</i>	BNM229 → BSR3
BSR36	<i>amyE::P<sub>xyl</sub>-ibpA-cfp spec</i> <i>mdh-yfp::cat ΔmcsB::kan</i>	BNM117 → BSR5
BNM233	<i>mdh-gfp cat ΔclpP::spec</i>	BNM103 → BNM224
BNM236	<i>mdh-gfp cat ΔclpX::kan</i>	BNM107 → BNM224
BSR15	<i>mdh-gfp cat Δspx::kan</i>	BNM111 → BNM224
BSR19	<i>mdh-gfp cat ΔclpP::spec</i> <i>Δspx::kan</i>	BNM103 → BSR15
BSR21	<i>mdh-gfp cat ΔclpX::spec</i> <i>Δspx::kan</i>	BNM107 → BSR15

BNM234	<i>mdh-gfp cat ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BNM224
BSR13	<i>mdh-gfp cat ΔdnaK::tet</i>	BNM119 → BNM224
BSR18	<i>mdh-gfp cat ItrxA</i> ( <i>trxA::pMutin2</i> )	BSR97 → BNM224
BSR16	<i>mdh-gfp cat</i> <i>amyE::P<sub>hyperspank(Hy)</sub>-</i> <i>spx<sup>DD</sup> spec</i>	BNM810 → BNM224
BSR14	<i>mdh-gfp spec ΔdnaK::cat</i>	BNM118 → BSR2
BSR20	<i>mdh-gfp spec ΔdnaK::cat</i> <i>ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BSR14
BNM855	<i>ΔyjbH::spec</i>	LUW272 → <i>B. subtilis</i> 168 (191)
BSR101	<i>ΔhtpG</i>	F. Seiffert
BSR102	<i>htpG Trap</i>	Diese Arbeit
BSR105	<i>ΔhtpG ΔdnaK::cat</i>	BNM118 → BSR101
BSR103	<i>ΔhtpG ΔclpP::spec</i>	BNM103 → BSR101
BSR104	<i>ΔhtpG ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BSR101
BSR108	<i>htpG Trap ΔdnaK::cat</i>	BNM118 → BSR102
BSR106	<i>htpG Trap ΔclpP::spec</i>	BNM103 → BSR102
BSR107	<i>htpG Trap ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BSR102
BSR40	<i>amyE::Pxyl-ibpA-gfp</i> <i>spec ΔhtpG</i>	BSR101 → BNM216
BSR41	<i>amyE::Pxyl-ibpA-gfp</i> <i>spec htpG Trap</i>	BSR102 → BNM216
BSR43	<i>amyE::Pxyl-ibpA-gfp</i> <i>spec ΔhtpG ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BSR40
BSR42	<i>amyE::Pxyl-ibpA-gfp</i> <i>spec htpG Trap</i> <i>ΔclpC::tet</i>	BNM105 → BSR41
BSR101-101	<i>ΔhtpG (101 d in GM 2.1,</i> <i>Experiment 1)</i>	Diese Arbeit
BSR64-43	<i>(43 d in GM 2.1,</i> <i>Experiment 2)</i>	Diese Arbeit
BSR70-43	<i>(43 d in GM 2.1,</i>	Diese Arbeit

Experiment 2)

BSR73	$\Delta def/fmt$	Diese Arbeit
BSR75	<i>htpG Trap</i> $\Delta def/fmt$	BSR102 → BSR73
BSR74	$\Delta htpG$ $\Delta def/fmt$	BSR101 → BSR73
BSR66	<i>amyE::Phag-GFP::cat</i>	DS908 → <i>B. subtilis</i> 168 (262)
BSR72	<i>amyE::Phag-GFP::cat</i> <i>htpG Trap</i>	BSR102 → BSR66
BSR69	<i>amyE::Phag-GFP::cat</i> $\Delta htpG$	BSR101 → BSR66
BSR65	<i>PspoIIE-gfp::cat</i>	<i>spoIIE-gfp</i> → <i>B. subtilis</i> 168 (263)
BSR71	<i>PspoIIE-gfp::cat htpG</i> <i>Trap</i>	BSR102 → BSR65
BSR68	<i>PspoIIE-gfp::cat</i> $\Delta htpG$	BSR101 → BSR65
BSR64	<i>PcomG-gfp::kan</i>	comG-GFP → <i>B. subtilis</i> 168 (264)
BSR70	<i>PcomG-gfp::kan htpG</i> <i>Trap</i>	BSR102 → BSR64
BSR67	<i>PcomG-gfp::kan</i> $\Delta htpG$	BSR101 → BSR64
IS75	<i>hisA1 leu-8 metBS</i>	(265)

Tabelle 2: *B. subtilis*- Stämme

### 2.1.9 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC-Biotech (Konstanz) durchgeführt.

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pMAD	binärer Vektor für <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> , mit thermosensitivem <i>ori</i> zur allelischen Replatzierung von Genen; Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> ; Linc <sup>R</sup>	(266)
pMAD- <i>htpG</i>	pMAD mit <i>htpG</i> (BamHI/NcoI)	F. Seiffert
pMAD- <i>htpG</i>	pMAD mit <i>htpG Trap</i> (BamHI/NcoI)	Diese Arbeit

Trap		
pMAD- <i>def/fmt</i>	pMAD mit <i>def/fmt</i> (BamHI/NcoI)	Diese Arbeit
pTYB2	IPTG-induzierbarer <i>E. coli</i> Expressionsvektor für Fusionsproteine mit abspaltbarer C-terminaler Intein- Sequenz unter Kontrolle des T7- Promotors; Amp <sup>R</sup>	NEB, Ipswich, USA
PTYB2- <i>htpG</i>	pTYB2 mit <i>htpG</i> (NdeI/SmaI)	Diese Arbeit
PTYB2- <i>htpG</i> Trap	pTYB2 mit <i>htpG</i> Trap (NdeI/SmaI)	Diese Arbeit
pTYB2- <i>clpC</i>	pTYB2 mit <i>clpC</i> (NdeI/SmaI)	(90)
pQE60	IPTG-induzierbarer <i>E. coli</i> Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminaler His6-Sequenz unter Kontrolle des T5-Promotors; Amp <sup>R</sup>	QIAGEN, Hilden
pQE60- <i>mecA</i>	pQE60 mit <i>mecA</i> (NcoI/BglII)	(90)
pQE70	IPTG-induzierbarer <i>E. coli</i> Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminaler His6-Sequenz unter Kontrolle des T5-Promotors; Amp <sup>R</sup>	QIAGEN, Hilden
pQE70- <i>clpP</i>	pQE70 mit <i>clpP</i> (SphI/BglII)	(91)
pet28a	IPTG-induzierbarer <i>E. coli</i> Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminaler oder N-terminaler His6-Sequenz unter Kontrolle des T7- Promotors; Kan <sup>R</sup>	Merck, Darmstadt
pet28a- <i>mcsB</i>	pet28a mit <i>mcsB</i> (N-terminaler His6- Tag, NheI/NcoI)	Diese Arbeit
pSG1154	C-terminale GFP-Fusion unter Kontrolle von <i>P<sub>xyl</sub></i> in <i>amyE</i> ; Amp <sup>R</sup>	(267)
pSG1187	Campbell Integration einer C- terminalen YFP-Fusion; Amp <sup>R</sup>	(267)
pSG1187- <i>mdh</i>	pSG1187 mit <i>mdh</i> (KpnI/EcoRI)	Diese Arbeit

pCm::Sp	Veränderung der Antibiotikaresistenz von Chloramphenicol zu Spectinomycin von bestehenden chromosomalen Insertionen durch Transformation und homologe Rekombination	(268)
pDG1515	Plasmid mit Tetrazyklinkassette	(269)

**Tabelle 3: Plasmide**

### 2.1.10 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind mit ihren Charakteristika in Tabelle 4 aufgeführt. Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Scientific synthetisiert. Die Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, erscheinen fett gedruckt.

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
288 (pSG1187-mdh-for)	cccc <b>ggtacct</b> gttcttgttgacattccgc	KpnI
289 (pSG1187-mdh-rev)	cccc <b>gaattc</b> ggataaactttcatgacattttg	EcoRI
S3 (pTYB2-htpG-for)	attat <b>catatg</b> gtggcggaaaaagagttaaagc	NdeI
S4 (pTYB2-htpG-rev; phosphoryliert)	caccatgaccttgcaaatattg	
S68 (pet28a-His6N-mcsB- for)	attatag <b>ctagc</b> atgctgctaaagcattttattc	NheI
S69 (pet28a-His6N-mcsB- rev)	attata <b>ccatgg</b> atgctgctaaagcattttattc	NcoI
S13	attatag <b>gatcc</b> ggaaaagcttgaagaaacgattg	BamHI

(pMAD-def/fmt-up- for)		
S14	atattag <b>tcgact</b> ttgtaccctccaagacgtg	SalI
(pMAD-def/fmt-up- rev)		
S15	attatag <b>tcgact</b> gttcgtgacatgcacctg	SalI
(pMAD-def/fmt-down- for)		
S16	ataata <b>ccatgg</b> ataacaccgaaacctgagcac	NcoI
(pMAD-def/fmt-down- rev)		
S44	gaaatttcct <b>gcgcgc</b> gtaatctccaattcg	BssHII
(Mutagenese- htpGE31A-for)		
S45	cgaattggagattaac <b>gcgcgc</b> caggaaaatttc	BssHII
(Mutagenese- htpGE31A-rev)		
S78 (clpP-tet-p1)	attgtccatcggaacaggtgaagc	
S79 (clpP-tet-p2)	gaacaacctgcaccattgcaagaaatgctcctccttcaccttttag	
S94 (clpP-tet-p3)	ttgatcctttttataacaggaattccacaacctgcaagagctgcgtctc	
S95 (clpP-tet-p4)	ggaaaagcttcttgcgttg	
S35 (htpG-for)	attat <b>ggatcc</b> gtggcgaaaaaagagttaaag	BamHI
S36 (htpG-rev)	ataat <b>ccatgg</b> tacacatgaccttgcaaatattg	NcoI
214 (test- $\Delta$ htpG-for)	cccc <b>ggatcc</b> ggcgataatgcgggtcaaacag	BamHI
S1 (test- $\Delta$ htpG-rev)	cccc <b>ccatgg</b> cgggattttgctgcctatatac	NcoI
S23 (test- $\Delta$ def/fmt-for)	agcaatcctatccgccatac	
S24 (test- $\Delta$ def/fmt-rev)	atccgeccactctttcacia	
S98 (tet-Kassette-for)	tcttgcaatggtgcaggttg	
S99 (tet-Kassette-rev)	gaattcctgtatacaaaaaggatc	

---

**Tabelle 4: Oligonukleotide**

### 2.1.11 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt und wenn nicht anders beschrieben durch Autoklavieren sterilisiert.

#### LB-Medium (*lysogeny broth* Medium)

Pro Liter:

5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; 5 g NaCl

#### Minimal-Medium

Modifiziert nach Chen et al. (270):

40 mM 3-N-(Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (auf pH 7,4 mit KOH eingestellt), 2 mM Kaliumphosphat (pH 7.0), Mannitol (2%, wt/vol), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g/l), MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.2 g/l), Natriumcitrat \* 2H<sub>2</sub>O (1 g/l), L-Glutamat (1 g/l), L-Tryptophan (8 mg/l), 5 μM FeCl<sub>3</sub>, 3 nM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 400 nM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 30 nM CoCl<sub>2</sub>, 10 nM CuSO<sub>4</sub>, 10 nM ZnSO<sub>4</sub>, 80 nM MnCl<sub>2</sub>

#### SMM-Medium

2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 14 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g Natriumcitrat; 0,2 g MgSO<sub>4</sub> 7xH<sub>2</sub>O

#### Kompetenzmedium

10 ml SMM-Medium; 250 μl 20 % (w/v) Glucose; 120 μl L-Tryptophan (10 mg/ml); 60 μl 1 M MgSO<sub>4</sub> 7xH<sub>2</sub>O; 10 μl 20 % (w/v) Caseinhydrolysat; 5 μl 0,22 % (w/v) Ammonium Eisen(III)-citrat

Das Kompetenz- und *Starvation*-Medium wurden für den Gebrauch frisch angesetzt. Die Glucose-Lösung, MgSO<sub>4</sub>-Lösung und das SMM-Medium wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die Ammonium Eisen(III)-citrat-, Caseinhydrolysat- und L-Tryptophan-Lösungen wurden beim Ansetzen sterilfiltriert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### „Starvation“-Medium

10 ml SMM-Medium; 250 µl 20 % (w/v) Glucose; 60 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> 7xH<sub>2</sub>O

### Sporulationsmedium

Pro Liter: 8g Bacto nutrient broth, 10 ml 10 % w/v KCl, 10 ml 1,2 % w/v MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1,5 ml 1M NaOH (auf pH 7,6)

Nachdem Autoklavieren wurden 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,01 mM MnCl<sub>2</sub> und 0,001 mM FeSO<sub>4</sub> als sterilfiltrierte Lösungen zugefügt.

### LB-Agar

Pro Liter:

5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; 5 g NaCl; 15 g Agar-Agar (Kobe I)

## **2.1.12 Antibiotika**

Die eingesetzten Antibiotika wurden als Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Den Nährmedien wurden bei Bedarf nach Autoklavieren, wenn nicht anders beschrieben, Antibiotika in einer Verdünnung von 1:1.000 hinzugefügt. Die Antibiotikakonzentrationen der Stammlösungen sowie die Lösungsmittel sind in Tabelle 5 aufgeführt. Erythromycin wurde in Kombination mit Lincomycin verwendet, da die *erm* Kassette Resistenz für beide Antibiotika garantiert.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Ampicillin	100	H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	10	50 % (v/v) Ethanol
Erythromycin	1	50 % (v/v) Ethanol
Kanamycin	10 ( <i>B. subtilis</i> )/50 ( <i>E. coli</i> )	H <sub>2</sub> O
Lincomycin	25	H <sub>2</sub> O
Spectinomycin	10	H <sub>2</sub> O
Tetrazyklin	100	70 % (v/v) Ethanol

**Tabelle 5: Antibiotika**

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Bakterienzellen**

Die Kultivierung von *E. coli*- und *B. subtilis* Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C.

Das Ausstreichen auf, bei Bedarf antibiotikahaltigen, LB-Agarplatten erfolgte von Glycerinkulturen mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze durch die 3-Strich-Methode. Die beimpften LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Ausstriche konnten danach für ca. 1 Woche bei Raumtemperatur gelagert werden. Zur längeren Lagerung von *E. coli*-Ausstrichen, wurden diese bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Übernachtskulturen (Vorkulturen) wurden durch Beimpfen von 3 ml LB-Medium, bei Bedarf mit Antibiotika, in einem Reagenzglas angelegt. Das Animpfen erfolgte von einer frischen LB-Platte mit einer Einzelkolonie. Übernachtskulturen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C in einem Kulturroller inkubiert.

Die Inkubation von Bakterienflüssigkulturen erfolgte in Erlenmeyerkolben mit der mindestens fünffachen Größe des Kulturvolumens. Diese wurden auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 von einer Vorkultur, wenn nicht anders beschrieben, in LB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei 37 °C in einem Wasserbadschüttler bei 300 rpm oder in einem Inkubationschüttler bei 170 rpm.

#### **2.2.1.2 Kultivierung unter Thermotoleranz- und Hitzestressbedingungen**

*B. subtilis* Zellen wurden in einem Inkubationschüttler bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von, wenn nicht anders angegeben, 0,5 wachsen gelassen. Für Thermotoleranzbedingungen wurde die Kultur geteilt, wobei ein Teil bei 37 °C belassen wurde und der andere für fünfzehn Minuten 48 °C in einem Wasserbadschüttler geschüttelt wurde. Anschließend wurden beide Kulturen in einen Wasserbadschüttler transferiert, das auf 53 °C vorgeheizt wurde und für eine bestimmte Zeit, abhängig vom jeweiligen Experiment, kultiviert. Für

Hitzestressbedingungen wurde die Kultur nicht geteilt und sofort nach Erreichen der OD<sub>600nm</sub> von 0,5 in ein Wasserbad transferiert, das auf 53 °C beziehungsweise 50 °C vorgeheizt wurde und für eine bestimmte Zeit, abhängig vom jeweiligen Experiment, kultiviert.

### **2.2.1.3 Kultivierung von *B. subtilis* Zellen mit IPTG-induzierbaren Genen**

#### **BNM810 (*spxDD*)/BSR16 (*mdh-gfp spxDD*):**

Der *B. subtilis* Stamm BNM810/BSR16 wurde, wenn nicht anders angegeben in einem Inkubationschüttler bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 wachsen gelassen und anschließend wurde die Expression von Sp<sub>x</sub>DD durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG in der gesamten Kultur oder nur in einer Hälfte induziert. Hiernach wurde die Kultur/Kulturen entsprechend der jeweiligen Experimente Thermotoleranz- oder Hitzestressbedingungen (siehe 2.2.1.2) ausgesetzt, wobei nachfolgend Aggregate präpariert oder die Zellen mikroskopisch untersucht wurden.

#### **BSR97 (*ItrxA*)/BSR18 (*mdh-gfp ItrxA*):**

Der *B. subtilis* Stamm BSR97/BSR18 wurde über Nacht in LB mit 50 µM IPTG bei 37 °C in einem Inkubationschüttler bei 37 °C angezogen, um eine ausreichende Expression von TrxA zu garantieren. Im Falle von BSR97 wurde die Kultur am nächsten Tag auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 in 10 ml LB mit 50 µM IPTG verdünnt und in einem Inkubationschüttler bei 37 ° bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur entweder in 150 ml LB mit 10 µM oder mit 500 µM IPTG auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 verdünnt, um sie für die Aggregatpräparation unter Hitzestressbedingungen erneut auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,3 in einem Inkubationschüttler bei 37 ° wachsen zu lassen. Im Falle von BSR18 wurden von der Übernachtskultur 10 ml LB mit jeweils 10 µM und mit 500 µM IPTG auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft, um sie für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen unter Hitzestressbedingungen erneut auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,3 in einem Inkubationschüttler bei 37 ° wachsen zu lassen.

#### **2.2.1.4 Kultivierung von *B. subtilis* Zellen unter anaeroben Bedingungen**

Aerobe Kulturen wurden in verschlossenen 100 ml Serumflaschen mit 50 ml LB kultiviert, das mit 1% w/v Glukose, 20 mM Kaliumphosphat (pH 7.0) und entweder 5 mM Kaliumnitrat (für die Nitratatmung) oder mit 1 % w/v Pyruvat (für die Fermentation) angereichert wurde. Kontrollexperimente bestätigen, dass die Kulturen in Abwesenheit von Nitrat oder Pyruvat kein anaerobes Wachstum zeigten.

Das Medium wurde in Abwesenheit von Glukose in 100 ml Serumflaschen mit Stickstoffgas äquilibriert, abgedichtet und autoklaviert. Die Glukoselösung wurde separat mit Stickstoffgas äquilibriert, autoklaviert und dem Medium anaerob vor dem Animpfen zugefügt. Das Medium wurde mit aerob angezogenen Übernachtskulturen angeimpft und bei 37 °C in einem Inkubationschüttler langsam geschüttelt um die Bildung zellulären Aggregaten zu verhindern. Diese Methode wurde von A. Janczkowski und N. Molière etabliert und durchgeführt. Anschließend wurde die Zellen Thermotoleranzbedingungen (siehe 2.2.1.2) ausgesetzt und Aggregate präpariert.

#### **2.2.1.5 Aufbewahrung von Bakterienstämmen**

Zur Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 900 µl einer Übernachtskultur (bei Bedarf mit entsprechendem Antibiotikum gewachsen) mit 600 µl 50 % (v/v) Glycerin in einem verschraubbaren 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

#### **2.2.1.6 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen**

Die Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Plattenlesers (Tecan Sunrise Plate Reader) in einer 96er-Mikrotiterplatte (F-Boden) ermittelt. Die Messung wurde mit 200 µl Kultur bzw. 200 µl einer 1:10 verdünnten Übernachtskultur durchgeführt. Der Nullwert wurde mit 200 µl des entsprechenden Mediums ermittelt. Die  $OD_{600nm}$  wurde mit folgender Formel aus der gemessenen Extinktion berechnet:

$$OD_{600} = (E - E_0) / 0,516$$

OD<sub>600</sub> - optische Dichte bei Wellenlänge 600nm

E - Extinktion der Probe

E<sub>0</sub> - Extinktion der Leerprobe

### **2.2.1.7 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen**

Die für die Hitzeschock-Transformation benötigten chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen wurden wie folgt hergestellt: 40 ml LB-Medium wurden auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 mit einer Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 300 rpm in einem Wasserbadschüttler inkubiert. Bei OD<sub>600nm</sub> von 0,35 wurden 3x10 ml Kultur in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, in einer vorgekühlten Tischzentrifuge (Centrifuge 5804R) für 5 min mit 4500 rpm bei 4 °C herunterzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Pellets wurden jeweils in 5 ml sterilem, eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> 2xH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 4500 rpm, 4 °C). Nach Resuspendieren in 800 µl sterilem 50 mM CaCl<sub>2</sub> 2xH<sub>2</sub>O, wurden 500 µl einer sterilen 50 % (v/v) Glycerin-Lösung zugegeben und die Zellen für 1 h auf Eis inkubiert. 100 µl der Zellen wurden nach 60 min oder während der Inkubation in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und diese bei -80 °C weggefroren.

### **2.2.1.8 Bestimmung der Transformationseffizienz**

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden die zu testenden Stämme mit der chromosomalen DNA des Tryptophan-auxotrophen Stammes IS75 transformiert und auf Minimalplatten mit und ohne Tryptophan ausplattiert. Durch Bestimmung der CFU konnte die Transformationseffizienz berechnet werden.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für Test- oder Klonierungszwecke wurde eine Miniprep durchgeführt. Dafür wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Plasmidreinigung kamen 3 ml Übernachtskultur zum Einsatz. Die Elution erfolgte in 50 µl Elutionspuffer.

### **2.2.2.2 Extraktion von genomischer DNA (Phenol-Chloroform-Extraktion)**

Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurden die Zellen einer 3 ml Vorkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes, wurden die Zellen in ein Pellet zusammengefasst. Danach wurden die Zellen in 1 ml TES-Puffer gewaschen und anschließend in 750 µl TES-Puffer mit 25 µl Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden zu dem Ansatz 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) sowie 150 µl 6 % (w/v) N-Lauroylsarcosin Natriumsalz gegeben und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 30 min bei 37 °C wurden 500 µl Phenol und 500 µl Chloroform zu dem Ansatz gegeben und durch Invertieren vermischt. Nach Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, 4 °C; Biofuge fresco) sollten sich 3 klar voneinander abgrenzbare Phasen gebildet haben. Falls keine scharfen Phasen erkennbar waren, wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Im Anschluss wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze die DNA-haltige obere Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, dabei war darauf zu achten nicht die proteinhaltige Interphase mit zu überführen. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform und 500 µl Chloroform wurde invertiert und erneut zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4 °C; Biofuge fresco) bis sich klare Phasen ausbildeten. Von der wässrigen oberen Phase wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze 600 µl in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit einem Volumen Ethanol (reinst) und 0,1 Volumen 5M Natriumacetat (pH 5,2) gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min mit 13.000 rpm bei 4 °C (Biofuge fresco) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet 2x ohne resuspendieren mit unvergälltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Darauf folgend wurde das Pellet in einer SpeedVac bei 45 °C komplett getrocknet und über Nacht in 200 µl TES-Puffer im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### TES-Puffer

10 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 0,1 mM NaCl

### **2.2.2.3 Bestimmung der Konzentration von DNA**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers (ND-1000). Der Nukleinsäuregehalt von Lösungen lässt sich durch deren Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum zeigen. Zur Konzentrationsmessung wurden 1 µl Probe verwendet.

#### 2.2.2.4 Aufreinigung und Aufkonzentration von DNA

Das Aufreinigen und Aufkonzentrieren von kleinen DNA-Mengen nach PCR, Restriktionsverdau oder ähnliches erfolgte mit dem DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research). Das Aufreinigen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 10 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O.

#### 2.2.2.5 Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von spezifischen, linearen DNA-Abschnitten zur Klonierung von Plasmiden oder Genanalyse kam die Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Einsatz. Bei dieser wurden mit Hilfe von flankierenden Oligonukleotiden (Primern) und einer thermostabilen DNA-Polymerase bei wechselnden thermischen Zyklen doppelsträngige lineare DNA-Abschnitte vermehrt. Für Klonierungszwecke, bei denen es auf sehr hohe Genauigkeit ankam, wurde die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität verwendet. Für Test-PCRs zur Bestimmung von Fragmentlängen wurde die DreamTaq™ DNA-Polymerase verwendet.

Die PCR erfolgte in 50 µl Gesamtvolumen in dünnwandigen PCR-Röhrchen in einem Thermocycler. Die PCR-Ansätze wurden den Herstellerangaben entsprechend zusammengestellt. Das PCR-Standardprogramm bzw. die PCR-Standardansätze sind in Tabelle 6 beziehungsweise Tabelle 7 dargestellt. Die Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Primer wurden für PCRs mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase nach folgender Formel berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = (4 \times n(G / C) + 2 \times n(A / T)) - 5$$

$n(G / C)$  -Anzahl der G/C Nukleotide im Primer  
 $n(A / T)$  -Anzahl der A/T Nukleotide im Primer  
 $T_m$  -Schmelztemperatur

Bei Einsatz der Phusion® DNA-Polymerase erfolgte die Berechnung der Annealing-Temperaturen mit dem „T<sub>m</sub>-Calculator“ von Finnzymes. Die Elongationszeiten richteten sich nach der zu amplifizierenden DNA-Länge und den Herstellerangabe der DNA-Polymerase. Primer lagen in einer Konzentration von 100 pmol/µl und wurden in einer 1:10-Verdünnung verwendet. Die verwendete genomische DNA wurde für den PCR-Einsatz nach der Phenol-Chloroform-Extraktion 1:10 verdünnt.

<b>Schritt</b>	<b>T [°C]</b>	<b>t [sek]</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initiale	98 (Phusion®)/	30 Phusion®)/	1
Denaturierung	95 (DreamTaq™)	120 (DreamTaq™)	
Denaturierung	98 (Phusion®)/	10 (Phusion®)/	35
Primer-Annealing	95 (DreamTaq™)	30 (DreamTaq™)	
Elongation	72	je nach DNA-Länge	1
Finale Elongation	72	600	

**Tabelle 6: PCR-Standardprogramm**

<b>DreamTaq</b>		<b>Phusion</b>	
	<b>V [µl]</b>		<b>V [µl]</b>
10x DreamTaq-Puffer	5	5x GC-Puffer	10
genom. DNA (1:10)	1,0	genom. DNA (1:10)	1,0
dNTP Mix (10 mM)	1,0	dNTPmix (10mM)	1,0
for Primer (1:10)	2,5	for Primer (1:10)	2,5
rev Primer (1:10)	2,5	rev Primer (1:10)	2,5
DreamTaq (5 U/µl)	0,5	Phusion (2 U/µl)	0,5
		DMSO bei Bedarf	(1,5)
ddH <sub>2</sub> O	37,5	ddH <sub>2</sub> O	32,5
			(31)

**Tabelle 7: PCR-Standardansätze und Zyklen für DreamTaq™- und Phusion®-DNA-Polymerase**

### 2.2.2.6 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der erfolgreichen Gendeletion von Klonen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Diese entsprach einer Standard-PCR mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase. Um den Aufschluss der Bakterien sicher zu stellen, verlängerte sich der initiale Denaturierungsschritt zur Aufschmelzung der doppelsträngigen DNA auf 10 min bei 95 °C. Ausserdem wurde anstatt von genomischer DNA mittels einer kleinen 10 µl Pipettenspitze eine zu testende Bakterien-Kolonie gepickt und im PCR-Ansatz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

### **2.2.2.7 Restriktionsverdau von DNA**

Die Verifizierung von DNA-Sequenzen bzw. Plasmid-Klonierung erfolgte durch Restriktionsverdau. Bei diesem wurden durch Restriktionsendonkleasen spezifische palindromische doppelsträngige DNA-Sequenzen erkannt und geschnitten. Für den DNA-Verdau wurden FastDigest® Restriktionsenzyme von Fermentas verwendet. Das Gesamtvolumen der Ansätze richtete sich nach dem Volumen der zu schneidenden DNA. Der Restriktionsverdau für Klonierungszwecke erfolgte in 10x FastDigest® Buffer. Testverdaue erfolgten in 10x FastDigest® Green Buffer, welcher eine direkte Gelbeladung zur Gelelektrophorese von DNA erlaubte. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für mindestens 30 Minuten im Brutschrank oder im Thermoschüttler mit 750 rpm. Für Klonierungszwecke wurde anschließend die Restriktionsendonkleasen nach Herstellerangaben abgestoppt.

### **2.2.2.8 5'-Dephosphorylierung von linearer Plasmid-DNA**

Um die Religation geschnittener Plasmide zu verhindern wurde diese mittels der Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Dazu wurden in 15 µl Reaktionsvolumen 10 µl Plasmid, 1,5 µl SAP-Puffer, 2,5 µl ddH<sub>2</sub>O und 0,5 µl SAP für 30 min mit 750 rpm bei 37 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Da die SAP nach einiger Zeit an Aktivität verliert, wurden nach 30 min zu dem Ansatz weitere 0,5 µl SAP gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.2.9 Ligation von linearer DNA**

Die Ligation zweier linearer DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase. Dabei wurden 75 ng DNA-Insert und 25 ng Plasmid verwendet. Die Ligation erfolgte in 10 µl Gesamtvolumen mit 1 µl 10x T4-Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl). Das restliche Volumen wurde mit DNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei schrittweiser Erniedrigung der Temperatur von Raumtemperatur zu 4 °C und wurde im Anschluss durch Hitzeinaktivierung für 5 min bei 65 °C abgestoppt.

### **2.2.2.10 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (AGE)**

Zur Auftrennung von DNA-Molekülen wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dabei wurden DNA-Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden standardmässig Gele aus 1,0 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer benutzt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 5 µl des Größenstandards Lambda DNA/Eco130I (StyI) Marker von Fermentas genutzt. Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt oder nach Restriktionsverdau in FastDigest® green Buffer direkt aufgetragen. Die angelegte Spannung lag bei 90 V. Nach ausreichender Auftrennung wurden die Gele für 15-30 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend die DNA-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 302 nm mit einem Geldokumentationsgerät visualisiert.

#### 50x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)

Pro 500 ml:

121 g TRIS; 29 ml Essigsäure; 9,3 g EDTA

### **2.2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von linearisierter Plasmid-DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research. Dazu wurde nach AGE mit einem großen Agarosegel und Färbung in einem Ethidiumbromidbad die DNA auf einem UV-Leuchttisch visualisiert und mit einem Skalpell die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein zuvor abgewogenes 2 ml Reaktionsgefäß überführt, das Gewicht des Gelfragments bestimmt und weiter entsprechend der Herstellervorgaben verfahren. Die Elution der DNA erfolgte in 15 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O.

### **2.2.2.12 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen**

Für die Hitzeschock-Transformation wurden chemisch-kompetente *E. coli* Zellen verwendet. Diese wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit 20 µl Ligationsansatz bzw. 2 µl Plasmid für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 1,5 min ein Hitzeschock bei 42 °C im

Thermoschüttler. Zur Regeneration inkubierten die Zellen nach Zugabe von 500 µl LB-Medium für 60 min bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden alle Zellen auf einer LB-Platte mit dem entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Dazu wurden die Zellen zuvor pelletiert (1 min, 13.000 rpm, 4 °C), 500 µl des Überstands abgenommen und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Danach wurde der komplette Ansatz ausplattiert.

#### **2.2.2.13 Transformation von *B. subtilis* mit chromosomaler DNA**

*B. subtilis* kann unter Hungerbedingungen natürliche Kompetenz entwickeln. Durch diese kann *B. subtilis* aus dem umgebenden Medium DNA aufnehmen und durch Rekombination in das Genom integrieren. Zur Erlangung der natürlichen Kompetenz wurden 10 ml Kompetenzmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben von einem frischen *B. subtilis* Ausstrich von einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm in einem Wasserbadschüttler inkubiert. Mit 600 µl Übernachtskultur wurden 10 ml frisches Kompetenzmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben beimpft und für 3 h bei 37 °C im Wasserbadschüttler inkubiert. Anschließend wurden zu der Kultur 10 ml im 37 °C-Brutschrank vorgewärmtes „Starvation“-Medium gegeben und für weitere 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nun wurden 400 µl der kompetenten Zellen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 5-10 µl 1:10 verdünnter chromosomaler DNA oder 20 µl Plasmid im Thermoschüttler für 40 min bei 750 rpm und 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl Zellen auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei Plasmidtransformationen wurde der gesamte Ansatz, der alle Zellen enthielt ausplattiert.

#### **2.2.2.14 Geninaktivierung von *clpP* durch homologe Rekombination**

Flankierende 5'- und 3'-Fragmente des *clpP* Gens wurden mit der Phusion® DNA-Polymerase von chromosomaler DNA von *B. subtilis* amplifiziert, wobei die Primer S 78/S79 für das 5'-Fragment und S94/S95 für das 3'Fragment benutzt wurden. Anschließend wurden diese aufgereinigt. Eine Tetrazyklin-Kassette wurde an diese flankierenden Regionen fusioniert. Hierzu wurde diese Kassette mit dem Primerpaar S98/S99 aus dem Plasmid pDG1515 unter Verwendung der Phusion® DNA-Polymerase amplifiziert. Unter Verwendung der Phusion® DNA-Polymerase und DMSO wurden 200 ng des 5'- und des 3'-

Fragments, die als Primer dienten mit der Tetrazyklinkassette (300 ng eingesetzt), die hier als Template diente, fusioniert (für Programm siehe Tabelle 8 ). Das Produkt wurde in einer zweiten PCR, wobei auch hier die Phusion® DNA-Polymerase und DMSO verwendet wurde, unter Verwendung des Primerpaares S78/S95 amplifiziert (für Programm siehe Tabelle 9). Das gesamte Fragment wurde hiernach, nachdem die Identität mittels Sequenzierung bestätigt wurde, über natürliche Kompetenz in *B. subtilis* transformiert. Auf tetrazyklinhaltigen LB-Platten wurden die Klone selektioniert, die über homologe Rekombination das Gen für Tetrazyklin anstatt des *clpP* Gens erhalten. Durch Sequenzierung (GATC Biotech) wurde die Identität des Stammes (BSR92) bestätigt.

<b>Schritt</b>	<b>T [°C]</b>	<b>t [sek]</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initiale			
Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	
Primer-Annealing	60	3	
Elongation	72	480	10
Denaturierung	98	10	
Primer-Annealing	62	3	
Elongation	72	480 + 20/Zyklus	25
Finale Elongation	72	600	1

**Tabelle 8: PCR-Programm Fusion (1. PCR)**

<b>Schritt</b>	<b>T [°C]</b>	<b>t [sek]</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initiale			
Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	
Primer-Annealing	60	30	
Elongation	72	300	35
Finale Elongation	72	600	1

**Tabelle 9: PCR-Programm Fusion (2. PCR)**

### 2.2.2.15 Geninaktivierung von *def/fmt* durch allelische Replatzierungs-Mutagenese

Der thermosensitive pMAD-Vektor wurde zur Inaktivierung der Deformylase *def* und der Formyltransferase *fmt*, die sich in einem Operon befinden durch allelische Replatzierung verwendet (BSR73) (266). Der pMAD-Vektor ermöglicht es ein chromosomales Gen mittels homologer Rekombination durch ein inaktiviertes Allel zu ersetzen.

Dazu wurde durch PCR mit der Phusion® DNA-Polymerase die „*upstream*“ und „*downstream*“ liegenden, flankierenden Regionen des *def/fmt*-Operons amplifiziert. Als Primer für die „*upstream*“ liegende Region (5' Fragment) dienten die Oligonukleotide S13 und S14. Die „*downstream*“ liegende Region (3' Fragment) wurde mit den Primer S15 und S16 amplifiziert. Die beiden amplifizierten Fragmente wurden aufgereinigt und durch Restriktionsverdau Überhänge erzeugt. Das 5'-Fragmente wurde mit *BamHI* und *Sall*, das 3'-Fragment mit *Sall* und *NcoI* verdaut. Die geschnittenen Fragmente wurden aufgereinigt und phosphoryliert. Der pMAD-Vektor wurde mit *BamHI* und *NcoI* verdaut und aufgereinigt. Nach Dephosphorylierung wurden die 5'- und 3'-Fragmente gleichzeitig in den pMAD-Vektor ligiert. Der ligierte pMAD-Vektor wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert und auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen. Klone wurden nach Miniprep und Testverdau mit *BamHI*, *Sall* und *NcoI* durch AGE auf ihre Identität geprüft. Anschließend wurde der rekombinante Vektor von einem positiven Klon durch Sequenzierung kontrolliert. Der sequenzierte Vektor wurde nun in natürlich kompetente *B. subtilis* Zellen transformiert und mit Hilfe von Ery-/Linc-Selektionsplatten die erfolgreiche Transformation getestet. Mit Einzelklonen wurde eine 3 ml Vorkultur ohne Antibiotika angeimpft und bei Raumtemperatur, bei welcher der thermosensitive pMAD-Vektor nicht replizieren konnte, im Kulturroller für mindestens 8 h oder über Nacht inkubiert. Nach Überimpfen von 100 µl Kultur in frisches 3 ml LB-Medium und erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 8 h, wurden die Bakterien in einer Verdünnungsreihe von 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-7</sup> auf LB-Platten ausgestrichen. Durch Umstreichen auf Ery-/Linc-LB-Platten und einem Rettungsausstrich auf reine LB-Platten, wurden Kolonien auf Verlust des Vektors getestet. Ery-/Linc-sensitive Klone wurden nach Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden S23 und S24 und mittels Sequenzierung (GATC Biotech) auf Verlust des *def/fmt*-Operons getestet.

#### **2.2.2.16 Klonierung des Expressionsvektors pTYB2-*htpG***

Zur Überexpression und Aufreinigung des HtpG-Proteins wurde dieses in den Expressionsvektor pTYB2, der es ermöglicht Proteine mit einem C-terminalen, abspaltbaren Intein-Tag zu fusionieren und das Fusionsprotein nach Induktion mit IPTG in mittelhohen Expressionsraten in *E. coli* zu exprimieren, kloniert. Eine Reinigung ist über den Intein-Tag möglich. Der Vektor pTYB2-*htpG* wurde hergestellt indem das *htpG*-Gen durch PCR mit der Phusion® DNA-Polymerase und mit den Primern S3 und S4 amplifiziert wurde. Durch die PCR wurden dem amplifizierten Fragment eine *NdeI* Restriktionsschnittstelle hinzugefügt, die es ermöglichten das Fragment in die *multiple cloning site* des pTYB2-Vektors zu klonieren. Das amplifizierte Fragment wurde durch AGE auf seine Identität geprüft und mit *NdeI* verdaut. Der pTYB2-Vektor wurde mit *NdeI* und *SmaI* verdaut und durch AGE aufgetrennt. Da *SmaI* „blunt“ schneidet, musste das Genfragment nicht geschnitten werden. Durch die Bestellung eines phosphorylierten Primers war auch keine weitere Vorbehandlung nötig. Die Bande des linearisierten Vektors wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert. Nach 5'-Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wurde das *htpG*-Fragment in den Vektor ligiert, durch Hitzeschocktransformation in *E. coli* XL1-Blue eingebracht und auf ampicillinhaltigen LB-Platten selektioniert. Mit ampicillinresistenten Klonen wurde eine Übernachtskultur angeimpft und durch Miniprep die Plasmid-DNA extrahiert. Die Identität des pTYB2-*htpG*-Vektors wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

#### **2.2.2.17 Herstellung des Expressionsvektors pTYB2-*htpG* Trap mittels QuikChange® Mutagenesis**

Für die Herstellung des pTYB2-*htpG* Trap Vektors, wurde das Adenin an Position 92 des *htpG* Gens im pTYB2 Plasmid durch ein Cytosin mittels des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit und unter Verwendung des Primerpaares S44/S45 nach Herstellerangaben mutiert. Eine erfolgreiche Mutagenese führt zu einer Einführung einer BssHIII-Schnittstelle, mittels der die Mutagenese bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde die Identität des Vektors durch Sequenzierung bestätigt.

### **2.2.2.18 Herstellung der *B. subtilis* *htpG* Trap Mutante durch allelische Replatzierungs-Mutagenese**

Um einen *B. subtilis* Stamm herzustellen, der anstatt HtpG, HtpG Trap produziert (BSR102), wurde der thermosensitive pMAD-Vektor verwendet. Hierzu wurde *htpG* Trap mit dem Primerpaar S35/S36 und unter Verwendung der Phusion® DNA-Polymerase aus dem Vektor pTYB2-*htpG* Trap amplifiziert. Durch die PCR wurden dem amplifizierten Fragment *BamHI* und *NcoI* Restriktionsschnittstellen hinzugefügt, die es ermöglichten das Fragment in das pMAD-Plasmid zu klonieren. Das amplifizierte Fragment wurde durch AGE auf seine Identität geprüft und mit *BamHI/NcoI* verdaut. Der pMAD-Vektor wurde auch mit *BamHI* und *NcoI* verdaut und durch AGE aufgetrennt. Die Bande des linearisierten Vektors wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert. Nach 5'-Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wurde das *htpG* Trap-Fragment in den Vektor ligiert, durch Hitzeschocktransformation in *E. coli* XL1-Blue eingebracht und auf ampicillinhaltigen LB-Platten selektioniert. Klone wurden nach Miniprep und Testverdau mit *BamHI* und *NcoI* durch AGE auf ihre Identität geprüft. Anschließend wurde der rekombinante Vektor von einem positiven Klon durch Sequenzierung kontrolliert. Der sequenzierte Vektor wurde nun in natürlich kompetente *B. subtilis* Zellen transformiert und mit Hilfe von Ery-/Linc-Selektionsplatten die erfolgreiche Transformation getestet. Mit Einzelklonen wurde eine 3 ml Vorkultur ohne Antibiotika angeimpft und bei Raumtemperatur, bei welcher der thermosensitive pMAD-Vektor nicht replizieren konnte, im Kulturröhrer für mindestens 8 h oder über Nacht inkubiert. Nach Überimpfen von 100 µl Kultur in frisches 3 ml LB-Medium und erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 8 h, wurden die Bakterien in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-5}$  bis  $10^{-7}$  auf LB-Platten ausgestrichen. Durch Umstreichen auf Ery-/Linc-LB-Platten und einem Rettungsausstrich auf reine LB-Platten, wurden Kolonien auf Verlust des Vektors getestet. Ery-/Linc-sensitive Klone wurden nach Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden 214/S1 und anschließendem Restriktionsverdau mit *BssHII* und AGE und mittels Sequenzierung (GATC Biotech) auf die *htpG* Trap Variante getestet.

### **2.2.2.19 Herstellung des *B. subtilis* Stammes, der GFP ektopisch exprimiert**

Um einen *B. subtilis* Stamm herzustellen, der GFP ektopisch im *amy* Lokus exprimieren kann (BSR26), wurde das Plasmid pSG1154 in *B. subtilis* über natürliche Kompetenz transformiert

und auf Spectinomycinresistenz selektiert. Die Einführung in den *amy* Locus wurde durch einen Standard-Amylasetest überprüft. Dazu wurde der Stamm auf LB-Platten, die 1% Stärke enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden der Platte Iodkristalle zugefügt, welche die Stärke anfärben. Stämme, die das Gen für Amylase (*amyE*) enthalten produzieren einen ungefärbten Bereich um den Ausstrich, während der Stamm, in dem *gfp* erfolgreich eingebracht wurde, keinen ungefärbten Bereich aufweist, da das Gen für Amylase dadurch zerstört wurde.

#### **2.2.2.20 Herstellung des *B. subtilis* Stammes, der anstatt *mdh-gfp::cat mdh-gfp::spec* kodiert**

In dem *B. subtilis* Stamm, der *mdh-gfp* chromosomal kodiert trägt (BNM224), wurde unter Verwendung des Plasmids pCM::SP die Antibiotikaresistenz von Chloramphenicol zu Spectinomycin (268) umgeändert. Dazu wurde das Plasmid über natürliche Kompetenz in den Stamm BNM224 transformiert und auf spectinomycinhaltigen LB-Platten selektioniert, um die Antibiotikaresistenz von Chloramphenicol durch Spectinomycin über homologe Rekombination zu ersetzen.

#### **2.2.2.21 Herstellung des *B. subtilis* Stammes, der Mdh als Fusion mit YFP exprimiert**

Um einen *B. subtilis* Stamm herzustellen, der Mdh als Fusion mit YFP exprimieren kann (BSR3), wurde das Gen für *mdh* in den Vektor pSG1187 (YFP Fusionsplasmid) kloniert. Der Vektor pSG1187-*mdh* wurde hergestellt indem das *mdh*-Gen durch PCR mit der Phusion® DNA-Polymerase und mit den Primern 288 und 289 amplifiziert wurde. Durch die PCR wurden dem amplifizierten Fragment *KpnI* und *EcoRI* Restriktionsschnittstellen hinzugefügt, die es ermöglichten das Fragment in das pSG1187-Plasmid zu klonieren. Das amplifizierte Fragment wurde durch AGE auf seine Identität geprüft und mit *KpnI/EcoRI* verdaut. Der pSG1187-Vektor wurde auch mit *KpnI* und *EcoRI* verdaut und durch AGE aufgetrennt. Die Bande des linearisierten Vektors wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert. Nach 5'-Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wurde das *mdh*-Fragment in den Vektor ligiert, durch Hitzeschocktransformation in *E. coli* XL1-Blue eingebracht und auf ampicillinhaltigen LB-Platten selektioniert. Mit ampicillinresistenten Klonen wurde eine Übernachtkultur angeimpft und durch Miniprep die Plasmid-DNA extrahiert. Die Identität des

pSG1187-*mdh*-Vektors wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Vektor über natürliche Kompetenz in *B. subtilis* transformiert und auf chloramphenicolhaltigen LB-Platten selektioniert, um eine Campbell-Integration der *mdh-yfp* Fusion, gefolgt von einem zweiten *mdh* Gen, dem das 5' Ende einschließlich Startkodon fehlt, im nativen *mdh* Lokus zu erhalten. Durch Sequenzierung wurde die Identität des Stammes bestätigt.

#### **2.2.2.22 Klonierung des Vektors pet28a-*mcsB***

Zur Überexpression und Aufreinigung des McsB-Proteins wurde sein Gen in den Expressionsvektor pet28a kloniert. Dieser ermöglicht es Proteine sowohl mit einem N-terminalen, als auch mit einem C-terminalen His6-*Tag* zu fusionieren und das Fusionsprotein nach Induktion mit IPTG in hohen Expressionsraten in *E. coli* zu exprimieren. Über den His6-Tag ist eine Reinigung des Proteins möglich.

Der Vektor pet28a-*mcsB* wurde hergestellt indem das *mcsB*-Gen durch PCR mit der Phusion® DNA-Polymerase und mit den Primern S68 und S69 amplifiziert wurde. Durch die PCR wurden dem amplifizierten Fragment *NheI* und *NcoI* Restriktionsschnittstellen hinzugefügt, die es ermöglichten das Fragment in das pet28a-Plasmid zu klonieren. Das amplifizierte Fragment wurde durch AGE auf seine Identität geprüft und mit *NheI/NcoI* verdaut. Der pet28a-Vektor wurde auch mit *NheI* und *NcoI* verdaut und durch AGE aufgetrennt. Die Bande des linearisierten Vektors wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert. Nach 5'-Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wurde das *mcsB*-Fragment in den Vektor ligiert, durch Hitzeschocktransformation in *E. coli* XL1-Blue eingebracht und auf kanamycinhaltigen LB-Platten selektioniert. Mit kanamycinresistenten Klonen wurde eine Übernachtkultur angeimpft und durch Miniprep die Plasmid-DNA extrahiert. Die Identität des pet28a-*mcsB*-Vektors wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Aggregatpräparation**

Für die Proteinaggregatpräparation wurden 100 ml *B. subtilis* Zellen, die unter Hitzestress- oder Thermotoleranzbedingungen kultiviert wurden, mit 4500 rpm bei 4 °C (Centrifuge 580

R) pelletiert, in Puffer A gewaschen und anschließend in 500 µl Puffer A mit 0.33 mg/ml Lysozym, 20 µg/ml DNaseI, 20 µg/ml RNaseI, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 für 90 Minuten bei 37 °C und 750 rpm aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min bei 4 °C (Biofuge fresco) entfernt, um den Gesamtzellextrakt (CE) zu erhalten, wobei 80 µl dieser Fraktion für das SDS PAGE und die Bestimmung der Proteinkonzentration zurückgehalten wurden. Durch die Zentrifugation des übrigen Gesamtzellextrakts bei 13000 rpm für 30 min bei 4 °C (Biofuge fresco) wurde die lösliche Fraktion (SN) von der Pelletfraktion abgetrennt. Das Pellet wurde anschließend in Puffer A mit 1 % Triton X-100 für zwei Stunden bei 4 °C durch Rotierung bei 18 rpm gewaschen. Diese Prozedur wurde mit 0,5 % Triton X-100 wiederholt. Die Pellets wurden hiernach bei 13000 rpm für 30 min (Biofuge fresco) zentrifugiert, um unlösliche Proteinaggregate (P) zu erhalten, die letztendlich in 80 µl Rehydratationspuffer gelöst wurden. Die Proteinkonzentration des CE und SN wurde bestimmt und standardmäßig wurden 5 µg der Gesamtproteinmenge für die SDS PAGE oder Western Blot Analyse benutzt. Für den Nachweis der Proteine DnaK oder ClpP wurde jedoch nur 1 µg Gesamtproteinmenge aufgetragen. Das Volumen der Aggregatfraktion wurde jeweils proportional an die absolute Proteinmenge des entsprechenden Gesamtzellextrakts angepasst, wobei die 1,5-fache Menge aufgetragen wurde. Als Positivkontrolle wurden in der Western Blot Analyse jeweils 100 ng des gereinigten Proteins (außer für TrxA (11,4 kDa)), das nachzuweisen war, aufgetragen. Die Reinigung von HtpG (72 kDa) , ClpC (90 kDa), MecA (26,5 kDa), McsB (41 kDa) und ClpP (22,4 kDa), wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und stehen unter 2.2.4 beschrieben. Die Proteine MDH (34 kDa), DnaK (67 kDa), Spx (15 kDa) und ClpX (30 kDa) wurden freundlicherweise von N. Molière zu Verfügung gestellt.

#### Puffer A

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8

#### Rehydratationspuffer

7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) 3-((3Cholamidopropyl)-Dimethylammonio)-1-Propanesulfonat (CHAPS), 100 mM Dithiothreitol

### **2.2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinen (Bradford-Assay)**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch durch einen Bradford-Assay. Bei diesem bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 an Proteine, wobei sich seine Absorption proportional zur Proteinkonzentration verändert. Die Messung erfolgte in einer 96er-Mikrotiterplatte im Plattenleser (Tecan Sunrise Plate Reader) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Dazu wurden zur Messung 5 µl Probe und 250 µl 1x Roti®Quant-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch das Programm Magellan™. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgerade mit BSA bestimmt.

### **2.2.3.3 Auftrennen von Proteinen mittels Glycin-SDS-PAGE**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im TRIS-Glycin-Puffersystem (modifiziert nach (271)). Bei dieser wurden denaturierte Proteine mit SDS beladen und im elektrischen Feld anhand ihrer Molekulargröße durch ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Proteinauftrennung wurden standardmäßig 12,5% bzw. für kleine Proteine 15% (zum Nachweis von Spx und TrxA) diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit 5% Sammelgel verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 10 dargestellt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x SDS-Laufpuffer genutzt. Proben wurden mit denaturierendem 4x SDS-Probenpuffer für 5 min, mit 750 rpm, bei 95 °C im Thermoschüttler aufgeköcht und anschließend in einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden 6 µl Größenstandard von Fermentas aufgetragen. Dabei wurden für eine anschließende Coomassie-Färbung Unstained Protein Molecular Weight Marker bzw. für eine Western Blotanalyse Prestained Protein Molecular Weight Marker verwendet. Die Auftrennung erfolgte im Mini-PROTEAN® 3 Cell System (B 10 cm/H 7,5 cm) oder im PROTEAN® II xi Cell (B 23 cm/H 18 cm).

Um ein schärferes Auftrennen zu gewährleisten, erfolgte das Einlaufen der Proteine in das Trenngel mit 90 V und danach bis zum Ende mit 180 V.

Bei der Verwendung von großen Gelen musste die Zusammensetzung in Tabelle vervierfacht werden und das Einlaufen der Proteine in das Trenngel erfolgte mit 30 V und danach bis zum Ende mit 180 V, um ein scharfes Auftrennen zu gewährleisten.

Proteingele wurden im Anschluss mit Coomassie-Färbelösung gefärbt oder es erfolgte mittels Western Blot Analyse eine Immundetektion.

		<b>5 %</b>	<b>12,5 %</b>	<b>15 %</b>
ddH <sub>2</sub> O	[ml]	1,8	4,6	3,4
30% Acrylamid	[ml]	0,83	6,3	7,5
0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	[ml]	1,26	-	-
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	[ml]	-	3,8	3,8
10 % (w/v) SDS	[ $\mu$ l]	50	150	150
10 % (w/v) APS	[ $\mu$ l]	50	150	150
TEMED	[ $\mu$ l]	5	6	6

**Tabelle 10: Zusammensetzung von 2 Sammel- und Trenngelen für Glycin-SDS-PAGE**

#### 10x SDS-Laufpuffer

0,5 M TRIS; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS

#### 4x SDS-Probenpuffer

500 mM TRIS-HCl (pH 6,8); 40 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 8 % (w/v) SDS; 0,6 % (w/v) Bromphenolblau

### **2.2.3.4 Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE**

Zur Visualisierung von Proteinen nach einer SDS-PAGE wurden sie mit Coomassie-Brilliantblau R250 angefärbt. Dazu wurden die Proteingele in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert bis das Gel eine blaue Farbe annahm. Um die Färbung zu beschleunigen wurde Gel und Färbelösung mit Hilfe einer Mikrowelle kurz aufgeköcht. Im Anschluss wurde das Gel in Leitungswasser entfärbt und unter mehreren Wasserwechseln auf einem Schüttler entfärbt bis die Proteinbanden ausreichend sichtbar wurden.

## Coomassie-Färbelösung

50 % (v/v) EtOH (vergällt); 10 % (v/v) Essigsäure; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

### **2.2.3.5 Western Blot Analyse und Immundetektion**

Der Nachweis spezifischer Proteine in einem Proteingel erfolgte durch die Western Blot Analyse. Dabei wurden Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE im ‚*semi-dry*‘-oder Nassblot-Verfahren elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen und das gewünschte Protein durch spezifische Antikörper detektiert.

Dazu wurde vor dem Blotten der Proteine die PVDF-Membran durch Inkubation für 1 min in 100 % Methanol aktiviert. Danach wurde die PVDF-Membran zusammen mit dem Proteingel und 2 Blotting-Papieren für einige Minuten in 1x Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte einerseits mit einem aus 2 Graphitelektroden bestehendem ‚*semi-dry*‘-Elektroblotter. Die in Transblotpuffer äquilibrierten Blot-Bestandteile wurden von Anode zur Kathode in der Reihenfolge: Blotting-Papier, PVDF-Membran, Gel, Blotting-Papier luftblasenfrei gestapelt. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h mit ca. 100 mA und 9 V. Andererseits erfolgte der Proteintransfer mittels Nassblot-Elektrophorese im Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System nach Herstellerangaben für 1 h bei 100V.

Im Anschluss an den Proteintransfer wurden unspezifische Bindestellen der PVDF-Membran durch Inkubation in TBSP-Puffer für min. 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit TBSP und dem Primärantikörper inkubiert. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzte Verdünnung sind in Tabelle 11 aufgeführt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 11), wurde die Membran 2x 15 min in TBST gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde 1:5000 verdünntes Immunglobulin G, welches an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist (siehe Tabelle 11), verwendet. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde 2x für 15 min mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend für 20 min in AP-Puffer inkubiert.

Die Proteindetektion erfolgte mittels BCIP/NBT-Färbung, wobei 0,0165 % w/v BCIP und 0,033 % w/v NBT zu der Membran und 20 ml AP-Puffer pipettiert wurden.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Rabbit IgG	1:5000	Ziege
GFP	1:2500	Maus

Mouse IgG	1:5000	Ziege
HtpG	1:40000	Kaninchen
ClpC	1:5000	Kaninchen
Mdh	1:5000	Kaninchen
DnaK	1:40000	Kaninchen
McsB	1:2500	Kaninchen
ClpX	1:5000	Kaninchen
Spx	1:5000	Kaninchen
YjbH	1:1000	Kaninchen
TrxA	1:2500	Kaninchen
ClpP	1:40000	Kaninchen
MecA	1:5000	Kaninchen

**Tabelle 11: Antikörper**

10x Transferpuffer

58 g TRIS; 29 g Glycin; 3,7 g SDS; 20 % (v/v) Methanol, lagern bei 4 °C

TBS-Puffer

50 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl

TBSM-Puffer (TBS-Milchpulver)

50 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 % (w/v) Milchpulver

TBST-Puffer (TBS-Tween)

50 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween® 20

AP-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer)

100 mM TRIS; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, auf pH 9,5 titrieren

NBT

5% w/v in 70% v/v Dimethylformamid

BCIP

5% w/v in Dimethylformamid

### 2.2.3.6 Überexpression von Proteinen

Zur Überexpression von Proteinen wurden die Vektoren pQE70, pQE60 und pet28a für His-markierte Proteine beziehungsweise pTYB12 für Intein-markierte Proteine verwendet. Die Plasmide wurden durch Hitzeschocktransformation in *E. coli* ER2566- (pTYB2, pet28a) beziehungsweise FI1202- Zellen (pQE60, pQE70) eingebracht, auf ampicillin-beziehungsweise kanamycinhaltigen LB-Platten selektioniert und eine Glycerinkultur angelegt. Von der Glycerinkultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine LB-Übernachtskultur angeimpft und im Inkubationsschüttler (Ecotron®) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Überexpression, wobei LB-Medium 1:100 in 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen und dem jeweiligen Antibiotikum angeimpft wurde. Die Inkubation erfolgte im Unitron®-Inkubationsschüttler bei 37 °C. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 0,7 wurde die Überexpression mit 1 mM IPTG beziehungsweise 20 % Lactose induziert. Anschließend wurden die Kulturen in SLC-Zentrifugenbecher überführt und bei 6.000 rpm für 10 min bei 4 °C mit der Sorvall® RC-5B (SLC4000-Rotor) pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand dekantiert und die Pellets bei -20 °C weggefroren. Von dem jeweiligen, zu reinigenden Protein abhängige Durchführungen der Überexpression sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

<b>Protein</b>	<b>Anzuchtvolumen (L)</b>	<b>Antibiotikum</b>	<b>Induktion</b>
ClpC	4	Ampicillin	Lactose, über Nacht, 16 °C
HtpG	6	Ampicillin	Lactose, über Nacht, 16 °C
MecA	4	Ampicillin	1 mM IPTG, 3 h, 37 °C
ClpP	2	Ampicillin	1 mM IPTG, 3 h, 37 °C
McsB	2	Kanamycin	1 mM IPTG, 1 h, 37 °C

**Tabelle 12: Eigenschaften der Überexpression der jeweiligen Proteine**

### 2.2.3.7 Schneller Zellaufschluss

Der Aufschluss von *B. subtilis* Zellen erfolgte bei dieser Methode durch osmotische Lyse. Falls nicht anders beschrieben, erfolgten alle Schritte auf Eis. Dazu wurde das Pellet einer 1

ml OD<sub>600nm</sub>-Kultur von 1 in 1000 µl gekühltem STM-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen in einer vorgekühlten Tischzentrifuge (Biofuge Fresco) für 5 min mit 6.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl STM-Puffer mit 0,33 mg/ml Lysozym für 5 min bei 37 °C aufgeschlossen. Anschließend konnte die Proteinkonzentration des Zelllysats bestimmt werden. Für ein SDS PAGE wurden 30 µl des Proteinextrakt mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

#### STM-Puffer

50 mM TRIS, pH 8,0; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 % (w/v) Saccharose, lagern bei 4 °C

### **2.2.3.8 Zellaufschluss mittels French-Press**

Der schnelle Zellaufschluss von Überexpressionskulturen erfolgte mit Hilfe der French-Press. Alle Schritte erfolgten dabei auf Eis. Dazu wurden die Zellpellets, abhängig vom aufzureinigenden Protein, in insgesamt 20 ml proteaseinhibitorhaltigen French Press-Lysepuffer resuspendiert und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit 3 Passagen durch die French Press bei einem Druck von mindestens 1.000 bar. Das Lysat wurde nun in ein SS34-Röhrchen überführt. Die Zelldebris wurden durch Zentrifugation 45 min, mit 18.000 rpm, bei 4°C mit einem SS34-Festwinkelrotor (Sorvall® RC-6+) pelletiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und konnte nun für die weitere Proteinaufreinigung verwendet werden.

#### ClpC-Lysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 300 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>;

Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette je 50 ml); 0,04 mg/ml DNaseI

#### HtpG-Lysepuffer

20 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA;

Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette je 50 ml); 0,04 mg/ml DNaseI

#### MecA-Lysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8); 300 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM Imidazol; 1mM DTT

Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette je 50 ml); 0,04 mg/ml DNaseI

#### ClpP-Lysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 10 mM Imidazol; 2mM DTT

Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette je 50 ml); 0,04 mg/ml DNaseI

#### McsB-Lysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8); 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 10 mM Imidazol;

Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette je 50 ml); 0,04 mg/ml DNaseI

### **2.2.3.9 Proteinaufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung von His<sub>6</sub>-markierten Proteinen erfolgte durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Dazu wurde eine Säule mit einer Fritte versehen und mit 500 µl Ni-NTA Matrix von Qiagen pro Liter Anzuchtvolumen beladen. Nach Waschen der Säule mit 20 ml ddH<sub>2</sub>O wurde das Säulenmaterial mit einer 2. Fritte versehen. Zur Vorbereitung der Säule wurde diese im 10x Matrixvolumen des entsprechenden Lysepuffers (siehe 2.2.3.8) äquilibriert. Alle folgenden Schritte wurden ab diesem Punkt im 4 °C-Kühlraum durchgeführt. Nach Auftragen und Durchlaufen des Rohextrakts wurde die Matrix mit 5 x 10 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit einem imidazolhaltigen Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei die Menge dem 3-fachen Matrixvolumen entsprach. Das Eluat wurde bei 4 °C gelagert.

#### MecA-Waschpuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8); 300 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Imidazol; 1mM DTT

#### ClpP-Waschpuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 20 mM Imidazol; 2mM DTT

#### McsB-Lysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8); 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 20 mM Imidazol;

#### MecA-Elutionspuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8); 300 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM Imidazol; 1 mM DTT

#### ClpP- Elutionspuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 250 mM Imidazol; 2 mM DTT

#### McsB- Elutionspuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8); 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 500 mM Imidazol; 1 mM DTT

### **2.2.3.10 Proteinaufreinigung durch Chitin-Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung von Intein-markierten Proteinen erfolgte durch Chitin-Affinitätschromatographie. Die Aufreinigung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, wie in Kapitel 2.2.3.9. Dazu wurde eine Säule mit 3 ml Matrixvolumen Chitin-Sepharose-Kügelchen verwendet. Nach Auftragen des Rohextrakts und Waschen mit 5 x 10 ml Waschpuffer, wurden 10 ml DTT-haltiger Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen und diese kurz vor dem Durchlaufen des Elutionspuffer verschlossen. Durch Übernacht-Inkubation der Säulenmatrix im Elutionspuffer bei 4 °C wurde durch das DTT der Intein-Tag von dem gebundenen Protein abgespalten, wodurch dieses eluiert wurde. Am nächsten Tag wurde das Protein mit 3 Matrixvolumen Waschpuffer von der Säule gewaschen. Die Effektivität der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE des aufgefangenen Eluats überprüft.

