



**Die Rolle des CcpA-äquivalenten Transkriptionsregulators PepR1 bei der Genregulation in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 am Beispiel der Regulation von Peptidase- und Laktoseverwertungsgenen**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte  
DISSERTATION

vorgelegt von

Joachim SCHICK

geb. in Landstuhl

Vorsitzender: Prof. Dr. T. Anke  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Henrich  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Cullum

Datum der wissenschaftlichen Aussprache:  
04. November 2005

Kaiserslautern, 2005

(D 386)

„...We probe the inexhaustable mysteries of nature in a variety of directions. We use different styles, and these probings are determined by our emotions, our moods, our cultural heritage, much as these feelings influence the artist. And the major discoveries in science are more often intuitive and serendipitous than they are the result of logical analysis. ...“

(A. Kornberg, 1995)

Meinen Eltern,  
Meiner Frau Sonja  
und  
meiner Tochter Johanna Marisa

Die vorliegende Arbeit wurde im Lehrbereich Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Henrich angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden unter dem folgenden Titel veröffentlicht:

Schick, J., Weber, B., Klein, J. R., Henrich, B. 1999. PepR1, a CcpA-like transcription regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Microbiology* 145: 3147-3154.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Henrich danke ich für die Vergabe des Themas, für sein immerwährendes Interesse, für die vielen lebhaften wissenschaftlichen und privaten Gespräche zu den im Verlauf der Arbeit auftretenden kleineren und größeren Fragen und nicht zuletzt für seine Unterstützung bei der Vorbereitung von Vorträgen sowie bei der Erstellung des Manuskriptes zur Veröffentlichung.

Herrn Prof. Dr. Anke danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. Cullum danke ich ebenso herzlich für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu dieser Arbeit anzufertigen.

Bei Herrn PD Dr. Jürgen Klein bedanke ich mich für die freundliche Überlassung einer Vielzahl an Plasmiden und Stämmen, für sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit und für die vielen kritischen und vor allem konstruktiven Hilfen und Tipps, die er mir vor allem während des praktischen Arbeitens, aber auch im Zusammenhang mit der Anfertigung von Postern und anderen schriftlichen Ausarbeitungen, gab. Jürgen, vor allem Dein nicht enden wollender Optimismus und Deine Fähigkeit schnelle und funktionale Problemlösungen aufzeigen zu können, sind mir bis heute in guter Erinnerung geblieben.

Herrn PD Dr. Reinhold Brückner, sowie den ehemaligen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe in der Abteilung für Mikrobielle Genetik der Universität Tübingen (Herrn Dr. Oliver Egeter, Herrn Dr. Joannis Bassias und Frau Dr. Ivana Jankovic) gebührt ein großes Dankeschön für die Überlassung der von ihnen konstruierten Plasmide und Stämme. Noch heute denke ich mit Freude an die Tage in Tübingen im Sommer 1996 zurück, wo ich die Gelegenheit hatte, das methodische Rüstzeug für die Arbeit mit *Staphylococcus xylosus* zu erhalten. Lieber Reinhold, vor allem die guten Diskussionen zur Katabolitrepression in verschiedenen Organismen, die wir führen konnten; und daß ich Dein enzyklopädisches Wissen zu diesem Phänomen sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien nutzen durfte, verpflichtet mich zu großem Dank.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht nach Groningen in den Niederlanden zur Abteilung für Molekulare Genetik der Rijksuniversiteit Groningen, wo ich insbesondere von Dr. Jan Kok, Dr. Girbe Buist und Michiel Hellendoorn für die Dauer meines DAAD-Stipendiums freundschaftlich aufgenommen und sowohl im Labor als auch außerhalb mit allem versorgt wurde, was ich zum Leben und Arbeiten brauchte.

Im „heimatlichen“ Labor möchte ich mich vor allem bei Udo (Dr. U. Wegmann), Günther (Dr. G. Engel) und Andrea (Dr. A. Dick) für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit, für den freimütigen Austausch von Stämmen, Plasmiden und Lösungen und für die tolle Atmosphäre bei unseren kleineren und größeren täglichen Kaffee- und abendlichen Gesprächsrunden sowie bei Kongress- und Tagungsbesuchen sehr herzlich bedanken.

Bei Ulrike Klein und Brigitte Rosenberg möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die geleistete Assistenz bei der Durchführung verschiedener Experimente und beim Sequenzieren ganz herzlich bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Dr. Erik Altermann, Dr. Susanne Becker, Dr. Carina Bergmann, Dr. Michelle Merai, Dr. Thorsten Mascher, Dr. Elke Meyer-Barton, Dr. Torsten Neu, Dr. Peter Reichmann, Dr. Klaus Stucky, Dr. Klaus Vongerichten, Dr. Beate Weber, Dr. Tanja Wolf, sowie bei Alejandro, Alexander, Angelika, Anja, Beate, Claudia, Eveline, Evelyn, Katja, und Tatjana und Thorsten ganz herzlich bedanken. Ihr habt durch Eure Anwesenheit, Eure gute Laune, durch Euer Verständnis und die gute Zusammenarbeit die Atmosphäre des Labors freundlich und freundschaftlich gestaltet.

Bei Herrn Prof. Dr. René Reinert und seiner Arbeitsgruppe am Nationalen Referenzzentrum für Streptokokken der Abteilung Medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum in Aachen möchte ich mich für die wochenlange Aufnahme während verschiedener „Schreiburlaube“ ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Adnan Al-Lahham, Frau Christiane Heeg und Herrn Reda Derrar, die zusammen mit Herrn Dr. Mark van der Linden eine produktive Arbeitsatmosphäre erzeugten, die mich immer wieder schnell vorankommen ließ.

Frau Dr. Inna Lavrik und Herrn Dr. Mark P.G. van der Linden danke ich für Ihre Freundschaft, Mark ganz besonders für seine nicht enden wollende Geduld, seinen steten, nicht zu brechenden Optimismus, der mich gestützt, geschleppt und immer wieder aufs neue motiviert hat. In den kommenden Jahren (oder Jahrzehnten) werde ich seine großartige „Führungsrolle“ noch des öfteren zu würdigen wissen.

Schlußendlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwiegereltern, bei meiner Frau Sonja und meiner Tochter Johanna Marisa ganz herzlich bedanken, die durch Ihre ständige Unterstützung, Ihre Aufmunterungen und durch das gezeigte Verständnis, wenn ich ´mal wieder Stunden und Tage nicht ansprechbar war; ganz besonderen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit haben.

Last but not least gilt mein Dank Richard, dem „Kingmaker“, für seine herausragende Rolle, die er als entscheidende historische Figur über die lange Zeit bis zur Vollendung dieser Dissertation innehatte.

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGEN

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
1.1 Das proteolytische System der Milchsäurebakterien .....	2
1.2 Regulation des proteolytischen Systems von Milchsäurebakterien .....	5
1.2.1 Proteine mit potentiellen regulatorischen Funktionen in <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290 .....	6
1.3 Globale Kontrolle des Zuckerstoffwechsels in Bakterien .....	8
1.3.1 Kontrolle des Zuckerstoffwechsels bei Enterobakterien .....	8
1.3.2 Kontrolle des Kohlenstoffmetabolismus bei Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt .....	11
1.3.2.1 Transkriptionelle Kontrolle durch CcpA .....	12
1.3.3 Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus in Milchsäurebakterien .....	15
1.3.4 Zuckerstoffwechsel-Regulation in LAB .....	16
1.4 Ziele dieser Arbeit .....	20
<b>2. MATERIAL</b> .....	21
2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....	21
2.1.1 Bakterienstämme .....	21
2.1.2 Plasmide .....	22
2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen .....	23
2.2.1 Nährmedien .....	23
2.2.2 Zusätze zu den Medien .....	26
2.2.3 Puffer .....	27
2.2.4 Chemikalien und Enzyme .....	28
2.2.5 Geräte .....	28
2.2.6 Computerprogramme und Datenbanken .....	29
<b>3. METHODEN</b> .....	30
3.1 Stammkonservierung .....	30
3.2 Messung des Bakterienwachstums .....	30
3.3 Wachstumsversuche .....	30
3.3.1 Phänotypische Überprüfung von Aminosäureauxotrophien .....	30
3.4 Transformation von Bakterien .....	30
3.4.1 Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	30
3.4.2 Elektroporation von <i>Lactobacillus casei</i> LK1 .....	31
3.4.3 Elektroporation von <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 .....	32
3.4.4 Schnelle Methode zur Elektroporation von <i>Lactococcus lactis</i> .....	32
3.4.5 Elektroporation von <i>Staphylococcus xylosum</i> .....	33
3.5 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren .....	34
3.5.1 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	34
3.5.2 Plasmid-Präparation aus <i>Staphylococcus xylosum</i> .....	37
3.5.3 Präparation von Plasmid DNA aus <i>Lactobacillus</i> und <i>Lactococcus</i> .....	38
3.5.4 Isolation von genomischer DNA und von Gesamt-DNA aus <i>Lactobacillus</i> und <i>Lactococcus</i> ...	41
3.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten .....	42
3.6 Isolierung von RNA aus <i>Lactobacillus</i> .....	43
3.6.1 Anzucht und Vorbehandlung der Zellen .....	44
3.6.2 Aufschluß der Zellen und Isolation der RNA .....	44
3.6.3 Qualitätskontrolle der RNA .....	45

3.7 Phenolextraktion und Präzipitation von DNA .....	45
3.7.1 Phenolextraktion .....	45
3.7.2 Ethanolpräzipitation .....	45
3.7.3 Präzipitation von DNA mit Isopropanol .....	46
3.7.4 Präzipitation von DNA mit Isopropanol und Ammoniumacetat .....	46
3.7.5 Präzipitation von DNA mit Polyethylenglykol .....	46
3.8 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden .....	47
3.8.1 Synthese der Oligonukleotide .....	47
3.8.2 Abspaltung der Schutzgruppen .....	47
3.8.3 Entsalzen der Oligonukleotide .....	47
3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	47
3.10 Enzymreaktionen mit DNA .....	48
3.10.1 Verdau durch Restriktionsenzyme .....	48
3.10.2 Auffüllen einzelsträngiger DNA-Enden .....	48
3.10.3 Abverdauen einzelsträngiger DNA-Enden .....	48
3.10.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	49
3.10.5 Ligation von DNA-Fragmenten .....	49
3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	49
3.11.1 PCR-Standardansatz .....	50
3.11.2 Amplifikation mit der ULTma Polymerase .....	51
3.11.3 Inverse PCR .....	51
3.11.4 Elektrophorese von DNA .....	52
3.11.5 Agarosegelelektrophorese .....	52
3.11.6 Polyacrylamidgelelektrophorese .....	52
3.11.7 Ethidiumbromidfärbung von Agarose- und PAA-Gelen .....	53
3.12 Sequenzgele .....	54
3.12.1 Sequenzgele für die nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem ABI373A und 373 Stretch .....	54
3.12.2 Sequenzgele für die nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem Li-Cor 4000L .....	54
3.13 Sequenzierung von DNA .....	55
3.13.1 Nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem ABI373A und 370 Stretch DNA-Sequenzer .....	55
3.13.2 Nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem Li-Cor 4000L .....	57
3.14 Northern-Blot Hybridisierung .....	58
3.14.1 Auftrennung der RNA durch Gelelektrophorese .....	58
3.14.2 Transfer der RNA durch Kapillarblot .....	59
3.14.3 RNA-Färbung mit Methylenblau .....	60
3.14.4 Nachweis spezifischer mRNA durch <sup>32</sup> P-markierte Sonden .....	60
3.14.5 Prähybridisierung, Hybridisierung und Stringenzwaschungen .....	62
3.14.6 Detektion durch Autoradiographie .....	63
3.15 In vitro Markierung neusynthetisierter Proteine .....	63
3.16 Elektrophorese von Proteinen .....	63
3.16.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	63
3.16.2 Coomassie-Färbung .....	63
3.16.3 Autoradiographie von SDS-PAA-Gelen .....	65
3.17 Phototechnische Methoden .....	66
3.17.1 Entwicklung von Röntgenfilmen .....	66
3.18 Band-Migration-Assay .....	66
3.18.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA .....	66
3.18.2 Bildung des Protein-DNA-Komplexes .....	67



3.18.3 Elektrophorese .....	67
3.18.4 Kapillar-Blotten .....	67
3.18.5 Detektion durch Chemolumineszenz .....	68
3.19 Proteinbiochemische Methoden .....	69
3.19.1 Präparation zellfreier Extrakte .....	69
3.19.1.1 Gewinnung von zellfreiem Extrakt aus <i>E. coli</i> .....	69
3.19.1.2 Gewinnung von zellfreiem Extract aus <i>Lactobacillus</i> .....	69
3.19.1.3 Präparation zellfreier Extracte aus <i>Lactobacillus</i> .....	70
3.19.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford .....	71
3.19.2.1 Standardassay (0,2-1,4 mg Protein/ml) .....	71
3.19.2.2 Microassay (5-100 µg Protein/ml) .....	72
3.19.3 Konzentrationsbestimmung nach Spector .....	72
3.19.4 Nachweis und Berechnung von Enzymaktivitäten .....	72
3.19.4.1 Messung von $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten .....	72
3.19.4.1.1 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in <i>E. coli</i> .....	72
3.19.4.1.2 Bestimmung der <i>E. coli</i> $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in Extrakten von <i>Lactococcus lactis</i> .....	73
3.19.4.1.3 Bestimmung der <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten .....	74
3.19.4.2 Bestimmung von Peptidaseaktivitäten .....	74
3.19.4.2.1 Bestimmung der PepI-, PepX-Aktivitäten durch Hydrolyse von <i>p</i> -Nitroanilid-Substraten .....	74
3.19.4.2.2 Bestimmung der PepQ-Aktivität .....	75
3.19.4.3 Nachweis der <i>D</i> -Laktat-Dehydrogenase von <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> .....	76
3.19.4.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten in <i>Staphylococcus xylosus</i> .....	76
3.19.4.4.1 Photometrische Bestimmung der Enzymaktivitäten .....	77
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	78
4.1 Das <i>cre</i> ( <i>catabolite responsive element</i> ) der <i>pepR1-pepQ</i> intergenen Region – funktionelle Analyse von Wildtyp und Mutanten im heterologen <i>E. coli</i> System .....	78
4.1.1 Subklonierung des <i>pepQ</i> <sub>wt</sub> -Promotors und mutierter Varianten in pMC1871 .....	79
4.1.2 Einfluß des Regulators PepR1 auf die Expression der verschiedenen <i>PpepQ::'lacZ</i> -Translationsfusionen im heterologen <i>E. coli</i> Wirt .....	81
4.2 Gel-Retardationsexperimente mit gereinigtem PepR1-Protein .....	85
4.2.1 Nachweis der <i>in vitro</i> Bindung von PepR1 an nicht mutierte <i>pepQ</i> - ( <i>cre</i> <sub>wt</sub> ) und mutierte ( <i>cre</i> <sub>mut1</sub> ) Promotorfragmente .....	85
4.2.2 Analyse der in den Gel-Retardierungsexperimenten eingesetzten DNA-Fragmenten hinsichtlich potentieller <i>cre</i> -Sequenzen .....	87
4.3 Analyse des Einflusses von <i>pepR1</i> auf Translationsfusionen der <i>pepI</i> - und <i>pepX</i> -Promotoren mit dem <i>'lacZ</i> -Gen im heterologen <i>E. coli</i> System .....	91
4.3.1 Subklonierung der <i>pepI</i> - und <i>pepX</i> -Promotorfragmente in pMC1871 .....	91
4.3.2 Einfluß des potentiellen Regulators PepR1 auf die Expression des <i>PpepI::'lacZ</i> - und des <i>PpepX::'lacZ</i> -Translationsfusions-Konstruktes im heterologen <i>E. coli</i> System .....	92
4.4 Komplementation einer <i>ccpA</i> -Mutation in <i>Staphylococcus xylosus</i> C2a durch das <i>pepR1</i> -Gen von <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> .....	95
4.4.1 Subklonierung des <i>pepR1</i> -Gens in den <i>Staphylococcus-E. coli</i> -Shuttle-Vektor pRB473 .....	95
4.4.2 Plasmidkodierte Expression von PepR1 aus <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> in <i>Staphylococcus xylosus</i> TX154 .....	97
4.4.3 Bestimmung der $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität der Stämme <i>S. xylosus</i> C2a und TX154 in Abhängigkeit von PepR1 .....	99

4.5 Expression von <i>pepR1</i> in <i>Lactobacillus casei</i> LK1 .....	100
4.5.1 Subklonierung des <i>pepR1</i> -Gens in den <i>Lactobacillus</i> -Vektor pJK651 .....	101
4.5.2 Plasmidkodierte Expression von PepR1 aus <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> in <i>Lactobacillus casei</i> LK1 .....	103
4.6 Untersuchung der Autoregulation des <i>pepR1</i> -Promotors durch PepR1 im heterologen <i>E. coli</i> -System	106
4.6.1 Klonierung des <i>pepR1</i> -Promotors in pMC1871 .....	106
4.6.2 Einfluß von PepR1 auf die Expression der P <i>pepR1</i> :: <i>lacZ</i> -Translationsfusion in <i>E. coli</i> .....	107
4.6.3 Klonierung des <i>pepR1</i> -Genes in den Expressionsvektor pK184 .....	108
4.6.4 Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation von pKR1184 .....	110
4.6.5 Einfluß von PepR1 (P <sub><i>lac</i></sub> :: <i>pepR1</i> ) auf die Expression der P <sub><i>pepR1</i></sub> :: <i>lacZ</i> -Translationsfusion in <i>E. coli</i> .....	111
4.7 Analyse der Transkripte von <i>pepR1</i> , <i>pepQ</i> , <i>pepI</i> und <i>pepX</i> sowie der spezifischen Aktivitäten der Peptidasen PepQ, PepI und PepX bei Wachstum in modifiziertem chemisch definiertem Medium (CDM <sub>mod.</sub> ) mit verschiedenen Zuckerquellen .....	113
4.7.1 Analyse der Transkripte von <i>pepR1</i> und <i>pepQ</i> , sowie der spezifischen Aktivität der Peptidase Q bei Wachstum in modifiziertem chemisch definiertem Medium (CDM <sub>mod.</sub> ) mit den Zuckern Laktose oder Glukose .....	116
4.7.2 Analyse der Transkripte von <i>pepI</i> , <i>pepX</i> sowie der spezifischen Aktivitäten der korrespondierenden Enzyme PepI und PepX bei Wachstum in modifiziertem chemisch definiertem Medium mit den C-Quellen Laktose oder Glukose .....	118
4.8 Klonierung und Sequenzierung der an der Laktoseverwertung beteiligten Gene und ihrer flankierenden Bereiche aus <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290 .....	121
4.8.1 Sequenzierung des Inserts von pUH89 <i>lac</i> .....	121
4.8.1.1 Analyse der Nukleotidsequenz des Inserts von pUH89 <i>lac</i> .....	124
4.8.1.2 Analyse der offenen Leserahmen 'ORF1, ORF2 und ORF3' sowie ihrer abgeleiteten Genprodukte .....	125
4.8.2 Komplettierung des <i>lacP</i> -Gens und der stromaufwärts gelegenen Promotorregion.....	127
4.8.2.1 Screening einer Genbank von <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7270 auf für die Laktoseverwertung positive Klone .....	127
4.8.2.2 Amplifikation des fehlenden 5'- <i>lacP</i> -Genabschnittes durch Inverse PCR .....	128
4.8.2.3 Analyse von <i>lacP</i> und des abgeleiteten Genproduktes LacP .....	131
4.8.2.4 Analyse der 5' nicht-kodierenden Region stromaufwärts von <i>lacP</i> .....	132
4.9 Expression von <i>lacPZ</i> in Abhängigkeit von der C-Quelle .....	135
4.9.1 Bestimmung des Temperaturoptimums der spezifischen $\beta$ -Galaktosidaseaktivität .....	135
4.9.2 Analyse der <i>lacPZ</i> -Transkripte sowie der spezifischen Aktivitäten der $\beta$ -Galaktosidase und der <i>D</i> -Laktatdehydrogenase .....	136
4.10 Funktionelle Analyse der beiden <i>cre</i> -Operatoren der <i>lac</i> -Promotor- und <i>lacP</i> -5'-Region in den heterologen Organismen <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> und <i>Lactococcus lactis</i> .....	140
4.10.1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMC <i>Plac1</i> und pMC <i>Plac2</i> .....	140
4.10.2 Einfluß des Regulators PepR1 auf die Expression der beiden P <sub><i>lac</i></sub> :: <i>lacZ</i> -Translationsfusionen im heterologen <i>E. coli</i> Wirt .....	142
4.10.3 Expression der P <sub><i>lac</i></sub> :: <i>lacZ</i> -Translationsfusionen in <i>lac</i> - bzw. <i>lac</i> - und <i>ccpA</i> -Mutanten von <i>Staphylococcus xylosus</i> C2a .....	146
4.10.3.1 Subklonierung der P <sub><i>lac</i></sub> :: <i>lacZ</i> -Translationsfusionen aus pMC <i>Plac1</i> und pMC <i>Plac2</i> in den <i>Staphylococcus-E. coli</i> -Shuttle-Vektor pRB473 .....	146
4.10.3.2 Plasmidkodierte Expression der beiden <i>lacZ</i> -Fusionen des <i>lac</i> -Promotors aus <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> in <i>Staphylococcus xylosus</i> TX300 und TX600 .....	148
4.10.3.3 Bestimmung der Aktivitäten der P <sub><i>lac</i></sub> -Translationsfusionen mit dem <i>E. coli-lacZ</i> -Gen in den Stämmen <i>S. xylosus</i> TX300 und TX600 .....	150

4.10.4	Expression der $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen im <i>Lactococcus lactis</i> Wildtyp MG1363 und der MG1363 <i>pepR1-pepQ</i> -Mutante (MG1363 <i>QR</i> ) .....	151
4.10.4.1	Konstruktion des <i>Lactococcus-E. coli</i> -Shuttle-Vektors pUK101 .....	152
4.10.4.2	Subklonierung der zwei $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen aus den pMC1871-Derivaten (pMCPlac1 / 2) in den <i>Lactococcus-E. coli</i> - Shuttle-Vektor pUK101 .....	154
4.10.4.3	Plasmidkodierte Expression der $lacZ$ -Fusionen des <i>lac</i> -Promotors aus <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> in <i>Lactococcus lactis</i> MG1363(pLP712) und MG1363 <i>QR</i> (pLP712) .....	156
4.10.4.4	Bestimmung der Aktivitäten der $P_{lac}$ -Fusionen in Transformanten von <i>L. lactis</i> MG1363(pLP712) und MG1363 <i>QR</i> (pLP712) .....	158
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	161
5.1	Die LacI/GalR-Familie bakterieller Regulatoren .....	161
5.1.1	PepR1 gehört zur Subfamilie der CcpA-Proteine.....	162
5.1.2	Komplementation der <i>Staphylococcus xylosus</i> C2a <i>ccpA</i> -Mutante TX154 durch <i>pepR1</i> aus <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290 .....	167
5.1.3	Expression von PepR1 aus <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> in <i>Lactobacillus casei</i> LK1 ...	169
5.2	Die <i>cre</i> -Operatoren der Promotorregionen der Peptidasegene <i>pepQ</i> , <i>pepI</i> , <i>pepX</i> und des Regulatorgens <i>pepR1</i> – <i>cis</i> -aktive Elemente für die durch PepR1 ausgeübte transkriptionelle Regulation? .....	170
5.2.1	Funktionelle Analyse von Wildtyp und Mutanten des <i>cre</i> der <i>pepQ-pepR1</i> -intergenen Region im heterologogen <i>E. coli</i> System .....	171
5.2.2	Das <i>cre</i> der <i>pepQ-pepR1</i> -intergenen Region beeinflusst auch die Transkription von <i>pepR1</i> .....	172
5.2.3	Band-Shift-Analyse mit <i>pepQ</i> -Promotorfragmenten und gereinigtem PepR1 .....	174
5.2.4	Studien zur Transkription von <i>pepR1</i> und <i>pepQ</i> und zur Expression von PepQ bei Wachstum mit den C-Quellen Glukose oder Laktose .....	176
5.2.5	C-Quellen-abhängige Transkription und Aktivität der Peptidasen I und X im Vergleich zur PepR1-Abhängigkeit der Aktivitäten der <i>PpepI</i> - bzw. <i>PpepX-lacZ</i> Translationsfusionen .....	178
5.2.6	Erweiterte vergleichende Betrachtungen zur Kontrolle von Genen durch CcpA/PepR1 und andere Regulatoren .....	179
5.3	Das <i>lac</i> -Operon von <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290.....	183
5.3.1	Nukleotidsequenzen, abgeleitete Genprodukte und Vergleich der genetische Organisation von <i>lacP</i> , <i>lacZ</i> und <i>lacR'</i> aus <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290 mit anderen Organismen .....	183
5.3.2	Die Transkription des <i>lac</i> -Operons und die LacZ-Aktivität in Abhängigkeit von der C-Quelle...	188
5.3.3	Die Relevanz der <i>cre</i> des <i>lac</i> -Promotors für die durch PepR1/CcpA ausgeübte Katabolitrepression.....	189
5.4	Schlußbemerkung.....	191
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	192
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b> .....	193
7.1	Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide .....	193
7.2	Nukleotid-und Aminosäuresequenzen .....	195
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	201

## ABKÜRZUNGEN

A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin	EtBr	Ethidiumbromid
Abb.	Abbildung	gpORF	Proteinprodukt des entsprechenden ORF's
Ac.	Acetat		
Acc.-Nr.	Accession-Number	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
Amp	Ampicillin	k	kilo
APS	Ammoniumperoxydisulfat	Kan	Kanamyzin
as	Aminosäure(n)	KAc	Kaliumacetat
ATCC	American Type Culture Collection	kb	Kilobasenpaare
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	kDa	Kilodalton
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>	Km	Kanamycin
bp	Basenpaar(e)	<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
BSA	Rinderserumalbumin	LAB	Milchsäurebakterien
CIP	calf intestinal phosphatase	<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
Cm	Chloramphenicol	MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
Da	Dalton	mRNA	messenger RNA
$\Delta$ /del	Deletion	MW	Molekulargewicht
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat	NCBI	National Centre for Biotechnology Information Datenbanken: DDJB, EMBL, GenBank; PDB, PIR, PRF, Swiss-Prot, GenPep
dest.	destilliert	nt	Nukleotid(e)
DMF	Dimethylformamid	ntp	Nukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid	O.D.	optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ORF	offenes Leseraster
DNase	Desoxyribonuklease	P	Promotor
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	p.A.	zur Analyse
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	PAA	Polyacrylamid
DTT	Dithiothreitol	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PEG	Polyethylenglykol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PCR	Polymerasekettenreaktion
EGTA	Ethylenglykol-O,O'-bis/2-amino-ethyl- )-N,N,N',N'-tetraacetat	pI	Isoelektrischer Punkt
Em	Erythromycin	r	resistent
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg	RBS	Ribosomenbindestelle
Ery	Erythromycin	RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute	Tet	Tetrazyklin
rRNA	ribosomale RNA	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
RT	Raumtemperatur	Tris	Trishydroxymethylaminoethan
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>	U	Units
<i>St.</i>	<i>Streptococcus</i>	UE	Untereinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat	UV	Ultraviolett
subsp.	Subspezies	v/v	Volumenprozent
Tab.	Tabelle	w/v	Gewichtsprozent
		X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid

Die Aminosäuren wurden entsprechend der üblichen Nomenklatur im Ein- oder Dreibuchstabenkode angegeben. Die Genbezeichnungen bei *E. coli* entsprechen der von Bachman (1991) aufgestellten Genkarte.

---

## I. EINLEITUNG

Bereits seit Jahrtausenden nutzt der Mensch bei der Herstellung von Lebensmitteln die Fermentation. In der Neuzeit sind Mikroorganismen zu einem bedeutenden Faktor in der Lebensmittelproduktion geworden. Bei den während der Fermentation ablaufenden mikrobiellen Gärungsprozessen haben die Bildung organischer Säuren und die Erzeugung von Aromastoffen eine konservierende Wirkung sowie einen entscheidenden Einfluß auf Geschmack, Bekömmlichkeit und Konsistenz der Produkte. Die wichtigsten industriell genutzten Mikroorganismen sind die Milchsäurebakterien oder LAB (Lactic Acid Bacteria). Sie werden in der Familie *Lactobacteriaceae* zusammengefaßt und in die morphologisch uneinheitlichen Gattungen *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* und *Lactobacillus* untergliedert. Es handelt sich von wenigen Ausnahmen abgesehen, um Gram-positive unbewegliche, aerotolerant wachsende Eubakterien, mit obligater Gärung und fehlender Sporenbildung. Systematisch gesehen werden Milchsäurebakterien aufgrund der 16s-RNA-Sequenzhomologien mit den Gattungen *Clostridium* und *Bacillus* zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt zusammengefaßt (Kandler und Weiss, 1986).

Ein wesentliches Merkmal der *Lactobacteriaceae* besteht in der Fähigkeit Milchzucker (Laktose) als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Wenn sie Hexosen nahezu vollständig (90 %) zu Milchsäure (Laktat) vergären, bezeichnet man sie als homofermentative, bilden sie daneben eine Reihe anderer Produkte wie CO<sub>2</sub>, Acetat oder Ethanol als heterofermentative Milchsäurebakterien. Man geht davon aus, daß Milchsäurebakterien als Folge ihrer Spezialisierung auf das Wachstum in Milch und anderen Nährstoff- und supplinreichen Habitaten die Fähigkeit zur Synthese vieler Metabolite verloren haben. Für ein optimales Wachstum benötigen sie daher eine Reihe von Supplinen wie Vitamine, Purine, Pyrimidine und verschiedene Aminosäuren (Kandler und Weiss, 1986).

Bei der Herstellung von Milchprodukten werden sterilisierter oder pasteurisierter Milch meist spezifische Reinkulturen zugesetzt. Die Auswahl dieser sogenannten Starterorganismen bestimmt dabei die Eigenschaften der fermentierten Produkte hinsichtlich Geschmack, Aroma und Konsistenz. Typische Aromastoffe sind die bei der Vergärung von Laktose anfallenden Verbindungen Acetaldehyd, Diacetyl und Alkohol. Als Geschmackskomponenten kommen neben der Milchsäure verschiedene weitere organische Säuren (Propioninsäure, Essigsäure), Ketone, Fettsäuren und einige Aminosäuren vor (El Soda, 1993). Die Ansäuerung im Verlauf des Fermentationsverfahrens ist als eine Hauptfunktion der zugesetzten Bakterienstämme anzusehen. Die konservierende Wirkung von Laktat wird häufig durch die Bildung und Freisetzung weiterer inhibitorischer Metaboliten wie Acetaldehyd, Diacetyl und Wasserstoffperoxid sowie durch die Ausschüttung von Bacteriocinen noch erhöht (Law und Kolstadt, 1983; Vandenbergh *et al.*, 1993).

Die wichtigsten kommerziell verwendeten Arten sind *Lb. delbrückii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* und *Lb. helveticus*. Der Stamm *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290, dessen regulatorische Komponente PepR1 im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, wurde in der "Süddeutschen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft" in Freising-Weihenstephan aus Emmentaler Käse isoliert. Er wird bei der Herstellung von Hartkäse und Sauerquark eingesetzt.

Außer in der Milchindustrie finden Milchsäurebakterien Anwendung bei der Herstellung von Rohwurst oder Sauerteig, bei der Fermentation verschiedener Gemüse (z.B. Sauerkraut), aber auch bei der Vergärung alkoholischer Getränke wie zum Beispiel Wein. Für die Tierfuttermittelproduktion ist die Silageherstellung durch LAB von Bedeutung (Kandler und Weiss, 1986; Marshall, 1987)

Unter geeigneten Milieubedingungen, wie beispielsweise unter Luftabschluß, setzen sich Milchsäurebakterien sehr schnell gegenüber der Begleitflora durch.

Infolge ihrer Bedeutung für die Wirtschaft galt den Milchsäurebakterien in den letzten Jahrzehnten das intensive Interesse der Wissenschaft, wobei die Anwendung gentechnischer Methoden zunehmend in den Vordergrund trat (McKay und Baldwin, 1990; Gasson, 1993). Als Forschungsschwerpunkte haben sich heute die folgenden Themengebiete herausgebildet: Verständnis der Genetik der Milchsäurebakterien, Optimierung gentechnologischer Methoden, Erforschung von Bakteriophagen und Bakteriophagenresistenz, Charakterisierung von Bacteriocinen, Aufklärung des proteolytischen Systems und des Kohlenhydratstoffwechsels, sowie die Erforschung probiotischer Effekte und Entwicklung rekombinanter Milchsäurebakterien als Vektoren zur oralen Immunisierung (McKay und Baldwin, 1990; Gasson, 1993; Pritchard und Coolbear, 1993; Gasson und De Vos, 1994; De Vos, 1996; Wells *et al.*, 1996).

Das Wissen über die physiologischen Vorgänge und die zugrundeliegenden Mechanismen bildet die Voraussetzung für eine gezielte Optimierung industriell oder medizinisch bedeutsamer Stämme. Das primäre Interesse der Industrie gilt der Verbesserung von Fermentationsverfahren bezüglich Effizienz und Geschmacksbildung (Olson, 1990; El Soda, 1993; Visser, 1993). Die Erforschung des proteolytischen Systemes der Milchsäurebakterien bildet hierzu eine der Grundlagen.

### 1.1 Das proteolytische System der Milchsäurebakterien

Der Bedarf an essentiellen und wachstumsfördernden Aminosäuren ist ein wesentliches Merkmal der *Lactobacteriaceae*. Heute steht fest, daß der Bedarf an essentiellen Aminosäuren ein stammspezifisches Phänomen ist und zwischen vier und vierzehn Aminosäuren variiert (Chopin, 1993). Milchsäurebakterien sind auf ein leistungsfähiges proteolytisches System angewiesen, mit dessen Hilfe die in Milch im Überschuß vorhandenen Protein-Substrate dem Metabolismus der Zelle zugänglich gemacht werden können (Mills und Thomas, 1981; Juillard, 1995). Durch den Abbau der Milchproteine, speziell des  $\beta$ -Caseins, die sich zu 80 % aus  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein zusammensetzen, versorgen sich Milchsäurebakterien mit allen essentiell zum Wachstum benötigten Aminosäuren (Kunji *et al.*, 1996a). Um zu hohen Zelldichten auszuwachsen, benötigt eine *Lc. lactis*-Kultur allerdings nur etwa 1 % des in der Milch vorhandenen Caseinanteiles.

Die Komponenten des proteolytischen Systems von Milchsäurebakterien kann man funktionell in drei Gruppen unterteilen. Dies zeigt die Darstellung in **Abb. 1.1-1** exemplarisch für *Lactococcus lactis* (Kunji *et al.*, 1996b). Zuerst wirken extrazelluläre Proteinasen, welche die Caseine in kürzere Fragmente spalten. Mit Hilfe der Transportsysteme wird ein Teil der von der jeweiligen Proteinase erzeugten Spaltprodukte in die Zelle aufgenommen. Diese Spaltprodukte stellen dann die Substrate für die Peptidasen dar, deren Aufgabe die komplette Hydrolyse der Oligopeptide zu freien Aminosäuren ist.

Die bisher charakterisierten Proteinasen wurden aus einer Vielzahl unterschiedlicher Milchsäurebakterien isoliert und charakterisiert (Kunji *et al.*, 1996). Für einige dieser Enzyme aus *Lactococcus*-Stämmen (Kok und Venema, 1988; Vos *et al.*, 1989a; Kiwaki *et al.*, 1989; Exterkate *et al.*, 1993) sowie aus *Lb. paracasei* (Holk und Naes, 1992) und *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* (Gilbert *et al.*, 1994), wurde die Nukleotidsequenz ermittelt. Die bisher bekannten Proteinasen aus LAB sind ausnahmslos zellwandgebundene monomere Serinproteasen mit einem Molekulargewicht zwischen 180 und 190 kDa.

Sie unterliegen einer zweifachen N-terminalen Prozessierung und besitzen typische C-terminale Zellwand-Sortierungssignale mit einem konservierten LPXT↓G-Motiv (Navarre und Schneewind, 1994). Die Initiation des Caseinabbaus wird in jedem der Stämme von einer einzelnen Proteinase ausgeführt. Die *Lactococcus*-Proteinasen weisen untereinander hohe Übereinstimmungen auf. Die Primärsequenzen dieser Enzyme sind untereinander zu über 98 % identisch.