#### ClpC-Waschpuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 300 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>;

#### HtpG-Waschpuffer

20 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA;

#### ClpC-Elutionspuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 300 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT

#### HtpG-Elutionspuffer

20 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM DTT

### **2.2.3.11 Aufkonzentration von Proteinlösungen durch Ultrafiltration**

Zum schonenden Aufkonzentrieren von Proteinlösungen wurde eine Ultrafiltration vorgenommen. Dazu wurden Vivaspin 6 Zentrifugalkonzentratoren nach Herstellerangaben verwendet. Die Zentrifugation erfolgte mit 5000 rpm bei 4 °C (Centrifuge 5804R). Zur Vorbereitung der Filtermembran zentrifugierten diese für 10 min mit ddH<sub>2</sub>O und anschließend für weitere 10 min mit dem jeweiligen Puffer. Proteinlösungen wurden bis 0,3-1,5 ml Endvolumen aufkonzentriert.

### **2.2.3.12 Dialyse von Proteinlösungen**

Um Imidazol aus Proteinlösungen nach der Ni-NTA Affinitätschromatographie zu entfernen, kann eine Dialyse durchgeführt werden. Dazu wurden Spectra/Por®-Dialyseschläuche mit 6-8 kDa MWCO verwendet. Die Proteinlösung wurde nach Spülen des Dialyseschlauches mit ddH<sub>2</sub>O und Äquilibrieren im Dialysepuffer in den Schlauch gefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlraum bei 4 °C in 2 L Dialysepuffer auf einem Magnetrührer. Am nächsten Tag wurde nach Pufferwechsel für weitere 3h inkubiert. Anschließend konnten die Proteine in flüssigen Stickstoff eingefroren werden und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert werden.

#### MecA-Dialysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 300 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT

#### McsB-Dialysespuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 200 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 % Glycerin; 1 mM DTT

### **2.2.3.13 Entsalzung von Proteinlösungen**

Eine schnellere Möglichkeit Imidazol aus Proteinlösungen nach der Ni-NTA Affinitätschromatographie zu entfernen, kann durch die Reinigung mit einer High Trap Desalting-Säule mit Hilfe des ÄKTA-„Purifier“ erreicht werden. Dies wurde für das Protein ClpP angewandt. Der verwendete Laufpuffer wurde vor Gebrauch sterilfiltriert, entlüftet und vorgekühlt. Das Auftragsvolumen betrug 1,5 ml, die Flussrate 5 ml/min und die

Fraktionsgröße 0,3 ml. Die Proteinelution erfolgte über zwei Säulenvolumen und wurde durch Messung der Absorption bei 228 nm verfolgt.

Anschließend konnten die Proteine in flüssigen Stickstoff eingefroren werden und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert werden.

#### ClpP-Laufpuffer (Entsalzung)

50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 10 % Glycerin; 2 mM EDTA; 2 mM DTT

### **2.2.3.14 Aufreinigung von Proteinen durch Gelfiltrationschromatographie**

Die Gelfiltrations-Chromatographie ermöglicht es Moleküle anhand ihrer Größe aufzutrennen. Dabei werden diese durch eine hochporöse Matrix geleitet, in der kleinere Moleküle stärker zurückgehalten werden als größere. Sie diente der Abtrennung von DTT, Imidazol und kleinerer Proteinverunreinigungen. Die Gelfiltrationsläufe erfolgten mit Hilfe des ÄKTA-„Purifier“ und über die HiLoad 16/60 SuperDex 75 Pepgrade Säule (1,6x60 cm). Der verwendete Laufpuffer wurde vor Gebrauch sterilfiltriert, entlüftet und vorgekühlt. Die Pufferzusammensetzung richtete sich nach dem jeweiligen Protein. Das Auftragsvolumen betrug 0,3 ml, die Flussrate 1 ml/min und Fraktionierungsgröße 2 ml. Die Proteinelution wurde durch Absorption der Peptidbindungen bei 228 nm verfolgt. ClpC und HtpG wurden vor der Gelfiltrationschromatographie auf 300 µl aufkonzentriert. Die Fraktionen wurden mittels SDS PAGE analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten wurden zusammengefasst.

#### ClpC-Gelfiltrationspuffer

20 mM Bicin (pH 8,9); 200 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### HtpG-Gelfiltrationspuffer

25 mM HEPES-KOH (pH 7.4); 200 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.2.3.15 Aufreinigung von Proteinen durch Anionenauschromatographie**

Die Anionenausch-Chromatographie erfolgte mit Hilfe des ÄKTA-„Purifier“ über die Resource Q – Säule (1 ml). Die verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert, entlüftet und auf

4 °C vorgekühlt. Die Säule wurde vor Gebrauch in Puffer 1 äquilibriert. Das zu reinigende Protein wurde auf 50 ml in Puffer 1 verdünnt, um die Salzkonzentration, die in dieser Chromatographie stören kann, zu vermindern. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min und die Fraktionierungsgröße 600 µl für ClpC und 700 µl für HtpG. Das Protein wurde über einen KCl-Gradienten, der durch Puffer 2 erzeugt wurde, über 10 Säulenvolumen von 0-1 M KCl von der Säule eluiert. Die Proteinelution wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten wurden zusammengefasst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Ein Teil des gereinigten HtpG Proteins wurde zur Antikörperproduktion (Pineda Antibody Service) benutzt.

#### Puffer 1-ClpC

20 mM Bicin-NaOH (pH 8,9); 5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Puffer 2- ClpC

Bicin-NaOH (pH 8,9); 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 M KCl

#### Puffer 1-HtpG

25 mM HEPES-KOH (pH 7,5); 5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Puffer 2- HtpG

25 mM HEPES-KOH (pH 7,5); 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 M KCl

### **2.2.3.16 Ko-Immunpräzipitation**

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden hier Pierce Protein AG Magnetic Beads verwendet. Auf der Oberfläche der Beads befindet sich ein rekombinantes Protein A/G, welches eine IgG-Bindedomäne, die die Bindung eines Antikörpers ermöglicht, besitzt. Zu Beginn wurde Proteinextrakt von den *B. subtilis* Zellen hergestellt, die das zu präzipitierende Protein enthalten beziehungsweise nicht enthalten (Negativkontrolle). Hierzu wurden die Zellen auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 in 200 ml angeimpft, bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1 wachsen gelassen. Daraufhin wurde die Kultur geteilt, wobei die eine Hälfte mit 0,6 % Formaldehyd versetzt wurde, um die in vivo vorhandenen Proteinbindungen zusätzlich zu fixieren. Diese Proben

wurden noch weitere 20 Minuten im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen beider Kulturen mit 4500 rpm bei 4 °C (Centrifuge 5804R) pelletiert. Das Pellet wurde hiernach in Puffer A (siehe 2.2.3.1) gewaschen und anschließend in 500 µl Puffer A mit 0.33 mg/ml Lysozym, 20 µg/ml DNaseI, 20 µg/ml RNaseI, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 für 90 Minuten bei 37 °C und 750 rpm aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min bei 4 °C (Biofuge fresco) entfernt, um den Gesamtzellextrakt (CE) zu erhalten, von dem nachfolgend die Proteinkonzentration bestimmt wurde. 1 mg des jeweiligen Proteinextrakts wurden mit 50 µg des zu präzipitierenden Proteins versetzt (Negativkontrolle: gleiche Menge Wasser), 2 mM ATP und in Puffer C für drei Stunden bei Raumtemperatur rotierend bei 18 rpm inkubiert (Gesamtmenge 400 µl). Anschließend wurden 100 µl des Antikörpers, der das zu präzipitierende Protein binden kann, dazugegeben und die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad bei 18 rpm inkubiert. Als nächstes wurden dem AK-Protein-Mix 200 µl, vorher zweimal mit 500 µl Puffer A (2.2.4.1) gereinigte Magnetbeads hinzugefügt, welche mithilfe von Protein A/G an der unspezifischen, langen Seitenkette (Fc-Fragment) des AK binden. Nach einer erneuten Inkubation (drei Stunden) bei Raumtemperatur auf dem Drehrad wurden die Proben dreimal mit Waschpuffer D mittels eines magnetischen Ständers gewaschen. So sollten die unspezifisch gebundenen Proteine abgetrennt werden. Nach dem letzten Waschvorgang wurden 100 µl 1x SDS-Probenpuffer auf die Beads gegeben und 20 min bei 95 °C aufgeköcht, wodurch alle Proteinbindungen zerstört werden. Das präzipitierte Protein und die möglichen Interaktionspartner konnten somit von den Beads getrennt und auf ein SDS PAGE aufgetragen werden. Nach einer erfolgreichen Auftrennung wurden die möglichen Interaktionspartner mittels Massenspektroskopie identifiziert. Dazu wurden die jeweiligen Proteinbanden mittels eines Skalpell herausgeschnitten und in 0,1 % Essigsäure überführt. Hiernach wurden sie mit freundlicher Unterstützung von Günther Kramer des ZMBH der Universität Heidelberg und von dem MS-Service der Universität Heidelberg massenspektrometrisch untersucht.

Die Auswertung wurde mittels des Programms Scaffold Viewer vorgenommen, wobei die Protein Wahrscheinlichkeit auf 99%, die Anzahl der Peptide auf mindestens 1 und die Peptid Wahrscheinlichkeit auf 95 % gesetzt wurde.

#### Puffer C

40 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % w/v Glycerin

#### Puffer D

50 mM Tris-HCL (pH8), 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20

### **2.2.3.17 Analytische Gelfiltration**

Gelfiltrationschromatographie beruht auf der Trennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Diese Methode kann auch im analytischen Maßstab genutzt werden, um eine Aussage über die Molekülgröße unter nativ-ähnlichen Bedingungen zu erhalten. Um Aussagen über die Quartärstruktur der gereinigten Proteine treffen zu können, wurde die analytische Gelfiltrationschromatographie angewandt. Die Molekülgröße korreliert jedoch nur im Falle globulärer Proteine mit dem Molekulargewicht, da weitere Parameter, wie hydrodynamischer Radius und Molekülform ebenfalls das Laufverhalten beeinflussen. Zur Durchführung wurde ein ÄCTA-„*Purifier*“ System verwendet. Die Analyse der Proteine erfolgte auf einer Superose 6 10/300 GL-Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min bei Raumtemperatur. Die Elutionszeit wurde benutzt, um eine relative, vergleichende Information über den Oligomerisierungszustand der ATPase HtpG vor und nach ATP-Zugabe zu erhalten. Dazu wurden 10 µM HtpG in einem Gesamtvolumen von 100 µl (in Laufpuffer) auf die Säule geladen. Für den Lauf mit ATP wurden 10 µM HtpG mit 5 mM ATP in 100 µl vorinkubiert und auf die Säule geladen. Der Laufpuffer enthielt zusätzlich 0,5 mM ATP. Über die Kalibrierung unter Verwendung des Elutionsverhalten des Ausschlussproteins und der Eichproteine (Tabelle 15) konnte das Molekulargewicht von HtpG berechnet werden (nach GE Healthcare).

Zusätzlich wurden bei jedem Lauf 500 µl Fraktionen gesammelt. Für die Aufkonzentrierung von Protein wurde eine Acetonfällung vorgenommen. Dazu wurden die Fraktionen mit 500 µl Aceton versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Proteine wurden hiernach in einer vorgekühlten Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge Fresco) für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C gefällt. Das Pellet wurde getrocknet, in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95 °C für 5 min gekocht und mittels SDS PAGE und Western Blot Analyse untersucht.

#### Laufpuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.2.3.18 Enzym-gekoppelter ATPase-Assay

Für die Messung der ATPase-Aktivität wurde ein Enzym-gekoppelter ATPase-Assay (130) verwendet (Abbildung 4). Dieser basiert auf der Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat durch die Pyruvatkinase (PK). Anschließend wandelt die Lactatdehydrogenase (LDH) Pyruvat zu Lactat um. Dieser letzte Schritt benötigt NADH, welches zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird. Im Gegensatz zu NAD<sup>+</sup> absorbiert NADH bei 340 nm. Dadurch wird es möglich den Verbrauch von NADH bei 340 nm zu beobachten. Der Abfall der Absorption bei einer OD<sub>340nm</sub> kann in die ATPase-Aktivität umgerechnet werden, da für den ersten Schritt eine ATPase benötigt wird, die ATP in ADP umwandelt. Dadurch wird ermöglicht, dass ADP generiert wird, auf das PEP sein Phosphat abgeben kann und somit zu Pyruvat umgewandelt wird. Ein Molekül NADH, das zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird, entspricht dabei einem Molekül ADP, das durch die ATPase produziert wurde. Die ATPase-Aktivität pro Molekül ATPase wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{ATP-Umsetzung/min} = - \text{Steigung} / (\epsilon_{340\text{nm}} * c_{\text{ATPase}} [\text{mol/l}]) / 0,5$$

Die Steigung berechnet sich aus der Gerade, die den Abfall der Absorption bei OD<sub>340nm</sub> beschreibt. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{340}$  von NADH beträgt 6200 [l/mol]. Es wurden jeweils 200  $\mu$ l-Ansätze (siehe Tabelle 13) in ATPase-Puffer bei Raumtemperatur in 96-Well Platten in einem Mikroplattenspektrometer (Biotek Instruments) vermessen.

Eingesetzte ATP-Konzentrationen waren 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1 und 2 mM. Als Blank diente 200  $\mu$ l ATPase-Puffer. Die Steigung der Kontrolle, die aus allen Komponenten ohne ATPase, Radicol und ATP vermessen wurde, wurde von allen ermittelten Steigungen subtrahiert. Zur Ermittlung der eigentlichen ATPase-Aktivität von HtpG wurde die ATPase-Aktivität von durch Radicol inhibiertem HtpG abgezogen. Eine Stocklösung von 5 mM wurde in DMSO hergestellt.

---

#### Komponenten

---

100 mM PEP

2 mM NADH (frisch hergestellt)

200 U/ml PK

350 U/ml LDH

---

---

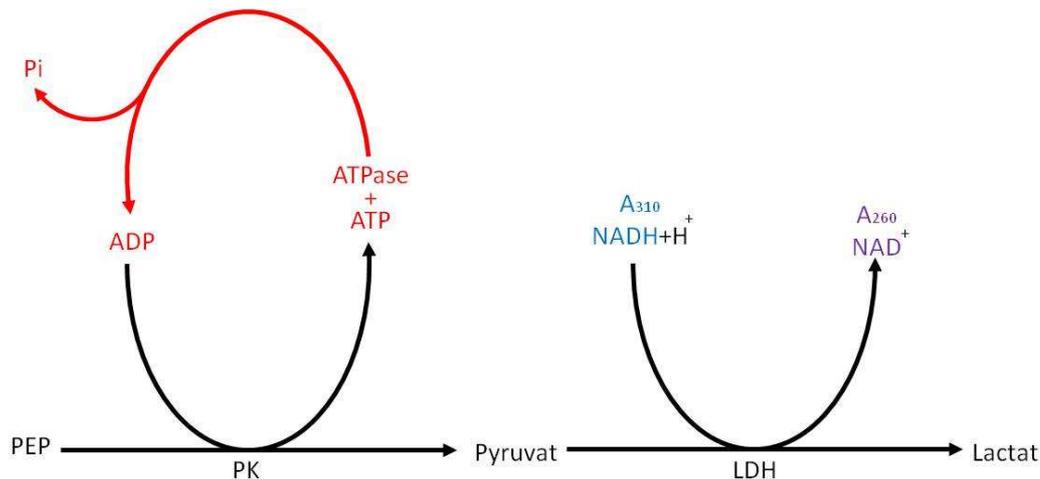
100 mM DTT  
30  $\mu$ M ATPase (HtpG)  
25  $\mu$ M Radicicol

---

**Tabelle 13: Komponenten des Enzym-gekoppelten ATPase-Assays**

#### ATPase-Puffer

40 mM HEPES-KOH (pH 7,5); 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 % Glycerin



**Abbildung 4: Prinzip des Enzym-gekoppelten ATPase-Assays**

#### **2.2.3.19 Detektion von Carbonylgruppen an Proteinen**

Zur Detektion von Carbonylgruppen an Protein wurde der OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Merck Millipore) verwendet. Die Proteinproben wurden nach Herstellerangaben behandelt, wobei 15  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt (CE) und 15  $\mu$ g der löslichen Fraktion (SN) eingesetzt wurden. Das Volumen der Aggregatfraktion wurde jeweils proportional an die absolute Proteinmenge des entsprechenden Gesamtzellextrakts angepasst. Eine SDS Page und die Western Blot Analyse wurden wie 2.2.3.3 und 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Der primäre Antikörper, der durch den Kit bereitgestellt wurde, wurde 1:1000 verdünnt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:5000 verdünntes, alkalische Phosphatase-gekoppeltes Immunglobulin G (siehe Tabelle 11), verwendet.

#### **2.2.4 Mikroskopie**

*B. subtilis* Zellen mit *mdh-gfp* und *mdh-yfp* Fusionen wurden in LB Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,2-0,3 angezogen. *B. subtilis* Zellen mit *ibpA-gfp* Fusionen, *ibpA-cfp* Fusionen und der Stamm BSR26 wurden für die Induktion der GFP-Fusionen und GFP in LB mit 2 % w/v Xylose angezogen. Anschließend wurden die Kulturen entsprechend der jeweiligen Experimente Thermotoleranz- oder Hitzestressbedingungen (siehe 2.2.1.2) ausgesetzt. Objektträger aus Glas wurden mit einer Schicht von Agarose (1 % w/v in Wasser) bedeckt. Hiernach wurden 0,5 µl der zu untersuchenden Kultur auf die Agarose-beschichteten Objektträger pipettiert, kurz bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem Deckgläschen bedeckt und mittels Phasenkontrast-, Durchlicht- oder/und Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines Nikon 120 Eclipse 90i Mikroskops analysiert (100x Ölimmersionsobjektiv, Standard-GFP/YFP/CFP Filter).

#### **2.2.5 Experimentelle Evolution**

##### **2.2.5.1 Bau und Funktionsweise der Genetischen Maschine**

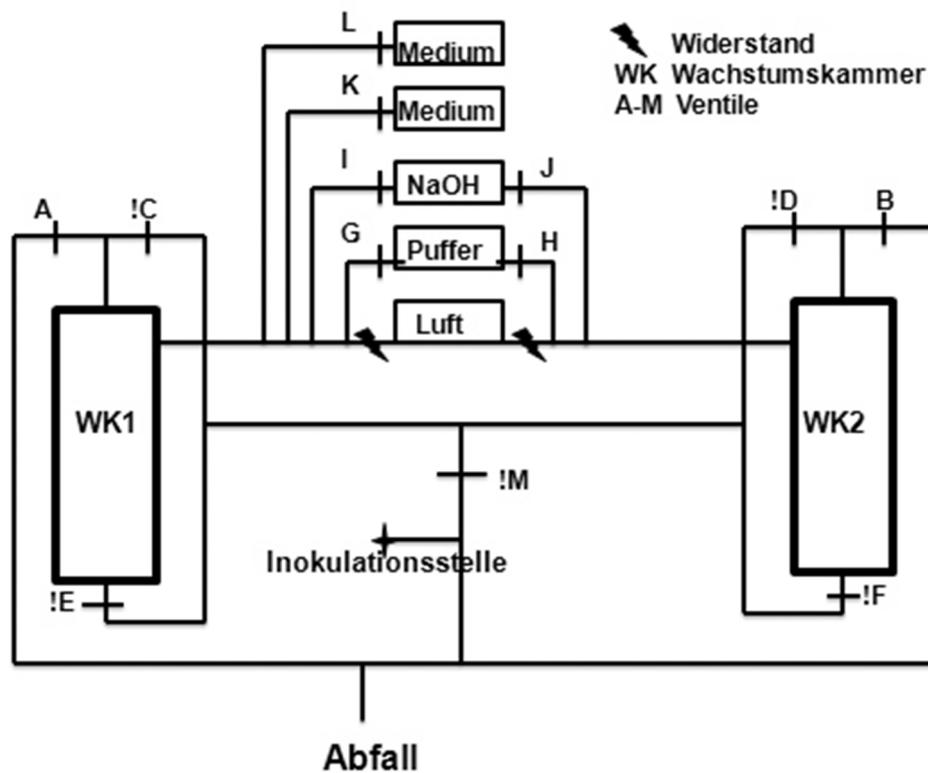
Die Genetische Maschine besteht aus einem Schlauchsystem, welches mit zwei Wachstumskammern, von denen eine beheizbar ist und den Behältern mit den Nährmedien und den Waschlösungen verbunden ist. Zudem führt ein Schlauch in ein Abfallgefäß. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 5 dargestellt. Außerdem besitzt die Maschine mehrere Ventile, einen Trübenregler und eine SPS-Steuerung zur Programmierung der Ventile. In dieser Arbeit wurde mit drei Maschinen gearbeitet, welche mit minimalen Abweichungen nach dem gleichen Prinzip funktionieren.

Das gesamte Schlauchsystem, sowie alle Flüssigkeitsbehälter stehen unter einem konstanten Druck. Dabei fließt die Luft über zwei Filter in das Schlauchsystem der Maschine, um Kontaminationen zu verhindern. Somit wird in den Flaschen ein Überdruck erzeugt, der die enthaltenen Flüssigkeiten in die entsprechenden Schläuche drückt. Durch die präzise angebrachten Ventile (A bis M) und deren periodisches Öffnen wird der Fluss von allen Lösungen und Bakterienkulturen kontrolliert. Eine Siemens SPS mit einer CPU-Einheit und zwei Analogmodulen gibt an die verschiedenen Ventile zu unterschiedlichen Zeitpunkten Stromsignale, wodurch sich diese öffnen, solange das Stromsignal anhält. Die Ventile A, B,

G, H I, J, K, und L sind im Normalzustand geschlossen und können geöffnet werden. Die Ventile !C, !D, !E, !F und !M sind im Normalzustand offen und können auf einen Stromimpuls hin geschlossen werden. Die Zelldichte wird permanent mittels Trübenregler gemessen. Die Wachstumskammer 1 wird über einen Temperaturregler ständig auf 37 °C gehalten. An die Maschine sind zwei (für die Adaptation an einen exogenen Salzstress) oder eine Flasche (für die Adaptation an einen endogenen Wachstumsstress) mit Minimalmedium, eine mit 50 mM Kaliumphosphat (pH 5) und eine mit 5 M Natronlauge angeschlossen. Außerdem ist an die Maschine eine mit Luft gefüllte Flasche angeschlossen. Diese bietet einen zusätzlichen Luftdruckvorrat beim technisch bedingten Druckabfall.

Der Zufluss von Medien in die Wachstumskammer wird durch die Ventile L und K kontrolliert. Alle drei Minuten kommt ein Impuls und abhängig von der Dichte der Kultur geht entweder das Ventil K oder L auf. Liegt die  $OD_{600nm}$  unter 1,0, öffnet sich für 10 Sekunden das Ventil L und der Kultur wird frisches Medium zugefügt. Ist die Dichte höher, öffnet sich für 60 Sekunden beziehungsweise 120 Sekunden das Ventil K. Im Falle der Salzadaptation ist die Maschine über Ventil L an das permissive Medium mit der niedrigen Salzkonzentration angeschlossen. Ventil K ist mit dem nicht-permissiven Medium mit der hohen Salzkonzentration verbunden. In diesem Fall wurde eine Maschine verwendet, in der Ventil K für 60 Sekunden öffnet. Im Fall der Adaptation an den endogenen Stress sind Ventil K und L an nur ein Minimalmedium angeschlossen. Durch die Öffnung von Ventil K wird die Kultur verdünnt und die optische Dichte nimmt ab, was ein konstantes Wachstum ermöglicht. Das gleiche Volumen an zugegebenem Nährmedium fließt in entsprechender Menge als Kulturmedium über die Ventile !E und !M in den Abfall. Der Waschzyklus findet alle zwölf Stunden statt. Damit wird die Bildung von Biofilmen an den Wänden der Wachstumskammern verhindert. Dabei wird die Bakterienkultur in die Wachstumskammer 2 (WK2) überführt, wobei die Wachstumskammer 1 zunächst mit 5 M NaOH sterilisiert und dann mit Puffer neutralisiert wird. Anschließend erfolgt der Rücktransfer in Kammer 1, wobei Kammer 2 sterilisiert und neutralisiert wird. Zunächst werden die Ventile !C, !M und !D geschlossen und B geöffnet, was den Transfer der Kultur in die Wachstumskammer 2 bewirkt. Anschließend wurde !E wieder geschlossen, damit die Natronlauge nicht aus der Kammer entweichen kann. Als nächstes werden das Ventil A, damit Luft entweichen kann, und Ventil I geöffnet, um den NaOH-Einstrom in die Kammer zu ermöglichen. Gleichzeitig verschließt sich Ventil !F, damit die transferierte Kultur in der WK2 verbleiben kann. Um die WK1 zu entleeren und die Natronlauge auch durch die anderen Schläuche fließen zu lassen, werden E! und !M geöffnet und A geschlossen. Auf diese Weise kann die Natronlauge in den

Abfall geleitet werden. Für die Neutralisierung der Kammer werden die Ventile G, A und !C geöffnet. Ventil !M bleibt anfangs noch offen, um das gesamte Wachstumsgefäß und die umliegenden Schläuche zu neutralisieren, wird jedoch kurze Zeit später auch geschlossen. Die Kammer wird erneut geleert und die Kultur kann zurücktransferiert werden. Sobald das Ventil G geschlossen wird, geht !D auf. Während die Bakterienkultur zurückfließt, bleibt !M verschlossen. Nun folgen nach dem gleichen Prinzip die Sterilisation und Neutralisation der Wachstumskammer 2.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Generationsmaschine (GM 2.1).** A-M stellen Ventile dar. Ventile, die normal offen sind und geschlossen werden können, sind zusätzlich mit einem Ausrufezeichen gekennzeichnet. Die zu untersuchende Kultur (30 ml) wird an der Inokulationsstelle mittels einer Spritze in die Maschine gegeben. Sie befindet sich dann in der Wachstumskammer 1. Die Zugabe von Medium erfolgt über die Ventile L und K. Bei dem Waschzyklus wird die Bakterienkultur in die Wachstumskammer 2 (WK2) überführt, wobei die Wachstumskammer 1 zunächst mit 5 M NaOH sterilisiert und dann mit Puffer neutralisiert wird. Anschließend erfolgt der Rücktransfer in Kammer 1, wobei Kammer 2 sterilisiert und neutralisiert wird. Kulturproben werden über den Schlauch in den Abfall entnommen. Der Transport aller Flüssigkeiten erfolgt über sterilfiltrierte Druckluft und die verschließbaren Ventile A – M. Die Ventile A, B, G, H I, J, K, und L sind im Normalzustand geschlossen und können geöffnet werden. Die Ventile !C, !D, !E, !F und !M sind im Normalzustand offen und können auf einen Stromimpuls hin geschlossen werden.

### 2.2.5.2 Experimenteller Verlauf

Abgesehen von dem Schlauch, welcher zum Abfall führt, bildet die Generationsmaschine ein geschlossenes System. Bevor die Maschine gestartet werden kann, wurde das gesamte System

mit dH<sub>2</sub>O gründlich gespült, alle späteren Verbindungsstellen mit Alufolie abgedeckt und zusammen mit sämtlichen Medien und dem Puffer autoklaviert. Alle Vorratsflaschen sind mit dem Schlauchsystem der Maschine mit Verbindungsstiften aus Metall verbunden. Um sterile Bedingungen während des Anschlusses zu ermöglichen, wurde hier über der Bunsenbrennerflamme gearbeitet. Für den Anschluss mussten diese am Schlauchsystem und an den Vorratsflaschen kurz geöffnet werden. Der Anschluss fand daher über der Bunsenbrennerflamme statt. An den Bereichen der Luftanschlüsse waren jeweils zwei Sterilfilter angebracht, somit gelangte in das gesamte Schlauchsystem und alle Nährmedien nur steril filtrierte Luft.

### 2.2.5.3 Inokulation und Probenentnahme

Die Inokulation mit der jeweiligen Kultur erfolgte über die Inokulationsstelle (Abbildung 5). Die Kultur wurde mittels einer sterilen Spritze mit Hilfe der Verbindungsstifte in die Wachstumskammer 1 geleitet. Damit die Kultur nicht in den Abfluss gelangte, wurde der Weg dahin abgeklemmt. Auch hier musste über der Bunsenbrennerflamme gearbeitet werden. Nach dem Start der Maschine wurden mindestens alle sieben Tage Proben aus dieser über den Schlauch zum Abfall entnommen und auf ihre genetische Identität (siehe Tabelle 14) überprüft ein und Glycerinstock erstellt, der bei -80 °C eingefroren.

Hierzu wurde das Ventil !C geschlossen, so dass ein Teil der Kultur über den Abfallschlauch abfließen und in einem sterilen 15-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt werden konnte.

<b>Gen</b>	<b>Primer, Restriktionsenzym</b>	<b>erwartete Fragmentlänge(n)</b>
<i>htpG</i> (1881 Bp)	S1 (bindet 999 Bp downstream von <i>htpG</i> ) 214 (bindet 875 Bp upstream von <i>htpG</i> )	3755 Bp
$\Delta$ <i>htpG</i>	S1, 214	1874 Bp
<i>htpG</i> Trap	S1,214, anschließend BssHII-Verdau (schneidet Fragment nach 247 und 965 Bp)	2790 Bp, 718 Bp 247 Bp
<i>def/fmt</i> (1437 Bp)	S23 (bindet upstream von <i>def/fmt</i> ) 224 (bindet downstream von <i>def/fmt</i> )	2560 Bp
$\Delta$ <i>def/fmt</i>	S23, S24	809 Bp

**Tabelle 14: Überprüfung der adaptierten Stämme auf ihre genetische Identität**

#### 2.2.5.4 Datenauswertung

Die Visualisierung der Adaptation über die Zeit erfolgte über die Erfassung des Verbrauches an Medium. Diese erfolgte manuell oder über die Aufzeichnung der Öffnung des Ventil Ks über einen Datenlogger. Die Salzadaptation erfolgte in einer Maschine, an die kein Datenlogger angeschlossen war und somit fand die Ermittlung des Verbrauch an permissiven und nicht-permissiven Medium manuell statt. Hierfür wurde der Verbrauch über die Abnahme des Flüssigkeitsstands der Mediumflaschen ermittelt (5l-Flaschen, 1 cm entsprechen 250 ml). Die Salzkonzentration  $c$ , die sich zum jeweiligen Zeitpunkt in der Wachstumskammer befand, konnte über den Verbrauch  $V$  an permissiven -  $P$  und nicht-permissiven Medium  $NP$  über folgende Formel errechnet werden:

$$c = ((c_{NP} * V_{NP}) + (c_P * V_P)) / (V_{NP} + V_P)$$

Für die Erfassung der Adaptation an den endogenen Stressfaktor wurde ein Datenlogger verwendet. Dieser zeichnete die Anzahl der Öffnungen (Pulse) von Ventil K auf. Da bekannt ist, dass alle 3 min ein Puls, also eine Öffnung eines Ventils stattfindet, berechnen sich daraus 480 Pulse pro Tag. Zweimal am Tag findet ein fünfzehnminütiger Waschzyklus statt. In dieser Zeit finden keine Pulse statt. Demnach sind es 470 Pulse am Tag. Zieht man nun die Pulse von dieser Zahl ab, die durch Ventil K verzeichnet werden, erhält man die Anzahl der Pulse, die von Ventil L ausgehen. Vor Beginn jedes Laufes wurde überprüft, wie lange es dauert bis 2 ml bei Öffnung jedes Ventils in die Wachstumskammer geflossen sind (2 ml entsprechen 1 cm in der Wachstumskammer). Zusätzlich wurde das Volumen an Medium, das pro kurzes Öffnen durch da Ventil strömt, bestimmt. Dieses Volumen fließt bei jeder Öffnung des Ventils am Anfang schwallartig in die Wachstumskammer und muss daher zu dem Volumen, das pro Puls durch das Ventil fließt hinzuaddiert werden. Da die Öffnungszeiten der beiden Ventile bekannt sind, kann aus diesen Daten auf den Verbrauch von Medium  $V$  geschlossen werden. Hieraus kann auf die Generationszeit geschlossen werden. Die Anzahl der Generationen  $n$  pro Stunde berechnet sich aus folgender Formel, wobei  $w$  das Kulturvolumen von 30 ml darstellt:

$$n = ((V/w) * (1/\ln 2)) / 24$$

Die Generationszeit in Stunden beträgt  $1/n$ .

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Thermotoleranz und Proteinaggregation

Durch Hitze ausgelöster Stress hat in der Zelle weitreichende Konsequenzen, die auf Proteinebene zu Fehlfaltung und Aggregation von thermolabilen Proteinen führen können (17, 18). Bei der Thermotoleranz konditioniert ein milder Stress Zellen und Organismen, um hohe, eigentlich letale Temperaturen zu überleben.

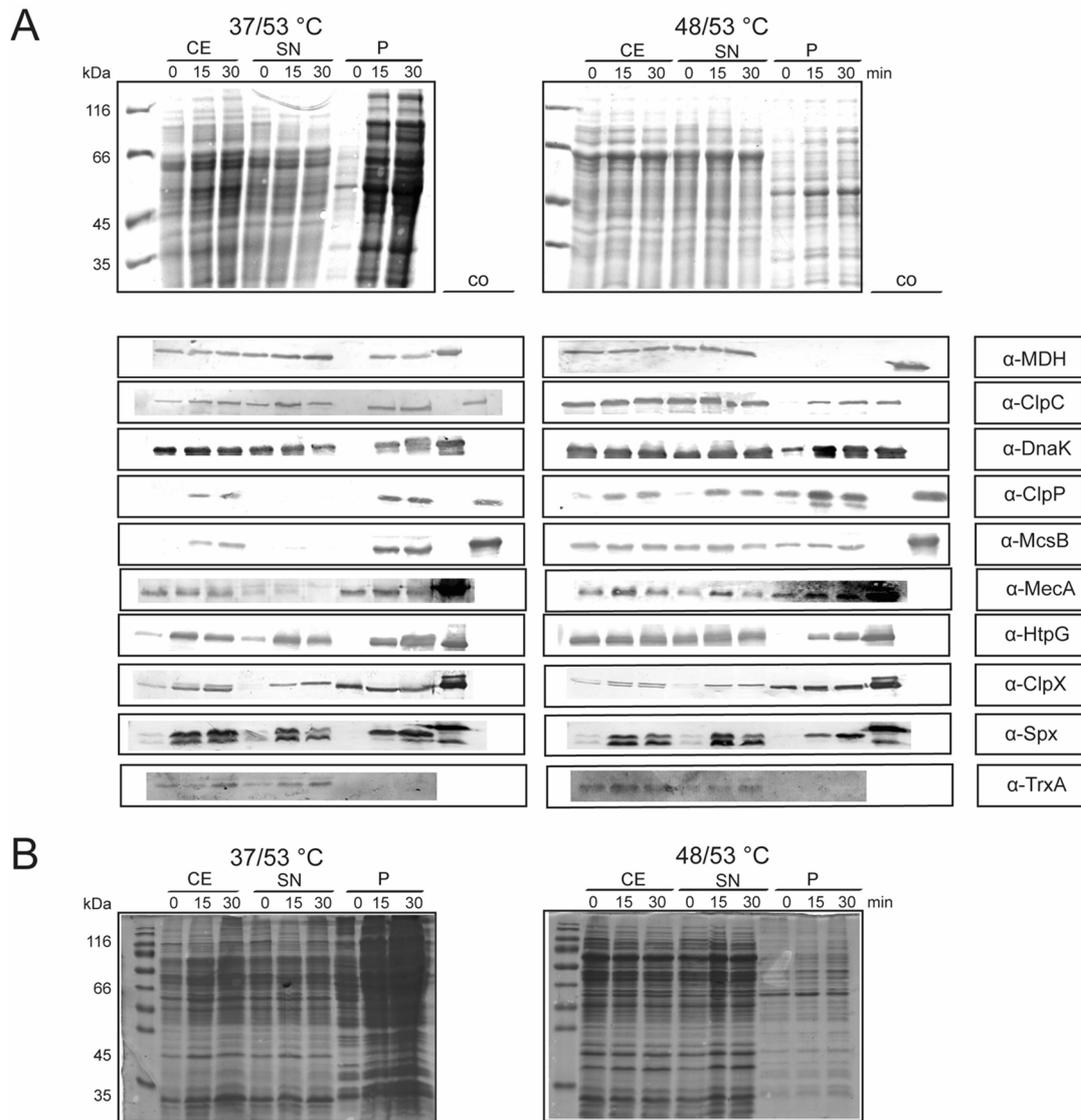
In *E. coli* ist die Entwicklung der Thermotoleranz abhängig von der Proteindisaggregation durch ClpB, DnaK und den kleinen Hitzeschockproteinen (44). Auch *B. subtilis* zeigt ein Thermotoleranzverhalten (135). Jedoch konnte der genaue, molekulare Mechanismus für diesen Prozess bisher noch nicht geklärt werden. Daher wurden in diesem Zusammenhang die Hitzeresistenz und das Thermotoleranzverhalten von *B. subtilis* in unserer Arbeitsgruppe eingehend studiert, indem die Überlebensrate unter Thermotoleranzbedingungen bestimmt wurde, wobei die Zellen durch die Inkubation bei einem fünfzehnminütigem Prätschock bei 48 °C den letalen Hitzeschock bei 53 °C besser überlebten als Zellen, die nicht diesem Prätschock ausgesetzt wurden (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis). In diesem Abschnitt wurde die Bedeutung von Proteasen, Chaperonen und Regulatoren, die eine Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle spielen und deren Einfluss auf das Überleben unter den Bedingungen des Thermotoleranzexperiments zuvor im Rahmen unserer Arbeitsgruppe getestet wurde (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis), auf die Bildung von Proteinaggregaten unter Thermotoleranzbedingungen genauer untersucht.

#### 3.1.1 Proteinaggregation in *B. subtilis* Wildtyp

Um die Entstehung von fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen in *B. subtilis* Zellen zu beobachten und verfolgen zu können, wurden zwei unterschiedliche Methoden etabliert.

### 3.1.1.1 Präparation von Aggregaten

Zum einen wurde, durch die Modifizierung eines Protokoll, in dem unlösliche Proteinansammlungen aus *E. coli* präpariert wurden (272, 273) versucht, Aggregate aus *B. subtilis* Zellen zu isolieren, um sie zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurden die Zellen gemäß der Thermotoleranzbedingungen unter Verwendung von LB- oder Minimalmedium entweder ohne oder mit einem fünfzehnminütigen Präschock bei 48 °C einem letalen Hitzeschock bei 53 °C ausgesetzt, wobei sie anschließend lysiert und durch Zentrifugation in Überstand und Pelletfraktion geteilt wurde. Die Pelletfraktion wurde durch stringentes Waschen mit dem Detergent Triton X-100 von Membranproteinen befreit, was zu einer Anreicherung unlöslicher Proteinaggregate führte (modifiziert von (272, 273)). Anhand massenspektrometrischer Untersuchung konnte bestätigt werden, dass, vergleichbar zur Aggregatpräparation in *E. coli* (272, 273) die Pelletfraktion nach dieser Behandlung nur einen sehr kleinen Anteil an Membranproteinen (1-4 %) enthält (eingereichtes Manuskript). Die Proteine des Gesamtzellextrakts (CE), der Überstands (SN) und der Pelletfraktion (P), welche die angereicherten, zytosolischen Proteinaggregate enthält, wurden zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 6). Abbildung 6A zeigt die Proteine der Zellen, die in LB gewachsen sind, während in Abbildung 6B die Proteine der Zellen aus Minimalmedium zu sehen sind. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Proteinmengen für die Proteine des Gesamtzellextrakts und des Überstandes (5 µg), wobei das Volumen des Pellets proportional an die absolute Proteinmenge des Gesamtzellextrakts angeglichen wurde. Anschließend wurde mittels Western Blot, unter den SDS-PAGES in Abbildung 6A dargestellt, sowohl die totale und relative Menge von einigen Komponenten und Regulatoren der Proteinqualitätskontrolle, als auch ihre Lokalisation untersucht, wobei jeweils 100 ng des zugehörigen, aufgereinigten Proteins als Kontrolle (co) dienten. Zusätzlich wurde die Lokalisation der Malatdehydrogenase (MDH), eines Proteins, das als Teil des Citratzyklusses die Reaktion von L-Malat zu Oxalacetat katalysiert (274) und das somit keinen Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle besitzt, untersucht. MDH verschiedener Organismen ist als thermolabiles Protein bekannt und diente mehrfach als *in vitro* Modell für Proteinaggregate.



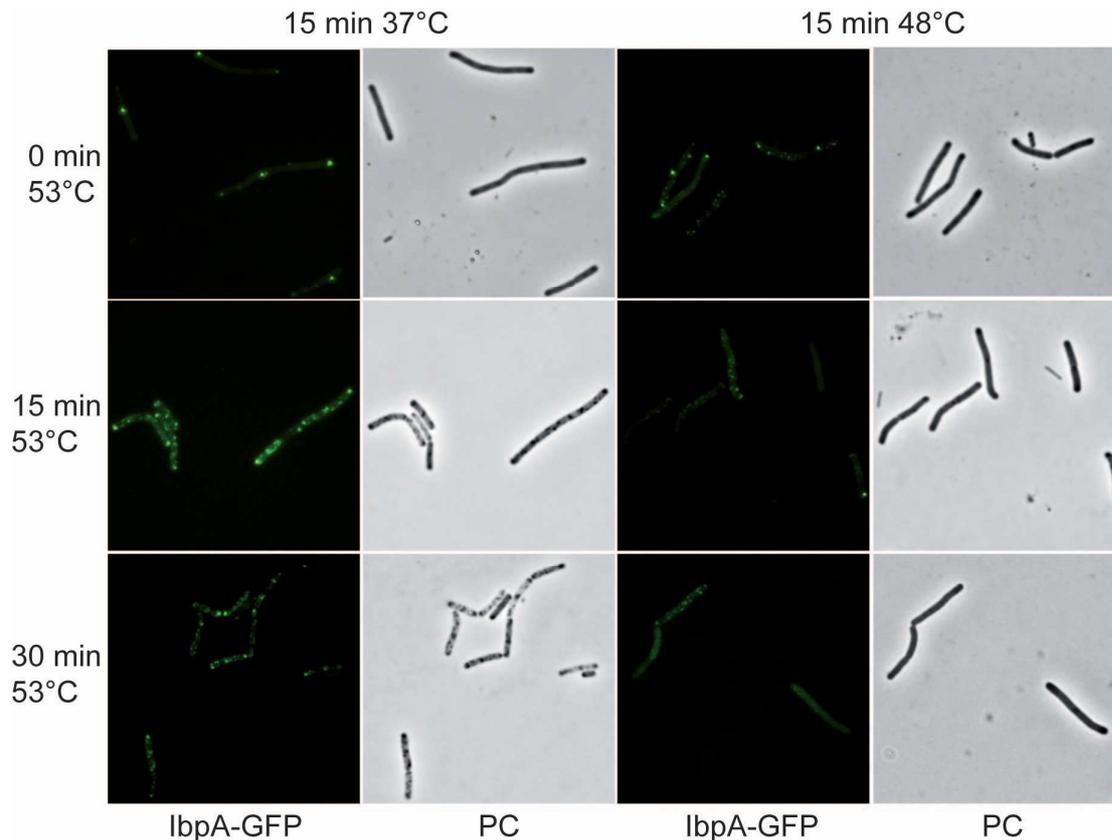
**Abbildung 6: Präparation von Proteinaggregaten in Wildtyp-Zellen unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von *B. subtilis* Wildtypzellen, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurden hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. B) *B. subtilis* Wildtypzellen wurden in Minimalmedium nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung analysiert.

Auf den Coomassie gefärbten Gelen in Abbildung 6A konnte deutlich beobachtet werden, dass die Zellen, die ohne den vorangegangenen Präschock bei 53 °C für 15 und 30 min ausgesetzt wurden (37/53 °C) einen vielfach stärkeren Anstieg an aggregierten Proteinen, im Vergleich zu denen, die den Präschock erhielten (48/53 °C), aufwiesen. Dieser Effekt war deutlich stärker ausgeprägt, wenn man die Zellen in Minimalmedium wachsen ließ (Abbildung 6B).

Die Western Blot Analyse (Abbildung 6A, unterer Teil) zeigte, dass der Präshock half, die Aggregation von MDH bei 53 °C zu verhindern, während sich MDH ohne Präshock deutlich nach 15 und 30 min bei 53 °C in der Aggregatfraktion befand. Die Chaperone DnaK und HtpG und die Komponenten der Proteasekomplexe (ClpC, ClpP, MecA, McsB) zeigten sowohl mit, als auch ohne Präshock nach dem letalen Hitzeschock eine erhöhte Lokalisation in der Aggregatfraktion. Zusätzlich wiesen diese Proteine eine Induktion durch den Präshock auf, wodurch DnaK, ClpP und McsB auch schon ohne den letalen Hitzeschock (0 min 53 °C) an den Aggregaten lokalisiert waren. Sowohl ClpX als auch Spx, der transkriptionale Regulator der oxidativen Stressantwort wurden nach dem letalen Hitzeschock, jedoch nicht nach dem Präshock vermehrt exprimiert und wiesen eine verstärkte Lokalisation an der Aggregatfraktion auf. Das Thioredoxin TrxA, welches durch Spx reguliert und unter oxidativen Stressbedingungen induziert wird, wurde, wie Spx auch, durch Hitzestress induziert.

### **3.1.1.2 *In vivo* Marker für Proteinaggregation**

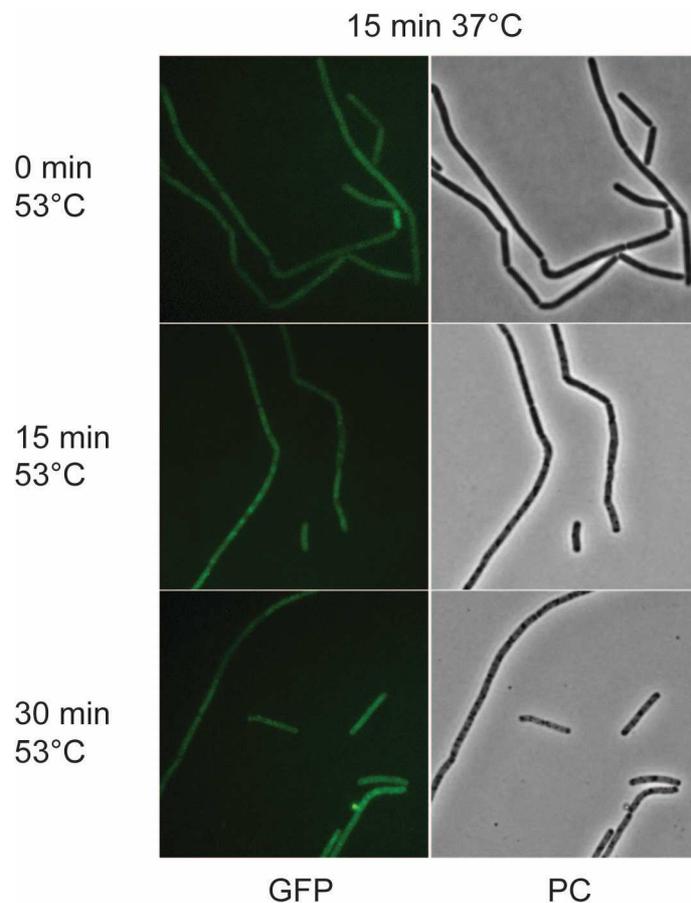
Eine weitere Methode Aggregatbildung sichtbar zu machen beinhaltet den Gebrauch von GFP, CFP oder YFP, die an ein Protein, das als Marker für Proteinaggregation dient, fusioniert werden. Als Marker wurde zum einen das kleine Hitzeschockprotein IbpA aus *E. coli* ausgewählt und zum anderen die hitzesensitive und schon unter 3.1.1.1 erwähnte MDH. Für IbpA konnte gezeigt werden, dass es in *E. coli* an aggregierte Protein und Inclusion Bodies binden kann (275, 276), wobei diese Fähigkeit schon genutzt wurde, um Aggregate mit Hilfe von IbpA-YFP zu lokalisieren (277). Da es in *B. subtilis* natürlicherweise nicht vorkommt, wurde das Gen für IbpA in den ektopischen *amy* Lokus als C-terminale GFP-Fusion kloniert und in Abhängigkeit eines Xylose-induzierbaren Promotors exprimiert. Diese Zellen wurden in Anwesenheit von Xylose den beschriebenen Thermotoleranzbedingungen ausgesetzt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 7).



**Abbildung 7: IbpA-GFP als in vivo Marker der Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** Der *B. subtilis* Stamm BNM216, der die *ibpA*-GFP Fusion ektopisch im *amy*-Lokus in Abhängigkeit eines Xylose-induzierten Promotors exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 und 30 Minuten nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (IbpA-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

Zu jeder fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme wird jeweils eine Phasenkontrastaufnahme (PC) des gleichen Bildausschnittes gezeigt. Selbst bei 37 °C lokalisierten die IbpA-GFP Fusionsproteine hauptsächlich in polaren Foci. Diese IbpA-GFP Foci konnten auch in nicht-gestressten *E. coli*-Zellen beobachtet werden, wobei sie hier als kleine unlösliche Proteinaggregate, die mit weniger sensitiven Methoden wie zum Beispiel Phasenkontrastmikroskopie nicht dargestellt werden können, gedeutet wurden (277). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass einige fluoreszente Proteinfusionen - unter anderem auch Fusionen mit GFP - die Lokalisation von markierten IbpA in *E. coli* beeinflussen und zu einer artifiziellen Foci-Entstehung führen können, die mittels Immunfluoreszenz nicht beobachtet werden kann (278). Vermutlich trifft dies auch auf *B. subtilis* Zellen, die diese Fusionsproteine exprimieren, zu. Wurden die Zellen für 15 und 30 min dem letalen Hitzeschock bei 53 °C ausgesetzt, nahmen die Foci sowohl in Größe als auch in ihrer Anzahl zu (Abbildung 7; 15 min 37 °C). GFP, welches alleine, von einem Xylose-induzierten Promotor im ektopischen *amy* Lokus als Kontrolle exprimiert wurde, bildete unter

diesen Hitzestressbedingungen keine Foci (Abbildung 8), was beweist, dass die Foci auf das an Aggregaten lokalisierte Markerprotein zurückzuführen war.

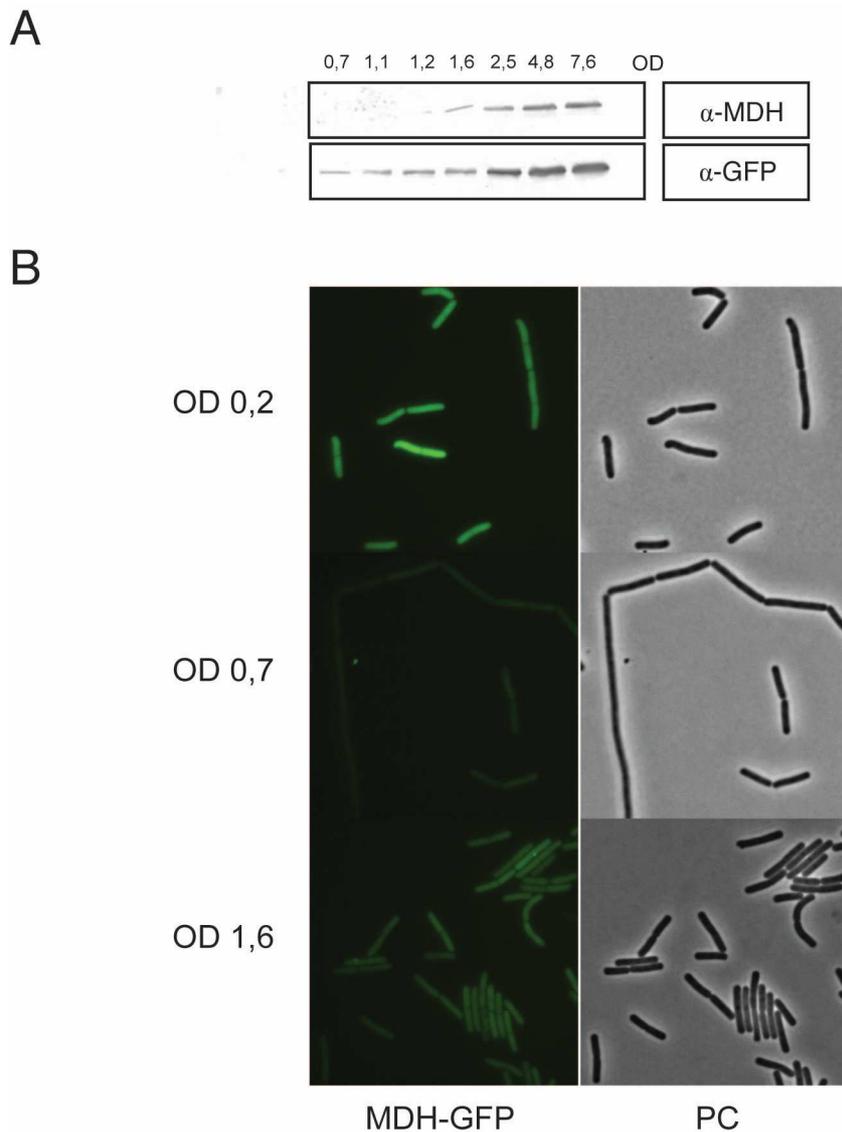


**Abbildung 8: Alleiniges, exprimiertes GFP unter Hitzestress in *B. subtilis*.** Der *B. subtilis* Stamm BSR26, der GFP ektopisch im *amy*-Lokus in Abhängigkeit eines Xylose-induzierten Promotors exprimiert, wurde bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (IbpA-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

Zusätzlich schienen diese Foci mit den dunklen Strukturen, die im Phasenkontrast nach dem letalen Hitzeschock zu beobachten sind und vermutlich Proteinaggregate oder Einschlusskörperchen darstellen (81), zu überlappen. Dies lässt vermuten, dass IbpA trotz artifizierlicher Lokalisation bei 37 °C in der Tat an Proteinaggregate, die unter Hitzestress entstehen binden und sie somit markieren kann. Behandelte man die Zellen mit einem milden Präschock bei 48 °C waren viel weniger dieser fluoreszenten Foci nach dem tödlichen Hitzeschock nachweisbar (Abbildung 7; 48 °C 15 min). Auch im Phasenkontrast zeigten sich fast keine Einschlusskörperchen. Dies lässt darauf schließen, dass in Folge des Präschocks weniger Proteine bei den letalen Temperaturen zur Aggregatbildung neigen.

Da einige Studien jedoch zeigten, dass IbpA-GFP sowohl in *E. coli*, als auch in *B. subtilis* scheinbar einen positiv Einfluss auf das Thermotoleranzverhalten nehmen kann (279) (A. Heinz, Master Thesis), wurde zusätzlich MDH als endogenes, zur Aggregation neigendes Markerprotein eingesetzt. Dazu wurde das Gen für MDH aus *B. subtilis* C-terminal an GFP fusioniert und diese Genfusion wurde mittels Campbell Intergration in das Genom unter ihren natürlichen Promotor inseriert. Da die Energiegewinnung durch den Citratzyklus in *B. subtilis* erst in der stationären Phase an Bedeutung gewinnt, ist fraglich, ob MDH, als Teil dieses Stoffwechselweges, in der logarithmischen Phase, in der bisher alle Untersuchungen zum Thema Thermotoleranz stattfanden, exprimiert wird.

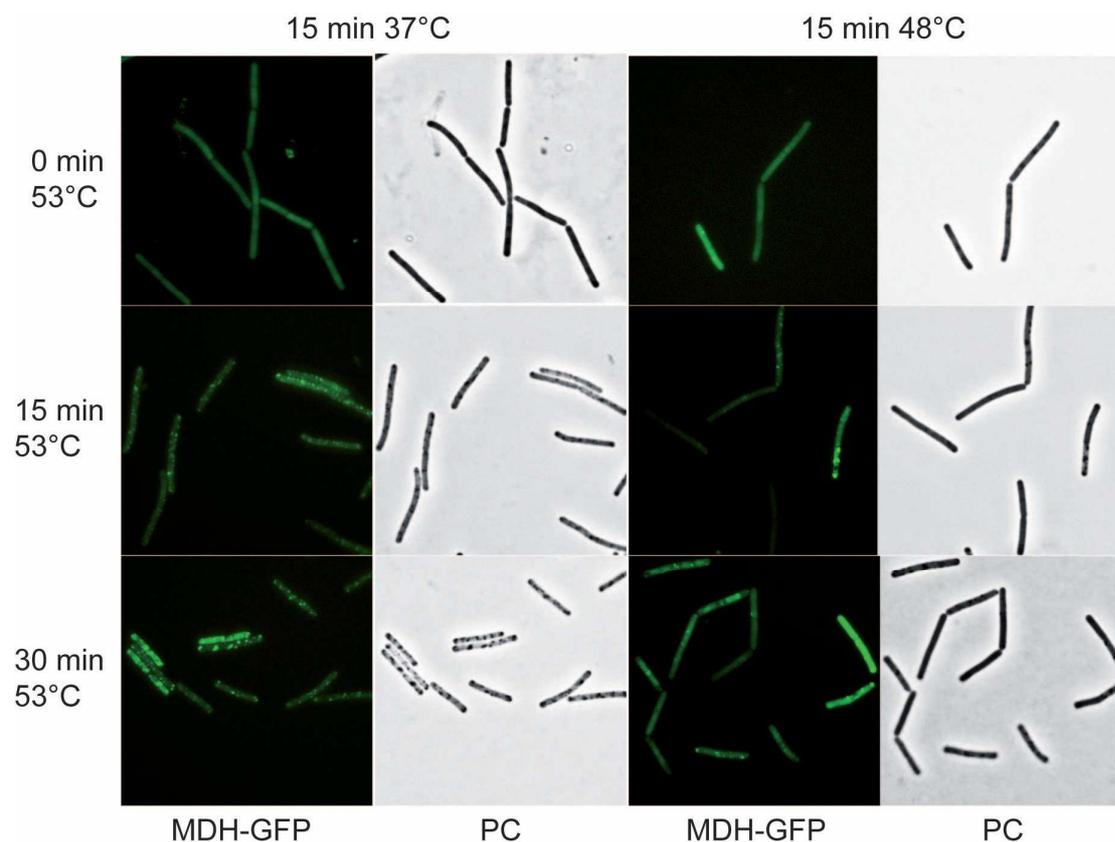
In diesem Zusammenhang wurden *B. subtilis* Zellen, die MDH-GFP exprimieren bei 37 °C wachsen gelassen und bei bestimmten OD<sub>600 nm</sub> – Werten Proben genommen. Diese wurden einerseits aufgeschlossen und 5 µg wurden zur anschließenden Western Blot Analyse zur Detektion von MDH und GFP mittels SDS PAGE aufgetrennt (Abbildung 9A). Andererseits wurden Zellen der frühlogarithmischen Phase (OD 0,2), der mittleren logarithmischen Phase (OD 0,7) und am Anfang der stationären Phase (OD 1,8) fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 9B).



**Abbildung 9: Expression von MDH in *B. subtilis*.** A) Der *B. subtilis* Stamm BNM224, der MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde bei 37 °C in 10 ml LB aufgezogen, wobei nach den angezeigten OD<sub>600nm</sub>-Werten Proben genommen wurde. Diese wurden aufgeschlossen (siehe Methode schneller Zellaufschluss) und jeweils 5 µg des Gesamtproteinextrakts wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen MDH und GFP mittels Western Blot Analyse untersucht. B) Der *B. subtilis* Stamm BNM224, der MDH-GFP exprimiert, wurde bei 37 °C aufgezogen und nach den angezeigten OD<sub>600nm</sub>-Werten im Phasenkontrast (PC) und fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung des GFP-Filters (MDH-GFP) untersucht. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

Sowohl aus der Western Blot Analyse, als auch aus den Mikroskopaufnahmen wurde ersichtlich, dass MDH-GFP eher in der stationären Phase exprimiert wird. Da der Antikörper gegen GFP sensitiver als der gegen MDH ist, erschien hier schon ein schwaches Signal bei einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,7. Ein stärkeres Signal war jedoch erst wieder ab OD<sub>600 nm</sub> von 1,6 zu beobachten. In der sehr frühen logarithmischen Phase war es unmöglich aufgrund der geringen Anzahl von Zellen eine ausreichende Menge an Proteinen zu präparieren. Daher kann in dieser Phase keine Aussage über das Expressionslevel von MDH-GFP anhand der

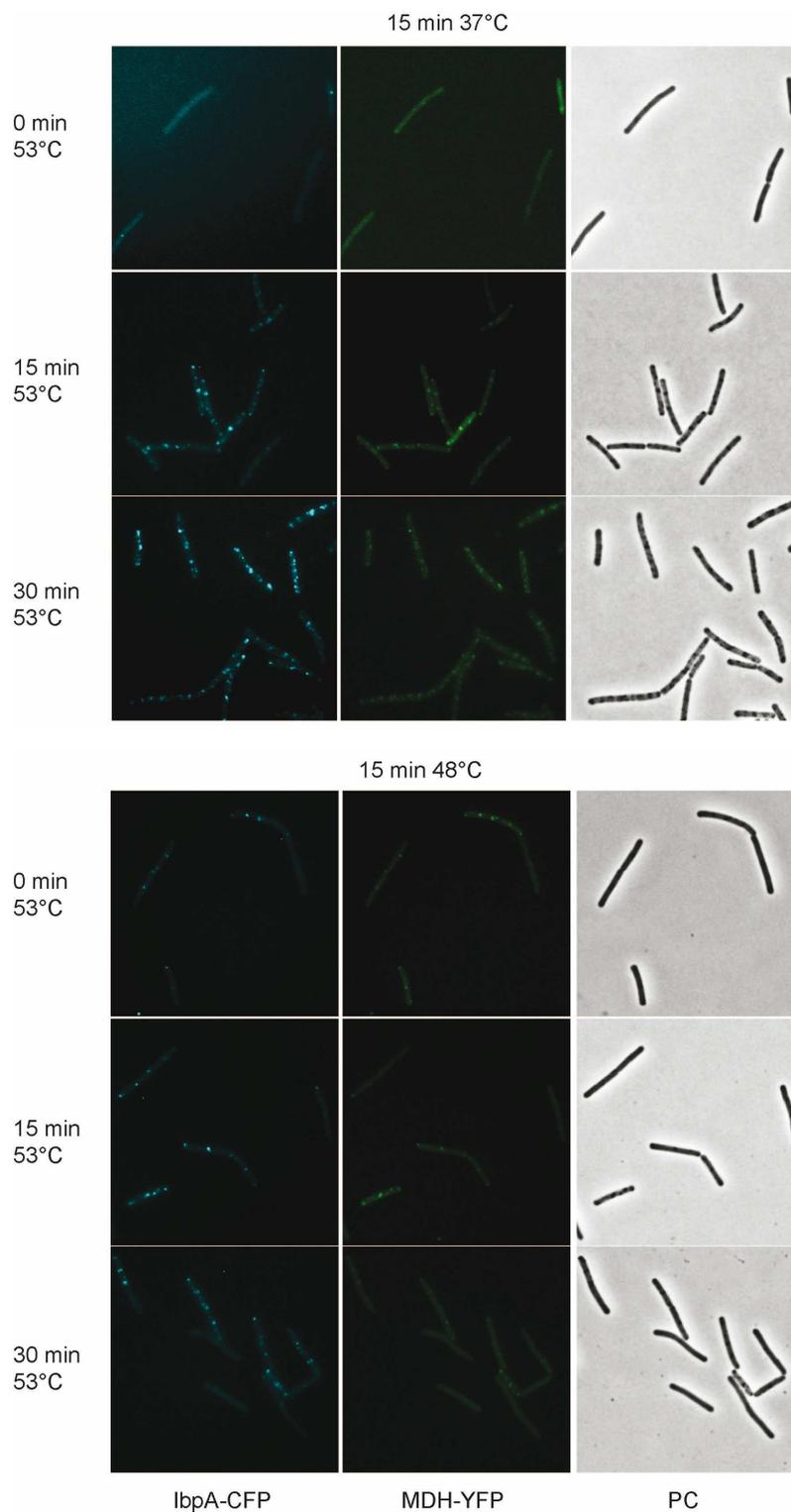
Western Blot Analyse getroffen werden. Anhand der Mikroskopiedaten wird jedoch ersichtlich, dass die Zellen in dieser frühen Wachstumsphase (OD 0,2) noch eine erhöhte GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Diese nahm jedoch zur mittleren logarithmischen Phase ab (OD 0,7), was auf eine erniedrigte MDH-GFP Expression hinweist und verstärkte sich erst in der stationären Phase wieder. Dies steht im Einklang mit den Western Blot Daten. Die erhöhte Fluoreszenz in der frühen Wachstumsphase kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen, die aus einer stationären Übernachtskultur für dieses Experiment in frischem Vollmedium angeimpft wurden, noch nicht genug Teilungen durchlaufen haben, um aus der Stationärphase angesammeltes MDH wieder loszuwerden. Folgende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von MDH-GFP unter Thermotoleranzbedingungen wurden daher in der frühlogarithmischen Phase durchgeführt (Abbildung 10).