Die Tatsache, daß die Proteinasegene in *Lactococcus* bis auf wenige Ausnahmen plasmidkodiert sind (McKay, 1983; Nissen-Meyer *et al.*, 1992), erklärt die beobachtete Instabilität dieses Merkmals. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde schnell erkannt, daß die Expression des Proteinasegenes (*prtP*) für das Wachstum in Milch essentiell ist.

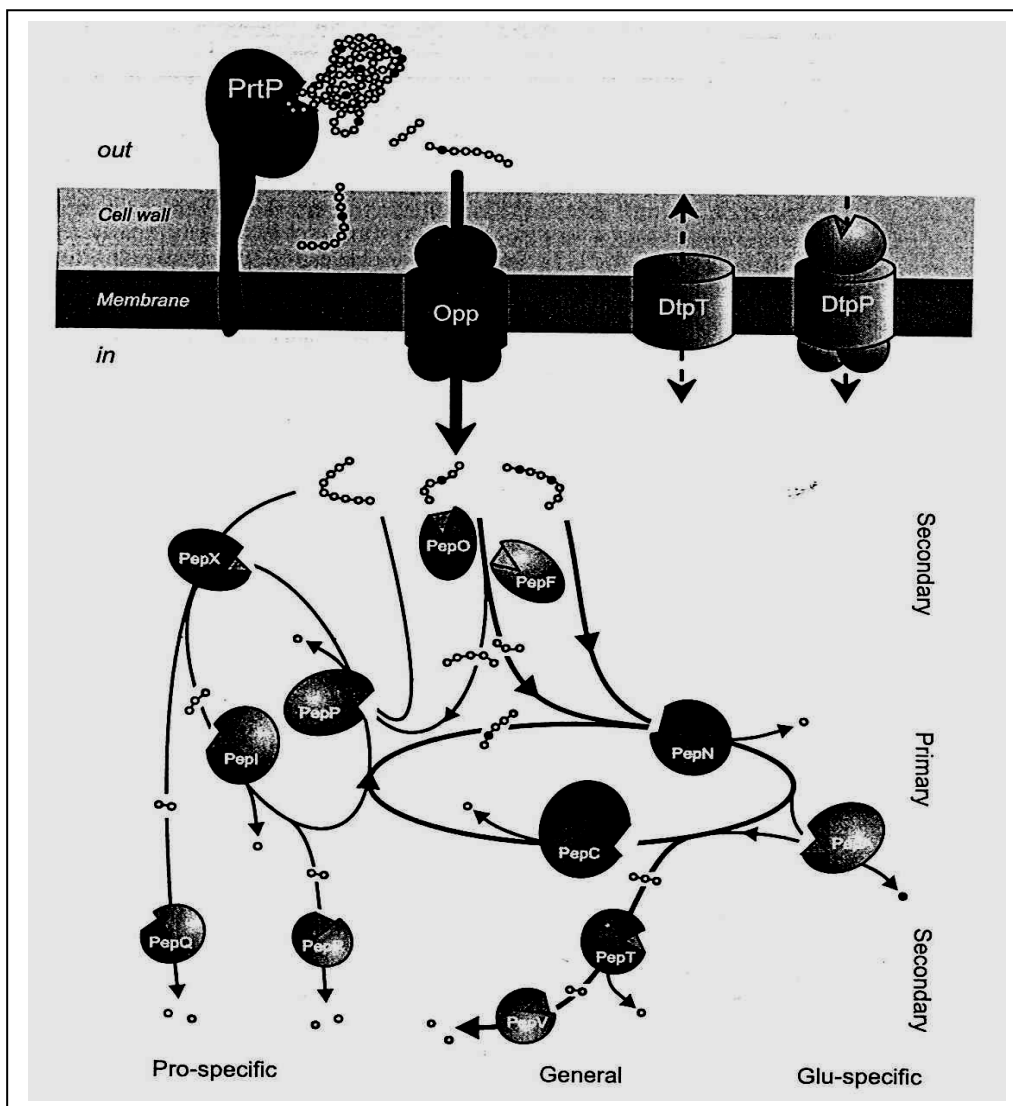


Abb. 1.1-1 Das proteolytische System der Milchsäurebakterien am Beispiel *Lactococcus lactis*. (aus Kunji *et al.*, 1996)

In *Lactococcus* können mindestens zehn verschiedene spezifische Aminosäure-Carrier unterschieden werden. Bei ihnen handelt es sich um Transportsysteme mit hoher Spezifität für strukturell verwandte Aminosäuren. Dazu gehören beispielsweise die Transporter für Glu/Gln, Leu/Ile/Val, Ser/Thr Ala/Gly, Lys/Arg/Orn (Konings *et al.*, 1989). In *Lactobacillus* konnten bisher weitaus weniger



Aminosäuretransportsysteme identifiziert werden, allerdings legen Aufnahmestudien mit *Lb. helveticus* nahe, daß *Lactobacillen* über ähnliche Systeme verfügen (Kunji *et al.*, 1996a).

Bei dem Di/Tripeptidtransportsystem für hydrophile Peptide (DtpT) von *Lc. lactis* handelt es sich um ein *proton moti force* getriebenes System mit breiter Substratspezifität (Smid *et al.*, 1989). Mit DtpP besitzt *Lc. lactis* ein weiteres Di/Tripeptidtransportsystem zur Aufnahme hydrophober Peptide (**Abb. 1.1-1**). Durch Inhibitionsversuche konnte gezeigt werden, daß es sich um ein primäres Transportsystem handelt (Foucaud, 1995).

Essentiell für das Wachstum von *Lc. lactis* in Milch ist das Oligopeptidtransportsystem (Opp) (Tynkynnen *et al.*, 1993; Kunji *et al.*, 1995; Juillard, 1995). Es handelt sich um ein ATP-getriebenes Transportsystem, welches für Oligopeptide mit einer Größe von vier bis achtzehn Aminosäuren spezifisch ist (Tynkynnen *et al.*, 1993, Kunji *et al.*, 1995).

Aus verschiedenen Milchsäurebakterien wurden bisher eine große Anzahl peptidolytischer Enzyme isoliert und auf biochemischer Ebene charakterisiert. Für die meisten dieser Peptidasen wurden darüber hinaus die Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene bestimmt. Die Aufgabe der Peptidasen besteht im allgemeinen darin, die von der extrazellulären Proteinase freigesetzten Spaltprodukte vollständig zu hydrolysieren. Entsprechend ihrer Substrat-, und Spaltungsspezifitäten lassen sich Peptidasen aus LAB unterscheiden in Endopeptidasen, allgemeine Aminopeptidasen und Aminopeptidasen mit enger Substratspezifität. Carboxypeptidasen, welche ihre Substrate vom C-Terminus her abbauen, konnten in LAB noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden (Kunji *et al.*, 1996a).

Die Endopeptidasen hydrolysieren interne Peptidbindungen und bilden so aus den durch das Opp-Transportsystem in die Zelle aufgenommenen Spaltprodukten kürzere Fragmente. Diese Enzyme besitzen eine breite Substratspezifität für Oligopeptide unterschiedlicher Größe (Kunji *et al.*, 1996a).

Desweiteren verfügen LAB über eine große Zahl allgemeiner Aminopeptidasen mit breiter Substratspezifität. Diese Enzyme ergänzen sich teilweise in ihren Aktivitäten, in manchen Fällen konnten aber auch überlappende Substratspektren festgestellt werden. Neben Peptidasen, welche eine große Anzahl unterschiedlicher Peptidbindungen spalten, verfügen LAB auch über einige proteolytische Enzyme mit enger Substratspezifität. Dazu gehören die prolinspezifischen Peptidasen (siehe **Tab. 1.1-1**), die für das Wachstum der LAB besonder Bedeutung besitzen. Der Grund hierfür ist, daß das Milchprotein Casein, insbesondere  $\beta$ -Casein, mit 16,7 %, im Vergleich zu anderen Proteinen (ca. 5 %) einen außerordentlich hohen Prolingehalt aufweist. Die Iminosäure Prolin besitzt durch Ausbildung eines Pyrrolidin-Ringes zwischen  $\alpha$ -N- und  $\alpha$ -C-Atom im Unterschied zu den anderen proteinogenen Aminosäuren eine sekundäre Aminogruppe. Diese Struktur der Iminosäure beeinflußt nicht nur die Konformation eines Proteins, sondern auch dessen Stabilität und Abbaurate. Im allgemeinen ist die Prolinbindung selbst für Peptidasen mit breiter Substratspezifität nicht zugänglich. Die Spaltung von Peptidbindungen, an denen Prolin beteiligt ist, wird daher von prolinspezifischen Peptidasen katalysiert (Yaron und Naider, 1993). Das Substratspektrum von Prolin-spezifischen Peptidasen umfaßt Oligopeptide, die Di-, Tri- und Tetrapeptide Pro-Gly, Gly-Pro, Pro-Gly-Gly, Gly-Pro-Gly, Pro-Leu-Gly-Lys als auch Polypeptide wie Poly-L-Prolin. Inzwischen konnten entweder die Enzyme oder die zugehörigen enzymatischen Aktivitäten in vielen LAB (**Tab. 1.1-1**), wie zum Beispiel

Name	Spaltspezifität	M <sub>r</sub> (kD)	Quarternäre Struktur	Katalytische Klasse	Identifiziert in
Prolidase ( <b>PepQ</b> )	X↓Pro	41-43	mono	Metallo	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i>
Aminopeptidase P ( <b>PepP</b> )	X↓Pro-(X) <sub>n</sub>	43	mono	Metallo	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
X-Prolyl-Dipeptidyl- Aminopeptidase ( <b>PepX</b> )	X-Pro↓(X) <sub>n</sub>	72-90	mono-di	Serin	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>bulg.</i>
Prolinase ( <b>PepR</b> )	Pro↓X	35	-	-	<i>Lb. helveticus</i>
Prolinimino- peptidase ( <b>PepI</b> )	Pro↓X-(X) <sub>n</sub>	33-34	di-tri	Serin/ Metallo	<i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>bulg.</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lb. helveticus</i>

**Tab. 1.1-1: Prolinspezifische Peptidasen aus LAB, nach Kunji et al. (1996b).** Die Pfeile bezeichnen die jeweiligen Spaltstellen. (-) - nicht getestet;

*Lactobacillus* Spezies (Gilbert et al. 1994; Klein et al., 1994a; Varmanen et al., 1996) und *Lc. lactis*. (Baankreis und Exterkate, 1991), nachgewiesen werden. Sehr gute Hinweise zu den möglichen Komponenten einer vollständigen Ausstattung an Peptidasen sollte die Analyse von in Sequenzierung befindlichen *Lactobacillus*-Genomen, wie zum Beispiel des *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA-365 Genomes, eröffnen können (gi 62465076; Richardson, 2005).

## 1.2 Regulation des proteolytischen Systems von Milchsäurebakterien

Über die Regulation der proteolytischen Komponenten von LAB ist noch wenig bekannt. Die genetische Kontrolle des Zellstoffwechsels als Anpassung an variierende Umweltbedingungen ist einer der entscheidenden Faktoren für den Überlebenserfolg einer Art. Unter diesem Aspekt wäre eine koordinierte Expression von Proteolysefunktionen in Abhängigkeit vom Substratangebot zu erwarten. In *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wurden drei offene Leseraster mit potentiell regulatorischer Funktion ermittelt. Auch in *Lc. lactis* bestehen Hinweise auf eine kontrollierte Expression proteolytischer Gene. Hier konnten in Bereich stromabwärts von *pepC*, einem Aminopeptidasegen, potentielle Regulatoren des LysR- bzw. MerR-Typs nachgewiesen werden (Kok, 1996). Stromaufwärts des *opp*-Operons, welches für die Komponenten des Oligopeptidtransportsystems kodiert, befindet sich ein offenes Leseraster, dessen Produkt Homologie zu einem Regulator der FNR/CRP-Familie aufweist (Kok, 1996).

Am besten untersucht ist die Regulation des Proteinasegens *prtP* aus *Lc. lactis* (Marugg et al., 1995). Hier wird die extrazelluläre Proteinase PrtP, welche für das Wachstum in Milch essentiell ist, durch den Peptidgehalt des Nährmediums reguliert. Es konnte gezeigt werden, daß insbesondere die prolinhaltigen Dipeptide Leu-Pro und Pro-Leu eine transkriptionelle Repression der *prtP*-Expression hervorrufen

Anwesenheit der entsprechenden Peptide an ein 90 bp großes, palindromisches Sequenzmotiv im Bereich (Marugg *et al.*, 1995). Dies führte zu dem Postulat, daß ein hypothetisches Regulatorprotein in des *prtP*-Transkriptionsstartpunktes binden könnte und so eine Hemmung der *prtP*-Transkription hervorruft. Der postulierte Regulator konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden. Für die beiden Peptidasegene *pepN* und *pepXP* aus *Lc. lactis* wurde ein zu *prtP* ähnliches Regulationsmuster nachgewiesen (Marugg *et al.*, 1996; Meijer *et al.*, 1997). Ob den beobachteten Effekten eine transkriptionelle Regulation der korrespondierenden Gene zugrunde liegt, wurde nicht geklärt. Die meisten Hinweise auf eine mögliche Regulation von Genen mit entsprechenden proteolytisch aktiven Genprodukten konnten in LAB im Zuge von Nukleotidsequenzanalysen dieser Gene gewonnen werden. Sowohl in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 als auch in *Lc. lactis* MG1363 wurden in der Nähe von Genen, die Genprodukten mit proteolytischer Funktion zugeordnet werden konnten, offene Leseraster identifiziert, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten zu verschiedenen bekannten Regulatorproteinen zeigen. Gesicherte Erkenntnisse über die Regulation derartiger Gene liegen allerdings aus anderen prokaryontischen Organismen vor. Beispielsweise wird die Expression von *pepD* aus *E. coli* auf transkriptioneller Ebene unter Phosphatmangelbedingungen induziert (Henrich *et al.*, 1992). Der gleiche Regulationsmechanismus konnte darüber hinaus auch für das Aminopeptidasegen *pepN* aus *E. coli* nachgewiesen werden (Gonzales und Robert-Baudouy, 1996). Die Regulation des *pepE*-Gens aus *Salmonella typhimurium* ist das bisher einzige Beispiel für eine genetische Kontrolle von Peptidasegenen durch Katabolitrepression (Gonzales und Robert-Baudouy, 1996).

### 1.2.1 Proteine mit potentiellen regulatorischen Funktionen in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290

Von den aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 sequenzierten und charakterisierten Peptidasegenen werden sowohl das Gen für eine allgemeine Aminopeptidase, *pepC* (Klein *et al.*, 1997; Weber, 1998), als auch das Proliniminopeptidasegen *pepI* (Klein *et al.*, 1994a) und das Prolidasegen *pepQ* (Stucky *et al.*, 1996) von offenen Leseraster mit potentiell regulatorischen Funktionen flankiert.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des potentiellen Regulatorgens *regU* in der Nachbarschaft des *pepC* Genes besitzt Ähnlichkeiten zur Output-Domäne von DegU aus *B. subtilis* (Weber, 1998b). Bei DegU handelt es sich um den Response-Regulator eines Zwei-Komponenten-Systems, welches in *B. subtilis* an der Regulation extrazellulärer Proteasen beteiligt ist (Tanaka und Kawata, 1988; Msadek *et al.*, 1990; Kunst *et al.*, 1994). In unmittelbarer Nähe des in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 als *regU* bezeichneten ORFs konnte ein weiteres offenes Leseraster, *regX*, identifiziert werden, dessen Funktion allerdings noch nicht geklärt ist (Weber, 1998).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des in der Nachbarschaft des *pepI*-Gens identifizierten offenen Leserasters (*pepR2*) weist signifikante Homologie zu dem negativen Transkriptionsregulator Pai1 aus *B. subtilis* auf (Klein *et al.*, 1994a). Pai1 ist ein 21 kDa großes, DNA-bindendes Protein und gehört neben AbrB, und SinR zu den sogenannten Übergangsphasenregulatoren in *B. subtilis* (Strauch und Hoch, 1993). Regulatoren dieses Typs kontrollieren den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Der bei ungünstigen Milieubedingungen ausgelöste Vorgang ist durch die Synthese von Genprodukten gekennzeichnet, die in vegetativ wachsenden Zellen nicht nachgewiesen werden

können (Strauch und Hoch, 1993). Übergangsphasenregulatoren kontrollieren die wachstumsphasenabhängige Expression einer Anzahl von Genen und verhindern somit die Synthese funktionsloser oder schädlicher Genprodukte während der aktiven Wachstumsphase. Der negative Regulator *Pai1* reprimiert während der exponentiellen Wachstumsphase die Expression degradativer Enzyme wie z.B. extrazellulärer Proteasen, der  $\alpha$ -Amylase oder der Laevansucrase sowie die Initiation der Sporulation. Seine Regulation erfolgt durch Katabolitrepression, wobei der zugrundeliegende Mechanismus allerdings nicht bekannt ist (Honjo *et al.*, 1990). Für die Ausprägung des vollständigen *pai* Phänotyps sind in *B. subtilis* zwei, in einem Operon organisierte offene Leserahmen (*pai1* und *pai2*) verantwortlich (Honjo *et al.*, 1990).

Bei heterologer Expression von *pepR2* in *E. coli* konnte eine Beeinflussung der Expression oder Aktivität von *PepI* durch das *pepR2*-Genprodukt festgestellt werden. Die nachgewiesenen *PepR2*-vermittelten Effekte wiesen dabei auf eine *PepI*-Aktivitätsvariation in Abhängigkeit von Komponenten des Nährmediums bzw. deren Metabolite hin (A. Dick, 1999). *PepR2* wurde in Band-Shift-Analysen als sequenzspezifisches, Ligand-aktiviertes DNA-Bindeprotein identifiziert. Die Zugabe des *PepI*-Substrats Pro-Pro stimulierte *in vitro* die spezifische Bindung von F-*PepR2* an ein 177 bp großes Fragment aus dem Bereich des *pepI*-Promotors (A. Dick, 1999). Northern-Blot-Analysen zeigten eine wachstumsphasenabhängige Transkription des potentiellen Regulatorgens *pepR2* in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis*. *PepR2*-spezifische Transkripte waren vornehmlich in der früh-exponentiellen Wachstumsphase detektierbar. Bei heterologer Expression von *pepR2* in *E. coli* konnte eine Beeinflussung der Expression oder Aktivität von *PepI* durch das *pepR2*-Genprodukt festgestellt werden.

Das als *pepR1* bezeichnete, potentielle Regulatorgen wurde stromaufwärts des Prolidasegens *pepQ* auf dem chromosomalen Insert des Plasmids pMS1 identifiziert (Stucky *et al.*, 1995). Das Gen *pepR1* kodiert für ein Protein von 333 Aminosäuren, was ein Molekulargewicht von 37 kDa ergibt. *PepR1* trägt an seinem N-Terminus eine für DNA-Bindeproteine typische Helix-Turn-Helix-Struktur und besitzt signifikante Homologien zu einer Vielzahl von Transkriptionsregulatoren der *LacI/GalR*-Familie (Stucky *et al.*, 1996). Die größten Homologien auf Aminosäuresequenzebene weist *PepR1* dabei zu Transkriptionsregulatoren aus der Familie der *CcpAs* (Catabolite Control Protein A) auf (44-50%), die eine wichtige Stellung bei der Katabolitrepression in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt einnehmen (Henkin *et al.*, 1991; Hueck und Hillen., 1995). Im Fall des in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in enger Nachbarschaft zu *pepQ* lokalisierten *pepR1*-Gens konnte im Zentrum der intergenen Region eine 14 bp große palindromische Sequenz identifiziert werden, die in nur einem Nukleotid von der *cre*-Konsensussequenz *CcpA*-regulierter Gene abweicht (Stucky *et al.*, 1996). Eine *cre*-Konsensussequenz wurde erstmals von Weickert und Chambliss (1990) veröffentlicht und dann von Hueck *et al.* (1994a) modifiziert. *cre*-Sequenzen wurden bisher für verschiedene Gene aus *B. subtilis* und für eine ganze Reihe anderer Gram-positiver Bakterienarten, darunter auch LAB, beschrieben (Hueck und Hillen, 1995). Es wird daher angenommen, daß sie an einen globalen Regulationsmechanismus Gram-positiver Bakterien beteiligt sind (Saier *et al.*, 1995; Hueck und Hillen, 1995).

### 1.3 Globale Kontrolle des Zuckerstoffwechsels in Bakterien

Sind Bakterien einer Mischung von Kohlenstoffquellen (C-Quellen) ausgesetzt, dann wählen sie das Substrat, welches ihnen den größten Vorteil für ihr Wachstum bringt (Gunnewijk *et al.*, 2001; Brückner und Titgemeyer, 2002). Sie haben deswegen komplizierte Mechanismen entwickelt, die sie in die Lage versetzen, die Nährstoffsituation in ihrem Habitat zu erfassen und ihre kataboles Potenzial mit Hilfe von regulatorischen Antworten, die unter den Überbegriff „Carbon Catabolite Repression“ (CCR) fallen, anzupassen. Zu den hier wohl wichtigsten Mechanismen gehören die transkriptionelle Kontrolle und der Induktor-Ausschluß („inducer exclusion“). Auf molekularer Ebene sind für die globale Kohlenstoff-Kontrolle („global carbon control“) bei Bakterien zwei sich unterscheidende Lösungswege erforscht und allgemein anerkannt. Diese wurden einerseits für die Gram-negativen Enterobakterien und andererseits für die Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt beschrieben. Beide Mechanismen machen zur Integration von auf die Kohlenstoffregulation wirkenden Signalen Gebrauch von den Komponenten des Phosphotransferasesystems (PTS) (Postma *et al.*, 1993; Saier *et al.*, 1996). Sie unterscheiden sich aber wesentlich auf der molekularen Ebene.

Bei den Enterobakterien benötigt die Übertragung von für die CCR wichtigen Signalen das PTS Protein IIA<sup>Glc</sup>, welches seinerseits die Aktivität des Katabolit-Aktivator-Proteines (Catabolite Activator Protein, CAP) steuert. Das CAP wird wiederum für die Aktivierung einer Vielzahl von unter Katabolitenkontrolle stehenden Genen (**Abb. 1.3.1-1**; Saier, 1989) benötigt. Das Enzym IIA<sup>Glc</sup> wirkt gleichzeitig auch bei der Proteinregulation über Induktor-Ausschluß („inducer exclusion“) mit.

Die zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt gehörenden Bakterien nutzen das PTS-Protein HPr zur Ausübung des Induktorausschlusses und zur Steuerung des globalen Regulators CcpA (Catabolite control protein A), der dann die Repression oder auch die Aktivierung bestimmter Sätze von Zielgenen vornimmt (**Abb. 1.3.2-1**).

Das Resultat der unterschiedlichen Wege zur Regulation des Kohlenstoffstoffwechsels ist in beiden Bakteriengruppen sehr ähnlich: Bevorzugte Aufnahme und Gebrauch der Kohlenstoffquelle, welche dem Bakterium die maximale Wachstumsrate ermöglicht.

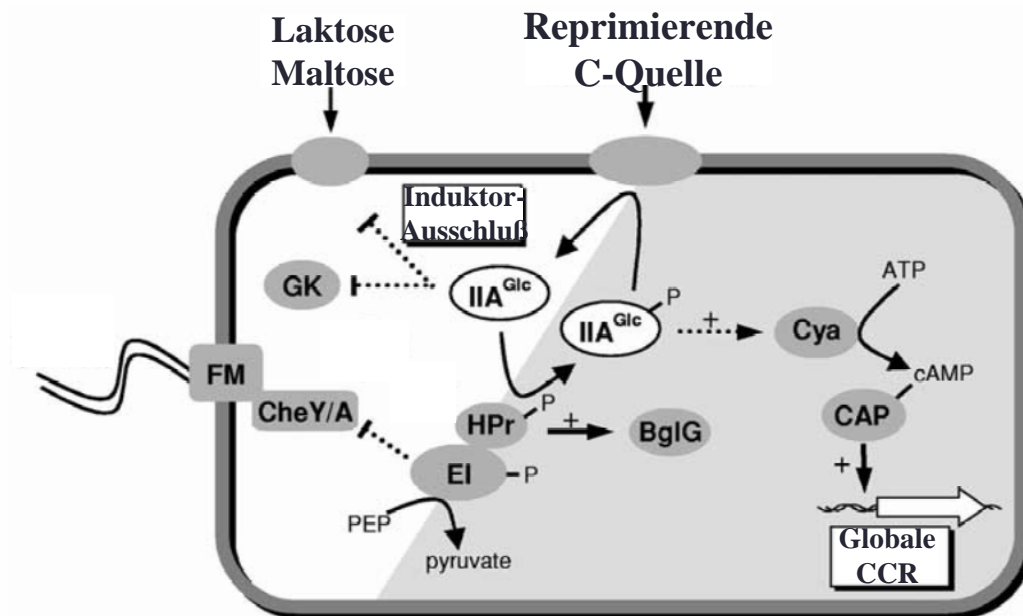
Im Folgenden soll nun die prinzipielle Natur der oben kurz umrissenen Regulationsmechanismen bei Enterobakterien und bei der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt näher erläutert und miteinander verglichen werden.

#### 1.3.1 Kontrolle des Zuckerstoffwechsels bei Enterobakterien

Bei der Kohlenstoffkataboliten-Regulation in *Escherichia coli* spielt das Glukose-spezifische Phosphotransferase-Enzym IIA<sup>Glc</sup> die zentrale Rolle. Es übermittelt ausgehend von seinem Phosphorylierungsgrad die für die Regulation notwendigen Signale zu einer Vielzahl weiterer zellulärer Ziele (**Abb. 1.3.1-1**).

Während des vom PTS vermittelten Zuckertransportes wird eine Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) über das allgemeine Phosphotransferase-Enzym I (EI) nach HPr, dann zu einem von mehr als 20 Zucker-spezifischen Enzym IIBC-Transportkomplexen und schließlich zu dem zu transportierenden Zucker übertragen (Postma *et al.*, 1993). Im Fall des Glukose-Transportes überträgt

$\text{IIA}^{\text{Glc}}$  die Phosphatgruppe zur IIB Domäne der Permease  $\text{IIBC}^{\text{Glc}}$ , die den Transport und die nachfolgende Phosphorylierung der zu transportierenden Glukose katalysiert. Werden andere PTS-Substrate in die Zelle aufgenommen, dann fließt die Phosphatgruppe zu den hierzu aktiven Transportsystemen ab. Das bedeutet, daß  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  mehrheitlich nur noch in seiner nicht-phosphorylierten Form vorliegt. Neuere Arbeiten auf dem Gebiet des Transportes von nicht-PTS-Zuckern haben gezeigt, daß der Phosphorylierungsgrad des  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  abhängig vom zellulären Energiestatus moduliert wird (Hogema *et al.*, 1998). Das Wachstum auf Laktose oder auf Glukose-6-Phosphat verändert den Phosphorylierungsgrad von  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  vermutlich durch die Beeinflussung des PEP-/Pyruvat-Verhältnisses. Deshalb reflektiert das Verhältnis von  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  zu  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$  bei allen beschriebenen Bedingungen den physiologischen Status der Zelle und führt zu einer angemessenen Übertragung der Signale für die globale zelluläre Kontrolle des Kohlenstoffmetabolismus.



**Abb. 1.3.1-1 Die Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in Gram-negativen Bakterien.** Die stark vereinfachte Darstellung zeigt die zellulären Interaktionen bei Anwesenheit einer reprimierenden C-Quelle (auf weißem Hintergrund) bzw. bei Abwesenheit eines solchen Kohlenhydrates (auf grauem Hintergrund). Aktivierende Vorgänge sind mit einem „+“, reprimierende oder inhibierende mit  $\top$  gekennzeichnet. Bei BglG handelt es sich um das Antiterminatorprotein des  $\beta$ -Glukosid-Operons, CAP steht für *Catabolite Activator Protein*, CheY/A sind an der Chemotaxis beteiligte Proteine, Cya steht für die Adenylat-Cyclase; EI für das Enzym I des Phosphotransferasesystems (PTS), FM, Flagellum-Motor; GK, Glycerin-Kinase; HPr, Histidin-beinhaltende PTS Phosphotransferase. (Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.)

### 1.3.1.1 Die transkriptionelle Kontrolle

Das Bindeglied zwischen  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  und CCR ist die Stimulation der Adenylatcyclase durch  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$  zur Produktion von cAMP (cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat), welches dem CAP als Co-Faktor für die

Aktivierung von Genen, die unter Katabolitenkontrolle stehen, dient (**Abb. 1.3.1-1**; Busby und Ebright, 1999; Brückner und Titgemeyer, 2002). Diese Vorgänge laufen üblicherweise als Antwort von substratspezifischen Repressor- oder Aktivatorproteinen auf das Vorhandensein einer spezifischen C-Quelle koordiniert in der Bakterienzelle ab.

Das CAP ist weiterhin beteiligt an der Regulation anderer zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel an der Selektivität der Sigma-Faktoren (Colland *et al.*, 2000; Ueguchi *et al.*, 2001) und an der Flagellum-Biosynthese (Soutourina *et al.*, 1999). Insgesamt, so schätzt man, beeinflusst CAP, einschließlich seines eigenen, die Transkriptionsinitiation von mehr als 100 *E. coli* Genen.

Andere pleiotrop aktive Faktoren der CR sind Cra (früher FruR genannt) und Mlc (Saier & Ramseier, 1996; Plumbridge *et al.*, 2001). Cra ist der Repressor des Fructose-PTS-Operons und der Aktivator der Schlüsselgene von Glukoneogenese, TCA-Zyklus sowie des Glyoxalat-Shunts. Seine Aktivität hängt von den zellulären Intermediaten Fruktose-1-Phosphat und Fruktose-1,6-Bisphosphat ab. Mlc trägt zur Regulation der Expression des *malt* Genes, welches für den Aktivator des Maltose-Regulons kodiert, sowie zur Kontrolle der Expression der Gene für die Glukose- und Mannose-spezifischen Permeasen bei. Darüber hinaus reguliert es in Verbindung mit Cra und cAMP-CAP die Expression des *ptsHlcr* Operons (HPr, EI, IIA<sup>Glc</sup>), was das Zusammenspiel dieser global agierenden zellulären Regulationsfaktoren von *E. coli* verdeutlicht.

### 1.3.1.2 Der Induktor-Ausschluß – „Inducer Exclusion“

Nicht-phosphoryliertes IIA<sup>Glc</sup> übt den Induktor-Ausschluß durch allosterische Inhibition von zytoplasmatischen Zielen wie der Glycerinkinase, die Glycerin-3-Phosphat generiert, oder durch Blockade von spezifischen Permeasen für die Kohlenhydrate Laktose, Maltose, Melibiose oder Raffinose (**Abb. 1.3.1-1**; Titgemeyer *et al.*, 1994; Brückner und Titgemeyer, 2002) aus. Die Wirkung von IIA<sup>Glc</sup> auf Ziele für die Inducer Exclusion ist bis ins molekulare Detail untersucht. Beispiele hierfür sind die Analyse der Kristallstruktur des Komplexes aus IIA<sup>Glc</sup> und Glycerinkinase oder die Mutationsanalyse der Interaktion von IIA<sup>Glc</sup> mit der Laktose-Permease LacY (Seok *et al.*, 1997). Die Untersuchung des *E. coli* Genomes auf Genprodukte mit einer Konsensussequenz für die Bindung von IIA<sup>Glc</sup> erbrachte zahlreiche Treffer. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß hier mehr regulatorische Quervernetzung existiert (Sondej *et al.*, 1999). Eine Wechselbeziehung zwischen der C-Quellen-Regulation und der bakteriellen Antwort auf Stress (Stressoren) zeigt sich möglicherweise an der Beteiligung von IIA<sup>Glc</sup> bei der transkriptionellen und translationellen Kontrolle des Haupt-Sigma-Faktors des Stress Regulons, RpoS (Ueguchi *et al.*, 2001).

Neben IIA<sup>Glc</sup> sind noch andere PTS-Komponenten an der Regulation des Kohlenstoffhaushaltes beteiligt (**Abb. 1.3.1-1**). Der Antiterminator BglG reguliert die Expression der Gene für die  $\beta$ -Glycosid-Verwertung. Das Protein besitzt sogenannte PTS-Regulationsdomänen („PTS Regulation Domains – PRD), die durch HPr und das entsprechende Enzym II in komplexer Art und Weise phosphoryliert werden (Stülke *et al.*, 1998; Görke und Rak, 1999). Dies koppelt die BglG-Aktivität an das Vorhandensein des Substrates für das zu regulierende Gen bzw. Genprodukt. BglG ist in Abwesenheit von  $\beta$ -Glycosiden oder in Anwesenheit bevorzugter PTS-Substrate inaktiv.

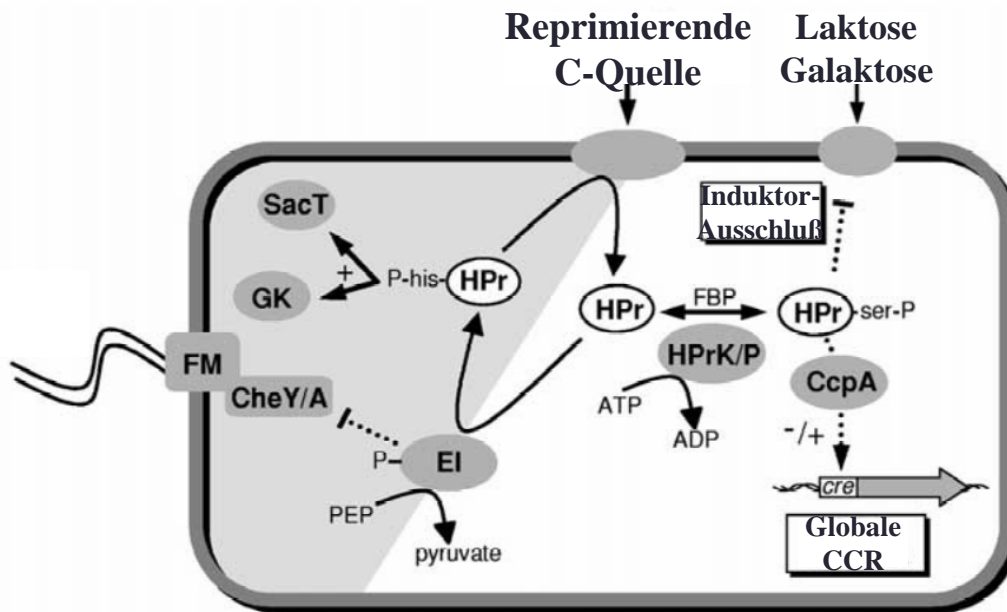
Desweiteren steuert der Phosphorylierungsgrad von HPr die Glykogen-Kinase bei der Koordination von Zuckerverbrauch und Kohlenstoffspeicherung (Seok *et al.*, 2001) und die dephosphorylierte Form von EI

hemmt die CheA-Phosphorylierung zur Unterstützung einer chemotaktischen Re-(Aktion) in Richtung auf in der Umgebung vorhandene PTS-Substrate (Lux *et al.* 1995).