**Abbildung 10: MDH-GFP als in vivo Marker der Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** Der *B. subtilis* Stamm BNM224, der MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

Bei 37 °C wiesen die *B. subtilis* Zellen, die MDH-GFP exprimieren, ein im Cytosol homogen verteiltes Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 10). Wurden die Zellen hingegen einem fünfzehn- und dreißigminütigem Hitzeschock ausgesetzt, erschien eine große Anzahl an fluoreszierenden Foci (Abbildung 10; 37 °C, 15 min). Da diese MDH-GFP enthaltenden Foci mit den Proteinaggregaten, die im Phasenkontrast sichtbar wurden, übereinstimmten, kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen hohen Temperaturen MDH anfängt zusammen mit anderen thermolabilen Proteinen zu entfalten und Aggregate zu bilden, die, da es an GFP fusioniert ist, als fluoreszierende Foci sichtbar werden. Wurden diese Zellen bei 48 °C vorinkubiert, erschienen nach dem letalen 53 °C Schock sehr viel weniger fluoreszente Foci (Abbildung 10; 48 °C 15 min). Daraus kann geschlossen werden, dass der Präshock bei 48 °C MDH vor der Entfaltung und Aggregation bei letalen Temperaturen schützt.

Um die beiden *in vivo* Marker für Aggregatbildung direkt miteinander vergleichen zu können, wurde ein *B. subtilis* Stamm kreiert, der zusätzlich zu der, unter dem eigenen Promotor produzierenden MDH-YFP Fusion eine IbpA-CFP Fusion von dem Xylose-abhängigen Promotor im *amy* Locus exprimiert. Somit ist es möglich beide Markerproteine gleichzeitig unter den Thermotoleranzbedingungen fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Entstehung und Lokalisation von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen unter Verwendung von IbpA-CFP und MDH-YFP als Reporterproteine in *B. subtilis*.** Der *B. subtilis* Stamm BSR5 mit einer *ibpA*-CFP und *mdh*-YFP Fusion wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 und 30 Minuten nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des CFP-Filters (IbpA-CFP) und YFP-Filters (MDH-YFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

Für die MDH-YFP Fusion konnte kein Unterschied in dem Erscheinen der Foci nach dem letalen Hitzeschock, sowohl ohne (15 min 37 °C) als auch mit fünfzehnminütiger Inkubation bei 48 °C (15 min 48 °C) zu der MDH-GFP Fusion (Abbildung 10) beobachtet werden (Abbildung 11).

Bei der Betrachtung der Aufnahmen der IbpA-CFP Fusion fiel auf, dass die Fluoreszenz vor der Hitzestressbehandlung (0 min 53°C, 15 min 37 °C) eher eine homogene Verteilung aufwies, während unter diesen Bedingungen die IbpA-GFP Fusionsproteine hauptsächlich in polare Foci lokalisiert waren (Abbildung 7).

Dies lässt den Schluss zu, dass vermutlich Fusionen mit CFP im Gegensatz zu denen mit GFP die Lokalisation von markierten IbpA weniger beeinflussten und somit zu einer weniger stark ausgeprägten artifiziellen Foci-Entstehung führten.

Viel bedeutender ist hingegen, dass das Erscheinen und die Lokalisation der IbpA-CFP Foci eine starke Überschneidung sowohl mit den MDH-YFP Foci, als auch mit den dunkleren Strukturen im Phasenkontrast aufwies. Dies lässt abermals stark vermuten, dass diese, unter bestimmten Hitzebedingungen entstehenden Foci, die aus MDH oder IbpA, welche kovalent an ein fluoreszierendes Protein fusioniert wurden bestehen, fehlgefaltete und aggregierte Proteine *in vivo* markieren können. Dabei wird MDH unter dem letalen Hitzestress selbst entfaltet und lokalisiert mit den in der Zelle entstehenden Aggregaten, wobei die Gabe des Präschocks die Hitzesensitivität der MDH heruntersetzt. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse, mit der die Lokalisation von MDH *in vitro* gezeigt werden konnte (Abbildung 6).

Zusammenfassend erwiesen sich diese zwei Methoden sehr geeignet, um die Aggregatbildung in *B. subtilis* zu studieren. Es konnte dargelegt werden, dass der Präschock (15 min 48 °C) nicht nur das Überleben der *B. subtilis* Zellen unter normalerweise letalen Temperaturen sicherte (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis), sondern auch, dass diese Zellen deutlich weniger Aggregate gegenüber Zellen, die diesem Präschock nicht ausgesetzt wurden, bildeten.

### **3.1.2 Einfluss einer Erholungsphase nach dem letalen Hitzeschock in Bezug auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen**

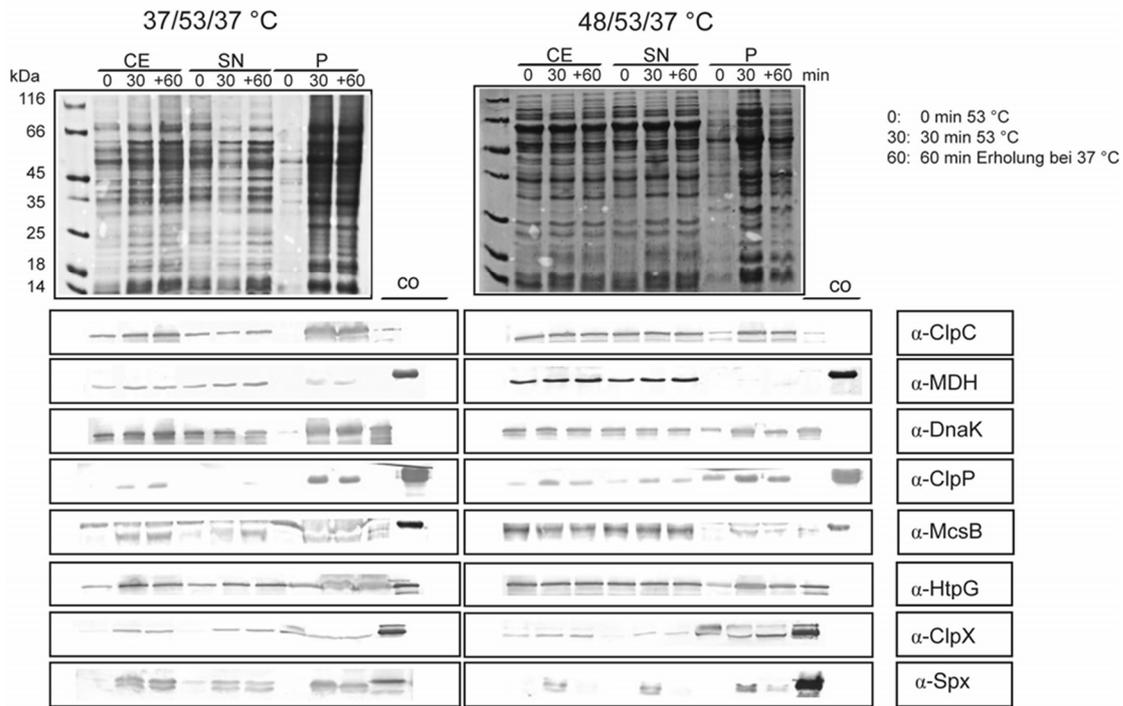
Werden *B. subtilis* Zellen einem letalen Hitzeschock ausgesetzt, kann eine massive Aggregatzunahme beobachtet werden. In diesem Zusammenhang stellte sich jedoch die Frage, inwiefern sich eine erneute Erholungsphase nach dem Hitzeschock auf die

vorhandenen Proteinaggregate auswirkt und, ob ein zuvor gesetzter Präschock Einfluss darauf nehmen kann. In diesem Sinne wurden *B. subtilis* Wildtyp Zellen als auch Zellen, welche die MDH-GFP Fusion exprimieren nach einem dreißigminütigem Hitzeschock bei 53 °C einer einstündigen Erholungsphase bei 37 °C ausgesetzt. Die eine Hälfte wurde vor dem letalen Hitzeschock für 15 min bei 48 °C inkubiert. Anschließend wurden Aggregate aus den Wildtyp Zellen präpariert und mittels SDS PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 12A), während die Zellen, die das genannte Fusionsprotein herstellen, fluorezenzmikroskopisch untersucht wurden (Abbildung 12C). Bei Betrachtung der SDS PAGE und der fluorezenzmikroskopischen Aufnahmen fiel auf, dass die Aggregatmenge der Zellen, die einem Präschock ausgesetzt waren, nach der Erholungsphase deutlich abnahm, während sie ohne Präschock gleich blieb. Dies lässt vermuten, dass die Entfernung der Aggregate auf Disaggregation beruht, deren Aktivität durch den Präschock ausgelöst wird. Die Menge und Lokalisation der, mittels Western Blot getesteten Chaperonen und Proteasen änderte sich nach der Erholungsphase nicht (Abbildung 12A). Nur Spx wies in den Zellen, die vor dem letalen Hitzeschock dem Präschock ausgesetzt waren, nach der Erholungsphase eine Abnahme auf. Dies ist möglicherweise auf eine, durch den Präschock und anschließende Inkubation bei 53 °C ausgelöste Induktion von YjbH, dem Adapterprotein von Spx zurückzuführen, welches eine schnellere Degradation des oxidativen Stressregulators durch ClpXP ermöglicht. Mittels durchgeführter Microarrays konnte gezeigt werden, dass das mRNA Level von *yjbH* bei 53 °C in der mit dem Präschock behandelten Zellen erhöht gegenüber den Zellen war, die eine Temperaturerhöhung von 37 °C auf 53 °C erfuhren (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis).

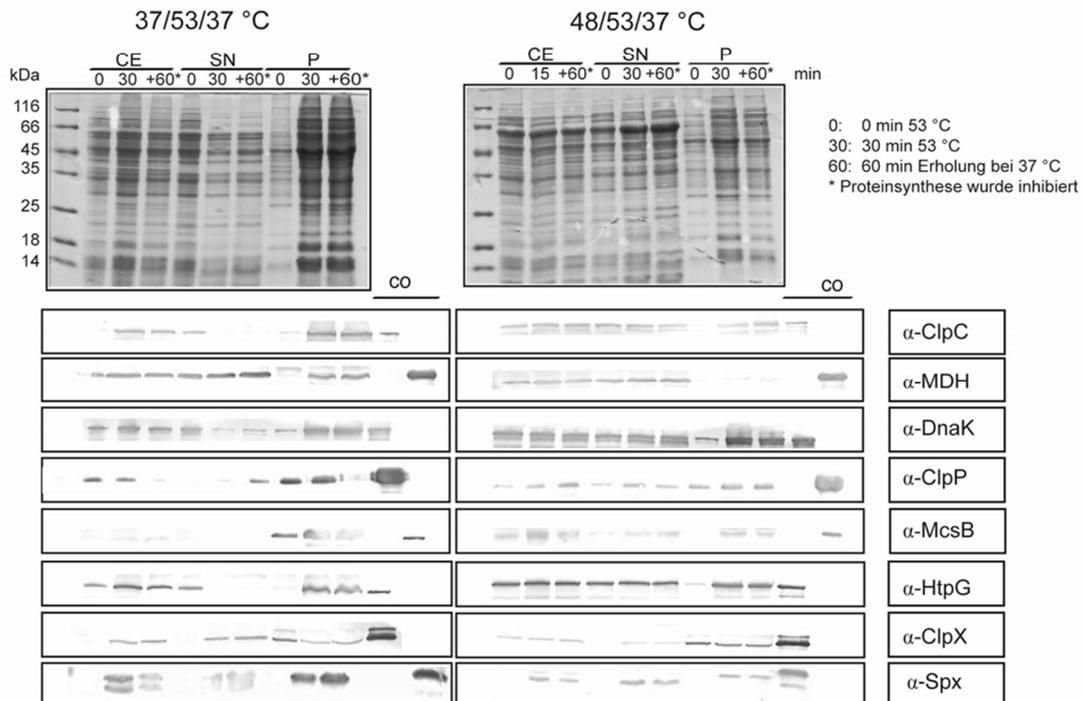
Anschließend wurde das Experiment erneut durchgeführt, wobei jedoch die Proteinherstellung vor der Erholungsphase durch die Zugabe von Spectinomycin inhibiert wurde (Abbildung 12B, C untere Reihe). Da dies jedoch keinen Einfluss auf die Beseitigung der Aggregate in den mit Präschock behandelten Zellen hatte und auch die Menge und Lokalisation der mittels Western Blot Analyse getesteten Komponenten sich nach der Erholungsphase unverändert zeigte, spielt bei diesem Prozess Neusynthese während der Erholungsphase vermutlich keine Rolle. Dies deutet daraufhin, dass schon während des Präschocks alle Proteine die für die Aggregatauflösung benötigt werden, synthetisiert werden. Der einzige Unterschied bei Betrachtung der Western Blot Daten manifestiert sich in dem Spx-Level, das nun in den mit dem Präschock behandelten Zellen vor und nach Erholungsphase konstant blieb und keine Abnahme mehr aufwies. Dies ist vermutlich dadurch erklärbar, dass die Expression von YjbH nun durch die Gabe von Spectinomycin

unterdrückt wurde, wodurch keine schnellere Degradation von Spx durch den ClpXP Proteasekomplex mehr stattfinden konnte.

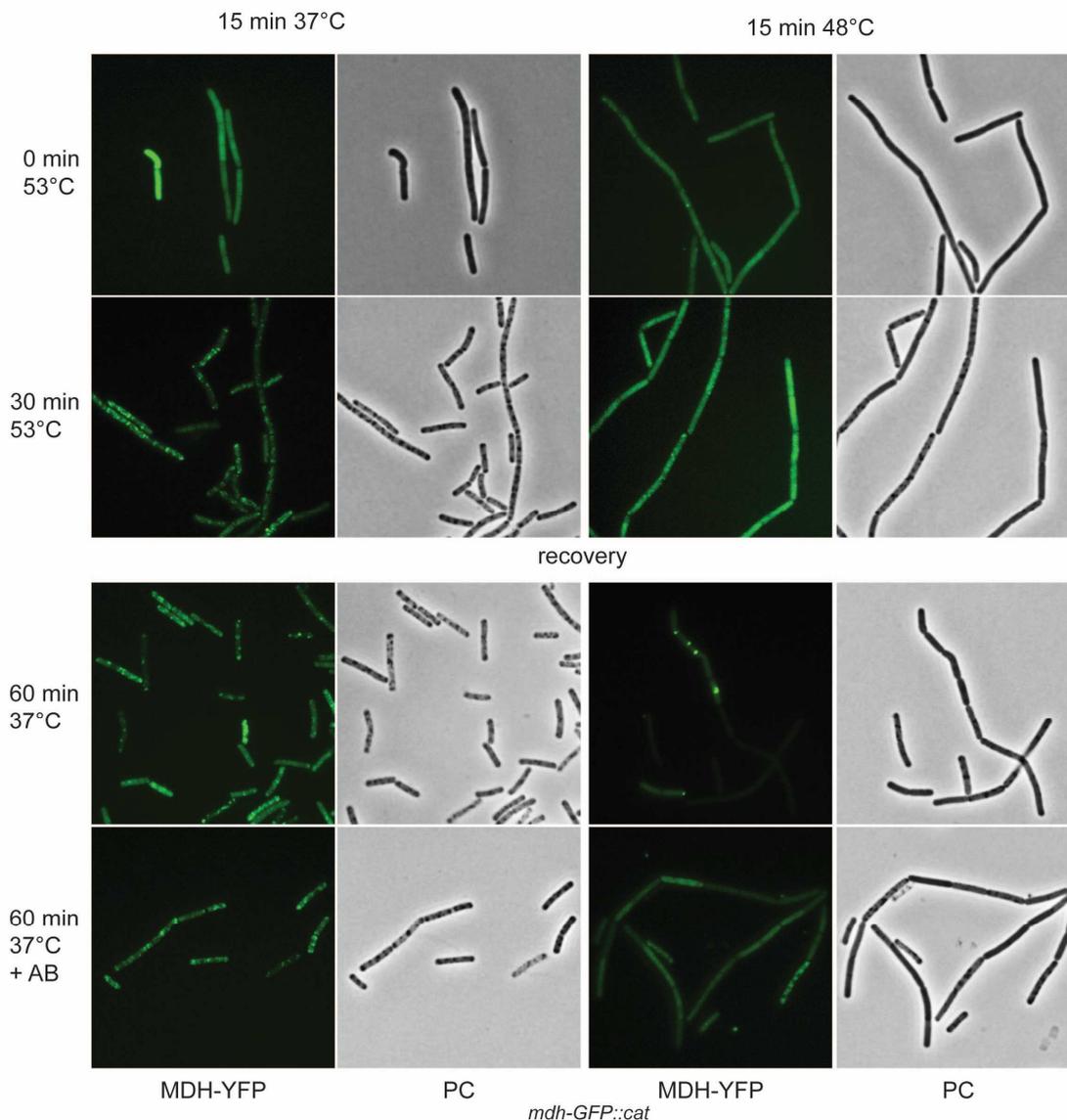
A



B



C



**Abbildung 12: Der Einfluss des 48 °C Präschocks auf das zelluläre Aggregatlevel nach einem letalen Hitzeschock und nach einer sechzigminütigen Erholungsphase in *B. subtilis*.** A) Der *B. subtilis* Wildtyp Stamm, der einerseits mit einem fünfzehnminütigem 48 °C Präschock angezogen wurde und andererseits nicht, wurde anschließend entsprechend den beschriebenen Thermotoleranzbedingungen für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von diesen Proben hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. B) Siehe A), jedoch wurde die Proteinsynthese nach dem letalen Hitzeschock durch die Gabe von 500 µM Spectinomycin inhibiert. C) Der *B. subtilis* Stamm mit der *mdh*-GFP Fusion (BNM224) wurde entsprechend den beschriebenen Thermotoleranzbedingungen für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei die Proteinsynthese einerseits durch die Zugabe von 500 µM Spectinomycin inhibiert wurde (durch +AB gekennzeichnet) und andererseits nicht. Proben wurden im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

### **3.1.3 Der Einfluss von Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen**

Da Deletionen von *clpC*, *dnaK*, *hrcA*, *clpX* und *clpP*, also Gene deren Proteinprodukte Bestandteile des Proteinqualitätskontrollnetzwerks darstellen und damit eine Rolle bei der Verhinderung und Auflösung von Aggregaten spielen könnten, einen Einfluss auf das Überleben im Rahmen des Thermotoleranzexperiments gezeigt haben, wurde in diesen Stämmen die Proteinaggregation unter den gleichen Bedingungen untersucht. Zusätzlich wurde die Bildung von Aggregaten während der Thermotoleranz auch in der *mcsB* Mutante getestet, da für dieses Adapterprotein gezeigt werden konnte, dass es zusammen mit dem Proteasekomplexen ClpCP oder ClpEP einerseits eine Rolle bei der Hitzeschockregulation spielt (159, 160) und andererseits bedeutend für die Auflösung des Kompetenzapparates, einer großen molekularen Maschine ist (92). In diesem Zusammenhang wurden diese Deletionsstämme Thermotoleranzbedingungen ausgesetzt und anschließend von diesen Proben Aggregate präpariert, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Rahmen der Western Blot Analyse auf die Lokalisation und Expression ausgesuchter Proteine, die im Verdacht stehen unter Hitzestress von Bedeutung zu sein, untersucht. Zusätzlich wurde in diesen Mutanten die Aggregation unter Thermotoleranzbedingungen über zusätzlich eingebrachte MDH-GFP- oder IbpA-GFP Fusionen unter Nutzung des Fluoreszenzmikroskops studiert.

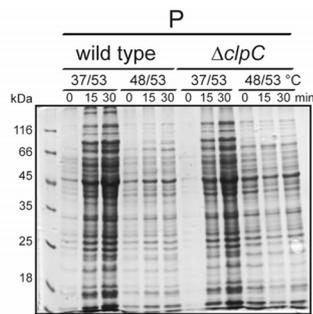
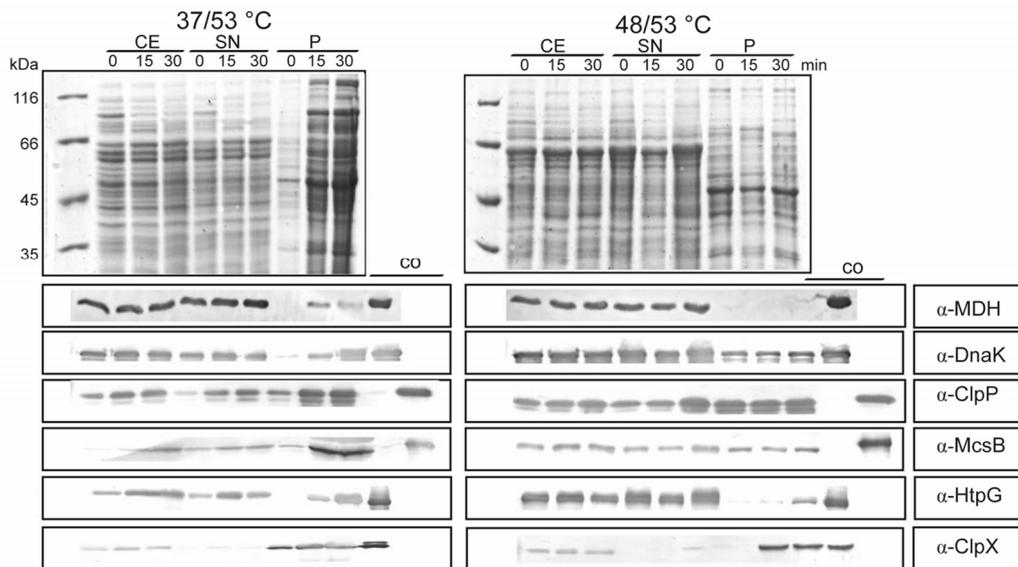
#### **3.1.3.1 Die Bedeutung der AAA-ATPase ClpC und des Chaperons DnaK für Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen**

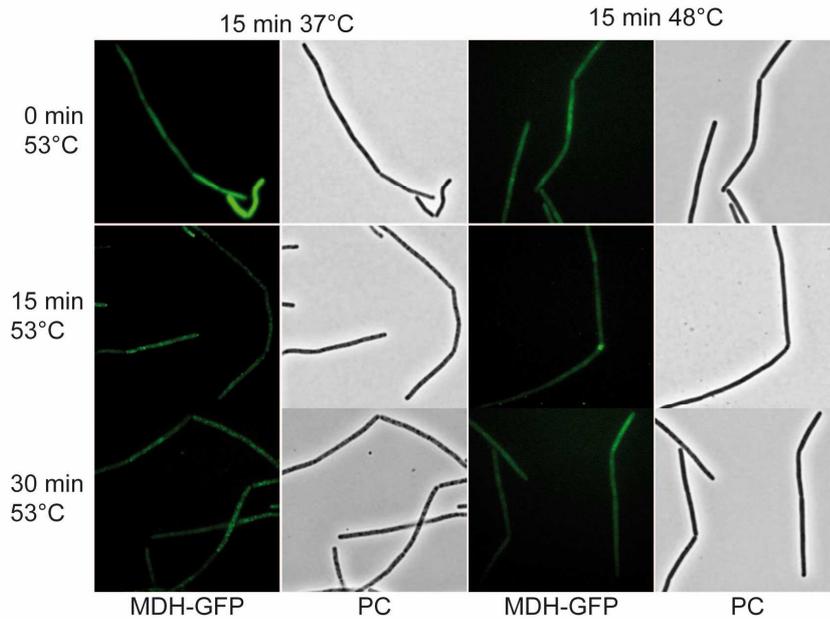
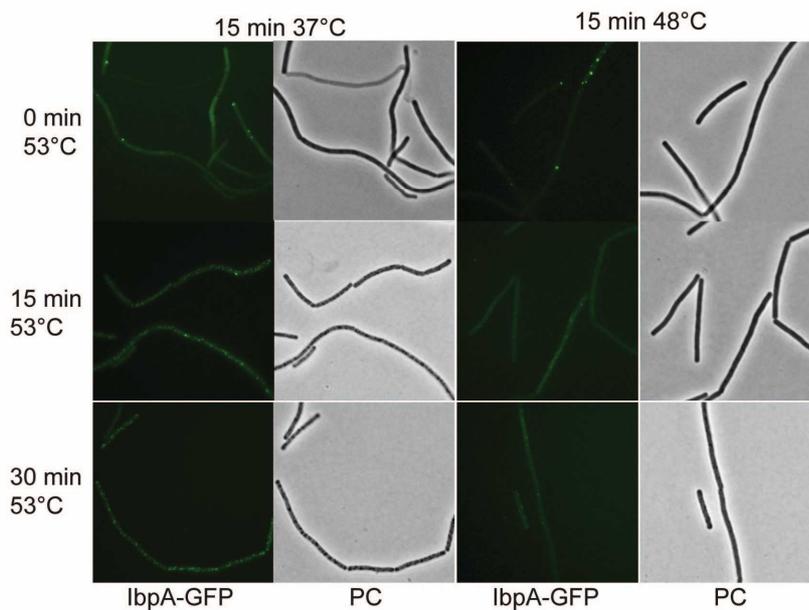
Die AAA ATPase ClpC wirkt im Komplex mit der Protease ClpP an der Degradation von fehlgefalteten, aggregierten Proteinen, die unter Stressbedingungen entstehen können, mit (77, 79, 83) und ist zudem an der Regulation der Hitzeschockantwort über regulatorische Proteolyse beteiligt (160). Jedoch konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden, welche Rolle ihr bei der Ausbildung der Thermotoleranz in Bezug auf Proteinaggregation zuteil wird. Eine Deletion von *clpC* wirkte sich im Vergleich zum *B. subtilis* Wildtyp Stamm negativ auf das Überleben bei 53°C der Zellen aus, die einem fünfzehnminütigen Präschock ausgesetzt wurden. Ohne den Präschock wies die Mutante eine gegenüber dem Wildtyp Stamm erhöhte Überlebensrate auf (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis). Betrachtet man die Menge der unter Thermotoleranzbedingungen präparierten Aggregate in der *clpC* Mutante, fielen jedoch keine größeren Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp

Stamm auf (Abbildung 13A). Dies bestätigte sich auch in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Mutante, in der die Entstehung von Aggregaten mittels an MDH oder IbpA fusioniertem GFP sichtbar gemacht werden konnte (Abbildung 13C, 13D). Es kann jedoch angemerkt werden, dass die *clpC* Mutante sich in ihrer Zellmorphologie vom Wildtyp stark unterschied. Die Anordnung der Zellen in langen Ketten kann vermutlich auf eine unvollständige Zellteilung zurückgeführt werden, die einer, durch fehlendes ClpC verursachten, gestörten Autolysin-Synthese zugrunde lag (95).

Somit scheinen die Effekte auf Thermotoleranz und Hitzeresistenz, die im Hinblick auf das Überleben beobachtet werden konnten (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis), nicht direkt bei der Proteinaggregation eine Rolle zu spielen.

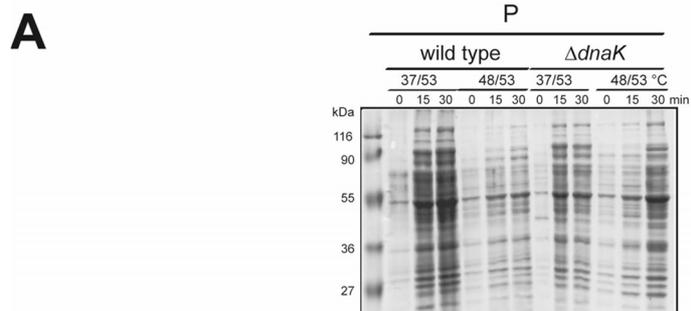
Die Western Blot Analyse ergab, dass die Lokalisation und das Expressionsmuster von MDH, DnaK, HtpG, und ClpX durch die verhinderte Expression von ClpC im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A) nicht beeinflusst wurden (Abbildung 13B). Jedoch wurden McsB und ClpP Proteine im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A) schon vor dem Hitzeschock und Präshock produziert und in den Zellen, die nicht dem Präshock ausgesetzt waren, in einer größeren Menge. Dies könnte in Abwesenheit von ClpC darauf zurückzuführen sein, dass McsB in ungestressten Zellen nicht mehr inhibiert wird. Aktives McsB kann als Adaptor fungieren und inhibiert die CtsR-DNA-Interaktion, indem es CtsR bindet, wobei dies zu einer erhöhten Expression von ClpP, ClpE und McsB führt (162).

**A****B**

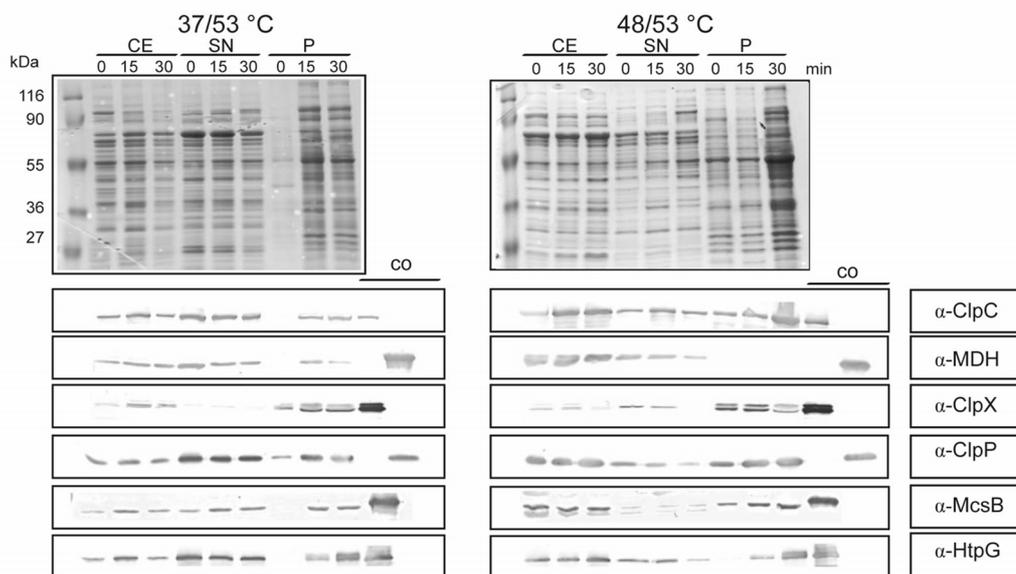
**C****D**

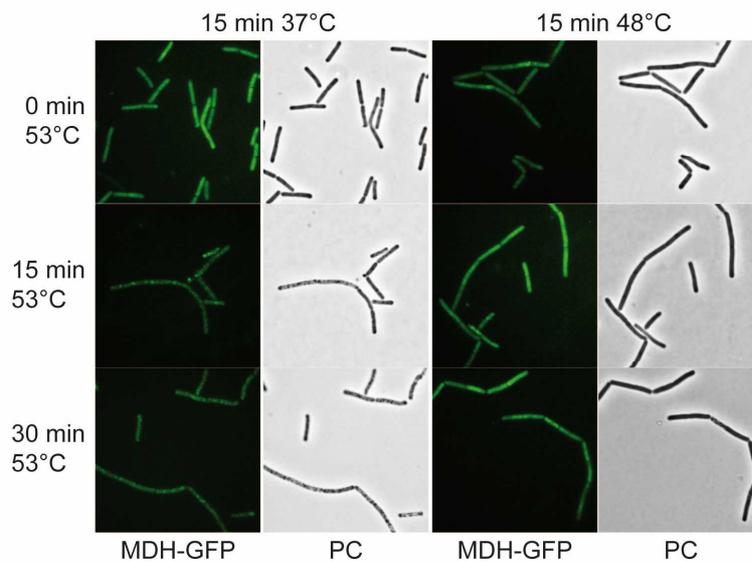
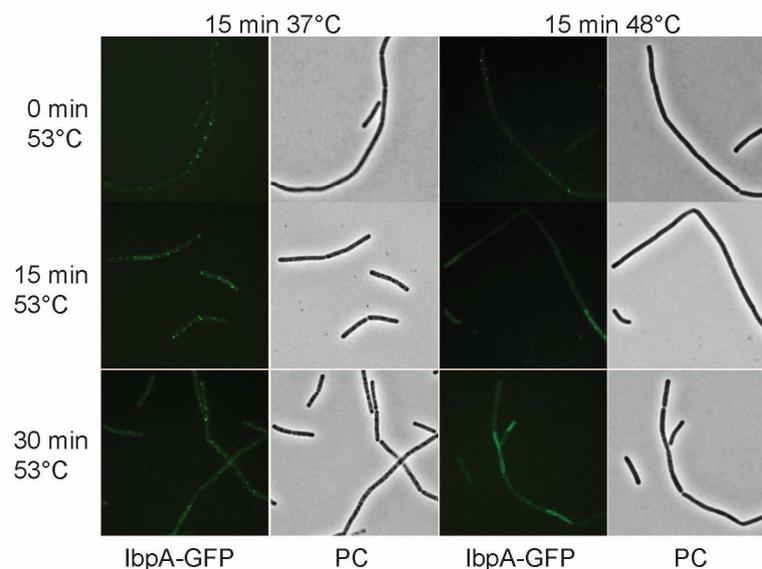
**Abbildung 13: Der Einfluss der *clpC* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis clpC* Mutante BNM105, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis clpC* Mutante BNM105, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis clpC* Mutante BNM234, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt. D) Siehe C), jedoch wurde anstatt des Stammes BNM234, die *B. subtilis clpC* Mutante BEM4, welche lbpA als Fusion mit GFP ektopisch exprimiert, verwendet.

Während für ClpC gezeigt werden konnte, dass es zusammen mit ClpP unter anderem an der Auflösung von Aggregaten beteiligt ist (77, 79, 83), verhindert DnaK die Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen und stellt somit eine zentrale Komponente des Chaperonsystems dar (35). Hier wurde daher der Einfluss von DnaK auf das Aggregationverhalten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis* getestet. Abbildung 9A zeigt, dass die Zellen der *dnaK* Mutante, die dem Präschock ausgesetzt waren, nach 30 min bei 53 °C etwas mehr Aggregate als der Wildtyp, der den gleichen Bedingungen ausgesetzt war, angesammelt hatten. Dies stimmte mit der unter diesen Bedingungen beobachteten, etwas geringeren Überlebensrate der Mutante überein (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis) und konnte auch durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der *dnaK* Mutante, die zusätzlich für das MDH- oder IbpA-GFP Fusionsprotein kodiert, bestätigt werden (Abbildung 14C, 14D). Wurden die DnaK-defizienten Zellen keinem Präschock ausgesetzt, konnten etwas weniger Aggregate als im Wildtyp Stamm präpariert werden (Abb 9A). Jedoch deuteten weder die Überlebenskurven auf eine höhere Überlebensrate dieser Mutante gegenüber zum Wildtyp hin (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis), noch zeigten sich im Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zum Wildtyp weniger, durch die GFP Fusionen markierten Aggregate nach dem letalen Hitzeschock (Abb 14C, 14D). Somit ist dieser Effekt vermutlich auf einen Auftrags- oder Präparationsfehler zurückzuführen.



**B**

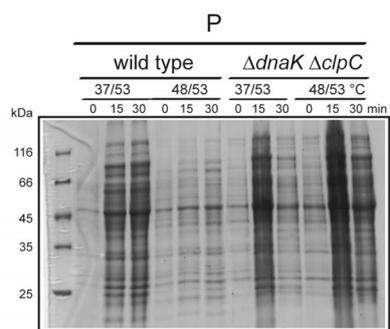
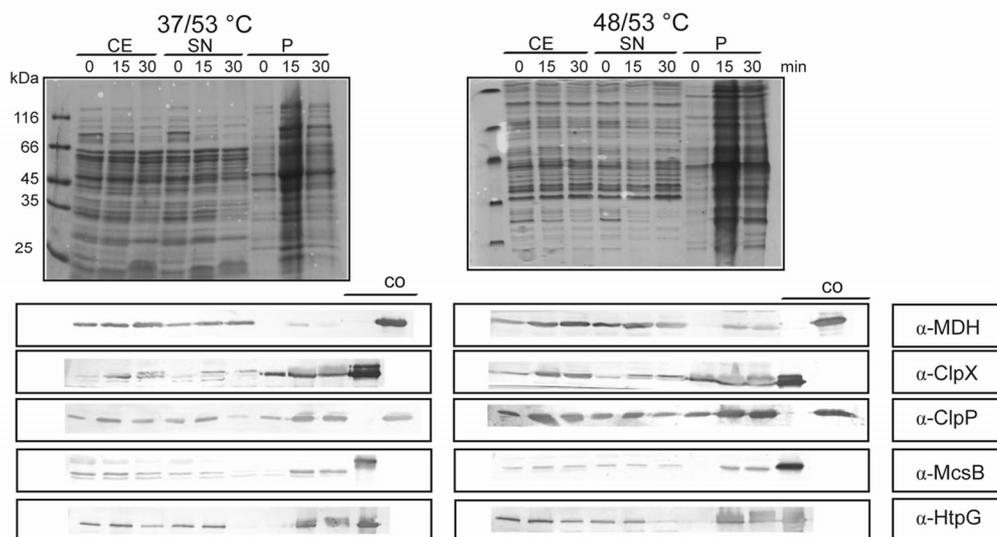


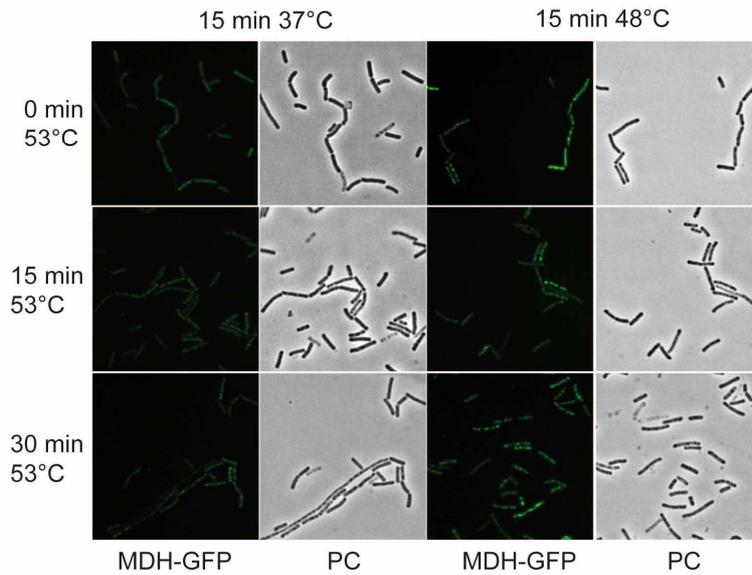
**C****D**

**Abbildung 14: Der Einfluss der *dnaK* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis dnaK* Mutante BNM118, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis dnaK* Mutante BNM118, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis dnaK* Mutante BSR13, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt. D) Siehe C), jedoch wurde anstatt des Stammes BSR13, die *B. subtilis dnaK* Mutante BEM8, welche IbpA als Fusion mit GFP ektopisch exprimiert, verwendet.

Da jedoch sowohl die Deletion von *clpC* als auch die von *dnaK* nur einen geringen Einfluss auf die Aggregatentstehung unter Hitzeschockbedingungen zeigten, wurde eine Doppelmutante geschaffen, die weder ClpC noch DnaK exprimiert. Diese wurde bezüglich ihres Aggregatverhaltens unter Thermotoleranzbedingungen untersucht. Aus Abbildung 15A, in der die präparierten Aggregate der Doppelmutante mittels SDS PAGE aufgetrennt wurden, wird ersichtlich, dass der letale Hitzeschock bei 53 °C in der Doppelmutante nach 15 Minuten zu einer massiven Ansammlung der Proteine in der unlöslichen Fraktion resultierte. Insbesondere führte die gleichzeitige Deletion von ClpC und DnaK dazu, dass sich der positive Einfluss des Präschocks auf das Aggregationsverhalten nach dem 53°C Hitzeschock verlor. Dies konnte durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eines Stammes, der sowohl *clpC* und *dnaK* deletiert hat, als auch das Fusionsprotein MDH-GFP exprimiert, bestätigt werden. Nach 15 min bei 48 C und weiteren 15 min bei 53 °C wiesen fast alle mikroskopierten Zellen MDH-GFP enthaltende Aggregate auf, die auch im Phasenkontrast erschienen (Abbildung 15 C). Bei erneuter Betrachtung der SDS PAGE in Abbildung 15A, fällt auf, dass die Doppelmutante nach 30 min bei 53 °C eine vom Präschock unabhängige Abnahme in der Aggregatmenge zu verzeichnen hatte, wobei dies nicht durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt werden konnte (Abbildung 15C). Nach 15 min bei 53 °C wiesen die Zellen der Doppelmutante eher eine stärkere Proteinaggregation auf, als nach 30 min.

Zusätzlich fiel jedoch auf, dass die Zellen nach 30 min bei 53°C im Phasenkontrast deutlich kontrastärmer werden. Dies ist möglicherweise auf eine durch den Tod der Bakterien bedingte Auflösung der Zellwand zurückzuführen. In diesem Fall wäre es möglich, dass die Methode der Aggregatpräparation zu fehlerhaften Ergebnissen geführt hat, da die toten Zellen im ersten Schritt ausgewaschen wurden und somit deren Aggregate nicht mehr erfasst werden konnten. Die Western Blot Analyse (Abbildung 15B) zeigte, dass der Präschock nun nicht mehr hilft, die Aggregation des Markerproteins MDH nach dem letalen Hitzeschock zu verhindern, da es sich deutlich nach 15 und 30 min bei 53 °C in der Aggregatfraktion befindet. Die Protease ClpP und das Adapterprotein wiesen wiederum eine frühere Expression bei 37 °C im Vergleich zum Wildtyp auf. Ansonsten wich das Expressions- und Lokalisationsmuster der einzelnen Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems in dieser Doppelmutante nicht gravierend vom Wildtyp (Abbildung 6A) ab.

**A****B**

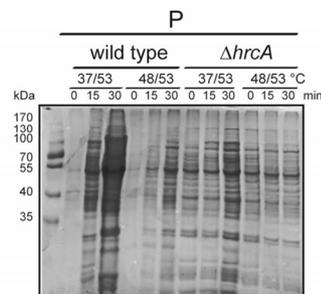
**C**

**Abbildung 15: Die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in der *dnaK clpC* Doppelmutante in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis dnaK clpC* Doppelmutante BSR117, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis dnaK clpC* Doppelmutante BSR117, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis dnaK clpC* Doppelmutante BSR20, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

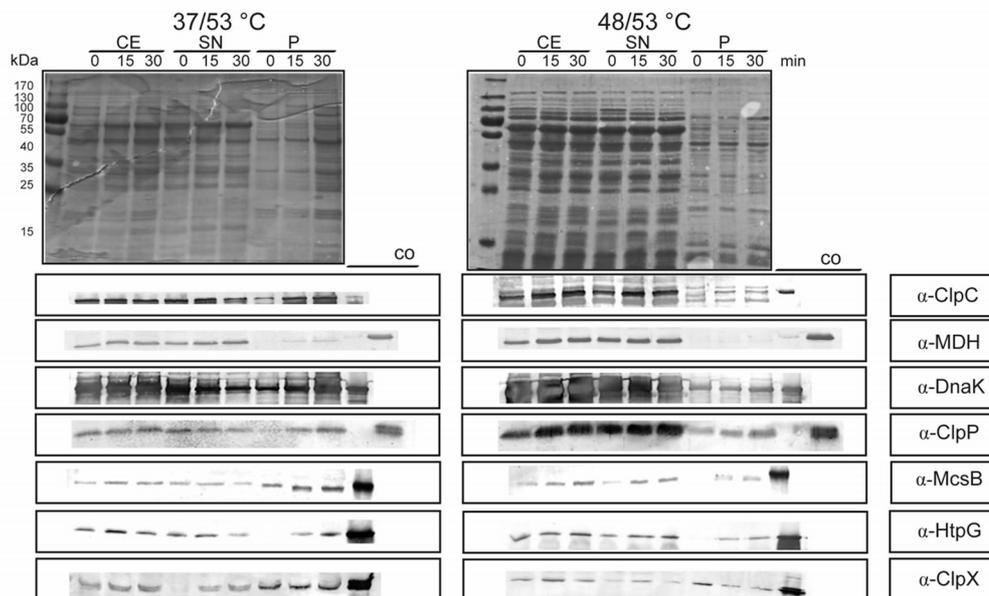
Da die Gene des *dnaK* Operons in einem Stamm, dem HrcA, der Repressor der Klasse I Hitzeschockgene, fehlt, auch ohne Hitzeschock auf einem hohen Level exprimiert werden (56, 154), wurde auch diese Mutante auf die Fähigkeit Einfluss auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen zu nehmen, getestet. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass die Deletion von *hrcA* eine leichte intrinsische Thermotoleranz entwickelte, wobei sie gegenüber dem Wildtyp eine höhere Überlebensrate bei 53 °C aufwies, wenn sie nicht zuvor bei 48 °C inkubiert wurde (135) (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis). Des Weiteren zeigt Abbildung 16, dass HrcA-defiziente Zellen nach einem Hitzeschock bei 53 °C deutlich weniger Aggregate als die Wildtyp Zellen entwickelten. Auch das Markerprotein MDH aggregierte nach der Inkubation bei 53 °C im Vergleich zum Wildtyp sehr viel weniger stark (Abbildung 16B). Zudem zeigte die Western Blot Analyse in der Tat eine deutliche Überexpression von DnaK (Abbildung 16B) im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A), wobei das Expressionsmuster von weiteren getesteten Proteinen des Proteinqualitätssystems nicht beeinflusst wurde. Interessanterweise erschien im Gesamtzellextrakt der Zellen, die dem Präschock ausgesetzt wurden, eine hervorstechende Proteinbande bei 60 kDa, die vermutlich GroEL repräsentiert. Auch in anderen Mutanten und im Wildtyp ist diese Bande nach einem Präschock auszumachen (zum Beispiel Abbildung 6). Trotzdem steigerte die in der *hrcA* Mutante schon ohne Stress erhöhte Expression des *dnaK* und *groE* Operons die Hitzeresistenz nicht so stark wie die Inkubation bei 48 °C. Infolgedessen sank die Aggregatmenge und ferner auch die MDH Aggregation in dieser Mutante nach dem Hitzeschock nicht auf das Level des Wildtyps, der zusätzlich dem 48°C Präschock ausgesetzt wurde, ab.

Die Gabe eines Präschocks bei 48 °C brachte in der Mutante keinen großartigen Unterschied in der Aggregatbildung gegenüber dem Wildtyp hervor. Das bedeutet, dass die Überexpression des *dnaK* Operons zusätzlich zum Präschock keine weiteren Auswirkungen auf die Verhinderung der Proteinaggregation hatte und somit eine Inkubation bei 48 °C völlig ausreichend war.

**A**



**B**



**Abbildung 16: Der Einfluss der *hrcA* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis hrcA* Mutante BAH42, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis hrcA* Mutante BAH42, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde.

### 3.1.3.2 Die Bedeutung der Argininkinase McsB für die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen

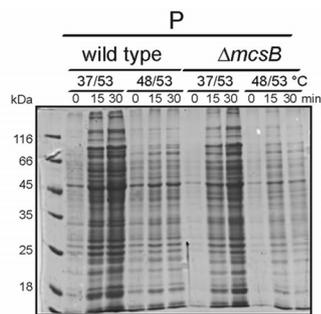
Die Argininkinase McsB ist ein Adapterprotein des ClpCP Komplexes und ist an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt (159, 160, 163, 164). Sie inhibiert und phosphoryliert CtsR, den Repressor der Klasse III Hitzeschockgene und verursacht zusätzlich dessen Degradation über ClpCP, wobei ClpC vermutlich durch McsB-vermittelte Phosphorylierung aktiviert werden muss (161). Außerdem konnte gezeigt werden, dass McsB Einfluss auf die Thermotoleranzentwicklung nehmen kann (eingereichtes Manuskript). Zudem wurde beobachtet, dass McsB zusammen mit ClpCP oder ClpEP eine wichtige Rolle bei der Auflösung des Kompetenzapparates, eine molekulare Maschine, die aus zahlreichen Kompetenzproteinen besteht, spielt (92). Daher besteht die Möglichkeit, dass McsB auch daran beteiligt sein könnte, unter Hitzestress entstehende Aggregate aufzulösen.

Betrachtet man jedoch die SDS Page, welche die unlöslichen Fraktionen der *mcsB*-defizienten Zellen mit denen des Wildtyps unter Thermotoleranzbedingungen vergleicht, wurde kein nennenswerter Unterschied ersichtlich. Möglicherweise entstanden in der Mutante sogar nach dem letalen Hitzeschock, sowohl mit als auch ohne Präschock etwas weniger Aggregate (Abbildung 17A). Auch wies die Mutante unter diesen Bedingungen ein ähnliches Expressions- und Lokalisationsmuster von ClpC, MDH, DnaK, ClpP und ClpX im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A) auf (Abbildung 17B). Das Chaperon HtpG wurde hingegen in der Mutante schon vor dem Hitzeschock verstärkt exprimiert, wobei HtpG im Wildtyp durch den Hitzeschock induziert wurde (Abbildung 6A). Zusätzlich wies HtpG in den Zellen, denen McsB fehlt, nach dem letalen Hitzeschock eine deutlich geringere Lokalisation in der Aggregatfraktion auf. Damit besteht die Möglichkeit, dass HtpG und McsB an einem gemeinsamen Prozess, der auch unter Hitzestress eine Rolle spielen könnte, beteiligt sind. Dies konnte in diesem Zusammenhang jedoch nicht geklärt werden.

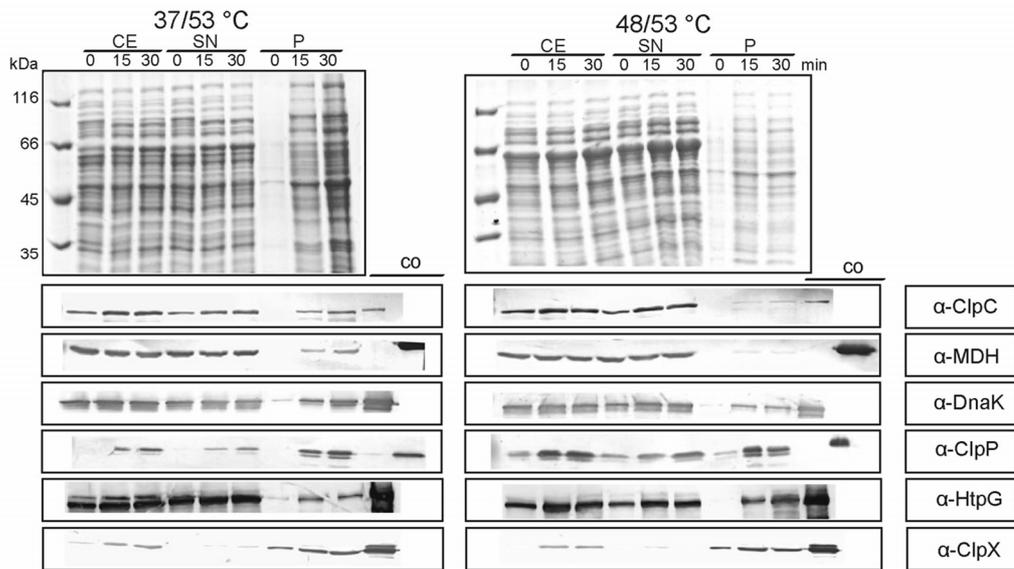
Um die Aggregatbildung unter Thermotoleranzbedingungen in Abhängigkeit von McsB *in vivo* darstellen zu können, wurde ein Stamm kreiert, der neben der Deletion von *mcsB* sowohl IbpA-CFP, als auch MDH-YFP produziert. Die MDH-YFP Fusion wurde hierbei unter dem eigenen Promotor exprimiert und das Gen für die IbpA-CFP Fusion wurde in den *amy* Lokus kloniert. Die Aufnahmen, die mittels eines Fluoreszenzmikroskops erstellt wurden, zeigten, dass in dieser Mutante IbpA-CFP und MDH-YFP schon vor dem Hitzeschock, bei 37 °C in extrem hell leuchtenden und großen polaren Foci ko-lokalisieren (Abbildung 17C). Es kommen jedoch auch Zellen vor, die keine Foci und damit auch nur eine sehr schwache

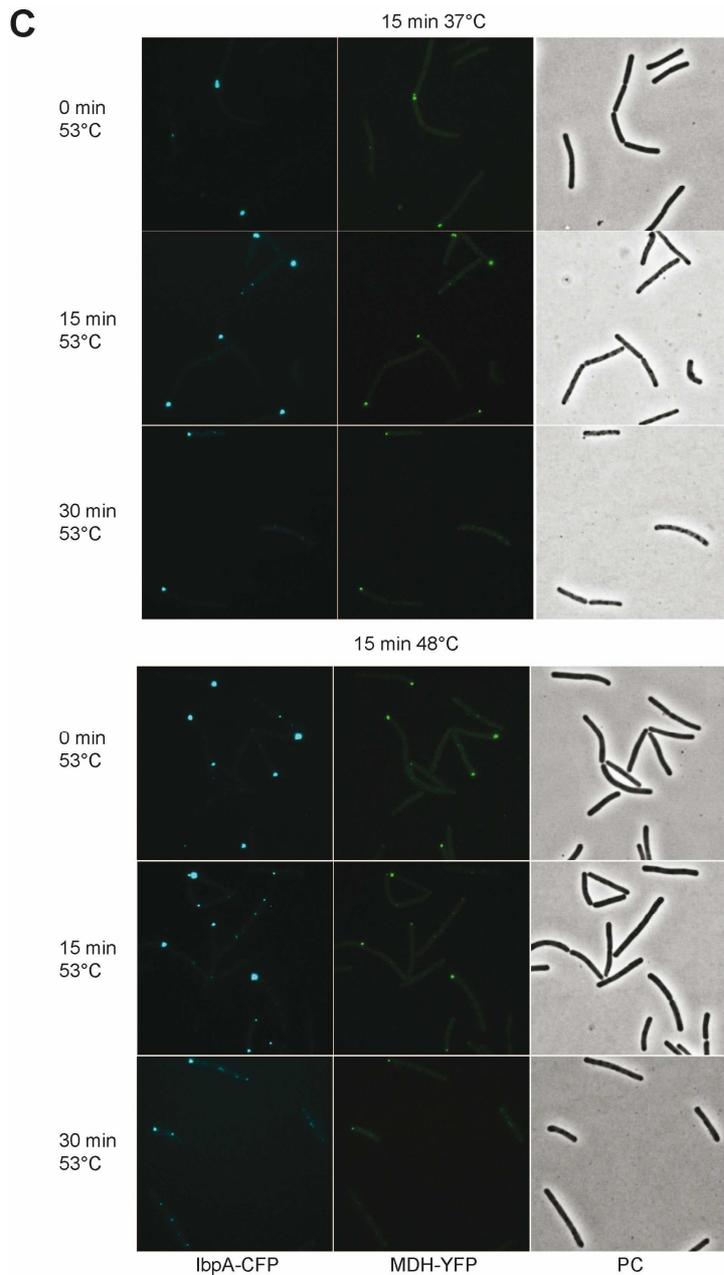
Fluoreszenz aufwiesen. Auch nach dem letalen Hitzeschock bei 53 °C blieben diese polaren Foci erhalten. Eine fünfzehnminütige Inkubation bei 48 °C führte ebenso zu stark leuchtenden, polaren Foci, wobei es schien, dass diese beim Vergleich zu den Zellen, die nur 53 °C ausgesetzt wurden, in weitaus mehr Zellen entstanden. Sogar im Phasenkontrast konnten diese Foci als dunkle Strukturen wahrgenommen werden. Es war schwer die normale, durch den Hitzeschock bei 53 °C ausgelöste Aggregatbildung, die gut im Phasenkontrast an den kleineren, dunkleren Strukturen nachvollzogen werden konnte und sich auch eher vom Wildtyp nicht unterschied (Abbildung 7, 10, 11), über die CFP und YFP Fusionen zu beobachten. Diese, durch MDH und IbpA markierten Aggregate wiesen im Gegensatz zu den riesigen, polaren Foci eine zu schwache Fluoreszenz auf. Vereinzelt waren sie nur durch die IbpA-CFP Fusion nach 15 und 30 min bei 53 °C zu erkennen, wobei die MDH-YFP Fusion einfach zu schwach leuchtete. Die Ursache für diese stark leuchtenden Foci konnte nicht aufgeklärt werden. Jedoch zeigen sie sich auch in ungestressten Zellen und scheinen daher keine durch Hitze entfalteten und aggregierten Proteine zu enthalten. Zusammengefasst zeigte die Argininkinase McsB unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen und unter Hitzestress.

**A**



**B**





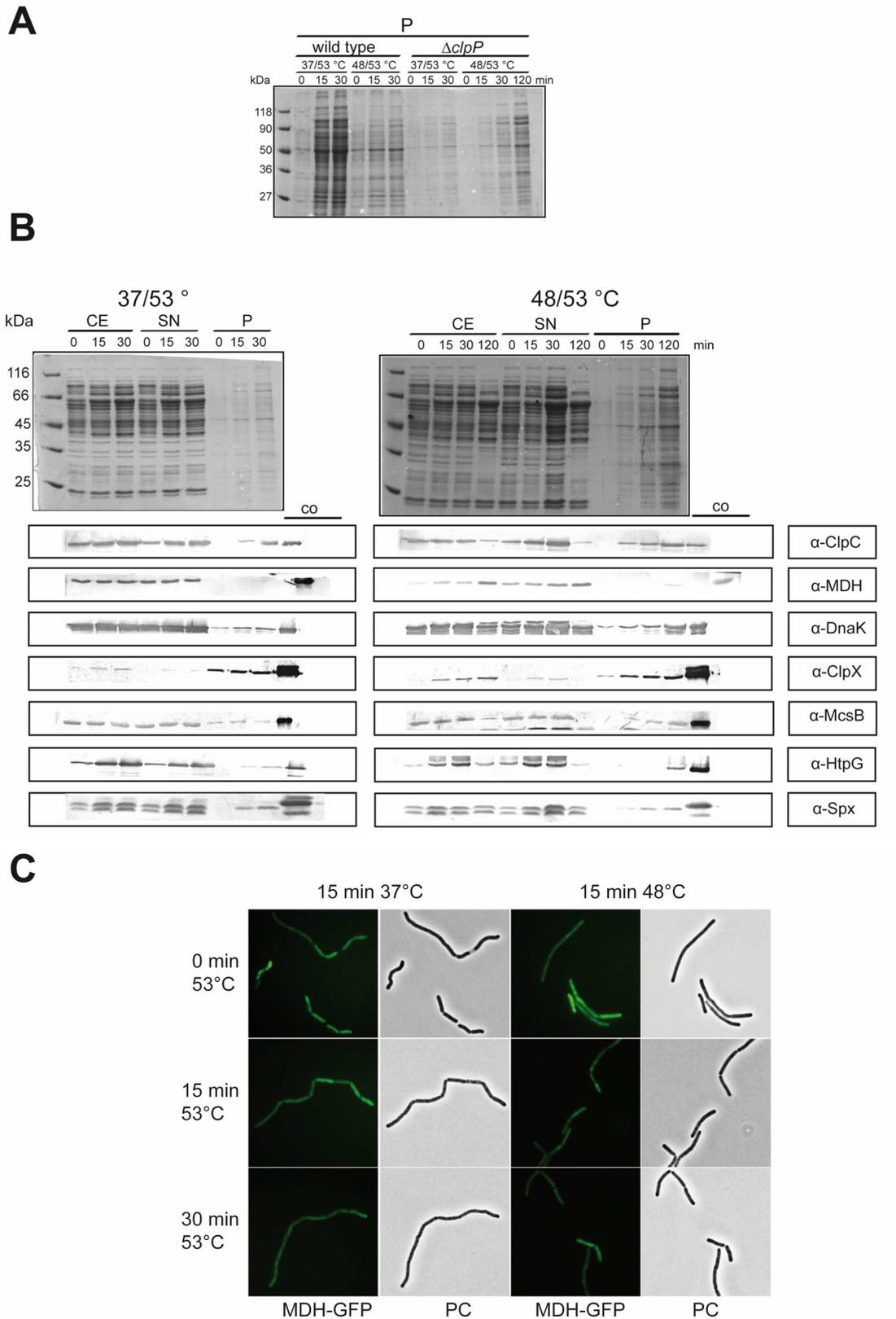
**Abbildung 17: Der Einfluss der *mcsB* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis mcsB* Mutante BNM117, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis mcsB* Mutante BNM117, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis mcsB* Mutante BSR36, die IbpA als Fusion mit CFP und MDH als Fusion mit YFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des CFP-Filters (IbpA-CFP) und des YFP-Filters (IbpA-YFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

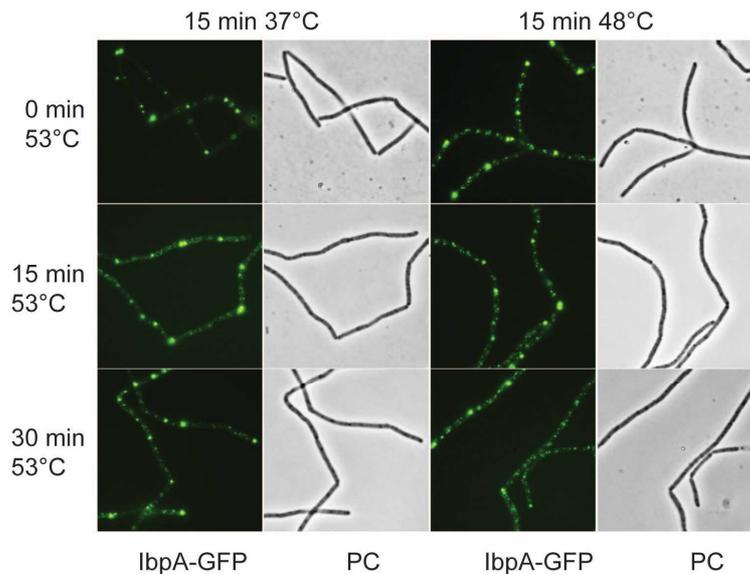
### 3.1.3.3 Die Bedeutung der ClpXP Protease für die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen

In *B. subtilis* spielt die AAA ATPase ClpX zusammen mit der Protease ClpP eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle, indem es, wie ClpC auch an der Degradation von fehlgefalteten Proteinen beteiligt ist (77). In diesem Sinne wurde der Einfluss dieses Komplexes auf die Entwicklung der Thermotoleranz im Hinblick auf Überleben und Proteinaggregation getestet. Gegen jegliche Erwartungen zeigte sowohl der *clpX*-, als auch der *clpP*-defiziente Stamm eine bessere Überlebensrate bei 53 °C im Vergleich zum Wildtyp (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis). Damit übereinstimmend resultierte eine *clpP* Deletion unter schweren Hitzestressbedingungen in einer im Vergleich zum Wildtyp weitaus geringeren Menge an Proteinaggregaten (Abbildung 18A). Dabei führte der Präschock zu keinem Unterschied im Aggregationslevel in dieser Mutante. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten dieses Ergebnis bestätigen (Abbildung 18C). Dabei entwickelten die *clpP*-defizienten Zellen nach der Inkubation bei 53 °C, unabhängig, ob sie vorher 48 °C ausgesetzt wurden, keine sichtbaren MDH-GFP markierten Aggregate. Auch im Phasenkontrast zeigten die Zellen nach dem letalen Hitzeschock deutlich weniger Einschlusskörperchen als die Wildtyp Zellen. Selbst für das hitzelabile Proteine MDH konnte keine Lokalisation an der Aggregatfraktion nach dem letalen Hitzeschock nachgewiesen werden (Abbildung 18B). Auch die anderen untersuchten Chaperone und Komponenten der Proteasekomplexe wiesen eine im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 1A) deutlich geringere Lokalisation in der unlöslichen Fraktion auf, wobei dies auch aufgrund des sehr niedrigen Aggregatlevels zu erwarten war. Interessanterweise erhöhte sich in den Zellen, die dem Präschock ausgesetzt wurden die Aggregatmenge kontinuierlich mit der Zeit, die sie bei 53 °C inkubiert wurden (Abbildung 18A, B). Nach 120 min bei 53 °C konnte eine kleine Menge aggregiertes MDH mittels der Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 18B).