### 1.3.2 Kontrolle des Kohlenstoffmetabolismus bei Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt

Eine völlig anders Kontrolle des Kohlenstoffmetabolismus haben die Gram-positiven Bakterien ausgebildet. Bei ihnen besetzen HPr, HPr-Kinase/-Phosphatase (HPrK/P) und das Catabolite Control Protein A (CcpA) die Schlüsselfunktionen beim Registrieren des physiologischen Status sowie bei der Regulation der Kohlehydrataufnahme und des -verbrauches. Das zum PTS-System gehörende Protein HPr spiegelt durch seinen Phosphorylierungsgrad den Nährstoffgehalt und die energetische Situation in der Zelle wieder. Es wird deshalb als das Gram-positive Äquivalent zu IIA<sup>Glc</sup> aus den Enterobakterien angesehen. Jedoch anders als IIA<sup>Glc</sup> wird HPr durch die Histidinprotein-Kinase/Phosphatase (HPrK/P), welche nicht in Enterobakterien zu finden ist, an einer zweiten, ausschließlich regulatorischen Stelle, dem Serin-46, phosphoryliert (Reizer *et al.*, 1998; Kravanja *et al.*, 1999). Das Gleichgewicht zwischen HPr-His~P und HPr-Ser~P wird wie in **Abb. 1.3.2-1** gezeigt und nachfolgend beschrieben, eingestellt. Die PEP-abhängige Phosphorylierung von HPr durch EI ergibt HPr-His~P, welches für den PTS-vermittelten Transport von Kohlenstoffquellen benötigt wird. Wie auch in Enterobakterien dient das PTS als Hauptaufnahmesystem für Kohlenhydrate. Dies wird verdeutlicht durch das Vorhandensein von 15 zuckerspezifischen PTS-Permeasen in *Bacillus subtilis*, neun in *Lactococcus lactis* und acht in *Streptococcus pneumoniae* (Reizer *et al.*, 1999; Bolotin *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001). Werden PTS-Substrate verstoffwechselt, so steigt die Menge an Glykolyse-Intermediaten wie zum Beispiel Fruktose-1,6-Bisphosphat an und stimuliert die Histidinprotein-Kinase/Phosphatase HPr-Ser~P zu bilden. Diese Form des aktivierten HPr-Ser~P wird für die *Carbon Catabolite Control (CCR)* benötigt. Da das HPr-Ser~P kein Substrat für das EI darstellt, wird hiermit einhergehend die Zuckeraufnahme durch das PTS-System reduziert (Deutscher *et al.*, 1994). Sobald die Menge an glycolytischen Intermediaten fällt und der Gehalt an anorganischem Phosphat ansteigt, beginnt das bi-funktionelle Enzym HPr-Kinase/-Phosphatase (HPrK/P) die umgekehrte Reaktion zu katalysieren. Es dephosphoryliert nun HPr-Ser~P zu HPr-Ser, was dann wieder zu einem gesteigerten PTS-abhängigen Transport führt (Kravanja *et al.*, 1999). Da der metabolische Status der Zelle das bestimmende Signal für die Art der HPr-Phosphorylierung ist, wird schnell deutlich, wie auch nicht zu den PTS-Zuckern gehörende Kohlenhydrate das Verhältnis von HPr-His~P zu HPr-Ser~P beeinflussen. HPr seinerseits spielt abhängig von seiner Phosphorylierung die Hauptrolle in der zellulären transkriptionellen Kontrolle der an der Aufnahme und am Kohlenhydrat-Stoffwechsel beteiligten Komponenten. Neben dem PTS-vermittelten Transport steuert HPr-His~P die Aktivität der Glycerin-Kinase durch Phosphorylierung des Enzymes und koordiniert somit die Nutzung von Glycerin mit der Verwertung anderer C-Quellen (**Abb. 1.3.2-1**; Charrier *et al.*, 1997). Darüber hinaus kontrolliert HPr-His~P weitere spezifische Aktivator- und Antiterminator-Proteine auf eine wie vorne für BglG von *E. coli* beschriebene Art und Weise (Stülke *et al.*, 1998). Bei den angesprochenen Proteinen handelt es sich um GlcT aus *B. subtilis*, den Regulator für das *ptsGHI* Operon, welches die Gene für das Glukose-spezifische Enzym II (*ptsG*), für HPr (*ptsH*) und für das Enzym I (*ptsI*) beinhaltet sowie um SacT, den Regulator des Sucrose-PTS (Stülke und Hillen, 2000).





**Abb. 1.3.2-1 Modell der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien.** Das Bild zeigt die zellulären Interaktionen bei Anwesenheit einer reprimierenden C-Quelle (auf weißem Hintergrund) bzw. bei Abwesenheit eines solchen Kohlenhydrates (auf grauem Hintergrund). Aktivierende Vorgänge sind mit einem „+“, reprimierende oder inhibierende mit  $\top$  gekennzeichnet. Der Phosphorylierungszustand des HPr ist hervorgehoben, Phosphorylierungsereignisse sind als durchgezogene geschwungene Pfeile, andere Interaktionen als gestrichelte Linien dargestellt. CcpA steht für *Catabolite control protein A*, CheY/A sind an der Chemotaxis beteiligte Proteine, *cre* ist die Abkürzung für *catabolic responsive element*, EI steht für das Enzym I des Phosphotransferasesystems (PTS); FM, Flagellum-Motor; FBP, Fruktose-1,6-bisphosphat; GK, Glycerin-Kinase; HPr, Histidin beinhaltende PTS Phosphotransferase. SacT ist das Antiterminatorprotein des Sucrose Operons. (Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.)

### 1.3.2.1 Transkriptionelle Kontrolle durch CcpA

Bei HPr-Ser~P handelt es sich um den Co-Repressor für den Transkriptionsregulator CcpA, welcher eine globale transkriptionelle Kontrolle in Gram-positiven Bakterien ausübt. CcpA wurde ursprünglich als das Protein entdeckt, welches die Glukose-Repression des *amyE* Genes von *B. subtilis* durch Bindung an seine *cis*-aktive Operatorsequenz, die den Namen *catabolite responsive element (cre)* erhielt, steuert (Henkin *et al.*, 1991; Hueck *et al.*, 1995; Miwa *et al.*, 2000). Nachfolgende Studien ergaben, daß CcpA eine allgemeine Funktion bei der CCR von Kataboliten-kontrollierten Genen, die für die Verwertung der Zucker Gluconat, Xylose oder der Aminosäure Histidin notwendig sind, besitzt. Interessanterweise variiert die Position der *cre*-Operatoren in Bezug auf die Promotoren der untersuchten Gene und Operons, was auf unterschiedliche Auswirkungen der transkriptionellen Kontrolle durch CcpA hindeutet. Das *cre* des *amyE* Genes liegt innerhalb der Promotorregion und deshalb verhindert bindendes CcpA hier die Transkriptionsinitiation. Die *catabolite responsive elements (cre)* des *hut* Operons liegen innerhalb der kodierenden Sequenz, wo sie eine Sperre („Roadblock“) für die Transkription verursachen (Wray *et al.*, 1994). Einige Gene, wie die des Gluconat Operons (*gnt*) von *B. subtilis* oder die des Xylose Operons (*xyl*) von *Bacillus megaterium* beinhalten mehrere *cre* Boxen, von denen angenommen wurde, daß sie in

Abhängigkeit von den Umweltbedingungen synergistisch zur CCR beitragen (Gösseringer *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1997).

Organismus	CcpA (AS)	Ziel-Enzym(e) bzw. Operon	Repression	Aktivierung	Referenz / Protein Genbank-Eintrag
<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>1</sup>	333	Galaktose Operon Laktat-Dehydrogenase Glc-, „Starvation“ Gene	+	+	Leboeuf <i>et al.</i> (2000a, b) / g3676165
<i>Lactobacillus casei</i>	333	Phospho- $\beta$ -Galaktosidase Laktose Operon Sorbose Operon	+		Monedero <i>et al.</i> (1997) / g2668503 Gosalbes <i>et al.</i> (1999) Yebra <i>et al.</i> (2000)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	336	Xylose Operon $\beta$ -Galaktosidase $\beta$ -Glucosidase	+		Lokman <i>et al.</i> (1997) / g5823363 Mahr <i>et al.</i> (2000) Chaillou <i>et al.</i> (2001)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	336	Phospho- $\beta$ -Glucosidase $\beta$ -Galaktosidase	+		Marasco <i>et al.</i> (1998) Muscarello <i>et al.</i> (2001) / g14331034
<i>Lactobacillus delbrückii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> (PepR1)	333	<i>pepQ</i>		+	Morel <i>et al.</i> (1999, 2001) / g7209172
<i>Lactobacillus delbrückii</i> <i>subsp. lactis</i> (PepR1)	333	<i>pepQ</i> weitere Peptidasegene (?) Laktose Operon (?)	? ? ?	+ (?) ? ?	Stucky <i>et al.</i> (1996) / g3024388 diese Arbeit diese Arbeit
<i>Lactococcus lactis</i>	332	Galaktose Operon Las Operon (glykol. Gene)	+	+	Luesink <i>et al.</i> (1998) / g4165285
<i>Streptococcus mutans</i> <sup>2</sup> (RegM)	333	$\alpha$ -Galaktosidase Phospho- $\beta$ -Galaktosidase Mannitol-1-P-Dehydrog.		+	Simpson und Russell (1998) / g2323342
<i>Streptococcus thermoph.</i>	333	Laktose Operon Laktat-Dehydrogenase	+	+	van den Bogaard <i>et al.</i> (2000) / g7341263
<i>Staphylococcus xylosus</i>	329	Xylose operon Sucrose Operon Laktose Operon $\alpha$ -Glucosidase	+		Egeter und Brückner (1996) / g1177685

**Tab. 1.3.2.1-1 CcpA und CcpA-homologe Proteine aus Milchsäurebakterien.** Die Tabelle zeigt alle CcpA und CcpA-ähnlichen (potentieller) Transkriptionsregulatoren aus LAB, die genetisch und biochemisch näher charakterisiert sind. Die zweite Spalte von links gibt die Länge der Polypeptidkette des CcpA-Monomers an.

Pluszeichen (+) sind, je nachdem ob eine Aktivierung oder eine Repression der unter CcpA-Kontrolle stehenden Gene vorlag, in der jeweiligen Spalte angegeben. <sup>1</sup> Bei den hier angeführten *E. faecalis* Resultaten handelt es sich nur um die bezüglich ihrer CcpA-abhängigen Regulation am besten untersuchten Gene und Enzyme, eine Proteomanalyse offenbarte zusätzlich eine Anzahl weiterer Kandidaten. <sup>2</sup> Die Analysen an den für *S. mutans* untersuchten Enzymen, ließen ihre CcpA-vermittelte Aktivierung erkennen. Diese Resultate stehen im Gegensatz mit der sonst für die am Katabolismus beteiligten Enzyme ermittelte Repression. Deshalb wurde geschlossen, daß RegM gleichwohl eine Rolle bei der CCR dieses Stammes besitzt, aber nicht sein CcpA darstellt. Die CcpA-abhängige Regulation der bei der Eingruppierung mit einem Fragezeichen versehenen Zielgene bzw. -Enzyme ist noch unklar und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

CcpA kann auch als Aktivator der Transkription wirken. Beispiele hierfür sind Gene der Glykolyse wie die Phosphofruktokinase, die an der Assimilation von Ammonium beteiligte Glutamat-Synthetase oder die dem Stoffwechsel von Speicherstoffen zuzurechnende Acetat-Kinase (*ackA*) (Henkin, 1996; Faires *et al.*, 1999; Tobisch *et al.*, 1999). Der Mechanismus der CcpA-vermittelten Aktivierung von Genen ist, bedingt durch die Tatsache daß in einigen Fällen keine *cre*-Boxen vorhanden sind, weniger gut beschrieben. Dennoch konnte gezeigt werden, daß *cre*-Operatoren entscheidend sind für die Aktivierung der an der Acetatproduktion beteiligten Gene *ackA* und *pta* (Phosphotransacetylase) (Turinsky *et al.*, 1998; Presecan-Siedel *et al.*, 1999). Zur Aktivierung von *pta* wird zusätzlich zum CcpA/HPr-Ser~P Komplex noch der Co-Faktor Fructose-1,6-Bisphosphat benötigt. Da die *cre*-Boxen in diesem Fall stromaufwärts vom Promotor des Genes lokalisiert sind, scheint es, daß die Bindung von CcpA an seine spezifischen Operatoren den RNA-Polymerase-Promotor-Komplex stabilisiert. Eine weiterer auffälliger bei *ccpA*-Mutanten von *Bacillus*, *Staphylococcus* und verschiedenen Milchsäurebakterien festgestellter Phänotyp ist ihre verringerte Wachstumsrate. Diese Tatsache wird in *B. subtilis* dem Ausbleiben der Aktivierung der Glutamat-Synthetase (*gltAB*) zugerechnet, was dann zu einer ineffizienten Assimilation von Stickstoffverbindungen führt (Faires *et al.*, 1999). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß auch der Ausfall der CcpA-abhängigen Aktivierung von glykolytischen Genen, was für das *gap* Operon von *B. subtilis* und für das *las* Operon von *Lactococcus lactis* gezeigt werden konnte, zu diesem Phänotyp beiträgt (Ludwig *et al.*, 2001; Luesink *et al.*, 1998).

Die pleiotrope Rolle von CcpA wurde auch durch die Analyse des Proteoms von *B. megaterium* gezeigt (Küster-Schöck *et al.*, 1999; Tobisch *et al.*, 1999). Unter 1500 auf 2-D-Gelen sichtbaren Proteinen waren 39 CcpA-vermittelt reprimiert, 4 waren aktiviert. Eine ähnliche Analyse, die am Proteom einer *Enterococcus faecalis* *ccpA*-Mutante vorgenommen wurde, erbrachte 16 überexprimierte und sechs reprimierte Polypeptide (Leboeuf *et al.*, 2000a, b). Die Funktion des CcpA in der Glucose-abhängigen Repression und Aktivierung wurde durch Transkriptomanalyse in *B. subtilis* näher beleuchtet (Moreno *et al.* 2001). Ungefähr 300 der Gene dieses Organismus wurden durch CcpA in direkter oder indirekter Weise mehr als 3-fach reguliert. 75% dieser Gene wurden hierbei reprimiert. In einer hierzu vergleichbaren Studie wurde nur eine wesentlich kleinere Zahl von CcpA-regulierten Genen gefunden (Yoshida *et al.*, 2001). Dieser Unterschied könnte durch die Anwendung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen und eines stringenteren Regulationsfaktors von 5 als Untergrenze zur Identifikation potentiell durch CcpA regulierter Gene zustande gekommen sein. Bei einer Suche innerhalb des Genoms von *B. subtilis* konnten 126 *cre*-Operatoren gefunden werden (Miwa *et al.*, 2000). *In vivo* Untersuchungen an einer repräsentativen Gruppe dieser potentiellen Operatoren zeigten, daß mindestens 2/3 von ihnen physiologisch relevant sind. Zusammengefasst ist die Schlüsselfunktion von CcpA bei der CCR durch Proteom- und Transkriptomanalyse deutlich gezeigt. Bis 1995 war unklar, wie CcpA die

Signale für die C-Regulation erhält. Die *in vivo* Analyse einer Mutation in *ptsH*, bei der die regulatorisch relevante Aminosäure Serin gegen Alanin ausgetauscht wurde, zeigte die Beeinträchtigung der CCR verschiedener kataboler Systeme. Dies wies auf eine Beziehung zwischen HPr und CCR hin (Deutscher *et al.*, 1994). Nachfolgende *in vitro* Studien bewiesen dann die Interaktion zwischen HPr-Ser~P mit CcpA und zeigten, daß der Komplex von CcpA mit HPr-Ser~P für eine effiziente Bindung an *cre* Boxen benötigt wird (Küster-Schöck *et al.* 1999). Eine NMR-Studie konnte zeigen, daß zwei HPr-Monomere an das CcpA-Dimer binden (Jones *et al.*, 1997). Desweiteren konnten die Aminosäurenreste des HPr, die an der Interaktion mit CcpA beteiligt sind, bestimmt werden. Diese befinden sich nahe der Oberfläche des Moleküls in der Nachbarschaft der als Phosphorylierungsstellen dienenden Aminosäuren Histidin-15 und Serin-46. Neben HPr-Ser~P könnten noch andere Effektoren für die spezifische Bindung von CcpA physiologisch relevant sein. In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass die Zugabe von NADP und Glucose-6-Phosphat die Bindung von CcpA an verschiedene *cre*-Zielsequenzen verstärkt (Gösseringer *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). In *B. subtilis* fand man ein HPr-paralogenes Protein, welches Crh (Catabolite repression HPr-like protein) genannt wurde (Galinié *et al.*, 1997). Dieses Crh besitzt nur die Serin-46-Phosphorylierungsstelle, ihm fehlt das Histidin-15. Zusätzlich zu HPr leistet Crh einen Beitrag zu dem von der Serinphosphorylierung abhängigen Signalübertragungsweg. Es scheint, daß das Vorkommen von Crh sich auf die Gattung *Bacillus* beschränkt. Das entsprechende Gen konnte in den Genomen von *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* und *Lactococcus lactis* nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich zu CcpA sind noch die Proteine CcpB, CcpC, AbrK und GerE an der Kohlenstoffregulation beteiligt. Jedoch scheinen sie nur einen auf bestimmte Wachstumsbedingungen beschränkten Beitrag zur globalen zellulären Katabolitenkontrolle zu leisten (Fisher *et al.*, 1994; Chauvaux *et al.*, 1998; Jourlin-Castelli *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2001). Ihr präziser Beitrag muß erst noch weiter erforscht werden.

### 1.3.3 Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus in Milchsäurebakterien

Obwohl die Mehrheit der Erkenntnisse zur Kohlenstoffkatabolitenregulation von Untersuchungen aus *Bacillus* stammt, werden in letzter Zeit immer mehr Daten aus Milchsäurebakterien publiziert. Sie unterstreichen die Bedeutung, die das gewonnene Wissen zur C-Regulation für die Aufklärung der bestmöglichen Nährstoffzusammensetzung bei den Fermentationsprozessen der Milchwirtschaft und anderer Industrien, die fermentierte Produkte herstellen, haben könnte.

Seit 1996 wurden Gene, die für CcpA und CcpA-ähnliche Proteine kodieren, für eine Vielzahl von zu den Milchsäurebakterien zählenden Organismen beschrieben (**Tab. 1.3.2.1-1**). Mutationen in diesen *ccpA*-Genen ließen Phänotypen erkennen, die ähnlich denen waren, die bereits aus anderen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt bekannt waren. Die Xylose-Verwertung bei *Lactobacillus pentosus* und die Galaktose-Verwertung bei *Lactococcus lactis* werden durch CcpA-vermittelte Glukoserepression kontrolliert (Lokman *et al.*, 1997; Luesink *et al.*, 1998). Weiterhin konnte eine CcpA-abhängige Genaktivierung für das glykolytische *las* Operon von *Lc. lactis* bewiesen werden (Luesink *et al.*, 1998). Genau wie für *Bacillus* wurde auch für verschiedene LAB eine stark verminderte Wachstumsrate bei *ccpA* knock-out Mutanten nachgewiesen (Monedero *et al.*, 1997; Luesink *et al.*, 1998; Leboeuf *et al.*, 2000b). Die Lokalisation der *ccpA*-Gene in den Genomen der Milchsäurebakterien ist ausnahmslos in der

Nachbarschaft des *pepQ* Genes, welches für die Prolidase PepQ kodiert. Beide Gene sind so angeordnet, daß sie divergierend transkribiert werden und eine gemeinsame intergene Promotorregion aufweisen (Mahr *et al.*, 2000). Andere zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalt gehörende Bakterien weisen diese spezielle Organisation nicht auf. Northern Blot Analysen lassen darauf schließen, daß *ccpA* als monocistronische mRNA transkribiert wird und daß seine Expression höchstwahrscheinlich vermittelt durch CcpA-Bindung an das in der *ccpA*-Promotorregion lokalisierte *cre* autoreguliert wird (Monedero *et al.*, 1997; Luesink *et al.*, 1998; Simpson und Russell, 1998; Mahr *et al.*, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000a; Morel *et al.*, 2001).

Die Entdeckung von *ptsK* oder auch *hprK*, dem Gen für die HPr-Kinase/-Phosphatase aus *B. subtilis* wurde 1998 beschrieben. Sie wurde gefolgt von den Berichten über die Klonierung von *hprK* aus verschiedenen LAB, wie zum Beispiel *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus brevis* (Kravanja *et al.*, 1999; Brochu und Vadeboncoeur, 1999; Dossonnet *et al.*, 2000; Djordjevic *et al.*, 2001). Dies verdeutlicht das generelle Vorkommen dieses Genes in Milchsäurebakterien. Die Kinaseaktivität von HPrK/P wird durch ein hohes ATP-Niveau stimuliert und durch einen hohen zellulären Gehalt an anorganischem Phosphat inhibiert. Im Gegensatz hierzu ist ein niedriges ATP-Niveau bei *B. subtilis* nicht ausreichend, um HPrK/P auf Phosphataseaktivität umzuschalten. Die Stimulation der Kinase-Reaktion von HPrK/P durch das glykolytische Intermediat Fruktose-1,6-Bisphosphat wurde für *B. subtilis* und *Lb. casei* berichtet, während bei *E. faecalis* and *S. salivarius* dieser Effekt nicht sichtbar war (Reizer *et al.*, 1998; Kravanja *et al.*, 1999; Brochu und Vadeboncoeur, 1999; Dossonnet *et al.*, 2000). Faßt man die oben dargelegten Erkenntnisse zusammen, so läßt sich sagen, daß das Vorkommen und die Wirkungsweise von HPrK/P als bi-funktionelle Histidin-Protein-Kinase/Phosphatase trotz kleiner speziesspezifischer Abweichungen bei der Stimulation und Inhibition gut konserviert ist.

### 1.3.4 Zuckerstoffwechsel-Regulation in LAB

Eine der bezüglich der zuckerspezifischen Regulation am besten untersuchten Spezies ist *Lactobacillus casei* ATCC393. Bei der Charakterisierung von CcpA, EI und Hpr Mutanten dieses Stammes konnte durch *in vivo* Analyse gezeigt werden, daß die Enzyme *N*-Acetylglucosaminidase und Phospho- $\beta$ -Galaktosidase unter CcpA-abhängiger CCR durch verschiedene Zuckerquellen stehen (Monedero *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2000). Das *lacTEGF* Operons kodiert den Antiterminator LacT, die Lactose-PTS-Permease LacE (IICB<sup>Lac</sup>), LacF (IIA<sup>Lac</sup>), und die Phospho- $\beta$ -Galaktosidase LacG. Die Deletion der in der Promotorregion des Operons identifizierten *cre*-Sequenz oder die Mutation von *ccpA* führten dazu, daß eine Fusion aus dem *lac*-Promotor mit dem promotorlosen *gusA* Gen nicht mehr der CCR unterlag (Monedero *et al.*, 1997). In weiteren Mutationsanalysen konnte bewiesen werden, daß LacT bei Verfügbarkeit von Laktose für die Induktion des *lac* Operons durch Antitermination benötigt wird (Gosalbes *et al.*, 1999). LacT gehört zur Klasse der PRD-Regulatoren (Antiterminatoren) und steht selbst durch Phosphorylierung an den Histidin-Resten seiner beiden PRD-Domänen unter der Kontrolle der allgemeinen PTS-Elemente sowie des IICB<sup>Lac</sup>/IIA<sup>Lac</sup>-Permeasekomplexes (Gosalbes *et al.*, 2002). Das der Nutzbarmachung der Sorbose dienende *sor* Operon wird ebenfalls durch CcpA reguliert (Yebra *et al.*, 2000). Die Glukose-vermittelte Repression dieses Systems hängt von CcpA aber auch von PTS-

Komponenten einschließlich der Mannose/Glukose-spezifischen Enzym II Permease ab. Dies läßt die Vermutung zu, daß der PTS-abhängige Glukosetransport für den Signalübertragungsweg zum CcpA benötigt wird. Stämme mit chromosomaler Mutation im *ptsH* (Serin46 → Alanin) zeigen ein verringertes diauxisches Wachstumsverhalten in Medien mit Glukose und einem zweiten Zucker (Laktose, Maltose oder Ribose) (Viana *et al.*, 2000). Alle vorab angeführten experimentellen Resultate lassen den Schluß zu, dass die CCR auch in Milchsäurebakterien über den CcpA/HPr-Ser~P-Komplex funktioniert. Diese Schlußfolgerung wurde *in vitro* mit den aufgereinigten beteiligten Komponenten bestätigt, da „Surface Plasmon Resonance“ Experimente zeigen konnten, daß nur HPr-Ser~P, nicht aber HPr-His~P, CcpA bindet. (Mahr *et al.*, 2002). Die Bindung dieses Komplexes wiederum an das *cre* des *Lb. casei lac* Operons wurde durch Gel-Shif-Assays gezeigt. Die Funktion des *cre* von *bgIH*, für eine Phospho- $\beta$ -Glukosidase kodierend, wurde durch einen direkteren Untersuchungsansatz demonstriert. Die Resultate von *in vivo* Footprint-Experimenten zeigten, daß zwei Nukleotide durch Bindung von HPr-Ser~P-CcpA beim Wachstum in Medium mit Glukose als C-Quelle vor dem Abbau geschützt waren (Marasco *et al.*, 1998).

Eine weitere im Bezug auf CcpA-kontrollierte Genexpression gut untersuchte *Lactobacillus* Spezies ist *Lactobacillus plantarum*. Diese heterofermentative Spezies wird bei der Fermentation von Gurken, Oliven und Sauerkraut eingesetzt. Die Klonierung und Analyse ihres *ccpA*-Genes haben gezeigt, daß dieses Gen, welches über einen Tandem-Promotor verfügt, der einen *cre*-Operator einschließt, autoreguliert wird (Mahr *et al.*, 2000). Die Regulation von Zuckerverwertungsgenen konnte bei diesem Organismus anhand der CcpA-vermittelten Repression von Operons und Genen veranschaulicht werden. Das *xylAB* Operon, welches die Gene für die Xylose-Isomerase und die Xylulose-Kinase beinhaltet (Lokman *et al.*, 1997), sowie die Enzyme  $\beta$ -Glucosidase und  $\beta$ -Galaktosidase, die durch Cellobiose beziehungsweise Laktose induziert werden, stellen Beispiele für eine CcpA-abhängige Repression dar (Chaillou *et al.*, 2001). Die Zugabe der Zucker Glukose, Mannose oder Fruktose, die durch ein Glukose/Mannose/N-Acetylglucosamin-spezifisches Enzym II<sup>Man</sup> oder durch ein Fruktose-spezifisches Enzym II transportiert werden, wirkt über die Vermittlungsstelle CcpA repressiv auf die Expression der genannten Gene. Der Aspekt der CcpA/HPr-Ser~P-abhängigen Regulation der Kohlenstoff-Kataboliten-Repression ist auch in *Lactococcus lactis* zu finden (Luesink *et al.*, 1998). Die *ccpA*-Mutante zeigte sich der im Wildtypstamm vorhandenen Glukose-abgängigen Repression des Galaktose-Operons gegenüber unempfindlich. Eine mutmaßliche *cre*-Sequenz wurde exakt am Start der *gal*-mRNA (Transkriptionsstart) im Promotor des Operons gefunden. Die Beteiligung von HPr-Ser~P am Regulationsgeschehen in *Lc. lactis* wurde durch Mutationsanalysen deutlich (Luesink *et al.*, 1999). Der Vergleich der Mutationen HPr-S46D mit HPrS46A zeigte, daß das Wachstum der Zellen in Medium mit Galaktose bei HPr-S46D deutlich beeinträchtigt war, während der Aminosäureaustausch bei HPrS46A keinen Effekt auf die Galaktose-Fermentation hatte. Da nur HPr-S46D, nicht aber HPrS46A, als Imitat von HPr-Ser~P gelten kann, stehen diese Ergebnisse im Einklang mit dem Konzept der CcpA/HPr-Ser~P-vermittelten Regulation. In *Lc. lactis* wurde desweiteren auch die CcpA-abhängige Aktivierung von Genen aufgezeigt (Luesink *et al.*, 1998, 1999). Wachsen *Lactococcus*-Zellen mit der als C-Quelle bevorzugten Glukose, dann konnten entsprechend erhöhte Aktivitäten von drei Schlüsselenzymen der Glykolyse bestimmt werden. Bei diesen Enzymen handelt es sich um die Phosphofruktokinase (Pfk), die Pyruvatkinase (Pyk) und um die L-Laktat-Dehydrogenase (L-Ldh). Die Gene dieser drei Enzyme bilden in *Lc. lactis* das tri-cistronische *las*-Operon. Eine *ccpA*-Mutante von *Lc. lactis* zeigte in Northern-Analysen eine verminderte Transkriptionsrate der drei Gene. Da unmittelbar stromaufwärts des *las*-Promotors ein *cre*

identifiziert wurde, liegt der Schluß nahe, daß die Aktivierung des Operons über das Zusammenwirken der Komponenten CcpA und HPr-Ser~P erfolgt. Demgegenüber führte die Deletion des für das HPr kodierenden *ptsH*-Genes nur zu einer 30%igen Reduktion der Aktivitäten der oben beschriebenen Enzyme, was andeutet, das auch noch andere Effektoren von CcpA in die Aktivierung des *las*-Operons einzugreifen scheinen. Zusammengenommen zeigen diese Daten, daß die CcpA-vermittelte Repression und Aktivierung von Genen Bestandteil der C-Quellen-Regulation in *Lc. lactis* ist. Die physiologische Funktion der Glukose-abhängigen Aktivierung von Genen kann durch das Postulat einer Anpassungsreaktion erklärt werden, die dazu dient, den zellulären Metabolismus bestmöglich an den jeweils verstoffwechselten Zucker anzupassen. Darüber hinaus könnte die Aktivierung des *las*-Operons einen Mechanismus darstellen, der die Akkumulation von für die Zellen schädlichen Stoffwechselendprodukten verhindert. Die Expression der im *las*-Operon zusammengefaßten Gene sorgt verstärkt für glykolytische Enzyme, die Glykolyseendprodukte bilden, die entweder die Zelle leicht verlassen oder leicht exportiert werden können (Luesink *et al.*, 1998).

Einige spezielle Eigenschaften für die Funktion seiner CCR weist *Streptococcus thermophilus* auf, ein Bakterium, das in Starterkulturen für die Joghurt- und Mozzarella-Herstellung zu finden ist, auf. Im Kontrast zu den meisten anderen Milchsäurebakterien zieht dieser Organismus die Verwertung von Laktose der Nutzung von Glukose vor und benutzt Nicht-PTS-Transporter für die Aufnahme dieser Zucker. Die Aufnahme des Milchzuckers Laktose erfolgt durch die Permease LacS entweder über Laktose-/H<sup>+</sup>-Symport oder über Laktose-/Galaktose-Antiport (Gunnewijk *et al.*, 2001). Für den zweitgenannten der beiden Wege konnte gezeigt werden, daß der Glukoseanteil der Laktose für das Wachstum der Zelle genutzt, während der Galaktoserest wieder ausgeschleust wird. Das Wachstum auf Laktose löst bei *S. thermophilus*, vergleichbar zu *Lc. lactis*, eine CcpA-vermittelte Regulation aus, was an der Aktivierung des an die glykolytischen Abläufe gekoppelten Genes für die Laktat-Dehydrogenase nachgewiesen werden konnte. Anders als in *Lc. lactis* bildet das Gen für die Ldh von *S. thermophilus* kein Operon mit den Genen für die Phosphofruktokinase und die Pyruvat-Kinase (van den Bogaard *et al.*, 2000). Dieser Aspekt betont die Tatsache, daß ein nicht durch das PTS-System transportierter Zucker ebenfalls Signal für die durch CcpA integrierte Regulation sein kann. CcpA ist desweiteren auch an der transkriptionellen Kontrolle von LacS beteiligt. Die vermutlich durch CcpA/HPr-Ser~P gesteuerte Repression von *lacS* führt zu einer Reduktion der möglichen Überkapazität des Laktose-Aufnahmesystemes und paßt die Aufnahmerate somit an die für ein optimales Zellwachstum maßgeblichen Raten der glykolytischen Enzyme an (Gunnewijk & Poolman, 2000; van den Bogaard *et al.*, 2000). Zusätzlich hierzu wird die Transport-Aktivität von LacS noch durch seine IIA<sup>Glc</sup>-ähnliche am C-Terminus der Polypeptidkette lokalisierte Domäne, die durch HPr-His~P phosphoryliert wird, auf Proteinebene reguliert (Gunnewijk *et al.*, 2001). Diese Phosphorylierung verbessert die Transportleistung von LacS durch eine Erhöhung der maximalen Geschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) des Laktose/Galaktose-Antiportes. Basierend auf der Erkenntnis, daß das Verhältnis von HPr-Ser~P zu HPr-His~P in der stationären Wachstumsphase zugunsten von mehr HPr-His~P verschoben wird, kann man schließen, daß unter den genannten Bedingungen die höhere LacS-Aktivität die geringer gewordene oder werdende Laktosekonzentration kompensiert. Diese sehr facettenreiche Regulation der Laktoseverwertung durch LacS in *S. thermophilus*, welche die Autoregulation von *lacS* und LacS sowohl auf der Ebene des Genes als auch auf Proteinebene beinhaltet, illustriert, wie Bakterienzellen eine fein abgestimmte Kontrolle bei ihren Kohlenstoffverwertungsmechanismen erreichen können (Gunnewijk *et al.*, 2001).

### 1.3.4.1 Durch CcpA vermittelte Kohlenstoff-Kataboliten-Regulation in *Staphylococcus xylosus*

*S. xylosus* ist neben *B. subtilis* (Henkin *et al.*, 1991) und *B. megaterium* (Hueck *et al.*, 1995) das im Bezug auf die Rolle des CcpA bestuntersuchte AT-reiche Gram-positive Bakterium. Aus diesem Stamm liegen molekulare Daten für die Regulation von Genen bei der Verwertung von Xylose (Sizemore *et al.*, 1991; Sizemore *et al.*, 1992), Sucrose (Brückner *et al.*, 1993; Gering und Brückner, 1996; Wagner *et al.*, 1995), Laktose (Bassias und Brückner, 1998) und Maltose (Egeter und Brückner, 1995) vor. Für die Sucrose- und die Laktoseverwertung sind die spaltenden Enzyme und die Transportproteine kloniert und charakterisiert, während Informationen über den Xylose- oder den Maltose-Transporter noch fehlen. Die Expression der zur Verwertung von Xylose, Sucrose und Laktose notwendigen Gene wird durch die Anwesenheit des entsprechenden Zuckers induziert. Zusätzlich hierzu unterliegen diese Gene der globalen CcpA-vermittelten Repression. Demgegenüber wird das für die Spaltung der Maltose notwendige Enzym  $\alpha$ -Glukosidase nicht durch Maltose induziert, steht aber unter Kontrolle des CcpA. In den Promotorregionen der oben genannten Gene befinden sich die CcpA-spezifischen *cre* Operatoren. Die funktionelle Signifikanz von zwei dieser *cre* aus dem *xyl*- und dem *mal*-System konnte durch Deletionsanalyse gezeigt werden (Egeter und Brückner, 1996; Hueck *et al.*, 1994b). Die verbliebenen Operatoren vermittelten die CcpA-abhängige Repression eines konstitutiven Promotors (Jankovic *et al.*, 2001), was ihr regulatives Potential deutlich macht. Neben der Regulation der Gene, die für die Enzyme der Zuckerverwertung kodieren, konnte auch gezeigt, daß das *ccpA*-Gen selbst durch CcpA reguliert wird (Egeter und Brückner, 1996). Die Transkription des *ccpA* Genes geht von zwei Promotoren aus, von denen einer in Anwesenheit von Glukose reprimiert ist. Die Menge an CcpA-Protein ist unter diesen Bedingungen ungefähr zweifach reduziert. Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität einer transkriptionellen Fusion beider *ccpA*-Promotoren mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen in einer entsprechenden *S. xylosus* Mutante bestätigte diese zweifache Repression des CcpA in Anwesenheit von Glukose (Jankovic *et al.*, 2001). Zusätzlich hierzu war die Aktivität des *ccpA*-Promotors in einer *ccpA* knock-out Mutante in Abwesenheit von Glukose ungefähr um den Faktor drei erhöht, was auf eine negative Autoregulation am *ccpA*-Promotor hindeutet. Interessanterweise handelt es sich bei dieser negativen Autoregulation des *ccpA* nicht um ein in allen Gram-positiven Organismen vorkommendes Phänomen. Sie konnte neben *S. xylosus* noch in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (Morel *et al.*, 2001) und in *Lactobacillus pentosus* (Mahr *et al.*, 2000) gezeigt werden, während die *ccpA*-Expression in den *Bacilli* (Miwa *et al.*, 1994; Hueck *et al.*, 1995) sowie in *Lactobacillus casei* (Monedero *et al.*, 1997) und in *Lactococcus lactis* (Luesink *et al.*, 1998) konstitutiv zu sein scheint.

Die Aktivierung von Genen durch CcpA, die bei *B. subtilis* (Grundy *et al.*, 1993) und *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1998) aufgezeigt wurde, konnte bisher in *S. xylosus* nicht gezeigt werden.

Da die Katabolitenregulation der oben erwähnten Zuckerverwertungssystem nicht allein auf dem CcpA basiert (Bassias und Brückner, 1998) wurden Promotoren konstruiert, die ausschließlich durch CcpA kontrolliert werden. Die Analyse der CcpA-vermittelten Regulation verschiedener Gene erfolgte durch die Insertion ihrer *cre* Operatoren an die Positionen +2 oder +3 downstream des Transkriptionsstarts eines konstitutiv exprimierten Promotors, der im Genom von *S. xylosus* vor das promotorlose  $\beta$ -Galaktosidasegen plaziert wurde und dessen jeweilige operatorabhängige Aktivität dann bestimmt werden konnte (Jankovic *et al.*, 2001). Hiermit konnte die CcpA-vermittelte Regulation und die Signaltransduktion in *S. xylosus* detailliert studiert werden.