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 18D, in der die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Stammes, der IbpA-GFP Xylose-abhängig im *clpP* Hintergrund exprimiert, dargestellt sind, unter allen Bedingungen sehr viele und sehr stark fluoreszierende Foci. Diese erschienen in den ungestressten Zellen, sowie in denen, die einem Präschock und oder dem letalen Hitzeschock ausgesetzt wurden. Eine Erklärung für diese ungewöhnlichen Resultate wäre, dass IbpA aus *E. coli* ein Substrat des Clp Systems in *B. subtilis* ist und ClpP somit an der Auflösung der unter 3.1.1.2 beschrieben artifiziellen Foci, die vermutlich durch die Fusion

von GFP an IbpA entstehen (278), beteiligt ist. Da dieser Effekt unabhängig von den Thermotoleranzbedingungen auftrat, konnte man davon ausgehen, dass er in diesem Zusammenhang keine Rolle spielte.



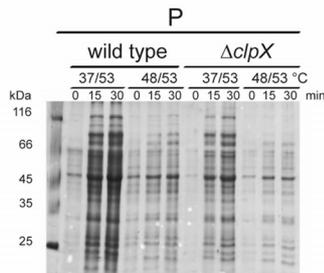
**D**

**Abbildung 18: Der Einfluss der *clpP* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis clpP* Mutante BNM103, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis clpP* Mutante BNM103, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis clpP* Mutante BNM233, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt. D) Siehe C), jedoch wurde anstatt des Stammes BNM233, die *B. subtilis clpP* Mutante BSR31, welche IbpA als Fusion mit GFP ektopisch exprimiert, verwendet.

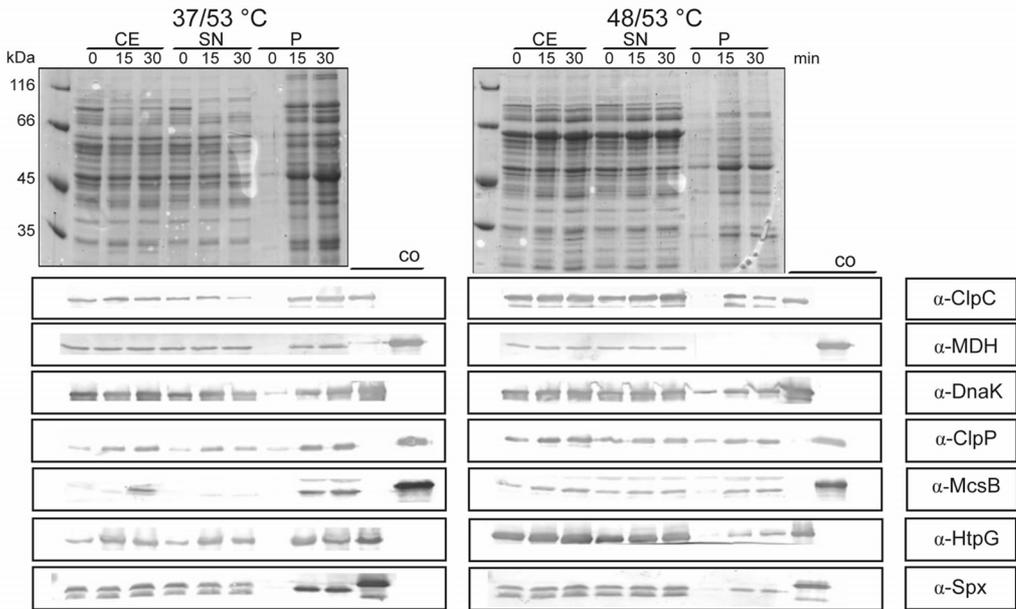
Betrachtet man nun die Aggregatbildung unter Thermotoleranzbedingungen in der *clpX* Deletionsmutante, konnte ebenso eine verminderte Proteinaggregation bei 53 °C im Vergleich zum Wildtyp Stamm beobachtet werden (Abbildung 19A). Jedoch fiel der Unterschied zum Wildtyp nicht so drastisch aus, wie in der *clpP* Mutante. Zellen, die keinem Präschock ausgesetzt wurden, wiesen noch immer eine erhöhte Anzahl an Aggregaten, die ebenfalls MDH enthalten, im Vergleich zu den Zellen auf, die zuvor bei 48 °C auf den letalen Hitzeschock vorbereitet wurden (Abbildung 19B). Die untersuchten Proteine des Qualitätskontrollsystems zeigten im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A) kein unterschiedliches Expressions- und Lokalisationsmuster. Die Anzahl der Aggregate, die MDH-GFP enthielten oder durch IbpA-GFP markiert wurden, verstärkte sich nach dem 53 °C Hitzeschock (Abbildung 19C,D). Die Menge der MDH-GFP bildenden Foci in dieser Mutante erreichte jedoch augenscheinlich nicht das Level des Wildtyp Stammes, wobei aufgrund der Betrachtung von Einzelzellen und des nicht so deutlichen Unterschieds die Beurteilung, ob

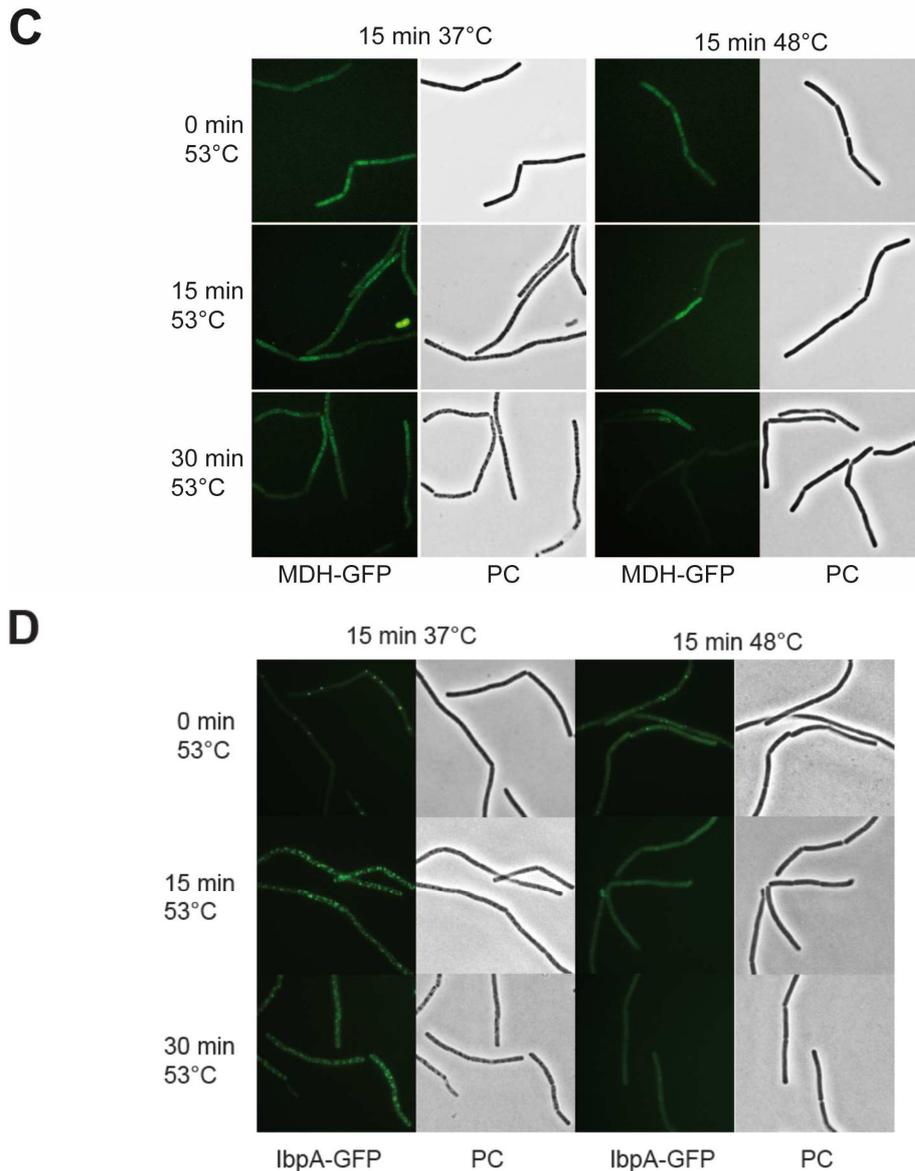
sich das Level der Aggregation in dieser Mutante vom Wildtyp unterschied, jedoch sehr schwerfiel. Möglicherweise zeigte sich nach 30 min bei 53 °C eine zum Wildtyp geringfügig erniedrigte Aggregatentstehung. Zusätzlich fiel auf, dass die Inkubation bei 48 °C die Entstehung von MDH- beziehungsweise IbpA-enthaltenden Aggregaten größtenteils verhindern konnte.

**A**



**B**



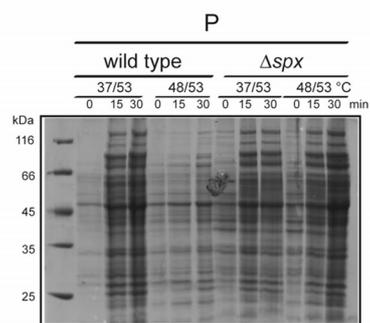
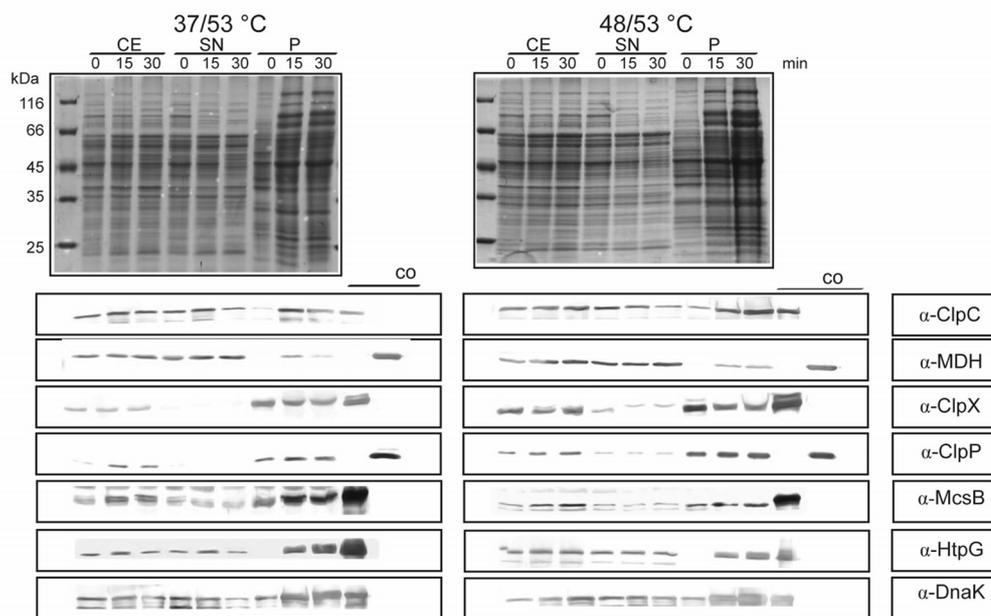


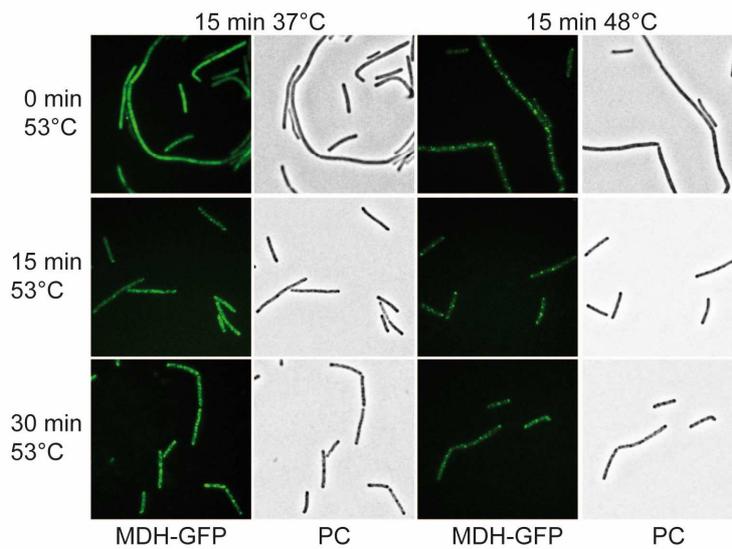
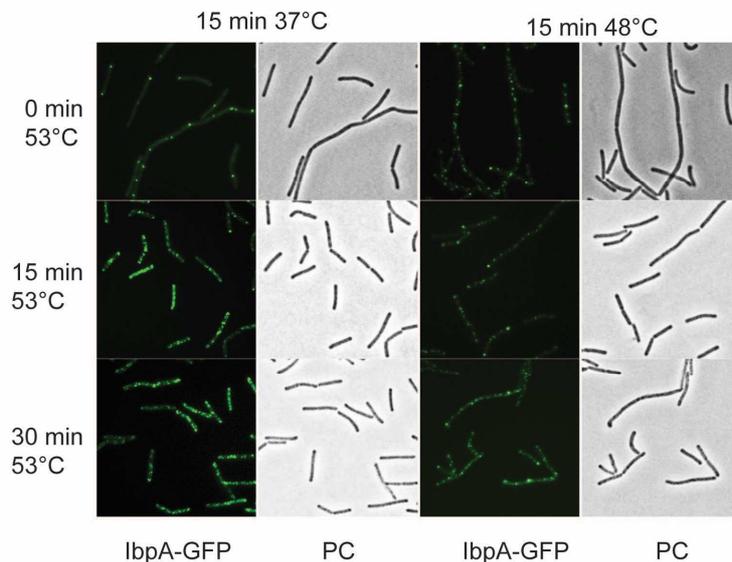
**Abbildung 19: Der Einfluss der *clpX* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis clpX* Mutante BNM107, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis clpX* Mutante BNM107, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis clpX* Mutante BNM236, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt. D) Siehe C), jedoch wurde anstatt des Stammes BNM236, die *B. subtilis clpX* Mutante BEM5, welche IbpA als Fusion mit GFP ektopisch exprimiert, verwendet.

Diese Ergebnisse lassen die Existenz eines Stressregulators vermuten, der durch den Proteasekomplex ClpXP negativ reguliert wird, sich jedoch positiv auf das Zellüberleben und negativ auf cytosolische Proteinaggregation unter letalen Hitzeschockbedingungen auswirkt.

### **3.1.4 Der Effekt der *clpP* und *clpX* Deletion auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen basiert hauptsächlich auf Spx**

Da ClpP zusammen mit ClpX an der Degradation von Spx beteiligt ist (100), stellt dieser globale Regulator der oxidativen Stressantwort einen möglichen Kandidaten dar, der den Effekt einer *clpP* oder *clpX* Deletion auf die Thermotoleranz hervorrufen kann. Nicht gestresste Wildtyp Zellen wiesen daher ein sehr geringes Spx Level auf (Abbildung 6A), wobei Spx in *clpP* und *clpX* defizienten Zellen akkumulierte (Abbildung 18B, 19B) (65, 103). Neben seiner Rolle in der oxidativen Stressantwort scheint Spx auch an der Hitzeschockantwort beteiligt zu sein, da seine Expression deutlich durch Hitze induziert wurde (Abbildung 6A) (103, 185). Um dies zu bestätigen, wurde der Einfluss von Spx auf das Überleben und die Aggregatbildung unter Thermotoleranzbedingungen studiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass im Bezug auf das Überleben kein Thermotoleranzverhalten für die *spx* Mutante mehr beobachtet werden konnte (eingereichtes Manuskript). Die Zellen, die dem Präshock ausgesetzt wurden, wiesen eine, zu den Zellen, die nicht bei 48 °C inkubiert wurden, ähnliche Sterberate bei 53 °C auf. Weiterhin konnte in dieser Mutante nach dem letalen Hitzeschock und trotz Gabe des Präshocks eine erhöhte Aggregatbildung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 20A). Die Inkubation bei 48 °C reichte bei fehlender Expression von Spx nicht mehr aus, um die Proteinaggregation bei 53 °C zu verhindern, wobei sich dies zudem in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bewahrheitete (Abbildung 20C, D). Auch die Western Blot Analyse (Abbildung 20B) bestätigte dies, da sich MDH trotz des Präshocks deutlich nach 15 und 30 min bei 53 °C in der Aggregatfraktion befindet. Die Lokalisation und Expression wichtiger Chaperone und Proteasen schien durch das Fehlen von Spx nicht betroffen zu sein.

**A****B**

**C****D**

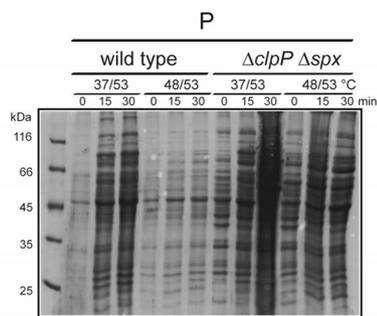
**Abbildung 20: Der Einfluss der *spx* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis* *spx* Mutante BNM111, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis* *spx* Mutante BNM111, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis* *spx* Mutante BSR15, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt. D) Siehe C), jedoch wurde anstatt des Stammes BSR15, die *B. subtilis* *spx* Mutante BSR30, welche IbpA als Fusion mit GFP ektopisch exprimiert, verwendet.

Sollte *Spx* jedoch in der Tat an der Entwicklung der intrinsischen Thermotoleranz, die sich zudem auf die Proteinhomeostase auswirkt, in der *clpX* oder *clpP* Mutante verantwortlich sein, müsste dieser Effekt in einer *spx clpP* oder *spx clpX* Doppelmutante aufgehoben werden.

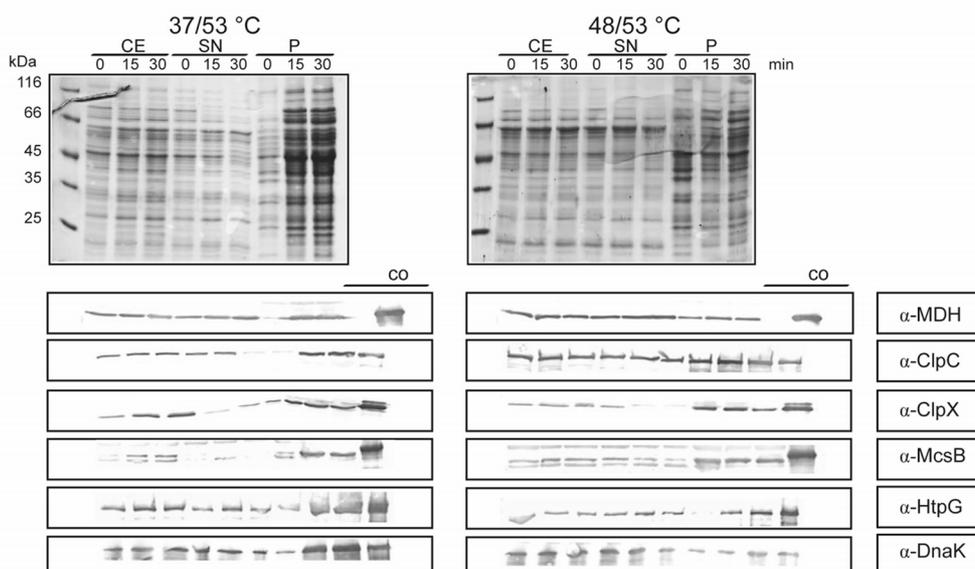
In Abbildung 21 und Abbildung 22 ist sehr deutlich zu erkennen, dass das gleichzeitige Fehlen von Spx und ClpP beziehungsweise ClpX zu einer verstärkten Proteinaggregation unter Hitzestressbedingungen führte, wobei das Thermotoleranzverhalten durch die 48 °C Inkubation vollständig beseitigt wurde. Dieses Ergebnis konnte durch die Anwendung von unterschiedlichen Methoden, wie der *in vitro* Aggregatpräparation mit anschließender Western Blot Analyse, in der unter anderem die Lokalisation und Expression des Markerproteins MDH detektiert wurde und der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung, in der die Aggregation mittels GFP-Fusionen *in vivo* dargestellt werden konnte, bestätigt werden.

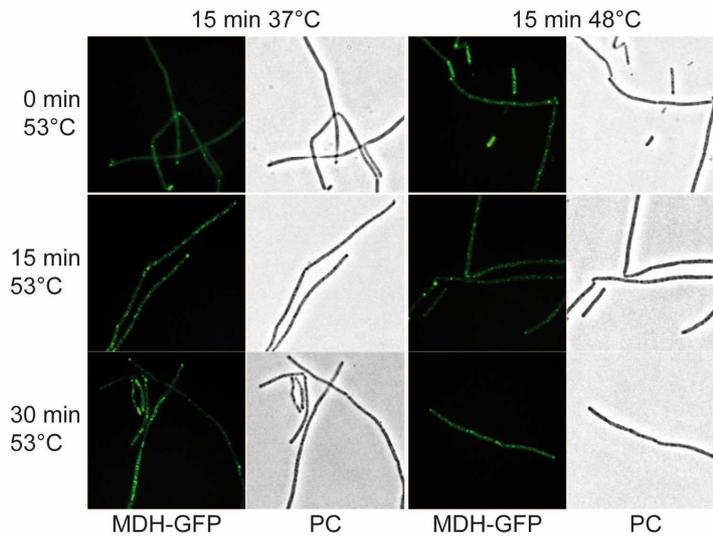
Western Blot Analysen von ausgewählten Proteinen zeigten, dass die jeweiligen Deletionen das Expressionsverhalten und die Lokalisation von Chaperone und Proteasen, die in der Hitzeschockantwort eine wichtige Rolle spielen, im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A) nicht beeinflussten.

**A**

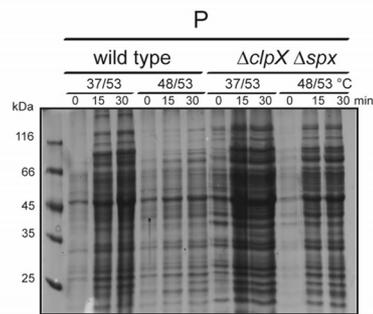
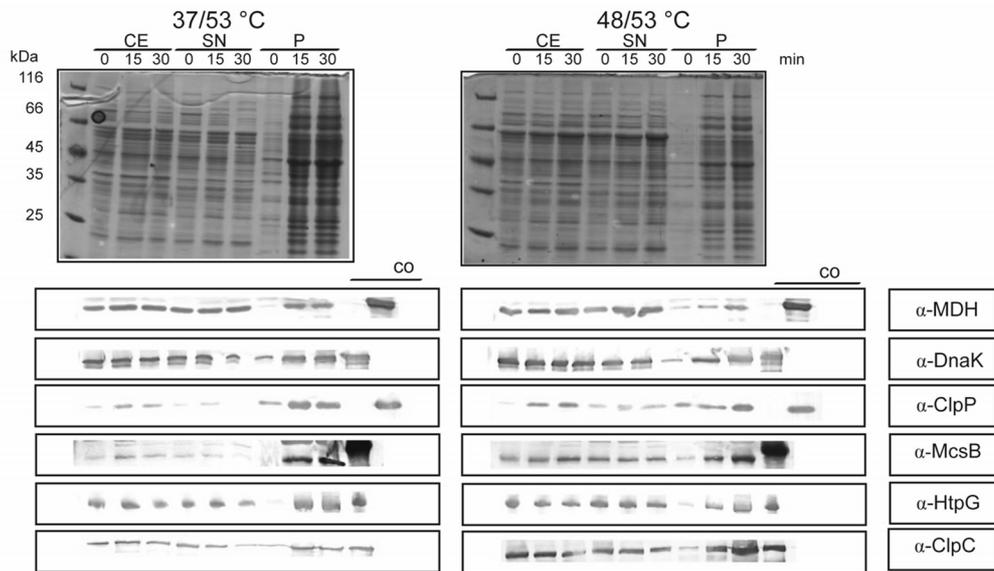


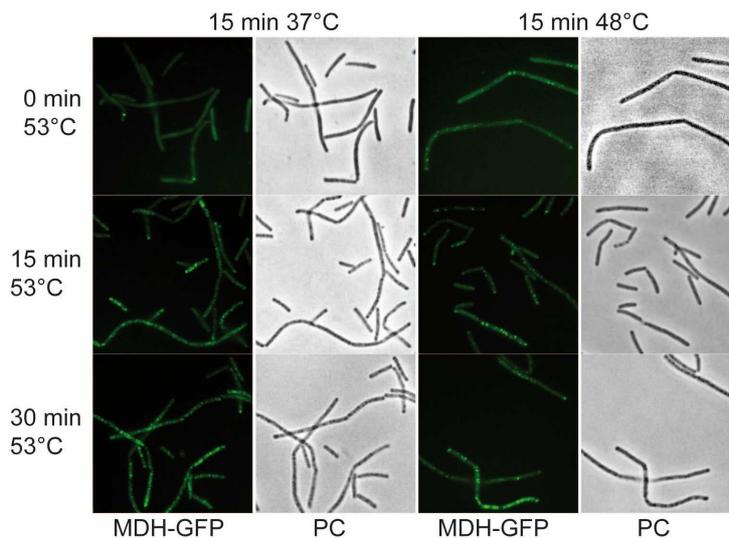
**B**



**C**

**Abbildung 21: Die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in der *B. subtilis spx clpP* Doppelmutante.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis spx clpP* Doppelmutante BSR110, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis spx clpP* Doppelmutante BSR110, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis spx clpP* Doppelmutante BSR19, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

**A****B**

**C**

**Abbildung 22: Die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in der *B. subtilis spx clpX* Doppelmutante.** A) Die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis spx clpX* Doppelmutante BSR109, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis spx clpX* Doppelmutante BSR109, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. C) Die *B. subtilis spx clpX* Doppelmutante BSR21, die MDH als Fusion mit GFP exprimiert, wurde nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt. Proben wurden vor, 15 min und 30 min nach dem 53 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass der beobachtete Effekt in der *clpP* und *clpX* Mutante tatsächlich auf ein erhöhtes Spx-Level beruhte.

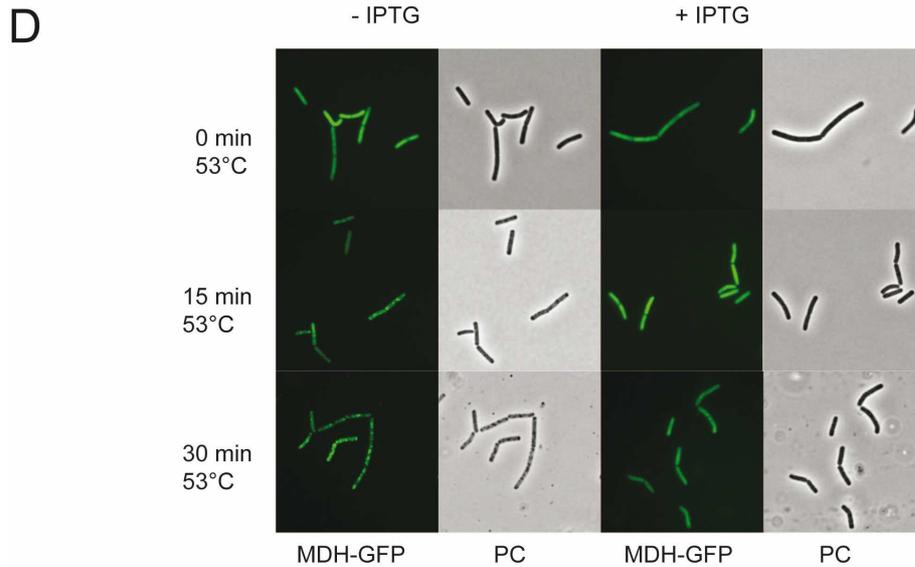
### **3.1.5 Ein erhöhtes Level an Spx schützt die Zelle vor hitzeinduzierter Proteinaggregation**

Um die Bedeutung von Spx für die Hitzeschockantwort und die Thermotoleranzentwicklung eindeutig aufzuklären, wurde der Einfluss einer Spx-Überexpression auf die Aggregatentstehung unter Hitzestressbedingungen studiert. Für diese Experimente wurde ein Stamm benutzt, in dem die zwei C-terminalen Aminosäuren von Spx, Alanin und Asparagin durch zwei Aspartate ersetzt wurden (DD), so dass es durch ClpXP nicht mehr degradiert werden kann. Dieses so veränderte Spx, weiterhin SpxDD genannt, wurde *in trans* unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors in den *amy* Lokus des *B. subtilis* Chromosoms inseriert (104). Wurde der Präshock durch die Induktion von SpxDD ersetzt, kann ein

besseres Überleben bei 53 °C beobachtet werden, als ohne diese Induktion, wobei Zellen, die den Präschock ausgesetzt wurden noch am langsamsten starben (eingereichtes Manuskript). Wurde die SpxDD-Expression vor dem letalen Hitzeschock bei 53 °C durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert, konnte eine geringere Proteinaggregation, die sowohl durch die Aggregatpräparation als auch durch die Lokalisation von MDH-GFP untersucht wurde, im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 23A) oder zum Stamm, in dem SpxDD nicht induziert wurde (Abbildung 23B, 23D) beobachtet werden. Die Western Blot Analysen in Abbildung 23B und C zeigen deutlich, dass SpxDD, welches mit einem Antikörper gegen Spx detektiert werden konnte, schon vor dem letalen Hitzeschock ausreichend induziert werden konnte. Außerdem erhöhte die Induktion von SpxDD die Expression der Thio-reduktase TrxA und ClpC (Abbildung 23B). Von TrxA ist bekannt, dass es durch Spx positiv reguliert wird (104) und kürzlich wurde gezeigt, dass auch das *ctsR* Operon (eingeschlossen *clpP* und *clpC*) von Spx induziert werden können (105).

Die Western Blot Analyse von DnaK und HtpG in Abbildung 23C diente als Kontrolle, ob die zusätzliche Expression von SpxDD Auswirkungen auf das Expressionsverhalten der anderen Chaperone hat. Dies konnte jedoch, da kein Unterschied zu den nicht-induzierten Zellen festgestellt wurde, ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde mittels eines Antikörpers gegen MDH bei 53 °C ein geringeres Aggregationslevel dieses hitzelabilen Proteins nach Induktion von SpxDD bestätigt. In Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen Überlebensrate entstanden nach der Gabe des Präschocks jedoch immer noch weniger Aggregate bei 53 °C als durch die Induktion von SpxDD (Abbildung 23A).

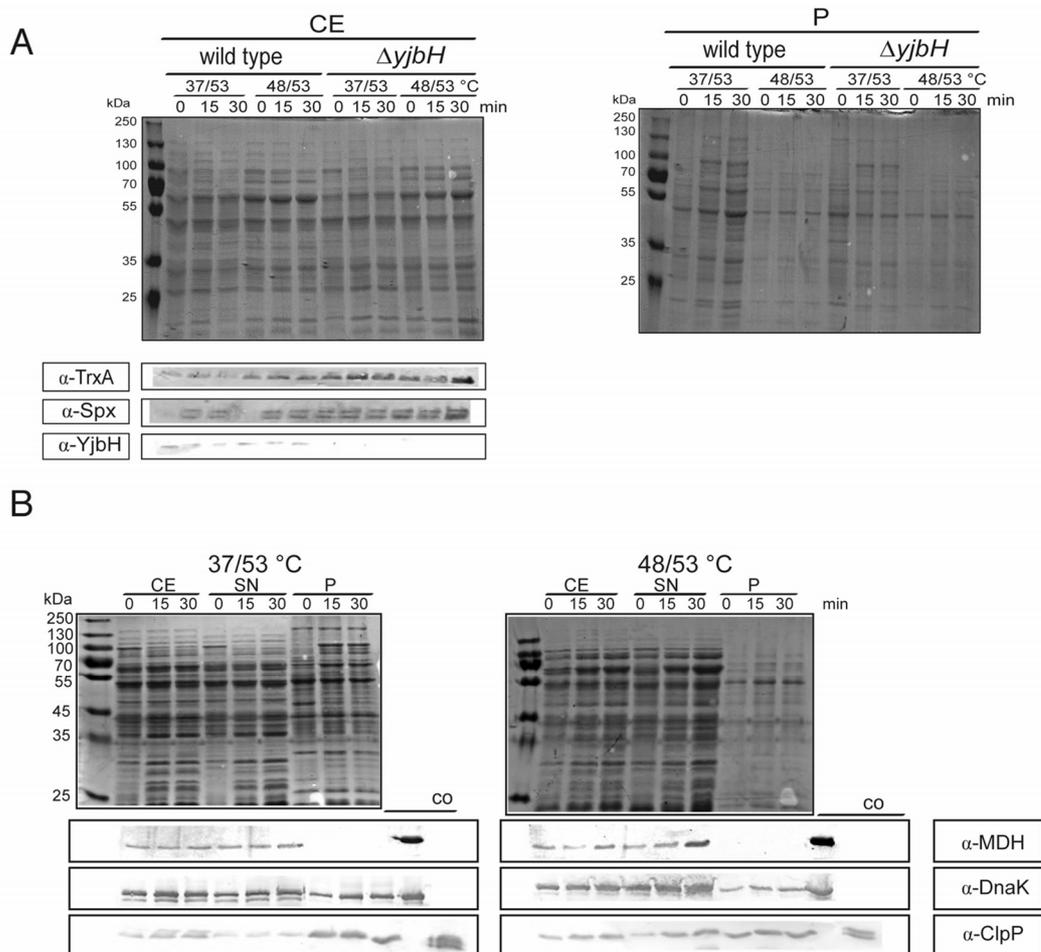




**Abbildung 23: Der Einfluss der Überexpression einer degradationsresistenten Spx-Variante (SpxDD) auf die Entstehung von Aggregaten unter Hitzestressbedingungen *B. subtilis*.** A) Der *B. subtilis* Stamm BNM810, in dem die Produktion von SpxDD durch einen IPTG-induzierbaren Promotor kontrolliert wird ( $P_{HY-spxDD}$ ) (104), wurde bei 37 °C angezogen. In der frühen exponentiellen Phase wurde die Expression von SpxDD durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert, die Zellen wurden für weiter 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend entsprechend dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll behandelt. Hiernach wurde die Aggregatfraktion (P) hergestellt und im Vergleich zu der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche auch unter Thermotoleranzbedingungen angezogen wurden, mittels SDS-PAGE analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von dem Stamm BNM810, indem die Expression von SpxDD induziert (siehe A)) und der für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurde, mit dem CE, SN und P dieses Stammes, der in Abwesenheit von IPTG angezogen wurde, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den hier angezeigten Antikörpern verglichen. C) Die Expression von SpxDD wurde in dem Stamm BNM810 mit 0,1 mM IPTG induziert (siehe A)), wobei der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) hergestellt wurden, nachdem die Zellen für 0, 15 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurden. Die Proben wurden anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. Als Kontrolle diente der Stamm, der in Abwesenheit von IPTG angezogen wurde. D) Der *B. subtilis*  $P_{HY-spxDD}$  Stamm mit einer *mdh*-GFP Fusion (BSR16) wurde nach der in C) beschriebenen Prozedur angezogen und behandelt. Anschließend wurden Proben im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert.

Kürzlich konnte das Adapterprotein YjbH, das die Degradation von Spx durch ClpXP beschleunigt, identifiziert werden (101, 191). Zellen, denen YjbH fehlt, weisen daher im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Menge an Spx und damit auch TrxA auf, ohne dass sie einem zusätzlichen oxidativen- oder Hitzestress ausgesetzt werden (191) (Abbildung 24A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *yjbH*-defiziente Zellen bei 53°C besser überleben als der Wildtyp (eingereichtes Manuskript). Trägt eine Überproduktion von Spx tatsächlich dazu bei Proteinaggregation unter Hitzestressbedingungen verringern zu können, sollte eine Deletion von *yjbH* zu denselben Ergebnissen führen, welche durch die SpxDD Expression beobachtet werden konnten (Abbildung 23). Daher wurden Aggregate von *yjbH*-defizienten Zellen, die unter Thermotoleranzbedingungen wachsen gelassen wurden, präpariert und mit

den unlöslichen Fraktionen von Wildtyp Zellen, die denselben Bedingungen ausgesetzt wurden, verglichen (Abbildung 24A). Dabei konnte verifiziert werden, dass Zellen, die *YjbH* nicht exprimieren können, deutlich weniger Aggregate nach dem letalen Hitzeschock (37/53 °C) entwickeln. Auch die Western Blot Analyse (Abbildung 24B) bestätigte dies, da sich MDH trotz des letalen Hitzeschocks nicht in der Aggregatfraktion befand. Das Expressionsmuster anderer Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems wurde von der *yjbH* Deletion im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 6A) nicht verändert (exemplarisch verdeutlicht durch Western Blot Analysen von DnaK und ClpP).

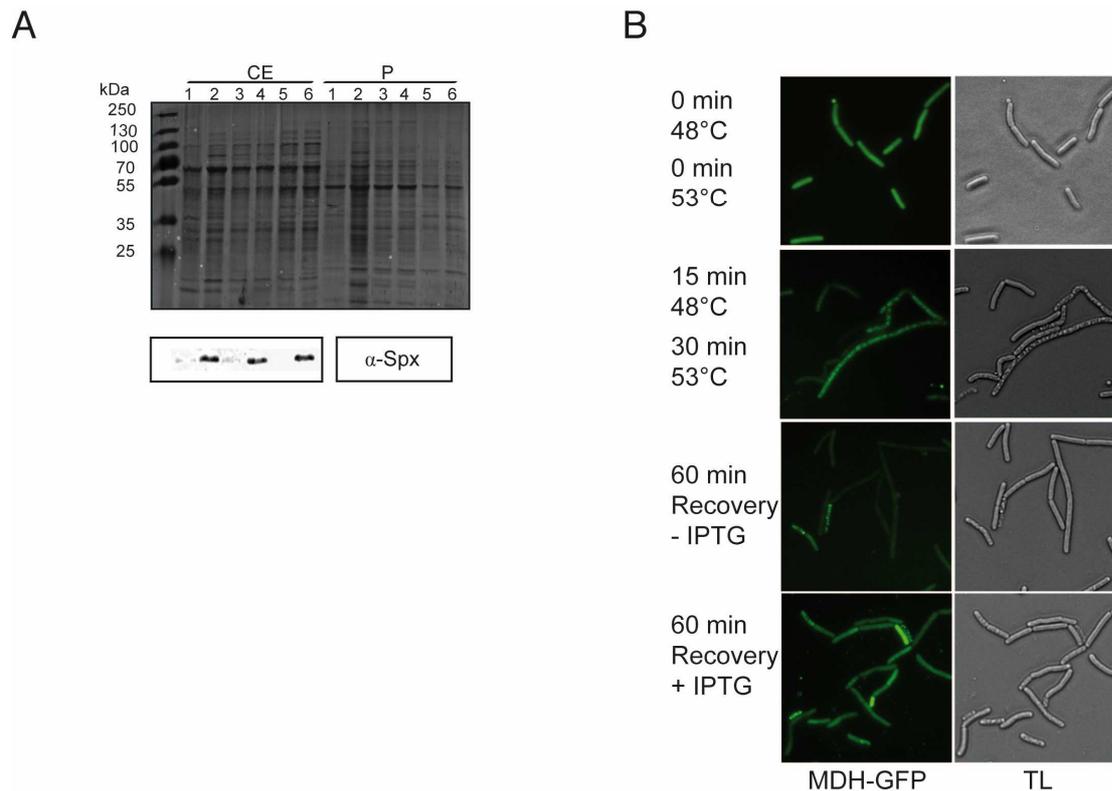


**Abbildung 24: Der Einfluss der *yjbH* Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Der Gesamtzellextrakt und die Aggregatfraktion (P) wurde von der *B. subtilis* *yjbH* Mutante BNM855, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und im Vergleich zum Gesamtzellextrakt und der Aggregatfraktion von Wildtypzellen, welche die gleiche Behandlung erfahren haben, mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern analysiert. B) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *B. subtilis* *yjbH* Mutante BNM855, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde.

Beide Experimente lassen vermuten, dass eine gering erhöhte Menge von Spx, entweder hervorgerufen durch artifizielle Induktion oder durch eine erniedrigte Degradationsrate desselbigen Transkriptionsfaktors, Proteinaggregation unter Hitzeschockbedingungen vermindern kann.

Jedoch reichte die erhöhte Menge von Spx nicht aus um das Aggregationslevel auf das Niveau der Wildtyp-Zellen, die zusätzlich einem 48 °C Präschock ausgesetzt wurden, zu senken. Im Rahmen dieser Experimente konnte nicht festgestellt werden, ob Spx vor der Entstehung von Aggregaten schützt oder die Aggregatauflösung durch das

Proteinqualitätskontrollsystems verstärkt. Aus diesem Grunde wurde in einem weiteren Versuch getestet, ob die Induktion von SpxDD nach dem letalen Hitzeschock in einer Erholungsphase die Entstehung von Aggregaten verhindern kann. In diesem Sinn wurden *B. subtilis* Zellen, welche das Gen für *spxDD* im *amy* Lokus insertiert haben, nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 53 °C zur Erholung bei 37 °C für eine weitere Stunde wachsen gelassen, wobei in einer Hälfte die Expression von SpxDD durch IPTG induziert wurde und in der anderen nicht. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Aggregatfraktion von der löslichen Fraktion getrennt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei die Induktion von SpxDD mittels einer Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen Spx nachgewiesen wurde (Abb 25A). Zudem wurde dieser Stamm, der zusätzlich in der Lage ist MDH in einer Fusion mit GFP zu exprimieren, denselben Bedingungen ausgesetzt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 25B). Ein vor dem letalen Hitzeschock gegebener fünfzehnminütiger Prätschock bei 48 °C war notwendig, da ohne diesen die Zellen aufgrund des Stresses vermutlich die Proteinsynthese einstellten und trotz IPTG-Zugabe nicht in der Lage waren, SpxDD zu exprimieren (nicht gezeigt). Jedoch konnte durch die Anwendung beider Methoden kein Unterschied zum nicht-induzierten Stamm in der Aggregatmenge beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Induktion von SpxDD in der Erholungsphase keine Einfluss auf die Beseitigung der Aggregate, die in beiden Fällen deutlich wahrgenommen werden kann, hatte.



**Abbildung 25: Der Einfluss der Überexpression von SpxDD auf die Entstehung von Aggregaten nach dem letalen Hitzeschock und einer Erholungsphase in *B. subtilis*.** A) Der *B. subtilis*  $P_{HY}$ -*spxDD* Stamm BNM810 wurde bei 37 °C angezogen, wobei eine Probe in der frühen exponentiellen Phase genommen wurde (1). Hiernach wurden die Zellen für 15 Minuten 48 °C und für 30 Minuten 53 °C ausgesetzt (2). Anschließend wurde in einem Teil der Zellen die Expression von SpxDD mit 0,1 mM IPTG vor der dreißig (4)- und sechzigminütigen (6) Erholungsphase bei 37 °C induziert, wobei der andere Teil für 30 (3) und 60 Minuten (5) in Abwesenheit von IPTG wachsen gelassen wurde. Der Gesamtzellextrakt (CE) und die Aggregatfraktion (P) wurde von diesen Proben hergestellt, die und daraufhin mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit dem Antikörper gegen Spx analysiert. B) Der *B. subtilis* 168  $P_{HY}$ -*spxDD* Stamm mit einer *mdh*-GFP Fusion (BSR16) wurde nach der in A) beschriebenen Prozedur angezogen und behandelt. Proben wurden jedoch nur nach der sechzigminütigen Erholungsphase und nicht noch zusätzlich nach 30 Minuten genommen und im Durchlicht (TL) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

### 3.1.6 Die Induktion von Spx verhindert Proteinoxidation unter Hitzestress

Oxidative Modifikationen von Proteinen verändern die Seitenketten von Aminosäuren können, wobei die Seitenketten von Prolin, Arginin, Lysin und Threonin in Proteinen unter Einführung von Keton- oder Aldehydgruppen carbonyliert werden können (175). Die Anwesenheit dieser Carbonylgruppen kann als Marker für Proteinoxidation benutzt und mittels sensitiver immunchemischer Methoden nachgewiesen werden (280).

Werden während eines Hitzeschocks entfaltete Proteine tatsächlich durch freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies modifiziert, sollten als Konsequenz unter Hitzestressbedingungen vermehrt Carbonylgruppen an Proteinen nachweisbar sein. Um dies zu testen wurde auf eine Methode zurückgegriffen, in der die Carbonylgruppen an den Proteinseitenketten mit 2,4-

Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon derivatisiert wurden. Diese derivatisierten Proteinproben wurden anschließend unter Verwendung einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels eines spezifischen Antikörpers konnten Carbonylgruppen im Western Blot sichtbar gemacht werden. Mostertz und Hecker konnten mit dieser Methode erfolgreich in *B. subtilis* zeigen, dass das Level an Proteincarbonylierung nach Wasserstoffperoxidstress stark erhöht war (281).

Abbildung 26A zeigt einen solchen Oxy Blot des *B. subtilis* Wildtyps, der den beschriebenen Thermotoleranzbedingungen ausgesetzt wurde. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 53 °C konnte eine deutliche Zunahme der Proteine, die mit dem Antikörper gegen Carbonylgruppen detektiert wurden, im Gesamtzellextrakt beobachtet werden. Wurden die Zellen einem zusätzlichen Präschock bei 48 °C ausgesetzt, konnte diese Zunahme nicht mehr wahrgenommen werden und es befanden sich deutlich weniger carbonylierte Proteine im Gesamtzellextrakt. Die lösliche Fraktion wies mit und ohne Präschock nach 30 Minuten 53 °C eine geringere Menge an carbonylierten Proteinen auf. Dieses Verschwinden ist möglicherweise mit der Aggregation dieser oxidierten Proteine zu erklären, wobei auch eine in der Tat erhöhte Menge an carbonylierten Proteinen nach dem letalen Hitzeschock in der unlöslichen Fraktion zu finden war. Insgesamt deutet dieses Ergebnis auf eine erhöhte Proteincarbonylierung und damit oxidative Schädigung der Proteine nach einem Hitzeschock bei 53 °C hin. Zusätzlich schienen diese oxidierten Proteine zur Aggregation zu neigen, da carbonylierte Proteine nach dem Hitzeschock aus der löslichen Fraktion verschwinden, um in der unlöslichen wieder aufzutauchen. Sowohl in *clpX*-, als auch in *clpP*-defizienten Zellen, ist die Menge an Sp<sub>x</sub> erhöht und nach dem letalen Hitzeschock bei 53 °C aggregierten deutlich weniger zytosolische Proteine (Abbildung 18, 19). Ist dieser Umstand auf die durch Sp<sub>x</sub> ausgelöste erhöhte Expression von redoxspezifischen Enzymen zurückzuführen, sollten in den Zellen dieser Mutanten weniger carbonylierte Proteine nachweisbar sein. Betrachtet man nun Abbildung 26 E und F zeigte sich im Gesamtzellextrakt und in der unlöslichen Fraktion nach der Inkubation bei 53 °C eine geringere Proteincarbonylierung in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch sollte bedacht werden, dass die unlösliche Fraktion der Mutanten aufgrund verringerter Aggregation auch insgesamt weniger Proteine enthielt. Das im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Level an detektierter Carbonylierung in den ungestressten Zellen der *clpX* und der *clpP* Mutante weist daraufhin, dass sowohl ClpX, als auch ClpP unter normalen Bedingungen an der Degradation von oxidativ geschädigten Proteinen, die aufgrund der aeroben Atmung entstehen können beteiligt sind.

In *spx*-defizienten Zellen konnte nach dem letalen Hitzeschock und trotz Gabe des Präschocks

eine erhöhte Aggregatbildung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 20). Somit wurden die Auswirkungen dieser Deletion auf die Proteincarbonylierung unter diesen Bedingungen getestet. Wie erwartet, wies die Mutante sowohl nach dem Präschock als auch nach Präschock und dreißigminütiger Inkubation bei 53 °C eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Menge an carbonylierten Proteinen auf (Abbildung 26G). Dementsprechend sollte nach Induktion von SpxDD, der Spx-Variante, die nicht mehr durch ClpXP degradiert werden kann, weniger Proteincarbonylierung nachweisbar sein. Vergleicht man die Menge der Carbonylierung in den nicht-induzierten Zellen, mit denen, in denen die Expression von SpxDD durch 0,1 mM IPTG induziert wurde, ist diese bei den letzteren deutlich erniedrigt und bestätigt damit die Erwartungen (Abbildung 26H).

Des Weiteren konnte eine zusätzliche Deletion von *spx* den positiven Effekt, den ClpX und ClpP auf die Proteincarbonylierung aufwiesen, aufheben, so dass sich das Carbonylierungslevel in den Doppelmутanten im Vergleich zur Einzelmutante unter Thermotoleranzbedingungen auffällig erhöhte (Abbildung 26I, J).

Als Kontrolle wurde der Grad der Proteincarbonylierung zusätzlich in der *clpC*- und der *hrcA*-Mutante bestimmt, da beide Proteine keinen Einfluss auf die Spx-Expression nehmen und somit keine Rolle bei der oxidativen Stressantwort spielen sollten. ClpC-defiziente Zellen, die im Vergleich zum Wildtyp unter Hitzestressbedingungen keine vermehrte Aggregation zeigten, wiesen unter allen getesteten Bedingungen eine erhöhte Proteincarbonylierung auf (Abbildung 26B). Somit scheint ClpC sowohl unter Nicht-Stress-Bedingungen, als auch unter Hitzestress an der Beseitigung oxidativ geschädigter Proteine beteiligt zu sein. Eine Deletion von *hrcA* führt, wie schon erwähnt zu einer erhöhten Expression von DnaK und GroEL, wobei sich das nach dem letalen Hitzeschock bei 53 °C im Vergleich zum Wildtyp positiv auf das Aggregationslevel auswirkte (Abbildung 16). Jedoch konnte im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied im Grad der Proteincarbonylierung unter Thermotoleranzbedingungen festgestellt werden. Dies war auch zu erwarten, da die geringere Aggregatmenge hauptsächlich auf die Überexpression von DnaK und GroEL in dieser Mutante zurückgeführt werden kann.

Zusammenfassend können die Aussagen getroffen werden, dass Hitzestress möglicherweise zu einer erhöhten Proteinoxidation führt, die durch die Induktion von Spx jedoch verhindert werden kann.



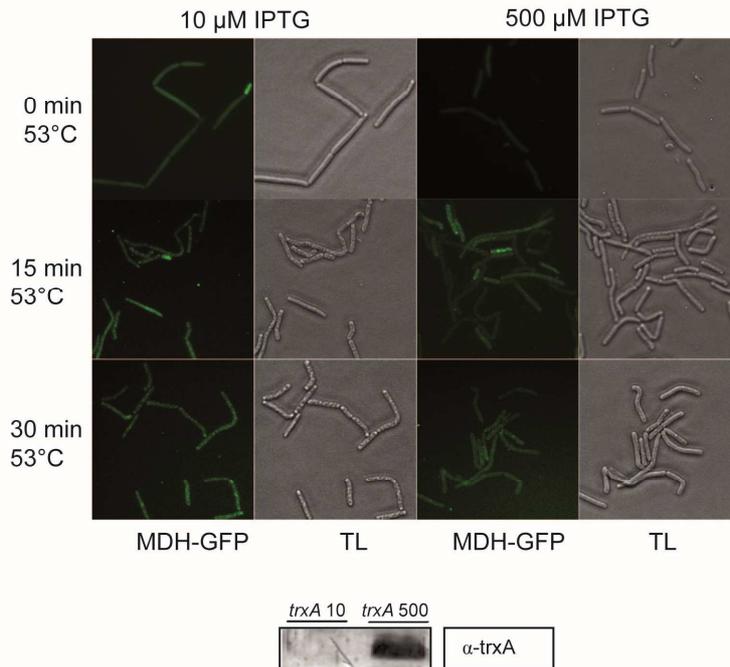
**Abbildung 26: Die Entstehung von Proteincarbonylierung unter Hitzestressbedingungen im *B. subtilis* Wildtyp und verschiedenen Mutanten.** A) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von *B. subtilis* Wildtyp Zellen, die sowohl mit als auch ohne den fünfzehnminütigen 48 °C Präschock für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurden, hergestellt. Proteincarbonylgruppen an den Proteinseitenketten wurden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP-Hydrazon) derivatisiert. Diese derivatisierten Proteinproben wurden anschließend unter Verwendung einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Carbonylgruppen wurden mittels eines für DNP-Gruppen spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ -DNP) in der Western Blot Analyse sichtbar gemacht. B)+C) Die Zellen und die hergestellten Proteinproben der *clpC*- (BNM105) (B) und der *hrcA* Mutante (BAH42) (C), die nach der in A) beschriebenen Prozedur behandelt wurden, wurden mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines für DNP-Gruppen spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ -DNP) mit den Proteinproben des Wildtyp Stammes, die nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden, verglichen. D)+E) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *clpX*- (BNM107) (D) und der *clpP* Mutante (BNM103) (E), die für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurden, hergestellt. Diese Proteinproben wurden wie unter A) beschrieben, behandelt und anhand der Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für DNP-Gruppen ist, auf Proteincarbonylgruppen mit denen des gleich behandelten Wildtyp Stammes verglichen. F) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von der *spx* Mutante (BNM111), die einem fünfzehnminütigen 48 °C Präschock und anschließend für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurde, hergestellt. Diese Proteinproben wurden wie unter A) beschrieben, behandelt und anhand der Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für DNP-Gruppen ist ( $\alpha$ -DNP), auf Proteincarbonylgruppen mit denen des gleich behandelten Wildtyp Stammes verglichen. G) Der *B. subtilis* *P<sub>HY</sub>-spxDD* Stamm BNM810 wurde bei 37 °C angezogen. In der frühen exponentiellen Phase wurde die Expression von SpxDD durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert, die Zellen wurden für weiter 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt. Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden hergestellt und wie unter A) beschrieben, behandelt. Hiernach wurden sie anhand der Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für DNP-Gruppen ist ( $\alpha$ -DNP), auf Proteincarbonylgruppen mit denen des gleich behandelten Stammes, in dem die Induktion der Expression von SpxDD jedoch ausblieb, verglichen. H)+I) Die Zellen und die hergestellten Proteinproben der *clpX spx*- (BSR109) (H) und der *clpP spx* Doppelmutante (BSR110) (I), die nach der in A) beschriebenen Prozedur behandelt wurden, wurden mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines für DNP-Gruppen spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ -DNP) mit den Proteinproben der *clpX* (BNM107) beziehungsweise der *clpP* Mutante (BNM103), die nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden, verglichen.

Spx ist als Regulator der thiol-spezifischen, oxidativen Stressantwort in der Lage, die Zelle vor Thiolstress zu schützen. Zusätzlich führte nach den hier gezeigten Ergebnissen eine erhöhte Menge an Spx unter Hitzestressbedingungen zu einer verringerten Oxidation und Aggregation von cytosolischen Proteinen. Dies vermittelt den Eindruck, dass nicht nur unter oxidativem Stress, sondern auch unter Hitzestressbedingungen die Thiolhomöostase und die Kontrolle des Oxidationsstatus von cytosolischen Proteinen von großer Bedeutung für das Überleben und die Verhinderung von Proteinaggregation ist. In diesem Sinne wäre es möglich, dass thiol-spezifische Proteine, die durch Spx induziert werden, direkt das Gleichgewicht zwischen gefalteten, fehlgefalteten und aggregierten Proteinen im Cytosol unter Hitzestress beeinflussen könnten.

### **3.1.7 TrxA ist in der Lage zelluläre Proteinaggregation zu verhindern**

Ein System, das unter der Kontrolle von Spx steht und eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxstatus und bei der Abwehr von oxidativen Stress spielt, besteht aus dem Thioredoxin TrxA und der NADPH-abhängigen Thioredoxin Reduktase TrxB (103, 105). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Expression von TrxA durch eine Vielzahl von Stressbedingungen, unter anderem auch durch Hitze, ausgelöst wird (199). Daher wurde in diesem Kontext der Einfluss von TrxA auf die Thermotoleranz im Hinblick auf Proteinaggregation näher untersucht. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Expression von TrxA in Abhängigkeit von Hitze induziert wird. Zellen, die vor dem letalen Hitzeschock einem Präshock bei 48 °C ausgesetzt waren, wiesen ein erhöhtes TrxA Level auf (Abbildung 6A, Abbildung 27A). Wie schon erwähnt, folgte der SpxDD-Induktion eine vermehrte Expression von TrxA und auch *yjbH*-defiziente Zellen, die durch die Deletion mehr Spx enthielten, wiesen ein gegenüber dem Wildtyp erhöhtes TrxA-Level auf. Zusätzlich konnten weniger Proteinaggregate in Zellen mit einem erhöhten Spx- bzw. SpxDD- und TrxA-Level detektiert werden (Abbildung 23B, 24A). Da TrxA in *B. subtilis* essentiell zu sein scheint (199) und sich daher eine Deletion von TrxA schwierig gestalten würde, wurde für folgende Experimente, in denen der Einfluss von TrxA auf die zelluläre Proteinaggregation untersucht werden sollte, Gebrauch von einem Stamm gemacht, in dem sich das Gen für TrxA unter Kontrolle eines IPTG-abhängigen  $P_{SPAC}$  Promotors befindet (199–201). Somit wird in diesem Stamm das Level an TrxA durch die Menge an zugegebenem IPTG kontrolliert. Eine Induktion mit 10  $\mu$ M IPTG erlaubte dem Stamm ein

normales Wachstum und die Entstehung von Suppressormutanten, die dem Stamm eine Expression von TrxA ohne die Zugabe von IPTG ermöglichen, wurde verhindert. Jedoch bewegten sich die TrxA Level unter der Detektionsgrenze der Western Blot Analyse (Abbildung 27B). Wurde der Stamm hingegen mit 500  $\mu$ M IPTG induziert konnte gegenüber dem Wildtyp eine etwas erhöhte Menge an TrxA beobachtet werden. Abbildung 27 C und D machen deutlich, dass eine erhöhte Menge an TrxA nach einem letalen Hitzeschock dazu beitragen konnte, zelluläre Proteinaggregation zu verhindern, da nach Induktion mit 500  $\mu$ M IPTG deutlich weniger Aggregate oder MDH-GFP bildende Foci im Vergleich zu den Zellen mit einer erniedrigten TrxA-Menge (10  $\mu$ M IPTG) nach der Inkubation bei 53 °C nachweisbar waren.

**D**

**Abbildung 27: Der Einfluss des Spx-regulierten Thioredoxins TrxA auf die Entstehung von Aggregaten unter Hitzestressbedingungen in *B. subtilis*.** A) Das Level von TrxA im Gesamtzellextrakt (CE) des *B. subtilis* Wildtyp Stammes, der nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurde, wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. B) Das Gesamtzellextrakt (CE) des *B. subtilis* Wildtyp Stammes und des *B. subtilis* Stammes BSR97, in dem die Expression von TrxA durch den induzierbaren  $P_{SPAC}$  Promotor kontrolliert wird (*ItrxA*) (199) und der in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  IPTG angezogen wurde, wurde hergestellt, nachdem diese Stämme für 0, 15 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurden. Anschließend wurde von diesen Gesamtzellextrakten das Level von TrxA mittels Western Blot Analyse bestimmt. C) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) des *B. subtilis ItrxA* Stammes BSR97, der in der Anwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  IPTG angezogen und für 0 und 30 Minuten 53 °C ausgesetzt wurde, wurden mit den CE, SN und P des gleichen Stammes, der in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  IPTG angezogen wurde, anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen TrxA verglichen. D) Der *B. subtilis ItrxA* Stamm mit einer *mdh*-GFP Fusion (BSR18) wurde in 10 und 500  $\mu\text{M}$  IPTG angezogen, wobei das Level von TrxA mittels Western Blot Analyse bestimmt wurde und einer Temperatur von 53 °C für 15 und 30 Minuten ausgesetzt. Proben, die vor und 15 beziehungsweise 30 Minuten nach dem 53 °C Hitzeschock genommen wurden, wurden im Durchlicht (TL) und fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung des GFP-Filters (MDH-GFP) analysiert. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

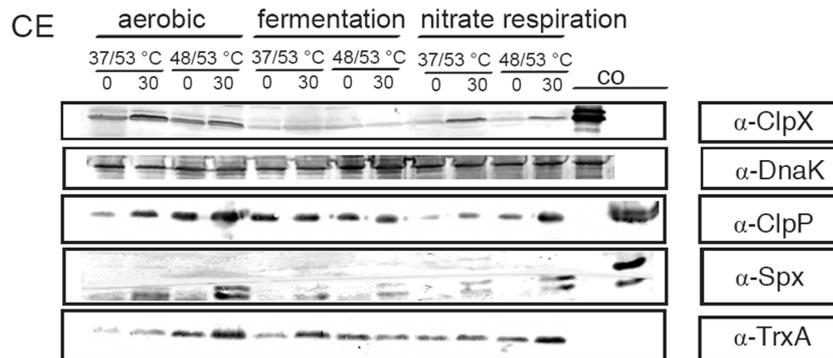
### **3.1.8 Anaerobes Wachstum schützt *B. subtilis* Zellen vor Hitze-induzierter Aggregation**

Die beobachteten Effekte von Spx oder TrxA lassen eventuell darauf schließen, dass Hitzestress zu einer Oxidierung von Proteinen führt, die daraufhin aggregieren. Daher stellte sich die Frage, ob Hitzestress in Zellen, die unter anaeroben Bedingungen, also ohne Zufuhr von, eigentlich für Oxidierungen benötigtem Sauerstoff wachsen auch zu Proteinaggregation führt. *B. subtilis* kann als fakultativ aerobes Bakterium auch unter anaeroben Bedingungen wachsen (282). Während im Falle der Nitratatmung Nitrat als Elektronenakzeptor anstatt

Sauerstoff benutzt wird, findet die Fermentation in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors statt. Energie wird im Prozess der Fermentation durch Substratkettenphosphorylierung generiert, wobei Pyruvat dazu benutzt wird, NADH aufgrund fehlender Elektronentransportkette zu reoxidieren, so dass die Glykolyse weiterlaufen kann. *B. subtilis* benötigt zum fermentativen Wachstum sowohl Glukose also auch Pyruvat. Im Rahmen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* Zellen einen plötzlichen Hitzeschock in der Abwesenheit von Sauerstoff besser überlebten (eingereichtes Manuskript). Abbildung 28 A, B zeigt, dass die Zellen, die unter anaeroben Bedingungen wuchsen, wobei die Methode der Fermentation oder der Nitratatmung keinen Unterschied erbrachte, eine deutlich geringere Proteinaggregation nach dem 53°C Schock aufwiesen als die Zellen, die den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren, aber aerob wachsen konnten. Wurden die Zellen einem zusätzlichen Präschock bei 48 °C ausgesetzt, reduzierte sich das Aggregatlevel zusätzlich. Außerdem wurde das Expressionsmuster von MDH und ausgewählten Chaperonen und Proteasen, sowie TrxA und Spx mittels Western Blot Analyse untersucht, um das Thermotoleranzverhalten unter anaeroben Bedingungen genauer zu charakterisieren (Abbildung 28C, D) und um es mit dem unter aeroben Bedingungen zu vergleichen (Abb 6A). Dabei wirkte sich Fermentation nicht unterschiedlich zur Nitratatmung aus. MDH wies, zusammen mit den anderen Chaperonen und Proteasen eine deutlich geringere Lokalisation mit der unlöslichen Fraktion nach dem 53 °C Hitzeschock auf, was auf ein insgesamt niedrigeres Aggregatlevel zurückzuführen ist. ClpX und Spx erweckten den Anschein ein geringeres Expressionslevel als der aerob gewachsene Wildtyp aufzuweisen. Daher wurde eine weitere Western Blot Analyse durchgeführt, in der das Expressionslevel ausgesuchter Proteine unter Thermotoleranzbedingungen der Zellen, die anaeroben Bedingungen ausgesetzt waren direkt mit denen, die zur Atmung befähigt waren, verglichen wurde (Abbildung 28E). Es konnte in der Tat eine geringere Menge an ClpX und eine etwas geringere Menge an ClpP unter anaeroben Bedingungen detektiert werden, während das Expressionslevel von DnaK eher keinen Unterschied zum aerob gewachsenen Stamm aufzeigte. Von Spx wurde nur sehr wenig produziert, waren die Zellen anaeroben Bedingungen ausgesetzt. Jedoch konnte seine Expression noch deutlich durch Hitze induziert werden, was nur zu einem sehr geringen Ausmaß auch für TrxA beobachtet werden konnte. Daher könnte vermutet werden, dass die hitzevermittelte Induktion von Spx unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff ist. Die Fähigkeit von Spx das *trxA* Gen hochzuregulieren, die von der Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke unter oxidativen Bedingungen abhängt (184, 193, 194), könnte hier, in der Abwesenheit von Sauerstoff blockiert sein.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass generell weniger Proteine nach einem Hitzeschock aggregieren, wenn den Zellen kein Sauerstoff für die Atmung zur Verfügung steht.