### 1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die von Stucky (Stucky, 1995; Stucky *et al.*, 1996) bereits begonnene vorläufige funktionelle Charakterisierung des CcpA-homologen potentiellen Transkriptionsregulators PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM 7290 weiterzuführen. Die Funktion von PepR1 bei der Regulation von am Protein- bzw. Stickstoffmetabolismus beteiligten Genen sollte im Rahmen dieser Arbeit weiter aufgeklärt werden. Im Fokus stand die postulierte Rolle von PepR1 bei der Regulation der Transkriptionsinitiation verschiedener Peptidasegene, deren Genprodukte, die Peptidasen, wie zuvor bereits dargestellt, die intrazelluläre Komponente des Caseinabbaues darstellen. Im Bezug auf die mögliche transkriptionelle Regulation dieser Gene war bei vorangegangenen vorläufigen Analysen (Stucky *et al.*, 1996) gezeigt worden, daß bei heterologer Expression in *E. coli* CM17 die Anwesenheit von PepR1 die Aktivität des translational mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen aus *E. coli* fusionierten Promotors des Genes der Peptidase Q (*pepQ*) 1,5 bis 2-fach erhöht wurde. Der dort benutzte Untersuchungsansatz sollte im Rahmen dieser Arbeit wieder aufgenommen und auf die Analyse des Einflusses verschiedenartig mutierter *pepQ* *cre*-Operatoren sowie weiterer potentieller Operatorsequenzen in der Nachbarschaft anderer Peptidasegene (*pepI*, *pepX*) ausgedehnt werden. Dies sollte zuerst durch die Analyse der Aktivitäten von translational mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen aus *E. coli* fusionierten Promotor- bzw. Upstream- und Downstream Regionen dieser Gene in An- bzw. Abwesenheit von PepR1 im heterologen *E. coli* Organismus durchgeführt werden. Daran sollte sich die Analyse der Transkripte dieser Gene bei Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen anschließen.

Desweiteren galt es auch die Frage zu beleuchten, ob PepR1 tatsächlich, wie Analysen auf Sequenz- und Proteinebene vermuten ließen, das CcpA-Äquivalent von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ist. Hierzu sollte PepR1 durch Komplementationsexperimente mit einer *ccpA*-Mutante von *Staphylococcus xylosus* C2a als der CcpA-homologe Regulator aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 bestätigt werden. Die zentrale Rolle von CcpA-homologen transkriptionellen Regulatoren wie PepR1 bei der Regulation des Zuckerstoffwechsels von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 schließlich, sollte exemplarisch am Beispiel der Laktoseverwertung dargestellt werden. Hierzu mußten die beteiligten Gene zuerst identifiziert und durch Klonierung sowie Sequenzierung für eine molekulare Untersuchung ihrer Promotorstrukturen sowie eine Analyse ihrer Expression zugänglich gemacht werden.

---

## II. Material

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

#### 2.1.1 Bakterienstämme

##### Escherichia coli K12-Stämme:

Stamm	Genotyp	Referenz
CM17	F <sup>-</sup> , <i>leu-9</i> , Δ( <i>pro-lac</i> ), <i>met</i> , <i>thyA</i> , <i>pepA11</i> , <i>pepB1</i> ,	Miller und Schwartz (1978)
CM89	F <sup>-</sup> , <i>leu-9</i> , Δ( <i>pro-lac</i> ), <i>met</i> , <i>thyA</i> , <i>pepA11</i> , <i>pepB1</i> , <i>pepN102</i> , <i>pepQ10</i>	Miller und Schwartz (1978)
DH5α	<i>endA</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>gyrA</i>	Hanahan (1983)
GM48	F <sup>-</sup> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>suppE44</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , λ <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup> <i>lacZ</i> ΔM15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)

##### Lactobacillus-Stämme:

Stamm	besondere Eigenschaften	Referenz
<i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290		Prof. Dr. M. Busse, Bakteriologisches Institut der süddeutschen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Freising-Weihenstephan
<i>Lb. casei</i> LK1	kryptisches Plasmid, Isolat aus Emmentaler Käse	Klein <i>et al.</i> (1993)

##### Lactococcus-Stämme:

Stamm	Relevante Merkmale	Referenz
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> MG1363	pLP712 plasmidfrei, Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , prophagenfrei (φT712 <sup>-</sup> )	Gasson (1983)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> MG1363 QR <sup>-</sup>	MG136, <i>ccpA</i> <sup>-</sup> (~ <i>pepRI</i> <sup>-</sup> ), <i>pepQ</i> <sup>-</sup>	H. Eshuis, M. Hellendoorn, (pers., Mitt.1997)

##### Staphylococcus-Stämme:

Stamm	Relevante Merkmale	Referenz
<i>Staphylococcus xylosus</i> C2a	Wildtyp	Götz <i>et al.</i> (1983)
<i>Staphylococcus xylosus</i> TX154	C2a-Derivat, <i>ccpA::ermB</i>	Egeter und Brückner (1996)
<i>Staphylococcus xylosus</i> TX300	C2a-Der., <i>'lacR</i> , Δ <i>lacP</i> , <i>'lacH</i>	Jankovic <i>et al.</i> (2001)
<i>Staphylococcus xylosus</i> TX600	TX300-Der., <i>ccpA::ermB</i>	Jankovic <i>et al.</i> (2001)

**Plasmide:**

Vektor / Plasmid	Relevante. Eigenschaften / Marker und klonierte Fragmente / Gene	Replikon	Referenz
<i>E. coli</i> Vektoren und Plasmide			
<b>pUC18</b>	$P_{lac}$ - <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> , high copy number	ColE1	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pUR1	<i>pepRI</i> <sup>+</sup> ; pUC18-Derivat	ColE1	Stucky <i>et al.</i> (1996)
<b>pUH89</b>	Amp <sup>R</sup> , $P_{lac}$ :: $P_{tac}$ :: <i>phiXmutE</i>	ColE1	Henrich und Schmidtberger (1995)
pUH89 <i>lac</i>	Amp <sup>R</sup> , $P_{lac}$ :: $P_{tac}$ ::' <i>lacP-lacZ-lacR</i> '; Genbank-Klon; <i>SalI</i> -Fragment (4401 bp) der <i>lac</i> -Region von <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	ColE1	Orschiedt (1997)
pUH89 <i>lac</i> Δ1	pUH89 <i>lac</i> -Derivat; Δ <i>BcII</i> -Fragment (615 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pUH89 <i>lac</i> Δ12	pUH89 <i>lac</i> Δ1-Derivat; Δ <i>PstI</i> -Fragment (791 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pUH89 <i>lac</i> Δ123	pUH89 <i>lac</i> Δ12-Derivat; Δ <i>ApaI</i> -Fragm. (1485 bp)	ColE1	Diese Arbeit
<b>pCR2.1</b>	Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i> , MCS, 3' dT, linear	ColE1	Fa. Invitrogen (www.invitrogen.com)
pCR2.1 <i>i8</i> bzw. <b>i18</b>	pCR2.1-Derivat mit PCR-Produkt (I-PCR) von 5'- <i>lacP-lacP'</i> (1721 bp)	ColE1 ColE1	Diese Arbeit
<b>pMCS5</b>	Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i> , medium copy number, MCS mit 59 unique Restriktionsschnittst.	ColE1	Fa. MoBiTec, Göttingen
pMCS5 <i>lacSE</i>	pMCS5-Derivat mit <i>SalI-EcoRI</i> -Fragment aus pUH89 <i>lac</i> (582 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pMCS5 <i>lacPS</i>	pMCS5-Derivat mit <i>PstI-SalI</i> -Fragment aus pUH89 <i>lac</i> (804 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pMCS5 <i>lacE1</i>	pMCS5-Derivat mit <i>EcoRI</i> -Fragment aus pUH89 <i>lac</i> (1017 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pMCS5 <i>lacE2</i>	pMCS5-Derivat mit <i>EcoRI</i> -Fragment aus pUH89 <i>lac</i> (909 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pMCS5 <i>lacEP</i>	pMCS5-Derivat mit <i>EcoRI-PstI</i> -Fragment aus pUH89 <i>lac</i> (1083 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pMCS5EX <i>lac</i>	pMCS5-Derivat mit <i>EcoRI-XmaI</i> -Fragment aus pCR2.1 <i>i8</i> (989 bp)	ColE1	Diese Arbeit
pMCS5XX <i>lac</i>	pMCS5-Derivat mit <i>XmaI-XbaI</i> -Fragment aus pCR2.1 <i>i8</i> (791 bp)	ColE1	Diese Arbeit
<b>pLG339</b>	Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , low copy number	pSC105	Stoker <i>et al.</i> (1982)
<b>pMS1</b>	Kan <sup>R</sup> , <i>pepQ</i> <sup>+</sup> ; <i>pepRI</i> <sup>+</sup> ;	pSC105	Stucky <i>et al.</i> (1995a)
<b>pKS1</b>	Kan <sup>R</sup> , <i>brnQ</i> <sup>+</sup> ;	pSC105	Stucky <i>et al.</i> (1995b)
<b>pJK433</b>	Kan <sup>R</sup> , <i>pepX</i> <sup>+</sup> ;	pSC105	Meyer-Barton <i>et al.</i> (1993)
<b>pJK502</b>	Kan <sup>R</sup> , <i>pepI</i> <sup>+</sup> ;	pSC105	Klein <i>et al.</i> (1994a)
pL <i>GlacOP5-9</i>	Kan <sup>R</sup> , ' <i>lacP-lacZ-lacR</i> '	pSC105	Diese Arbeit
<b>pFN476</b>	Amp <sup>R</sup> ; low copy number	pSC101	Sankar <i>et al.</i> (1993)
<b>pFNP13</b>	<i>pepRI</i> <sup>+</sup> ; pFN476-Derivat	pSC101	Stucky <i>et al.</i> (1996)
<b>pK184</b>	Kan <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i> , low bis medium copy num.	p15A	Jobling und Holmes (1990)
pKR1184	<i>pepRI</i> <sup>+</sup> , pK184-Derivat	p15A	Diese Arbeit

Vektor / Plasmid	Relevante. Eigenschaften / Marker und klonierte Fragmente / Gene	Replikon	Referenz
<b>pMC1871</b>	' <i>lacZ</i> ; Tet <sup>R</sup> ; high copy number	ColE1	Shapira <i>et al.</i> (1983)
pMCPQ2	<b>5'-<i>pepQ</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pMC1871-Derivat	ColE1	Diese Arbeit
pMCPQ3	<b>5'-<i>pepQ</i>*-'</b> <i>lacZ</i> , pMC1871-Derivat	ColE1	Diese Arbeit
pMCPQ4	<b>5'-<i>pepQ</i>*-'</b> <i>lacZ</i> , pMC1871-Derivat	ColE1	Diese Arbeit
pMCPlac1	<b>5'-<i>lacP1</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pMC1871-Derivat	ColE1	Diese Arbeit
pMCPlac2	<b>5'-<i>lacP2</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pMC1871-Derivat	ColE1	Diese Arbeit
pMCPRI1	<b>5'-<i>pepRI</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pMC1871-Derivat	ColE1	Diese Arbeit
<b><i>E. coli-Staphylococcus-Shuttle-Plasmide</i></b>			
<b>pRB473</b>	Amp <sup>R</sup> , Cat <sup>R</sup> , high copy number Vektor	ColE1/pUB110	Egeter und Brückner (1996)
pR1473	<b><i>pepRI</i></b> <sup>+</sup> ; pRB473-Derivat	ColE/pUB110	Diese Arbeit
pRBP <i>lac11</i> bzw. <b>12</b>	<b>5'-<i>lacP1</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pRB473-Derivat mit Insert ( <i>Pst</i> I-Fragment, 3267 bp) aus <b>pMCPlac1</b>	ColE1/pUB110	Diese Arbeit Diese Arbeit
pRBP <i>lac21</i> bzw. <b>22</b>	<b>5'-<i>lacP2</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pRB473-Derivat mit Insert ( <i>Pst</i> I-Fragment, 3327 bp) aus <b>pMCPlac2</b>	ColE1/pUB110	Diese Arbeit Diese Arbeit
<b><i>E. coli-Lactococcus-Shuttle-Plasmide</i></b>			
<b>pNZ8020</b>	Cat <sup>R</sup> , <i>P<sub>nisA</sub></i>	pSH71	De Ruyter <i>et al.</i> (1996)
<b>pUK100</b> (pNZ8020t)	pNZ8020-Derivat; <i>t<sub>brnO</sub></i> (Stucky <i>et al.</i> , 1995b)	pSH71	Wegmann (2000)
<b>pUK101</b>	pUK100 Δ(358 bp <i>Bsp</i> MI/ <i>Bam</i> HI- <i>P<sub>nisA</sub></i> -Fragment), 2986 bp	pSH71	Diese Arbeit
pUK <i>Plac11</i> bzw. <b>12</b>	<b>5'-<i>lacP1</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pUK101-Derivat mit Insert ( <i>Pst</i> I-Fragment, 3267 bp) aus <b>pMCPlac1</b>	pSH71	Diese Arbeit Diese Arbeit
pUK <i>Plac21</i> bzw. <b>22</b>	<b>5'-<i>lacP2</i>-'</b> <i>lacZ</i> , pUK101-Derivat mit Insert ( <i>Pst</i> I-Fragment, 3327 bp) aus <b>pMCPlac2</b>	pSH71	Diese Arbeit Diese Arbeit
<b><i>Lactobacillus-Plasmide</i></b>			
<b>pJK651</b>	Ery <sup>R</sup>	pWS58	Klein <i>et al.</i> (1995a)
pR1651	<b><i>pepRI</i></b> <sup>+</sup> ; pJK651-Derivat	pWS58	Diese Arbeit

Replikons sind grau unterlegt. Ausgangsvektoren für Plasmid-Konstruktionen sind fett gedruckt, Inserts/Fragmente ebenfalls. Derivate sind jeweils unter den Vektoren aufgelistet.

## 2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen

### 2.2.1 Nährmedien

LB-Medium für <i>E. coli</i> : (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Pepton aus Casein	10,0	g/l
	Hefeextrakt	5,0	g/l
	NaCl	5,0	g/l
	H <sub>2</sub> O		ad 1 l
	pH 7,0 ± 0,2		

Im Bedarfsfall wurde das LB-Medium mit 100 µg/ml Thymidin aus einer sterilfiltrierten Stocklösung von 10 mg/ml supplementiert. Glukose wurden nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C ausgehend von einer 50 %igen, sterilfiltrierten Lösung in einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt.

<b>MacConkey Agar</b> für <i>E. coli</i> : (nach MacConkey, 1905; MacConkey Agar Base, Fertigmedium Difco)	Bactopecton	17	g/l
	Gallensalze (Nr. 3)	1,5	g/l
	NaCl	5	g/l
	Neutralrot	0,03	g/l
	Proteosepepton	3	g/l
	Kristallviolett	1	mg/l
	Agar	13,5	g/l
	pH = 7,0 ± 0,2		

Von dem Fertigagar wurden 40 g in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> durch Aufkochen gelöst und dann das Medium 15 min autoklaviert. Laktose wurden nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C in einer Endkonzentration von 0,5 % oder 1 % zugesetzt ausgehend von einer 25 %igen, sterilfiltrierten Lösung.

<b>MRS-Medium</b> für <i>Lactobacillus</i> : (De Man <i>et al.</i> , 1960)	Pepton aus Casein	10,0	g/l
	Fleischextrakt	10,0	g/l
	Hefeextrakt	5,0	g/l
	D(+)-Glucose	20,0	g/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0	g/l
	Tween 80	1,0	g/l
	di-Ammoniumhydrogencitrat	2,0	g/l
	Na-Acetat	5,0	g/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,1	g/l
	MnSO <sub>4</sub>	0,05	g/l
	H <sub>2</sub> O		ad 1 l
	pH 6,5 ± 0,2		

MRS-Medium wurde 15 min autoklaviert. Glukose (50 %) oder Laktose (25 %) wurden getrennt autoklaviert und dem Medium anschließend in einer Konzentration von 2 % zugesetzt.

<b>G-/L-M17-Medium</b> für <i>Lactococcus</i> : (Fertigmedium, Difco)	Casein, tryptisch verdaut	5	g/l
	Pepton aus Soja	5	g/l
	Fleischextrakt	5	g/l
	Hefeextrakt	25	g/l
	Ascorbinsäure	0,5	g/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,25	g/l
	Na <sub>2</sub> -β-Glycerophosphat	19	g/l
	Glukose oder Laktose	5	g/l (getrennt autoklaviert)
pH 6,9 ± 0,2			

CDM für *Lactobacillus*:(Ledesma *et al.*, 1977)

Kaliumacetat	10 g/l
D-Glukose	10 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g/l
Natriumthioglykanat	0,5 g/l
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	0,15 g/l
Mangansulfat x 4 H <sub>2</sub> O	0,02 g/l
Eisensulfat x 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
<u>Tween 80</u>	<u>1,1 g/l</u>
DL-Alanin	0,2 g/l
L-Arginin-HCl	0,005 g/l
L-Asparagin	0,2 g/l
L-Cystein-HCl	0,2 g/l
L-Phenylalanin	0,04 g/l
L-Glutamat	0,15 g/l
L-Histidin-HCl	0,05 g/l
L-Isoleucin	0,05 g/l
L-Leucin	0,06 g/l
L-Lysin-HCl	0,06 g/l
L-Methionin	0,05 g/l
L-Prolin	0,04 g/l
L-Serin	0,1 g/l
L-Tyrosin	0,004 g/l
L-Threonin	0,05 g/l
L-Tryptophan	0,05 g/l
<u>L-Valin</u>	<u>0,03 g/l</u>
Adenin	0,05 g/l
Cytidin	0,05 g/l
Desoxyguanosin	0,05 g/l
Guanin-HCl	0,05 g/l
Thymidin	0,05 g/l
<u>Uracil</u>	<u>0,05 g/l</u>
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	0,00001 g/l
Vitamin B12	0,000001 g/l
d-Biotin	0,00001 g/l
Calciumpantothenat	0,001 g/l
Folsäure	0,0001 g/l
Niacin	0,001 g/l
Pyridoxal-Ethylacetal-HCl	0,0005 g/l
Riboflavin	0,0005 g/l
<u>Thiamin-HCl</u>	<u>0,001 g/l</u>
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wurden die essentiellen Aminosäuren (L-Alanin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Arginin, L-Tyrosin) in doppelter Konzentration eingesetzt.

**Basis (B-) –Medium**für *S. xylosum*:

Casein-Hydrolysat (Pepton #140, Gibco BRL)	10,0	g/l
Hefeextrakt	5,0	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	g/l
H <sub>2</sub> O		ad 1 l
pH 7,2		

**Brain Heart Infusion Medium**für *S. xylosum*:

(Fertigmedium, Difco)

Infusion aus 200 g Kalbshirn		
Infusion aus 250 g Rinderherz		
Bacto Dextrose	2,0	g/l
NaCl	5	g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5	g/l

37 g des Fertigmediums werden in 1 l H<sub>2</sub>O gelöst, der pH, wenn nötig mit HCl, auf  $7,4 \pm 0,2$  eingestellt und 15 Minuten autoklaviert.

**2.2.2 Zusätze zu den Medien**

Zur Herstellung von Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Flüssigmedium zugesetzt. Antibiotika wurden 100- bzw. 1000-fach konzentriert angesetzt, steril filtriert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Antibiotikum	Lösungsmittel		Endkonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		20 µg/ml
		pFN476-Derivate	100 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol	<i>E. coli</i> :	25 µg/ml
		<i>Staphylococcus</i> :	15 µg/ml
		<i>Lactococcus</i> :	10 µg/ml
		<i>Lactobacillus</i> :	5 µg/ml
Erythromycin	Ethanol	<i>Lactobacillus</i> :	5 µg/ml
		<i>Staphylococcus</i> :	2,5 µg/ml
		<i>Lactococcus</i> :	10 µg/ml
		<i>E. coli</i> :	100 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		40 µg/ml
Tetrazyklin	50 % Ethanol	Plasmide	25 µg/ml
		Tn10	15 µg/ml

## 2.2.3 Puffer

soweit nicht im Methodenteil gesondert aufgelistet

DNA-Probenpuffer (6 x)	Ficoll 400	15	%
	Bromphenolblau	0,25	%
	Xylen-Cyanol	0,25	%
SSC-Puffer (20 x)	Tri-Na-Citrat, pH 7,0	0,3	M
	NaCl	3	M
STE-Puffer	Tris-HCl, pH 8,0	10	mM
	EDTA	1	mM
	NaCl	100	mM
TBE-Puffer (5 x)	Tris-HCl, pH 8,0	445	mM
	EDTA	10	mM
	Borsäure	445	mM
TE-Puffer	Tris-HCl, pH 8,0	10	mM
	EDTA	1	mM
TEE-Puffer (50 x)	Tris-HCl, pH 8,0	2	M
	EDTA	0,1	M
Z-Puffer: (Miller, 1972)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60	mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40	mM
	KCl	10	mM
	MgSO <sub>4</sub>	1	mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	50	mM
	pH = 7,0		

nicht autoklavieren, bei 4°C aufbewahren



## 2.2.4 Chemikalien und Enzyme

### Chemikalien:

Gebräuchliche Chemikalien wurden in der Qualität p.A. von folgenden Firmen bezogen:

Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg; Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Fluka AG, Neu-Ulm; E. Merck AG, Darmstadt; C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen.

Radiochemikalien:  $^{32}\text{P}$ -[ $\alpha$ ]-dCTP, 3000  $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ ; NEN Life Science Products Inc., Boston, USA  
 $^{35}\text{S}$ -Methionin, 1000  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ ; ICN Biomedical GmbH, Meckenheim

Antibiotika: Ampicillin, Erythromycin, Sigma; Chloramphenicol, Kanamycin, Tetrazyclin: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

### Enzyme:

Die verwendeten Enzyme und Restriktionsendonukleasen stammten von:

Appligene, Heidelberg; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; La Roche Biochemicals, Mannheim; New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Perkin-Elmer-Cetus, Weiterstadt; Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg; Sigma; Stratagene, Heidelberg.

## 2.2.5 Geräte

### 2.2.5.1 Zentrifugen und Rotoren

Hersteller	Zentrifugentyp	Rotoren
Beckmann	Kühlzentrifuge Modell J2-J21	JA-10; JA-20; JA-21
	Ultrazentrifuge Modell L8-70M	SW-28; SW 50-L; Ti70.1
Eppendorf	Zentrifuge 5415C	
	Z320	
Heraeus	Biofuge A	
	Biofuge Stratos	Festwinkelrotor 3331
	Biofuge 28RS	Festwinkelrotor HFA28.1
Sorvall	Varifuge GL	
	Zentrifuge RC5B Plus	SLA-1500
		SS-34

**2.2.5.2 Sonstige Geräte**

Thermocycler:	^	- DNA Thermocycler TC-1, Perkin-Elmer-Cetus, Weiterstadt - Personal Cycler, Biometra; UNO-Thermoblock, Biometra - Hybaid Omn-E, MWG-Biotech
DNA Sequencer:		- ABI 373A DNA Sequencing System und ABI 373 STRETCH DNA Applied Biosystem, Calif. USA - Sequencing System, Applied Biosystem, Calif. USA - MWG Li-COR DNA Sequencer 4000L
Oligonukleotidsynthesizer:		- ABI 392 DNA/RNA Synthesizer, Applied Biosystems, Calif. USA
Elektroporationsgerät:		- GENE-Pulser™, Bio-Rad, München
Hybridisierungsöfen:		- Biometra Hybridisierungskubator APT-Line ES, Biometra OV1
UV-Crosslinker:		- Crosslinker LX-254 Bio-Link, MWG-Biotech, Ebersberg
Photometer:		- Ultrospec Plus Spectrometer, Pharmacia, Uppsala - Ultrospec III UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia, Uppsala - GeneQuant, Pharmacia, Uppsala - Uvikon Spectrophotometer 930, Kontron

**2.2.6 Computerprogramme und Datenbanken**

Computerprogramme: *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1997); *PC-Gene*, (IntelliGenetics); Microgenie (Beckmann, Palo Alto, Calif.; *HUSAR* (Biocomputing Service Group, DKFZ, Heidelberg, <http://genius.dkfz-heidelberg.de>); *BlastN*, *BlastP*, *BlastX* (Altschul *et al.*, 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); *FASTA*, (<http://www.ebi.ac.uk>); *Clone-Manager* 5.03 (Scientific and Educational Software); *Enhance* Plasmid Map Enhancer 3.1 (Scientific and Educational Software); Origin 5.0™, Microcal Software Inc., Northhampton, USA.

Datenbanken: NCBI (EBI-EMBL); GenBank, Swissprot, PIR, PROSITE: <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; BLOCKS (<http://www.blocks.fhrc.org>); ProDom (<http://www.toulouse.inra.fr>)

---

## **III. Methoden**

### **3.1 Stammkonservierung**

Eine Übernachtskultur des betreffenden Stammes wurde in sterile, verschließbare Glas- oder Plastikröhrchen gefüllt und für die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit 96 %igem Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die Aufbewahrung bei  $-70$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden 1,7 ml der Kultur mit 0,3 ml 96 %igem Glycerin gemischt und vor der Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **3.2 Messung des Bakterienwachstums**

Die Messung des Bakterienwachstums erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte der Bakterienkultur mit einem Uvikon Spectrophotometer 930 (Kontron) bei einer Wellenlänge von 600 nm oder 578 nm (*Staphylococcus xylosus*) und Küvetten mit einem Lichtweg von 1 cm. Als Referenz wurde das entsprechende unbewachsene Medium verwendet. Bei einer optischen Dichte  $> 1$  wurde zur Messung ein Aliquot mit unbewachsenem Medium verdünnt und die optische Dichte über den Verdünnungsfaktor errechnet.

### **3.3 Wachstumsversuche**

#### **3.3.1 Phänotypische Überprüfung von Aminosäureauxotrophien**

1. Der zu untersuchende Bakterienstamm wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium vermehrt.
2. 1ml der Kultur wurde 30 sec bei 10 krpm abzentrifugiert und das Pellet dreimal in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen.
3. Das Pellet wurde im gleichen Volumen DM-Medium resuspendiert.
4. Verschiedene Verdünnungsstufen der gewaschenen Kultur wurden auf DMM-Platten mit allen benötigten Zusätzen und zum Vergleich auf DMM-Platten, in denen jeweils die zu testende Aminosäure fehlte, ausplattiert.
5. Die Auswertung erfolgte nach Bebrütung von 2-3 Tagen.

### **3.4 Transformation von Bakterien**

#### **3.4.1 Elektroporation von *E. coli***

1. Von dem betreffenden Stamm wurde eine Übernachtskultur angelegt.
2. 100 ml LB-Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben wurden mit 2 ml der Übernachtskultur beimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu ein O.D.<sub>600</sub> von ca. 0,6 geschüttelt.
3. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und anschließend in vorgekühlten, sterilen JA20-Zentrifugenbechern bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 10 krpm 2 min lang abzentrifugiert.
4. Das Pellet wurde zweimal mit je 30 ml 10 %igem Glycerin (in Milliporewasser) gewaschen.
5. Nach erneutem Zentrifugieren wie unter 3. wurde das Zellpellet in 1/400 Volumen 10 %igem Glycerin aufgenommen und in 40  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt.
6. Zellen, die nicht direkt zur Elektroporation verwendet wurden, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

7. 40 µl Zellen wurden mit maximal 5 µl DNA-Lösung (2-100 ng DNA) gemischt und in eine sterile, eisgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,2 cm) eingefüllt.
8. Die Elektroporation mit dem Gene-Pulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad) wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:  
Kapazität: 25 µF  
Widerstand: 200 Ω  
Spannung: 2100 V  
Die Pulsdauer betrug 4,5 – 4,8 ms.
9. Direkt nach dem Puls wurden die Zellen mit 200 µl LB-Medium gemischt, der Küvette vollständig entnommen und zu weiteren 0,8 ml LB-Medium in einem sterilen, kleinen Reagenzglas pipettiert.
10. Zur Erholung der Zellen wurde diese Suspension 1 h im 37 °C–Wasserbad inkubiert.
11. Nach der Inkubation wurden 100 bis 200 µl des Transformationsansatzes in geeigneter Verdünnung auf den entsprechenden Selektivmedien ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Je nach verwendetem Stamm und Plasmid konnten Transformationseffizienzen bis zu 10<sup>9</sup> Transformanten/µg DNA erreicht werden (Dower *et al.*, 1988).

#### 3.4.2 Elektroporation von *Lactobacillus casei* LK1

Die Transformation von *Lactobacillus casei* durch Elektroporation erfolgte modifiziert nach Klein *et al.* (1995a). Bei dieser Methode konnten bis zu 1·10<sup>6</sup> Transformanten pro µg pJK651 erhalten werden.

Lösungen und Puffer:

K-Phosphat-Lösung	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7 mM
	pH 7,2	
KPS-Puffer	K-Phosphat-Lösung	3,5 mM
	Saccharose	0,5 mM
	pH 7,2	

Durchführung:

1. 400 ml vorgewärmtes MRS-Medium wurden mit 4 ml einer Übernachtskultur von *Lb. casei* beimpft und bei 37°C bis zu einer O.D.<sub>600</sub> von ca. 2,0 inkubiert. Die Zellen wurden auf Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.
2. Die Zellen wurden 1 min bei 10 krpm und 0 °C in vorgekühlten JA10-Zentrifugenbechern abzentrifugiert.
3. Das Pellet wurde zweimal mit je 300 ml eiskalter K-Phosphat-Lösung gewaschen, dann in 40 ml eiskaltem KPS-Puffer resuspendiert, 1 min bei 10 krpm und 0 °C in vorgekühlten JA20-Zentrifugenbechern abzentrifugiert und in 5 ml eiskaltem KPS-Puffer resuspendiert.
4. Die Zellen konnten entweder sofort zur Elektrotransformation verwendet oder als 150 µl Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -70 °C gelagert werden.
5. 150 µl Zellen wurden mit maximal 5 µl DNA (100 bis 1000 ng) in eine sterile, eisgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) gegeben.
6. Der elektrische Puls erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 400 Ω und einer Feldstärke von 2000 V. Die Pulsdauer betrug im optimalen Fall ca. 4,0 bis 4,6 ms.
7. Die Zellen wurden mit 0,2 ml MRS-Medium der Küvette vollständig entnommen, mit weiteren 0,65 ml Medium versetzt und 2-3 h bei 37 °C inkubiert.
8. Der Transformationsansatz wurde im Plattengußverfahren zu je 100 bis 500 µl auf geeigneten Selektivmedien ausgebracht und bei 37°C inkubiert.

### 3.4.3 Elektroporation von *Lactococcus lactis* MG1363

Die Transformation von *Lactococcus* durch Elektroporation erfolgte nach einer Laboranleitung des NIZO (Niederlands Instituut voor Zuivel Onderzoek / Netherlands Institute for Dairy Research). Bei dieser Methode konnten bis zu  $1 \cdot 10^7$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  pNZ8020 erhalten werden.

Medien und Lösungen:

GS-GM17:	GM17-Medium		
	Glycin	3	%
	Saccharose	0,5	M
GS-Puffer:	Glycerin	12,6	%
	Saccharose	171,16	g/l
	pH 8,0		
GSE-Puffer:	GS-Puffer		
	EDTA	50	mM
	pH 8,0		

1. Aus einer ÜN-Kultur in GM17, wurden 25 ml GS-GM17-Medium mit 2,5 ml beimpft und am nächsten Tag zu 200 ml GS-GM17 gegeben.
2. Bei einer O.D.600 von 0,2-0,3, wurden die Zellen für 20 min bei 4,5 krpm und 4 °C in JA20 Bechern abzentrifugiert und mit 1 Vol. GS-Puffer gewaschen.
3. Die Zellen wurden in 1/2 Vol. GSE-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert.
4. Das Pellet wurde nochmals in 1/3 Vol. GS-Puffer gewaschen, in 1,6 ml GS-Puffer resuspendiert und als 40  $\mu\text{l}$  Aliquots direkt verwendet oder über flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -70 °C gelagert.
5. Der elektrische Puls erfolgte mit einer Kapazität von 25  $\mu\text{F}$ , einem Widerstand von 200  $\Omega$  und einer Feldstärke von 2000 V.
6. Die Zellen wurden in 1 ml GM17, mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 mM CaCl<sub>2</sub> bei 30 °C für 1-1,5 h inkubiert.
7. Der Transformationsansatz wurde im Plattengußverfahren zu je 100 bis 500  $\mu\text{l}$  auf geeigneten Selektivmedien ausgebracht und bei 30 °C inkubiert.

### 3.4.4 Schnelle Methode zur Elektroporation von *Lactococcus lactis*

Medien und Lösungen:

1. M17
2. Glucose 50 % (w/v)
3. Glycerin 100 %
4. Glycin 20 %
5. MgCl<sub>2</sub> 1 M
6. CaCl<sub>2</sub> 100 mM
7. GSM17G
 

M17		
Glucose	0,5	%
Saccharose	0,5	M
Glycin	1,0	%

8. Wasch-Puffer	Saccharose	0,5 M
	Glycerin	10 %
9. GSM17MC	M17	
	Glucose	0,5 %
	Saccharose	0,5 M
	MgCl <sub>2</sub>	20 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
10. GSM17-Agar	M17-Agar	
	Glucose	0,5 %
	Saccharose	0,5 M

Durchführung:

1. Überimpfen der ÜNK in 100 ml GSM17G. Inkubation bei 30°C bis zu einer O.D.600 von 0,4-0,7.
2. Abzentrifugieren der gewachsenen Kultur in zwei JA-20 Zentrifugenröhrchen bei 8000 rpm, 4°C für 5 min in einer Beckman J2-21 Zentrifuge.
3. Zellpellet 4-5x mit 50 ml eiskaltem Wasch-Puffer waschen und wieder wie oben abzentrifugieren.
4. Zellpellet in 1 ml Waschpuffer resuspendieren und Zellen in 50 µl-Portionen bei -75°C tiefrieren.

Elektroporation:

5. Zugabe von 1 µl DNA-Lösung in 40 µl Zellsuspension. Überführen der Mischung in eine eiskalte Elektroporations-Küvette von 0,2 cm Elektrodenabstand. PULS: 2.5 kV, 25 µF, 200 Ohm;
6. Direkt nach dem Puls 2 ml Erholungsmedium (GSM17MC) zugeben und den gesamten Ansatz in ein 2,2 ml ERG überführen und bei 30°C 2 h inkubieren.
7. Zellen auf 0,5 ml aufkonzentrieren (@ 10 krpm, 1-2 min.), 1,5 ml Erholungsmedium verwerfen Zellpellet resuspendieren.
8. Geeignete Aliquots oder Verdünnungen der Zellsuspension auf GSM17-Agar, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattieren.
9. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 30°C sollten kleine Kolonien sichtbar sein, nach 36 Stunden Inkubation sind die Kolonien deutlich gewachsen.

### 3.4.5 Elektroporation von *Staphylococcus xylosus* (Brückner, 1997)

Medien und Lösungen:

BHI-Medium	BHI-Fertigmedium (Difco)	37 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
BHS-Medium	BHI-Fertigmedium (Difco)	37 g
	Saccharose	0,5 M
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Glycin-Lösung	10 %	
	nach Lösen in H <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren.	

Durchführung:

1. 5 ml ÜNK von *S. xylosus* in BHI-Medium bei 37°C schüttelnd inkubieren;
2. 50 ml BHI-Medium mit 50 µl der ÜNK animpfen und bei 37°C schüttelnd bis zu einer O.D.<sub>578</sub> von 0,4-0,5 inkubieren;
3. Abzentrifugieren (10 min, 4°C, 5000 upm, Heraeus Minifuge RF);
4. Überstand vollständig abgießen, Zellen in 30 ml, 10ml, 2,5 ml Glycin-Lösung waschen und dann in 130 µl Glycin-Lösung resuspendieren;
5. Zu 60 µl Glycin-Zellen 3-5 µl DNA-Lösung (0,1-1 µg) geben;
6. 30 min bei RT inkubieren;
7. Zell-/DNA-Suspension in 0,2 ml Elektroporationsküvetten (Biorad Laboratories) überführen;
8. Puls: 10 kV/cm, 2,0 kV, 25 µF, 100 Ohm, 2,5 ms;
9. Nach einem Puls sofort 1 ml BHS-Medium hinzufügen,
10. Zur phänotypischen Expression 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubieren;
11. Je 200 µl der Zellsuspension auf BHS-Agarplatten ausplattieren und unter selektiven Bedingungen bei 37°C inkubieren;
12. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sollten kleine Kolonien sichtbar sein, nach 36 Stunden Inkubation sind die Kolonien deutlich gewachsen.