E



**Abbildung 28: Der Einfluss des anaeroben Wachstums auf die Entstehung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in *B. subtilis*.** A) Die Aggregatfraktion (P) von *B. subtilis* Wildtyp Zellen, die anaerob durch Fermentation in Anwesenheit von Glukose und Pyruvat unter Thermotoleranzbedingungen angezogen wurde, wurde mit der Aggregatfraktion von Wildtyp Zellen verglichen, die anaerob den gleichen Thermotoleranzbedingungen ausgesetzt wurden. B) Siehe A), jedoch diente den Zellen hier Nitrat während des anaeroben Wachstums als Elektronenakzeptor (Nitratatmung) C)+D) Der Gesamtzellextrakt (CE), der lösliche Überstand (SN) und die Aggregatfraktion (P) wurden von *B. subtilis* Wildtypzellen, die ohne Sauerstoffzufuhr mittels Fermentation (C) oder Nitratatmung (D) angezogen wurden und, die nach dem beschriebenen Thermotoleranzprotokoll aufgezogen und behandelt wurden hergestellt und anhand SDS-PAGE, mittels Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse mit den angezeigten Antikörpern untersucht, wobei jeweils 100 ng des entsprechenden Proteins als Positivkontrolle (co) geladen wurde. E) Der *B. subtilis* Wildtyp Stamm wurde aerob oder anaerob mittels Fermentation oder Nitratatmung angezogen. Das Gesamtzellextrakt (CE) wurde von diesen Zellen hergestellt, nachdem sie einem 53 °C Hitzeschock für 0 und 30 Minuten ausgesetzt wurden und eine Western Blot Analyse mit den angezeigten Proteinen durchgeführt.

## **3.2 Die Rolle des Chaperons HtpG und seine Bedeutung für die Evolution in Prokaryoten**

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wird prokaryotisches HtpG, das Homolog zu Hsp90 näher untersucht. HtpG und Hsp90 sind zwar in ihrer dreidimensionalen Struktur hochkonserviert (128, 129), jedoch scheint HtpG im Gegensatz zu eukaryotischen Hsp90 weder unter normalen Bedingungen noch unter Stress essentiell für das Überleben der bakteriellen Zelle zu sein (123). Auch insgesamt ist seine Funktion in Bakterien noch nicht eindeutig geklärt, wobei für Hsp90 gezeigt werden konnte, dass es neben seiner Rolle als Chaperon und wichtiger Zellregulator einen bedeutenden Einfluss auf die Evolution von Eukaryoten hat (8), indem es in der Lage ist als genetischer Puffer zu agieren (134). In diesem Zusammenhang sollte die Bedeutung von HtpG, auch im Hinblick der Möglichkeit, dass es eine Rolle bei evolutionären Prozessen spielen kann, für die bakterielle Zelle genau studiert werden.

### **3.2.1 Biochemische Charakterisierung von HtpG aus *B. subtilis***

Prokaryotisches HtpG aus *E. coli* besitzt wie auch eukaryotisches Hsp90 eine N-terminale ATPase-Domäne mit einer sehr schwachen ATPase-Aktivität (128, 129) und beide liegen zumeist als Dimer in der Zelle vor (283, 284). Dies sollte auch für HtpG aus *B. subtilis* bestätigt werden.

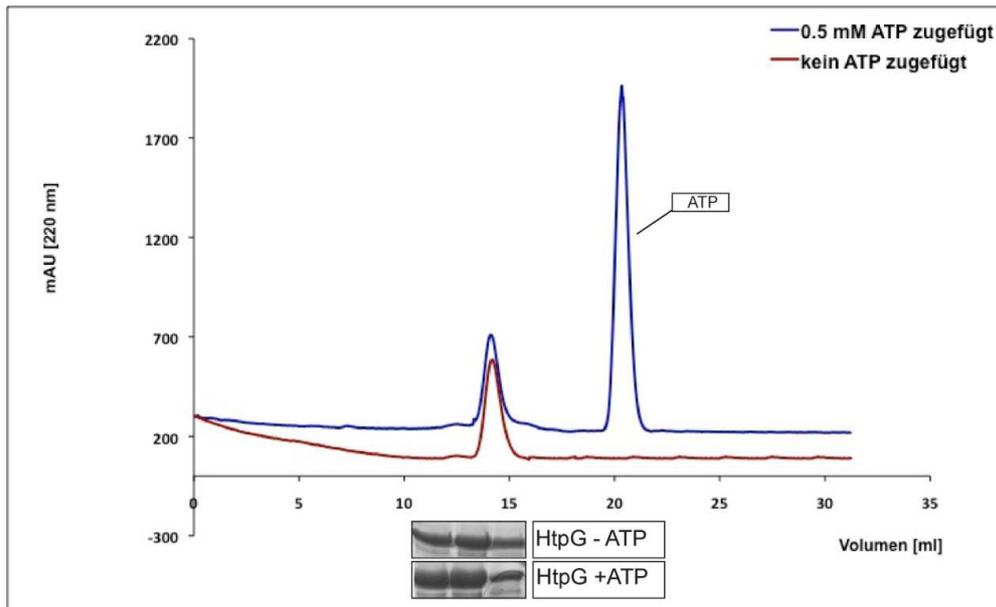
#### **3.2.1.1 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von HtpG mittels analytischer Gelfiltration**

Um den Oligomerisierungszustand von HtpG sowohl vor, als auch nach ATP-Zugabe zu untersuchen, wurde ein Gelfiltrationsexperiment durchgeführt. Dies geschah mit Unterstützung von Pia Ehrentraut im Rahmen ihrer Master Thesis. Hierzu wurde zunächst das Laufverhalten von Eichproteinen mit bekannter Größe erstellt, um eine Kalibrierung zu ermöglichen (siehe Tabelle 15). Anschließend wurde das Elutionsvolumen von HtpG bestimmt (Abbildung 29), um anhand der Kalibrierung das Molekulargewicht von HtpG berechnen zu können (Tabelle 15). Als Monomer hat HtpG ein Molekulargewicht von 72 kDA und es eluierte in Abwesenheit von ATP nach 14,22 ml. Die Zugabe von 0,5 mM ATP hatte keinen Einfluss auf das Elutionsverhalten von HtpG und es eluierte nach 14,11 ml.

Daraus berechnet sich ein ungefähres Molekulargewicht von 350 bis 400 kDA, was einem hochmolekularen Komplex aus vier bis fünf HtpG-Molekülen entspricht. Die Identität von HtpG konnte mittels einer Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen HtpG bestätigt werden (Abbildung 29). Der zweite Peak kann nicht gebundenem ATP zugeordnet werden, das auch bei 220 nm absorbiert.

<b>Ausschlussprotein</b>	<b>Peak [ml]</b>	<b>Größe [kDa]</b>
Blue Dextran	7,44	
<b>Eichproteine</b>		
Ferritin	14,55	440
BSA	16,58	66
Aldolase	16,01	158
Rnase A	18,98	13,7
Thyroglobulin	12,49	670
Katalase	15,59	232
Ovalbumin	17,16	43
Chymotrypsinogen	18,34	25
<b>HtpG</b>		
HtpG minus ATP	14,22	364,7
HtpG plus ATP	14,11	391,6

**Tabelle 15: Kalibrierung der Superose 6 und Berechnung des Molekulargewichts von HtpG.** Das Elutionsverhalten (Peak [ml]) und das Molekulargewicht (Größe [kDa]) des Ausschlussproteins und der Eichproteine sind angezeigt. Aus dem Elutionsverhalten konnte im Zuge der Kalibrierung auf das Molekulargewicht von HtpG geschlossen werden.



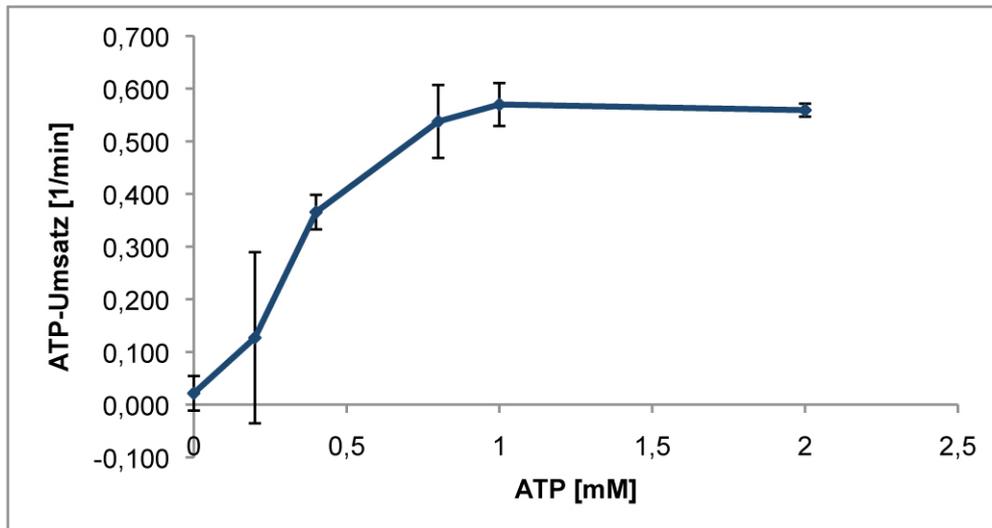
**Abbildung 29: Analytische Gelfiltration von HtpG.** Die analytische Gelfiltration wurde von 10  $\mu\text{M}$  gereinigtem HtpG, das mit 5  $\mu\text{M}$  ATP vorinkubiert wurde, in Anwesenheit von 0,5 mM ATP im Laufpuffer durchgeführt (blaue Kurve). Die rote Kurve repräsentiert das Elutionsprofil von 10  $\mu\text{M}$  HtpG in Abwesenheit von ATP. Die Elution der HtpG Proteine wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm bestimmt, wobei die Identität des ersten Peaks mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen HtpG analysiert wurde. Der zweite Peak entsprach eluiertem, nicht gebundenem ATP.

### 3.2.1.2 Charakterisierung der ATPase-Aktivität von HtpG

Um die ATPase-Aktivität von HtpG aus *B. subtilis* zu bestimmen, wurde ein Enzymgekoppelter ATPase Assay eingesetzt (285). Dieser beruht auf der ADP-abhängige Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat durch die Pyruvatkinase, welches durch die Lactatdehydrogenase NADH-abhängig zu Lactat umgesetzt wird. Das ADP aus dem ersten Schritt wird durch die ATPase bereitgestellt. Somit kann der Verbrauch von NADH in ATPase-Aktivität umgerechnet werden. Ein Vorteil an diesem Assay ist, dass entstehendes ADP sich nicht ansammeln kann, sondern sofort wieder umgesetzt wird. Da bekannterweise HtpG ADP mit einer höheren Affinität bindet und durch dieses inhibiert wird (286), ist die Anhäufung von ADP ein Problem, das häufig bei anderen ATPase Assays nicht ausgeschlossen werden kann. Da HtpG aus *E. coli* und auch eukaryotisches Hsp90 sehr schwache ATPasen darstellen, wurde dies auch von HtpG aus *B. subtilis* erwartet. Um den ATP-Umsatz trotzdem sichtbar zu machen, wurden relativ hohe Mengen an HtpG, nämlich 30  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Dabei besteht die Möglichkeit, dass trotz eines hohen Reinigungsgrades des Proteins andere ATPasen mitgereinigt wurden, die in so geringen enthalten Mengen sind, dass sie mittels SDS-PAGE nicht visualisiert werden können. Diese ATPasen würden bei dieser eingesetzten Menge an HtpG das Ergebnis verfälschen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich

die ATPase-Aktivität von HtpG bestimmt, welches durch den Inhibitor Radicicol gehemmt wurde. Diese Aktivität wurde anschließend von der absoluten Aktivität subtrahiert, wodurch die alleinige ATPase-Aktivität von HtpG bestimmt werden konnte. Abbildung 30 zeigt die Hydrolyseraten von HtpG in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration, wobei das Experiment bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen konnte die Enzymkinetik von HtpG durch die Michaelis-Menten-Kinetik mit einem  $K_M$  von ca. 0,4 mM und einer maximalen Aktivität von ca. 0,7 ATP pro Minute und pro HtpG beschrieben werden, wobei diese Daten durch das Lineweaver-Burk Diagramm gewonnen wurden. Da bei dieser Methode der Auswertung kleine Fehler in der Geschwindigkeit  $v$  bei kleinen Substratkonzentrationen große Abweichung hervorrufen, wurden für die Auswertung nur die Geschwindigkeiten bei 0,4 mM ATP bis 2 mM ATP herangezogen.

Diese Ergebnisse befanden sich im gleichen Rahmen verglichen zu den ermittelten ATPase-Aktivitäten von Hsp90 aus *S. cerevisiae* und HtpG aus *E. coli* (130, 287). Falls HtpG aus *B. subtilis* auch oligomerisiert, was noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (siehe Diskussion), lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass ATP von jeder ATPase-Domäne im HtpG-Oligomer unabhängig voneinander gebunden wird.



**Abbildung 30: Die ATPase-Aktivität von HtpG.** Die ATPase-Aktivität pro Minute und pro Molekül (ATP-Umsatz [1/min]) wurde von 30  $\mu$ M HtpG als Funktion der ATP-Konzentration unter Verwendung eines Enzymgekoppelten ATPase-Assays bestimmt, wobei von der absoluten ATPase-Aktivität die Aktivität von HtpG, welche durch 25  $\mu$ M Radicicol, ein Inhibitor von HtpG gehemmt wurde, subtrahiert wurde. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden der Mittelwert der ATPase-Aktivität und die Standardabweichung bestimmt.

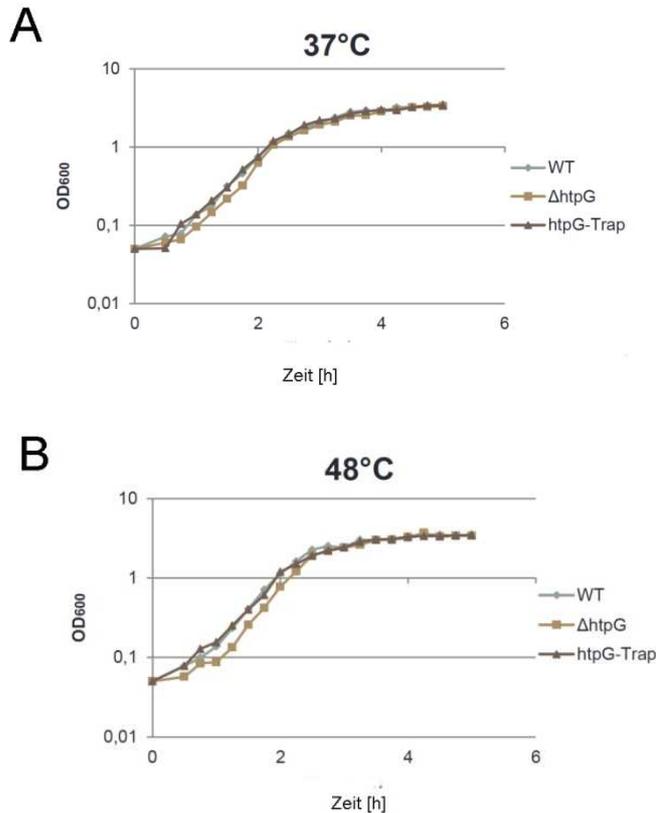
### **3.2.2 Charakterisierung der generellen Rolle des Chaperons HtpG für *B. subtilis***

Bisherige Versuche die Rolle von prokaryotischen HtpG eindeutig zu bestimmen gestalteten sich als sehr schwierig. Besonders für den Modellorganismus *B. subtilis* liegen noch sehr wenig eindeutige Ergebnisse vor. Die einzigen Erkenntnisse beschränken sich auf die Hitzeinduzierbarkeit von HtpG (Abbildung 6A) (123), wobei es trotzdem nicht essentiell unter Hitzestress zu sein scheint (135). Aus diesem Grund wurde versucht die generelle Rolle von HtpG näher zu bestimmen. In diesem Sinne wurde der Einfluss verschiedener *htpG* Doppelmutanten auf die *B. subtilis* Zelle untersucht und mögliche Interaktionspartner von HtpG sollten charakterisiert werden.

#### **3.2.2.1 Einfluss verschiedener *htpG* Doppelmutanten auf das Wachstumsverhalten in *B. subtilis***

Da HtpG, wie schon erwähnt, in *B. subtilis* nicht essentiell ist (135), wurde seine mögliche Funktion untersucht, in dem sein Einfluss auf das Wachstumsverhalten in diesem Bakterium in Doppelmutanten studiert wurde. Für die folgenden Wachstumsexperimente, die mit Unterstützung von Michelle Hussong im Rahmen einer Laborarbeit durchgeführt wurden, wurde sowohl ein *htpG* Deletionsstamm, als auch einer, der eine veränderte Variante von HtpG exprimiert, benutzt und mit Mutanten kombiniert, die in *B. subtilis* einen Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle haben. Diese Variante, im folgenden HtpG Trap (P. Ehrentraut, Master Thesis) genannt, zeichnet sich durch einen einzelnen Basenaustausch in der ATPase Domäne von HtpG aus. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 31 von Glutamat zu Alanin. Das Glutamat an dieser Position spielt eine Rolle als katalytische Base, wobei es ein Proton vom Wassermolekül abzieht, das nun in der Lage ist das  $\gamma$ -Phosphat von ATP anzugreifen und somit die Hydrolyse von ATP zu ermöglichen. Daher ist HtpG Trap zwar in der Lage ATP zu binden, jedoch nicht zu hydrolysieren. Die Verwendung dieser Mutante basiert auf der Hypothese, dass mögliche Substrate, die mit HtpG unter ATP-Bindung interagieren und eigentlich während der Hydrolyse erneut freigesetzt werden, wie es für den eukaryotischen ATPase-Zyklus von Hsp90 gezeigt werden konnte, nun gebunden oder gefangen bleiben und ihre Funktion ebenfalls nicht mehr ausüben können. Somit wäre es möglich, dass ein möglicher Effekt, der durch HtpG verursacht wird, mittels dieser Variante verstärkt wird.

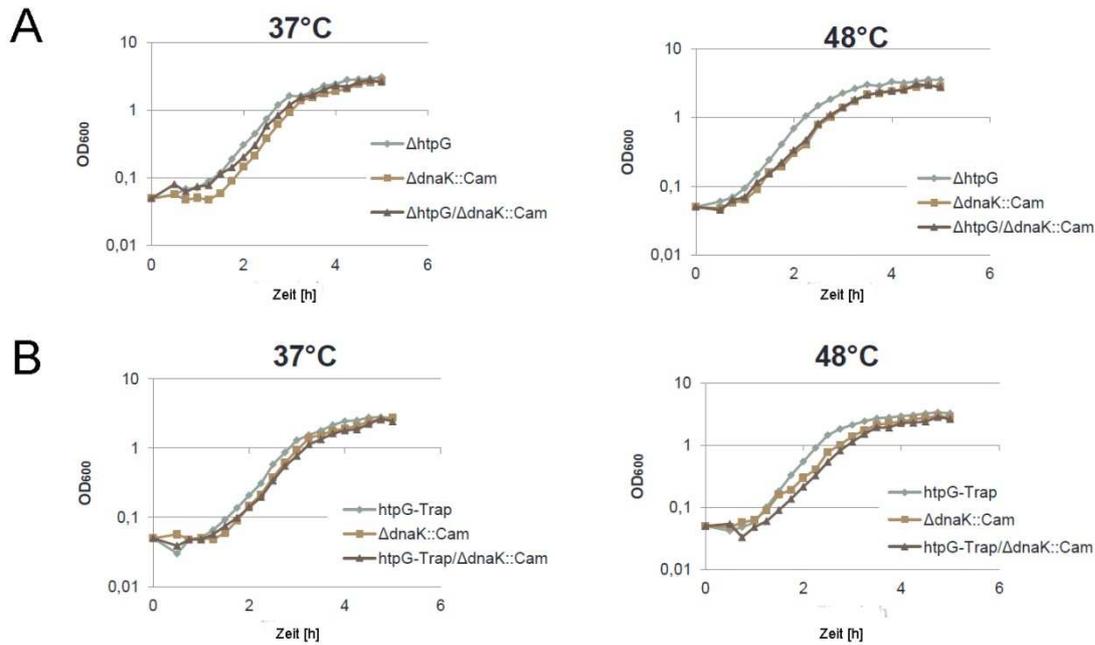
Abbildung 31 zeigt die Wachstumskurven dieser Mutante, im Vergleich zum Wildtyp und zur *htpG* Deletionsmutante bei 37 °C und 48 °C, wobei das Wachstum bei einer OD<sub>600nm</sub> über sechs Stunden verfolgt wurde.



**Abbildung 31: Der Einfluss von HtpG auf das Wachstumsverhalten in *B. subtilis*.** Das Wachstumsverhalten des *B. subtilis* Wildtyp Stammes, der *htpG* Deletionsmutante (BSR101) und der *htpG* Trap Mutante (BSR102) wurden bei 37 °C (A) und 48 °C (B) über einen Zeitraum von sechs Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. In der *htpG* Trap Mutante wurde das Glutamat an Position 13 von einem Alanin ersetzt. Dadurch kann diese HtpG Variante zwar noch ATP binden, jedoch nicht mehr hydrolysieren.

Dabei wird deutlich, dass beide Stämme bei beiden Temperaturen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten. Somit hatte auch die Trap Mutante sowohl unter normalen Bedingungen, als auch unter milden Hitzestressbedingungen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten.

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass HtpG mit dem Dank-Chaperonsystem zusammenarbeiten kann, wobei durch Hitze inaktivierte Modellsubstrate reaktiviert werden konnten (138). Daher besteht die Möglichkeit, dass HtpG auch in *B. subtilis* mit Dnak kooperiert. Um dies zu testen, wurde das Wachstumsverhalten der *htpG/dnaK*- und der *htpG*-Trap/*dnaK* Doppelmutante untersucht (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Der Einfluss, den die beiden Chaperone DnaK und HtpG zusammen auf das Wachstumsverhalten in *B. subtilis* ausüben.** A) Das Wachstumsverhalten der *B. subtilis htpG dnaK* Doppelmutante (BSR105), wurde bei 37 °C und 48 °C über einen Zeitraum von sechs Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. Das Wachstum der *htpG* (BSR101) und *dnaK* (BNM118) Einzelmutante wurde als Kontrolle zusätzlich aufgezeichnet. B) Siehe A), jedoch wurde das Wachstum der *htpG* Trap *dnaK* Doppelmutante (BSR108) betrachtet. Das Wachstum der *htpG* Trap (BSR102) und der *dnaK* (BNM118) Einzelmutante wurde als Kontrolle zusätzlich aufgezeichnet.

Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass die Doppelmutante weder bei 37 °C noch bei erhöhter Temperatur einen Wachstumsdefekt gegenüber den Einzelmutanten aufwies.

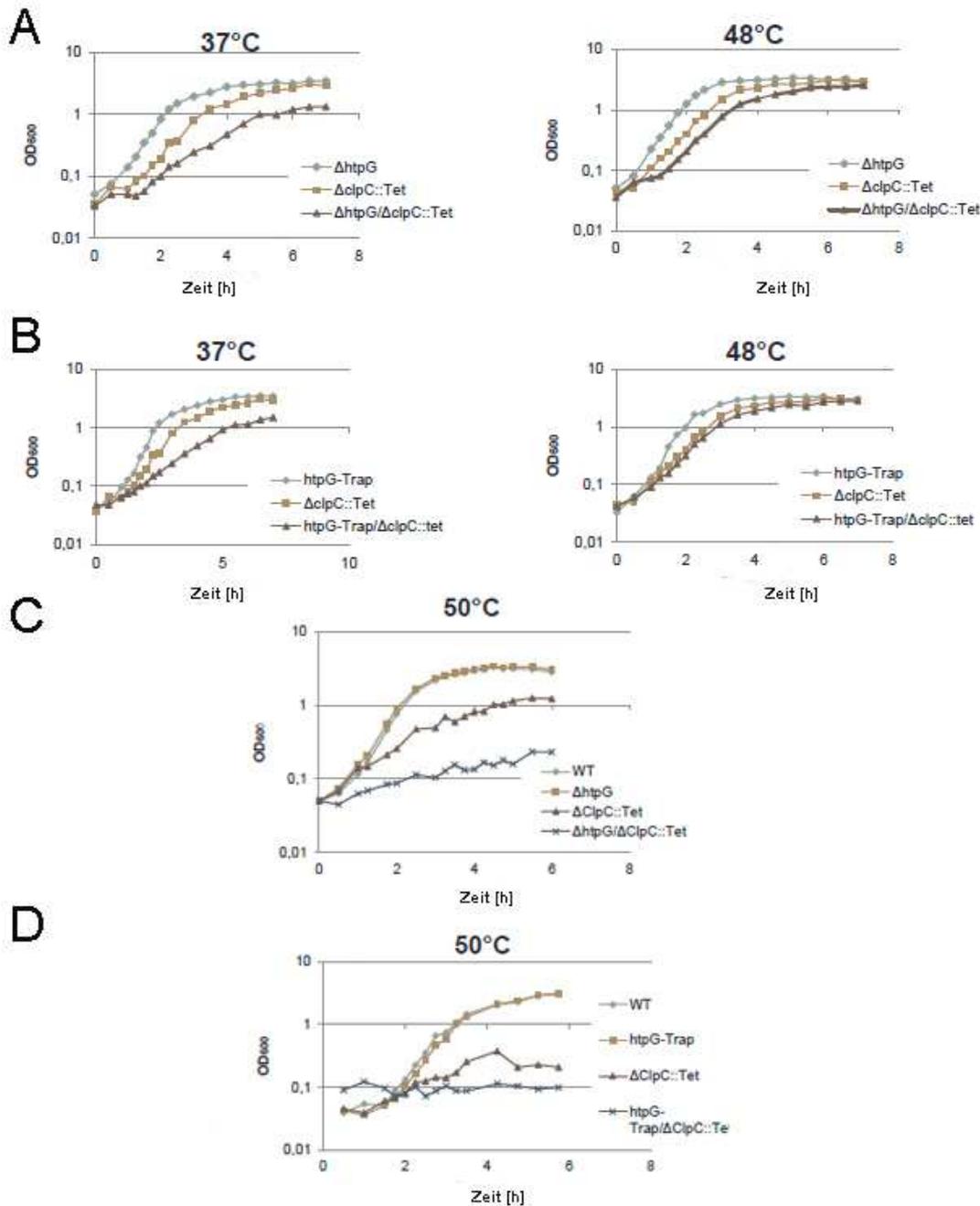
Auch die ClpCP Protease spielt eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle (5), wobei sie auch an der Kontrolle vieler regulatorischer Prozesse (58), unter anderem der Induktion der Hitzeschockantwort (164), beteiligt ist. Es konnte sogar gezeigt werden, dass ClpC in der Lage ist aggregierte Proteine zu disaggregieren und aktiv rückzufalten (83). Daher wurde getestet, ob das Fehlen von HtpG zusammen in der Doppelmutante mit *clpP* und *clpC* einen möglichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten dieses Bakteriums hat. Dabei zeigte die *clpP* Mutante alleine als auch in Kombination mit der *htpG* oder *htpG*-Trap Mutante keinen Wachstumsdefekt bei 37 °C (Abbildung 33).

**Abbildung 33: Der Einfluss, den die Protease ClpP und das Chaperon HtpG zusammen auf das Wachstumsverhalten in *B. subtilis* ausüben.** A) Das Wachstumsverhalten der *B. subtilis htpG clpP* Doppelmutante (BSR103) wurde bei 37 °C und 48 °C über einen Zeitraum von sechs Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. Um eine verlängerte lag Phase zu vermeiden wurde die Übernachtskultur der *clpP* Mutante anstatt bei 37 °C bei 23 °C angezogen. Das Wachstum der *htpG* (BSR101) und *clpP* (BNM103) Einzelmutante wurde als Kontrolle zusätzlich aufgezeichnet. B) Siehe A), jedoch wurde das Wachstum der *htpG* Trap *clpP* Doppelmutante (BSR106) betrachtet. Das Wachstum der *htpG* Trap (BSR102) und der *clpP* (BNM103) Einzelmutante wurde als Kontrolle zusätzlich aufgezeichnet.

Bei 48 °C wiesen sowohl die *clpP* Mutante, als auch beide Doppelmutanten einen signifikanten Wachstumsdefekt, im Vergleich zu der *htpG* oder *htpG*-Trap Mutante auf. Da die Doppelmutanten jedoch kein anderes Wachstumsverhalten im Vergleich zu der *clpP* Mutante an den Tag legten, beruhte das schlechtere Wachstum der Doppelmutanten auf der Deletion von *clpP*.

Sowohl die *clpC* Einzelmutante, als auch die Kombinationen aus *clpC* und *htpG* beziehungsweise *htpG*-Trap beeinflussten das Wachstum bei 48 °C nicht (Abbildung 34A,B). Bei 37 °C führte das Fehlen von *clpC* jedoch zu vermindertem Wachstum, wobei die Doppelmutanten noch einen größeren Wachstumsdefekt aufwiesen. Da eine Temperaturerhöhung auf 48 °C einen sehr milden Hitzeschock für *B. subtilis* darstellt, wurde der Effekt der *clpC/htpG* bzw. der *clpC/htpG*-Trap Doppelmutante auch bei 50 °C untersucht (Abbildung 34C,D). Im Gegensatz zum Wachstum bei 48 °C, zeigten die untersuchten Stämme bei 50 °C einen deutlichen Wachstumsdefekt. Das Wachstum der *clpC* Einzelmutante war gegenüber der *htpG* beziehungsweise *htpG*-Trap Mutante erniedrigt und

die Doppelmutanten zeigten kein Wachstum mehr.



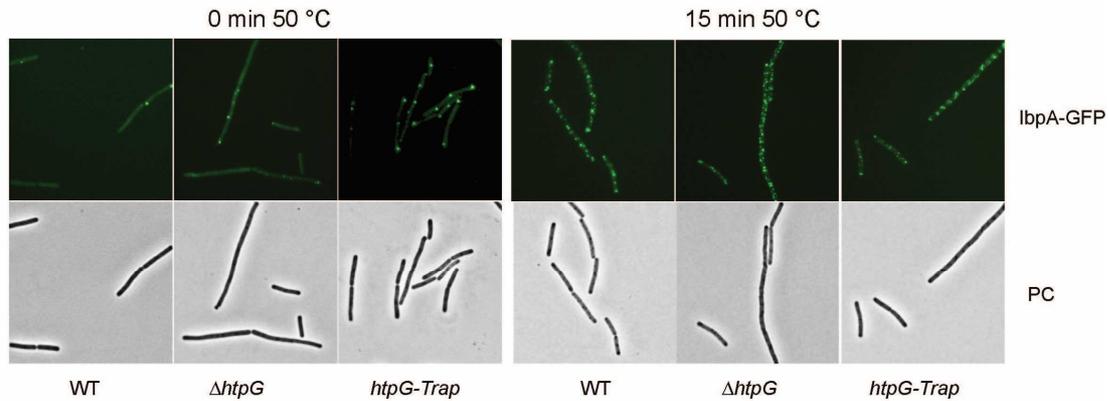
**Abbildung 34: Der Einfluss, den die AAA+ ATPase ClpC und das Chaperon HtpG zusammen auf das Wachstumsverhalten in *B. subtilis* ausüben.** A) Das Wachstumsverhalten der *B. subtilis* *htpG clpC* Doppelmutante (BSR104), wurde bei 37 °C und 48 °C über einen Zeitraum von sechs Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. Das Wachstum der *htpG* (BSR101) und *clpC* (BNM105) Einzelmutante wurde als Kontrolle zusätzlich aufgezeichnet. B) Siehe A), jedoch wurde das Wachstum der *htpG* Trap *clpC* Doppelmutante (BSR107) betrachtet. Das Wachstum der *htpG* Trap (BSR102) und der *clpC* (BNM105) Einzelmutante wurde als Kontrolle zusätzlich aufgezeichnet. C) Siehe A), jedoch wurde das Wachstumsverhalten der Stämme bei 50 °C aufgezeichnet und der *B. subtilis* Wildtyp Stamm als Kontrolle eingeschlossen. D) Siehe B), jedoch wurde das Wachstumsverhalten der Stämme bei 50 °C aufgezeichnet und der *B. subtilis* Wildtyp Stamm als Kontrolle eingeschlossen.

### 3.2.2.2 Einfluss von HtpG in Kombination mit ClpC auf die Hitze-induzierte Aggregatentstehung

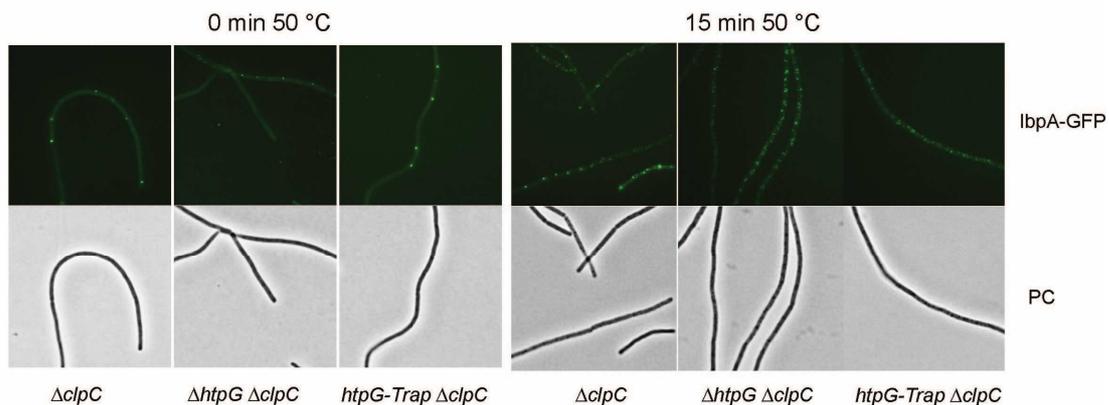
Da beobachtet werden konnte, dass die Deletion von *htpG* beziehungsweise inaktives HtpG in Kombination mit der Deletion von *clpC* zu einem Wachstumsdefekt bei 37 °C und 50 °C führt, besteht die Möglichkeit, da beide Proteine den molekularen Chaperonen zugeordnet werden, dass die Doppelmutante einen Effekt auf die Hitze-induzierte Aggregatentstehung aufweist. Dazu wurde die Lokalisation von IbpA-GFP, der hier als Marker für Proteinaggregation diente, in den jeweiligen Mutanten im Fluoreszenzmikroskop bei 50 °C untersucht. In Abbildung 35A kann deutlich die Aggregatentstehung nach einem Hitzeschock bei 50 °C beobachtet werden. Diese schien sich auch in der *htpG* beziehungsweise *htpG*-Trap Mutante nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die GFP-enhaltenen Foci, die schon vor dem Hitzeschock bei 37 °C sichtbar waren, sind vermutlich auf die durch IbpA ausgelöste artifizielle Foci-Entstehung zurückzuführen (siehe 3.1.1.2). Eine zusätzliche Deletion von ClpC hatte keinen Einfluss auf die Aggregatentstehung nach dem 50 °C Hitzeschock im Vergleich zu den Einzelmutanten (Abbildung 35B).

Somit kann eine vermehrte Hitze-induzierte Aggregatentstehung in dieser Doppelmutante eindeutig ausgeschlossen werden und scheint damit nicht der Grund für den Wachstumsdefekt bei 37 °C oder 50 °C zu sein (Abbildung 34).

A



B



**Abbildung 35: Der Einfluss, den die AAA+ ATPase ClpC und das Chaperon HtpG zusammen auf die hitze-induzierte Aggregatentstehung in *B. subtilis* ausüben.** A) Die *B. subtilis htpG* Deletionsmutante (BSR40) und die *htpG* Trap Mutante (BSR41), welche die *ibpA*-GFP Fusion ektopisch im *amy*-Lokus in Abhängigkeit eines Xylose-induzierten Promotors exprimieren, wurden vor und 15 Minuten nach einem 50 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (IbpA-GFP) analysiert. Der *B. subtilis* Wildtyp Stamm BNM216 mit der *ibpA*-GFP Fusion wurde zusätzlich als Kontrolle untersucht. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt. B) Die *B. subtilis clpC htpG* (BSR43) und die *htpG* Trap *clpC* Doppelmutante (BSR42) mit der *ibpA*-GFP Fusion wurden vor und 15 Minuten nach einem 50 °C Hitzeschock im Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung des GFP-Filters (IbpA-GFP) analysiert. Die *B. subtilis clpC* Mutante BEM4 mit der *ibpA*-GFP Fusion wurde zusätzlich als Kontrolle untersucht. Repräsentative Bilder wurden ausgewählt.

### 3.2.2.3 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von HtpG

Um Interaktionspartner des HtpG-Proteins zu identifizieren, wurde eine Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung des Wildtypstammes und der *htpG-Trap* Mutante durchgeführt. Dies geschah mit Unterstützung von Lea Stahmer und Stephanie Braun im Rahmen ihrer Bachelor- und Master Thesis. Der *htpG* Deletionsstamm diente dabei als Negativkontrolle. Mögliche Substrate, die an HtpG binden, können aus den hergestellten Proteinextrakten dieser Stämme mittels Antikörpern gegen HtpG präzipitiert werden. Mit Hilfe magnetischer Beads, die den Antikörper erkennen, wurde der gesamte Komplex anschließend isoliert. Ein Teil der für die Proteinextraktion verwendeten Kulturen wurden vor der Lyse mit Formaldehyd versetzt, um Proteininteraktionen *in vivo* zu fixieren. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen wiederholt, wobei die Ergebnisse der darauffolgenden SDS-PAGEs nach einer Coomassie-Färbung in den Abbildungen 36 zusammengefasst sind. Als Kontrolle (co) diente jeweils 1 µg aufgereinigtes HtpG. Deutlich zu identifizieren sind Banden, die sowohl durch den Antikörper präzipitiertes HtpG, als auch den Antikörper selbst, der durch das Aufkochen in seine schweren (H, 50 kDa) und leichten Kette (L, 25 kDa) zerfallen ist, darstellen. Banden, die in der Negativkontrolle, also der  $\Delta$ *htpG*-Mutante nicht vorkommen, dafür aber beim Wildtyp und HtpG-Trap nachweisbar sind, könnten möglichen Interaktionspartnern von HtpG entsprechen. Diese wurden isoliert und mit freundlicher Unterstützung von Günther Kramer (ZMBH, Universität Heidelberg) und von dem MS-Service der Universität Heidelberg massenspektrometrisch untersucht (1A-I, 1M, 2A-I, 2K-2P, 2S, 2R). Alle isolierten Banden, welche ein K tragen, sind die Kontrollbanden. Es ist davon auszugehen, dass Proteine vorhanden waren, obwohl sie mit bloßem Auge nicht erkennbar sind. Deshalb war es notwendig, die Banden der Negativkontrolle auf der gleichen Höhe mit zu isolieren. Zusätzlich ist es möglich, dass die ausgeschnittenen Proteinbanden mehrere Proteine enthielten. Hierbei hilft die Kontrolle, die eventuell falsch positiven Proteine auszuschließen.

**Abbildung 36: Ko-Immunopräzipitation mit HtpG.** A) Die Ko-Immunopräzipitation wurde unter Verwendung des *B. subtilis* Wildtyp Stammes (Wildtyp) und der *htpG* Trap Stamm (BSR102) (TRAP) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der *htpG* Deletionsstamm (BSR101) ( $\Delta$ htpG). Ein Teil der für die Proteinextraktion verwendeten Kulturen wurde für 20 Minuten mit 0,6 % Formaldehyd versetzt (+Formaldehyd), wobei der andere Teil so belassen wurde (-Formaldehyd). Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen HtpG und unter Verwendung von magnetischen Beads wurden Substrate die an HtpG gebunden haben aus den hergestellten Proteinextrakten, wobei jeweils 1 mg verwendet wurde, präzipitiert und mittels SDS-PAGE unter Verwendung von Coomassie-Färbung analysiert (großes Gel mit B 23 cm/H 18 cm). Als Kontrolle (co) diente 1  $\mu$ g aufgereinigtes HtpG. Gekennzeichnete Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht, wobei präzipitierte Proteine aus dem Proteinextrakt der *htpG* Deletionsmutante als Kontrolle (K) dienten. Extra gekennzeichnet ist die Bande die HtpG selbst darstellt und die schwere (H) und leichte Kette des Antikörpers (L) B) Unabhängige Wiederholung von A), allerdings wurde ein kleines Gel (B 10 cm/H 7,5 cm) verwendet.

Die Auswertung wurde mit dem Programm Scaffold Viewer vorgenommen, wobei die Protein Wahrscheinlichkeit auf 99%, die Anzahl der Peptide auf mindestens 1 und die Peptid Wahrscheinlichkeit auf 95 % gesetzt wurde.

In Tabelle 16 sind die identifizierten Proteine, die in keiner Kontrolle auftauchten

zusammengefasst. Die Anzahl der jeweils identifizierten Peptide ist in Klammern gezeigt. Identifizierte Proteine, die zwar nicht in der dazugehörigen Kontrolle auftauchten, jedoch in einer gleichwertigen Kontrolle (Kontrolle befindet sich auf gleiche Höhe, aber Probe wurde nicht gleich behandelt, z.B. K1 und K6) nachgewiesen werden konnten, sind in Tabelle 17 gezeigt.

<b>Bande</b>	<b>Identifiziertes Protein</b>	<b>Molekulargewicht (kDa)</b>
1B	Glutamin:Fruktose-6-Phosphat Aminotransferase (5)	65
1B	Aerobe Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (8)	63
1B	Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase (7)	63
1H	PTS-Komponente EIIABC (2)	67
1H	Glutamin:Fruktose-6-Phosphat Aminotransferase (1)	65
1H	Aerobe Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (15)	63
1H	Triggerfaktor (5)	47
2C	Trehalose-6-Phosphat Hydrolase (4)	65
2F	Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphotransferase (1)	63
2F	Triggerfaktor (3)	47
2I	Uridylat Kinase (4)	26
2L	50S ribosomales Protein L1 (3)	25
2M	Pyruvat Dehydrogenase E1 Komponent UE B (11)	35
2N	Pyruvat Dehydrogenase E1 Komponent UE B (1)	35

**Tabelle 16: Mögliche Interaktionspartner von HtpG.** Identifizierte Proteine, die nicht in der dazugehörigen Kontrolle auftauchten wurden der entsprechenden Proteinbande zugeordnet. In Klammern ist die Anzahl der gefundenen Peptide angezeigt.

<b>Bande</b>	<b>Identifikation auch in nicht gleichwertiger Kontrolle</b>	<b>Molekulargewicht (kDa)</b>	<b>Peptidmenge in Kontrolle</b>
1A	RNA-Polymerase UE B (32)	134	K6 (3), K1 (0)
1A	RNA-Polymerase UE C (25)	134	K6(9), K1 (0)
1C	RNA-Polymerase UE B (1)	134	K6 (3), K1 (0)
1H	Dihydrolipoyl Dehydrogenase (2)	50	K3 (6), K8 (0)
2C	Vegetative Katalase (2)	55	K8 (2), K3 (0)
2N	L-Lactat-Dehydrogenase (2)	35	K4 (2), K9 (0)

2R	50S ribosomales Protein L20 (1)	14	K14 (2), K13 (0)
2S	30S ribosomales Protein S6 (3)	11	K13 (1), K14 (0)
2S	50S ribosomales Protein L32 (1),	7	K13 (1), K14 (0)

**Tabelle 17: Mögliche Interaktionspartner von HtpG, die jedoch in einer gleichwertigen Kontrolle auftauchten.** Identifizierte Proteine, die nicht in der dazugehörigen Kontrolle, jedoch in einer gleichwertigen Kontrolle auftauchten wurden der entsprechenden Proteinbande zugeordnet. In Klammern ist die Anzahl der gefundenen Peptide angezeigt.

Einige dieser identifizierten Proteine sind am Stoffwechsel von *B. subtilis* beteiligt. Auch konnten ribosomale Protein und das Chaperon Triggerfaktor als mögliche Clients von HtpG identifiziert werden. Ebenso wurden Untereinheiten der RNA-Polymerase in den Proben, die nicht mit Formaldehyd behandelt wurden, identifiziert. Leider konnten diese in den Kontrolle der Formaldehyd-behandelten Proben, die sich auf gleicher Höhe zu der jeweiligen Bande befanden, nachgewiesen werden, wenn auch zu einem viel geringeren Maße (siehe Peptidmengen). Auffällig ist, dass in den mit Formaldehyd behandelten Proben insgesamt sehr wenige Proteine identifiziert werden konnten. Möglicherweise wurde während der Durchführung der Massenspektrometrie nicht beachtet, dass die Proteine durch Formaldehyd modifiziert waren.

### **3.2.3 Die Rolle von HtpG in evolutionären Prozessen**

In diesem Teil sollte, nachdem Hsp90 ein bedeutender Einfluss auf die eukaryotische Evolution nachgewiesen werden konnte, HtpG im Hinblick auf seine mögliche Rolle auf die Adaptation an sich ändernde Umweltbedingungen und Stress untersucht werden. Vorangegangene Experimente, die eine mögliche Interaktion von HtpG mit ribosomalen Proteinen oder der RNA-Polymerase zeigten, könnten auf eine etwaige Beteiligung von HtpG an evolutionären Prozessen hindeuten. Über Wechselwirkungen mit diesen Proteinen könnte HtpG die Translation von Proteinen beeinflussen, die eine Rolle bei Entwicklungsprozessen spielen.

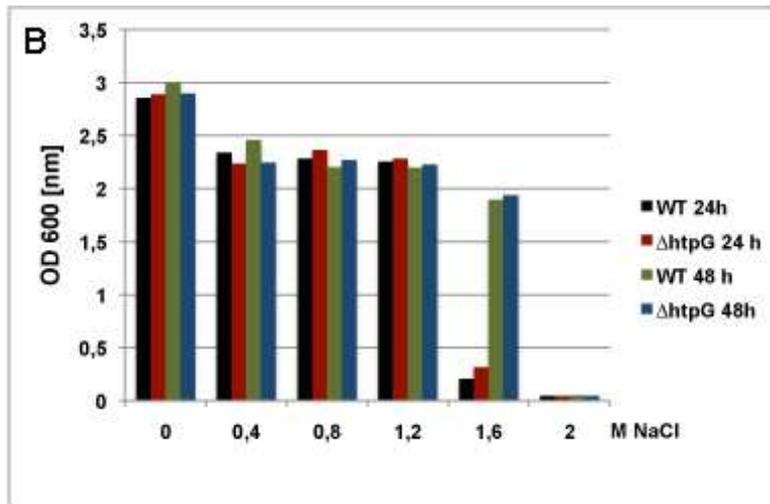
#### **3.2.3.1 Experimentelle Evolution**

Der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an einen bestimmten endogenen und exogenen Stress wurde mittels experimenteller Evolution unter Verwendung der „*Genetic Machine*“ in *B. subtilis* näher untersucht. Hierbei wurde das „*conditional pulse-feed Regime*“ angewendet

(232), welches den Selektionsdruck automatisch auf einem Level hält, das gerade noch von der best-adaptierten Variante toleriert werden kann.

#### 3.2.3.1.1 *Adaptation an einen exogenen Salzstress in B. subtilis*

Sowohl der Wildtyp, als auch die *htpG* Deletionsmutante und die *htpG* Trap Mutante aus *B. subtilis* wurden auf Fähigkeit hin, sich an erhöhte Salinität anzupassen, untersucht. Das erste Experiment beschäftigte sich jedoch vorerst mit der Adaption der *htpG* Deletionsmutante. In diesem Sinne wurde vor dem Start des Experiments getestet, welche Konzentration an Natriumchlorid von dem Wildtyp und der *htpG* Mutante toleriert werden. Zusätzlich wurde ein Wachstumsvergleich dieser beiden Stämme durchgeführt, um auszuschließen, dass HtpG eine Rolle bei der Salztoleranz spielt. Hierzu wurden 10 ml Minimalmedium mit 2 % Glukose und den verschiedenen Salzkonzentrationen von Kulturen dieser beiden Stämme, die über Nacht in 10 ml Minamlmedium mit 2 % Glukose und 0,4 M NaCl gewachsen waren, auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 angeimpft und das Wachstum wurde aufgezeichnet (Abbildung 37 A). Für die Endpunktsbestimmung in Abbildung 37B wurde die erreichte OD<sub>600 nm</sub> nach 24 und 48 h bestimmt.



**Abbildung 37: Der Einfluss von HtpG auf die Salztoleranz in *B. subtilis*.** A) Das Wachstumsverhalten des *B. subtilis* Wildtyp Stammes (Wildtyp, offene Symbole) und der *htpG* Deletionsmutante (BSR101,  $\Delta$ *htpG*, geschlossene Symbole) wurde bei 37 °C in Minimalmedium mit 2 % Glukose und mit verschiedenen Salzkonzentrationen über einen Zeitraum von neun Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. B) Siehe A), wobei die OD<sub>600nm</sub> nach 24 und 48 Stunden bestimmt wurde.

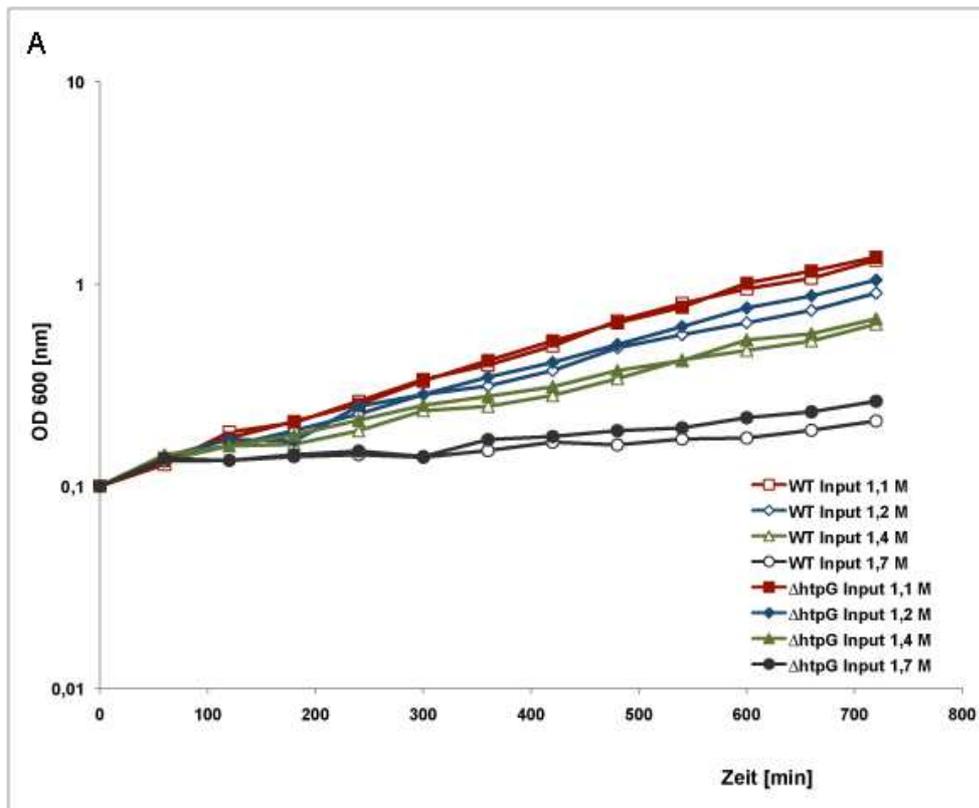
Beide Stämme zeigten keine großen Unterschiede im Wachstum in Minimalmedium mit den verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen. Wachstum konnte für beide bis zu einer Salzkonzentration von 1,2 M verzeichnet werden. Nach 24 h konnte Wachstum bei 1,6 M NaCl detektiert werden und nach 48 h erreichten die Stämme bei dieser Salzkonzentration fast eine OD<sub>600nm</sub> von 2. Somit tolerieren beide Stämme von Natur aus eine Salzkonzentration zwischen 1,2 – 1,6 M. Aus diesem Grund wurde als Stressfaktor ein Minimalmedium mit einer Salzkonzentration gewählt, die mit 2,5 M weit über den tolerierten Wert liegt, um Adaptation in der in der „*Genetic Machine*“ (GM 2.1, Malière, Mutzel Pat: DE 2982168201) überhaupt erst möglich zu machen. Dieses wird im folgenden auch nicht-permissives Medium genannt. Das sogenannte permissive Medium, welches der Kultur als Nährstoffquelle dient, enthielt 0,4 M NaCl und somit eine Salzkonzentration die beide *B. subtilis* Stämme ohne Probleme tolerieren können. Für das erste Experiment wurde die Maschine mit der *htpG* Mutante angeimpft, die über Nacht in 30 ml Minimalmedium mit 0,4 M NaCl bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 1,215 angewachsen war. Alle sieben Tage wurde der in der Maschine befindliche Stamm auf seine genetische Identität mittels PCR überprüft, wobei zusätzlich ein Glycerinstock hergestellt und bei -80 °C eingefroren wurde. Insgesamt befand sich der Stamm für 122 Tage in der Maschine. Der Verbrauch an permissiven, als auch nicht-permissiven Medium wurde manuell aufgezeichnet. Das Volumen des zugeführten nicht-permissiven Mediums hängt von der Fähigkeit der Kultur ab, sich an die jeweilige Salzkonzentration anzupassen. Aus diesem Verbrauch ließ sich die Salzkonzentration, die sich zum jeweiligen

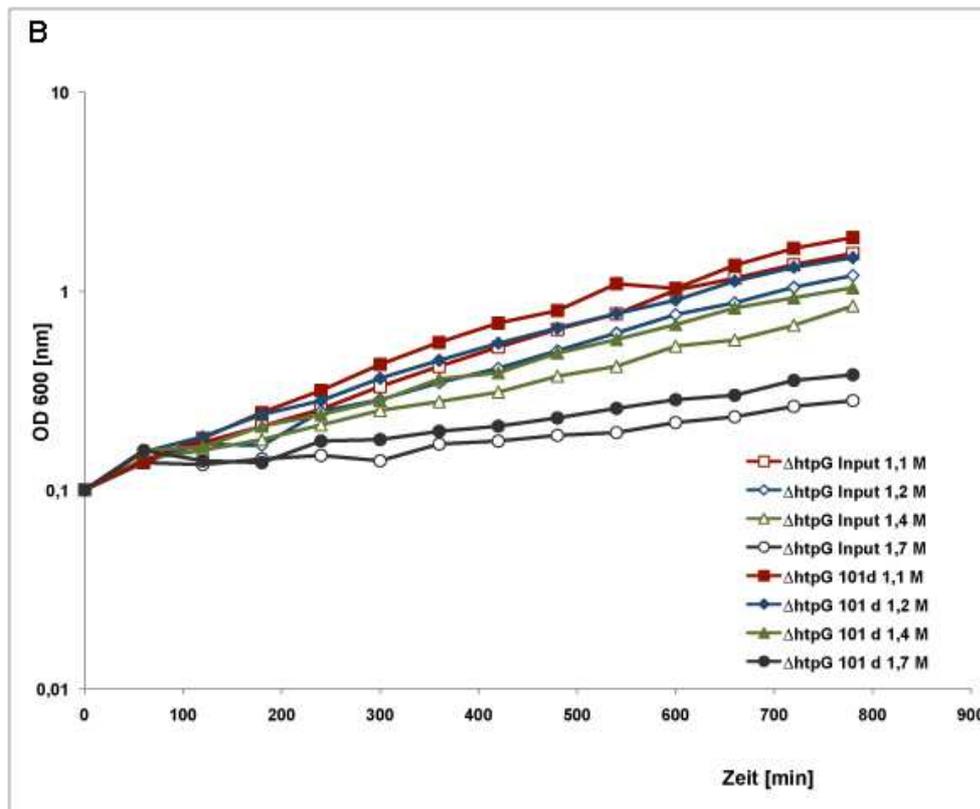
Zeitpunkt in der Wachstumskammer herrschte, errechnen, wobei die Anpassung durch eine Erhöhung der Salzkonzentration graphisch dargestellt werden konnte (Abbildung 38).

**Abbildung 38: Der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an erhöhte Salinität in der GM 2.1 (Experiment 1).** Die genetische Maschine GM2.1 wurde mit der *B. subtilis htpG* Deletionsmutante (BSR101) angeimpft. Als permissives Medium diente Minimalmedium mit einer Salzkonzentration von 0,4 M NaCl und als nicht-permissives Minimalmedium mit einer Salzkonzentration von 2,5 M NaCl. Die Salzkonzentration, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt in der Wachstumskammer befand, wurde über die Zeit aufgetragen. Insgesamt befand sich der Stamm für 122 Tage in der Maschine.

Ein Anstieg der Salzkonzentration konnte nicht beobachtet werden. Die Salzkonzentration in der Wachstumskammer betrug nach 122 Tagen 1,56 M (Abbildung 38). Nach dem Start pendelte sie sich zwischen 1,5- 1,6 M ein. Eine Adaptation an eine erhöhte Salzkonzentration konnte somit nicht festgestellt werden. Insgesamt wurde mit 7 l mehr nicht-permissives Medium als permissives (5,6 l) verbraucht. Der höhere Verbrauch an nicht-permissiven Medium im Vergleich zu dem permissiven Medium, lässt darauf schließen, dass die Salzkonzentration noch zu gering angesetzt war, um die Kultur zur Adaptation an höherer Salzkonzentrationen zu zwingen. Um nochmals zu überprüfen, dass eine Adaptation an höhere Salzkonzentration nicht stattgefunden hatte, wurden Wachstumskurven im Vergleich zum Ausgangsstamm bei verschiedenen Salzkonzentrationen erstellt. Hier ergaben sich einige Probleme bei der Erstellung und Reproduzierbarkeit der Kurven, wobei der Ausgangsstamm teilweise ein besseres Wachstum, was besonders bei den Endpunktsbestimmungen deutlich wurde, aufwies (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde festgestellt, dass der Stamm, der sich für längere Zeit in der Maschine befand, teilweise Probleme hatte, die stationäre Phase zu erreichen. Dies kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass sich dieser Stamm an logarithmisches Wachstum angepasst hat und nun deutlich mehr Probleme nach dem Eintritt in die Stationärphase aufweist als der Ausgangsstamm. Da bei der Endpunktsbestimmung die

Ausgangsstämme bei niedrigen Salzkonzentrationen auf jeden Fall die Stationärphase erreichen (siehe Abbildung 37B) und sich somit ein Vergleich mit dem Stamm aus der Maschine schwer gestalten würde, wurde auf diese Methode verzichtet. Die Wachstumskurven wurden nach einem abgeänderten Protokoll erstellt. Dazu wurden sowohl der  $\Delta htpG$  Ausgangsstamm, als auch der  $htpG$  Deletionsstamm, der sich für 101 Tage in der Maschine befand über Nacht in Minimalmedium mit 2 % Glukose und 0,4 M NaCl angezogen. Am nächsten Tag wurde frisches Minimalmedium mit 2 % Glukose und 0,4 M NaCl mit diesen Übernachtskulturen auf eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,05 angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Phase wachsen gelassen. Erst hiernach wurden das Minimalmedium mit den unterschiedlichen Salzkonzentrationen auf eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,1 angeimpft, wobei das Wachstum anschließend über 12 Stunden bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  verfolgt wurde (Abbildung 39). Hierdurch wurde sichergestellt, dass sich alle Stämme zur Zeit des Animpfens in der gleichen Wachstumsphase befanden. Als Kontrolle wurde erneut ein Wachstumsvergleich zwischen den Ausgangsstämmen (Wildtyp,  $\Delta htpG$ ) erstellt (Abbildung 39A).