### 3.5 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

#### 3.5.1 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

##### 3.5.1.1 Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979)

Der Vorteil der hier beschriebenen Methode liegt in den hohen Ausbeuten an Plasmid-DNA, da die Zellen durch die Behandlung mit SDS/NaOH vollständig lysiert werden. Deshalb wurde diese Methode vor allem zur Präparation von Plasmiden mit geringer Kopienzahl (low-copy-number) eingesetzt. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß die so gewonnene Plasmid-DNA nicht immer direkt durch Restriktionsendonukleasen verdaut werden konnte, sondern gegebenenfalls erst durch Phenolextraktion (3.7.1) und Ethanolpräzipitation (3.7.2) weiter gereinigt werden mußte.

Lösungen:

SDS/NaOH	SDS NaOH	10,0 mg/ml 0,2 M
KAc/HAc	Kaliumacetat Ameisensäure	3,0 M 1,8 M

1. 1,5 ml einer Übernachtskultur des plasmidhaltigen Stammes wurden in einer Eppendorfzentrifuge 1 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
2. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl GTE-Puffer vollständig resuspendiert.
3. Anschließend wurden 400 µl SDS/NaOH zugegeben und vorsichtig gemischt.
4. Nach erfolgter Lyse der Zellen (30 – 60 s) wurden 300 µl eiskalten KAc/HAc zugegeben und sanft gemischt. Bei diesem Schritt werden Proteine, chromosomale DNA und hochmolekulare RNA ausgefällt, während Plasmid-DNA renaturiert und so in Lösung bleibt.
5. Der Ansatz wurde mindestens 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 14 krpm zentrifugiert.

6. Der Überstand wurde abgehoben und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 0,5fachem Volumen Isopropanol 10 min bei RT gefällt.
7. Die gefällte DNA wurde mindestens 10 min abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und dann in 50 µl TE-Puffer oder Milliporewasser gelöst.

### 3.5.1.2 Minilysate nach Pharmacia (Birnboim und Doly, 1979; modifiziert nach Pharmacia LKB)

Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zu der unter 3.5.1.1 beschriebenen Methode besteht vor allem darin, daß die isolierte Plasmid-DNA meist direkt durch Restriktionsendonukleasen verdaut werden konnte. Allerdings ist hier die Ausbeute geringer als in der vorangegangenen Methode.

1. 1,5 ml einer Übernachtskultur des plasmidhaltigen Stammes wurden in einer Eppendorffzentrifuge 1 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
2. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet in 100 µl GTE-Puffer vollständig resuspendiert.
3. Es wurden 200 µl NaOH/Triton zugegeben und vorsichtig gemischt.
4. Nach erfolgter Lyse der Zellen (2 – 5 min bei RT) wurden 150 µl eiskaltes NaAc zugegeben, sanft gemischt und anschließend mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt werden Proteine, chromosomale DNA und hochmolekulare RNA ausgefällt, während Plasmid-DNA renaturiert und so in Lösung bleibt.
5. Anschließend wurde mindestens 10 min bei 14 krpm zentrifugiert, der plasmidhaltige Überstand wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 450 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt.
6. Die präzipitierte DNA wurde 10 min bei 14 krpm abzentrifugiert und das Pellet mit 250 µl Isopropanol gewaschen
7. Das getrocknete Pellet wurde dann in 50 µl TE-Puffer oder Milliporewasser gelöst.

NaOH/Triton	NaOH	0,2 M
	Triton X-100	1,0 %
NaAc	Natriumacetat	3,0 M
	pH 4,8 mit Essigsäure einstellen	

### 3.5.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* ("Boiling Lysis") (Sambrook *et al.* 1989)

Plasmid-DNA, die nach dieser Methode präpariert wurde, konnte direkt restringiert werden. Die Methode war besonders geeignet, wenn eine größere Anzahl von Plasmidpräparationen gleichzeitig durchgeführt werden sollte. Diese Methode war hinsichtlich der Ausbeute und der Qualität der DNA mit der alkalische Lyse vergleichbar.

Lösungen:

STET	Saccharose	8 %	32 g
	Triton X-100	5 %	20 g
	EDTA	50 mM	40 ml einer 0,5 M Lösung, pH 8
	Tris-HCl	50 mM, pH 8	2 ml einer 1 M Lösung
	H <sub>2</sub> O	ad 400 ml, Lagerung bei 4°C	
Lysozym	10 mg/ml, Lagerung bei -20°C		
TE/RNaseA	20 µg/ml, RNaseA in TE lösen		



Durchführung:

1. 1,5 ml einer ÜNK wurden 1 min in einer Eppendorffzentrifuge bei 14 krpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
2. 2 µl Lysozym wurden an den Rand des Eppendorftubes pipettiert. Nach Zugabe von 300 µl STET wurde der Ansatz solange gevortext bis das Pellet vollständig aufgelöst war.
3. Nach 1 min kochen wurde sofort 10-15 min zentrifugiert.
4. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt.
5. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 325 µl Isopropanol 5 min bei RT gefällt und anschließend 15 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
6. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, im Trockenschrank 3-5 min getrocknet und in TE/RNaseA gelöst.

#### 3.5.1.4 Plasmid-Isolation mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit

Zur Isolation von zur Sequenzierung und Klonierung eingesetzter Plasmid-DNA aus *E. coli* und *Lactococcus lactis* wurde der High Pure Plasmid Isolation Kit von Boehringer Mannheim/La Roche Diagnostics eingesetzt. Hiermit konnten sowohl bei den Gram-negativen als auch bei den Gram-positiven Stämmen aus 4 ml einer entsprechenden Übernachtskultur bis zu 10µg Plasmid-DNA isoliert werden.

Für die Plasmid-Isolation aus *E. coli* wurden sämtliche Puffer unmodifiziert eingesetzt und das Standard-Protokoll des Herstellers befolgt. Für die Plasmid-Isolation aus *Lc. lactis* wurde ein wie folgt zusammengesetzter Suspensionspuffer eingesetzt:

Lösung A:	Saccharose	20 %
	Tris/HCl	10 mM, pH 8,1
	EDTA	10 mM, pH 8,1
	NaCl	50 mM
	bei 4°C aufbewahren.	

Diese Lösung wurde kurz vor Gebrauch mit 5 mg/ml Lysozym versetzt. Die Bakterienpellets wurden in 250µl dieser Lösung vollständig resuspendiert und bei 55°C im Wasserbad für 10-15 min inkubiert.

Die weitere Durchführung erfolgte auch hier mit den im Kit enthaltenen Lösungen nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 3.5.1.5 Midi-/Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in großem Maßstab, wurde der Nucleobond® AX-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Das Verfahren beruht auf der Methode von Birnboim und Doly (1979). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit einer Anionenaustauscher-Säule auf Kieselgelbasis. Zur Midipräparation mit dem AX100-Kit wurden 100 - 150 ml einer Übernachtskultur des plasmidhaltigen Stammes eingesetzt, zur Maxipräparation mit dem AX500-Kit 400 – 500 ml Übernachtskultur. Die Präparation erfolgte nach der vom Hersteller angegebenen Vorschrift.

Die durchschnittliche zu erwartenden Ausbeuten waren stark abhängig von der Kopienzahl des betreffenden Plasmids. Bei low-copy-number Plasmiden wurden mit dem AX100-Kit im Durchschnitt 20 – 30 µg Plasmid-DNA isoliert, mit dem AX500-Kit 90 – 100 µg. Bei high-copy-number Plasmiden lagen die Ausbeuten im Bereich von 80-90 µg beim AX100-Kit und 350 – 450 µg für den AX500-Kit.

### 3.5.2 Plasmid-Präparation aus *Staphylococcus xylosus*

#### 3.5.2.1 Plasmid-Minipräparation aus *Staphylococcus xylosus* durch alkalische Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Lösungen:

- |                       |   |               |
|-----------------------|---|---------------|
| 1. Lösung I           | Tris/HCl  | 25 mM; pH 8,0 |
|                       | EDTA  | 10 mM         |
|                       | Saccharose  | 30 %          |
| 2. Lösung II          | NaOH  | 0,1 M         |
|                       | SDS   | 1 %           |
| 3. Lösung III         | K-Acetat  | 1,5 M; pH 4,8 |
| 4. Lösung IVa         | Tris/HCl  | 50 mM, pH 7,5 |
|                       | Na-Acetat   | 0,1 M         |
| 5. Lösung IVb         | Tris/HCl  | 10 mM, pH 7,5 |
|                       | NaCl  | 15 mM         |
|                       | RNaseA  | 10 mg/ml      |
| 6. Lösung IV          | Lösung IVa  | 5 ml          |
|                       | Lösung IVb  | 25 µl         |
|                       | die Endkonzentration der RNaseA in Lösung IV beträgt 50 µg/ml |               |
| 7. Lysostaphin-Lösung | 0,5 mg/ml in H <sub>2</sub> O lösen.                          |               |
| 8. NaCl-Lösung        | 1 M   |               |

Durchführung:

1. ÜNK in 1,5 ml BHI-Medium unter selektiven Bedingungen bei 37°C schüttelnd inkubieren;
2. je 1,5 ml Kultur in ERG 1 min bei 12000 rpm abzentrifugieren, Kulturmedium vollständig entfernen;
3. Zellen in 0,5 ml Lsg. I waschen und erneut abzentrifugieren (der pH des Kulturüberstandes oder eventuell vorhandene Proteasen könnten die Lysostaphinbehandlung erschweren);
4. Zellen in 100 µl Lsg. I resuspendieren, auf homogene Suspension achten;
5. 15 µl 1 M NaCl-Lösung und 30 µl Lysostaphin-Lsg. hinzufügen, mischen und bei 37°C inkubieren (die Lyse beobachten: Nach 20-60 min sollte die Zellsuspension etwas klar und viskos geworden sein, ansonsten weitere 20 µl Lysostaphin-Lösung hinzufügen); nach der Lyse die Zellen auf Eis stellen;
6. 200 µl Lsg. II zugeben, vorsichtig mischen und den Ansatz auf Eis 5 min inkubieren;
7. 200 µl Lsg. III zugeben, vorsichtig mischen und den Ansatz auf Eis 5 min inkubieren;
8. abzentrifugieren (12000 rpm, RT, 15 min);
9. Überstand überführen in ERG, 0,5 ml Isopropanol hinzufügen, mischen und 10 min bei RT stehen lassen;
10. abzentrifugieren (12000 upm, RT, 5 min);
11. das Pellet in 200 µl Lsg. IV aufnehmen und 5 min bei RT inkubieren;
12. zur Entfernung von RNase und der restlichen Proteine eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchführen;

13. aus der wässrigen Phase die Plasmid-DNA mit 2,5 Volumen EtOH 15 min bei -70°C präzipitieren;
14. das DNA-Pellet mit 70% EtOH waschen, kurz im 65° Trockenschrank trocknen und in 30µl TE-Puffer lösen;

### 3.5.3 Präparation von Plasmid DNA aus *Lactobacillus* und *Lactococcus*

#### 3.5.3.1 Plasmid-Minipräparation aus *Lactobacillus*

Diese Methode wurde in Anlehnung an ein Verfahren zur Plasmid-Präparation aus *Lactobacillus* (Laboranleitung nach Anderson und McKay, 1983) entwickelt.

1. 5 ml MRS-Medium wurde mit 0,5 ml einer Übernachtskultur versetzt und bei 37 °C bis zu einer O.D.<sub>600</sub> von ca. 2 kultiviert.
2. 1,5-3 ml der Kultur wurden 1 min bei 14 krpm abzentrifugiert und zweimal mit 1 ml STE-Puffer gewaschen.
3. Das Pellet wurde in 380 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl Mutanolysin-Lösung, sowie 90 µl frisch angesetzter Lysozym-Lösung zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert.
4. Zur Suspension wurde 50 µl Lösung 2 gegeben und gemischt.
5. Nach Zugabe von 28 µl Lösung 3 wurde vorsichtig gemischt und der Ansatz 1-10 min bei RT inkubiert.
6. Das Lysat wurde mit 350 µl Lösung 4 versetzt, sanft gemischt und 10 min auf Eis inkubiert.
7. Nach zweimaliger Zentrifugation für 10 min bei 14 krpm, wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol präzipitiert.
8. Die ausgefallene DNA wurde 10 min bei 14 krpm abzentrifugiert, mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, 20 min in 20 µl TE-Puffer gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 14 krpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Lösung 1	Saccharose	6,7 %
	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,0	

Lösung 2	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	250 mM
	pH 8,0	

Lösung 3	SDS	20 %
	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	20 mM
	pH 8,0	

Lösung 4	KAc	3 M
	Ameisensäure	1,8 M

Mutanolysin-Lösung: 5000 U/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Lysozym-Lösung :  
 25 mg/ml  
 Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

#### 3.5.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *Lactobacillus* durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Verwendete Lösungen entsprechen, wenn nicht anders angegeben, der Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *Lactobacillus* (3.5.3.1).

1. Zu 400 ml MRS-Medium wurde 40 ml Übernachtskultur gegeben und 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 1 min bei 10 krpm und 4 °C abzentrifugiert und mit gleichem Vol. STE-Puffer gewaschen.
2. Das Pellet wurde in 30 ml Lösung 1 resuspendiert, 500 µl Mutanolysin-Lösung und 7 ml Lysozym-Lösung zugegeben und 1 h bei RT auf dem Rollbrett inkubiert.
3. Dem Ansatz wurden 3,75 ml Lösung 2, 1 ml Proteinase K-Lösung (2,25 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) und 2,25 ml Lösung 3 zugegeben und 45 min bei 55 °C inkubiert.
4. Pro Gramm Lysat wurde 1 g CsCl zugegeben und durch langsames Schwenken gelöst. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.
5. Zu 3 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) in einem Beckmann Quick-Seal-Röhrchen (Beckmann) wurde 30 ml der Lösung hinzugegeben und die Öffnung luftblasenfrei verschweißt.
6. Der Gradient wurde 40 Stunden (Rotor Ti50.2, 40 krpm, 20 °C) zentrifugiert, danach die Plasmid-DNA-Bande bei langwelligem UV-Licht (354 nm) mit einer Spritze abgesaugt.
7. Um das Ethidiumbromid zu entfernen, wurde in Corex-Zentrifugenröhrchen dreimal mit 20 ml Isopropanol (gesättigt mit 5 M NaCl in TE-Puffer) extrahiert. Zur wäßrigen Lösung wurde 5 µl Glykogen gegeben und mit 0,8 Vol. Isopropanol in 60 min gefällt.
8. Nach 45 min Zentrifugation bei 15 krpm wurde das Pellet bei RT angetrocknet und die Plasmid-DNA in TE-Puffer gelöst.

#### 3.5.3.3 Mini-Präparation von Plasmid DNA aus *Lactococcus*

Diese Methode wurde nach einer modifizierten Anleitung von O'Sullivan und Klaenhammer (1993) durchgeführt. Sie beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse, wobei in einem zusätzlichen Schritt die DNA weiter gereinigt wird. Dies erfolgt durch Zugabe von EtBr, das in die DNA interkaliert und so die Nukleoproteinkomplexe auflöst. Die Proteinanteile werden durch die nachfolgende Phenolextraktion entfernt.

1. 4–10 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Stammes wurden 1 min bei 14 krpm abzentrifugiert und mit 500 µl TES-Puffer gewaschen.
2. Das Pellet wurde in 100 µl TES-Puffer resuspendiert.
3. Danach wurden 100 µl TES/Lysozym (8 mg/ml) hinzugegeben und 15 bis 60 min bei 37 °C auf einem Eppendorfschüttler inkubiert.
4. Ein Aliquot wurde mit SDS/NaOH einem Lysetest unterzogen. Lysierten die Zellen in ausreichendem Maß, so wurde der restliche Ansatz mit 400 µl SDS/NaOH lysiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert.
5. Nach Zugabe von 30 µl KAc (3 M, pH 4,8) wurden der Ansatz weitere 15–20 min bei 0°C inkubiert und danach 15 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
6. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 650 µl vorgelegtem Isopropanol präzipitiert und direkt 15 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
7. Das Pellet wurde nach vollständiger Entfernung des Überstandes ohne Trocknung mit 320 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst.
8. Nach Zugabe von 200 µl EtBr-Lösung wurde der Ansatz 5 min auf einem Eppendorfschüttler inkubiert.
9. Anschließend wurde 300 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, 5 min auf einem Eppendorfschüttler inkubiert und danach 5 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
10. Die wässrige Phase wurde mit 300 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 5 min in auf einem Eppendorfschüttler inkubiert und 5 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
11. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses vollständig mit EtOH aufgefüllt.

12. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 45 min bei 14 krpm abzentrifugiert, gewaschen und in 30-40 µl TE-Puffer gelöst.

TE-Puffer 100x	EDTA	37,2 g/l	
	Tris/HCl	121 g/l	
	pH 8,0		
TES-Puffer	Saccharose	200 ml (250 g/l)	
	TE 100x	2 ml	
SDS/NaOH	SDS	3 %	
	NaOH	0,2 N	
	immer frisch angesetzt		

#### 3.5.3.4 Plasmid-Isolation großer Plasmide aus *Lactococcus* und *Lactobacillus*

Die Methode wurde speziell auf die Isolation von Plasmiden aus *Lactococcus* und *Lactobacillus* adaptiert, die eine Größe von bis zu 100 kB besitzen. Sie wurde bei dieser Arbeit zur Isolation des Protease-Lactose-Plasmides pLP712 eingesetzt.

Lösungen:

Lösung A	Saccharose	6,7 %	
	Tris/HCl	50 mM	
	EDTA	1 mM; pH 8.0	
Lösung B	Lysozym	5-10 mg/ml in	
	Tris/HCl	25 mM; pH 8.0	
Lösung C	EDTA	0,25 M	
	Tris/HCl	50 mM; pH 8.0	
Lösung D	SDS	20 %	
	Tris/HCl	50 mM	
	EDTA	20 mM; pH 8.0	
Lösung E	NaOH	3 N	
Lösung F	Tris/HCl	2 M; pH 7.0	
Lösung G	NaCl	5 M	
Lösung H	Phenol/ NaCl	3 %	

Durchführung:

1. Eine ÜNK in 5 ml frischem M17, mit 0,5 % Laktose oder Glukose, anlegen.
2. Die bewachsene ÜNK 1/50 in 5 ml des gleichen Mediums überimpfen und bis zu einer O.D.<sub>600</sub> von 0,5 bebrüten.
3. 4 ml der Kultur 20 sec in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugieren, mit H<sub>2</sub>O dest. waschen und wieder wie oben abzentrifugieren.
4. Das Pellet in 380 µl Lösung A, welche 2 min bei 37°C vorgewärmt wurde, resuspendieren.

5. Zugabe von 96 µl Lösung B, bei niedriger Geschwindigkeit vortexen.
6. Ansatz 7 min bei 37°C inkubieren.
7. Zugabe von 50 µl Lösung C, bei niedriger Geschwindigkeit vortexen.
8. 28 µl Lösung D zugeben und sofort durch mehrmaliges invertieren des Tubes mischen.
9. Ansatz 10 min bei 37°C inkubieren, um eine komplette Lyse zu erzielen.
10. 30 sec bei höchster Geschwindigkeit vortexen.
11. 28 µl Lösung E zugeben, sofort durch mehrmaliges invertieren des Tubes mischen, dann den Ansatz auf Eis stellen und mit dem Durchmischen für 10 min fortfahren; bis ein weißes Präzipitat ausfällt.
12. Zugabe von 50 µl Lösung F, Ansatz vorsichtig durch invertieren des Tubes für 5 min bei RT mischen, bis der Ansatz viskos wird und sich kleine weiße Flocken gebildet haben.
13. Zugabe von 72 µl Lösung G, durch mehrmaliges invertieren des Tubes mischen und 30 min auf Eis stellen.
14. 10 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren.
15. Überstand (~700 µl) in ein neues Tube überführen, oder das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernen.
16. Zugabe von 200 µl kalter Lösung H, mischen.
17. 2 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren.
18. Den Überstand in ein neues Tube überführen und 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben.
19. Wiederum 2 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren.
20. Den Überstand in ein neues Tube überführen und die DNA-Lösung durch Zugabe von 700 µl Isopropanol präzipitieren.
21. 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren. Überstand abpipettieren.
22. Das Pellet einmal mit 80 % EtOH waschen, 2 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren und den Überstand vollständig abnehmen. Kurz im Ofen trocknen.
23. Das trockene Pellet in 100 µl TE-Puffer (versetzt mit 5µg/ml RNase) lösen. Dieser Vorgang dauert einige Zeit!
24. Zur Analyse der Präparation 10 µl des gelösten Plasmides auf einem 0.6 % Agarosegel der Elektrophorese unterwerfen.

#### 3.5.4 Isolation von genomischer DNA und von Gesamt-DNA aus *Lactobacillus* und *Lactococcus*

##### 3.5.4.1.1 Genomische-DNA-Extraktion aus *Lactobacillen* mit dem Genomix® Genomic DNA Extraction Kit der Firma Talent SRL

1. Das Pellet von 100 (bzw. 7,5) ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wird dreimal mit jeweils 30 (1,5) ml STE-Puffer gewaschen und kurz bei -20°C eingefroren, bevor es in 2 ml (150 µl) GTE-Puffer mit Lysozym (70 mg/ml) und Mutanolysin (5 U/ml) resuspendiert und 60-120 min bei 37°C schüttelnd inkubiert wird.
2. Dann wird mit 4 (0,3) ml Lysing Solution 1 und 20-50 µg RNase A vorsichtig gemischt und 15 min bei 68°C inkubiert.
3. Nun werden 6,5 (0,49) ml Chloroform zugesetzt und nach dem Mischen für 15-25 min bei 2000-2600 g zentrifugiert.
4. Die obere wäßrige klare Phase wird in ein neues Gefäß überführt und mit 8 (0,6) ml Precipitating Solution 2 vorsichtig vermischt.
5. Das erscheinende filamentöse DNA-Präzipitat wird für 5 min bei 1500 g sedimentiert und vorsichtig in 4 (0,3) ml Ionic Exchange Solution 3 ca. 10 min auf dem Rollbrett resuspendiert.
6. Mit 8 (0,6) ml Ethanol wird die DNA wieder vorsichtig präzipitiert.
7. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 g wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen.
8. Das gut getrocknete Pellet wird in 600 (45) µl TE-Puffer bei 4°C ca. 5 Tage stehend gelöst.

#### 3.5.4.2 Gesamt-DNA aus *Lactococcus lactis* für PCR (modifiziert nach Anderson und McKay, 1983)

1. Das Pellet von 2 ml Übernachtskultur wird in 50 µl TES mit 10 mg/ml Lysozym resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert.
2. Nachfolgend werden nacheinander 32,5 µl Tris (10 mM) / EDTA (50 mM); 35 µl SDS (2 % w/v) / Tris (5 mM) / EDTA (2 mM) und 1 µl Proteinase K (0,5 mg/ml, Eurogentec) zugegeben und eine Stunde bei 55°C inkubiert.
3. Danach werden 50 µl TE-Puffer und 50 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) zugegeben.
4. Nach dem Mischen wird für 5 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und die Oberphase mit 50 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) vermischt und erneut für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. (Diese Extraktionsschritte müssen gegebenenfalls wiederholt werden, um die DNA-enhaltende Oberphase von der proteinhaltigen mittleren Phase sicher abzutrennen.)
5. Die Oberphase wird in 1 ml Ethanol (-20°C) gegeben und wie unter Punkt 3.7.2 beschrieben ausgefällt und mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen.
6. Das bei Raumtemperatur getrocknete Pellet wird in 100 µl sterilem Wasser bei 4°C über Nacht gelöst und anschließend für 10 min bei 95°C denaturiert.
7. Maximal 1 µl dieser DNA werden für eine PCR-Reaktion eingesetzt.

#### 3.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

##### 3.5.5.1 QIAquick-Gel-Extraktion

Diese Elutionsmethode, die nur für Agarosegele geeignet ist, beruht auf der Bindung von DNA (0,1 – 10 kb) an eine aus beschichtetem Silika-Gel bestehende Membran in Anwesenheit eines speziellen Bindepuffers. Die Kapazität eines QIAquick-Säulchens beträgt 10 µg DNA. Nach einer Reihe von Waschschritten zur Entfernung störender Verunreinigungen kann die DNA dann wieder mit TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O dest. eluiert werden. Es wurde der Gel-Extraktionskit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach der vom Hersteller mitgelieferten Vorschrift.

##### 3.5.5.2 Ausschleudern von DNA-Fragmenten aus Agarose

Diese Methode eignet sich zur schnellen Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen für nichtkritische Enzymreaktionen. Dabei sollte möglichst reine Agarose verwendet werden, um zusätzliche Verunreinigungen der DNA zu vermeiden.

1. Die betreffende DNA-Bande wurde nach EtBr-Färbung unter UV-Licht mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten.
2. Mit einer feinen Nadel wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß ein kleines Loch gestoßen und anschließend das untere Drittel des Gefäßes mit Glaswolle ausgelegt.
3. Das betreffende Gelstück wurde dann auf die Glaswolle gelegt und solange bei 14 krpm in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert, bis das Gelstück vollständig verschwunden war.
4. Das Eluat wurde mit 1 Volumen Chloroform 5 min auf einem Eppendorfschüttler gemischt und danach 5 min bei 14 krpm zentrifugiert.
5. Die DNA wurde durch eine Ethanolpräzipitation (3.7.2) aus der wässrigen Phase gefällt, gewaschen und in TE-Puffer oder Milliporewasser resuspendiert.
6. Die so gewonnene DNA konnte direkt weiterverwendet werden.

### 3.5.5.3 Elektroelution

Diese Methode eignet sich zur Isolierung von DNA-Fragmenten sowohl aus PAA- wie auch aus Agarosegelen, vorausgesetzt, daß 1fach TBE als Laufpuffer verwendet wurde. Die Isolierung wurde unter Verwendung einer Biometra® Elektroelutionskammer Typ-Nr. E51 durchgeführt.

1. Die betreffende DNA-Bande wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten.
2. Die Elektroelutionskammer wurde bei geöffnetem Verbindungshahn mit entgastem 0,5x TBE-Puffer bis knapp über die Bohrungen der runden Probenröge gefüllt.
3. Die Gelstücke wurden in die Probenröge gelegt und alle zugehörigen V-Bohrungen von Luftblasen befreit.
4. Das Pufferniveau wurde soweit aufgefüllt, daß die Gelstücke gerade mit Puffe bedeckt waren.
5. Der Puffer in den verwendeten V-Bohrungen wurde mit je 50 µl entgastem Hochsalzpuffer (NaAc 3 M in 0,5x TBE-Puffer + Bromphenolblau) unterschichtet und anschließend der Verbindungshahn zwischen den beiden Pufferreservoirs geschlossen.
6. Die Elution erfolgte 30 min bei einer Spannung von 150 V
7. Nach dem Elutionsvorgang wurde der Verbindungshahn wieder geöffnet und der Puffer mit der Wasserstrahlpumpe bis unter die Eintrittsöffnungen der V-Bohrungen abgesaugt.
8. Der Hochsalzpuffer, der die eluierte DNA enthielt, wurde vollständig aus den V-Bohrungen entnommen.
9. Diese DNA-Lösung wurde zunächst phenolisiert und dann die DNA ohne weitere Salzzugabe mit Ethanol gefällt.

### 3.6 Isolierung von RNA aus *Lactobacillus*

Zur RNA-Präparation aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wurde ein Verfahren angewandt, das sich bei leichter Modifikation der Verfahrensvorschrift als sehr gut geeignet bezüglich Zellaufschluß, Extraktionsmethode sowie Ausbeute und Reinheit der isolierten RNA erwiesen hat.

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Glaswaren (auch Glasperlen) ca. 16 h bei 230°C im Trockenschrank gebacken. Nicht-sterilisierbare Gegenstände wurden durch Behandlung mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0,1% SDS und anschließendem Spülen mit sterilem Millipore-H<sub>2</sub>O RNase-frei gemacht. Alle Lösungen wurden in vorgebackenen Gefäßen mit sterilem Millipore-H<sub>2</sub>O angesetzt, und falls möglich (nicht bei MOPS-Puffer), noch einmal autoklaviert. pH-Werte von Lösungen wurden anhand jeweils entnommener Aliquots eingestellt. Grundsätzlich wurde mit Handschuhen gearbeitet, die während der Präparation öfters gewechselt wurden.

Die hier beschriebene Technik basiert auf den Patenten von Chomczynski (Chomczynski, 1989; Chomczynski, 1994) und der Arbeitsvorschrift der Firma Molecular Research Center, Inc. (Cincinnati, USA). Durch die eingeführten Modifikationen eignet sich diese Methode jetzt besonders für die RNA-Isolation aus *Lactobacillen*. Die RNA wird bei dieser Methode durch eine Lösung isoliert, die im wesentlichen aus den chaotropischen Salzen Guanidiniumthiocyanat und Ammoniumthiocyanat und Phenol zusammengesetzt ist. Diese Salze bewirken eine effektive Denaturierung von Proteinen und die Deproteinierung der zu isolierenden RNA. Dadurch werden die Nukleoproteinkomplexe aufgelöst und es liegt freie RNA vor. Das Phenol denaturiert die vorhandenen Proteine vollständig. Die Kombination der Salze mit dem Phenol verhindert zudem die Oxidation des Phenols, so daß die Lösung bei 4 °C über Monate hinweg gebrauchsfähig bleibt (die Oxidationsprodukte des Phenols führen zur Degradation und zur Quervernetzung von Nukleinsäuren).

Im Vergleich zu anderen Methoden der RNA Isolation wie zum Beispiel der Extraktion der RNA durch heißes Phenol (Sambrook *et al.*, 1989) besitzt die hier beschriebene Vorschrift gleich mehrere Vorteile. Die wichtigste Eigenschaft ist die Isolierung von hochreiner und nicht-degradierter RNA, was für Transkriptionsanalysen von entscheidender Bedeutung ist. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Ausbeute an RNA.



### 3.6.1 Anzucht und Vorbehandlung der Zellen

1. Ein für das Experiment geeignetes Nährmedium wurde mit einer *Lactobacillus* Übernachtskultur bis zu einer O.D.<sub>600</sub> von 0,05 beimpft und bei 42°C bebrütet. In der Regel wurden über die gesamte Wachstumsdauer mehrere Proben entnommen, wobei sich die Volumina der abzentrifugierenden Aliquots nach der jeweiligen O.D.<sub>600</sub> der Kultur richteten. Als Berechnungsgrundlage diente dabei ein Wert von 10 ml bei O.D.<sub>600</sub> = 0,3; der entsprechend der optischen Dichte der Kultur verändert wurde.
2. Das entnommene Aliquot wurde in einem eisgekühlten Gefäß abgekühlt, mit 1/100 Volumen Thimerosal (10 mg/ml) versetzt und bei 4°C mit 5 krpm 5 min lang abzentrifugiert.
3. Das Zellpellet wurde zur Entfernung von Exopolysacchariden dreimal mit je 1 Volumen STE-Puffer gewaschen, wie unter 2. beschrieben zentrifugiert und anschließend entweder pelletiert bis zum Zellaufschluß bei -80°C eingefroren oder direkt in den Zellaufschluß (3.6.2) eingesetzt.

### 3.6.2 Aufschluß der Zellen und Isolation der RNA

1. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml der chaotropischen Lösung vollständig resuspendiert und in Ja21-Becher überführt.
2. Der Aufschluß erfolgte mit Hilfe von 0,7 g gewaschenen Glasperlen ( $\varnothing$  0,17 – 0,18 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)/ ml Reagenz. Die Zellen wurden 15 bis 20 min je 30 s gevortext und dann 30 s lang in einem auf Eis gelagertem, auf -20 °C vorgekühltem Metallblock wieder abgekühlt.
3. Der Aufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert.
4. Die Suspension wurde dann 5 min bei RT inkubiert, um eine vollständige Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu gewährleisten.
5. Danach wurde der Ansatz 10 min bei 10 krpm abzentrifugiert, damit verbliebene Zellen, die Glasperlen und ein Großteil der Polysaccharide der Zellwand abgetrennt werden konnten. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt.
6. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform / ml Reagenz wurden die Proben 15 s lang gevortext und dann 10 bis 15 min bei RT inkubiert.
7. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 14 krpm und 4 °C abzentrifugiert. Dabei bildete sich ein 3 Phasen Gemisch mit einer wässrigen Phase, einer festen Interphase und einer organische Phase aus.
8. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,25 ml Isopropanol und 0,25 ml Hochsalzpuffer / ml Reagenz gemischt.
9. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden die Proben 30 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
10. Die RNA-Pellets wurden mit 75 % EtOH (RNase-frei) gewaschen (vortexen !) und mit 7500 g 5 min bei RT abzentrifugiert.
11. Die Pellets wurden 10 min bei RT angetrocknet und in Milliporewasser (RNase-frei) bei 55 bis 60 °C gelöst.

#### Chaotropische Lösung:

Guanidiniumthiocyanat	0,8	M
Ammoniumthiocyanat	0,4	M
Na-Acetat	0,1	M
pH 5,0		
Glycerin	5	% (v/v)
Phenol	38	% (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 200 ml	
9 – 12 Monate bei 4 °C haltbar.		
pro 100 mg Zellen 2 ml Lösung einsetzen		

Hochsalzpuffer:

NaCl	1,2	M
Na-Citrat (RNase frei)	0,8	M

RNase-freies Wasser:

- Zugabe von 0,1 % DEPC zu Milliporewasser
- 2 h Inkubation unter kräftigem Rühren bei RT.
- 2 h autoklavieren zur vollständigen Entfernung des DEPC

Die Fällung der RNA unter Zugabe des Hochsalzpuffers verhindert eine Kopräzipitation der Polysaccharide. Dadurch werden aber auch kleinere RNA-Moleküle nicht mehr vollständig gefällt. Bei der Qualitätskontrolle (3.6.3) sind daher nur die Banden der 23S- und der 16S-rRNA zu sehen. Die Menge an präzipitierten kleinen RNA-Spezies reicht aber in jedem Falle für eine Detektion bei einer Northern-Blot-Analyse aus.

Sind die vorhandenen Polysaccharide bedeutungslos, so kann alternativ auch mit 0,5 ml Isopropanol / ml Reagenz ohne Zugabe von Hochsalzpuffer gefällt werden. Damit werden auch die kleineren RNA-Spezies quantitativ mitgefällt und bei der Qualitätskontrolle ist dann die 5S-rRNA-Bande zu erkennen.

#### 3.6.3 Qualitätskontrolle der RNA

Von der so isolierten RNA wurden 10 µl einer 1/100 Verdünnung mit 1/5 Volumen 6x RNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 0,8 %iges TEE-Agarosegel aufgetragen. Intakte, nicht-degradierte RNA zeigte nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid je nach Art der Präzipitation typischerweise zwei bzw. drei klar abgegrenzte Banden, die der 23S, 16S und 5S rRNA entsprechen. Bei durch Einwirken von RNasen degradierte RNA ist statt dieser Banden nur ein einheitlicher Schmier in der betreffenden Gelspur zu erkennen. Die unter 3.14 beschriebenen Maßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination durch RNasen wurden auch hier eingehalten.

### 3.7 Phenolextraktion und Präzipitation von DNA

#### 3.7.1 Phenolextraktion

1. Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-Lösung wurde diese mit gleichem Volumen äquilibriertem Phenol (Roti®-Phenol; C. Roth GmbH, Karlsruhe) versetzt und 5 min auf einem Eppendorfschüttler durchmischt.
2. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 14 krpm wurde die wässrige Oberphase abgehoben.
3. Die Extraktion wurde mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) so oft wiederholt, bis in der Interphase kein denaturiertes Protein mehr sichtbar war.
4. Zur vollständigen Entfernung des Phenols wurde dann noch zweimal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.
5. Die phenolisierte DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (3.7.2).

#### 3.7.2 Ethanolpräzipitation

1. Zur Fällung von DNA aus einer wässrigen Lösung wurde zunächst durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 die erforderliche Salzkonzentration eingestellt.
2. Das 2,5fache Volumen 100 % Ethanol (-20 °C) wurde zugegeben, sorgfältig gemischt und mindestens 30 min bei -20 °C oder über Nacht bei -70 °C gefällt. Bei sehr geringen DNA-Mengen (< 500 ng) wurden 20 µg Glykogen (Appligene) als Carrier zugesetzt.

3. Die gefällte DNA wurde in einer Heraeus-Biofuge mindestens 45 min bei 4 °C und 28 krpm abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgehoben.
4. Zur Entfernung der restlichen Salze wurde das Pellet mit 75 %igem Ethanol gewaschen.
5. Das Pellet wurde ca. 10 min bei 68 °C im Trockenschrank getrocknet und dann in TE-Puffer oder Milliporewasser gelöst.

### 3.7.3 Präzipitation von DNA mit Isopropanol

Die Vorteile dieser Fällung gegenüber der Ethanolpräzipitation liegen zum einen in dem geringeren Volumen des Ansatzes, zum anderen wird weniger RNA kopräzipitiert. Der Nachteil liegt in einem höheren Anteil an mit ausgefällten Salzen.

1. Durch Zugabe von 0,5 – 0,7fachen Volumen Isopropanol wurde die DNA ca. 10 min bei RT gefällt.
2. Die gefällte DNA wurde in einer Eppendorffzentrifuge mindestens 20 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
3. Das Pellet wurde einmal mit Isopropanol gewaschen, ca. 10 min bei 68 °C getrocknet und dann in TE-Puffer oder Milliporewasser gelöst.

### 3.7.4 Präzipitation von DNA mit Isopropanol und Ammoniumacetat

Diese Methode der DNA-Fällung wurde zur Reinigung von PCR-Amplifikaten eingesetzt. Sie hat den Vorteil, daß die in der PCR eingesetzten Nukleotide nicht mit ausgefällt werden.

1. Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 4 M Ammoniumacetat und dem 2fachen Volumen Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert.
2. Die gefällte DNA wurde in einer Eppendorffzentrifuge 30 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
3. Das Pellet wurde mit 80 %igem Ethanol gewaschen, ca. 10 min bei 68 °C getrocknet und dann in TE-Puffer oder Milliporewasser gelöst.

### 3.7.5 Präzipitation von DNA mit Polyethylenglykol

Diese Methode wurde zur Aufreinigung und Präzipitation von PCR-Produkten eingesetzt, die direkt sequenziert werden sollten.

1. Herstellen einer frischen 1/1 (v/v) Mischung von 40% PEG 8000 und 5 M NaCl.
2. Zugabe von 60 µl 20 % PEG 8000/2,5 M NaCl zu einer 100 µl PCR-Reaktion. Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 10 min.
3. Zentrifugation des Ansatzes in einer Eppendorff-Zentrifuge bei 14 krpm für 10 min.
4. Den Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen.
5. Das Pellet mit 500 µl kaltem 70 % Ethanol waschen.
6. Zentrifugation des Ansatzes in einer Eppendorff-Zentrifuge bei 14 krpm für 5 min.
7. Den Überstand vorsichtig abnehmen.
8. Das Pellet für maximal 5 min im 65°C-Ofen trocknen.
9. Das trockene DNA-Pellet in 10-50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.

### 3.8 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

#### 3.8.1 Synthese der Oligonukleotide

Die Auswahl von Primern, entweder zur Sequenzierung oder zum Einsatz in der PCR, wurde mit einem Primer-Suchprogramm (Jackson-Foundation, 1990) oder nach allgemeinen Richtlinien (Newton und Graham, 1994) direkt anhand vorhandener Sequenzdaten durchgeführt.

#### 3.8.2 Abspaltung der Schutzgruppen

Die Schutzgruppen der neusynthetisierten Oligonukleotide wurden durch 8 – 16 h Inkubation in einer mit Ammoniak gesättigten Atmosphäre bei 54 °C abgespalten.

#### 3.8.3 Entsalzen der Oligonukleotide

Zum Entsalzen wurden mit Sephadex G-25 gepackte NAPTM-10-Säulen (Pharmacia, LKB) verwendet.

1. Der Puffer mit dem die Säulen überschichtet sind, wurde abgekippt und die Säule dreimal mit je 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> äquilibriert.
2. Maximal 1 ml der DNA-Lösung wurde auf die Säule aufgetragen.
3. Die Elution der Oligonukleotide erfolgte mit 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>. Dabei wurden 8-10 Fraktionen zu je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesammelt.
4. Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde getestet, indem 2 µl jeder Fraktion auf ein Agarosegel (mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) in einer Petrischale aufgetropft wurden.
5. Unter UV-Licht konnte nun der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen verglichen werden. Die Fraktionen mit den höchsten Fluoreszenzintensitäten wurden vereinigt. Eine genaue Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (3.9).

### 3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer DNA- oder RNA-Probe erfolgte photometrisch am GeneQuant Photometer (Pharmacia, LKB) in einer Quarzküvette mit 5 mm bzw. 10 mm Schichtdicke. Dabei wurde die Absorption der geeignet verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Extinktion sollte dabei einen Wert von 1,5 nicht überschreiten. Der Quotient O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub> ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäureproben. Der Wert sollte sowohl für RNA als auch für DNA bei 1,8 – 2,0 liegen. Ein niedrigerer Wert deutet eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol an (Ausubel *et al.*, 1990). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung der folgenden Werte:

Doppelstrang-DNA:	1 O.D. <sub>260</sub> = 50 ng/µl
Einzelstrang-DNA:	1 O.D. <sub>260</sub> = 33 ng/µl
RNA:	1 O.D. <sub>260</sub> = 40 ng/µl

Zur Qualitätskontrolle wurden geeignete Verdünnungen der DNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid erfolgte die optische Qualitätsabschätzung im UV-Licht.

### 3.10 Enzymreaktionen mit DNA

#### 3.10.1 Verdau durch Restriktionsenzyme

Um optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, wurden die vom Hersteller angegebenen Puffer und Inkubationstemperaturen gewählt. Die zum Verdau notwendigen Enzymeinheiten wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{MW(\lambda)}{MW(a)} * \frac{n(a)}{n(\lambda)} = U / \mu\text{g}(a)$$

MW( $\lambda$ )	=	Molekulargewicht der DNA des Phagen $\lambda$ (32 MDa)
MW(a)	=	Molekulargewicht der zu verdauenden DNA in MDa
n( $\lambda$ )	=	Anzahl der Schnittstellen für das betreffende Enzym in $\lambda$ -DNA
n(a)	=	Anzahl der Schnittstellen für das betreffende Enzym der zu verdauenden DNA

Die zugegebene Enzymmenge betrug maximal 10 % des Gesamtvolumens. Es wurde in der Regel 1 h bei 2 – 10fachem Enzymüberschuß verdaut.

Bei Verwendung von Restriktionsenzymen, die durch Dcm- bzw. Dam-methylierte DNA beeinflusst werden, wurde die zu verdauende DNA in *E. coli* GM48 vermehrt. Da dieser Stamm Mutationen in den Genen *dcm* (DNA-Cytosin-Methylase) und *dam* (DNA-Adenin-Methylase) besitzt, findet hier keine entsprechende Methylierung der DNA statt.

#### 3.10.2 Auffüllen einzelsträngiger DNA-Enden

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der *E. coli*-DNA-Polymerase I wurden die 5'-überstehenden, einzelsträngigen Enden von DNA-Molekülen, wie sie durch Einwirken vieler Restriktionsenzyme entstehen, unter Bildung glatter, doppelsträngiger Enden aufgefüllt. Durch die 5'-3'-Polymeraseaktivität dieses Enzyms in Anwesenheit von dNTPs werden dabei die zum Einzelstrang komplementären Desoxynukleotide eingebaut.

1. Die vollständig verdaute DNA (bis zu 1  $\mu\text{g}$ ) wurde phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation gewaschen, getrocknet und in 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O dest. gelöst.
2. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  10x Puffer M (Boehringer, Mannheim), 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix und 1  $\mu\text{l}$  Klenow Enzym (1 U/ $\mu\text{l}$ ; Boehringer, Mannheim) zugegeben.
3. Die Reaktion wurde 10 min bei 37 °C durchgeführt.
4. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend eine Ethanol-fällung durchgeführt.
5. Die so behandelte DNA konnte nun ligiert oder mit anderen Enzymen behandelt werden.

dNTP-Mix: je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 10 mM Tris/HCl pH = 7,6

#### 3.10.3 Abverdauen einzelsträngiger DNA-Enden

In Abwesenheit von dNTPs besitzt die Klenow-Polymerase 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Diese Aktivität kann dazu genutzt werden, 3'-überstehende Enden, wie sie durch Einwirkung einiger Restriktionsenzyme entstehen, durch

Abbau der überhängenden Nukleotide in glatte, doppelsträngige Enden zu überführen. Die Reaktion wurde analog zur Auffüllreaktion durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, daß keine Desoxynukleotide zugesetzt wurden. Sollten in dem gleichen Reaktionsansatz sowohl 3'-Enden abverdaut, als auch 5'-Enden aufgefüllt werden, konnten beide Reaktionen sofort hintereinander durchgeführt werden. Der Ansatz wurde dazu erst 10 min bei 37 °C ohne dNTPs und anschließend 10 min nach Zugabe der Desoxynukleotide inkubiert.

#### 3.10.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei Klonierungsexperimenten kann die Rezirkularisierung von Vektor-DNA durch Entfernen der 5'-Phosphatgruppen auf ein Minimum reduziert werden. Ligation zu einem zirkulären Molekül ist dann nur noch zwischen den 5'-Phosphatgruppen des zu klonierenden DNA-Fragmentes und den 3'-OH-Gruppen des dephosphorylierten Vektors möglich. Da diese zirkuläre DNA wesentlich besser transformiert und in der Zelle nur in zirkulärer Form repliziert werden kann, besitzen fast alle Transformanten den Vektor mit dem gewünschten Insert.

Zur Dephosphorylierung wurden in dieser Arbeit alkalische Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase; Boehringer Mannheim GmbH) und der zugehörige 10x Puffer verwendet.

1. Die verdaute Vektor-DNA wurde phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert und das getrocknete DNA-Pellet dann in 89 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.
2. Es wurden 10 µl 10x CIP-Puffer und 1 µl alkalische Phosphatase (1 U/µl) zugegeben und zur Dephosphorylierung überstehender 5'-Enden 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei DNA mit glatten oder 3'-überstehenden Enden wurde 15 min bei 37 °C und 45 min bei 55 °C inkubiert.
3. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 200 mM EGTA pH 8,0 und 30 min Inkubation bei 70 °C abgestoppt.
4. Die DNA wurde zweimal phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert.
5. Nach dem Abzentrifugieren wurde das DNA-Pellet zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Die so behandelte DNA konnte dann direkt zur Ligation eingesetzt werden.

#### 3.10.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Ligase handelte es sich um T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Boehringer Mannheim GmbH). Das Enzym verbindet 3'-OH-Enden von DNA-Fragmenten mit 5'-Phosphat-DNA-Enden, wobei die notwendige Energie aus der Hydrolyse von ATP (im Ligasepuffer enthalten) stammt.

Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 – 20 µl 16 h in einem 16 °C Wasserbad. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit überstehenden Enden („sticky ends“) wurden 0,1 U/µl Ansatz an T4-DNA-Ligase eingesetzt. Bei glatten Enden („blunt ends“) wurden von der Ligase 0,2 – 0,3 U/µl Ansatz zugegeben und außerdem noch fakultativ PEG6000 (Endkonzentration 15 %), um die Molekularbewegung zu reduzieren. Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden in 2 – 5fachem molarem Überschuß zum linearisierten Vektor eingesetzt, um die Rezirkularisierung des Vektors zu vermindern.

### 3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) stellt eine effiziente Methode zur in vitro Amplifikation von DNA-Fragmenten dar. Sie wurde 1985 bei der Firma Cetus (Kalifornien) entwickelt (Saiki *et al.*, 1985).

Zur Durchführung einer PCR-Reaktion benötigt man neben eines geeigneten doppelsträngigen DNA-Templates zwei Oligonukleotidprimer, die zum Plusstrang („sense“-Primer) bzw. zum Minusstrang („antisense“-Primer) der Template-DNA komplementär sind und die zu amplifizierende Sequenz umrahmen. Die Amplifikation der Zielsequenz wird dabei durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert, die auch während der Hitzedenaturierung der DNA aktiv bleibt (Newton und Graham, 1994).

Die Vervielfältigung der Template-DNA besteht dabei im Wesentlichen aus drei Schritten:

Denaturierung:	Auftrennung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge
Annealing:	Anlagerung der Primer an die denaturierte Template-DNA
Elongation:	Synthese der Komplementärstränge

Die Einhaltung der für die einzelnen Schritte notwendigen Temperatur- und Zeitprofile wird durch die Durchführung der Reaktion in einem programmierbaren Thermocycler gewährleistet.

#### 3.11.1 PCR-Standardansatz

Für Standardamplifikationen, speziell zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen oder zur Herstellung von Sonden für die Hybridisierung, wurde die Taq-Polymerase der Firma Appligene verwendet.

Standardansatz (100 µl):	10x PCR-Puffer	10	µl
	dNTP-Mix (1,25 mM je dNTP)	16	µl
	„sense“-Primer (20 µM)	5	µl
	„antisense“-Primer (20 µM)	5	µl
	Template-DNA (2 ng – 1 µg)	10	µl
	Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5	µl
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	53,5	µl

Der Ansatz wurde gut gemischt und mit 75 µl leichtem Mineralöl (Sigma) überschichtet, um Evaporation zu vermeiden.

Temperaturprofil:	A	Denaturierung	95 °C	4 min
	B	Denaturierung	94 °C	1 min
	C	Annealing	60 °C	1 min
	D	Elongation	72 °C	1 min
	E	Elongation	72 °C	4 min

Die Schritte B – D stellen einen Zyklus dar und wurden 25 bis 30 mal wiederholt. Sowohl die Annealingtemperatur, als auch die Elongationszeit sind variabel und hängen in erster Linie von den gewählten Primern und der Länge der zu amplifizierenden DNA ab. Die Annealingtemperatur (Schritt C) ist in hohem Maße von den gewählten Primern abhängig, da deren Schmelztemperatur mit zunehmenden G+C-Gehalt steigt. Die Elongationszeit (Schritt D) ist abhängig von der Größe des zu erwartenden Amplifikates und der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase. Die Denaturierung vor dem ersten Zyklus sollte eine vollständige Trennung der DNA-Stränge und die 4 min. lange Elongationszeit am Ende der Amplifikation eine vollständige DNA-Synthese gewährleisten. Je nach Art des DNA-Templates, der Größe des Amplifikates, der Schmelzpunkte der verwendeten Primer oder der verwendeten Polymerase mußten die Standardbedingungen variiert werden.

Am Ende der Reaktion konnten zur Kontrolle der PCR-Amplifikate 5 µl direkt aus dem Ansatz auf ein Agarose- oder PAA-Gel aufgetragen werden.

### 3.11.2 Amplifikation mit der ULTma™ Polymerase

Die oben beschriebene Taq-Polymerase besitzt für die Klonierung von DNA-Fragmenten zwei nicht wünschenswerte Eigenschaften. Zum einen fehlt eine 3'-5'-proofreading Aktivität, was eine hohe Fehlerrate von ca.  $10^{-4}$  pro Base und Zyklus bedingt (Krawczak *et al.*, 1989), zum anderen werden an die 3'-OH-Enden des fertigen Produktes Adenin-Reste angehängt.

Die ULTma™ DNA Polymerase (Perkin Elmer) aus *Thermotoga maritima* besitzt im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease und damit Korrekturlese-Aktivität. Bei der Amplifikation ergibt sich daraus eine 10 – 15fach höhere Genauigkeit bei der Amplifikation (Krawczak *et al.*, 1989). Zudem werden bei der Amplifikation „glatte“ Enden erzeugt, so daß eine „blunt-end“-Ligation ohne weitere Behandlung der DNA-Fragmente (siehe 3.10.3) möglich ist.

Die „proofreading“-Aktivität der ULTma™ Polymerase bedingt allerdings auch die Gefahr, daß Primer und Template-DNA abgebaut werden. Ist dies bei der Template-DNA meist unkritisch, so kann der Verlust von einigen Nukleotiden bei den Primern zu einer verminderten Spezifität und damit zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Um diese Gefahr zu minimieren, wurde die Hot-Start-Technik verwendet. Dabei wird die DNA-Polymerase erst bei Temperaturen von über 75 °C bis 80 °C zugegeben und so eine Modifikation der 3'-Enden der Primer vermieden.

Ansatz 1:	10x PCR-Puffer	5	µl
	MgCl <sub>2</sub>	7	µl
	DNTP (1,25 mM je dNTP)	1,6	µl
	„sense“-Primer (20 µM)	2	µl
	„antisense“-Primer (20 µM)	2	µl
	Template-DNA (2 ng – 1 µg)	10	µl
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	32,4	µl
Ansatz 2:	10x PCR-Puffer	5	µl
	DNA-Polymerase	0,5	µl
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	44,5	µl

Die Amplifikationsbedingungen wurden im wesentlichen aus 3.11.1 übernommen.

### 3.11.3 Inverse PCR

Die inverse PCR stellt eine Variante der PCR dar, die dazu dient, an bekannten Sequenzen flankierende unbekannte Sequenzen zu amplifizieren, bzw. gezielte nukleotidgenaue Deletionen in Plasmiden einzuführen. Um solche Deletionen zu erzeugen, wurden die Primer so gewählt, daß deren 5'-Ende die Deletion umrahmen. Bei der Amplifikation entstehen prinzipiell immer 5'-dephosphorylierte DNA-Fragmente. Um eine Rezirkularisierung der deletierten Plasmide zu ermöglichen, wurden modifizierte Primer eingesetzt, deren 5'-Ende bereits bei deren Synthese phosphoryliert wurde (MWG Biotech).

Für die Amplifikation wurden dieselben Bedingungen verwendet wie unter 3.11.2 bereits beschrieben.

#### Aufreinigung der Amplifikate

1. Der gesamte Ansatz wurde ohne Öl mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt.
2. In einer Eppendorfzentrifuge wurde 2 min bei 14 krpm zentrifugiert und dann der DNA-haltige Überstand abgenommen.
3. Die DNA wurde anschließend mit Ammoniumacetat und Isopropanol wie unter 3.7.4 beschrieben gefällt.



Dadurch wurden Primer, dNTPs, Salze und Puffer von den PCR-Amplifikaten abgetrennt. Eine alternative Methode zur Aufreinigung war die Verwendung des Wizard™ PCR Preps DNA Purification Systems der Firma Promega. Die Aufreinigung erfolgte nach der vorgegebenen Anleitung.

### 3.11.4 Elektrophorese von DNA

#### 3.11.5 Agarosegelelektrophorese

Größere DNA-Fragmente (ca. 0,2 – 20 kb) und Plasmidmoleküle wurden in Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente.

Agarosekonzentration [%]	effektiver Trennbereich [kb]
0,6	1,0 – 20
0,8	0,6 – 9
1,2	0,4 – 6

nach Sambrook et al. (1989)

Die Größenbestimmung bei linearen DNA-Fragmenten erfolgte durch Vergleich mit geeigneten Molekulargewichtslängenstandards. Dabei ist die Wanderungstrecke umgekehrt proportional zum  $\log^{10}$  der Molekülgröße. Als Molekulargewichtslängenstandard diente  $\lambda$ -DNA (Boehringer Mannheim), die durch Verdau mit *Hind*III, *Eco*RI und Doppelverdau beider Enzyme geeignete Fragmente zur Größenbestimmung lieferte.

1. Die Agarose (SEAKEM LE-Agarose; FMC Bioproducts, Rockland) wurde in dem entsprechenden Laufpuffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd vollständig gelöst.
2. Die Elektrophoresekammer wurde mit heißem Gel abgedichtet.
3. Die restliche Agaroselösung wurde vor dem Gießen auf ca. 60 °C abgekühlt und dann in die Kammer gegossen. Die Taschen wurden durch Eintauchen eines Plexiglaskammes gebildet.
4. Nach einer Erhärtungszeit von ca. 30 min wurde die Gelkammer in eine Horizontal-Elektrophorese-Apparatur gelegt, Seitenwände und Kamm entfernt und das Gel knapp mit dem Laufpuffer überschichtet.
5. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffers versetzt und in die Geltaschen eingefüllt.
6. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 – 140 V.
7. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt (3.11.7) und dokumentiert.

Die analytischen Gele hatten in der Regel eine Stärke von 5 mm, eine Breite von 10 cm und eine Länge von 6,5 cm bzw. 13,5 cm. In die Taschen (Grundfläche 1 x 3 mm) wurden maximal 12  $\mu$ l DNA-Probe mit 10 bis 1000 ng DNA aufgetragen.

#### 3.11.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten (Größenbereich: 50 – 1000 bp) wurden vertikale PAA-Flachgele verwendet. Die Acrylamidkonzentration der eingesetzten Gele richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente.

Acrylamidkonzentration [%]	effektiver Trennbereich [bp]
3,5	1000 – 2000
5,0	80 – 500
8,0	60 – 400
12,0	40 – 200
20,0	6 – 100

nach Sambrook et al. (1989)

Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte wie für die Agarosegele beschrieben (3.11.5).

1. Zwischen zwei Glasplatten („Ohren“- und Rückenplatte) wurden „Spacer“ (1,2 mm dick) gelegt, die Platten mit Klammern fixiert und mit heißer, 2 %iger Agaroselösung abgedichtet.
2. Die Komponenten des Gels wurden unter leichtem Rühren zusammenpipettiert. Pipettierschema für Gele der Größe 130·130·1,2 mm (Höhe, Breite, Tiefe):

	Prozentigkeit der Gele [%]				
	3,5	5,0	8,0	12,0	20,0
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> [ml]	16,95	15,65	13,25	9,82	3,15
30 % Acrylamid:Bisacrylamid [ml] (29:0,8 % w/v; Roth, Karlsruhe)	2,9	4,15	6,6	10,0	16,6
5x TBE-Puffer [ml]	5	5	5	5	5
10 % APS [ $\mu$ l]	310	310	310	310	310
TEMED [ $\mu$ l]	25	25	25	25	25

3. Die Acrylamidlösung wurde zwischen die beiden Glasplatten gegossen und die Taschen mit einem Plexiglaskamm geformt.
4. Nach 30minütiger Polymerisation wurden der Kamm und der untere „Spacer“ entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt. Die Taschen wurden mit 1fach TBE-Puffer ausgespült.
5. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen (max. 30  $\mu$ l) eingefüllt.
6. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE als Laufpuffer bei 200 V ca. 1 h.
7. Nach dem Lauf wurden die Gele in Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert (3.11.7).

### 3.11.7 Ethidiumbromidfärbung von Agarose- und PAA-Gelen

Nach der Elektrophorese wurden die Agarose- und PAA-Gele in Ethidiumbromid-Lösung (5  $\mu$ g/ml) für 15 – 20 min bzw. 5 – 10 min gefärbt. Der Farbstoff interkaliert dabei zwischen den DNA-Basen, so daß die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht werden konnten.

Zur Dokumentation wurden die DNA-Banden mit einer Video Copy Processor Kamera P68E (Mitsubishi) fotografiert.

### 3.12 Sequenzgele

#### 3.12.1 Sequenzgele für die nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem ABI373A und 373 Stretch

1. Die in zweifach konzentriertem Alconox® gelagerten Glasplatten wurden unter fließendem destillierten Wasser gründlich gereinigt, mit EtOHtechn. gespült und an der Luft getrocknet.
2. Die Glasplatten wurden durch zwei „Spacer“ getrennt zusammengeklammert. Dabei wurden bei 24 cm WTR-Platten pro Seite 3 Klammern und bei 48 cm WTR-Platten 4 Klammern zum Fixieren eingesetzt.
3. Die Gellösung wurde unter Verwendung einer Fertigpolyacrylamidgel-Lösung (Biozym Diagnostik, Oldendorf) wie folgt angesetzt:

24 cm WTR-Platten (Sequagel 6):

Pufferlösung	40	ml
Monomerlösung	10	ml
APS (10 %)	0,4	ml

48 cm WTR-Platten (Sequagel XR):

Pufferlösung	60	ml
Monomerlösung	15	ml
APS (19 %)	0,5	ml

4. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und ein Blockkamm eingesetzt.
5. War das Gel nach 1,5 – 2 h auspolymerisiert, wurden die Klammern und der Rechteckkamm entfernt und stattdessen der entsprechende Haifischzahnkamm eingesetzt.
6. Das Gel wurde dann senkrecht in die Gelkammer des Sequenzers eingespannt und mit Hilfe des Lasers auf Verunreinigungen gescannt.
7. Die obere Pufferkammer wurde wasserdicht montiert und diese mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt.
8. Nachdem die Taschen gründlich mit dem Laufpuffer ausgespült worden waren, erfolgte der Vorlauf 1 h bei 2500 V, 40 mA, 37 W für den ABI373Stretch bzw. 2500 V, 40 mA, 30 W für den Abi373A. Dabei wurde eine konstante Temperatur von ca. 40 °C eingestellt.
9. Nach dem Vorlauf wurden die Taschen erneut gespült.
10. Es wurden 2,5 µl denaturierte Probe so aufgetragen, daß zunächst zwischen jeder beladenen Tasche eine freie lag und dann 5 min wie oben elektrophoretisiert.
11. Danach wurden die restlichen Proben in die noch freien Taschen aufgetragen. Taschen ohne Proben wurden mit 2,5 µl Formamid/50 mM EDTA (5:1) beladen.
12. Daraufhin wurde der Hauptlauf gestartet: 19 h, 2500 V, 40 mA, 37 W für den ABI373Stretch bzw. 14 h, 2500 V, 40 mA, 30 W für den Abi373A. Dabei fand die Detektion statt und die gescannten Daten wurden mit Hilfe des Data Collection Programms gesammelt.
13. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten mit dem Gel aus dem Sequenzer entnommen und maschinell in einer Spülmaschine gereinigt. Um eventuelle Rückstände in der Maschine zu beseitigen, wurde diese einmal ohne Inhalt gestartet. Danach wurden die Glasplatten vorsichtig in die Maschine gestellt und gereinigt. Spülmittelrückstände wurden durch einen dritten Lauf ohne Reinigungsmittel entfernt. Anschließend wurden die Glasplatten wieder in 2fach konzentriertem Alconox® gelagert.

#### 3.12.2 Sequenzgele für die nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem Li-Cor 4000L

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 66 cm bei 8 bit (Version 3) bzw. 16 bit (Version 4) verwendet.

1. Die trocken gelagerten Gelpulatten wurden gründlich unter fließendem  $H_2O_{dest.}$  gewaschen, anschließend mit EtOHtechn. gespült und an der Luft getrocknet.
2. Die Glasplatten wurden durch zwei „Spacer“ getrennt mit den entsprechenden Klammerschienen festgeschraubt.
3. Die Gellösung wurde wie folgt angesetzt:

Long Ranger Gele für 66 cm Glasplatten (4,3 %ige Gele):

LongRangerSolution 50 %	4,3	ml
Harnstoff	21	g
10x TBE-LongRun-Puffer	5	ml
$H_2O_{dest.}$	32	ml
TEMED	50	$\mu$ l
APS 10 %	400	$\mu$ l

Ein Entgasen der Gellösung war nicht nötig, da mögliche Mikro-Luftblasen nicht durch den Infrarot-Laser detektiert werden („Red Rain“). Die Spacerdicke betrug für 66-cm-Gele 0,25 mm.

4. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und ein Blockkamm eingesetzt. Dieser wurde zusätzlich mit einem Plexiglasblock fixiert.
5. War das Gel nach 1,5 – 2 h auspolymerisiert, wurden die Klammern und der Rechteckkamm entfernt und stattdessen der entsprechende Haifischzahnkamm eingesetzt.
6. Das Gel wurde dann senkrecht in die Gelkammer des Sequenzers eingespannt, die obere Pufferkammer wasserdicht montiert und diese mit 1x TBE-LongRun-Puffer aufgefüllt.
7. Nachdem die Taschen gründlich mit dem Laufpuffer ausgespült worden waren, erfolgte der Vorlauf bei 2200 V, 37 mA, 45 W, bis eine konstante Temperatur von 45 °C erreicht war.
8. Nach dem Vorlauf wurden die Taschen erneut gespült.
9. Es wurden zwischen 0,8 und 1,2  $\mu$ l denaturierte Proben aufgetragen. Leere Taschen wurden mit Probenpuffer (Formamid/50 mM EDTA (5:1), Fuchsin) beladen.
10. Daraufhin wurde der Hauptlauf mit den folgenden Parametern gestartet: 2200 V, 37 mA, 45 W, 40 Frames. Dabei fand die Detektion statt und die gescannten Daten wurden mit Hilfe des Data Collection Programms gesammelt
11. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus dem Sequenzer entnommen, gründlich unter fließendem  $H_2O_{dest.}$  gereinigt, mit EtOHtechn. gespült und trocken gelagert.

TBE-LongRun-Puffer:

Tris	162,0	g	
Borsäure	27,5	g	
EDTA	9,3	g	
$H_2O_{dest.}$	ad 1 l		pH 8,6; bei 50 °C

### 3.13 Sequenzierung von DNA

#### 3.13.1 Nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem ABI373A und 370 Stretch DNA-Sequenzer

Die hier beschriebene Methode beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977). Dabei kopieren DNA Polymerasen einzelsträngige DNA-Templates, indem sie an den neuen DNA-Strang die jeweiligen Basenpaarpartner-Nukleotide kovalent anhängen. Die Kettenelongation beginnt am 3' Ende des Primers und wird in 5'-3'-Richtung fortgeführt. DNA Polymerasen können auch Nukleotidanaloga einbauen, so daß es bei Zugabe von

2',3'-Didesoxynukleotiden zu einer Termination des DNA-Synthese kommt. Die Markierung der neusynthetisierten DNA erfolgt hier durch die Verwendung von 2'-dye-gelabelten ddNTPs unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Durch die Verwendung eines jeweils anderen Fluoreszenzfarbstoffes für die Basen A, C, G und T, die bei Anregung durch einen Argon-Ionen-Laser unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen, können alle vier Basen in einer Spur detektiert werden. Deren Emissionen werden während der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente durch einen Photomultiplier als Funktion über die Zeit aufgezeichnet, digitalisiert und anschließend durch einen Computer aufgezeichnet und ausgewertet.

Die hier verwendete Sequenzreaktion wird als CycleSequencing bezeichnet. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA lagert sich der spezifische Primer an (Annealing) und in der folgenden Elongation werden die dNTPs eingebaut, bis die Synthese durch die Anlagerung eines ddNTPs terminiert wird (Kettenabbruch). Dieser Zyklus wird 25mal in einem Thermocycler wiederholt, wobei es im Gegensatz zu einer PCR nur zu einer linearen Zunahme der Amplifivate kommt. Durch die wiederholte Denaturierung der Template-DNA kann diese immer wieder als Ausgangsprodukt wiederverwendet werden, wodurch sich die Menge an benötigter Template-DNA im Vergleich zur Sequenzierung mit der T7-DNA-Polymerase erheblich reduziert. Zur Durchführung der Reaktion wurde der PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer) verwendet. Die Synthese der neuen DNA-Stränge wird durch die AmpliTaq® DNA Polymerase, FS katalysiert. Dabei handelt es sich um eine mutierte Version der Taq-DNA-Polymerase, die mehrere Aminosäureaustausche aufweist. Die wichtigsten sind ein Austausch eines Phenylalanins gegen ein Tyrosin (F667Y) im aktiven Zentrum, was eine Verminderung der Diskriminierung der Didesoxynukleotide zur Folge hat. Außerdem wurde in der aminoterminalen Domäne ein Glycin gegen ein Aspartat (G46D) ausgetauscht, was den Verlust der 5'-3'-Exonukleaseaktivität bewirkt.

Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs ermöglicht den Einsatz unmodifizierter Primer, die damit auch für andere Anwendungen zu Verfügung stehen.

Die elektrophoretische Auftrennung und Detektion erfolgte mit Hilfe des ABI 373A bzw. ABI373 Stretch DNA Sequenzers (Applied Biosystems). Die Herstellung der verwendeten Sequenzgele wurde unter 3.12.1 beschrieben. Die Verfahren zur Isolierung der für die Sequenzierung eingesetzten DNA ist unter 3.5.1.3 und 3.5.1.4 beschrieben.

#### 1. Sequenzreaktion:

Der folgende Ansatz wurde in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

Terminator-Premix	2,0	µl
DNA-Template		
ssDNA	50	ng
dsDNA	250 – 400	ng
PCR-Produkte	10 – 50	ng
Primer	3 – 10	pmol
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10	µl

Zur Vermeidung von Evaporation wurde der Ansatz mit zwei Tropfen leichten Mineralöl (Serva) überschichtet.

Die eigentliche Sequenzreaktion erfolgte in einem DNA-Thermal Cycler TC1 (Perkin-Elmer) mit dem folgenden Temperaturprofil:

96 °C	30 s	Denaturierung
50 °C	15 s	Annealing
60 °C	4 min	Elongation

Dieser Zyklus wurde 25mal wieder, anschließend wurde die Probe bis zu ihrer Aufreinigung bei 4 °C gekühlt.

2. Probenaufreinigung (Die Reinigung der Sequenzreaktionen erfolgte nach einer modifizierten Anleitung des Herstellers.):

Die Probe wurde vollständig ohne Leicht-Öl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml) als Carrier versetzt. Anschließend wurde 1 µl NaAc (3 M, pH 4,6) zugegeben. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 25 µl EtOH p.A. 10 min lang bei RT. Die gefällte DNA wurde 30 min bei 14 krpm pelletiert und konnte dann entweder bei -20 °C aufbewahrt werden oder direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden.

3. Probenvorbereitung:

Die DNA-Pellets wurden in 2µl Formamid/EDTA (50 mM, pH 8,0) (1:5) gelöst und 2 min bei 90 °C in einem Wasserbad denaturiert. Der Probenauftrag wurde wie unter 3.12.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.13.2 Nicht-radioaktive Sequenzierung auf dem Li-Cor 4000L

Die DNA-Sequenzierung auf dem Li-Cor 4000L beruht auf dem gleichen Prinzip wie die oben beschriebene Sequenzierung auf einem ABI-DNA-Sequencer. Der wichtigste Unterschied besteht in der Verwendung von nur einem Fluoreszenzfarbstoff, statt von 4 wie bei den Systemen von Applied Biosystems. Daraus ergibt sich, daß hier für jede sequenzierte DNA, wie bei der radioaktiven Sequenzierung, 4 Spuren benötigt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch einen Infrarot-Laser angeregt, die Emissionen mit einem Photomultiplier aufgezeichnet, umgewandelt und durch einen Computer ausgewertet.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern statt von gelabelten Didesoxynukleotiden. Die Primer wurden markiert von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

#### Sequenzreaktion

Es wurde der Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing Kit der Firma Amersham verwendet. Der Sequenzansatz wurde nach der Vorschrift des Herstellers in Mikrotiterplatten zusammenpipettiert:

Premix:	DNA-Template		
	ssDNA	50	ng
	dsDNA	250 – 400	ng
	PCR-Produkte	10 – 50	ng
	Primer	2	pmol
	DMSO	0,5	µl
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 13	µl

Je 1µl des Terminationsmixes für die Basen A, C, G und T wurden mit 3 µl des Premixes zusammenpipettiert und mit 1 Tropfen Chill-out 14 Flüssigwachs (MJ Research, Inc.) überschichtet.

Die eigentliche Sequenzreaktion wurde in einem Thermal-DNA-Cycler Hybaid Omn-E (MWG-Biotech) mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

A)	95 °C	2 min	Denaturierung
B)	95 °C	15 s	Denaturierung
C)	50 – 65 °C	15 s	Annealing
D)	70 °C	15 s	Elongation

Die Schritte B bis D bilden einen Zyklus und wurden 25 bis 30 mal wiederholt.

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben mit je 3  $\mu$ l Stop-Puffer (95 % Formamid/EDTA (10 mM, pH 9), Fuchsin) gemischt und bis zur Denaturierung dunkel gelagert.

Vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min bei 70 °C in einem Thermocycler denaturiert.

#### Probenauftrag

Die Proben wurden wie unter 3.12.2 beschrieben aufgetragen.

### 3.14 Northern-Blot Hybridisierung

Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik kann eine spezifische mRNA durch Hybridisierung mit einer geeigneten DNA- oder RNA-Sonde nachgewiesen werden. Die RNA wird dabei zunächst in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt und dann auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die eigentliche Hybridisierung findet dann auf dieser Membran statt, wobei sowohl quantitative als auch qualitative Analysen der nachgewiesenen mRNA-Spezies möglich sind.