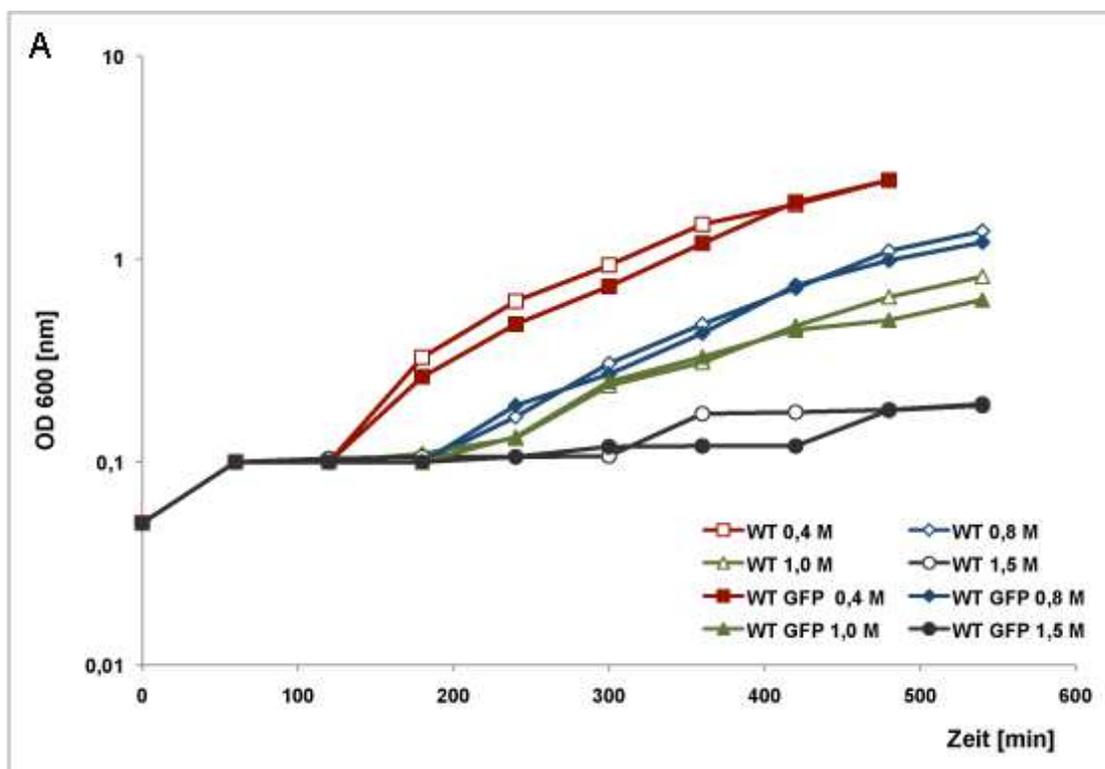


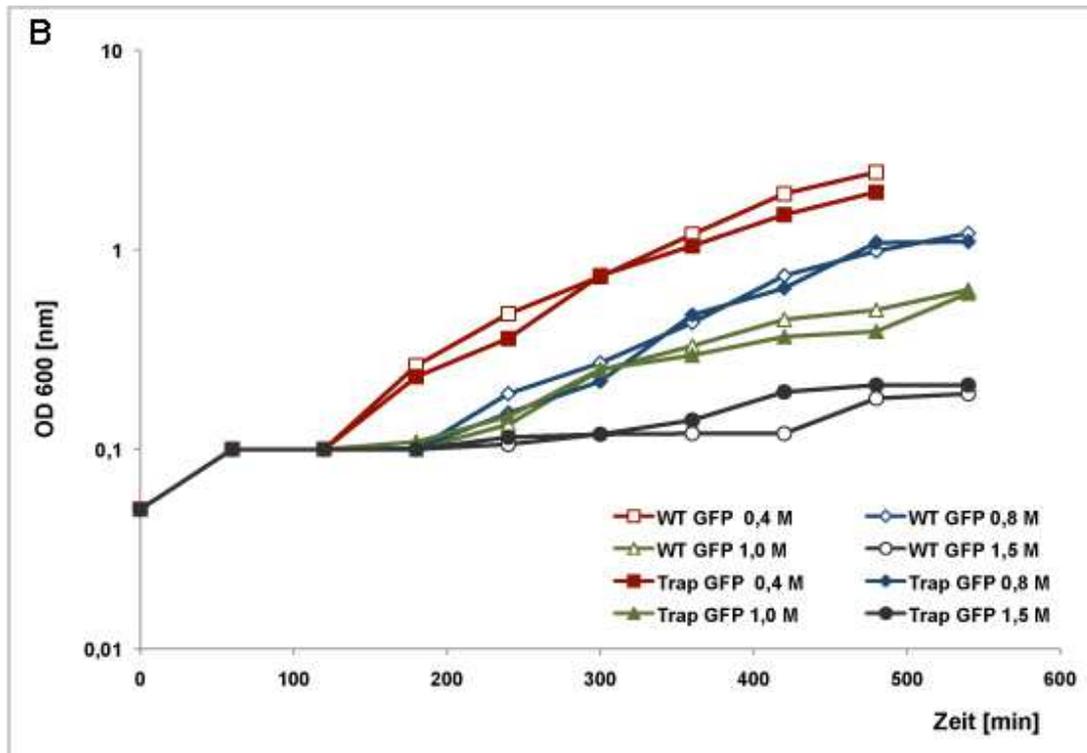


**Abbildung 39: Das Wachstumsverhalten der evolvierten *B. subtilis* htpG Mutante aus Experiment 1.** A) Das Wachstumsverhalten des *B. subtilis* Wildtyp Stammes (Wildtyp Input, offene Symbole) und der *htpG* Deletionsmutante (BSR101,  $\Delta$ htpG Input, geschlossene Symbole), die beide nicht den Adaptationsprozessen der genetischen Maschine ausgesetzt waren, wurden bei 37 °C in Minimalmedium mit 2 % Glukose und mit verschiedenen Salzkonzentrationen, das mit einer Ausgangskultur, die sich in der logarithmischen Phase befand auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angimpft wurde, über einen Zeitraum von zwölf Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. B) Siehe A), jedoch wurde hier das Wachstumsverhalten der *htpG* Deletionsmutante (BSR101,  $\Delta$ htpG Input, offene Symbole), die nicht den Adaptationsprozessen der genetischen Maschine ausgesetzt war, mit dem des gleichen Stammes über dreizehn Stunden verglichen, der für 101 Tage in der genetischen Maschine evolvierte (BSR101-101,  $\Delta$ htpG 101 d, geschlossene Symbole).

Wieder konnte kein Unterschied im Wachstum zwischen den Ausgangsstämmen festgestellt werden (Abbildung 39A). Auch zeigte der Stamm, der sich für 101 Tage in der Maschine befand, bei den höheren Salzkonzentrationen kein besseres Wachstum als der Ausgangsstamm. Dies war zu erwarten, da keine Anpassung an höhere Salzkonzentrationen festgestellt werden konnte (Abbildung 38). Zusammengefasst schienen alle Stämme bis zu einer Salzkonzentration von 1,4 M NaCl noch ausreichend wachsen zu können, wobei sie nach 12 Stunden die stationäre Phase noch nicht erreicht hatten. Bei einer Salzkonzentration von 1,7 M fiel die Wachstumsrate schon deutlich ab, ist jedoch noch vorhanden. Damit scheint *B. subtilis* Salzkonzentrationen von mindestens 1,7 M zu tolerieren. Für das nächste Experiment in der „Genetic Machine“ wurde der Salzstress erhöht, um die Stämme zur Adaptation an höhere Salzkonzentrationen zu bewegen. Die Salzkonzentration des nicht-permissiven Mediums betrug schon 2,5 M und eine weitere Erhöhung würde vermutlich zur

Kristallisation des Salzes führen und damit zur Verstopfung der Schläuche der Maschine. Daher wurde der Salzgehalt des permissiven Mediums von 0,4 M auf 1,5 M erhöht. Unter diesen Bedingungen wurden die *htpG* Deletionsmutante und die *htpG* Trap Mutante bezüglich ihrer Adaptation an erhöhte Salinität untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Um die Feststellung der Identität der *htpG* Trap Mutante zu erleichtern, wurde hier ein Stamm verwendet, der zusätzlich GFP exprimiert. Dazu wurde GFP in den *amy* Locus kloniert. Somit ist es möglich die Identität des Stammes mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestätigen. Um auszuschließen, dass zusätzlich produziertes GFP einen Einfluss auf die Adaption an erhöhte Salinität hat, wurde auch ein Stamm, der GFP und intaktes HtpG produziert in der Maschine untersucht. Vorab wurde jedoch das Wachstum der Stämme, die GFP produzieren unter verschiedenen Salzkonzentrationen sowohl mit dem reinen Wildtyp (Abbildung 40A) als auch untereinander (Abbildung 40B) miteinander verglichen.

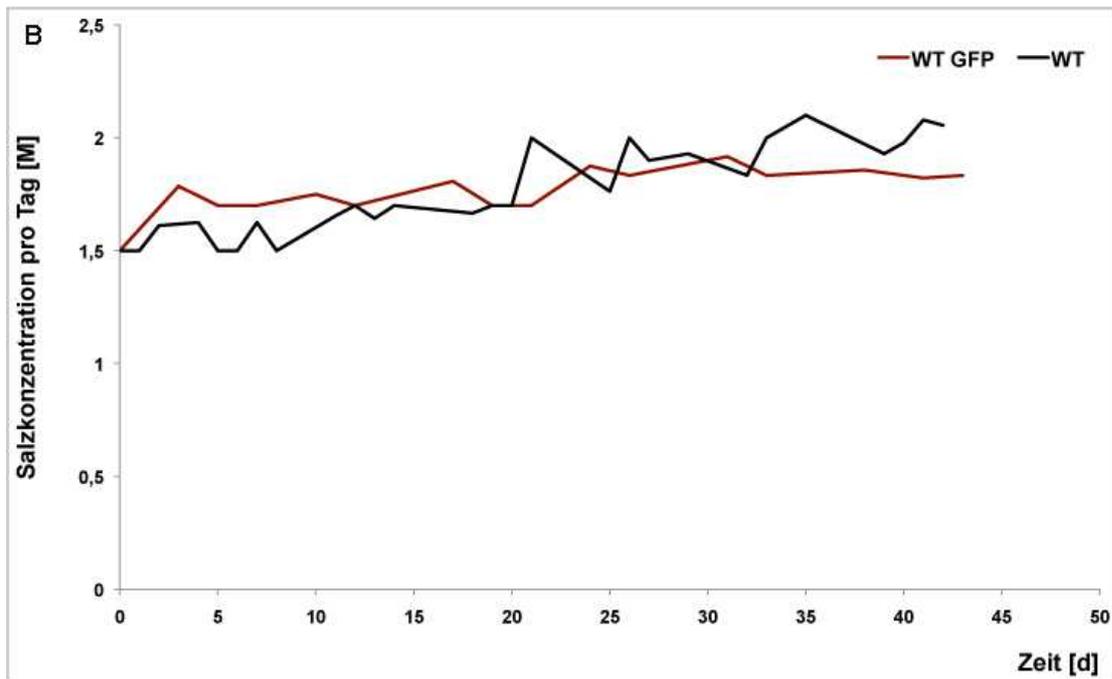
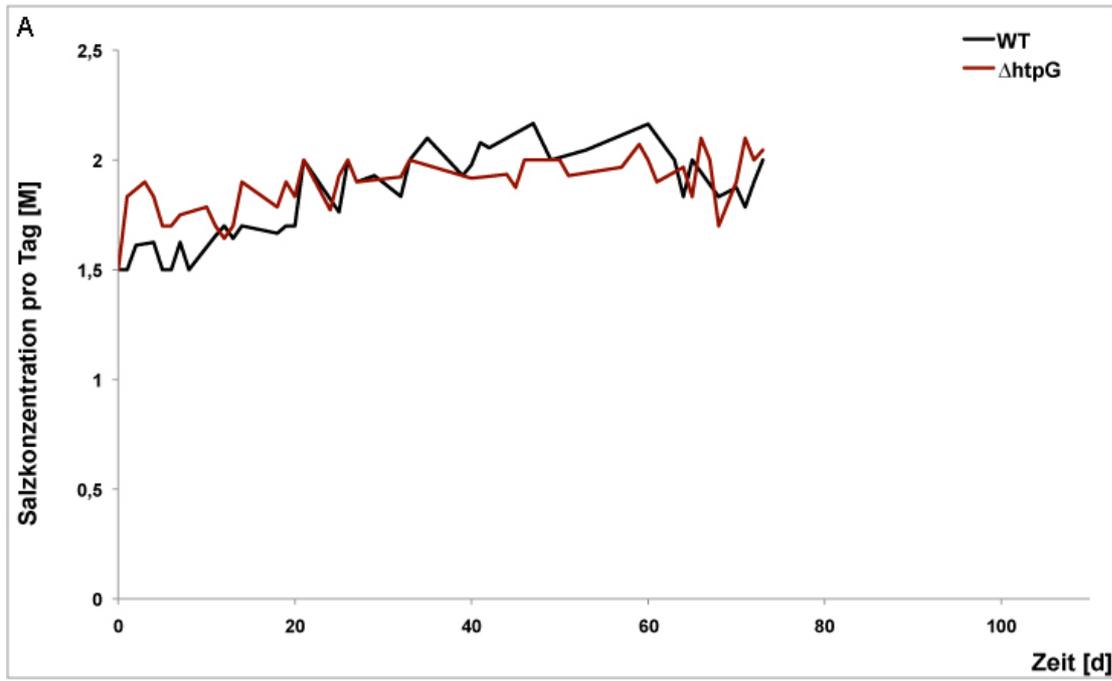


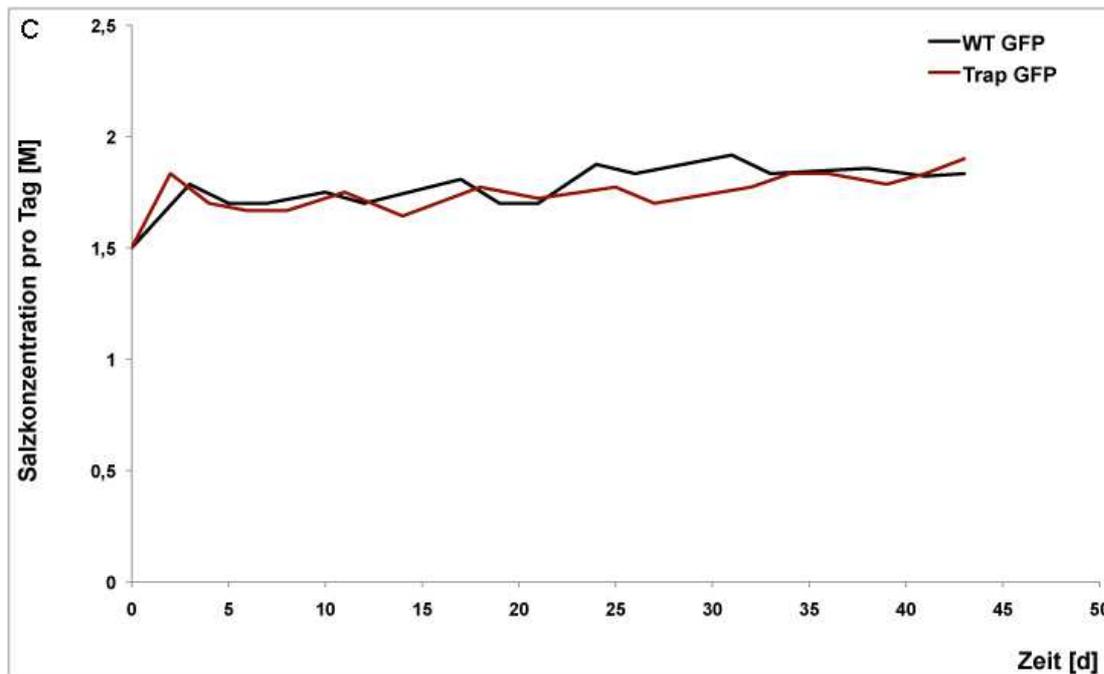


**Abbildung 40: Der Einfluss von ektopisch exprimierten GFP und HtpG-Trap auf die Salztoleranz in *B. subtilis*.** A) Das Wachstumsverhalten des *B. subtilis* Wildtyp Stammes (Wildtyp, offene Symbole) und Wildtypstamm, der GFP ektopisch im *amy*-Lokus exprimiert (BSR64, Wildtyp GFP, geschlossene Symbole) wurde bei 37 °C in Minimalmedium mit 2 % Glukose und mit verschiedenen Salzkonzentrationen über einen Zeitraum von neun Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. B) Siehe A), jedoch wurde hier das Wachstumsverhalten des *B. subtilis* *htpG* Trap Stammes (BSR70, Trap GFP, geschlossene Symbole) mit dem des Wildtypstammes (BSR64, Wildtyp GFP, offene Symbole), wobei beide GFP ektopisch im *amy*-Lokus produzieren, verglichen.

Wie aus Abbildung 40A ersichtlich zeigte die Expression von GFP keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Stammes unter den verschiedenen Salzkonzentrationen. Auch die Trap Mutation in *htpG* wirkte sich nicht auf das Wachstumsverhalten und somit die Salztoleranz in diesem Hintergrund aus (Abbildung 40B).

Die Anzucht der jeweiligen Stämme, deren Evolutionsverhalten in der Maschine untersucht wurde, erfolgte in 30 ml Minimalmedium mit einer Salzkonzentration von 1,5 M NaCl, wobei jeweils mit einer sich in der logarithmischen Phase befindenden Kultur angeimpft wurde. Auch hier wurde die Identität des in der Maschine befindlichen Stammes alle 7 Tage mittels PCR oder Fluoreszenzmikroskopie überprüft und ein Glycerinstock erstellt. Die Adaptation über die Zeit wurde über den Anstieg, der sich in der Maschine befindliche Salzkonzentration, die aus dem Verbrauch an permissiven und nicht-permissiven Medium ermittelt wurde, überwacht (Abbildung 41). Dies geschah mit Unterstützung von Pia Ehrentraut und Stephanie Braun im Rahmen ihrer Master Arbeiten.





**Abbildung 41: Der Einfluss von HtpG und HtpG Trap auf die Adaptation an erhöhte Salinität in der GM 2.1 (Experiment 2).** A) Die genetische Maschine GM2.1 wurde nacheinander mit der *B. subtilis* Wildtypstamm (Wildtyp) und der *htpG* Deletionsmutante (BSR101,  $\Delta htpG$ ) angeimpft. Als permissives Medium diente Minimalmedium mit einer Salzkonzentration von 1,5 M NaCl und als nicht-permissives Minimalmedium mit einer Salzkonzentration von 2,5 M NaCl. Die Salzkonzentration, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt in der Wachstumskammer befand, wurde für beide Stämme über die Zeit aufgetragen und konnte somit miteinander verglichen werden. Insgesamt befanden sich die Stämme für 73 Tage in der Maschine. B) siehe A), jedoch wurde die genetische Maschine mit dem *B. subtilis* Wildtyp Stamm (BSR64, Wildtyp GFP) angeimpft, der GFP ektopisch exprimiert und sich für 43 Tage in der Maschine befand. Die zum jeweiligen Zeitpunkt tolerierte Salzkonzentration wurde mit der des Wildtyp Stammes (Wildtyp, siehe A), 42 Tage gezeigt) verglichen. C) siehe A), jedoch wurde die Maschine mit der *B. subtilis htpG* Trap Mutante (BSR70, Trap GFP) angeimpft, der GFP ektopisch exprimiert und sich für 43 Tage in der Maschine befand. Die zum jeweiligen Zeitpunkt tolerierte Salzkonzentration wurde mit der des Wildtyp GFP Stammes (BSR64, Wildtyp, siehe B) verglichen.

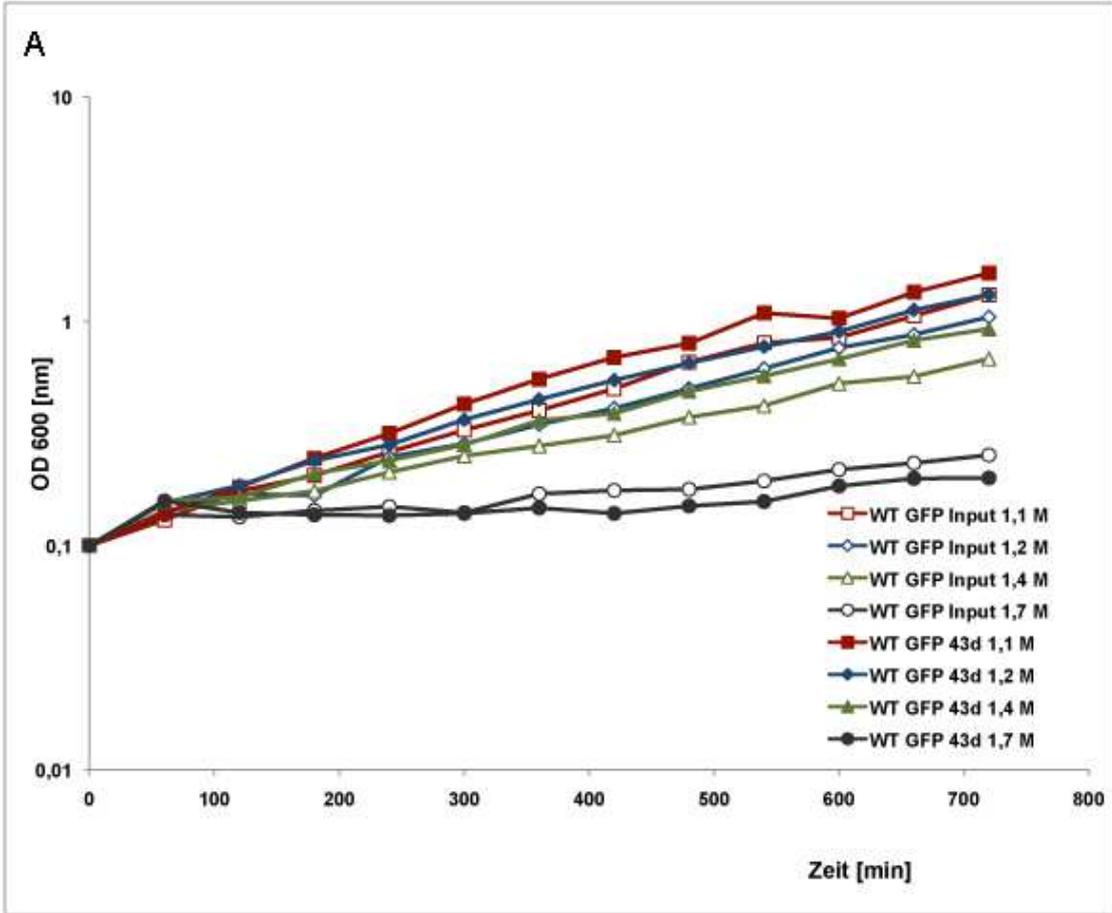
Der Wildtyp Stamm befand sich für 73 Tagen in der Evolutionsmaschine, wobei er eine tolerierte Salzkonzentration von ungefähr 1,9 - 2 M erreichte (Abbildung 41A). Der Gesamtverbrauch an permissivem Medium betrug 2,8 L und an nicht-permissivem Medium 1,2 L. Die *htpG* Deletionsmutante verbrauchte in dieser Zeit 2,6 L permissives Medium und 1,8 L nicht-permissives und tolerierte nach dieser Zeit durchschnittlich 1,9 - 2 M NaCl. Anhand der Interpretation des Graphen lässt sich erkennen, dass sich der Wildtyp zu Anfang etwas langsamer an höhere Salzkonzentration als der *htpG* Mutationsstamm anpasste, wobei er trotz dessen gegen Ende der Laufzeit eine ähnlich tolerierte Salzkonzentration wie der mutierte Stamm aufwies. Die Mutante zeigte dahingegen eine über die Zeit schwächere Adaptation. In diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, dass der Lauf des Wildtyp-Stammes anfänglich mit Problemen gekennzeichnet war. Aufgrund eines Defektes der Maschine war die Zufuhr an permissivem Medium deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt). Dadurch wurde die Zufuhr an nicht-permissivem Medium automatisch gedrosselt, wodurch

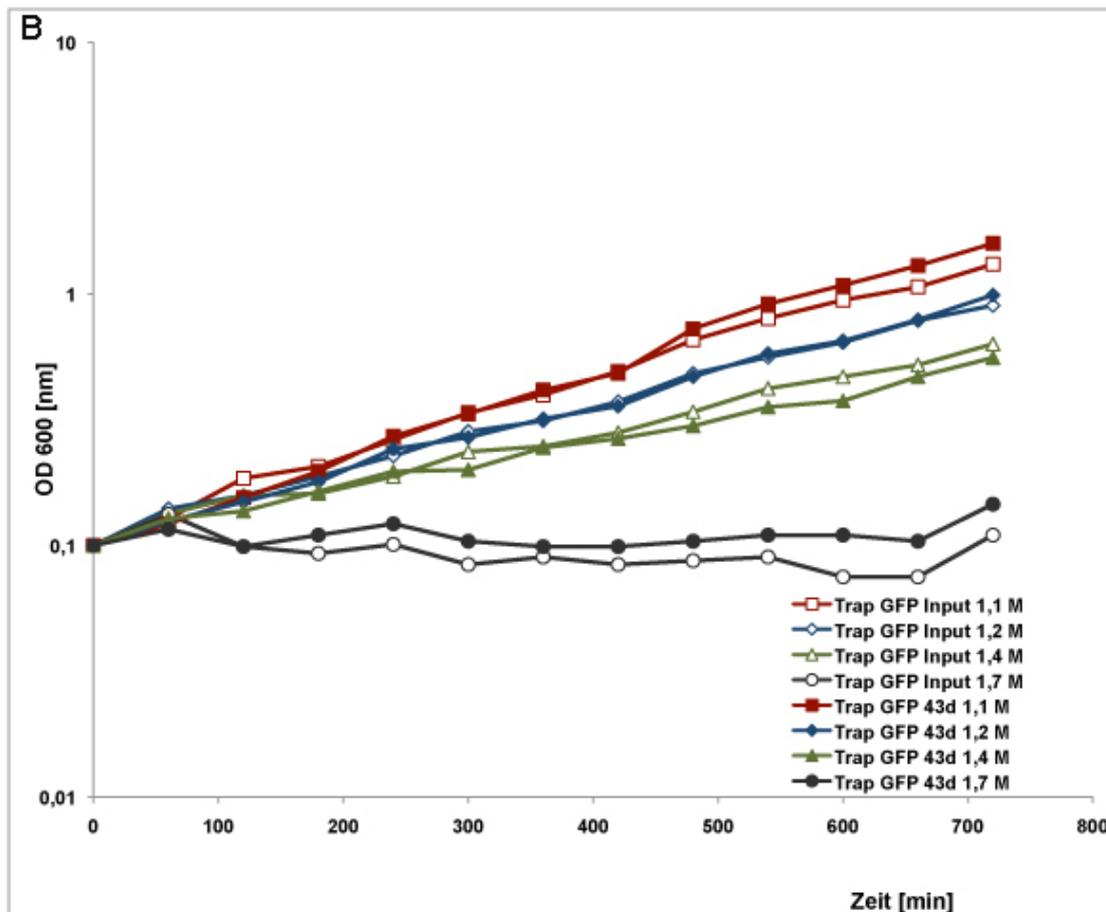
die langsamere Anpassung erklärt werden kann.

Um auszuschließen, dass GFP Einfluss auf das Evolutionsverhalten gegenüber erhöhte Salinität nehmen kann, wurde die Adaption des Wildtyp Stammes (aus Abbildung 41A) mit der des GFP produzierenden Stammes verglichen (Abbildung 41B). Die durchschnittliche, tolerierte Salzkonzentration lag für den Wildtyp nach 42 Tagen bei 1,9 M (2,3 L permissives und 0,7 L nicht-permissives Medium) und für den GFP exprimierenden Stamm bei 1,8 M (1,9 L permissives und 0,8 L nicht-permissives Medium). Auch der GFP-exprimierende Stamm wies gegenüber dem reinen Wildtyp eine flachere, aber schnellere Adaptation an höhere Salzkonzentrationen auf. Dies ist jedoch eher auf die bereits erwähnten, unterschiedlichen Bedingungen zurückzuführen, als auf einen Einfluss von überexprimierten GFP, zumal die Unterschiede auch relativ gering waren. Wurde dahingegen das Evolutionsverhalten der *htpG* Trap Mutante mit dem des Wildtyps verglichen, zeigte sich ein recht ähnlicher Kurvenverlauf (Abbildung 41C). Diese Mutante befand sich wie der Wildtyp auch für 43 Tage in der „*Genetic Machine*“ und erreichte eine Salzkonzentration von 1,8 M, wobei 2,2 L permissives und 0,8 L nicht-permissives Medium verbraucht wurden. Beide wiesen einen sehr flachen Kurvenverlauf auf und erreichten ihre maximal tolerierte Salzkonzentration schon nach wenigen Tagen in der Maschine.

Auch wurden Wachstumskurven im Vergleich zum Ausgangsstamm bei verschiedenen Salzkonzentrationen (1,1 M, 1,2 M, 1,4 M und 1,7 M) erstellt. Hier wurde wieder mit Kulturen angeimpft, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, um den Einfluss der Stationärphase auf die Bakterien, die sich über längeren Zeitraum in der Maschine befanden, gering zu halten. Der hier getestete Wildtyp befand sich für 68 Tage in der Maschine und die *htpG* Mutante, deren Wachstum hier bestimmt wurde, für 71 Tage. Zwischen diesen Stämmen und den dazugehörigen Ausgangsstämmen konnte kein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate festgestellt werden (P. Ehrentraut, Master Thesis).

Auch der GFP exprimierende Wildtyp- und *htpG* Trap Stamm, die sich jeweils für 43 Tage in der Maschine befanden, zeigten keine Wachstumsunterschiede zu ihren jeweiligen Ausgangsstämmen (Abbildung 42).





**Abbildung 42: Das Wachstumsverhalten des evolvierten *B. subtilis* Wildtyps und der *htpG* Trap Mutante aus Experiment 2.** Das Wachstumsverhalten des *B. subtilis* GFP exprimierenden Wildtyp Stammes (BSR64, Wildtyp GFP Input, offene Symbole), der nicht den Adaptationsprozessen der genetischen Maschine ausgesetzt war, wurde mit dem des gleichen Stammes verglichen, der für 43 Tage in der genetischen Maschine evolvierte (BSR64-43, Wildtyp GFP 43d, geschlossene Symbole). Das Wachstum wurde bei 37 °C in Minimalmedium mit 2 % Glukose und mit verschiedenen Salzkonzentrationen, das mit einer Ausgangskultur, die sich in der logarithmischen Phase befand auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angimpft wurde, über einen Zeitraum von zwölf Stunden über die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. B) Siehe A), jedoch wurde hier das Wachstumsverhalten der GFP exprimierenden *htpG* Trap Mutante (BSR70, Trap GFP Input, offene Symbole), die nicht den Adaptationsprozessen der genetischen Maschine ausgesetzt war, mit dem des gleichen Stammes verglichen, der für 43 Tage in der genetischen Maschine evolvierte (BSR70-43, Trap GFP 43d, geschlossene Symbole).

Auffallend ist, dass alle vermeintlich evolvierten Stämme deutliche Wachstumsprobleme bei einer Salzkonzentration von 1,7 M aufwiesen. In der „Genetic Machine“ tolerierten sie diese Salzkonzentration hingegen schon nach kurzer Zeit. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Kulturen in der Maschine anderen, besseren Bedingungen, wie zum Beispiel bessere Belüftung ausgesetzt waren, als in den Erlenmeyerkolben, die für die Bestimmung der Wachstumskurve benutzt wurden.

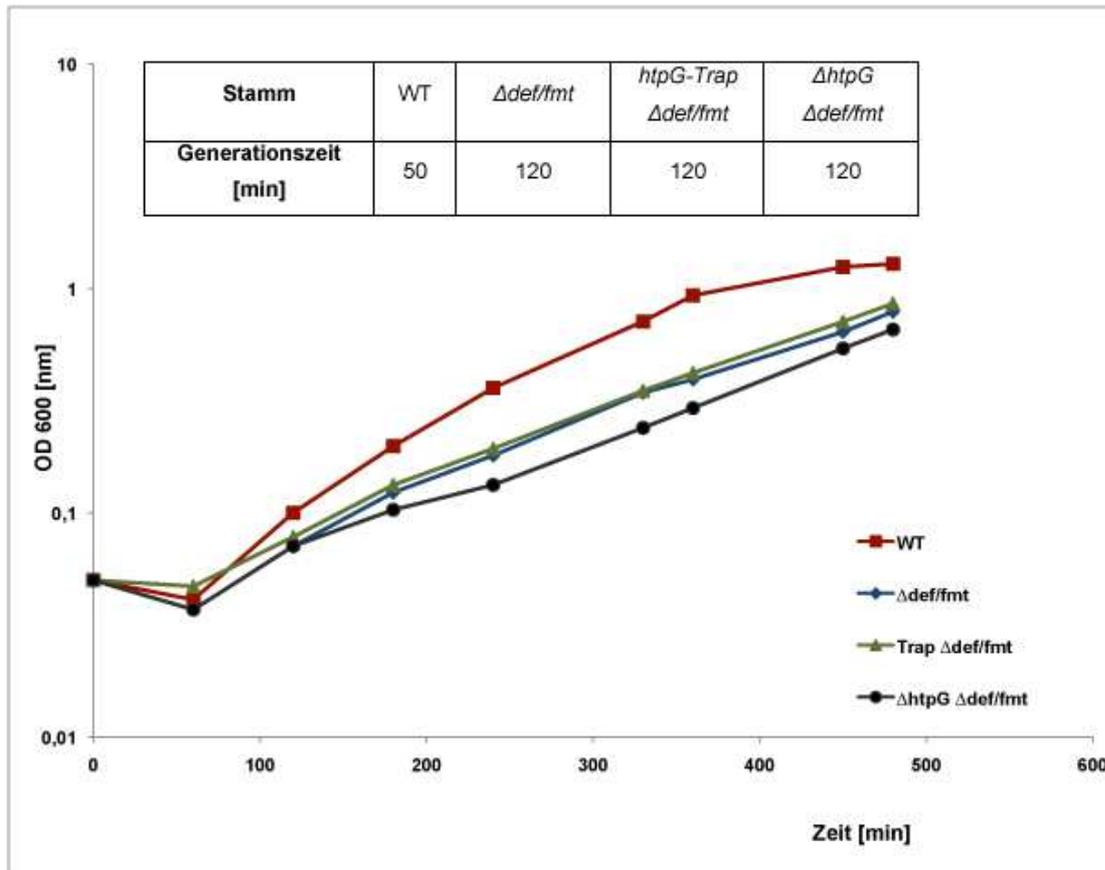
Somit bestätigten auch die Wachstumskurven, dass keine beziehungsweise eine nur sehr geringe Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen stattgefunden hatte. Aufgrund dieser geringen Adaptation an erhöhte Salzkonzentrationen, kann durch diese Experimente keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob HtpG eine Rolle bei evolutionären

Prozessen spielt. Vermutlich müsste die Salzkonzentration und die Laufzeit noch weiter erhöht werden, um eine Adaptation beobachten und damit auch die Rolle von HtpG in diesem Zusammenhang bestimmen zu können. Eine Erhöhung der Salzkonzentration ist aber aufgrund der Gefahr der Kristallisation, die zu technischen Problemen führen würde, nicht mehr möglich. Aufgrund der zeitlichen Begrenzung dieser Dissertation war es auch nicht möglich die Laufzeit noch weiter zu erhöhen.

#### 3.2.3.1.2 *Adaptation an einen endogenen Wachstumsstress in B. subtilis*

Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an einen endogenen Wachstumsstress, der durch die Deletion Gens für die Formylase ausgelöst wurde, in *B. subtilis* untersucht. Abbildung 43 zeigt das Wachstumsdefizit der Zellen, denen die Formylase fehlt.

Mit Hilfe der „*Genetic Machine*“ kann diese Deletionsmutante auf schnelleres Wachstum selektiert werden. Hierbei stellt die Mutation einen endogenen Stressfaktor dar, an den sich die Bakterien im Laufe der Zeit adaptieren. Die experimentelle Evolution wurde für  $\Delta def/fmt$ , *htpG-Trap*  $\Delta def/fmt$  und dem  $\Delta htpG/\Delta def/fmt$  (S. Braun, Master Thesis) im Vergleich zum Wildtyp unter Verwendung des *conditional pulse-feed Regimes* durchgeführt. Die Anzucht der jeweiligen Stämme, deren Evolutionsverhalten in der Maschine untersucht wurden, erfolgte in 30 ml Minimalmedium mit einer Salzkonzentration von 0,4 M NaCl, wobei jeweils mit einer sich in der logarithmischen Phase befindlichen Kultur angeimpft wurde. Da hier die Adaptation an einen endogenen Stress über die Zunahme der Wachstumsrate beobachtet wurde und somit der Stress nicht von einer exogenen Quelle abhängig war, wurde nur ein Nährstoffmedium benötigt. Das Volumen des zugeführten Mediums hängt von der Dichte der Kultur und damit von seiner Fähigkeit sich an die Mutation anzupassen, ab. Aus dem Verbrauch von Nährmedium, das hier mittels eines Datenloggers aufgezeichnet wurde, lässt sich daher auf die Wachstumsrate und damit auf die Generationszeit schließen. Zuvor wurde jedoch die genau Wachstumsrate der Stämme in Minimalmedium mit 0,4 M NaCl im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Einfluss der Formylase auf das Wachstumsverhalten und die Generationszeit in *B. subtilis* im Vergleich zum Wildtyp.** Das Wachstumsverhalten und die sich daraus erschließende Generationszeit der *B. subtilis def/fmt* (BSR73), der *htpG* Trap *def/fmt* (BSR75) und der *htpG def/fmt* Mutante (BSR74) wurde bei 37 °C in Minimalmedium mit 2 % Glukose über einen Zeitraum von acht Stunden über die OD<sub>600nm</sub> mit dem des *B. subtilis* Wildtyp Stammes verglichen.

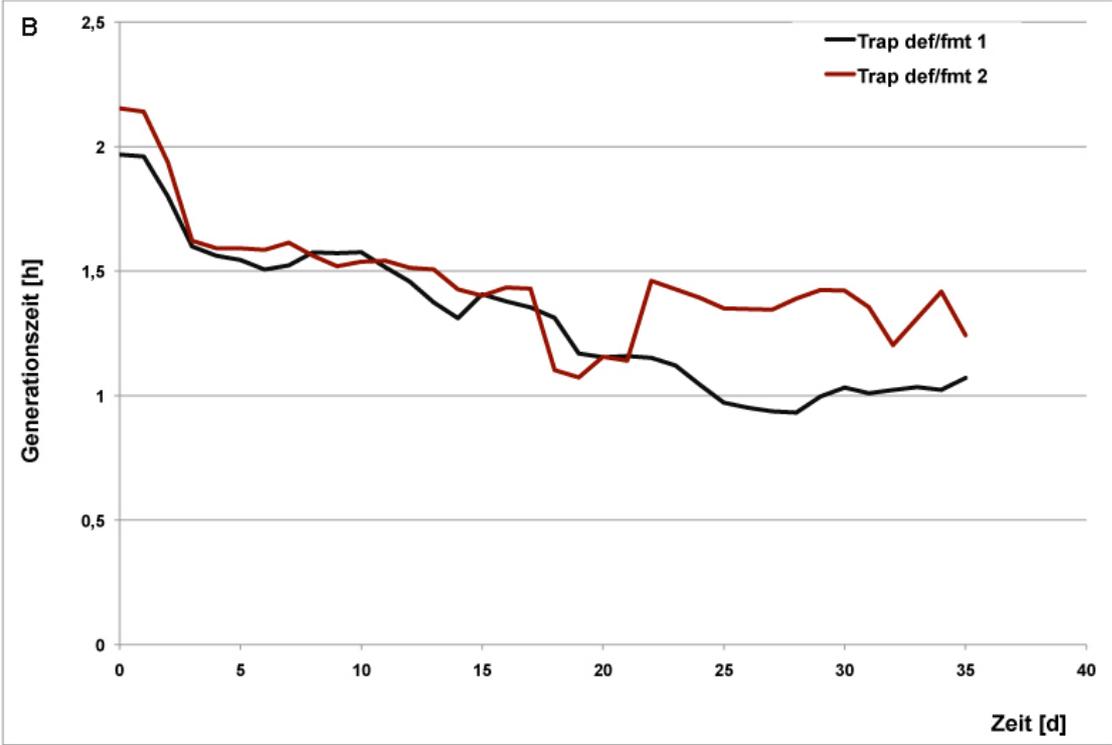
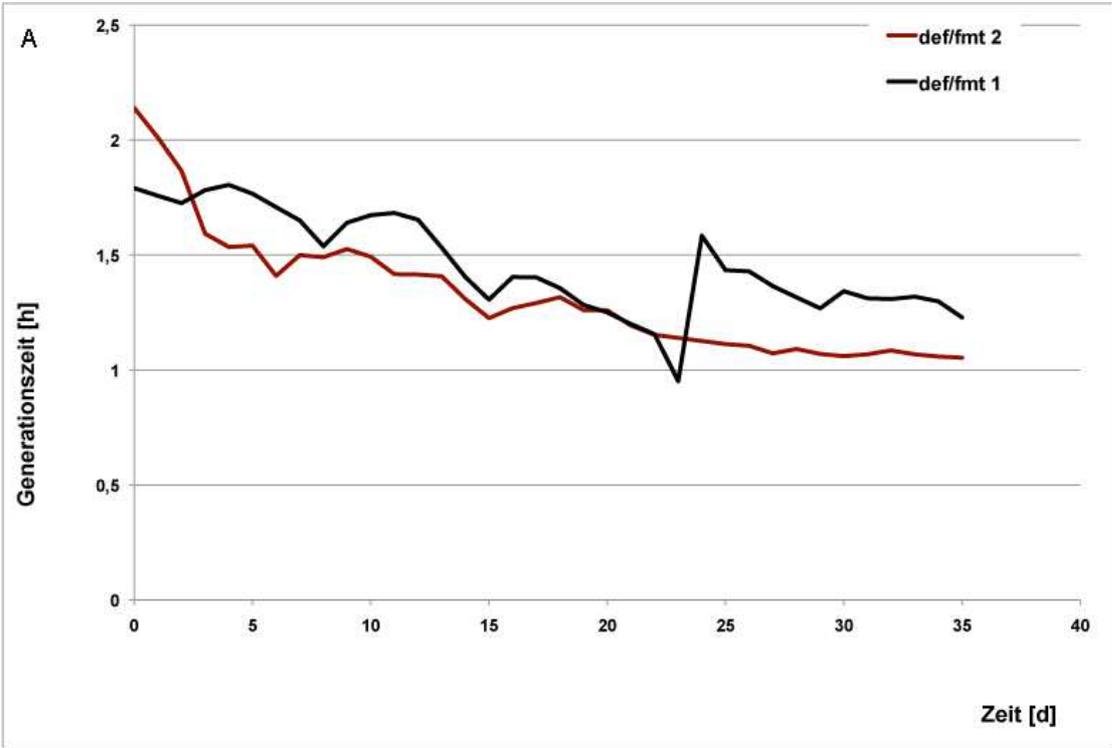
Im Gegensatz zum Wildtyp, der eine Generationszeit von 50 Minuten aufwies, wuchsen die Formylase-Mutanten mit einer Generationszeit von 120 Minuten deutlich langsamer (Abbildung 43).

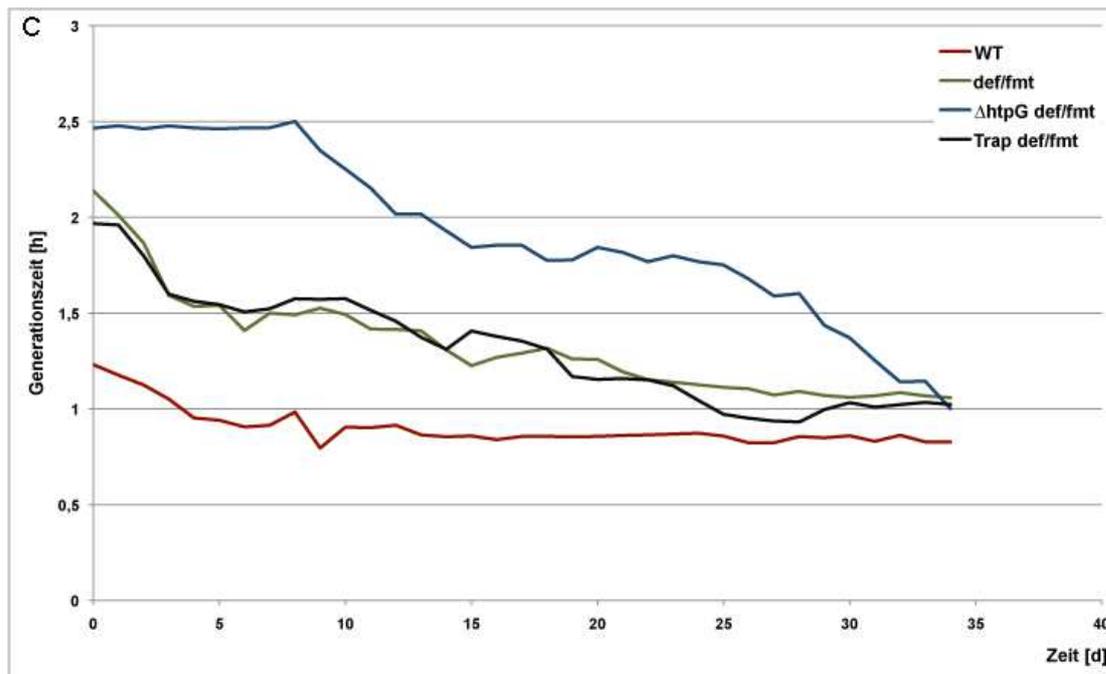
Die Adaptation an diese Mutation in der „Genetic Machine“ wurde daraufhin mit Unterstützung von Lea Stahmer und Stephanie Braun im Rahmen ihrer Bachelor- und Master Arbeit durchgeführt und über eine Abnahme der Generationszeit graphisch dargestellt (Abbildung 44). Alle Stämme befanden sich für 36 Tage in der Maschine. Da der Verbrauch des Mediums, aus dem sich auch das Maß der Adaptation erschließt, sehr empfindlich auf äußere Einflüsse wie zum Beispiel maschinenbedingte Druckveränderungen reagiert und auch die jeweiligen Läufe hintereinander und nicht parallel in einer Maschine durchgeführt und somit nicht direkt miteinander verglichen werden können, wurde die experimentelle Evolution der jeweiligen *def/fmt* Mutanten zweimal durchgeführt. Leider war dies aus Zeitgründen für die  $\Delta def/fmt \Delta htpG$  Mutante nicht möglich. Abbildung 44A zeigt die Abnahme der Generationszeiten der zwei Läufe der *def/fmt* Mutante im Vergleich. Während

die Mutante des ersten Laufes mit einer Generationszeit von 1,8 Stunden startete, begann die Mutante des zweiten Laufes mit einer Generationszeit von 2,1 Stunden. Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Mutante des ersten Laufes schon vorab besser an die Mutation angepasst war. Keine Population weist nur identische Zellen auf und vermutlich enthielt die Mutante schon vor dem Animpfen einen Klon, der durch eine Mutation, die sich vielleicht während oder sogar vor der Anzucht entwickelt hatte, schon eine erhöhte Wachstumsrate aufwies. Dieser Klon kann sich natürlich durchsetzen und führt schnell zu einer geringeren Generationszeit in der Population. Dafür zeigte die Mutante des zweiten Laufes bis zum Tag 5 in der Maschine eine deutlich schnellere Adaptation als die Mutante des ersten Laufes. Anschließend sank die Generationszeit bei beiden Läufen bis zu Tag 20 sehr vergleichbar auf 1,1 Stunden ab. Bei der Mutante des ersten Laufes wurde jedoch daraufhin ein erneuter Anstieg sichtbar. Dieser ist vermutlich auf unterschiedliche Druckbedingungen in der Maschine zurückzuführen, die den Zulauf und damit den Verbrauch des Mediums beeinflussten. Die beiden Läufe der *htpG* Trap *def/fmt* Mutante zeigten ein ähnliches Bild (Abbildung 44B). Die Mutante begann im ersten Lauf mit einer Generationszeit von knapp zwei Stunden und im zweiten Lauf mit 2,1 Stunden. Nach 3 Tagen erreichte diese Mutante in beiden Läufen eine Generationszeit von 1,6 Stunden. Bis zum Tag 20 wies die Mutante in beiden Läufen einen ziemlich ähnlichen Adaptationsprozess auf, wobei die Generationszeit auf 1,1 Stunden sank. Die Mutante des ersten Laufes erreichte bis zum Ende eine Generationszeit von einer Stunde, während sie im zweiten Lauf, vermutlich wieder aufgrund äußerer Einflüsse auf 1,4 Stunden anstieg und sich bis zum Ende des Laufes auf diesen Wert einpendelte.

Der Wildtyp, dessen Adaptation in der „*Genetic Machine*“ als Kontrolle beobachtet wurde und nur eine Anpassung an das Minimalmedium darstellt, begann mit einer Generationszeit von 1,2 Stunden (Abbildung 44C). Dies ist etwas höher als der Wert, der in den Wachstumskurven in demselben Medium ermittelt wurde (Abbildung 43), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass der Stamm in der Maschine anderen Bedingungen ausgesetzt war. Zudem wäre es möglich, dass die Population, mit der die Wachstumskurve bestimmt wurde, einen Klon enthielt, der eine schnellere Generationszeit aufwies und sich im Laufe der Bestimmung der Wachstumsrate durchsetzen konnte. Nach ungefähr 10 Tagen in der Maschine erreichte der Stamm die Generationszeit von 0,8 Stunden, die auch mittels der Wachstumskurve bestimmt werden konnte (Abbildung 43). Eine weitere Adaptation des Wildtyp Stammes an das Minimalmedium, die während des Laufes in der Evolutionsmaschine durchaus möglich gewesen wäre, konnte nicht beobachtet werden. Somit

scheint eine Generationszeit von 50 Minuten in Minimalmedium das Maximum zu sein und dieses erreichte *B. subtilis* schon nach sehr kurzer Zeit. Der Adaptationsprozess der *htpG* Trap *def/fmt* Mutante zeigte keinen sichtbaren Unterschied zu der *def/fmt* Mutante. Beide starteten, wie eben schon erwähnt bei einer Generationszeit von ungefähr 2 Stunden. Dies stimmte mit der durch die Wachstumskurve ermittelten Generationszeiten in Abbildung 43 überein. Nach 36 Tagen wiesen beide eine Generationszeit von einer Stunde auf. Dahingegen wies die *htpG*-defiziente Mutante, eine deutlich langsamere Adaptation auf. Sie startete bei einer Generationszeit von 2,5 Stunden, die erst nach acht Tagen, abzunehmen begann. In der Wachstumskurve wurde für die Generationszeit ein Wert von zwei Stunden ermittelt. Dieser Unterschied ist vermutlich wieder auf die unterschiedlichen Bedingungen in der Maschine oder auf die genetischen Unterschiede der Populationen zurückzuführen. Vom Tag 15 bis Tag 25 schwankte die Generationszeit zwischen 1,7 und 1,8 Stunden. Ab Tag 25 sank die Generationszeit ziemlich stark ab und endete vergleichbar zu den anderen *def/fmt* Mutanten auch bei einer Stunde (Abbildung 44C). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Deletion von HtpG möglicherweise negativ auf den Adaptationsprozess an den durch die Deletion der Formylase ausgelösten Wachstumsstress auswirkt. Jedoch wurde dieser Lauf nicht ein weiteres Mal wiederholt und somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche, äußere Bedingungen oder maschinenbedingte Einflüsse den Adaptationsprozess beeinflussen haben.



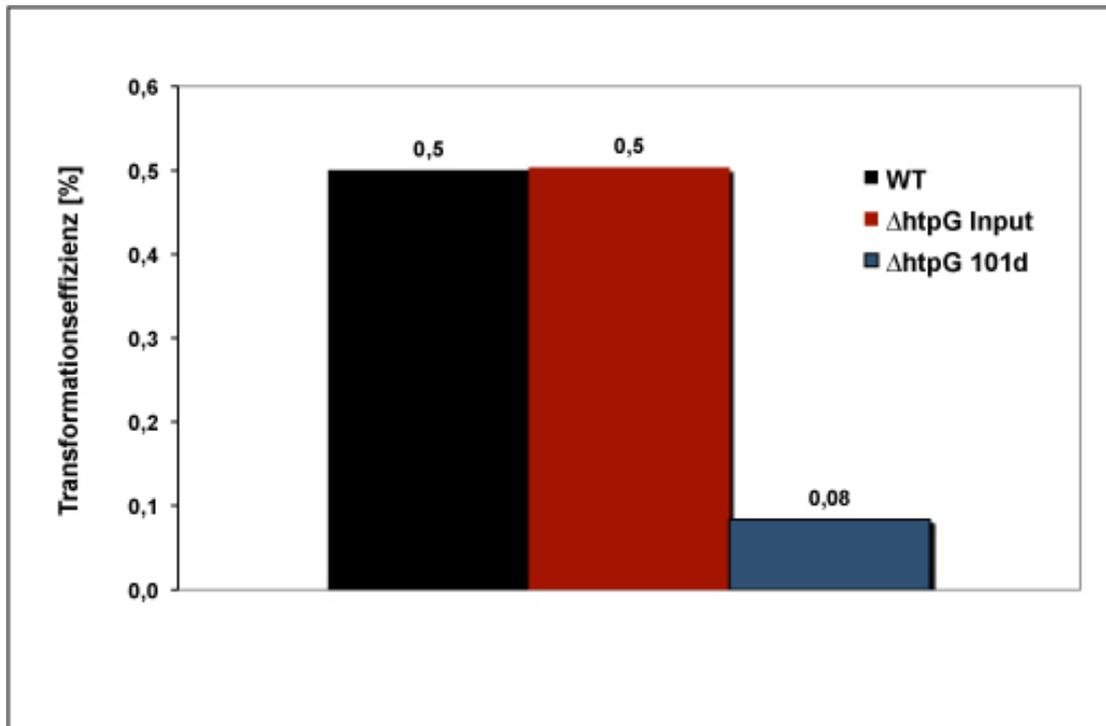


**Abbildung 44: Der Einfluss von HtpG und HtpG Trap auf die Adaptation an einen endogenen Stress, der durch die Mutation der Formylase ausgelöst wurde, in der GM 2.1.** A) Die genetische Maschine GM2.1 wurde mit der *B. subtilis* *def/fmt* Mutante (BSR73) angeimpft. Die Adaptation wurde über den Verbrauch an Minimalmedium unter Verwendung eines Datenloggers berechnet und mittels der Generationszeit, die der Stamm zum jeweiligen Zeitpunkt in der Wachstumskammer hatte, ausgedrückt. Diese wurde über die Zeit aufgetragen. Zwei unabhängige Läufe dieser Mutante wurden über 36 Tage verglichen. B) siehe A), jedoch wurde die genetische Maschine mit dem *B. subtilis* *htpG* Trap *def/fmt* Stamm (BSR75) angeimpft. Zwei unabhängige Läufe dieser Mutante wurden über 36 Tage verglichen. C) siehe A), jedoch wurde die genetische Maschine mit dem *B. subtilis* Wildtyp Stamm, der *def/fmt* (BSR73), der *htpG* Trap *def/fmt* (BSR75) und der *htpG* *def/fmt* Mutante (BSR74) nacheinander angeimpft, wobei deren Adaptation anhand der Verringerung der Generationszeit über die Zeit von 36 Tagen miteinander verglichen wurde.

### 3.2.3.1.3 Einfluss der Adaptionsprozesse in der „Genetic Machine“ auf die Kompetenzentwicklung

Wie schon erwähnt scheinen Bakterien, die über längeren Zeitraum in der „Genetic Machine“ in der logarithmischen Phase gehalten werden, Probleme bei der Induktion von Stationärphaseprozessen zu bekommen. Ein wichtiger Prozess, der während der Stationärphase von *B. subtilis* unter Nährstoffmangel in einer Subpopulation ausgelöst wird, ist die Kompetenzentwicklung (288), wobei genetische Kompetenz die Fähigkeit darstellt, DNA aus der Umwelt aufzunehmen und in das Genom durch homologe Rekombination einzuschleusen (289). Daher wurde die Transformationseffizienz der *htpG* Mutante, die über 101 Tage in der Maschine evolviert ist, im Vergleich zu den Ausgangsstämmen (Wildtyp,  $\Delta$ *htpG*) getestet (Abbildung 45). Dazu wurden die Stämme mit der chromosomalen DNA eines Tryptophan-auxotrophen Stammes transformiert und auf Minimalplatten mit und ohne Tryptophan ausplattiert. Durch Bestimmung der CFU konnte die Transformationseffizienz

berechnet werden.



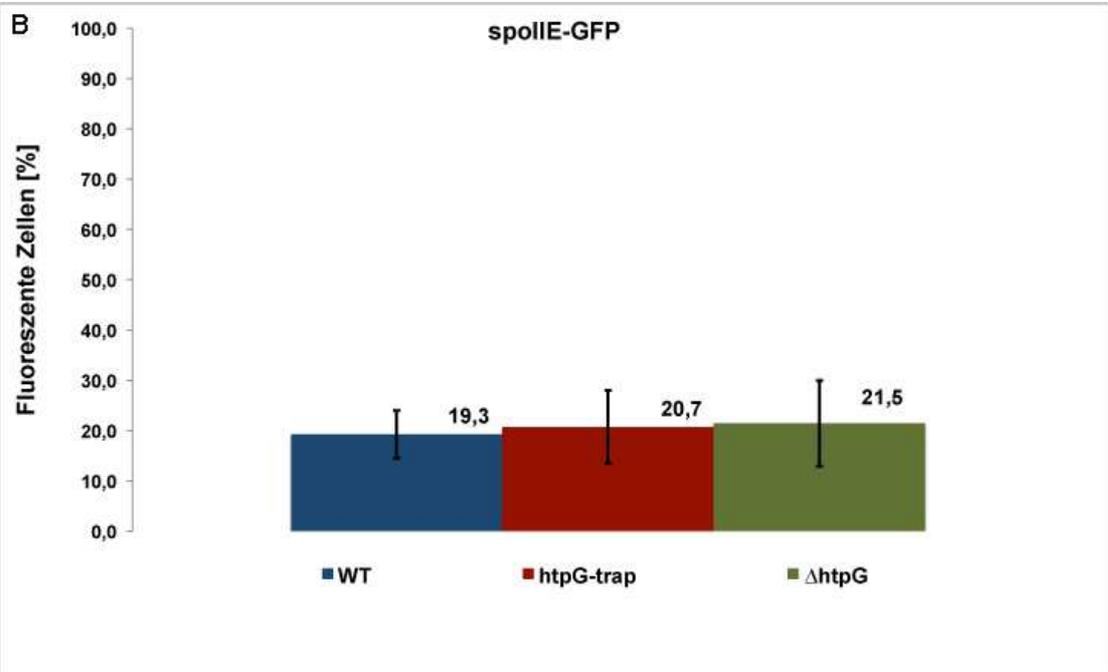
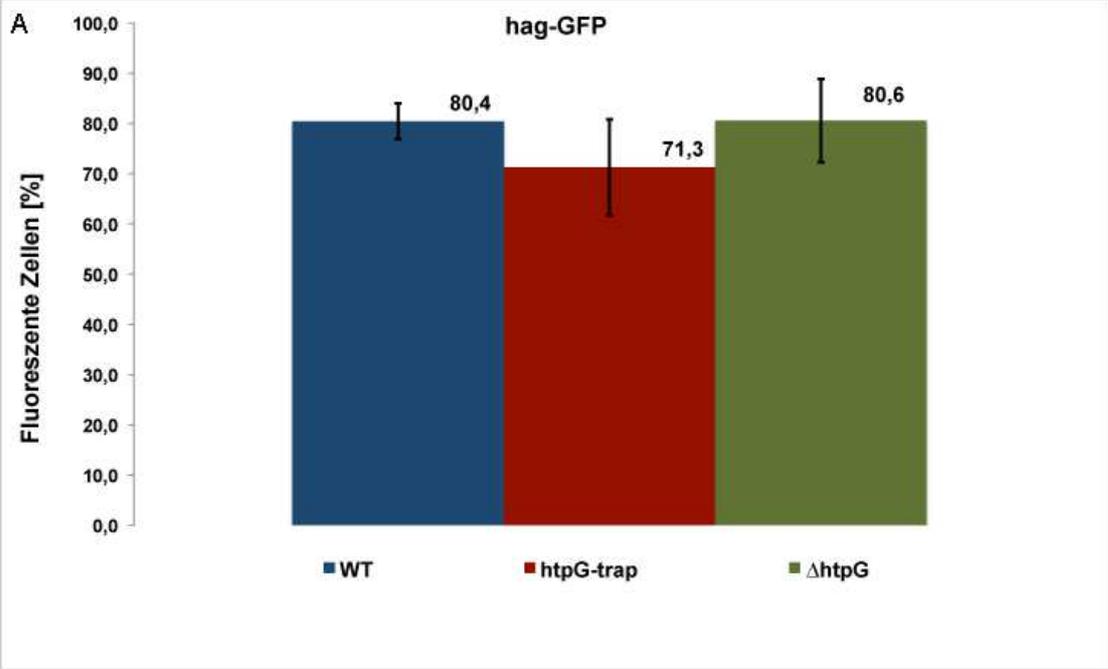
**Abbildung 45: Der Einfluss der Adaptation in der GM 2.1 auf Stationärphasenprozesse in *B. subtilis*.** Die Transformationseffizienz der *B. subtilis* *htpG* Mutante (BSR101-101), die für 101 Tage in der genetischen Maschine adaptierte (Experiment 1) wurde mit der Transformationseffizienz des Wildtypstammes und der *htpG* Mutante (BSR101), die beide nicht den Adaptationsprozessen der genetischen Maschine ausgesetzt waren, verglichen.

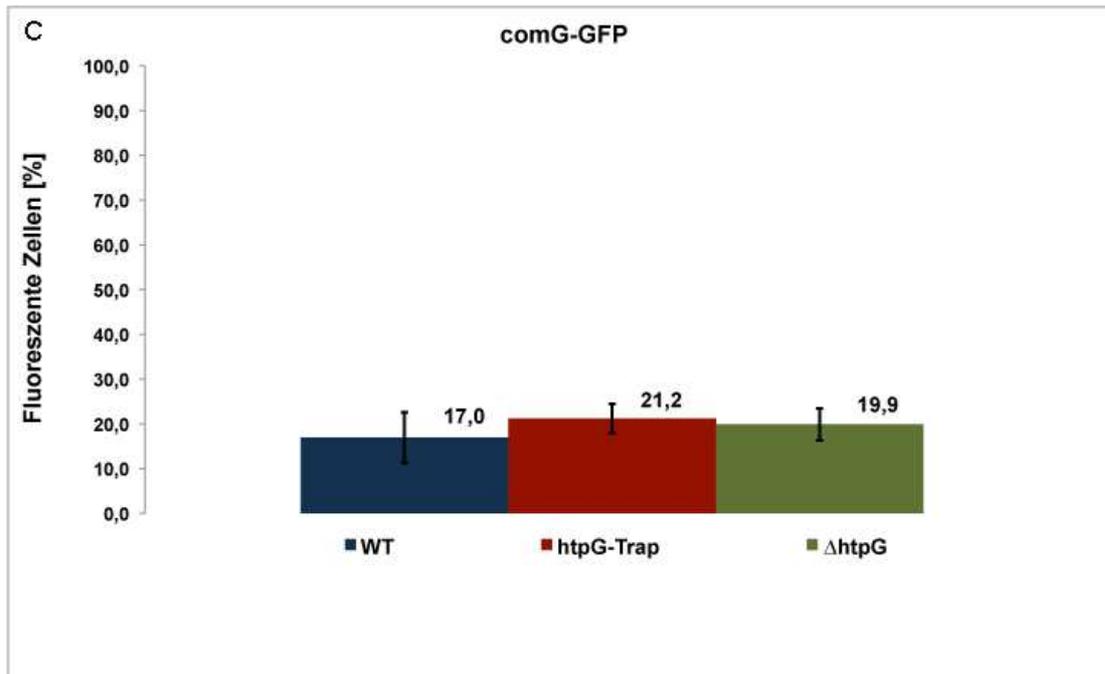
Abbildung 45 zeigt deutlich, dass der adaptierte Stamm eine gestörte Kompetenzentwicklung aufwies. Das deutet daraufhin, dass die Adaption in der „Genetic Machine“ mit einer Anpassung an logarithmisches Wachstum einhergehen und somit Einfluss auf die Induktion der Stationärphasenprozesse nehmen könnte.

### 3.2.3.2 Bistabilität

Da eukaryotisches Hsp90 bei der Faltung von bestimmten Proteinen, einschließlich Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielt und daher vermutlich die Genexpression beeinflussen kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich HtpG auch in *B. subtilis* möglicherweise auf die Genexpression auswirken kann, indem es möglicherweise direkt oder indirekt Einfluss auf die zufälligen Schwankungen in der Expression eines Masterregulatorgens nehmen kann, die in einem Teil der Zellen einer genetisch identischen Population zu einem neuen Expressionsmuster und damit zur Bistabilität führen können (238). Das Fehlen von HtpG

könnte dabei den Prozentsatz von Zellen in der Population, die das bistabile System anschalten, beeinflussen. Um den Effekt von HtpG auf Bistabilität zu untersuchen, wurden Promotoren von bekannten bistabil regulierten Genen an GFP fusioniert und in das Genom des Wildtyp-, des  $\Delta htpG$ - und des *htpG* Trap- Stammes in den *amy* Locus integriert. In diesem Zusammenhang wurden der Promotor von *comG*, das bedeutend für die Kompetenzentwicklung ist, der Promotor für *spoIIIE*, das wichtig für den Prozess der Sporulation ist und der Promotor von *hag*, das wichtig für die Motilitätsentwicklung in *B. subtilis* ist, benutzt. Durch das Zählen von GFP-positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde es ermöglicht, den Prozentsatz der Wildtyp Zellen, die das bistabile System anschalten im Vergleich zum *htpG*-defizienten und HtpG-Trap exprimierenden Zellen zu bestimmen. Für die Untersuchung des Einflusses von HtpG auf die Motilität wurden die jeweiligen Zellen, die GFP in Abhängigkeit des *hag* Promotors exprimieren, in LB angeimpft und in der logarithmischen Phase gezählt, wobei der Wildtyp mit HtpG-defizienten Varianten verglichen wurde (Abbildung 46A). Im Wildtyp zeigten 80,4 % der Zellen GFP Fluoreszenz und damit motiles Verhalten. Ein sehr geringer Unterschied konnte im  $\Delta htpG$  Stamm beobachtet werden, der 80,6 % motile Zellen aufwies. Der Stamm, der HtpG Trap produzierte ließ mit 71,3 % einen geringeren Prozentsatz an motilen Zellen erkennen. Anhand der Standardabweichung erkennt man jedoch, dass diese Abnahme nicht signifikant ist. Um den Einfluss von HtpG auf den Prozentsatz der sporulierenden Zellen zu ermitteln, wurde der Stamm, der GFP unter dem Promotor von *spoIIIE* exprimiert, in Sporulationsmedium angezogen und zwei Stunden nach Eintritt in stationäre Phase mikroskopiert (Abbildung 46B). Der *htpG* Trap und der  $\Delta htpG$  Stamm wiesen mit 20,7% und 21,5 % sporulierender Zellen nur einen sehr geringen Unterschied zum Wildtyp mit einem Prozentsatz von 19,7 % auf. Abbildung 46C zeigt den Einfluss von HtpG auf den Prozentsatz der Zellen, die zur Kompetenzentwicklung befähigt waren. Während im Wildtyp 17% der Zellen GFP-Fluoreszenz und damit Kompetenzentwicklung zeigten, wies der *htpG* Trap 21,2 % und der  $\Delta htpG$  Stamm 19,3 % kompetente Zellen auf. Auch für dieses bistabile System konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Zusammenfassend konnte für HtpG kein Einfluss auf diese untersuchten bistabilen Systeme nachgewiesen werden.