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde grundsätzlich mit Handschuhen gearbeitet und alle verwendeten Glaswaren 14 h bei 230 °C im Trockenschrank gebacken. Alle Lösungen wurden mit sterilem Milliporewasser angesetzt und deren pH-Wert mit Hilfe von Indikatorpapier eingestellt. Originalverpackte, sterile Plastikwaren wurden als RNase-frei angesehen und zu sterilisierende Plastikmaterialien wurden 1 h bei 121 °C autoklaviert.

#### 3.14.1 Auftrennung der RNA durch Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA ist es nötig die RNA zu denaturieren, um die ausgebildeten Sekundärstrukturen zu zerstören und zu unterdrücken. Daher wurden zur Elektrophorese Formaldehyd-Agarosegele verwendet, da Formaldehyd kovalent an die Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin bindet und so Basenpaarungen verhindert. Zusätzlich wird den RNA-Proben noch Formamid zugesetzt, das Wasserstoffbrückenbindungen aufbricht und so den Angriff des Formaldehyds an die Basen erleichtert.

1. Zur Herstellung eines 1,2 %igen Gels wurden 1,47 g Agarose in 106,6 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst.
2. Der Lösung wurden 12,5 ml 10x MOPS-Laufpuffer und 3,7 ml Formaldehyd zugegeben, vorsichtig gemischt und in die abgedichtete Elektrophoresekammer gegossen. Die Geltaschen hatten die Grundfläche 2-3 mm. Da Formaldehyd kanzerogen ist, erfolgen sowohl das Gelgießen als auch später der Lauf in einem Abzug.
3. Nach einer Polymerisationszeit von 30 bis 45 min in wurde das Gel in eine mit 1x MOPS-Puffer gefüllte Gelelektrophoreseapparatur gelegt. Nach einem Vorlauf von 5 min wurden die RNA-Proben direkt aufgetragen.

Für jede RNA-Probe wurde der folgende Mix vorbereitet:

10x MOPS-Laufpuffer	1,2	$\mu$ l
Formaldehyd (37 %)	2,2	$\mu$ l
Formamid	6	$\mu$ l
RNA	10	$\mu$ g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 12,4	$\mu$ l

4. Die Proben wurden zur Denaturierung 15 min bei 55 °C inkubiert und danach mit 2,4 µl RNA-Probenpuffer gemischt.
5. Dieser Ansatz wurde dann sofort auf das vorbereitete Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen.
6. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50 – 70 V (ca. 4 V/cm) für 3 – 3,5 h, bis die Bromphenolblaubande das untere Drittel des Gels erreicht hatte.

10x MOPS-Puffer:

MOPS	0,2	M
Na-Acetat	50	mM
EDTA	10	mM
pH 7,0		

Es wurde zunächst die entsprechenden Mengen an MOPS, Na-Acetat und EDTA in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst und dann der pH-Wert mit NaOH eingestellt. Der Puffer wurde nicht autoklaviert (steriles H<sub>2</sub>O) und nach dem Mischen im Dunkeln aufbewahrt. Er war in dieser Form für mehrere Wochen haltbar.

RNA-Probenpuffer:

EDTA	1	mM
Glycerin	50	%
Bromphenolblau	0,25	%
Xylen-Cyanol	0,25	%

Formaldehyd:

37%iges Formaldehyd wurde in dieser Konzentration von der Firma Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Da Formaldehyd leicht zu Ameisensäure oxidiert und diese zur Hydrolyse der RNA führt, muß darauf geachtet werden, daß der pH-Wert der verwendeten Formaldehydlösung nicht unterhalb von 4,0 liegt.

#### 3.14.2 Transfer der RNA durch Kapillarblot

1. Nach der Elektrophorese wurde das Gel dreimal je 10 bis 15 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen.
2. Die folgende Äquilibrierung in 10x SSC erfolgte solange, bis das Gel nicht mehr oben aufschwamm (ca. 45 min).
3. Vor dem Kapillartransfer wurden die nicht verwendeten Teile des Gels und die Geltaschen abgeschnitten.
4. Auf eine Glasplatte wurde ein Stück Plastikfolie glatt gespannt und das Gel mit der Oberseite nach unten auf die Folien gelegt.
5. Auf das Gel wurde die passend zugeschnittene und zuvor in 10x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Nylon 66 auf einer Polyester-Trägerfolie; Boehringer Mannheim) luftblasenfrei aufgelegt. Die Positionen der Geltaschen wurde mit Bleistift gekennzeichnet.
6. Drei gleich große (etwa 0,5 cm größer als das Gel) Blätter Gel-Blotting-Papier (GB004; Schleicher&Schuell) wurden in 10x SSC eingelegt und ebenfalls luftblasenfrei auf die Nylonmembran gelegt.
7. Darauf wurde ein ca. 5 cm dicker Stapel Papiertücher gelegt, wobei darauf zu achten ist, daß diese nicht mit dem Boden in Berührung kommen.
8. Den Abschluß bildete eine mit 1 kg beschwerte Glasplatte. Um ein vorzeitiges Austrocknen des Gels zu verhindern, wurden vorsichtig ca. 1 – 2 ml 10x SSC um das Gel herum aufgetragen.
9. Der Blot wurde über Nacht (18 – 22 h) bei RT durchgeführt. Dabei wurden die RNA-Fragmente durch die Kapillarkräfte auf die Nylonmembran übertragen.



10. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran vorsichtig vom Gel abgezogen und zur Entfernung von Agaroseresten kurz in 2xSSC geschwenkt.
11. Anschließend wurde die Membran bei RT getrocknet und zur Fixierung der RNA 2 h bei 80°C gebacken.
12. Die so erhaltenen Blots konnten bei 4 °C für mehrere Wochen aufbewahrt werden.

#### 3.14.3 RNA-Färbung mit Methylblau

Die auf die Nylonmembran übertragene RNA kann mit Methylblau angefärbt werden. Dadurch werden die Banden des RNA-Molekulargewichtlängenstandards sichtbar gemacht. Der Zustand und die Intensität der Banden des RNA-Standards geben zudem Aufschluß über Quantität und Qualität der Elektrophorese und des Transfers. Ebenso wie bei linearen DNA-Fragmenten ist auch hier die Laufstrecke direkt proportional zum log<sub>10</sub> der Molekülgröße, so daß ein Vergleich der Position der später bei der Hybridisierung detektierten RNA-Banden mit denen der Markerbanden aus der Methylblaufärbung eine Aussage über die Größe dieser Banden erlaubt.

Nach dem Backen der RNA wurden die Teile der Membran, die dem Längenstandard entsprachen, abgeschnitten. Die abgeschnittenen Membranspuren wurden 1 min in die Färbelösung gelegt und dann ca. 2 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> entfärbt, bis die RNA-Banden deutlich zu sehen waren. Nach der Färbung wurde die Membran 10 – 15 min luftgetrocknet.

Färbelösung:

Methylblau	0,03	%
Na-Acetat	0,3	M
pH 5,2		

Molekulargewichtlängenstandard: 0,24 – 9,5 kb RNA Ladder (Gibco BRL) mit der folgenden Zusammensetzung:

9,49	kb
7,46	kb
4,40	kb
2,37	kb
1,35	kb
0,24	kb

Es wurden jeweils 2 µl (1 µg/µl) aufgetragen.

#### 3.14.4 Nachweis spezifischer mRNA durch <sup>32</sup>P-markierte Sonden

Bei dieser Methode wird die DNA-Sonde mit radioaktiven Nukleotiden (hier: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP) markiert. Dieser Vorgang verläuft während der Komplementärstrangsynthese an einem denaturiertem DNA-Template unter Katalyse des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I durch den Einbau der markierten Nukleotidanaloga. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgt durch Autoradiographie.

##### 3.14.4.1 Auswahl und Reinigung der DNA-Templates

Die Auswahl geeigneter DNA-Templates für die Sonden wurde anhand der vorhandenen und neu ermittelten Sequenzdaten des Genoms von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis*. Die Templates selbst wurden durch PCR-Synthesen hergestellt.

Die Amplifikate wurde auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.11.5), und unter UV-Licht (3.11.7) mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten. Die DNA wurde aus den Agaroseblöcken wie in 3.5.5.2 beschrieben isoliert und konnte dann als Template-DNA eingesetzt werden.

#### 3.14.4.2 Markierung der Sonden

Um eine Kontamination der Umwelt durch Radioaktivität zu vermeiden, wurde die Markierung der Sonden in abgedichteten 1,5 ml Schraubeppendorfgefäßen durchgeführt.

#### 3.14.4.3 Unspezifische Markierung der Sonden durch „random“-Oligonukleotide

Die Markierung eines geeigneten DNA-Templates erfolgte durch die Verwendung des High Prime Labeling Kits der Firma Boehringer Mannheim. Es wurden ca. 100 ng Template-DNA eingesetzt und die Markierungsreaktion bei 37°C für 30 bis 60 min durchgeführt.

Die Markierung beruht auf der „random priming“ Methode (ursprünglich beschrieben von Feinberg und Vogelstein (1983), bei der Hexamere als Zufallsprimer an beliebige Stellen des DNA-Templates hybridisieren können und dann als Primer für die Synthese des komplementären Stranges dienen. Durch die Verwendung der Zufallsprimer war eine gesonderte Abtrennung der Amplifikationsprimer der DNA-Templates nicht notwendig.

1. Die Template-DNA (ca. 100 ng) wurde in einem Volumen von 10  $\mu$ l 5 – 8 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert, auf Eiswasser abgekühlt und kurz abzentrifugiert.
2. Zur Sondensynthese wurde der folgende Ansatz zusammenpipettiert:

Denaturierte Template-DNA	10	$\mu$ l
High Prime Mix	3	$\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	2	$\mu$ l

3. Die Synthesereaktion erfolgte durch 30 min Inkubation des Ansatzes bei 37 °C.
  4. Die Reaktion wurde mit 85  $\mu$ l TEN-Puffer abgestoppt.
  5. Nicht in die DNA eingebaute Radioaktivität wurde durch Gelfiltration in einer Sephadex-Spin-Column bei 3000 rpm für 3 min in einer Eppendorf Z320 Zentrifuge abgetrennt.
  6. Das Säuleneluat wurde mit einem Handmonitor auf die verbliebene Aktivität gemessen (10 – 30 kBq).
  7. Die markierte Sonde wurde dann sofort für die Hybridisierung eingesetzt
- Sephadex-Spin-Column:

In eine 2 ml-Insulinspritze wird ein Glaswollestopfen eingebracht. Die Spritze wird auf eine Wasserstrahlpumpe aufgesetzt und das in TEN-Puffer äquilibrierte Sephadex G-50 wird langsam bis ca. 0,5 cm vom oberen Rand in die Spritze gefüllt. Die Verdichtung der Sephadex G-50 Matrix (Dextran mit Epichlorhydrin quervernetzt) erfolgte durch 3 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm.

TEN-Puffer:		
NaCl	100	mM
Tris-HCl	10	mM
EDTA	1	mM
pH 8,0		

### 3.14.5 Prähybridisierung, Hybridisierung und Stringenzwaschungen

Diese Methode beruht auf einer modifizierten Anleitung von Church und Gilbert (1984).

1. Die Membran wurde mit 6 ml Church-Puffer (0,065 ml/cm<sup>2</sup> Membran) in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungssofen 60 min bei 65 °C prähybridisiert.
2. Die markierte Sonde wurde 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und auf einem Eisbad abgeschreckt.
3. Der Puffer wurde abgekippt und 4 ml (0,04 ml/cm<sup>2</sup> Membran) frischer, vorgewärmter Church-Puffer zugegeben. Die denaturierte Sonde wurde direkt in den Puffer gegeben und gemischt.
4. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C.
5. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer abgekippt, die Membran dreimal für je 2 min mit auf Hybridisierungstemperatur vorgewärmten Waschpuffer I geschüttelt und schließlich für 30 min im Hybridisierungssofen bei Hybridisierungstemperatur nachgewaschen. Diese Prozedur wurde gegebenenfalls solange wiederholt, bis die meßbare Restaktivität auf der Membran unter 100 bq lag.
6. Die Membran wurde dann mit Waschpuffer 2 bei RT nachgewaschen und nochmals mit dem Handgeigerzähler überprüft.
7. Der Blot wurde in eine Klarsichthülle eingepackt und in eine Hypercassette autoradiography cassette (Amersham) zur Autoradiographie gelegt.

Church-Puffer:

BSA (Fraktion V)	1	%
EDTA	1	mM
SDS	7	%
NaHPO <sub>4</sub>	0,25	M
pH 7,2		

NaHPO<sub>4</sub> (0,5 M):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	134	g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %)	4	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1	l
pH 7,2		

Waschpuffer 1:

BSA (Fraktion V)	0,5	%
EDTA	1	mM
SDS	5	%
NaHPO <sub>4</sub>	40	mM
pH 7,2		

Waschpuffer 2:

EDTA	1	mM
SDS	1	%
NaHPO <sub>4</sub>	40	mM
pH 7,2		

### 3.14.6 Detektion durch Autoradiographie

Die Autoradiographie erfolgte mit einem doppelseitig beschichtetem Biomax MS Röntgenfilm (Kodak) bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zur Steigerung der Empfindlichkeit (etwa Faktor 8 bis 10) wurde zusätzlich eine Verstärkerfolie (Biomax MS intensifying screen; Kodak) verwendet. Diese wird durch Strahlungsereignisse zur Fluoreszenz angeregt, was im Bereich der Ereignisse zu einer zusätzlichen Schwärzung des Röntgenfilms führt. Da es sich hierbei um eine chemisch-physikalische Reaktion handelt, wird durch die Lagerung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  deren Halbwertszeit erhöht, so daß die Strahlungsereignisse die für die Anregung der Moleküle notwendig sind, über einen längeren Zeitraum hinweg stattfinden können. Dabei lagen die Expositionszeiten zwischen wenigen Minuten und mehreren Wochen.

Die Entwicklung der Röntgenfilme wurde wie unter 3.17.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.15 In vitro Markierung neusynthetisierter Proteine

Zur in vitro Expression Plasmid-kodierter Gene wurde das *E. coli* S30 Extract System For Circular DNA der Firma Promega verwendet. Die Methode beruht auf der Anwendung eines bakteriellen, zellfreien gekoppelten Transkription-/Translationssystems wie es erstmals von DeVries & Zubay (1967) vorgestellt und später modifiziert (Zubay, 1973, Collins, 1979) wurde. Dieser S30-Extrakt enthält alle Faktoren, die zur Proteinsynthese notwendig sind. Die auf den zugegebenen Plasmiden kodierten Gene können somit exprimiert werden, sofern sie die entsprechenden Signalsequenzen (Shine/Dalgarno-Sequenz, -10-, -35-Region) besitzen. Durch Zugabe von 35S-Methionin zum Reaktionsansatz werden neusynthetisierte Proteine radioaktiv markiert.

Die Durchführung erfolgte nach der vom Hersteller mitgelieferten Vorschrift, allerdings wurde nur ein Viertel des dort angegebenen Ansatzes eingesetzt. Die verwendete Menge an Plasmid-DNA schwankte zwischen 500 ng und 1500 ng. Die synthetisierten Proteine wurden auf 12 %igen SDS-PAA-Gelen (3.16.1) aufgetrennt und dann durch Autoradiographie (3.16.3) detektiert.

### 3.16 Elektrophorese von Proteinen

#### 3.16.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einer vertikalen Flachbettapparatur. Die diskontinuierlichen Gele mit den Abmessungen 130·130·1,2 mm (Höhe · Breite · Tiefe) wurden nach einer Vorschrift von Laemmli (1970) hergestellt.

1. Die mit 0,1 % SDS, Wasser und EtOH gereinigten Glasplatten wurden durch Plexiglasspacer (0,2 mm) getrennt zusammengeklammert und mit 2 %iger Agaroselösung abgedichtet.
2. Zwischen diese senkrecht stehenden Glasplatten wurde zunächst ein ca. 8 cm hohes Trenngel gegossen. Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden dabei verschiedene Acrylamid-Prozentigkeiten eingesetzt.
3. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Gel mit wenig wassergesättigtem n-Butanol überschichtet (ca. 2 mm).
4. Nach der Polymerisation des Trenngels (30 – 45 min) wurde dessen Oberfläche mit Wasser gespült und mit Papierhandtüchern getrocknet.
5. Anschließend wurde darauf das ca. 2 cm hohe Sammelgel gegossen. Die Taschen wurden durch einen Plexiglaskamm gebildet.

	Acrylamidkonzentration [%] im Trenngel		
	8,0	10,0	12,0
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> [ml]	12,05	10,45	8,75
Lower-Tris [ml]	6,25	6,25	6,25
Acrylamid:Bisacrylamid	6,7	8,3	10
TEMED [ $\mu$ l]	40	40	40
APS 10 % [ $\mu$ l]	60	60	60

Gebrauchsfertige 30 %ige Acrylamidlösung wurde von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen. TEMED (Sigma) war ebenfalls gebrauchsfertig. 10 % APS (Serva) wurde in 500  $\mu$ l Aliquots bei  $-70$  °C gelagert.

Sammelgel (3,3 %):

H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	6,4	ml
Upper-Tris	2,5	ml
30 % Acrylamid	1,1	ml
TEMED	40	$\mu$ l
10 % APS	40	$\mu$ l

- Nach Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm und der untere „Spacer“ entfernt und das Gel in die vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt.
- Die Proteinproben und der verwendete Molekulargewichtsmarker wurden in 1x SDS-Probenpuffer 3 min aufgekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen.
- Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100 V im Sammelgel und 200 V im Trenngel und dauerte ca. 2 h.
- Nach erfolgtem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung (3.16.2) gefärbt. Bei der Auftrennung von radioaktiv markierten Proteinen wurde das Gel einer Autoradiographie (3.16.3) unterzogen.

Lower-Tris:

Tris-HCl, pH 8,8	1,5	M
SDS	0,4	%

Upper-Tris:

Tris-HCl, pH 6,8	0,5	M
SDS	0,4	%

Laemmli-Puffer:

Tris/HCl	25	mM
Glycin	200	mM
SDS	0,1	%

1x/2x SDS-Probenpuffer:

Upper-Tris	2,5	ml
Glycerin	2,0	ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,3	ml
Bromphenolblau	4	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	0,2	ml für 2x
	(5,2)	ml für 1x)

Midrange-Marker (Promega):

Phosphorylase B (UE)	97,4	kDa
BSA	66,2	kDa
Glutamat-Dehydrogenase	55,0	kDa
Ovalbumin	42,7	kDa
Aldolase	40,0	kDa
Carboanhydrase	31,0	kDa
Trypsin-Inhibitor	21,5	kDa
Lysozym	4,3	kDa

### 3.16.2 Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamidgele wurde 1 h bei 37 °C in der Färbelösung gleichzeitig gefärbt und fixiert. Anschließend wurden die Gele 2-3 h bei 37 °C bzw. über Nacht bei RT entfärbt, wobei die Färbelösung ein- bis zweimal gewechselt wurde. Ein klarer Hintergrund wurde durch mehrstündiges Entfärben in Wasser mit 0,5 % Essigsäure erzielt. Die so behandelten Gele wurden auf einem Durchlichtscanner (Umax S-12) digitalisiert und anschließend getrocknet (siehe 3.16.3 Punkt 2) aufbewahrt.

Färbelösung:

Methanol	40	%
Essigsäure	7	%
Serva Brilliant-Blue (G250)	0,25	%

Entfärbelösung:

Methanol	40	%
Essigsäure	7	%

### 3.16.3 Autoradiographie von SDS-PAA-Gelen

1. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vorsichtig abgetrennt und auf ein auf Gelgröße zugeschnittenes Blatt Whatmann 3MM-Papier gelegt.
2. Das Gel wurde mit Frischhaltefolie bedeckt und dann in einem Geltrockner unter Vakuum bei 60 – 70 °C mindestens eine Stunde lang getrocknet.
3. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR bzw. BioMax MS) aufgelegt und in einer Filmkassette zwischen 16 h und 3 Wochen lang exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte wie unter 3.17.1 angegeben.

Als Molekulargewichtsmarker wurde bei der Auftrennung radioaktiv markierter Proteine der „Rainbow™ 14C methylated protein molecularweight marker“ von Amersham mitaufgetragen:

Myosin	200,0	kDa
Phosphorylase B	97,4	kDa
BSA	69,0	kDa
Ovalbumin	46,0	kDa
Carboanhydrase	30,0	kDa
Trypsin inhibitor	14,3	kDa

### 3.17 Phototechnische Methoden

#### 3.17.1 Entwicklung von Röntgenfilmen

Der Film wurde solange im Entwicklerbad geschwenkt, bis die Signale deutlich zu erkennen waren (ca. 5 – 10 min). Anschließend wurde der Film für 60 sec in ein Unterbrecherbad gelegt (5 % Essigsäure).

Der Film wurde dann für ca. 5 min im Fixierbad geschwenkt, anschließend mindestens 10 min gewässert und schließlich bei RT getrocknet

### 3.18 Band-Migration-Assay

In dieser Arbeit wurden das gereinigte PepR1-Protein (Weber B., 1997) und über PCR gewonnene Amplifikate von Promotorbereichen ausgewählter Peptidasegene in Band-Migration-Experimenten eingesetzt.

Der Erfolg eines solchen Experiments ist abhängig von der Ziel-DNA, dem Protein, den Bedingungen zur Bindung, dem Nachweis der Spezifität der Bindung und passenden Elektrophoresebedingungen. Sie müssen für verschiedenen Protein-DNA-Bindungen optimiert werden. Die eingesetzte DNA ist normalerweise doppelsträngig und weniger als 300 bp lang. Zu den optimierbaren Bedingungen für die DNA-Proteinbindung gehören pH, Ionenkonzentration (monovalente und divalente Kationen, sowie Chelatbildner), und Temperatur. Zudem gibt es noch verschiedene Protektoren, wie Detergenzien, die die Proteinaggregation verringern, Rinderserumalbumin, das als Carrier die Aufnahme des Protein-DNA-Komplexes ins Gel erleichtert, und Protease Inhibitoren. Zur Verringerung nicht-spezifischer Interaktionen, setzt man Poly(dI-dC)-, Kalbsthymus- oder Heringsperma-DNA ein, die ebenfalls die Komplexbildung unterstützen.

#### 3.18.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA

Die in die Banshift-Assays eingesetzten durch PCR generierten DNA-Fragmente wurde nicht-radioaktiv mit Digoxigenin (DIG) - dUTP (Boehringer Mannheim GmbH) markiert. Der Vorteil gegenüber der radioaktiven Markierung liegt in der längeren Haltbarkeit der markierten DNA.

Beim DIG-dUTP sind Uridin-Nukleotide über einen Spacerarm mit dem Steroid-Hapten DIG verbunden. Damit werden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim GmbH) die 5'-überhängenden Enden von DNA-Fragmenten markiert. Die Durchführung basierte auf einer modifizierten Vorschrift von Ausubel *et al.* (1990).

1. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde folgender Ansatz pipettiert:

DIG-dUTP (1 mM)	2 µl
Markierungspuffer	2 µl
PCR-Produkt (100 ng/µl)	10 µl
T4-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	5 µl

2. Inkubation für 10 min bei 37°C.
3. Danach wurde 1 µl Mix aus je 1 mM dATP, dCTP, dGTP dazugegeben und weitere 10 min bei 37°C inkubiert.
4. Durch anschließende Ethanolpräzipitation wurden nicht eingebaute Nukleotide entfernt. Das Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst, so daß die Endkonzentration 50 ng/µl betrug. Die so gelabelte DNA war bei -20°C mehrere Wochen stabil.

Markierungspuffer: (10fach)	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	NaCl	50 mM
	DTT	1 mM

### 3.18.2 Bildung des Protein-DNA-Komplexes

1. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde folgender 20 µl Ansatz pipettiert:

5x Bindepuffer	4 µl
10x BSA	2 µl
Glycerin	3 µl
HS-DNA 1 ng/µl	1 µl
DNA-Fragment 2 ng/µl (DIG markiert)	1 µl
Protein/TE	9 µl

2. Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Die gesamte Menge wurde dann auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (5%) aufgetragen. Das Beladen des Gels fand unter Spannung von ca. 90 V statt. Dadurch sollte erreicht werden, daß der Reaktionsansatz möglichst schnell ins Gel aufgenommen wird und die Verweilzeit im Laufpuffer möglichst kurz ist.

5x Bindepuffer:	Tris/HCl, pH 8	0,1 M
	Glycerin	25 %
	EDTA	5 mM
	KCl	1 M
	DTT	5 mM

### 3.18.3 Elektrophorese

1. Die Elektrophorese erfolgte in einem 6%igen Polyacrylamidgel im Laufpuffer TEE mit Glycerin (3%).
2. Der Vorlauf wurde bei 100 V ca. 20 min lang durchgeführt.
3. Die Taschen wurden vor dem Beladen gründlich gespült. Das Gel wurde unter Spannung von 90 - 200 V beladen, die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt und dauerte ca. 2,5 h.

Polyacrylamidgel (6%)	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	19 ml
	50x TEE	250 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid	5 ml
	Glycerin	0,75 ml
	10% APS	310 µl
	TEMED	28 µl

### 3.18.4 Kapillar-Blotten

Zur Detektion wird die DNA vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen.

1. Die Probetaschen wurden abgetrennt, dann wurde das Polyacrylamidgel 5 min in Denaturierungslösung geschüttelt.
2. Anschließend wurde das Gel 10 min mit Neutralisierungslösung behandelt, die mehrfach gewechselt wurde.

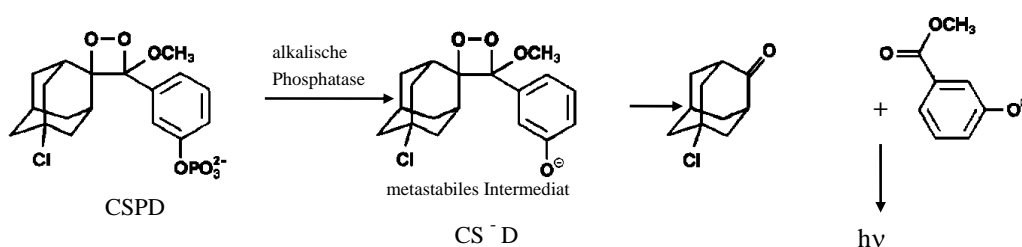


3. Zuletzt folgten 10 min in Transferlösung.
4. Das Gel wurde dann auf eine saubere Glasplatte gelegt und mit einer Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) luftblasenfrei bedeckt.
5. Auf die Membran wurden drei Lagen auf passende Größe zugeschnittenes 3 MM Filterpapier (Whatman International Ltd., England) gelegt, die vorher mit Transferlösung getränkt wurden.
6. Zur Verstärkung der Kapillarwirkung wurden noch 3-4 cm Papiertücher und eine Glasplatte aufgelegt, die mit ca. 1 kg Gewicht beschwert wurde.
7. Die DNA wurde über Nacht (mindestens 4 h) geblottet.
8. Danach wurde sie zwischen 1 MM Filterpapier 2 h bei 80°C fixiert.

Denaturierung:	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH
Neutralisierung:	1 M Tris/HCl, pH 5
	2 M NaCl
Transferlösung:	175 g NaCl
	88,2 g Tri-Na-Citrat
	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	pH 7 mit Citronensäure

### 3.18.5 Detektion durch Chemolumineszenz

Das an das Uridin gebundene Hapten Digoxigenin kann durch Antikörper-Konjugate (polyklonales Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment, konjugiert an alkalische Phosphatase) detektiert werden. CSPD (*Boehringer Mannheim GmbH*) ist ein chemolumineszentes Substrat für die alkalische Phosphatase und ermöglicht den Nachweis von Biomolekülen durch Emission von Licht. Durch die alkalische Phosphatase wird CSPD enzymatisch unter Bildung eines metastabilen Phenolat-Anions dephosphoryliert. Dieses zerfällt und emittiert dabei Licht mit einem Maximum bei 477 nm. Dieses Chemilumineszenz-Signal kann durch blaulicht-empfindlichen ECL-Film (*Hyperfilm ECL, Amersham*) dokumentiert werden.



1. Die Nylonmembran wurde auf dem Rollbrett 5 min mit Waschpuffer gewaschen und dann 30 min in Puffer 2 inkubiert.
2. Anschließend folgte eine 30 min Anti-Dig-AP- Konjugat Behandlung mit Lösung 3.
3. Zur Entfernung des überschüssigen Konjugats, wurde die Membran 3x 15 min lang mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurde 3 min mit Puffer 4 äquilibriert.
4. Die CSPD-Lösung wurde aufgetragen und mit einer Folie gleichmäßig und luftblasenfrei über die Membran verteilt.
5. Die anschließende 5 min Inkubation bei Raumtemperatur diente der Anlagerung des Substrates an die Antikörper.
6. Nach 10 min Präinkubation bei 37°C wurde ein ECL-Film 1-2 h exponiert.

Puffer 1:	Maleinsäure NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen	100 mM 150 mM
Waschpuffer:	Puffer 1 Tween 20	0,3 % (v/v)
Puffer 2:	Puffer 1 Blocking Reagenz	1 %
Puffer 3:	Puffer 2 Antikörper-Konjugat	1:10 000
Puffer 4:	Tris/HCl NaCl pH 9,5 mit HCl einstellen	100 mM 50 mM
CSPD-Lösung:	0,116 mg/ml	(0,25 mM)

### 3.19 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.19.1 Präparation zellfreier Extrakte

##### 3.19.1.1 Gewinnung von zellfreiem Extrakt aus *E. coli*

1. Eine für das Experiment geeignete Menge Nährmedium wurde 1:100 mit einer ÜN-Kultur des betreffenden Stammes beimpft und bis zu einer O.D.<sub>600</sub> von ca. 1 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Herstellung des zellfreien Extraktes zu analytischen Zwecken wurden 10-20 ml des entsprechenden Mediums beimpft.
2. Nach Erreichen der erforderlichen O.D.<sub>600</sub> wurde die Kultur 5 min bei 10 krpm und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit je 1 Vol. 20 mM Tris-HCL pH 8 gewaschen.
3. Das gewaschene Pellet wurde in 1/15 (analytisch) Vol. eines geeigneten Puffers resuspendiert und in ein eisgekühltes, ultraschallresistentes Gefäß überführt.
4. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Ultraschall (analytisch : Bandelin Sonopuls HD60, Power 70-80 %, Cycle 70 %; präparativ : Branson Sonifier, Power 3-4) entweder mit dreimal 20 Pulsen oder mit ca. achtmaliger Beschallung für jeweils 10 Sekunden. Um eine stärkere Erhitzung zu vermeiden, wurden die Proben während der Ultraschallbehandlung auf Eis gehalten, und zwischen den Beschallungsintervallen wieder auf 4°C heruntergekühlt.
5. Der Aufschluß ist makroskopisch durch eine Klärung der Suspension zu erkennen, wurde aber zusätzlich lichtmikroskopisch überprüft.
6. Zelltrümmer und unlösliche Proteinaggregate wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 10 krpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand (= zellfreier Extrakt) wurde abgehoben, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

##### 3.19.1.2 Gewinnung von zellfreiem Extrakt aus *Lactobacillus*

Die in dieser Arbeit hergestellten zellfreien Extrakte aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 dienten in erster Linie zur Bestimmung verschiedener Peptidaseaktivitäten sowie der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit von

der Kohlenstoffquelle sowie der Wachstumsphase der Kultur. Die Messung des Bakterienwachstums erfolgte durch photometrisch Bestimmung der optischen Dichte, wobei die entnommenen Aliquots vor der Messung auf einen Basiswert von 0,3 herunter verdünnt wurden. Über den entsprechenden Verdünnungsfaktor ließ sich dann die O.D.<sub>600</sub> der Kultur bestimmen. Zur Erstellung der Aktivitätsprofile wurden in der Regel eine Vielzahl von Proben entnommen, wobei sich die Volumina der abzuzentrifugierenden Aliquots nach der jeweiligen O.D.<sub>600</sub> der Kultur richteten. Als Berechnungsgrundlage diente dabei ein Wert von 500 ml bei O.D.<sub>600</sub> = 0,3. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mechanisch in einer Vibrogen-Zellmühle (Bachhofer, Degerschlacht) mit Hilfe vibrierender Glaskügelchen (Ø 0,18 mm). Dieses Verfahren bietet im Vergleich zu anderen Aufschlußmethoden (Mörsern oder Ultraschallbehandlung mit Glasperlen, French Pressure Cell) die Möglichkeit mehrere Proben parallel aufzubereiten (max.5) und mit Hilfe einer speziellen Kühlvorrichtung kontinuierlich zu kühlen. Um eine optimale Temperierung der Enzymextrakte zu erreichen, wurden sowohl der Einsatz für das Reaktionsgefäß als auch der verwendete Puffer vor Gebrauch auf Eis gekühlt.

Anzucht der Zellen und Probenvorbereitung:

1. Eine für das Experiment geeignete Menge Nährmedium wurde mit einer *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 Glycerinkultur 1:1000 beimpft und über Nacht bei 42°C bebrütet.
2. 0,5-1,5 l des gleichen Nährmediums wurden am nächsten Morgen mit der Vorkultur bis zu einer O.D.<sub>600</sub> von 0,05 beimpft und bei 42°C bebrütet.
3. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden entsprechende Mengen Bakterienkultur entnommen, in einem eisgekühlten Gefäß abgekühlt und die Zellen 10 min mit 10 krpm bei 4°C abzentrifugiert und zweimal mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen.
4. Anschließend wurden die Pellets in 5 ml des gleichen Puffers resuspendiert und in gewogene JA-21 Röhrchen überführt. Nach einminütigem Abzentrifugieren bei 14 krpm und 4°C wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Probenaufbereitung am nächsten Tag bei -20°C gelagert.

Zellaufschluß mit der Vibrogen-Zellmühle:

1. Die Naßgewichte der Zellpellets wurden bestimmt und die Zellen anschließend pro 100 mg in 170 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert.
2. Pro 100 mg Naßgewicht wurden 250 µl Glasperlen (Ø 0,18 mm ) zugegeben und das Reaktionsgefäß mit dem zugehörigen Einsatz in den Becherhalter der Zellmühle eingesetzt.
3. Nach dem sorgfältigen Verschließen der Apparatur erfolgte der Aufschluß der Zellen 10 min bei maximaler Vibrationsfrequenz unter ständiger Kühlung (4°C) des Bechereinsatzes.
4. Anschließend wurden pro 100 mg Naßgewicht nochmals 150 µl des gleichen Puffers zugegeben und kurz gevortext.
5. Zum Abtrennen der Glasperlen, Zelltrümmer sowie nicht-aufgebrochener Zellen wurde 10 min bei 14 krpm und 4°C zentrifugiert.
6. Der Überstand ( = zellfreier Extrakt ) wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, und anschließend zur vollständigen Entfernung von Glasperlen noch einmal kurz in einer Eppendorfzentrifuge bei 14 krpm zentrifugiert.
7. Der zellfreie Extrakt wurde nun aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.19.1.3 Präparation zellfreier Extrakte aus *Lactococcus*

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten zellfreien Extrakte dienten zur Charakterisierung der translationalen Promotorfusionskonstrukte des Promotors des *lacPZ(R)*-Operons aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* mit dem

promotorlosen  $\beta$ -Galaktosidasegen in *Lc. lactis*. Zur Gewährleistung einheitlicher Bedingungen bei der Herstellung der Extrakte wurden jeweils 50 O.D.-Einheiten der zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgter Induktion geernteten Kulturen eingesetzt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mechanisch in einer Vibrogen-Zellmühle (Bachhofer, Degerschlacht) unter Verwendung von Glasperlen ( $\varnothing$  0,18 mm). Dieses schonende Verfahren bietet im Vergleich zu anderen Aufschlußmethoden die Möglichkeit die Proben während des Zellaufschlusses permanent zu kühlen.

Anzucht der Kulturen:

1. 10 ml L-bzw.GM17 wurden mit 10  $\mu$ l einer Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 30°C bebrütet.
2. Je 2 x 100 ml des gleichen Mediums wurden so mit der ÜK beimpft, daß der O.D.<sub>600</sub>-Wert zwischen 0,05 und 0,06 lag. Die Kulturen wurden bei 30°C bebrütet, wobei in regelmäßigen Abständen die O.D.<sub>600</sub> der Kultur bestimmt wurde.
3. Über den Kulturverlauf wurden zu drei Zeitpunkten entsprechende Aliquots entnommen.
4. Die Zellen wurden in einen eisgekühlten Zentrifugenbecher überführt und zum sofortigen Abstoppen der Proteinbiosynthese mit 1/100 Volumen Thimerosal (10 mg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 10 krpm für 1 min abzentrifugiert, mit 1 Volumen 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen.
5. Anschließend wurden die Pellets in 1,5 ml des gleichen Puffers resuspendiert und in gewogene 2 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einminütigem Abzentrifugieren bei 14 krpm wurde das Zellnaßgewicht bestimmt und dann das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Probenaufbereitung am nächsten Tag bei -20°C gelagert.