**Abbildung 46: Der Einfluss von HtpG auf bistabile Prozesse in *B. subtilis*.** A) Der *B. subtilis* Wildtyp Stamm (BSR66), die *htpG* Trap- (BSR72) und die *htpG* Mutante (BSR69), die GFP ektopisch unter dem *hag* Promotor exprimieren, wurden bei 37 °C in LB angezogen. In der logarithmischen Phase wurde der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert dieses Prozentsatzes und die Standardabweichung bestimmt. B) Der *B. subtilis* Wildtyp Stamm (BSR65), die *htpG* Trap- (BSR71) und die *htpG* Mutante (BSR68), die GFP ektopisch unter dem *spoIIIE* Promotor exprimieren, wurden bei 37 °C in Sporulationsmedium angezogen. Zwei Stunden nach Eintritt in die Stationärphase wurde der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert dieses Prozentsatzes und die Standardabweichung bestimmt. C) Der *B. subtilis* Wildtyp Stamm (BSR64), die *htpG* Trap- (BSR70) und die *htpG* Mutante (BSR67), die GFP ektopisch unter dem *comG* Promotor exprimieren, wurden bei 37 °C in Kompetenzmedium angezogen. Zwei Stunden nach Eintritt in die Stationärphase wurde der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert dieses Prozentsatzes und die Standardabweichung bestimmt.

## 4. Diskussion

### **4.1 Die Charakterisierung der Thermotoleranzentwicklung in *B. subtilis***

In diesem Teil der Arbeit wurde die Thermotoleranzentwicklung in *B. subtilis* genauer untersucht. Unter Thermotoleranz versteht man, dass Zellen, die zuvor einem milden Hitzeschock ausgesetzt wurden, nun normalerweise tödliche Temperaturen überleben können. Dabei wird vermutet, dass während des milden Hitzeschock, die Expression von Proteinen des Proteinqualitätskontrollsystems induziert wird, die zur Entwicklung der Thermotoleranz beitragen können (168, 290, 291). Hier konnte gezeigt werden, dass das durch den milden Präschock ausgelöste bessere Überleben unter eigentlich letalen Temperaturen mit einer verminderten Aggregatentstehung korreliert. Dabei wiesen Proteine des Proteinqualitätskontrollsystems, wie DnaK, die AAA-ATPase ClpC, die AAA-ATPase ClpX und die Protease ClpP nur einen kleinen beziehungsweise keinen Einfluss auf diese unter Thermotoleranzbedingungen verminderte Proteinaggregation auf. Wider Erwarten konnte sogar ein gegenteiliger Effekt für das ClpXP Proteasesystem beobachtet werden. Zellen, denen dieser Proteasekomplex fehlte, wiesen eine geringere Hitze-induzierte Aggregatentstehung auf, wobei dies auf die Akkumulation des transkriptionalen Regulators Spx, der eigentlich eine wichtige Rolle bei der oxidativen Stressantwort spielt, zurückgeführt werden konnte. Auch die Induktion der Proteindisulfidisomerase TrxA, deren Expression durch Spx reguliert wird, oder Wachstum unter anaeroben Bedingungen war ausreichend, um Proteinaggregation unter letalen Temperaturen zu mindern. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass Schutz vor oxidativen Stress unter Hitzebedingungen Proteinaggregation verhindern kann.

#### **4.1.1 Die Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen**

Durch Hitze ausgelöster Stress hat in der Zelle weitreichende Konsequenzen, die auf Proteinebene zu Missfaltung und Aggregation von thermolabilen Proteinen führen (17, 18), wobei Aggregate den geregelten Ablauf von Zellprozessen stören und zum Tod der Zelle führen können, wenn sie nicht abgebaut oder disaggregiert und rückgefaltet werden (33). Um

die Entstehung von Proteinaggregaten unter Thermotoleranzbedingungen verfolgen zu können, wurden zwei Methoden etabliert. Zum einen wurden unlösliche Proteinaggregate präpariert und mittels SDS PAGE und Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 6). Als Modellprotein für Proteinaggregate diente hierbei die Malatdehydrogenase, ein Protein, das als Teil des Citratzyklusses die Reaktion von L-Malat zu Oxalacetat katalysiert (274) und, das somit keinen Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle besitzt. Zum anderen wurden Marker der Proteinaggregation an fluoreszente Proteine fusioniert, um die Entstehung der Aggregate *in vivo* beobachten zu können. Als Marker dienten hierbei das kleine Hitzeschockprotein IbpA aus *E. coli*, von dem bekannt ist, dass es an Aggregate und „*Inclusion Bodies*“ binden kann (275, 276) und wiederum die Malatdehydrogenase aus *B. subtilis*. Ektopisch exprimiertes IbpA lokalisierte in der Fusion an GFP jedoch schon unter normalen Bedingungen hauptsächlich in polaren Foci (Abbildung 7), was auch schon in *E. coli* beobachtet werden konnte. Dazu wurde die Vermutung aufgestellt, dass einige fluoreszente Proteinfusionen - unter anderem auch Fusionen mit GFP - die Lokalisation von markierten Proteinen beeinflussen und zu einer artifiziellen Foci-Entstehung führen könnten, die mittels Immunfluoreszenz nicht beobachtet werden kann (278). Zudem konnte gezeigt werden, dass IbpA in *E. coli* Aggregate verändern (51, 276, 292) und sowohl in *E. coli*, als auch in *B. subtilis* einen Einfluss auf die Thermotoleranzentwicklung ausüben kann (279) (A. Heinz, Master Thesis). Daher wurde auf die MDH als weiteres endogenes, zur Aggregation neigendes Markerprotein zurückgegriffen, um die Entstehung von Aggregaten *in vivo* beobachten zu können. Dieses hat den Nachteil in der logarithmischen Phase schwach exprimiert zu sein, da der Citratzyklus in *B. subtilis* erst in der stationären Phase an Bedeutung gewinnt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass MDH in der früh-logarithmischen Phase ausreichend vorhanden ist, um als Marker zu dienen (Abbildung 9). Dies beruht vermutlich auf noch aus der Stationärphase angesammeltes MDH, welches die Zellen aufgrund der wenigen Zellteilungen noch nicht abgebaut haben.

Da die unter Hitzeeinwirkung entstandenen Foci aus IbpA-GFP sowohl mit den MDH-GFP Foci, als auch mit dunkleren Strukturen im Phasenkontrast, die vermutlich Proteinaggregate darstellen (81), ko-lokalisieren, scheinen sich beide als *in vivo* Marker für Proteinaggregation zu eignen (Abbildung 7, 10, 11) . Somit konnte mit beiden Methoden gezeigt werden, dass Zellen, die vor einem Hitzeschock, einem milden Präschock ausgesetzt wurden, deutlich weniger Aggregate entwickelten als Zellen, die auf die letale Temperaturerhöhung nicht vorbereitet wurden (Abbildung 6, 7, 10, 11). Dabei konnte generell beobachtet werden, dass durch den Präschock sowohl die Expression von Chaperonen wie DnaK und HtpG, als auch

von Komponenten des Proteasekomplexes wie ClpP, ClpC und McsB induziert wurde (Abbildung 6).

Damit wird die Vermutung unterstützt, dass durch einen milden Hitzeschock die Expression von Proteinen induziert wird, die während eines letalen Hitzeschocks die Entstehung von Aggregate verhindern können oder bereits entstandene fehlgefaltete Proteine abbauen oder rückfalten können.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich eine Erholungsphase nach den erhöhten Temperaturen sich nur positiv auf die Aggregatmenge auswirkte, wenn diese Zellen vorher durch den Präshock auf den wirklichen Hitzeschock vorbereitet wurden (Abbildung 12). Dieser Effekt der Aggregatabnahme zeigte sich unabhängig von Protein-Neusynthese während der Erholungsphase. Dies unterstützt die Annahme, dass der Präshock zu einer Induktion von Proteinen führt, die aggregierte Proteine disaggregieren und rückfalten beziehungsweise degradieren können.

#### **4.1.2 Der Einfluss des Proteinqualitätskontrollsystems auf die Entwicklung der Thermotoleranz im Hinblick auf Proteinaggregation**

Das Ziel weiterer Experimente war es, Proteine des Proteinqualitätskontrollsystems zu identifizieren, die bei der erniedrigten Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen eine Rolle spielen könnten.

##### **4.1.2.1 Der Einfluss der AAA+ ATPase ClpC auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen**

Die Ergebnisse zeigten, dass die AAA+ ATPase ClpC keinen Einfluss auf die Menge der unter Thermotoleranzbedingungen entstanden Aggregate hatte (Abbildung 13).

Da bekannt ist, dass ClpC zusammen mit ClpP CtsR, den Repressor der Klasse III Hitzeschockgene, degradiert und somit die Expression von unter anderem ClpC selbst und ClpP und damit eine schnelle Hitzeschockantwort und ermöglicht (160, 163, 164), war dies nicht zu erwarten. Zusätzlich konnte in mehreren Studien beobachtet werden, dass ClpC zusammen mit ClpP an der Degradation von Aggregaten beteiligt ist und vermutlich alleine Aggregation verhindern (77, 79, 83) und möglicherweise Aggregate rückfalten kann (83). Dazu passt die Beobachtung, dass ClpC nach einem Hitzeschock an den Aggregaten lokalisiert ist (Abbildung 6). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle bei der

Thermotoleranzentwicklung spielt, was vermutlich auf die verzögerte oder schwache Expression der Klasse III Hitzeschockgene zurückzuführen ist (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis).

In Bezug auf die im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöhte Hitze-induzierte Proteinaggregation in der *clpC* Mutante besteht jedoch die Möglichkeit, dass andere Hsp100/Clp Proteine und Chaperonsysteme die Funktion von ClpC übernehmen können und damit den negativen Effekt, den die Deletion mit sich bringen sollte, kompensieren. Darüber hinaus kann ein indirekter Effekt der *clpC* Mutation auf die Hitzeschockantwort, der auf die komplexe Rolle, die diese AAA+ ATPase in verschiedenen regulatorischen Netzwerken spielt (90, 91, 94, 160, 163, 164), zurückgeführt werden könnte, nicht ausgeschlossen werden.

Ist ClpC zusammen mit ClpP an der Degradation von Proteinen beteiligt, die bei der Hitzeschockantwort oder Entwicklung der Thermotoleranz eine Rolle spielen, würde die *clpC* Deletion zu einer erhöhten Menge dieser Proteine führen, die möglicherweise vor den weitreichenden Konsequenzen eines letalen Hitzeschocks schützen können. Ein Beispiel hierfür könnte die Argininkinase McsB sein, welche von ClpC in nicht-gestressten Zellen inhibiert wird (162). Fehlt nun ClpC, kann McsB schon vor einem Hitzeschock aktiv als Adaptorprotein CtsR, den Repressor der Klasse III Hitzeschockgene, binden und stört somit die CtsR-DNA-Interaktion. Dies führt zu einer leichten Induktion der Klasse III Hitzeschockgene, die die Zellen schon auf den nachfolgenden Hitzeschock vorbereiten könnte. Hiermit könnte auch erklärt werden, warum die fehlende Expression von ClpC den Zellen unter letalen Temperaturen eine verbesserte Überlebensrate ermöglicht (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis).

#### **4.1.2.2 Der Einfluss des Chaperons DnaK auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von *dnaK* nur einen schwachen negativen Effekt auf das Thermotoleranzverhalten ausübt (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis). Auch auf die Entstehung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen konnte nur ein geringer Einfluss der *dnaK* Mutation nachgewiesen werden (Abbildung 14). Die *dnaK*-defizienten Zellen, entwickelten nach 30 Minuten bei 53 °C nach dem Präschock ein gegenüber den Wildtyp Zellen nur leicht erhöhtes Aggregatlevel. Eine Überexpression von DnaK und des GroEL, die durch die Deletion von HrcA, den Repressor der Klasse I Hitzeschockgene erreicht wurde (154), führte zwar zu einem geringeren Aggregatlevel nach

einem letalen Hitzeschock. Die Hitzeresistenz konnte jedoch nicht in dem Maße erhöht werden, wie durch die Gabe eines Präschocks, die vollkommen ausreichend für die Entwicklung der Thermotoleranz im Bezug auf die Proteinaggregation schien (Abbildung 16). Dies steht in Einklang mit Überlebenskurven, die nur eine geringe intrinsische Thermotoleranz der *hrcA* Mutante vermuten ließen (135) (A. Heinz, Master Thesis). Somit wird suggeriert, dass das *dnaK* Operon zwar an der Entwicklung der Thermotoleranz, die zu einer verringerten Proteinaggregation unter Hitzestress führt, beteiligt ist. Jedoch scheinen auch andere Gene, die bei 48 °C induziert werden, dazu beizutragen, die Zelle vor dem Hitzeschock und der damit verbundenen, massiven Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen zu schützen. Dies war zu erwarten, da die Deletion von DnaK, das zwar als Chaperon an der Rückfaltung fehlgefalteter Protein beteiligt ist (30–34) und zusätzlich Aggregation verhindern kann (36) und daher auch nach dem Hitzeschock zusammen mit der unlöslichen Proteinfraction lokalisiert (Abbildung 6), nur einen moderaten temperatursensitiven Phänotyp in *B. subtilis* zeigte (52), während dies in *E. coli* zu einem signifikanten Wachstumsdefekt führte (53). Dies kann zum einen damit erklärt werden, dass DnaK in *E. coli* an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt ist (54, 55) und zum anderen zusammen mit der AAA ATPase ClpB, welche *B. subtilis* nicht besitzt, große Proteinaggregate auflösen kann (42). Daher kann vermutet werden, dass in *B. subtilis* anders als in *E. coli* der Degradation von fehlgefalteten Proteinen und Aggregaten eine weitaus bedeutendere Rolle zukommt als Rückfaltung von denaturierten und aggregierten Proteinen (5). Dies konnte auch durch die Untersuchungen an den Zellen der *clpC/dnaK* Doppelmutante hervorgehoben werden, die nach dem Hitzeschock eine massive Ansammlung von Aggregaten aufwies, wobei der positive Effekt der Thermotoleranz nicht mehr beobachtet werden konnte (Abbildung 15).

#### **4.1.2.3 Der Einfluss der Argininkinase McsB auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen**

Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Argininkinase McsB keinen Einfluss auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen und unter Hitzestress nimmt (Abbildung 17). Da McsB jedoch an der Induktion der Klasse III Hitzeschockgene beteiligt ist, indem es bei der Inaktivierung des Repressors CtsR eine Rolle spielt, war dies nicht vorauszusehen. Zusätzlich konnte durch weitere Experimente gezeigt werden, dass McsB für die Entwicklung der Thermotoleranz von Bedeutung ist, da das Überleben von

*mcsB*-defizienten Zellen, die einem milden Hitzeschock ausgesetzt waren nach dem letalen Hitzeschock beeinträchtigt war (eingereichtes Manuskript). Dies deutet darauf hin, dass die Klasse III Hitzeschockgene notwendig für die Entwicklung der Thermotoleranz sind, jedoch nicht unbedingt für die verminderte Aggregation unter Thermotoleranzbedingungen benötigt werden. Möglicherweise kann dies durch andere Komponenten des Proteinqualitätskontrollnetzwerks kompensiert werden. Dies steht auch in Einklang mit den Daten, welche durch die *clpC* Deletion hervorgebracht wurden.

MDH-YFP und IbpA-CFP wiesen in dieser Mutante eine äußerst ungewöhnliche Lokalisation auf. Schon vor dem Hitzeschock konnten extrem helle und große, polare Foci bestehend aus MDH-YFP und IbpA-CFP beobachtet werden, deren Aussehen sich nach dem Hitzeschock wenig änderte (Abbildung 17C).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Entstehung dieser untypischen Foci nicht geklärt werden. Da sie jedoch in Zellen auftauchen, die noch keinem Hitzeschock ausgesetzt waren, scheinen diese Foci keine durch Hitze entfalteten oder aggregierten Proteine zu enthalten. Außerdem ergab sich bei der Betrachtung der Phasenkontrastbilder eine zum Wildtyp ähnliche Aggregatzunahme nach dem letalen Hitzeschock, die nach Gabe des Präschocks um einiges schwächer ausfällt. Zudem zeigt die Präparation der unlöslichen Fraktion dieser Mutante (Abbildung 17A) keine außergewöhnlich vermehrte Aggregatbildung bei 37 °C. Da diese Foci-Entstehung im Wildtyp-Stamm, der die gleichen Fusionen exprimiert und den gleichen Bedingungen ausgesetzt wurde (Abbildung 11), nicht beobachtet werden kann, scheint dieser Phänotyp abhängig von der fehlenden Expression von McsB zu sein. Aus diesen Gründen kann auch ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um ein Artefakt handelt. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dieser ungewöhnlichen polaren Foci-Bildung und der Rolle von McsB bei der Auflösung des Kompetenzapparates, der sich aus zahlreichen cytosolischen und Membran-lokalisierten Proteinen an den Zellpolen bildet (92).

In diesem Fall ist die Auflösung jedoch abhängig von der Degradation durch die Protease ClpP im Komplex mit entweder ClpE oder ClpC. Besteht also wirklich ein Zusammenhang, müssten exprimiertes MDH-GFP oder IbpA-GFP in der *clpP* Mutante auch ähnlich aussehende Foci bilden. Dies konnte im Fall von MDH-GFP jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 18C). Im Gegensatz zeigt der Stamm, der IbpA-GFP Xylose-abhängig im *clpP* Hintergrund exprimiert, sehr viele und sehr stark fluoreszierende Foci (Abbildung 18D). Damit scheint ClpP zusammen mit McsB an der Auflösung der IbpA-GFP bildenden Foci, wobei IbpA möglicherweise ein Substrat von ClpP darstellt, beteiligt zu sein.

#### 4.1.2.4 Der Einfluss des ClpXP Proteasekomplexes auf die Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen

Das Fehlen des ClpXP Proteasekomplexes zeigte sowohl besseres Überleben (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis) als auch verringerte Bildung von Proteinaggregaten unter extremen Hitzestressbedingungen (Abbildung 18, 19). Dieser Effekt war für die Protease ClpP etwas stärker ausgeprägt als für die AAA+ ATPase ClpX. Dies lässt vermuten, dass die Deletion von ClpX teilweise durch andere AAA+ ATPasen kompensiert werden kann. Diese Ergebnisse widersprachen bestimmten Erwartungen, da sowohl ClpP, als auch ClpX eine bedeutende Rolle in der Proteinqualitätskontrolle zugeschrieben wird. In diesem Sinne spielt ClpX zusammen mit ClpP eine wichtige Rolle in der Degradation von unvollständig translatierten Proteinen (97).

Daneben ist ClpP zusammen mit ClpC oder ClpX, wie schon mehrfach erwähnt an der Regulation der Klasse III Hitzeschockgene beteiligt (160, 163, 164) und ist darüber hinaus imstande fehlgefaltete Proteine zu degradieren (77, 79, 83). Damit übereinstimmend konnte in der *clpP* Mutante beobachtet werden, dass sich die Aggregatmenge kontinuierlich mit der Zeit, die sie letalen Temperaturen unter Thermotoleranzbedingungen ausgesetzt war, erhöhte (Abbildung 18B). Auch spricht die starke Lokalisation dieses Proteins an der unlöslichen Proteinfraction für eine Beteiligung an der Verhinderung der Aggregation unter Thermotoleranzbedingungen (Abbildung 6), woraus geschlossen werden kann, dass ClpP durchaus eine gewichtige Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle spielt. Einer der unmittelbaren, vermutlich indirekten Effekte der *clpP*-Deletion äußert sich dahingegen in einer deutlich verminderten Menge von Proteinaggregaten in diesen Zellen, die Hitzestress ausgesetzt waren. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ClpP zusätzlich zu der Rolle, die es in der Proteinqualitätskontrolle inne hat, an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt ist (58).

Auch ClpX ist unter Thermotoleranzbedingungen hauptsächlich an der Aggregatfraction lokalisiert (Abbildung 6), so dass auch für die AAA+ ATPase auf eine Rolle in der beobachteten Verminderung von Proteinaggregaten unter Thermotoleranzbedingungen geschlossen werden kann. In der Mutante scheint diese Funktion von ClpX jedoch durch regulatorische Effekte überdeckt zu sein.

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass der ClpXP Proteasekomplex einen Faktor negativ reguliert, der als Stressregulator das Zellüberleben unter Hitzestressbedingungen sichert und zusätzlich die cytosolische Proteinaggregation verhindert.

### **4.1.3 Der Transkriptionsfaktor Spx und die Rolle von oxidativen Stress in der Entstehung von Proteinaggregaten unter Hitzestress**

#### **4.1.3.1 Spx scheint als möglicher Kandidat für den *clpX*- und *clpP* Phänotyp unter Thermotoleranzbedingungen verantwortlich zu sein**

Der durch das Fehlen des ClpXP-Proteasekomplexes beobachtete positive Effekt auf das Überleben und die Aggregation unter Hitzestress scheint im direkten Zusammenhang mit Spx, dem globalen Regulator der oxidativen Stressantwort zu stehen. Spx wurde ursprünglich als Suppressor der *clpP* und *clpX* Mutante identifiziert (65) und stellt ein Substrat dieses Komplexes dar (100) wobei es in *clpP*- und in *clpX*-defizienten Zellen akkumuliert (Abbildung 18, 19). Dabei wird die Stabilität von Spx posttranslational über regulatorische Proteolyse durch ClpXP reguliert, wobei das Adaptorprotein YjbH die Degradation beschleunigen kann. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das gleichzeitige Fehlen von Spx und ClpX beziehungsweise ClpP erneut eine deutlich erhöhte Proteinaggregation (Abbildung 21, 22) und schlechteres Überleben (eingereichtes Manuskript) unter Thermotoleranzbedingungen aufweist. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Phänotyp der *clpP*- und *clpX* Mutation auf die reduzierte, hitze-induzierte Proteinaggregation und das verbesserte Zellüberleben tatsächlich Spx-vermittelt ist.

#### **4.1.3.2 Spx als Regulator der Hitzeschockantwort**

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Spx sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen durch Hitze induziert werden kann (Abbildung 6) und dass *spx*-defiziente Zellen extrem Hitze-sensitiv sind und kein Thermotoleranzverhalten mehr zeigen (eingereichtes Manuskript). Zudem konnte mittels Microarrays gezeigt werden, dass ein großer Teil von Genen, deren Transkription unter Thermotoleranzentwicklung verändert wird, unter direkter oder indirekter Kontrolle von Spx steht (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis, (105), woraus geschlossen werden kann, dass das Spx Regulon auf irgendeine Weise die durch einen Hitzeschock vermittelte transkriptionalen Veränderungen unter Thermotoleranzbedingungen beeinflussen kann. Diese Ergebnisse lassen somit eine Beteiligung von Spx an der Hitzeschockantwort in *B. subtilis* vermuten. Wie zu erwarten, konnte für Spx ein Effekt auf die hitze-bedingte Aggregation nachgewiesen werden. Fehlte der Transkriptionsfaktor, reichte die Gabe des Präschocks nicht mehr aus, um die

Aggregatbildung unter letalem Hitzestress zu vermindern (Abbildung 20). Andererseits konnte ein erhöhtes Level an Spx, das durch die künstliche Induktion einer Proteolyse-resistenten Variante oder durch verminderte Degradation über die Deletion des Adapterproteins YjbH geschaffen wurde, vor der Entstehung von Proteinaggregaten unter Hitzestressbedingungen schützen (Abbildung 23, 24). In diesem Zusammenhang wurde eindeutig ausgeschlossen, dass Spx die Aggregatauflösung durch das Proteinqualitätskontrollsystem verstärkt (Abbildung 25).

Jedoch reicht die erhöhte Menge von Spx nicht aus, in Zellen das Aggregationslevel unter Hitzestress auf das Niveau zu senken, das durch den milden Präschock erreicht werden konnte. Diese Daten deuten also darauf hin, dass Spx essentiell aber nicht ausreichend für die Verhinderung der Proteinaggregation während der Thermotoleranzentwicklung ist, da in diesem Zusammenhang ein erhöhtes Level an Spx nicht den 48 °C Präschock ersetzen kann. Dies ist vermutlich auf die Induktion von anderen Chaperonen und Proteasen im Rahmen des 48 °C Präschocks zurückzuführen, die ebenso zu der Thermotoleranzentwicklung beitragen können. Jedoch kann Spx eine sehr bedeutende Rolle an der Thermotoleranzentwicklung im Hinblick auf das Überleben und der Proteinaggregation zugeschrieben werden, während das Fehlen von Proteasen, wie des ClpCP Komplexes oder von Chaperonen, wie zum Beispiel DnaK eher einen kleineren Einfluss haben (Abbildung 13, 14).

#### **4.1.3.3 Proteinoxidation kann unter Hitzestress durch die Induktion von Spx verhindert werden**

Als Transkriptionsfaktor kontrolliert Spx ein großes Regulon an Genen, von denen einige bedeutend für die Aufrechterhaltung der Redoxbalance und der Schwefelhomeostase der Zelle sind (102, 104, 183, 184). Da Spx zusätzlich daran beteiligt zu sein scheint, die hitze-induzierte Proteinaggregation cytosolischer Proteine zu vermindern, liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund von Hitze zelluläre Proteine anfangen zu entfalten und oxidativ beschädigt werden, was dann zum Beispiel zu einer falschen Ausbildung von Disulfidbrücken oder irreversibler Carbonylierung dieser Proteine führen kann. In der Tat war es möglich eine erhöhte Carbonylierung cytosolischer Proteine nach einem letalen Hitzeschock in *B. subtilis* und damit oxidative Schädigung dieser nachzuweisen (Abbildung 26A). Wurden die Zellen auf den Hitzeschock durch die Gabe eines Präschocks vorbereitet, zeigte sich ein geringeres Level an carbonylierten Proteinen (Abbildung 26A). Da in diesen Zellen die Proteine auch zu

einer geringeren Aggregation neigen, liegt ein Zusammenhang zwischen oxidativer Schädigung von Proteinen und Entstehung von Proteinaggregaten nahe.

In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Carbonylierung eine irreversible Modifizierung von Proteinen darstellt, die dabei zu einem weiteren Verlust der Integrität des Proteins führt (170) und möglicherweise als Signal fungiert, beschädigte, aber noch lösliche Proteine eher durch das Proteasesystem der Zelle zu beseitigen, als sie durch molekulare Chaperone rückzufalten (176). Unter Hitzestress entsteht jedoch möglicherweise eine so große Anzahl an fehlgefalteten, carbonylierten Proteinen, dass diese die Kapazität des Proteasesystems ausschöpfen und daraufhin anfangen Aggregate zu bilden. Aggregate aus stark oxidierten Proteinen präsentieren sich als schlechte Substrate für das Proteasesystem und scheinen dieses sogar zu inhibieren (293). In diesem Sinne wäre es möglich, dass oxidative Modifizierungen die Behebung der Fehlfaltung oder Rückfaltung dieser Proteine erschweren und die Aggregatentstehung erleichtern.

In Übereinstimmung damit konnte beobachtet werden, dass Spx die Menge an carbonylierten Protein unter Hitzestress- und Thermotoleranzbedingungen beeinflussen konnte (Abbildung 26E-J). Dabei bewirkte ein erhöhtes Level an Spx, das entweder durch die Deletion von *clpP* (Abbildung 26E) oder *clpX* (Abbildung 26F) oder durch die Induktion der Proteolyse-resistenten Spx-Variante (Abbildung 26H) erreicht wurde, eine geringere Proteincarbonylierung nach einem Hitzeschock, die mit einem geringeren Aggregationslevel korrelierte. In der *spx* Mutante konnte der entgegengesetzte Effekt beobachtet werden (Abbildung 26G), wobei der positive Einfluss, den ClpX und ClpP auf die Proteincarbonylierung aufwiesen, durch die zusätzliche Deletion von Spx aufgehoben wurde, so dass sich das Carbonylierungslevel in den Doppelmutanten im Vergleich zur Einzelmutante unter Thermotoleranzbedingungen auffällig erhöhte (Abbildung 26 I, J). Diese Auswirkungen, die das Level der Proteincarbonylierung auf die Aggregatentstehung unter erhöhten Temperaturen hat, schienen spezifisch auf Spx zurückgeführt werden können. In der *hrcA* Mutante, die unabhängig von Spx durch Überexpression von GroEL und DnaK eine verminderte Proteinaggregation unter Hitzestress aufwies (Abbildung 16), wurde das Level der Proteincarbonylierung nicht beeinflusst. Dabei spielen beide Chaperone vermutlich nur bei der Verhinderung der Entfaltung und bei der Rückfaltung von noch nicht oxidierten Proteinen eine große Rolle. Einmal entfaltete und oxidierte Proteine können sehr wahrscheinlich nicht mehr so einfach rückgefaltet werden und müssen degradiert oder durch redoxspezifische Chaperone erneut reduziert werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Induktion von Spx unter Thermotoleranzbedingungen zu einer erhöhten Expression von redoxspezifischen Enzymen führt, welche die Oxidation von unter Hitzestress entfalteten Proteinen verhindern und damit die Rückfaltung oder Degradation dieser erleichtern, wobei die irreversible Bildung von Aggregaten verhindert wird.

Betrachtet man jedoch den Oxy-Blot in den Wildtyp-Zellen, fällt auf, dass diese schon unter normalen Bedingungen einen sehr hohen Grad an Proteincarbonylierungen aufwiesen. Die Zunahme nach dem Hitzeschock konnte zwar detektiert werden, sie fiel jedoch nicht deutlich aus (Abbildung 26A-G). Daher stellte sich die Frage ob unter Verwendung dieses Kits wirklich nur Proteincarbonylierung detektiert werden. In diesem Sinne deuteten frühere Untersuchungen daraufhin, dass die Möglichkeit besteht, dass mit dieser Methode falsche Menge an Proteincarbonylierung detektiert wird. Levine et al. konnte zeigen, dass das Erscheinen von Carbonylgruppen kein Beweis für oxidative Modifizierungen ist, da Glykierungen, also nicht-enzymatische Glykosylierungen, auch solche Gruppen an Aminosäurereste hängen kann (294). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Thiole, wie zum Beispiel Dithiothreitol oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, die nach Herstellerangaben des verwendeten Oxy-Blot Kits dem Lysepuffer zugefügt werden müssen, um Oxidation der Proteine nach der Zellyse zu vermeiden, das Proteincarbonyllevel artifiziell erhöhen können (295). In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Lagerung der Proben in Anwesenheit von Thiolen nach der Derivatisierungsreaktion zu künstlich erniedrigten Carbonylwerten führen kann. Da in dieser Arbeit jedoch das Proteincarbonyllevel bestimmter Mutanten untereinander oder mit dem Wildtyp verglichen wurden, können zueinander relative, valide Aussagen getroffen werden. Jedoch könnte der hier bestimmte Oxidationsstatus von Proteinen nach einem Hitzeschock durch andere Methoden, wobei massenspektrometrische Untersuchungen in Betracht gezogen werden könnten (296), zusätzlich bestätigt werden.

#### **4.1.3.4 Schutz vor oxidativem Stress kann die hitze-induzierte Aggregatentstehung verhindern**

Die Überwachung des Oxidationsstatus der Zelle scheint somit auch unter Hitzestressbedingungen essentiell zu sein und Einfluss auf die Entstehung von Proteinaggregaten nehmen zu können. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass das, durch Spx regulierte Enzym Thioredoxin TrxA (Abbildung 23, 24) (104), welches den intrazellulären Redoxstatus der Zelle kontrolliert (196, 197), in der Lage war, die

Aggregation von Proteinen unter tödlichen Temperaturen zu reduzieren (Abbildung 27). Dies lässt vermuten, dass Hitzestress den intrazellulären Redoxstatus stört, was zu einer oxidativen Schädigung von Proteinen führen kann. In Einklang damit konnte bereits im Rahmen früherer Studien gezeigt werden, dass TrxA, wie Spx auch, nicht nur durch oxidativen Stress, sondern auch durch andere Stressarten, wie Hitze und Ethanol induziert wird (Abbildung 6) (105, 185, 199). Erhöhte Level an Thioredoxin könnten gestresste *B. subtilis* Zellen dabei unterstützen, den nativen und reduzierten Status ihrer zellulären Proteine aufrechtzuerhalten, indem es mit Disulfiden oder Thiolgruppen von fehlgefalteten Proteinen, die möglicherweise im Rahmen des Hitzestress oxidiert wurden, interagiert. Dies könnte zu einer Verhinderung der Aggregation der oxidierten Proteine führen (297). In Übereinstimmung hiermit konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass die Redox-regulierten Chaperone HsLO (Hsp33) oder YajL (DJ1) vor Proteinaggregation, die durch oxidativen Stress ausgelöst wird, schützen können (298–300). Überdies führte die Überexpression der Superoxiddismutase SodA (272) oder der Alkyl Hydroperoxid Reduktase AhpF (301), zweier Enzyme, die Zellen vor den Auswirkungen des oxidativen Stresses schützen können, zu einer verringerten Menge an Proteinaggregaten in *E. coli*, die während des normalen Alterungsprozess oder durch Antibiotika, welche die Translation beeinträchtigen können und dadurch fehltranslatierte Proteine hervorbringen, akkumulierten. Zusätzlich zeigten *E. coli* Zellen als Antwort auf einen Hitzeschock eine erhöhte Superoxiddismutase Expression (302). Interessanterweise wird die Transkription von Homologen dieser erwähnten, durch Redoxstress regulierten Chaperone und Enzyme (HsLO (*yacC*), YaiL (*yfkM*, *yraD*), AhpF (*ahpF*), SodA (*sodA*)) in *B. subtilis* durch Spx kontrolliert (eingereichtes Manuskript, A. Heinz Master Thesis, (105). Zusätzlich konnte in *E. coli* beobachtet werden, dass Thioredoxine mit fehlgefalteten und denaturierten Proteinen, ähnlich wie molekulare Chaperone, interagieren und entweder direkt ihre Rückfaltung fördern oder andere Chaperone dabei unterstützen konnten. Diese Aktivität zeigte sich als unabhängig von ihrer Disulfidisomerase-Aktivität (297, 303).

Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass TrxA im Gegensatz zu Chaperonen oder Proteasen, also anderen Proteinen, die eine Rolle bei der Verhinderung von Aggregation unter Hitzestress spielen, nach einem Hitzeschock nicht in der unlöslichen Fraktion lokalisiert ist (Abbildung 27C), wobei dadurch suggeriert wird, dass TrxA seinen schützenden Einfluss nur auf noch lösliche und nicht schon auf bereits aggregierte Proteine ausüben kann.

Im Einklang mit der Beobachtung, dass scheinbar der Schutz vor oxidativem Stress Aggregation unter Hitzestressbedingungen verhindern kann, entwickelten Zellen nach einem

Hitzeschock weniger Aggregate, wenn sie anaeroben Bedingungen ausgesetzt waren und somit kein Sauerstoff für die Atmung zu Verfügung stand (Abbildung 28).

Somit wird durch die vorangegangenen Ergebnisse aufgestellte Hypothese, dass die Hitze-induzierte Entstehung von Proteinaggregaten durch Sauerstoff und der damit möglichen oxidativen Schädigung begünstigt wird, durch diese Daten unterstützt.

#### **4.1.3.5 Ursachen für die hitze-induzierte oxidative Schädigung von Proteinen und die Aktivierung von Spx durch Hitze**

Nun stellte sich allerdings die Frage, worin die Ursache für die oxidative Beschädigung von Proteinen unter Hitzestressbedingungen liegt. In diesem Zusammenhang wurde die Entstehung eines sekundären, oxidativen Stresses in verschiedenen *Bacillus* Arten vermutet, der durch Hitze, aber auch durch andere Stressarten, wie zum Beispiel die Gabe von Antibiotika ausgelöst werden kann (178, 304–306). Dabei werden möglicherweise Proteine der Atmungskette durch den Stress geschädigt (177), was demnach zu einem erhöhten Level von reaktiven Sauerstoffspezies führt, wobei dies nach Hitzestress in *B. subtilis* experimentell bestätigt werden konnte (304). Auch konnte unter anaeroben Bedingungen keine Produktion von ROS nach einem letalen Hitzeschock nachgewiesen werden, wobei die untersuchten *B. cereus* Zellen zusätzlich resistenter auf diese erhöhten Temperaturen reagierten (305). Somit besteht die Möglichkeit, dass ClpX und YjbH durch den durch Hitze ausgelösten, oxidativen Stress inaktiviert werden, was zu einer schnellen Stabilisierung und Akkumulation von Spx führen würde (101, 190, 191). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass erst die oxidative Bildung einer N-terminalen intramolekularen Disulfidbrücke Spx als transkriptionaler Aktivator anschaltet (184, 193, 194). Auch dies könnte mittels dieses sekundär entstehenden oxidativen Stresses ermöglicht werden.

Weitere Daten weisen jedoch darauf hin, dass die oxidative Schädigung von Proteinen durch zum Beispiel Carbonylierung auch in Abwesenheit von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stattfinden kann, wobei davon ausgegangen wird, dass Substrate entstehen, die anfällig gegenüber oxidativen Angriffen sind (179, 180). Dabei ist die Oxidation stark mit der Produktion fehlerhafter Proteine, die zum Beispiel durch Hitzeeinwirkung ausgelöst werden kann, assoziiert (179).

In Einklang damit beobachtete Ling et al, dass Aminoglycoside, eine Gruppe von Antibiotika, die die Translation stören können, zu einem erhöhten Level an carbonylierten Proteinen und Proteinaggregaten in *E. coli* führten, wobei dies nicht auf eine gesteigerte Radikalbildung zurückzuführen war, sondern auf die Fehlfaltung falsch synthetisierter Proteine und die

Destabilisierung von Proteinen, die Aggregation verhindern können (301). Eine Hitzevermittelte Stabilisierung von Spx könnte in diesem Fall durch die Auslastung der ClpXP Protease mit den unter Hitzestress akkumulierenden fehlgefalteten und entfalteten Proteine erklärt werden (77). Die oxidative Aktivierung von Spx unter Hitzeeinwirkung ohne einen sekundär auftretenden oxidativen Stress zu begründen, gestaltet sich schwieriger. Da Spx jedoch für das Ausüben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiviert werden muss und dies auch durch eine erhöhte Expression von TrxA nach einem Hitzeschock gezeigt werden konnte (Abbildung 6), scheint das Cytosol nach Hitzeeinwirkung einen gewissen Grad an Oxidation aufzuweisen. Möglicherweise reicht auch schon der Sauerstoff unter normalen Bedingungen aus, um Spx zu oxidieren. Um dies abschließend zu bestimmen, müsste in weiteren Experimenten der intrazelluläre Oxidationszustand nach einem Hitzeschock bestimmt werden. Eine Möglichkeit wäre, eine Redox-sensitive Variante von GFP in das Chromosom zu klonieren. Die fluoreszenten Eigenschaften dieser Varianten verändern sich, wenn Disulfidbrücken zwischen den eingeschleusten Cysteinen geschlossen werden. Somit erlauben sie die Visualisierung des Oxidationsstatus in der Zelle (307, 308), wobei dies schon erfolgreich in *B. subtilis* getestet werden konnte (200).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen folglich vermuten, dass der Transkriptionsfaktor Spx nicht nur an der Aufrechterhaltung der Schwefelhomöostase und des intrazellulären Redoxzustandes beteiligt ist, sondern auch eine bedeutende Rolle spielt, den Einfluss des intrazellulären Oxidationsstatus auf die Proteinqualitätskontrolle im Rahmen der Hitzeschockantwort zu bestimmen und zu regulieren (184, 193, 194).

## **4.2 Die Rolle des Chaperons HtpG und seine Bedeutung für die Evolution in Prokaryoten**

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurden evolutionäre Prozesse, die zur Anpassung an Stress führen, genauer betrachtet. Zufällige Mutationen innerhalb einer Population führen während der Evolution zur Selektion genetisch an diesen Stress besser angepasster Varianten. Trotzdem sollte ein schützendes System vorhanden sein, welches den Organismen trotz der genetischen Variation eine normale Entwicklung garantiert (6). In Eukaryoten wurde in diesem Zusammenhang das molekulare Chaperon Hsp90 identifiziert, welches in der Lage ist genetische Variabilität abzupuffern (8, 9). Bakteriell HtpG weist zwar eine hohe Homologie zu eukaryotischem Hsp90 auf (126), trotzdem konnte seine Funktion bisher noch nicht

eindeutig aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Bedeutung des Chaperons HtpG für *B. subtilis* näher beleuchtet und eine mögliche Funktion in evolutionären Prozessen experimentell untersucht und diskutiert.

In diesem Sinne wurde HtpG biochemisch und in seiner Funktion als ATPase charakterisiert, wobei sich die Bestimmung des Oligomerisierungszustandes als schwierig herausstellte. In Einklang mit eukaryotischen Hsp90 und HtpG aus *E. coli* wies HtpG eine sehr schwache ATPase-Aktivität auf.

Die Charakterisierung einiger Doppelmutanten erbrachte, dass das gleichzeitige Vorhandensein von ClpC und HtpG für die Aufrechterhaltung des Wachstums sowohl unter normalen, als auch unter Hitzestressbedingungen notwendig ist, wobei dieser Effekt nicht auf der Vermeidung erhöhter Aggregatentstehung beruhte. Auch konnte keine direkte Interaktion zwischen ClpC und HtpG nachgewiesen werden. Jedoch scheint HtpG mit Proteinen, die beim Stoffwechsel von *B. subtilis* eine Rolle spielen, mit ribosomalen Proteinen, Triggerfaktor und der RNA-Polymerase in Wechselwirkung zu stehen.

Der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an einen bestimmten endogenen und exogenen Stress wurde mittels experimenteller Evolution in *B. subtilis* näher untersucht. Während durch erhöhte Salinität der exogene Stress geschaffen wurde, bestand der endogene Stress aus der Deletion des Gens für die Formyltransferase, einem Enzym das eine überaus bedeutende Rolle in der Proteinbiosynthese von *B. subtilis* spielt. Einen Einfluss von HtpG auf die Evolution in *B. subtilis* konnte unter Verwendung der experimentellen Evolution aufgrund von maschinell- und Zeit-bedingten Beeinträchtigungen nicht eindeutig bestimmt werden.

Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass HtpG in *B. subtilis* möglicherweise Auswirkungen auf bistabile Systeme hat, indem es direkt oder indirekt Einfluss auf Faktoren nimmt, deren Schwankungen es ermöglichen die Genexpression zu steuern. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen ausgeschlossen werden.

#### **4.2.1 Biochemische Charakterisierung des molekularen Chaperons HtpG**

Um den Oligomerisierungszustand von HtpG zu bestimmen wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt (Abbildung 29), wobei gezeigt werden konnte, dass HtpG aus *B. subtilis* vor und nach ATP-Zugabe nach dem gleichen Volumen von der Säule eluierte, was darauf hindeutet, dass ATP keinen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand von HtpG hat. Es stellte sich jedoch die Frage, ob die Methode der analytischen Gelfiltration

geeignet ist, den Oligomerisierungsgrad von HtpG zu bestimmen, nachdem das in diesem Experiment ermittelte Molekulargewicht von HtpG deutlich größer als erwartet ausfiel. Für HtpG aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass es in der meisten Zeit als Dimer vorliegt (308). Aufgrund der hohen Konservierung wurde dies auch für HtpG aus *B. subtilis* angenommen. Unter Verwendung dieser Methode wurde jedoch ermittelt, dass HtpG eher als Tetramer oder sogar Pentamer vorliegt. Allerdings geht die Methode der analytischen Gelfiltration von globulären Molekülen aus. Nicht globuläre Proteine weisen kein zu ihrer Größe perfektes Elutionsverhalten auf, wodurch sich die Berechnung des Molekulargewichts als schwierig gestalten kann.

Mittels Bestimmung der Kristallstruktur konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei HtpG aus *E. coli* nicht um ein globuläres Protein handelt (129) und dies ist auch für HtpG aus *B. subtilis* anzunehmen. Zudem ist bekannt, dass es sich bei HtpG um ein hochflexibles Protein handelt, wodurch es sich noch weit entfernter von dem globulären Zustand befinden kann. Daher sollte auf andere Methoden zurückgegriffen werden, um den Oligomerisierungszustand von HtpG zu bestimmen. Dabei eignet sich zum Beispiel die Methode der analytischen Ultrazentrifugation, da hierbei die Oberfläche der zu bestimmenden Moleküle keine Rolle spielt und das Molekulargewicht exakt bestimmt werden kann.

Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde ein Enzym-gekoppelter Assay, der die Akkumulation von ADP ausschließt, herangezogen. ADP würde HtpG binden und dieses inaktivieren (286). Die Umsetzung von ATP konnte mittels der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden (Abbildung 30). Außerdem konnte gezeigt werden, dass HtpG aus *B. subtilis* in Übereinstimmung mit Hsp90 aus *S. cerevisiae* und HtpG aus *E. coli* (130, 287) eine sehr schwache ATPase-Aktivität aufweist. Da HtpG aus *E. coli* eine große Homologie in der Aminosäuresequenz zu HtpG aus *B. subtilis* besitzt, könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass beide auch in ihrer dreidimensionalen Struktur aus einer ATP-Binde-, einer mittleren und einer Dimerisierungsdomäne hochkonserviert sind und, dass bei beiden Chaperonen Konformationsänderungen eng an ATP-Bindung und Hydrolyse geknüpft sind (129).

#### **4.2.2 Die Bedeutung des molekularen Chaperons HtpG für *B. subtilis***

Während Hsp90 in Eukaryoten essentiell ist und eine bedeutende Funktion als Regulator der Zellfunktion ausübt (9), ist die Funktion von HtpG in *B. subtilis* noch nicht eindeutig geklärt. Eine Deletion von *htpG* zeigte weder unter normalen Bedingungen noch unter Stress Auswirkung auf die zellulären Funktionen (135). Wachstumsexperimente, in denen die *htpG* Mutante und HtpG Trap, eine Variante von HtpG, die aufgrund eines Basenaustausches nicht in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren, mit verschiedenen Mutanten, die in *B. subtilis* einen Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle haben, kombiniert wurden, zeigten im Kombination mit DnaK (Abbildung 32) und ClpP (Abbildung 33) keinen Effekt.

Bei gleichzeitigem Fehlen von ClpC und HtpG konnte *B. subtilis* sein normales Wachstum, sowohl unter normalen Bedingungen, als auch unter Hitzestressbedingungen, nicht aufrechterhalten (Abbildung 34). Dies deutet daraufhin, dass HtpG auf direkte oder indirekte Weise, also über andere Proteine, die sowohl Substrate von ClpC, als auch von HtpG darstellen, mit ClpC zusammenarbeitet. Eine direkte Wechselwirkung mit ClpC konnte jedoch unter Verwendung von Ko-Immunopräzipitationsexperimenten ausgeschlossen werden (Tabelle 16, 17). Eine mögliche Erklärung für das normale Wachstumsverhalten bei 48 °C, ist, dass diese Temperatur einen milden Hitzeschock darstellt, der zu der Hochregulierung zahlreicher Chaperone und anderer, für die Proteinqualitätskontrolle wichtiger Proteine führt, die den Effekt der Doppelmutanten kompensieren und zu normalen Wachstum führen konnten. Ein erhöhtes Level an Proteinaggregation nach Hitzeeinwirkung schien nicht der Grund für den Wachstumsdefekt zu sein, da dies in der *clpC/htpG* Doppelmutante eindeutig ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 35), obwohl sowohl ClpC, als auch HtpG der Gruppe der molekularen Chaperone zugeordnet werden können und zumindest für ClpC eindeutig gezeigt werden konnte, dass es in *B. subtilis* die Entstehung von Aggregaten verhindern (83) und an Disaggregation und Rückfaltung beziehungsweise Degradation fehlgefalteter Proteine (77, 83) beteiligt ist.

Im Rahmen von Ko-Immunopräzipitations Experimenten konnten Proteine, die beim Stoffwechsel von *B. subtilis* eine Rolle spielen, ribosomale Proteine, Triggerfaktor und die RNA-Polymerase als mögliche Substrate (Clients) von HtpG identifiziert werden. Eventuell ist HtpG für die Faltung dieser Enzyme, die am Stoffwechsel beteiligt sind, von Bedeutung. Fehlt HtpG, wäre es möglich, dass diese Aufgabe von anderen Chaperonen, wie zum Beispiel ClpC übernommen wird. Damit könnte der beobachtete Wachstumsdefekt der *clpC/htpG*

Doppelmutante erklärt werden. Das Fehlen beider Chaperone könnte möglicherweise zur Destabilisierung eines Proteins führen, das eine bedeutende Funktion im Stoffwechsel von *B. subtilis* innehat, was letztendlich Auswirkungen auf die Teilungsrate des Bakteriums haben könnte. Auch der fehlende Phänotyp einer *htpG* Einzelmutante könnte hiermit erklärt werden. Eine Interaktion mit Triggerfaktor scheint auch nicht abwegig, da dieses Protein auch ein Chaperon darstellt und eine Zusammenarbeit denkbar wäre. Wechselwirkungen mit ribosomalen Proteinen oder der RNA-Polymerase deutet darauf hin, dass HtpG die Transkription und Translation von Proteinen beeinflussen könnte. Da trotzdem nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese identifizierten Proteine trotz der Kontrollen nicht mit HtpG, sondern den Beads interagieren und somit falsch positive Ergebnisse darstellen, sollten diese Ergebnisse mittels weiterer Experimente verifiziert werden. Interessante Kandidaten könnten zum Beispiel mit einem Tag aufgereinigt werden, wobei die Interaktion mit HtpG beispielsweise über *in vitro* Proteininteraktionsexperimente oder der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie nachgeprüft werden könnte.

Um die Rolle von HtpG in der bakteriellen Zelle weiter einzugrenzen, könnten Microarray-Analysen durchgeführt werden. Vergleicht man das relative mRNA-Level eines Stammes, dem das *htpG* Gen fehlt mit einem, der HtpG exprimieren kann, könnten Gene identifiziert werden, deren Expression von HtpG beeinflusst werden.

#### **4.2.3 Der Einfluss von HtpG auf evolutionäre Prozesse in *B. subtilis***

Eukaryotisches Hsp90 besitzt eine duale Rolle, wobei es einerseits für die Stabilisierung von, für die Entwicklung der Zelle wichtigen Proteinen unter normalen Bedingungen von Bedeutung ist (9) und andererseits eine wichtige Funktion bei der Rückfaltung hitze-geschädigter Proteine hat (124). Dadurch ist es in der Lage Veränderungen in der Umwelt auf die zelluläre Entwicklung zu übertragen, worauf sich seine bedeutende Rolle in der Evolution begründet. Hsp90 agiert als evolutionärer Puffer. Dies bedeutet, dass dieses Chaperon der Zelle erlaubt, Mutationen frei vom Selektionsdruck zu akkumulieren, ohne dass diese phänotypisch sichtbar werden. Unter veränderten Umweltbedingungen kann Hsp90 diese Mutationen nicht mehr abschirmen, wobei es zu zahlreichen, aber auch verschiedenen entwicklungsbedingten Veränderungen kommen kann. Viele diese Veränderungen werden sich negativ auf den Organismus auswirken. Die Mutation, die jedoch unter den veränderten Umweltbedingungen einen positiven Effekt hat, wird aufgrund natürlicher Selektion bewahrt

und setzt sich durch (249–251). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob HtpG aus *B. subtilis* auch als Puffer genetischer Variabilität agieren kann. Im Vorhinein konnte bereits ausgeschlossen werden, dass HtpG einen Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika, welche die bakterielle Proteinsynthese inhibieren, hat (S. Braun, Master Thesis). Dies könnte besagen, dass HtpG keinen Einfluss auf die vermehrte oder verminderte Entstehung von Mutationen hat. Studien an *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* konnten dahingegen zeigen, dass ein normales Hsp90 Level die Entwicklung neuer Resistenzen gegenüber Antimykotika ermöglicht (256). Die hier getesteten Antimykotika inhibieren jedoch ein Protein, das daraufhin zu einer toxischen Intermediatbildung neigt. Hsp90 verhindert in diesem Fall das Sterben des Pilzes über die Faltung eines Client Proteins, das über ein drittes Protein diese toxische Intermediatbildung verhindert (256) und nicht über eine gesteigerte Mutationsrate.

#### **4.2.3.1 Untersuchungen des Einflusses von HtpG auf verschiedene Selektionsfaktoren unter den Bedingungen der experimentellen Evolution**

Mit Hilfe der experimentellen Evolution ist es möglich Evolution in Echtzeit zu beobachten. Dabei können jederzeit genetische Analysen durchgeführt werden. Außerdem ist es möglich zu jedem Zeitpunkt während des Evolutionsprozesses Proben zu nehmen und zu konservieren. Auch kann getestet werden, ob der Evolutionsprozess unter den gleichen Bedingungen denselben Weg nimmt. Diese Eigenschaften machen die experimentelle Evolution zu einem wichtigen Mittel, um Evolution von Lebewesen besser verstehen zu können. Hier wurde der mögliche Einfluss von HtpG auf Adaptationsprozesse, die durch einen exogenen und einen endogenen Selektionsdruck hervorgerufen werden, wurde in der „Genetic Maschine“, einer vollautomatisierten Maschine, die experimentelle Evolution ohne die negativen Effekte der Biofilmbildung und des „Flaschenhalseffekts“ ermöglicht, bestimmt. Der Selektionsdruck kann in dieser Maschine automatisch auf einen Level gehalten werden, das nur von der Variante noch toleriert werden kann, die am besten angepasst ist. Als exogener Selektionsdruck wurde eine erhöhte Salinität gewählt, wobei die *htpG* Deletions- und die *htpG* Trap-Mutante mit dem Wildtyp aus *B. subtilis* in der Fähigkeit sich an diesen anzupassen, verglichen wurde. Die Kultur wurde regelmäßig mit einem Medium verdünnt, das sich mit dem Wachstum der Zellen kompatibel zeigt (Permissives Medium). Sobald die Zelldichte der Kultur einen bestimmten Schwellenwert überschritt, wurde sie mit einem Puls von „nicht-permissiven Medium“ verdünnt. Dabei sollte dieses Medium eine

Salzkonzentration enthalten, die von der Kultur nicht toleriert werden kann. Durch dieses Medium wird somit ein Selektionsdruck auf die Kultur ausgeübt, so dass genetische Varianten, die eine höhere Osmolarität erdulden können, unter diesen Bedingungen einen selektiven Vorteil genießen und schnell die weniger Salz-toleranten Vorläuferzellen verdrängen, um später selbst durch ihre eigene, salztoleranteren Nachkommenschaft ersetzt zu werden. Im ersten Lauf wurde für das permissive Medium eine Salzkonzentration von 0,4 M NaCl gewählt, da hier die Zellen noch eine ausreichende Wachstumsrate in Minimalmedium aufwiesen (Abbildung 37) und für das nicht-permissive 2,5 M NaCl. Da sich eine Salzkonzentration von 2 M NaCl nicht kompatibel mit dem Wachstum von *B. subtilis*-Zellen zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass eine Salzkonzentration von 2,5 M NaCl auf jeden Fall nicht toleriert wird und somit genügend Druck ausüben kann (Abbildung 37). Jedoch konnte ein Adaption der *htpG* Mutante an erhöhte Salzkonzentrationen nicht beobachtet werden (Abbildung 38, 39). Es zeigte sich ein höherer Verbrauch an nicht-permissivem Medium im Vergleich zu dem permissiven Medium, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die Salzkonzentration noch zu gering angesetzt war, um die Kultur zur Adaption an höherer Salzkonzentrationen zu zwingen. Da jedoch der Salzgehalt des nicht-permissiven Mediums aufgrund der Gefahr der Kristallbildung nicht noch weiter erhöht werden konnte, wurde ein permissives Medium mit 1,5 M NaCl verwendet.

Trotzdem wiesen alle getesteten *B. subtilis* Stämme eine nur sehr schwache Anpassung an erhöhte Salzkonzentration von 1,8 M -1,9 M NaCl im zeitlichen Rahmen von 40 bis 70 Tagen in der Evolutionsmaschine auf, wobei diese Salzkonzentrationen im Durchschnitt nach einer Woche in der Maschine erreicht wurden (Abbildung 41). Eine Mutation von HtpG zeigte kein verändertes Anpassungsverhalten an die erhöhte Salzkonzentrationen (Abbildung 41, 42). Die verlangsamte Adaption, die während des Laufes des Wildtyps beobachtet werden konnte, beruhte sehr wahrscheinlich auf den bereits erwähnten, anfänglichen Defekt der Maschine. Hier war die Zufuhr an permissivem Medium aufgrund eines defekten Widerstandes stark erhöht, wodurch die Dichte der Kultur künstlich auf einem niedrigen Level gehalten wurde. Dies hatte zur Folge, dass weniger Pulse an nicht-permissivem Medium erfolgten, so dass die Adaption künstlich verlangsamt wurde. Wie bereits erwähnt konnte für Hsp90 gezeigt werden, dass es als genetischer Puffer die Speicherung und kontrollierte Freilassung genetischer Variation erlauben kann (125). Ob dies auch auf sein bakterielles Homolog zutrifft, kann nach diesen Untersuchungen weder bestätigt noch widerlegt werden. Die schnelle Adaption an eine Salzkonzentration von 1,8-1,9M ist vermutlich auf die normale osmotische Stressantwort, zu der die Neusynthese und Akkumulation der kompatibel gelösten

Substanz Prolin zählt, zurückzuführen (210, 211). Vermutlich reicht diese Strategie in *B. subtilis* noch aus, um diese erhöhten Salzkonzentrationen zu tolerieren. Die schnelle Anpassung spricht eher nicht dafür, dass sich die Stämme durch genetische Veränderungen an die erhöhten Salzkonzentrationen angepasst haben. Für eine genetische Adaptation müsste die Laufzeit und auch der evolutionäre Druck durch Erhöhung der Salzkonzentration in der „*Genetic Machine*“ vermutlich deutlich erhöht werden, wobei noch höhere Salzkonzentrationen in den Medium technische Probleme aufgrund erhöhter Kristallisationsgefahr bereiten könnten.

*B. subtilis* scheint in diesem Zusammenhang im Gegensatz zu *E. coli* sehr hohe Salzkonzentrationen ohne größeren Aufwand tolerieren zu können. Um den Einfluss von HtpG auf die Anpassung an erhöhte Salinität mittels der experimentellen Evolution in der „*Genetic Machine*“ zu untersuchen, wäre es daher sinnvoll auf *E. coli* als Organismus zurückzugreifen. Dieser Organismus konnte auch bereits erfolgreich in der „*Genetic Machine*“ an erhöhte Salzkonzentrationen angepasst werden (M. R. K. Khlaf, Dissertation).

Eine Deletion des Gens für die Formylase, eines Enzyms, das eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese in Bakterien spielt, führt zu einer erniedrigten Wachstumsrate (Abbildung 43) und stellt damit einen Stressfaktor dar. Hier wurde der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an diesen endogenen Selektionsdruck unter Verwendung der „*Genetic Machine*“ in *B. subtilis* untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Deletion von HtpG negativ auf den Adaptationsprozess der Mutation der Formylase auswirkte (Abbildung 44C). HtpG-Trap, eine Variante von HtpG, die ATP nicht mehr hydrolysieren kann, zeigte wider Erwarten im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in der Anpassung an die Formylase-Mutante (Abbildung 44C). Die Verwendung dieser Mutante basierte eigentlich auf der Hypothese, dass mögliche Substrate, die mit HtpG unter ATP-Bindung interagieren und eigentlich während der Hydrolyse erneut freigesetzt werden, wie es für den eukaryotischen ATPase-Zyklus von Hsp90 gezeigt werden konnte, nun gebunden oder gefangen bleiben und ihre Funktion ebenfalls nicht mehr ausüben können. Somit wäre es möglich, dass ein möglicher Effekt, der durch HtpG verursacht wird, mittels dieser Variante verstärkt wird. Aufgrund dieser Ergebnisse, die nur einen Effekt für die Deletion von HtpG, aber nicht für die HtpG Trap Mutante zeigen, stellt sich die Frage, ob die Funktion von HtpG nicht von seiner ATPase-Aktivität abhängt. Dies ist jedoch aufgrund der Homologie zu eukaryotischen Hsp90 (126) sehr unwahrscheinlich.

Schon der Vergleich unterschiedlicher Läufe von gleichen Mutanten macht deutlich, dass Adaptation in der „*Genetic Machine*“ unterschiedlich verlaufen kann (Abbildung 44A, B).

Diese wird beeinflusst durch unterschiedliche äußere Bedingungen, wie zum Beispiel Druckunterschiede zwischen den unterschiedlichen Läufen, kann aber auch durch die Population selbst anders gestaltet werden. Dabei ist es möglich, dass sich in einer Population, die Mutationen, die zum schnelleren Wachstum und somit zu einer besseren Adaptation führen, früher entwickeln, als in einer anderen Population, die den gleichen Bedingungen ausgesetzt gewesen ist. Dies zeigt, dass Evolution trotz ähnlichen Ausgangsbedingungen vermutlich nicht immer den gleichen Weg einnimmt. Hinzu kommt, dass die experimentelle Evolution der  $\Delta htpG$  Mutante leider nicht ein weiteres Mal wiederholt werden konnte, um diese Effekte auszuschließen. Um maschinenbedingte Einflüsse auszuschalten, wäre es sinnvoll die experimentelle Evolution von Mutante und Wildtyp parallel in einer Maschine durchzuführen. Der Adaptationsprozess könnte damit direkt verglichen werden, wobei der Vergleich nicht durch äußere Einflüsse gestört werden würde.

Auch im Rahmen dieses Experiments konnte somit ein Einfluss von HtpG auf die Anpassung an einen endogenen Stressfaktor nicht eindeutig bestimmt werden.

#### **4.2.3.2 Probleme der experimentellen Evolution**

Wie schon erwähnt erwies es sich als äußerst schwierig, die Evolution verschiedener Stämme mittels experimenteller Evolution trotz ähnlicher Ausgangsbedingungen zu vergleichen. Selbst wenn der maschinenbedingte Einfluss durch zum Beispiel die Durchführung zweier experimenteller Evolutionen in einer Maschine, ausgeschaltet wird, besteht die Möglichkeit, dass die Anpassung unter einem bestimmten Selektionsdruck immer unterschiedliche Wege einnehmen kann (Abbildung 44A, B). Damit wäre es beinahe unmöglich den Einfluss eines Faktors mittels experimenteller Evolution auf evolutionäre Prozesse zu bestimmen. Da Bakterien jedoch eine extrem hohe Teilungsrates und damit eine große Populationsdichte aufweisen, ist die genetische und damit auch die phänotypische Variabilität im Vergleich zu Eukaryoten deutlich erhöht und nicht gleichbleibend. Aus diesem Grund könnte es sich problematisch gestalten mögliche Einflüsse, wie zum Beispiel von HtpG, auf genetische oder phänotypische Veränderungen nachzuweisen, besonders wenn sie eher gering ausfallen.

Ein weiteres Problem der experimentellen Evolution ergab sich aus dem durch die Maschine angewendeten „*conditional pulse-feed Regime*“, welches den Selektionsdruck automatisch auf einem Level hält, das gerade noch von der best-adaptierten Variante toleriert werden kann. Hierdurch wird die Kultur nämlich dauerhaft in der logarithmischen Phase gehalten und passt

sich im Laufe der Zeit daran an. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass die Induktion von Stationärphasenprozessen, wie zum Beispiel die Kompetenzentwicklung sich für die Stämme, die längere Zeit in der „*Genetic Machine*“ adaptierten, zum Problem wurde (Abbildung 45). Damit besteht die Möglichkeit, dass auch weitere Prozesse, die in der Stationärphase stattfinden, in diesen Stämmen gestört sind. Dies könnte die weitere Charakterisierung dieser Stämme eindeutig erschweren oder muss zumindest berücksichtigt werden.

#### **4.2.3.3 Der Einfluss von HtpG auf bistabile Systeme**

Zusätzlich wurde die Rolle von HtpG auf bistabile Systeme untersucht (Abbildung 46). Nachdem eukaryotisches Hsp90 die Faltung bestimmter Proteine, einschließlich Transkriptionsfaktoren unterstützt und dadurch Genexpression und somit evolutionäre Prozesse beeinflussen kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass HtpG in *B. subtilis* möglicherweise direkt oder indirekt Einfluss auf Faktoren nimmt, deren Schwankungen es ermöglichen die Genexpression zu steuern und somit Auswirkungen auf bistabile Systeme hat. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob HtpG die Schwankungen der Expression des Masterregulatorgens, dessen Überschreiten eines Schwellenwertes das System der Motilität, der Sporulation und der Kompetenzentwicklung anschaltet, beeinflussen kann. Dies konnte jedoch für keines der drei bistabilen Systeme bestätigt werden. Jedoch ist möglicherweise das Zählen der GFP-positiven Zellen für diese Art der Untersuchung zu ungenau sein, was auch teilweise durch die hohen Standardabweichungen deutlich wurde. Daher wäre es sinnvoll, den Anteil der fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS, „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“) zu bestimmen, um somit den Einfluss von HtpG auf die Bistabilität deutlich exakter ermitteln zu können.

### **4.3 Fazit**

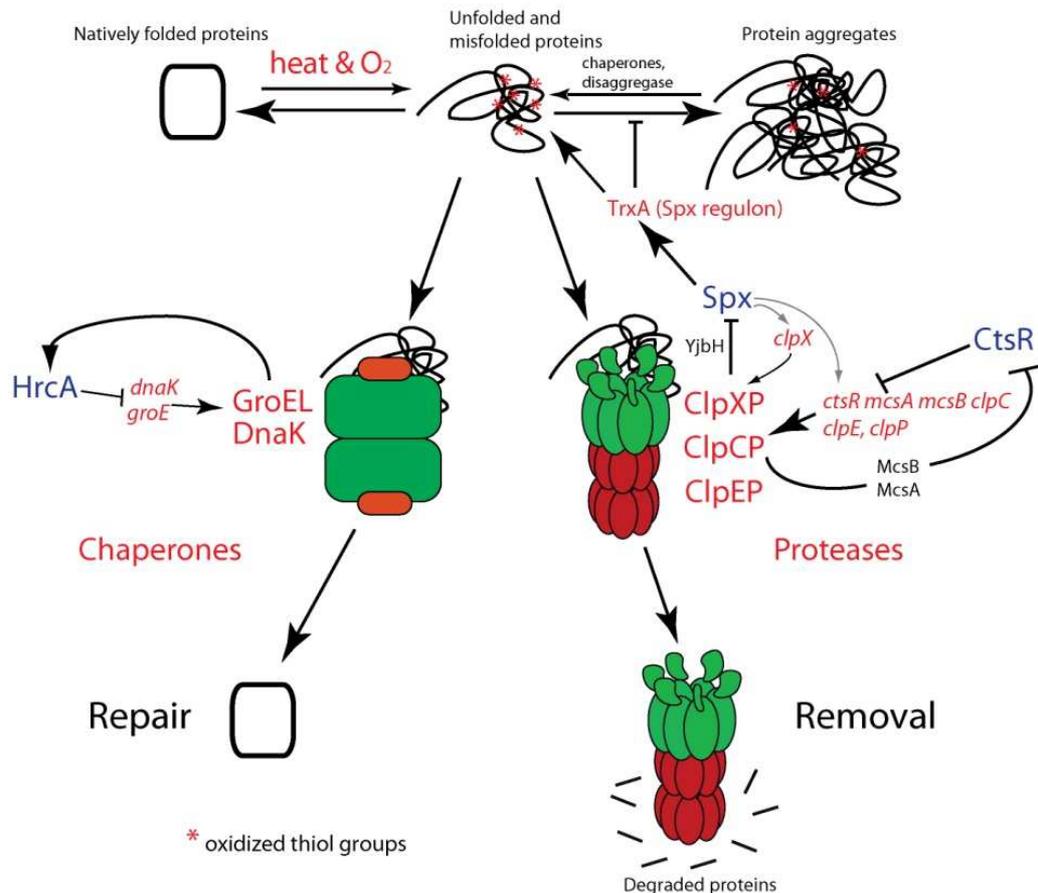
Die zelluläre Stressantwort ist für alle Lebewesen von essentieller Bedeutung. An vielen Beispielen kann aufgezeigt werden, wie eng einzelne Stressantworten miteinander verknüpft sind, wobei im ersten Teil dieser Arbeit unter Verwendung des Modellorganismus *B. subtilis* ein Zusammenhang zwischen der Hitzeschock- und der oxidativen Stressantwort hergestellt werden konnte (Abbildung 47). Hitzestress führt zur Entfaltung und Aggregation zellulärer

Proteine. Chaperone wie DnaK oder GroEl, die in *B. subtilis* durch den Repressor HrcA reguliert werden, helfen bei der Proteinfaltung, indem sie fehlgefaltete Proteine rückfalten oder einfach an der Aggregation hindern. In *B. subtilis* spielt das Chaperonsystem gegenüber dem Proteasesystem eine untergeordnete Rolle bei der Hitzeschockantwort, wobei hier gezeigt werden konnte, dass die Hitze-Induktion der oxidativen Stressantwort äußerst bedeutend für die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase unter Hitzeeinwirkung zu sein scheint. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Proteine, die aufgrund eines Hitzeschocks entfalten, oxidativ geschädigt werden. Hierbei konnte nicht eindeutig bestimmt werden, ob diese oxidative Schädigung auf einem durch Hitze ausgelösten, sekundären oxidativen Stress beruht, oder ob fehlgefaltete Proteine anfälliger gegenüber Oxidation sind. Oxidation kann zu Carbonylierungen oder an Schwefelresten zu der Bildung inkorrekturer Disulfidbrücken an Proteinen führen, die weiterhin nicht-native Proteinkonformationen stabilisieren oder kovalente Vernetzung zu anderen fehlgefalteten Proteinen begünstigen können. Somit liegt es nahe, dass diese oxidativen Modifizierungen die Behebung der Fehlfaltung oder Rückfaltung dieser Proteine erschweren und die Aggregatentstehung erleichtern. Die unter Hitzestress beobachtete Akkumulation von Spx, dem globalen Transkriptionsfaktor der oxidativen Stressantwort, dessen Regulation auf die Degradation durch das ClpXP Proteasesystem beruht, veranlasst die Expression redoxaktiver Enzyme, wie zum Beispiel TrxA. Dabei könnten diese redoxaktiven Enzyme die Konformation der durch Hitze fehlerhaft gefalteten Proteine stabilisieren, indem sie mit Disulfiden oder Thiolgruppen dieser, die möglicherweise im Rahmen des Hitzestress oxidiert wurden oder Gefahr laufen, oxidiert zu werden, interagieren und somit der Bildung von Proteinaggregaten entgegenwirken.

Diese Proteine könnten dann wiederum durch das Chaperonsystem rückgefaltet oder durch das Proteasesystem (ClpCP, ClpXP, ClpEP), wobei hier auch Hinweise auf eine Regulation durch Spx vorliegen (105), degradiert werden. Diese Beobachtungen sind möglicherweise auch auf eukaryotische Organismen anwendbar und sollten bei Proteinfehlfaltungserkrankungen bedacht werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Adaptation an einen dauerhaften Stress näher untersucht. Normalerweise zeigen sich lebende Systeme sehr robust gegenüber Mutationen, was bedeutet, dass die Mutationen normalerweise phänotypisch nicht in Erscheinung treten. Aufgrund von Stress kann diese Robustheit jedoch gestört werden, wobei genetische Variabilität phänotypisch sichtbar wird und nun der natürlichen Selektion unterworfen ist. Molekulare Chaperone spielen eine Rolle bei der Proteinfaltung und können damit zur

Stabilität von Proteinen beitragen. Daher wurde in Betracht gezogen, dass Chaperone zu der Robustheit beitragen können, indem sie dafür sorgen, dass Proteine trotz Fehlern auf der genetischen Ebene korrekt gefaltet werden. Somit ist die Entstehung einer größeren Anzahl an Genotypen möglich. Bei Stress sind Chaperone mit der großen Anzahl an entfaltenen Proteinen so überlastet, dass die Fehler auf genetischer Ebene nun Konsequenzen zeigen und zu einer größeren Anzahl an Phänotypen führen. Die Funktion des bakteriellen Chaperons HtpG konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden. Mit den hier dargelegten Resultaten ist eine präzise Aussage über die Bedeutung von HtpG für die bakterielle Zelle und, ob HtpG aus *B. subtilis* eine Rolle in evolutionären Prozessen spielt, nicht möglich. Da HtpG in der Zelle in so einem hohen Ausmaß produziert wird und sein Homolog von so enormer Wichtigkeit für den eukaryotischen Organismus ist, wird es weiterhin von großem Interesse sein die Bedeutung dieses Chaperons für die bakterielle Zelle aufzudecken.



**Abbildung 47: Modell: Rolle der Proteinoxidation, Spx, TrxA und dem Spx Regulon im Proteinqualitätskontrollsystem von *B. subtilis*.** Chaperone und Proteasen erscheinen rot und Regulatoren blau. Nativ gefaltete Proteine („Natively folded proteins“), die durch Hitze („heat“) und Sauerstoff („ $\text{O}_2$ “) geschädigt werden, entfalten („Unfolded and misfolded proteins“), wobei sie an ihren Thiolgruppen oxidiert („oxidized thiol groups“) werden und dazu tendieren Aggregate („Protein aggregates“) zu bilden. Chaperone („Chaperones“) wie zum Beispiel DnaK und GroEL sind daran beteiligt fehlgefaltete Protein durch Rückfaltung zu reparieren („Repair“), während Proteasen („Proteases“) wie zum Beispiel ClpXP, ClpCP und ClpEP fehlgefaltete Proteine degradieren („Removal“). Spx, der globale Transkriptionsfaktor der oxidativen Stressantwort, akkumuliert nach Hitzeeinwirkung und bewirkt die Hochregulation redoxaktiver Enzyme wie TrxA, welche die durch Hitze ausgelösten oxidativen Beschädigungen an Proteinen verhindern oder reparieren und somit der Bildung von Proteinaggregaten entgegen wirken könnten. (teilweise adaptiert von (62))

## 5. Referenzen

1. **Mogk A, Huber D, Bukau B.** 2011. Integrating protein homeostasis strategies in prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
2. **Kültz D.** 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* **67**:225–257.
3. **Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S.** 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**:1888–1893.
4. **Bukau B, Weissman J, Horwich A.** 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**:443–451.
5. **Molière N, Turgay K.** 2009. Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **160**:637–644.
6. **Waddington CH.** 1959. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* **183**:1654–1655.
7. **Mitchell-Olds T, Knight CA.** 2002. Chaperones as buffering Agents? *Science* **296**:2348–2349.
8. **Jarosz DF, Lindquist S.** 2010. Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science* **330**:1820–1824.
9. **Lindquist S.** 2010. Protein folding sculpting evolutionary change. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
10. **Hecker M, Schumann W, Völker U.** 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**:417–428.
11. **Hecker M, Völker U.** 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**:35-91
12. **Schumann W.** 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* **8**:207–217.
13. **Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR.** 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* **11**:815–823.
14. **Hartl FU.** 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**:571–579.
15. **Dougan DA, Mogk A, Bukau B.** 2002. Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cell Mol Life Sci* **59**:1607–1616.
16. **Mogk A, Deuerling E, Vorderwülbecke S, Vierling E, Bukau B.** 2003. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol* **50**:585–595.
17. **Bukau B.** 1999. Molecular chaperones and folding catalysts: regulation, cellular function, and mechanisms. Taylor & Francis Group.
18. **Horwich AL, Weissman JS.** 1997. Deadly conformations-protein misfolding in prion disease. *Cell* **89**:499–510.
19. **Davidson JF, Schiestl RH.** 2001. Cytotoxic and genotoxic consequences of heat stress are dependent on the presence of oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **183**:4580–4587.
20. **Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL, Sigler PB.** 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**:578–586.
21. **Xu Z, Horwich AL, Sigler PB.** 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature* **388**:741–750.

22. **Mayhew M, Silva ACR da, Martin J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hartl FU.** 1996. Protein folding in the central cavity of the GroEL–GroES chaperonin complex. *Nature* **379**:420 - 426
23. **Weissman JS, Rye HS, Fenton WA, Beechem JM, Horwich AL.** 1996. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* **84**:481–490.
24. **Hunt JF, Weaver AJ, Landry SJ, Gierasch L, Deisenhofer J.** 1996. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature* **379**:37–45.
25. **Weissman JS, Hohl CM, Kovalenko O, Kashi Y, Chen S, Braig K, Saibil HR, Fenton WA, Norwich AL.** 1995. Mechanism of GroEL action: Productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* **83**:577–587.
26. **Chen S, Roseman AM, Hunter AS, Wood SP, Burston SG, Ranson NA, Clarke AR, Saibil HR.** 1994. Location of a folding protein and shape changes in GroEL–GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* **371**:261–264.
27. **Horwich AL, Fenton WA.** 2009. Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q Rev Biophys* **42**:83–116.
28. **Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C.** 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**:1379–1385.
29. **Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, Boland F, Brignell SC, Bron S, Bunai K, Chapuis J, Christiansen LC, Danchin A, Débarbouillé M, Dervyn E, Deuerling E, Devine K, Devine SK, Dreesen O, Errington J, Fillinger S, Foster SJ, Fujita Y, Galizzi A, Gardan R, Eschevins C, Fukushima T, Haga K, Harwood CR, Hecker M, Hosoya D, Hullo MF, Kakeshita H, Karamata D, Kasahara Y, Kawamura F, Koga K, Koski P, Kuwana R, Imamura D, Ishimaru M, Ishikawa S, Ishio I, Coq DL, Masson A, Mauël C, Meima R, Mellado RP, Moir A, Moriya S, Nagakawa E, Nanamiya H, Nakai S, Nygaard P, Ogura M, Ohanan T, O'Reilly M, O'Rourke M, Pragai Z, Pooley HM, Rapoport G, Rawlins JP, Rivas LA, Rivolta C, Sadaie A, Sadaie Y, Sarvas M, Sato T, Saxild HH, Scanlan E, Schumann W, Seegers JFML, Sekiguchi J, Sekowska A, Séror SJ, Simon M, Stragier P, Studer R, Takamatsu H, Tanaka T, Takeuchi M, Thomaidis HB, Vagner V, Dijnl JM van, Watabe K, Wipat A, Yamamoto H, Yamamoto M, Yamamoto Y, Yamane K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa H, Zuber U, Ogasawara N.** 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci* **100**:4678–4683.
30. **Ryan MT, Pfanner N.** 2001. Hsp70 proteins in protein translocation. *Adv Protein Chem* **59**:223-242
31. **Neupert W, Brunner M.** 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:555–565.
32. **Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F.** 2003. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* **28**:541–547.
33. **Hartl FU, Hayer-Hartl M.** 2002. Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* **295**:1852–1858.
34. **Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA.** 2000. Getting Newly Synthesized Proteins into Shape. *Cell* **101**:119–122.
35. **Skowyra D, Georgopoulos C, Zylicz M.** 1990. The *E. coli dnaK* gene product, the Hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**:939–944.

36. **Rüdiger S, Schneider-Mergener J, Bukau B.** 2001. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J* **20**:1042–1050.
37. **Mayer MP, Bukau B.** 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**:670–684.
38. **Deuerling E, Schulze-Specking A, Tomoyasu T, Mogk A, Bukau B.** 1999. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**:693–696.
39. **Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU.** 1999. Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**:755–765.
40. **Vorderwülbecke S, Kramer G, Merz F, Kurz TA, Rauch T, Zachmann-Brand B, Bukau B, Deuerling E.** 2004. Low temperature or GroEL/ES overproduction permits growth of *Escherichia coli* cells lacking trigger factor and DnaK. *FEBS Lett* **559**:181–187.
41. **Genevaux P, Keppel F, Schwager F, Langendijk-Genevaux PS, Hartl FU, Georgopoulos C.** 2004. In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO Rep* **5**:195–200.
42. **Weibezahn J, Schlieker C, Tessarz P, Mogk A, Bukau B.** 2005. Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biol Chem* **386**:739–744.
43. **Zietkiewicz S, Krzewska J, Liberek K.** 2004. Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* **279**:44376–44383.
44. **Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FTF, Mogk A, Bukau B.** 2004. Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* **119**:653–665.
45. **Acebrón SP, Martín I, del Castillo U, Moro F, Muga A.** 2009. DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A bichaperone network at the aggregate surface. *FEBS Letters* **583**:2991–2996.
46. **Winkler J, Tyedmers J, Bukau B, Mogk A.** 2012. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation. *J Cell Biol* **198**:387–404.
47. **Schlieker C, Weibezahn J, Patzelt H, Tessarz P, Strub C, Zeth K, Erbse A, Schneider-Mergener J, Chin JW, Schultz PG, Bukau B, Mogk A.** 2004. Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol* **11**:607–615.
48. **Lum R, Tkach JM, Vierling E, Glover JR.** 2004. Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *J Biol Chem* **279**:29139–29146.
49. **Seyffer F, Kummer E, Oguchi Y, Winkler J, Kumar M, Zahn R, Sourjik V, Bukau B, Mogk A.** 2012. Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. *Nat Struct Mol Biol* **19**:1347–1355.
50. **Oguchi Y, Kummer E, Seyffer F, Berynskyy M, Anstett B, Zahn R, Wade RC, Mogk A, Bukau B.** 2012. A tightly regulated molecular toggle controls AAA+ disaggregase. *Nat Struct Mol Biol* **19**:1338–1346.
51. **Ratajczak E, Zietkiewicz S, Liberek K.** 2009. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *J Mol Biol* **386**:178–189.
52. **Schulz A, Tzschaschel B, Schumann W.** 1995. Isolation and analysis of mutants of the dnaK operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **15**:421–429.

53. **Paek K-H, Walker GC.** 1987. *Escherichia coli dnaK* null mutants are inviable at high temperature. *J Bacteriol* **169**:283–290.
54. **Gamer J, Multhaup G, Tomoyasu T, McCarty JS, Rudiger S, Schonfeld H-J, Schirra C, Bujard H, Bukau B.** 1996. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$ . *EMBO J* **15**:607–617.
55. **Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T, Bukau B.** 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **30**:567–581.
56. **Mogk A, Homuth G, Scholz C, Kim L, Schmid FX, Schumann W.** 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**:4579–4590.
57. **Reyes DY, Yoshikawa H.** 2002. DnaK chaperone machine and trigger factor are only partially required for normal growth of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:1583–1586.
58. **Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud M-L, Denizot F, Rapoport G.** 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* **27**:899–914.
59. **Msadek T, Kunst F, Rapoport G.** 1994. MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci* **91**:5788–5792.
60. **Gerth U, Krüger E, Derré I, Msadek T, Hecker M.** 1998. Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* **28**:787–802.
61. **Gerth U, Wipat A, Harwood CR, Carter N, Emmerson PT, Hecker M.** 1996. Sequence and transcriptional analysis of *clpX*, a class-III heat-shock gene of *Bacillus subtilis*. *Gene* **181**:77–83.
62. **Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S.** 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**:1888–1893.
63. **Kirstein J, Molière N, Dougan DA, Turgay K.** 2009. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Microbiol* **7**:589–599.
64. **Hershko A, Eytan E, Ciechanover A, Haas AL.** 1982. Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem* **257**:13964–13970.
65. **Nakano MM, Hajarizadeh F, Zhu Y, Zuber P.** 2001. Loss-of-function mutations in *yjbD* result in ClpX- and ClpP-independent competence development of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **42**:383–394.
66. **Krüger E, Hecker M.** 1998. The first gene of the *Bacillus subtilis clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol* **180**:6681–6688.
67. **Kress W, Maglica Ž, Weber-Ban E.** 2009. Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res Microbiol* **160**:618–628.
68. **Maurizi MR, Clark WP, Kim SH, Gottesman S.** 1990. Clp P represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem* **265**:12546–12552.
69. **Thompson MW, Singh SK, Maurizi MR.** 1994. Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J Biol Chem* **269**:18209–18215.

70. **Sauer RT, Baker TA.** 2011. AAA+ Proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem* **80**:587–612.
71. **Erbse A, Schmidt R, Bornemann T, Schneider-Mergener J, Mogk A, Zahn R, Dougan DA, Bukau B.** 2006. ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature* **439**:753–756.
72. **Flynn JM, Neher SB, Kim Y-I, Sauer RT, Baker TA.** 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**:671–683.
73. **Kirstein J, Schlothauer T, Dougan DA, Lilie H, Tischendorf G, Mogk A, Bukau B, Turgay K.** 2006. Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J* **25**:1481–1491.
74. **Baker TA, Sauer RT.** 2006. ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends Biochem Sci* **31**:647–653.
75. **Singh SK, Rozycki J, Ortega J, Ishikawa T, Lo J, Steven AC, Maurizi MR.** 2001. Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis. *J Biol Chem* **276**:29420–29429.
76. **Kim Y-I, Levchenko I, Fraczkowska K, Woodruff RV, Sauer RT, Baker TA.** 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**:230–233.
77. **Krüger E, Witt E, Ohlmeier S, Hanschke R, Hecker M.** 2000. The clp proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J Bacteriol* **182**:3259–3265.
78. **Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ESC, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA.** 2004. Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell* **119**:9–18.
79. **Jürgen B, Hanschke R, Sarvas M, Hecker M, Schweder T.** 2001. Proteome and transcriptome based analysis of *Bacillus subtilis* cells overproducing an insoluble heterologous protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:326–332.
80. **Simmons LA, Grossman AD, Walker GC.** 2008. Clp and Lon Proteases Occupy Distinct Subcellular Positions in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**:6758–6768.
81. **Kirstein J, Strahl H, Molière N, Hamoen LW, Turgay K.** 2008. Localization of general and regulatory proteolysis in *Bacillus subtilis* cells. *Mol Microbiol* **70**:682–694.
82. **Kain J, He GG, Losick R.** 2008. Polar localization and compartmentalization of ClpP proteases during growth and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**:6749–6757.
83. **Schlothauer T, Mogk A, Dougan DA, Bukau B, Turgay K.** 2003. MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci* **100**:2306–2311.
84. **Krüger E, Msadek T, Hecker M.** 1996. Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* clpC operon. *Mol Microbiol* **20**:713–723.
85. **Chen I, Christie PJ, Dubnau D.** 2005. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* **310**:1456–1460.
86. **Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP.** 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149**:9–17.
87. **Hamoen LW, Eshuis H, Jongbloed J, Venema G, van Sinderen D.** 1995. A small gene, designated *comS*, located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **15**:55–63.

88. **D'Souza C, Nakano MM, Zuber P.** 1994. Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* **91**:9397–9401.
89. **Prepiak P, Dubnau D.** 2007. A peptide signal for adapter protein-mediated degradation by the AAA+ protease ClpCP. *Mol Cell* **26**:639–647.
90. **Turgay K, Hamoen LW, Venema G, Dubnau D.** 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **11**:119–128.
91. **Turgay K, Hahn J, Burghoorn J, Dubnau D.** 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* **17**:6730–6738.
92. **Hahn J, Kramer N, Briley K, Dubnau D.** 2009. McsA and B mediate the delocalization of competence proteins from the cell poles of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **72**:202–215.
93. **Kock H, Gerth U, Hecker M.** 2004. MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **51**:1087–1102.
94. **Pan Q, Garsin DA, Losick R.** 2001. Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* **8**:873–883.
95. **Rashid MH, Tamakoshi A, Sekiguchi J.** 1996. Effects of *mecA* and *mecB* (*clpC*) mutations on expression of *sigD*, which encodes an alternative sigma factor, and autolysin operons and on flagellin synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:4861–4869.
96. **Banecki B, Wawrzynow A, Puzewicz J, Georgopoulos C, Zylicz M.** 2001. Structure-function analysis of the zinc-binding region of the ClpX molecular chaperone. *J Biol Chem* **276**:18843–18848.
97. **Wiegert T, Schumann W.** 2001. SsrA-Mediated Tagging in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:3885–3889.
98. **Keiler KC, Waller PR, Sauer RT.** 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**:990–993.
99. **Nakano MM, Zhu Y, Liu J, Reyes DY, Yoshikawa H, Zuber P.** 2000. Mutations conferring amino acid residue substitutions in the carboxy-terminal domain of RNA polymerase  $\alpha$  can suppress *clpX* and *clpP* with respect to developmentally regulated transcription in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **37**:869–884.
100. **Nakano S, Zheng G, Nakano MM, Zuber P.** 2002. Multiple pathways of Spx (YjbD) proteolysis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:3664–3670.
101. **Garg SK, Kommineni S, Henslee L, Zhang Y, Zuber P.** 2009. The YjbH protein of *Bacillus subtilis* enhances ClpXP-Catalyzed Proteolysis of Spx. *J Bacteriol* **191**:1268–1277.
102. **Zuber P.** 2004. Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *J Bacteriol* **186**:1911–1918.
103. **Nakano S, Nakano MM, Zhang Y, Leelakriangsak M, Zuber P.** 2003. A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **100**:4233–4238.
104. **Nakano S, Küster-Schöck E, Grossman AD, Zuber P.** 2003. Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* **100**:13603–13608.

105. **Rochat T, Nicolas P, Delumeau O, Rabatinová A, Korelusová J, Leduc A, Bessières P, Dervyn E, Krásný L, Noirot P.** 2012. Genome-wide identification of genes directly regulated by the pleiotropic transcription factor Spx in *Bacillus subtilis*. *Nucl Acids Res*
106. **Miethke M, Hecker M, Gerth U.** 2006. Involvement of *Bacillus subtilis* ClpE in CtsR degradation and protein quality control. *J Bacteriol* **188**:4610–4619.
107. **Derré I, Rapoport G, Devine K, Rose M, Msadek T.** 1999. ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**:581–593.
108. **Gerth U, Kirstein J, Mostertz J, Waldminghaus T, Miethke M, Kock H, Hecker M.** 2004. Fine-tuning in regulation of Clp protein content in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**:179–191.
109. **Yoo SJ, Seol JH, Shin DH, Rohrwild M, Kang M-S, Tanaka K, Goldberg AL, Chung CH.** 1996. Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**:14035–14040.
110. **Rohrwild M, Coux O, Huang HC, Moerschell RP, Yoo SJ, Seol JH, Chung CH, Goldberg AL.** 1996. HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci* **93**:5808–5813.
111. **Missiakas D, Schwager F, Betton JM, Georgopoulos C, Raina S.** 1996. Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J* **15**:6899–6909.
112. **Kang MS, Lim BK, Seong IS, Seol JH, Tanahashi N, Tanaka K, Chung CH.** 2001. The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is an N-terminal serine protease. *EMBO J* **20**:734–742.
113. **Gottesman S, Maurizi MR.** 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**:592–621.
114. **Tomoyasu T, Gamer J, Bukau B, Kanemori M, Mori H, Rutman AJ, Oppenheim AB, Yura T, Yamanaka K, Niki H.** 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J* **14**:2551–2560.
115. **Liu J, Cosby WM, Zuber P.** 1999. Role of Lon and ClpX in the post-translational regulation of a sigma subunit of RNA polymerase required for cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **33**:415–428.
116. **Schmidt R, Decatur AL, Rather PN, Moran CP, Losick R.** 1994. *Bacillus subtilis* Lon protease prevents inappropriate transcription of genes under the control of the sporulation transcription factor sigma G. *J Bacteriol* **176**:6528–6537.
117. **Riethdorf S, Völker U, Gerth U, Winkler A, Engelmann S, Hecker M.** 1994. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* lon gene. *J Bacteriol* **176**:6518–6527.
118. **Cutting S, Driks A, Schmidt R, Kunkel B, Losick R.** 1991. Forespore-specific transcription of a gene in the signal transduction pathway that governs Pro-sigma K processing in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **5**:456–466.
119. **Deuerling E, Paeslack B, Schumann W.** 1995. The ftsH gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. *J Bacteriol* **177**:4105–4112.
120. **Deuerling E, Mogk A, Richter C, Purucker M, Schumann W.** 1997. The ftsH gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol Microbiol* **23**:921–933.

121. **Thomas JG, Baneyx F.** 2000. ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol* **36**:1360–1370.
122. **Versteeg S, Escher A, Wende A, Wiegert T, Schumann W.** 2003. Regulation of the *Bacillus subtilis* heat shock gene *htpG* is under positive control. *J Bacteriol* **185**:466–474.
123. **Schulz A, Schwab S, Homuth G, Versteeg S, Schumann W.** 1997. The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *J Bacteriol* **179**:3103–3109.
124. **Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S.** 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:515–528.
125. **Whitesell L, Lindquist SL.** 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* **5**:761–772.
126. **Harris SF, Shiau AK, Agard DA.** 2004. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure* **12**:1087–1097.
127. **Genest O, Reidy M, Street TO, Hoskins JR, Camberg JL, Agard DA, Masison DC, Wickner S.** 2013. Uncovering a region of heat shock protein 90 important for client binding in *E. coli* and chaperone function in yeast. *Mol Cell*.
128. **Hessling M, Richter K, Buchner J.** 2009. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Biol* **16**:287–293.
129. **Shiau AK, Harris SF, Southworth DR, Agard DA.** 2006. Structural analysis of *E. coli* Hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* **127**:329–340.
130. **Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH.** 1998. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J* **17**:4829–4836.
131. **Obermann WMJ, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU.** 1998. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* **143**:901–910.
132. **Buchner J.** 2010. Bacterial Hsp90-desperately seeking clients. *Mol Microbiol* **76**:540–544.
133. **Wandinger SK, Richter K, Buchner J.** 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* **283**:18473–18477.
134. **Lindquist S.** 2009. Protein folding sculpting evolutionary change. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **74**:103–108.
135. **Versteeg S, Mogk A, Schumann W.** 1999. The *Bacillus subtilis htpG* gene is not involved in thermal stress management. *Mol Gen Genet* **261**:582–588.
136. **Shirai Y, Akiyama Y, Ito K.** 1996. Suppression of *ftsH* mutant phenotypes by overproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol* **178**:1141–1145.
137. **Bardwell JC, Craig EA.** 1988. Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* **170**:2977–2983.
138. **Genest O, Hoskins JR, Camberg JL, Doyle SM, Wickner S.** 2011. Heat shock protein 90 from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling. *Proc Natl Acad Sci* **108**:8206–8211.
139. **Jakob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J.** 1995. Transient Interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem* **270**:7288–7294.
140. **Tanaka N, Nakamoto H.** 1999. HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Letters* **458**:117–123.

141. **Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M, Motojima F.** 2010. Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Bioch Biophys Res Commun* **400**:241–245.
142. **Yosef I, Goren MG, Kiro R, Edgar R, Qimron U.** 2011. High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proc Natl Acad Sci* **108**:20136–20141.
143. **Marraffini LA, Sontheimer EJ.** 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**:1843–1845.
144. **Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P.** 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**:1709–1712.
145. **Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Oost J van der.** 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**:960–964.
146. **Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP.** 2009. RNA-Guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* **139**:945–956.
147. **Saito M, Watanabe S, Yoshikawa H, Nakamoto H.** 2008. Interaction of the molecular chaperone HtpG with uroporphyrinogen decarboxylase in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**:1394–1397.
148. **Watanabe S, Kobayashi T, Saito M, Sato M, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Taketani S, Nakamoto H, Yoshikawa H.** 2007. Studies on the role of HtpG in the tetrapyrrole biosynthesis pathway of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biochem Biophys Res Commun* **352**:36–41.
149. **Sato T, Minagawa S, Kojima E, Okamoto N, Nakamoto H.** 2010. HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol Microbiol* **76**:576–589.
150. **Homuth G, Masuda S, Mogk A, Kobayashi Y, Schumann W.** 1997. The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J Bacteriol* **179**:1153–1164.
151. **Schmidt A, Schiesswohl M, Völker U, Hecker M, Schumann W.** 1992. Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**:3993–3999.
152. **Zuber U, Schumann W.** 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**:1359–1363.
153. **Yuan G, Wong SL.** 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J Bacteriol* **177**:6462–6468.
154. **Schulz A, Schumann W.** 1996. *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis* *dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J Bacteriol* **178**:1088–1093.
155. **Wiegert T, Schumann W.** 2003. Analysis of a DNA-binding motif of the *Bacillus subtilis* HrcA repressor protein. *FEMS Microbiol Lett* **223**:101–106.
156. **Mogk A, Homuth G, Scholz C, Kim L, Schmid FX, Schumann W.** 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**:4579–4590.
157. **Hecker M, Pané-Farré J, Völker U.** 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**:215–236.

158. **Hecker M, Reder A, Fuchs S, Pagels M, Engelmann S.** 2009. Physiological proteomics and stress/starvation responses in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol* **160**:245–258.
159. **Kirstein J, Zühlke D, Gerth U, Turgay K, Hecker M.** 2005. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J* **24**:3435–3445.
160. **Kirstein J, Dougan DA, Gerth U, Hecker M, Turgay K.** 2007. The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *EMBO J* **26**:2061–2070.
161. **Elsholz AKW, Turgay K, Michalik S, Hessling B, Gronau K, Oertel D, Mäder U, Bernhardt J, Becher D, Hecker M, Gerth U.** 2012. Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* **109**:7451–7456.
162. **Elsholz AKW, Hempel K, Michalik S, Gronau K, Becher D, Hecker M, Gerth U.** 2011. Activity Control of the ClpC Adaptor McsB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**:3887–3893.
163. **Elsholz AKW, Michalik S, Zühlke D, Hecker M, Gerth U.** 2010. CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *EMBO J* **29**:3621–3629.
164. **Krüger E, Zühlke D, Witt E, Ludwig H, Hecker M.** 2001. Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J* **20**:852–863.
165. **Hyyryläinen H-L, Bolhuis A, Darmon E, Muukkonen L, Koski P, Vitikainen M, Sarvas M, Prágai Z, Bron S, Van Dijnl JM, Kontinen VP.** 2001. A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol Microbiol* **41**:1159–1172.
166. **Darmon E, Noone D, Masson A, Bron S, Kuipers OP, Devine KM, Dijnl JM van.** 2002. A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsxRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:5661–5671.
167. **Queitsch C, Hong S-W, Vierling E, Lindquist S.** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**:479–492.
168. **Sanchez Y, Lindquist S.** 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**:1112–1115.
169. **Höper D, Völker U, Hecker M.** 2005. Comprehensive characterization of the contribution of individual *sigB*-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**:2810–2826.
170. **Davies KJ.** 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**:9895–9901.
171. **Halliwell B, Gutteridge JM.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**:1–14.
172. **Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER.** 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci* **93**:15036–15040.
173. **Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER.** 1989. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem* **264**:3341–3346.
174. **Farber JM, Levine RL.** 1986. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem* **261**:4574–4578.
175. **Berlett BS, Stadtman ER.** 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**:20313–20316.

176. **Nyström T.** 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* **24**:1311–1317.
177. **Mols M, Van Kranenburg R, Van Melis CCJ, Moezelaar R, Abee T.** 2010. Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation. *Environ Microbiol* **12**:873–885.
178. **Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ.** 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8**:423–435.
179. **Ballesteros M, Fredriksson Å, Henriksson J, Nyström T.** 2001. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J* **20**:5280–5289.
180. **Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nyström T.** 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci* **97**:5746–5749.
181. **Reder A, Höper D, Weinberg C, Gerth U, Fraunholz M, Hecker M.** 2008. The Spx paralogue MgsR (YqgZ) controls a subregulon within the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **69**:1104–1120.
182. **Helmann JD, Wu MFW, Gaballa A, Kobel PA, Morshedi MM, Fawcett P, Paddon C.** 2003. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol* **185**:243–253.
183. **Antelmann H, Helmman JD.** 2011. Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal* **14**:1049–1063.
184. **Nakano S, Erwin KN, Ralle M, Zuber P.** 2005. Redox-sensitive transcriptional control by a thiol/disulphide switch in the global regulator, Spx. *Mol Microbiol* **55**:498–510.
185. **Zuber P.** 2009. Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu Rev Microbiol* **63**:575–597.
186. **Helmann JD, Wu MFW, Kobel PA, Gamo F-J, Wilson M, Morshedi MM, Navre M, Paddon C.** 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* **183**:7318–7328.
187. **Antelmann H, Scharf C, Hecker M.** 2000. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol* **182**:4478–4490.
188. **Tam LT, Antelmann H, Eymann C, Albrecht D, Bernhardt J, Hecker M.** 2006. Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. *Proteomics* **6**:4565–4585.
189. **Leelakriangsak M, Kobayashi K, Zuber P.** 2007. Dual negative control of *spx* transcription initiation from the P3 promoter by repressors PerR and YodB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**:1736–1744.
190. **Zhang Y, Zuber P.** 2007. Requirement of the zinc-binding domain of ClpX for Spx proteolysis in *Bacillus subtilis* and Effects of Disulfide Stress on ClpXP Activity. *J Bacteriol* **189**:7669–7680.
191. **Larsson JT, Rogstam A, Von Wachenfeldt C.** 2007. YjbH is a novel negative effector of the disulphide stress regulator, Spx, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **66**:669–684.
192. **Kommineni S, Garg SK, Chan CM, Zuber P.** 2011. YjbH-Enhanced Proteolysis of Spx by ClpXP in *Bacillus subtilis* Is Inhibited by the Small Protein YirB (YuzO). *J Bacteriol* **193**:2133–2140.
193. **Newberry KJ, Nakano S, Zuber P, Brennan RG.** 2005. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* anti-alpha, global transcriptional regulator, Spx, in complex with the  $\alpha$  C-terminal domain of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* **102**:15839–15844.

194. **Nakano MM, Lin A, Zuber CS, Newberry KJ, Brennan RG, Zuber P.** 2010. Promoter recognition by a complex of Spx and the C-terminal domain of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit. *PLoS One* **5**:e8664.
195. **Reyes DY, Zuber P.** 2008. Activation of transcription initiation by Spx: formation of transcription complex and identification of a Cis-acting element required for transcriptional activation. *Mol Microbiol* **69**:765–779.
196. **Holmgren A.** 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**:13963–13966.
197. **Pigiet VP, Schuster BJ.** 1986. Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci* **83**:7643–7647.
198. **Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagata-Kuno K, Minakami S.** 1992. Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem* **209**:917–922.
199. **Scharf C, Riethdorf S, Ernst H, Engelmann S, Völker U, Hecker M.** 1998. Thioredoxin Is an Essential Protein Induced by Multiple Stresses in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**:1869–1877.
200. **Smits WK, Dubois J-YF, Bron S, Dijnl JM van, Kuipers OP.** 2005. Tricky Business: Transcriptome Analysis Reveals the Involvement of Thioredoxin A in Redox Homeostasis, Oxidative Stress, Sulfur Metabolism, and Cellular Differentiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**:3921–3930.
201. **Mostertz J, Hochgräfe F, Jürgen B, Schweder T, Hecker M.** 2008. The role of thioredoxin TrxA in *Bacillus subtilis*: A proteomics and transcriptomics approach. *Proteomics* **8**:2676–2690.
202. **Kempf B, Bremer E.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**:319–330.
203. **Oren A.** 1999. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:334–348.
204. **Ventosa A, Nieto JJ, Oren A.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:504–544.
205. **Dennis PP, Shimmin LC.** 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:90–104.
206. **Madigan MT, Orent A.** 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* **2**:265–269.
207. **Brown AD.** 1976. Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**:803–846.
208. **Yancey PH.** 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**:2819–2830.
209. **Wong LS, Johnson MS, Sandberg LB, Taylor BL.** 1995. Amino acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**:4342–4349.
210. **Whatmore AM, Reed RH.** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136**:2521–2526.
211. **Whatmore AM, Chudek JA, Reed RH.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**:2527–2535.
212. **Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N, Bremer E.** 2003. KtrAB and KtrCD: Two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* **185**:1289–1298.
213. **Belitsky BR, Brill J, Bremer E, Sonenshein AL.** 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:4389–4392.

214. **Boch J, Kempf B, Bremer E.** 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**:5364–5371.
215. **Kappes RM, Kempf B, Kneip S, Boch J, Gade J, Meier-Wagner J, Bremer E.** 1999. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**:203–216.
216. **Boch J, Kempf B, Schmid R, Bremer E.** 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the gbsAB genes. *J Bacteriol* **178**:5121–5129.
217. **Kappes RM, Kempf B, Bremer E.** 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**:5071–5079.
218. **Hahne H, Mäder U, Otto A, Bonn F, Steil L, Bremer E, Hecker M, Becher D.** 2010. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *J Bacteriol* **192**:870–882.
219. **Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Völker U, Hecker M.** 2001. Global Analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:5617–5631.
220. **Horsburgh MJ, Moir A.** 1999.  $\sigma$ M, an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol Microbiol* **32**:41–50.
221. **Steil L, Hoffmann T, Budde I, Völker U, Bremer E.** 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol* **185**:6358–6370.
222. **Elena SF, Lenski RE.** 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet* **4**:457–469.
223. **Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP.** 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiol* **149**:9–17.
224. **Novick A, Szilard L.** 1950. Description of the chemostat. *Science* **112**:715–716.
225. **Monod J.** 1950. La technique de culture continue. Théorie et applications. *Ann Inst Pasteur* **79**:390–410.
226. **Mutzel R, Marlière P.** 2010. Experimentelle Evolution *in vivo* in kontinuierlicher Suspensionskultur. *BIOspektrum* **16**:660–662.
227. **Kubitschek HE.** 1970. Introduction to research with continuous cultures. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
228. **Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**:20–26.
229. **Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R.** 2011. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* **80**:1155–1168.
230. **Lopez D, Vlamakis H, Kolter R.** 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **33**:152–163.
231. **Barrick JE, Yu DS, Yoon SH, Jeong H, Oh TK, Schneider D, Lenski RE, Kim JF.** 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**:1243–1247.
232. **Marlière P, Patrouix J, Döring V, Herdewijn P, Tricot S, Cruveiller S, Bouzon M, Mutzel R.** 2011. Chemical evolution of a bacterium's genome. *Angew Chem* **123**:7247–7252.
233. **Knippers R.** 2006. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag.

234. **Guillon JM, Mechulam Y, Schmitter JM, Blanquet S, Fayat G.** 1992. Disruption of the gene for Met-tRNA(fMet) formyltransferase severely impairs growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:4294–4301.
235. **Klebe G.** 2009. Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. Springer DE.
236. **Mazel D, Pochet S, Marlière P.** 1994. Genetic characterization of polypeptide deformylase, a distinctive enzyme of eubacterial translation. *EMBO J* **13**:914–923.
237. **Sandikci A, Gloge F, Martinez M, Mayer MP, Wade R, Bukau B, Kramer G.** 2013. Dynamic enzyme docking to the ribosome coordinates N-terminal processing with polypeptide folding. *Nat Struct Mol Biol* **20**:843–850.
238. **Veening J-W, Smits WK, Kuipers OP.** 2008. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **62**:193–210.
239. **Dubnau D, Losick R.** 2006. Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* **61**:564–572.
240. **Smits WK, Kuipers OP, Veening J-W.** 2006. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Microbiol* **4**:259–271.
241. **Hamoen LW, Werkhoven AFV, Bijlsma JJE, Dubnau D, Venema G.** 1998. The competence transcription factor of *Bacillus subtilis* recognizes short A/T-rich sequences arranged in a unique, flexible pattern along the DNA helix. *Genes Dev* **12**:1539–1550.
242. **Maamar H, Raj A, Dubnau D.** 2007. Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*. *Science* **317**:526–529.
243. **Mirel DB, Chamberlin MJ.** 1989. The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase. *J Bacteriol* **171**:3095–3101.
244. **Margot P, Pagni M, Karamata D.** 1999. *Bacillus subtilis* 168 gene *lytF* encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, sigmaD. *Microbiol* **145**:57–65.
245. **Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S.** 1989. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* **9**:3919–3930.
246. **Chen B, Zhong D, Monteiro A.** 2006. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* **7**:156.
247. **Zuehlke A, Johnson JL.** 2010. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* **93**:211–217.
248. **Pearl LH, Prodromou C.** 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* **75**:271–294.
249. **Rutherford SL, Lindquist S.** 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**:336–342.
250. **Sangster TA, Salathia N, Undurraga S, Milo R, Schellenberg K, Lindquist S, Queitsch C.** 2008. HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *Proc Natl Acad Sci* **105**:2963–2968.
251. **Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S.** 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* **417**:618–624.
252. **Sollars V, Lu X, Xiao L, Wang X, Garfinkel MD, Ruden DM.** 2002. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nat Genet* **33**:70–74.
253. **Tariq M, Nussbaumer U, Chen Y, Beisel C, Paro R.** 2009. Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc Natl Acad Sci* **106**:1157–1162.

254. **Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J.** 2003. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **48**:959–976.
255. **Anderson JB, Sirjusingh C, Parsons AB, Boone C, Wickens C, Cowen LE, Kohn LM.** 2003. Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**:1287–1298.
256. **Cowen LE, Lindquist S.** 2005. Hsp90 Potentiates the Rapid Evolution of New Traits: Drug Resistance in Diverse Fungi. *Science* **309**:2185–2189.
257. **Whitesell L, Mimnaugh EG, Costa BD, Myers CE, Neckers LM.** 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci* **91**:8324–8328.
258. **Xu Y, Singer MA, Lindquist S.** 1999. Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci* **96**:109–114.
259. **Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, Palumbo G, Pimpinelli S, Bozzetti MP.** 2010. Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature* **463**:662–665.
260. **Fiedler U, Weiss V.** 1995. A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J* **14**:3696–3705.
261. **Anagnostopoulos C, Spizizen J.** 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**:741–746.
262. **Kearns DB, Losick R.** 2005. Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **19**:3083–3094.
263. **Veening J-W, Kuipers OP, Brul S, Hellingwerf KJ, Kort R.** 2006. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:3099–3109.
264. **Veening J-W, Smits W k., Hamoen L w., Kuipers O p.** 2006. Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. *J Appl Microbiol* **101**:531–541.
265. **Smith I, Pares P, Cabane K, Dubnau E.** 1980. Genetics and physiology of the rel system of *Bacillus subtilis*. *Molec. Gen. Genet.* **178**:271–279.
266. **Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-Content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**:6887–6891.
267. **Lewis PJ, Marston AL.** 1999. GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **227**:101–109.
268. **Steinmetz M, Richter R.** 1994. Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene* **142**:79–83.
269. **Guérout-Fleury A-M, Shazand K, Frandsen N, Stragier P.** 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**:335–336.
270. **Chen L, James LP, Helmann JD.** 1993. Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *J Bacteriol* **175**:5428–5437.
271. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
272. **Maisonneuve E, Ezraty B, Dukan S.** 2008. Protein aggregates: an aging factor involved in cell death. *J Bacteriol* **190**:6070–6075.

273. **Maisonneuve E, Frayse L, Moinier D, Dukan S.** 2008. Existence of abnormal protein aggregates in healthy *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **190**:887–893.
274. **Yoshida A.** 1965. Enzymic Properties of Malate Dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **240**:1118–1124.
275. **Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM.** 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:6938–6947.
276. **Laskowska E, Wawrzynów A, Taylor A.** 1996. IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie* **78**:117–122.
277. **Lindner AB, Madden R, Demarez A, Stewart EJ, Taddei F.** 2008. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci* **105**:3076–3081.
278. **Landgraf D, Okumus B, Chien P, Baker TA, Paulsson J.** 2012. Segregation of molecules at cell division reveals native protein localization. *Nat Methods* **9**:480–482.
279. **Kitagawa M, Matsumura Y, Tsuchido T.** 2000. Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**:165–171.
280. **Levine RL.** 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* **32**:790–796.
281. **Mostertz J, Hecker M.** 2003. Patterns of protein carbonylation following oxidative stress in wild-type and sigB *Bacillus subtilis* cells. *Mol Gen Genomics* **269**:640–648.
282. **Nakano MM, Zuber P.** 1998. Anaerobic growth of a “strict aerobic” *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol* **52**:165–190.
283. **Koyasu S, Nishida E, Kadowaki T, Matsuzaki F, Iida K, Harada F, Kasuga M, Sakai H, Yahara I.** 1986. Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci* **83**:8054–8058.
284. **Spence J, Georgopoulos C.** 1989. Purification and properties of the *Escherichia coli* heat shock protein, HtpG. *J Biol Chem* **264**:4398–4403.
285. **Ali JA, Jackson AP, Howells AJ, Maxwell A.** 1993. The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry* **32**:2717–2724.
286. **Prodromou C, Roe SM, O’Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH.** 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**:65–75.
287. **Richter K, Muschler P, Hainzl O, Reinstein J, Buchner J.** 2003. Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the ATPase Cycle. *J Biol Chem* **278**:10328–10333.
288. **Albano M, Hahn J, Dubnau D.** 1987. Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**:3110–3117.
289. **Dubnau D.** 1999. Dna Uptake in Bacteria. *Ann Rev Microbiol* **53**:217–244.
290. **Völker U, Mach H, Schmid R, Hecker M.** 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **138**:2125–2135.
291. **Goloubinoff P, Mogk A, Zvi APB, Tomoyasu T, Bukau B.** 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc Natl Acad Sci* **96**:13732–13737.
292. **Matuszewska M, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E, Liberek K.** 2005. The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *J Biol Chem* **280**:12292–12298.

293. **Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJA.** 2004. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and “aggresomes” during oxidative stress, aging, and disease. *International J Biochem Cell Biol* **36**:2519–2530.
294. **Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E.** 2000. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol. Biol.* **99**:15–24.
295. **Wang P, Powell SR.** 2010. Decreased sensitivity associated with an altered formulation of a commercially available kit for detection of protein carbonyls. *Free Radic Biol Med* **49**:119–121.
296. **Maisonneuve E, Fraysse L, Lignon S, Capron L, Dukan S.** 2008. Carbonylated proteins are detectable only in a degradation-resistant aggregate state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:6609–6614.
297. **Berndt C, Lillig CH, Holmgren A.** 2008. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta* **1783**:641–650.
298. **Kthiri F, Gautier V, Le H-T, Prere M-F, Fayet O, Malki A, Landoulsi A, Richarme G.** 2010. Translational defects in a mutant deficient in YajL, the bacterial homolog of the parkinsonism-associated protein DJ-1. *J Bacteriol* **192**:6302–6306.
299. **Le H-T, Gautier V, Kthiri F, Malki A, Messaoudi N, Mihoub M, Landoulsi A, An YJ, Cha S-S, Richarme G.** 2012. YajL, prokaryotic homolog of parkinsonism-associated protein DJ-1, functions as a covalent chaperone for thiol proteome. *J Biol Chem* **287**:5861–5870.
300. **Winter J, Ilbert M, Graf PCF, Özcelik D, Jakob U.** 2008. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* **135**:691–701.
301. **Ling J, Cho C, Guo L-T, Aerni HR, Rinehart J, Söll D.** 2012. Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. *Mol Cell* **48**:713–722.
302. **Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH.** 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* **93**:5116–5121.
303. **Kern R, Malki A, Holmgren A, Richarme G.** 2003. Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochem J* **371**:965–972.
304. **Mols M, Abee T.** 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ Microbiol* **13**:1387–1394.
305. **Mols M, Pier I, Zwietering MH, Abee T.** 2009. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **135**:303–311.
306. **Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ.** 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**:797–810.
307. **Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ.** 2004. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* **279**:13044–13053.
308. **Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY.** 2004. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* **279**:22284–22293.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Mechanismus des AAA+ Chaperon Proteasekomplexes. ....	7
<b>Abbildung 2:</b> Organisation der Domänen der Hsp90 Proteine. ....	12
<b>Abbildung 3:</b> Die genetische Maschine (GM 2.1). ....	30
<b>Abbildung 4:</b> Prinzip des Enzym-gekoppelten ATPase-Assays .....	86
<b>Abbildung 5:</b> Schematischer Aufbau der Generationsmaschine (GM 2.1). ....	89
<b>Abbildung 6:</b> Präparation von Proteinaggregaten in Wildtyp-Zellen unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	94
<b>Abbildung 7:</b> IbpA-GFP als in vivo Marker der Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	96
<b>Abbildung 8:</b> Alleiniges, exprimiertes GFP unter Hitzestress in <i>B. subtilis</i> .....	97
<b>Abbildung 9:</b> Expression von MDH in <i>B. subtilis</i> . ....	99
<b>Abbildung 10:</b> MDH-GFP als in vivo Marker der Proteinaggregation unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	100
<b>Abbildung 11:</b> Entstehung und Lokalisation von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen unter Verwendung von IbpA-CFP und MDH-YFP als Reporterproteine in <i>B. subtilis</i> . ....	102
<b>Abbildung 12:</b> Der Einfluss des 48 °C Präschocks auf das zelluläre Aggregatlevel nach einem letalen Hitzeschock und nach einer sechzigminütigen Erholungsphase in <i>B. subtilis</i> . ....	106
<b>Abbildung 13:</b> Der Einfluss der <i>clpC</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	110
<b>Abbildung 14:</b> Der Einfluss der <i>dnaK</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> . ....	113
<b>Abbildung 15:</b> Die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in der <i>dnaK clpC</i> Doppelmutante in <i>B. subtilis</i> . ....	116
<b>Abbildung 16:</b> Der Einfluss der <i>hrcA</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> . ....	118
<b>Abbildung 17:</b> Der Einfluss der <i>mcsB</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> . ....	122
<b>Abbildung 18:</b> Der Einfluss der <i>clpP</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> . ....	125

<b>Abbildung 19:</b> Der Einfluss der <i>clpX</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	127
<b>Abbildung 20:</b> Der Einfluss der <i>spx</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	130
<b>Abbildung 21:</b> Die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in der <i>B. subtilis spx clpP</i> Doppelmutante. ....	132
<b>Abbildung 22:</b> Die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in der <i>B. subtilis spx clpX</i> Doppelmutante. ....	134
<b>Abbildung 23:</b> Der Einfluss der Überexpression einer degradationsresistenten Spx-Variante (SpxDD) auf die Entstehung von Aggregaten unter Hitzestressbedingungen <i>B. subtilis</i> . ....	137
<b>Abbildung 24:</b> Der Einfluss der <i>yjbH</i> Mutation auf die Entstehung und Bildung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	139
<b>Abbildung 25:</b> Der Einfluss der Überexpression von SpxDD auf die Entstehung von Aggregaten nach dem letalen Hitzeschock und einer Erholungsphase in <i>B. subtilis</i> .....	141
<b>Abbildung 26:</b> Die Entstehung von Proteincarbonylierung unter Hitzestressbedingungen im <i>B. subtilis</i> Wildtyp und verschiedenen Mutanten.....	145
<b>Abbildung 27:</b> Der Einfluss des Spx-regulierten Thioredoxins TrxA auf die Entstehung von Aggregaten unter Hitzestressbedingungen in <i>B. subtilis</i> .....	148
<b>Abbildung 28:</b> Der Einfluss des anaeroben Wachstums auf die Entstehung von Aggregaten unter Thermotoleranzbedingungen in <i>B. subtilis</i> . ....	151
<b>Abbildung 29:</b> Analytische Gelfiltration von HtpG.....	154
<b>Abbildung 30:</b> Die ATPase-Aktivität von HtpG. ....	155
<b>Abbildung 31:</b> Der Einfluss von HtpG auf das Wachstumsverhalten in <i>B. subtilis</i> . ....	157
<b>Abbildung 32:</b> Der Einfluss, den die beiden Chaperone DnaK und HtpG zusammen auf das Wachstumsverhalten in <i>B. subtilis</i> ausüben. ....	158
<b>Abbildung 33:</b> Der Einfluss, den die Protease ClpP und das Chaperon HtpG zusammen auf das Wachstumsverhalten in <i>B. subtilis</i> ausüben.....	159
<b>Abbildung 34:</b> Der Einfluss, den die AAA+ ATPase ClpC und das Chaperon HtpG zusammen auf das Wachstumsverhalten in <i>B. subtilis</i> ausüben.....	160
<b>Abbildung 35:</b> Der Einfluss, den die AAA+ ATPase ClpC und das Chaperon HtpG zusammen auf die hitze-induzierte Aggregatentstehung in <i>B. subtilis</i> ausüben. ....	162
<b>Abbildung 36:</b> Ko-Immunopräzipitation mit HtpG. ....	164
<b>Abbildung 37:</b> Der Einfluss von HtpG auf die Salztoleranz in <i>B. subtilis</i> . ....	168

<b>Abbildung 38:</b> Der Einfluss von HtpG auf die Adaptation an erhöhte Salinität in der GM 2.1 (Experiment 1).....	170
<b>Abbildung 39:</b> Das Wachstumsverhalten der evolvierten <i>B. subtilis htpG</i> Mutante aus Experiment 1. ....	172
<b>Abbildung 40:</b> Der Einfluss von ektopisch exprimierten GFP und HtpG-Trap auf die Salztoleranz in <i>B. subtilis</i> . ....	174
<b>Abbildung 41:</b> Der Einfluss von HtpG und HtpG Trap auf die Adaptation an erhöhte Salinität in der GM 2.1 (Experiment 2). ....	176
<b>Abbildung 42:</b> Das Wachstumsverhalten des evolvierten <i>B. subtilis</i> Wildtyps und der htpG Trap Mutante aus Experiment 2. ....	179
<b>Abbildung 43:</b> Einfluss der Formylase auf das Wachstumsverhalten und die Generationszeit in <i>B. subtilis</i> im Vergleich zum Wildtyp. ....	181
<b>Abbildung 44:</b> Der Einfluss von HtpG und HtpG Trap auf die Adaptation an einen endogenen Stress, der durch die Mutation der Formylase ausgelöst wurde, in der GM 2.1..	185
<b>Abbildung 45:</b> Der Einfluss der Adaptation in der GM 2.1 auf Stationärphasenprozesse in <i>B. subtilis</i> . ....	186
<b>Abbildung 46:</b> Der Einfluss von HtpG auf bistabile Prozesse in <i>B. subtilis</i> .....	189
<b>Abbildung 47:</b> Modell: Rolle der Proteinoxidation, Spx, TrxA und dem Spx Regulon im Proteinqualitätskontrollsystem von <i>B. subtilis</i> . ....	215

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> <i>E. coli</i> -Stämme .....	46
<b>Tabelle 2:</b> <i>B. subtilis</i> - Stämme .....	49
<b>Tabelle 3:</b> Plasmide .....	51
<b>Tabelle 4:</b> Oligonukleotide .....	52
<b>Tabelle 5:</b> Antibiotika.....	54
<b>Tabelle 6:</b> PCR-Standardprogramm .....	61
<b>Tabelle 7:</b> PCR-Standardansätze und Zyklen für DreamTaq™- und Phusion®-DNA- Polymerase .....	61
<b>Tabelle 8:</b> PCR-Programm Fusion (1. PCR).....	65
<b>Tabelle 9:</b> PCR-Programm Fusion (2. PCR).....	65
<b>Tabelle 10:</b> Zusammensetzung von 2 Sammel- und Trenngelen für Glycin-SDS-PAGE .....	73
<b>Tabelle 11:</b> Antikörper .....	75
<b>Tabelle 12:</b> Eigenschaften der Überexpression der jeweiligen Proteine .....	76
<b>Tabelle 13:</b> Komponenten des Enzym-gekoppelten ATPase-Assays .....	86
<b>Tabelle 14:</b> Überprüfung der adaptierten Stämme auf ihre genetische Identität.....	90
<b>Tabelle 15:</b> Kalibrierung der Superose 6 und Berechnung des Molekulargewichts von HtpG. .....	153
<b>Tabelle 16:</b> Mögliche Interaktionspartner von HtpG. ....	165
<b>Tabelle 17:</b> Mögliche Interaktionspartner von HtpG, die jedoch in einer gleichwertigen Kontrolle auftauchten. ....	166

## **Publikationen**

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

**Runde S, Molière N, Heinz A, Maisonneuve E, Janczikowski A, Elsholz AKW, Gerth U, Hecker M & Turgay K.** 2013. The role of thiol oxidative stress response in heat-induced protein aggregate formation during thermotolerance in *Bacillus subtilis*. Mol.Microbiol. in revision.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. Turgay bin ich für die Betreuung meiner Arbeit und für seine Unterstützung während meiner Promotionszeit zu großem Dank verpflichtet. Unsere fachlichen Diskussionen fand ich immer äußerst spannend und anregend.

Herr Professor Dr. Mutzel danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit. Außerdem stellte er mir die genetische Maschine für meine Experimente zur Verfügung, half mir bei der Inbetriebnahme und unterstützte mich bei der Diskussion der Ergebnisse. Auch für diesbezügliche Fragen hatte er immer ein offenes Ohr. Dafür bin ich sehr dankbar.

Frau Professor Dr. Hengge danke ich für die Möglichkeit, zahlreiche Geräte ihrer Arbeitsgruppe nutzen zu dürfen und schließlich für gute Diskussionen im Rahmen des gemeinsamen Arbeitsseminars mit ihrer Gruppe. Vor allem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich nach dem Umzug meiner Arbeitsgruppe an die Leibniz Universität Hannover ihre Räume für die Beendigung meiner Arbeit nutzen konnte.

Frau Professor Dr. Romeis danke ich für die Mitbenutzung des Fluoreszenzmikroskops und weiterer Geräte ihrer Arbeitsgruppe.

Meinen Laborkollegen Anja Heinz, Jörn Hossmann, Noël Molière, Pia Ehrentraut, Lea Stahmer, Stephanie Braun und David van den Bruck danke ich für ihre Unterstützung und für eine tolle Laboratmosphäre.

Pia Ehrentraut, Lea Stahmer und Stephanie Braun hatten mit den eng verwandten Themen in ihren Bachelor- und Masterarbeiten einen großen Anteil an dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich für die gute Arbeit der Praktikanten Michelle Hussong, David van den Bruck und Stefanie Wolter bedanken, die mir bei meinen Experimenten in allen Phasen dieser Doktorarbeit geholfen haben.

Ich danke Sabine Kretschmer für die vielseitigen technischen Unterstützungen bei der experimentellen Arbeit und Armgard Janczikowski für die Etablierung und Durchführung der Experimente unter anaeroben Bedingungen.

Die massenspektrometrischen Daten sind unter Mithilfe von Günther Kramer und des MS-Service des ZMBH der Universität Heidelberg entstanden. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hengge und der Arbeitsgruppe Mutzel an der FU Berlin danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Nach dem Umzug meiner Arbeitsgruppe an die Leibniz Universität Hannover konnte ich mich als Teil dieser Arbeitsgruppen sehen.

Auch danke ich Roman Lassig für die geduldige Unterstützung am Fluoreszenzmikroskop.

Ulf Gerth, Leendert Hamoen, Claes von Wachenfeld, Jan-Maarten van Dijl, Daniel Kearns und Peter Zuber danke ich für die freundliche Bereitstellung zahlreicher Antisera, Plasmide und Stämme, die mir die Arbeit sehr erleichtert haben.

Meiner Familie danke ich für ihre langjährige Unterstützung all meiner Pläne.

Ich danke Jens-Anders, der alle meine Klagen und Zweifel ertragen und mir bis zum Ende meiner Promotion treu zur Seite gestanden ist. Er hat mir durch seine Ratschläge die Kraft gegeben, meine Ziele mit Erfolg zu erreichen.