Zellaufschluß mit der Vibrogen-Zellmühle:

6. Die Pellets wurden pro 100 mg ihres Naßgewichts mit 180  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl; pH7,5 versetzt und resuspendiert.
7. Pro 100 mg Naßgewicht wurden 250  $\mu$ l (0,5 g) Glasperlen ( $\varnothing$  0,18 mm ) zugegeben und das Reaktionsgefäß mit dem zugehörigen Einsatz in den Becherhalter der Zellmühle eingesetzt.
8. Nach dem sorgfältigen Verschließen der Apparatur erfolgte der Aufschluß der Zellen für 15 min bei maximaler Vibrationsfrequenz unter ständiger Kühlung (4°C) der Proben.
9. Anschließend wurden pro 100 mg Naßgewicht nochmals 150  $\mu$ l des gleichen Puffers zugegeben und kurz gemischt.
10. Zum Abtrennen der Glasperlen, Zelltrümmer sowie nicht-aufgebrochener Zellen wurde 2 min bei 14 krpm zentrifugiert.
11. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, durch auf- und abpipettieren gemischt, anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der zellfreien Extrakte erfolgte bei -70°C.

#### 3.19.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

##### 3.19.2.1 Standardassay (0,2-1,4 mg Protein/ml)

5 ml der Coomassie-Blau-Färbelösung wurden mit 0,1 ml der Probe (20-140  $\mu$ g Protein) vermischt und 5-30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm in 1 ml Plastikkuvetten gegen einen Leerwert aus 0,1 ml Probenpuffer und 5 ml Färbereagenz.

### 3.19.2.2 Microassay (5-100 µg Protein/ml)

0,8 ml der Coomassie-Blau-Färbelösung wurden mit 0,2 ml der Probe (1-20 µg Protein) vermischt. Die weitere Vorgehensweise entspricht dem Standardassay.

### 3.19.3 Konzentrationsbestimmung nach Spector (1978)

200 µl Coomassie-Blau-Färbelösung wurden mit 10 µl der Probe in Mikrotiterplatten vermischt, und die Extinktion gegen den entsprechenden Leerwert bei 600 nm in einem EIA-Reader (Modell 2550, BioRad) gemessen.

Coomassie-Blau-Reagenz:

- 100 mg Coomassie-Brilliant-Blau G250 (Serva) wurden in 50 ml 95%igem Ethanol gelöst, mit
- 100 ml 85%iger (w/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  versetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  auf 1 l aufgefüllt.

Zur Entfernung von Schwebeteilchen wurde die Lösung anschließend durch einen Faltenfilter filtriert und im Dunklen aufbewahrt.

### 3.19.4 Nachweis und Berechnung von Enzymaktivitäten

#### 3.19.4.1 Messung von $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten

##### 3.19.4.1.1 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in *E. coli*

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens in *E. coli* Extrakten erfolgte modifiziert nach (1972). Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach Miller (1972). Das Enzym spaltet das Substrat *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid in Galaktose und *o*-Nitrophenol. Die Menge an freigesetztem *o*-Nitrophenol wurde photometrisch bei 420 nm bestimmt.

Herstellung der Extrakte:

1. 40 ml LB-Medium wurden 1:50 mit ÜN-Kulturen der zu testenden Stämme beimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert.
2. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde je 1,8 ml Kultur entnommen, die Zellen 1 min bei 14 krpm pelletiert, mit 1,8 ml eiskaltem Z-Puffer gewaschen und in 1,8 ml Z-Puffer resuspendiert.
3. 0,5 ml der Suspension wurde zu 0,5 ml Z-Puffer, 40 µl Chloroform, 20 µl 0,1 % SDS gegeben und gründlich gevortext (40x). Der Extrakt wurde auf Eis gelagert, bis die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durchgeführt wurde.
4. Von der restlichen Suspension (Schritt 2.) wurde die O.D.<sub>600</sub> bestimmt.

Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität:

5. Folgende Ansätze wurden pipettiert und auf 28 °C vorgewärmt:

ONPG-Lösung	0.2 ml (4 mg/ml in 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,0)
Z-Puffer	1 ml minus Extraktvolumen

6. Zum Starten der Reaktion wurde Extrakt zugegeben, gemischt und bei 28°C inkubiert. Dabei wurde ein Volumen von 30 bis 100  $\mu$ l Extrakt unverdünnt, 1:10 oder 1:20 verdünnt eingesetzt.
7. Die Reaktion wurde nach 10 min bis 2 h Inkubationszeit (O.D.<sub>420</sub>=0.6 bis 0.9) durch Zugabe von 0.5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt. Vom Ansatz wurde die O.D.<sub>420</sub> und O.D.<sub>550</sub> bestimmt und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach folgender Formel errechnet:

$$A/O.D._{.600} = 1000(O.D._{.420} - 1,75 \times O.D._{.550}) / (t \times V \times O.D._{.600}) \text{ und Auftragung gegen die Zeit}$$

bzw.

$$A = 1000(O.D._{.420} - 1.75 \times O.D._{.550}) / (t \times V) \text{ und Auftragung gegen O.D._{.600} der Kultur}$$

A: Aktivität, t: Inkubationszeit (min), V: eingesetztes Extraktvolumen (ml)

#### 3.19.4.1.2 Bestimmung der *E. coli* $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in Extrakten von *Lactococcus lactis*

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ausgehend vom  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens von *E. coli* in zellfreien Extrakten *L. lactis* erfolgte modifiziert nach (1972). Das Enzym spaltet das Substrat *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid in Galaktose und *o*-Nitrophenol. Die Menge an freigesetztem *o*-Nitrophenol wurde photometrisch bei 420 nm bestimmt.

Durchführung:

1. In einer Kunststoff-Einwegküvette das  $\beta$ -D-Galaktosidase-Substrat und den Aufschlußpuffer (entsprechend der gewünschten Verdünnung des Zellextraktes) vorlegen;
2. Probe in Photometer bei 30°C für 5 min vorwärmen; Reaktion durch Zugabe des Zellextraktes starten.
3. Die Enzymaktivitäten der Zellextrakte wurden in einem Volumen von 1 ml bei 420 nm bei einer Temperatur von 30°C bestimmt. Die Messung erfolgte in 1 min-Abständen über einen Zeitraum von 30 min.

Berechnung der Enzymaktivität:

Substrat  $\beta$ -D-Galaktosidase (*E. coli*)      *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid [4mg/ml]    13,3 mM

$$\frac{S \times 1000}{\epsilon \times P} = \text{Aktivität [nmol / mg x min]}$$

S = Steigung ( $\Delta$ Extinktion/min)

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient des abgespaltenen ONP-Restes bei 420 nm = 0,045 nmol/ml

P = Einsatz Zellextrakt

#### 3.19.4.1.3 Bestimmung der *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (LacZ) in zellfreien Extrakten von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* erfolgte modifiziert nach (1972). Das Enzym spaltet das Substrat *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid in Galaktose und *o*-Nitrophenol. Die Menge an freigesetztem *o*-Nitrophenol wurde photometrisch bei 420 nm bestimmt.

Durchführung:

1. In einer Kunststoff-Einwegküvette das  $\beta$ -D-Galaktosidase-Substrat und den Aufschlußpuffer (entsprechend der gewünschten Verdünnung des Zellextraktes) vorlegen;
2. Probe in Photometer bei 42°C für 5 min vorwärmen; Reaktion durch Zugabe des Zellextraktes starten.
3. Die Enzymaktivitäten der Zellextrakte wurden in einem Volumen von 1 ml bei 405 nm bei einer Temperatur von 42°C bestimmt. Die Messung erfolgte in 0,5 min-Abständen über einen Zeitraum von 20 min.

Berechnung der Enzymaktivität:

Substrat der  $\beta$ -D-Galaktosidase *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid [4mg/ml] 13,3 mM

$$\frac{S \times 1000}{\epsilon \times P} = \text{Aktivität } [\mu\text{mol} / \text{mg} \times \text{min}]$$

S = Steigung ( $\Delta$ Extinktion/min)

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient des abgespaltenen ONP-Restes bei 420 nm = 0,045 nmol/ml

P = Einsatz Zellextrakt

#### 3.19.4.2 Bestimmung von Peptidaseaktivitäten

##### 3.19.4.2.1 Bestimmung der PepI-, PepX-Aktivitäten durch Hydrolyse von *p*-Nitroanilid-Substraten

Durch die Spaltung von geeigneten chromogenen *p*-Nitroanilid (*p*-NA) Substraten können Peptidaseaktivitäten sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden. Die hydrolytische Aktivität führt dabei zur Freisetzung von grün-gelbem *p*-Nitroanilin, das photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann. Die verwendeten *p*-NAs wurden von der Fa. Bachem (Heidelberg) bezogen.

Die quantitative Bestimmung der Peptidasaktivitäten aus Zellextrakten von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 erfolgte per Endpunktmessung in Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg am Ultrospec Plus Photometer (Pharmacia). Die Enzymlösung mußte zuvor so verdünnt werden, daß nach 30-60 minütiger Inkubation des Reaktionansatzes die gemessene Extinktion einen Wert von 0,6-0,8 nicht überstieg. Auf diese Weise wurde gewährleistet, daß sich die ermittelten Werte im linearen Meßbereich befanden. Dieser mußte zuvor durch Erstellung einer Eichkurve mit freiem *p*-Nitroanilin (Merck) bestimmt werden.

1. Zur quantitativen Bestimmung der Peptidaseaktivität wurden 20  $\mu$ l einer geeigneten Enzymverdünnung mit 400  $\mu$ l des jeweiligen Puffers in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt, kurz gevortext und anschließend 5 min bei 37°C (PepI: 32°C) äquilibriert.
2. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20  $\mu$ l der entsprechenden *p*-NA Lösung (45 mM) in einer Endkonzentration 2 mM gestartet und 30-60 min bei 37°C (PepI: 32°C) im Dunkeln inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Enzymlösung diente dabei als Referenz.

- Die Reaktionsansätze sowie die Kontrolle wurden 5 min bei 95°C inkubiert und zur Sedimentation von ausgefallenem Protein 10 min bei 14 krpm abzentrifugiert.
- Die Extinktion der abgestoppten Ansätze wurde bei 405 nm gegen die entsprechenden Leerwerte bestimmt.

Als 1 U Enzymaktivität wurde die Freisetzung von 1µmol *p*-Nitroanilin pro Minute definiert. Die freigesetzte Menge wurde über den molaren Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitroanilin errechnet:

Berechnung:

Molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von *p*-Nitroanilin (*p*NA):  $(9,9 \cdot 10^6) \cdot \text{cm}^2/\text{Mol}$

$$\boxed{U/\text{ml} = (\Delta A_{405 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}) / (0,0099 \cdot 10^3) \cdot (x) \cdot (y) \cdot (z)}$$

wobei  $x$  = Umrechnungsfaktor auf 1 ml Reaktionsansatz

$y$  = Verdünnungsfaktor

$z$  = Umrechnungsfaktor auf 1 ml Proteinlösung

$$U/\text{mg (spezifische Aktivität)} = (U/\text{ml}) / (\text{mg Protein/ml})$$

Inkubationsbedingungen:

Peptidase	Puffer	Substrat
<b>PepI</b>	100 mM Tris-HCl + 0,1 % BSA pH 7,5	2 mM H-Pro- <i>p</i> NA x HBr in MeOH (MW 316,2)
<b>PepX</b>	20 mM HEPES + 0,1 % BSA pH 7,0	2 mM H-Ala-Pro- <i>p</i> NA x HCl in DMF (MW 324,8)

#### 3.19.4.2.2 Bestimmung der PepQ-Aktivität

Die qualitative Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der PepQ aus Zellextrakten von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 erfolgte durch Bestimmung des aus dem Dipeptid Leu-Pro (Stucky *et al.*, 1995a) freigesetzten Prolins. Die Menge des freigesetzten Prolins konnte nach Umsetzung mit Ninhydrinreagenz photometrisch bei 480 nm bestimmt werden (Morel *et al.*, 1999). Da die Derivate der Iminosäure Prolin im Gegensatz zu den Aminosäurederivaten ein anderes Absorptionsmaximum besitzen, konnte der Substratumsatz anhand einer mit freiem Prolin erstellten Eichgerade bestimmt werden.

- Der folgende Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 42°C inkubiert:

200 µl Puffer: 0,125 mM Na-Citrat, 3,125 mM ZnSO<sub>4</sub>, 8 mM Leu-Pro  
50 µl Extrakt

- Es wurden 620 µl Ninhydrinreagenz sowie 620 µl Eisessig zugesetzt und die Reaktion bei 100°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die O.D.<sub>480</sub> der Ansätze bestimmt.

Herstellung des Ninhydrinreagenz:

6 g Ninhydrin werde in 200 ml eines 80:120 (v/v) Gemisches aus 6 M Phosphorsäure und Eisessig gelöst.



3.19.4.3 Nachweis der *D*-Laktat-Dehydrogenase von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis*

Dieser Nachweis wurde analog der von Bernard *et al.* (1991) publizierten Vorschrift durchgeführt.

## Material:

Phosphatpuffer, pH 5,6	
73 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,993 g/100 ml
3,5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,062 g/100 ml

Na-Pyruvat (MW 110,05)	
50 mM Lösung	0,550 g/100 ml
	immer frisch ansetzen

NADH/Natriumsalz (MW 763,5)	
10 mM Lösung	0,0076 g/ml

## Reaktionsansatz:

Phosphatpuffer, pH 5.6	960 – x $\mu\text{l}$
Na-Pyruvat-Lösung, 50 mM	20 $\mu\text{l}$
NADH-Lösung, 10 mM	20 $\mu\text{l}$
Enzymlösung	x $\mu\text{l}$ (1-50 $\mu\text{l}$ zellfreier Extrakt)

## Messung:

Abnahme der Extinktion bei 340 nm, 25°C

## Berechnung:

Eine Zunahme der Extinktion bei 340 nm um 0,1 entspricht 0,048  $\mu\text{mol}$  umgesetztem NADH.  
1 Unit entspricht 1  $\mu\text{mol}$  umgesetztem NADH pro Minute.

3.19.4.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten in *Staphylococcus xylosus*

Enzymaktivitäten von *S. xylosus* wurden in Zellextrakten bestimmt. Die Methode beruht darauf, die Abspaltung des Para-oder Orthonitrophenylrests (PNP, ONP) von nicht physiologischen Zuckersubstraten photometrisch nachzuweisen.

## Zellaufschluß:

## Material und Lösungen:

- sterile Glasperlen
- Z-Aufschlußpuffer (modifiziert nach Miller, 1972)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	60 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	40 mM
KCl	10 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1 mM

Durchführung:

1. ÜNK von *S. xylosus* in 10 ml B-Medium animpfen und bei 37°C schüttelnd inkubieren;
2. 100 ml B-Medium (versetzt mit 25 mM der gewünschten Kohlenstoffquelle) mit einer ÜNK bis zu einer O.D.<sub>578</sub> von 0,1 animpfen und bei 37°C schüttelnd inkubieren;
3. 40 ml der Kultur bei O.D.<sub>578</sub> 1,5 ernten und in JA-20 Zentrifugenröhrchen abzentrifugieren (Beckman Zentrifuge, 8000 rpm 10 min, 4°C);
4. Pellet in 10 ml Aufschlußpuffer resuspendieren, in 15 ml Corex-Röhrchen überführen und abzentrifugieren (Beckman Zentrifuge, JA-20 Rotor mit Adapter, 8000 rpm, 10 min, 4°C);
5. Zellpellet in 500 µl Aufschlußpuffer resuspendieren, 1 g Glasperlen hinzufügen und 3 x 1 min vortexen (Heidolph Vortex, Reax 2000); dazwischen die Proben jeweils 1 min auf Eis stellen;
6. abzentrifugieren (Beckman Zentrifuge, JA-20 Rotor mit Adapter, 8000 upm, 10 min, 4°C);
7. Überstand abheben und in ein steriles 2 ml ERG überführen (auf Eis halten);
8. Zellpellet in 500 µl Aufschlußpuffer resuspendieren, 1 min vortexen, abzentrifugieren und Überstand abheben. Diesen Arbeitsschritt insgesamt 3x durchführen, die Überstände vereinigen und auf Eis halten;
9. die gesammelten Zellextrakte (ca. 2 ml) zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge, 13000 rpm, 10 min, 4°C) und Überstand in frisches ERG überführen.

Die Zellextrakte können bei -20°C über mehrere Tage gelagert werden, ohne daß die Enzymaktivität nennenswert nachläßt.

#### 3.19.4.4.1 Photometrische Bestimmung der Enzymaktivitäten

Durchführung:

1. In einer Kunststoff-Einwegküvette das  $\alpha$ -Glucosidase- bzw. das  $\beta$ -D-Galaktosidase-Substrat und den Aufschlußpuffer (entsprechend der gewünschten Verdünnung des Zellextraktes) vorlegen;
2. Probe in Photometer bei 30°C für 5 min vorwärmen; Reaktion durch Zugabe des Zellextraktes starten.
3. Die Enzymaktivitäten der Zellextrakte wurden in einem Volumen von 1 ml bei 405 nm ( $\alpha$ -Glucosidase) bzw. 420 nm ( $\beta$ -D-Galaktosidase) bei einer Temperatur von 30°C bestimmt. Die Messung erfolgte in 1 min-Abständen über einen Zeitraum von 30 min.

Berechnung der Enzymaktivität:

Substrat $\alpha$ -Glucosidase:	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid	10 mM
	Stammlösung in einer Konz. von 20 mM mit Aufschlußpuffer ansetzen	
Substrat $\beta$ -D-Galaktosidase ( <i>E. coli</i> )	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid [4 mg/ml]	13,3 mM

$$\frac{S \times 1000}{\epsilon \times P} = \text{Aktivität [nmol / mg x min]}$$

S = Steigung ( $\Delta$ Extinktion/min)

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient

des abgespaltenen PNP-Restes bei 405 nm = 0,014 nmol/ml bzw.

des abgespaltenen ONP-Restes bei 420 nm = 0,045 nmol/ml

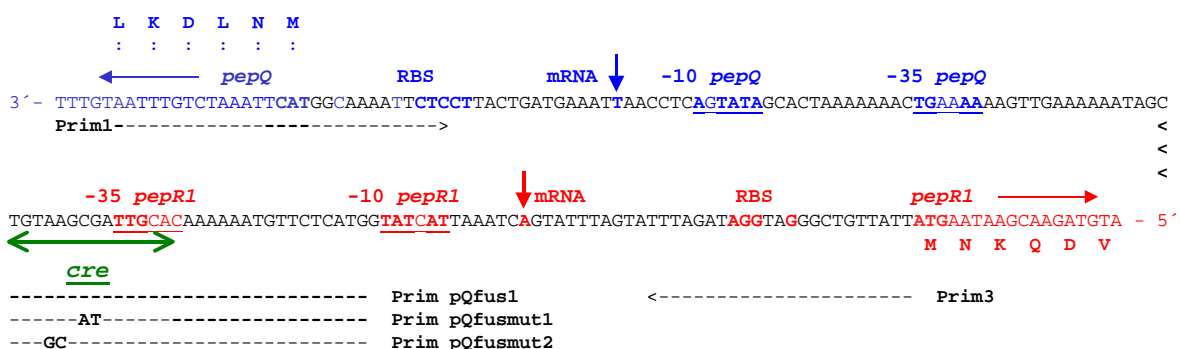
P = Einsatz Zellextrakt

## IV. Ergebnisse

Diese Arbeit setzt die von Stucky (Stucky, 1995; Stucky *et al.*, 1996) begonnene Analyse zur Genregulation durch den PepR1 genannten potentiellen transkriptionellen Regulator aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 fort. Das *pepRI*-Gen wurde aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten zu anderen regulatorischen Genen aus der GalR/LacI-Familie transkriptioneller Regulatoren (Weickert und Adhya, 1992) identifiziert. Es liegt in chromosomaler Nachbarschaft zum *pepQ*-Gen, welches für die Peptidase Q kodiert (siehe Abb. 4.1) und besitzt das Potential für eine Polypeptidkette von 333 Aminosäuren zu kodieren, die eine kalkulierte molekulare Masse von 36.955 Da und einen isoelektrischen Punkt von 5,5 aufweist. Die Gene *pepRI* und *pepQ* sind divergierend angeordnet. Die kodierenden Sequenzen sind durch eine intergene Region von 152 Basenpaaren getrennt, welche Promotoren und potentiell regulatorische Sequenzen beherbergt.

### 4.1 Das *cre* (catabolite responsive element) der *pepRI-pepQ* intergenen Region – Funktionelle Analyse von Wildtyp und Mutanten im heterologen *E. coli* System

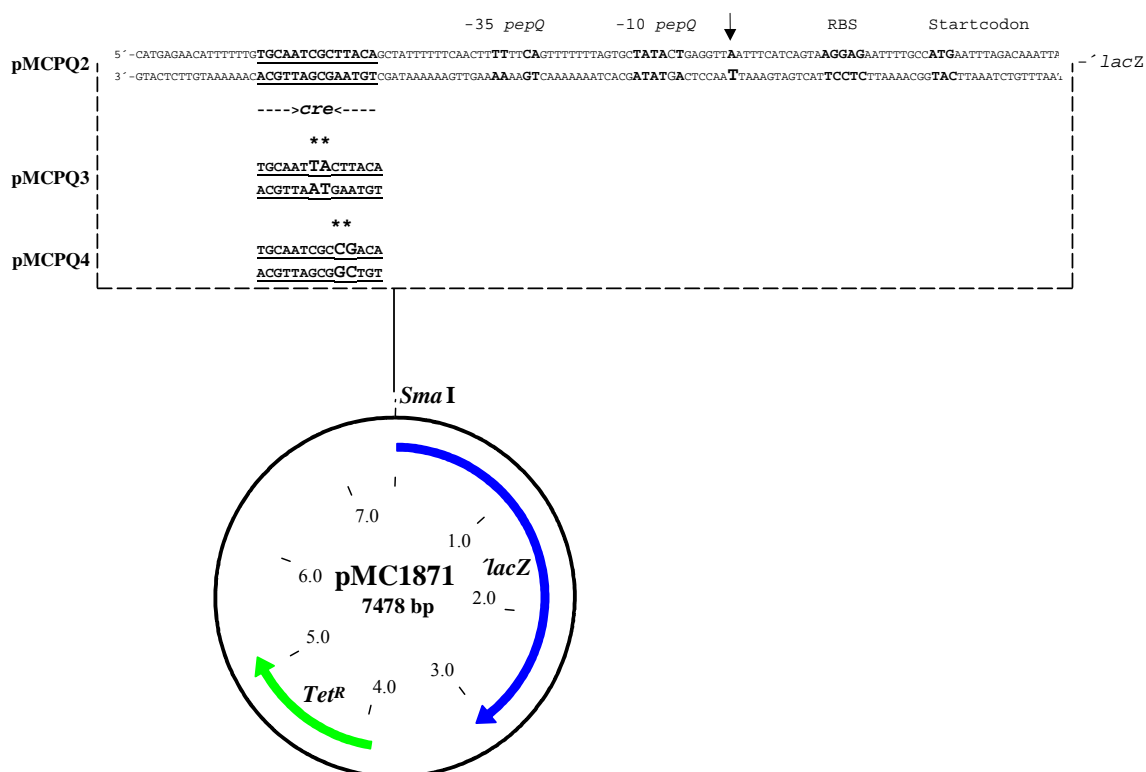
Bei vorangegangenen vorläufigen Analysen (Stucky *et al.*, 1996) konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von PepR1 die Aktivität des Promotors des *pepQ* Genes erhöhte. Die *pepQ* Upstream-Region war hierzu inklusive der ersten sechs Kodons des *pepQ* Genes mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen aus *E. coli* translational fusioniert (Plasmid pMCP1). Das dort benutzte, durch PCR erzeugte, 170 bp-Fragment umfaßte die in **Abb. 4.1-1** durch die mit den Primern **Prim1** und **Prim3** gekennzeichnete intergene Region einschließlich der ersten sechs Tripletts des *pepQ* Genes, welche bei translationaler Fusion sechs der acht dem N-terminal trunkierten LacZ fehlenden Aminosäuren ergänzte. Die originale Aminosäurenabfolge der Primärsequenz von LacZ wurde hierbei von M T M I T N S S zu M N L D K L verändert und gleichzeitig verkürzt.



**Abb. 4.1-1: Die *pepQ-pepRI* intergene Region.** Die Abbildung stellt die 152 Basenpaare umfassende Region zwischen den divergierend angeordneten Genen *pepQ* und *pepRI* dar. Hervorgehoben sind die Startkodons der beiden Gene, ihre mRNA-Startstellen ( $\downarrow$ ), Ribosomenbindestellen (RBS) sowie die jeweiligen -35- und -10-Regionen. Zusätzlich sind die 14 bp palindromische Sequenz (*cre*) und die von den Nukleotidsequenzen abgeleiteten ersten sechs Aminosäuren beider Polypeptidketten sowie die zur Amplifikation von *pepQ*-Promotorfragmenten benutzten Primer als gestrichelte Pfeile angegeben. Abweichungen der Primer- von der *wt*-Sequenz sind hier in fett gedruckten Großbuchstaben kenntlich gemacht.

#### 4.1.1 Subklonierung des *pepQ*<sub>wt</sub>-Promotors und mutierter Varianten in pMC1871

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, wie sich Mutationen im *catabolite responsive element* (*cre*) auf die Beeinflussung der *pepQ*-Promotoraktivität durch PepR1 im heterologen *E. coli* System auswirken. Zu diesem Zweck wurde die Größe des *pepQ*-Promotorfragmentes auf 123 Basenpaare verringert. Dies geschah, um mit Hilfe mutagenisierender Primer einfach die die *cre*-site betreffenden Mutationen einführen zu können. Mit den das *cre* überlappenden Primern, welche entweder der Wildtyp-Sequenz entsprachen, oder einfache bzw. doppelte Basenaustausche enthielten, konnten verschiedene Amplifikate erzeugt werden. Die im folgenden näher beschriebenen Doppelmutationen sind aus Kombinationen mit dem Primer **Prim1** und den unterschiedlichen Gegenstrang-Primern (**Prim**) **pQfus1** bzw. **pQfusmut1** und **pQfusmut2** entstanden (**Abb. 4.1**, **Tab. 4.1.1-1**, die Nukleotidsequenzen der Primer sind dem Anhang zu entnehmen). Die Fragmente, die den *pepQ*-Promotor einschließlich der Triplets, die für die ersten sechs AS der PepQ kodieren, enthielten, wurden als PCR-Produkte in die *Sma*I-Schnittstelle des  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsvektors pMC1871 (Fa. Promega) kloniert (**Abb. 4.1.1-1**).



**Abb. 4.1.1-1** Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMCPQ2 /..Q3 und ..Q4. Die Abbildung zeigt den Vektor pMC1871 und die in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle (blunt) von pMC1871 inserierten, teilweise mutierten Fragmente der *pepQ*-Promotor- und 5'-Genabschnitte. Mutationen in *cre* (*catabolite responsive element*) sind mit \* gekennzeichnet. Die relevanten Elemente der klonierten *PpepQ*-Fragmente sind fett gedruckt dargestellt, der Transkriptionsstart des *pepQ* Genes (Matern *et al.*, 1994) ist mit einem Pfeil (↓) markiert. *Tet<sup>R</sup>*, Tetracyclin-Resistenz; *lacZ*, 5'-trunkiertes *lacZ*-Gen.

Die Amplifikation der betreffenden Fragmente wurde mit der ULTma DNA-Polymerase unter Standardbedingungen durchgeführt. Als Template diente pMS1 Plasmid-DNA (Stucky *et al.*, 1995a). Beim Plasmid pMS1 handelt es sich um einen Klon aus einer Genbank mit größenfraktionierten *Sau3A*-Fragmenten (4-10 kb) von chromosomaler *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DNA, inseriert in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pLG339. Das 3,9 kb große Insert chromosomaler DNA beinhaltet die vollständigen Gene *pepQ* und *pepR1*. Plasmid pMS1 vermittelte die Komplementation einer *pepQ*-Mutante von *E.coli*. Die PCR-Reaktionen enthielten keine Nebenprodukte unerwünschter Größe und konnten deshalb direkt in die Ligation des mit *Sma*I linearisierten Vektors pMC1871 eingesetzt werden. Die Ligationsansätze, einschließlich einer nur aus restringiertem und religiertem Vektor bestehenden Ligationskontrolle, wurden in *E. coli* JM109 transformiert. Die Transformationsansätze wurden nach Erholung auf LB-Platten, die Tetracyclin und *X-Gal* enthielten, ausplattiert. Nach 36 – 48 Stunden zeigten sich Kolonien, welche durch die Spaltung des Farbstoffes *X-Gal* schwach blau bis blau waren. Diese, durch die komplettierte  $\beta$ -Galaktosidase hervorgerufene, Spaltung des Farbstoffes *X-Gal* konnte bei leicht blau gefärbten Klonen durch direktes Auftropfen einer 2 %igen *X-Gal*-Lösung auf die Kolonie auch unmittelbar nachgewiesen werden. Klone, die eines der gewünschten rekombinanten Plasmide enthielten, färbten sich dann binnen Sekunden tiefblau. Nachfolgend wurden für jedes zu erstellende Konstrukt je zwölf Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Alle isolierten Plasmide wiesen die erforderliche Größe von 7,6 kB auf, woraufhin pro Konstrukt je 6 Plasmide in die weitere Analyse eingesetzt wurden. Die rekombinanten Plasmide wurden des weiteren in Nachweis-PCR-Reaktionen eingesetzt, wobei die oben erwähnten Gegenstrang-Primer -jeweils getrennt voneinander- zusammen mit einem Primer (pMCKon, siehe Anhang), der im *'lacZ*-Gen entgegen dessen Leserichtung hybridisierte, kombiniert wurden. Nur wenn die jeweiligen *pepQ*-Promotorfragmente in der richtigen Orientierung in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pMC1871 inseriert waren, konnte bei der Standard-PCR-Reaktion jeweils ein 683 bp großes PCR-Produkt entstehen. Dies konnte bei mindestens drei der sechs analysierten Plasmide gezeigt werden. Je drei der rekombinanten Plasmide, die bei dieser Nachweis-PCR-Reaktion ein positives Resultat zeigten, wurden zur abschließenden Sicherstellung der Richtigkeit der unveränderten oder mutierten Sequenzabschnitte mit Hilfe des Primers pMCKon (siehe Anhang) sequenziert. Je eines der Plasmide, dessen Sequenz bezüglich *'lacZ* und kloniertem Promotorabschnitt bestätigt werden konnte, wurde in die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

forward Primer	reverse Primer	Größe PCR-Produkt [bp]	resultierende <i>cre</i> -Sequenz	Bezeichnung	resultierendes Plasmid
Prim1	pQfus1	123	5´ -TGCAATCGCTTACA	<i>cre</i> <sub>wt</sub>	pMCPQ2
Prim1	pQfusmut1	123	5´ -TGCAAT <b>T</b> ACTTACA	<i>cre</i> <sub>mut1</sub>	pMCPQ3
Prim1	pQfusmut2	123	5´ -TGCAATCG <b>CC</b> GACA	<i>cre</i> <sub>mut2</sub>	pMCPQ4

**Tab. 4.1.1-1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMCPQ2 /..Q3 und ..Q4.** Die Tabelle zeigt die aus den erstellten PCR-Produkten resultierenden Nukleotidabfolge des *cre*, mutierte Basen sind hervorgehoben. Die zur Subklonierung von *pepQ*-Promotorfragmenten benutzten Oligonukleotide sind ebenso wie die Größen der jeweiligen PCR-Produkte, die Bezeichnung für die Mutation und die Namen der resultierenden Plasmide eingetragen.

#### 4.1.2 Einfluß des Regulators PepR1 auf die Expression der verschiedenen *PpepQ::lacZ*-Translationsfusionen im heterologen *E. coli* Wirt

Die unter 4.1.1 erstellten Konstrukte wurden nun in *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ) jeweils mit einem zweiten, kompatiblen Plasmid, pFNP13 (Stucky *et al.*, 1996), welches das gesamte *pepR1*-Gen einschließlich seines eigenen Promotors als 1325 bp PCR-Fragment in der *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pFN476 trug, co-transformiert. Der Ampicillinresistenz vermittelnde Vektor pFN476, welcher das Fragment mit dem *pepR1*-Gen nicht trug, diente als Kontrolle. Kolonien, die auf LB-*X-Gal*-Agarplatten, die mit Tetracyclin und Ampicillin versetzt waren, Blaufärbung zeigten wurden abgeimpft, die Plasmide durch Minipräparation isoliert und durch Restriktionsanalyse überprüft. Zum Einsatz in  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen (Miller, 1972) wurden 5ml-Übernachtskulturen aus diesen Stocks angelegt und die Messungen anschließend mit frisch überimpften Übertagkulturen durchgeführt. Mit über den Zeitverlauf der wachsenden Kultur entnommenen Aliquots wurden die jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt. Die Abbildungen 4.1.2-1 bis 4.1.2-3 zeigen die Resultate der Wachstums- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen.

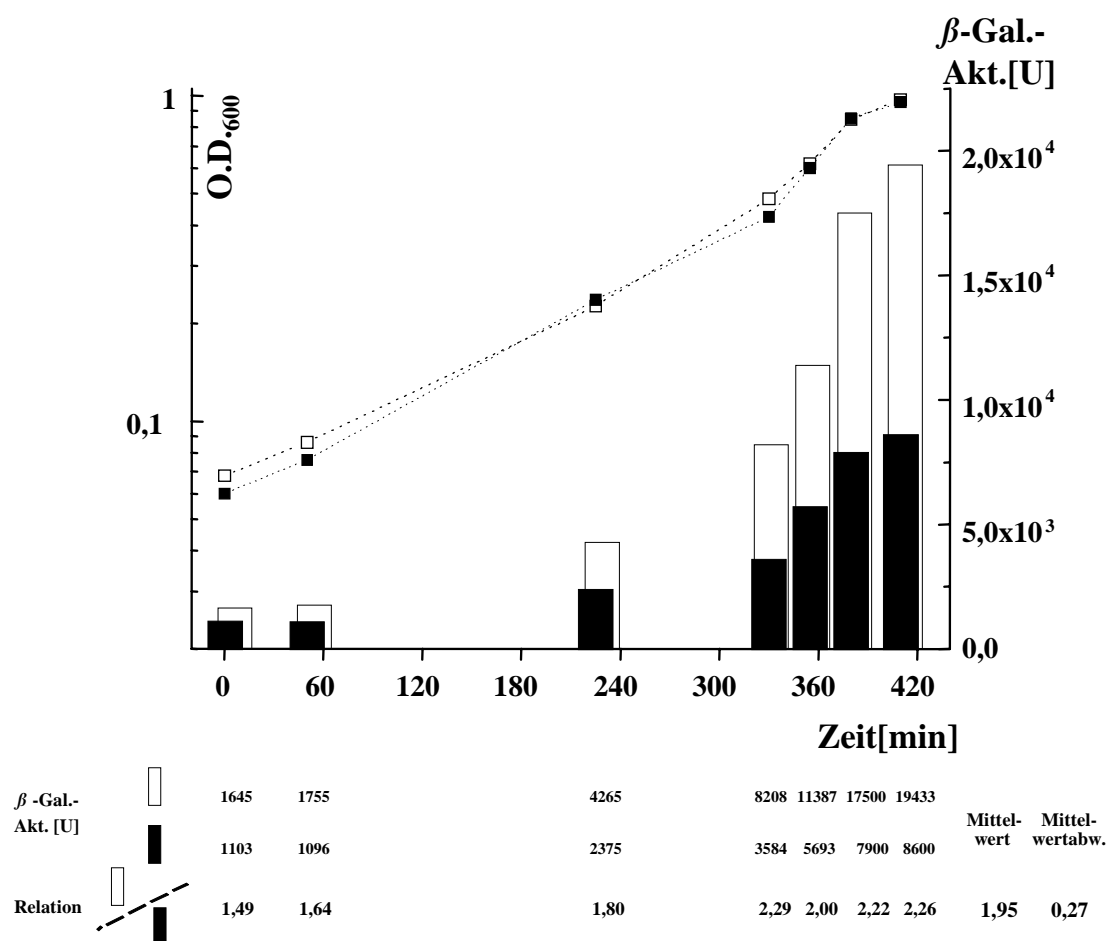
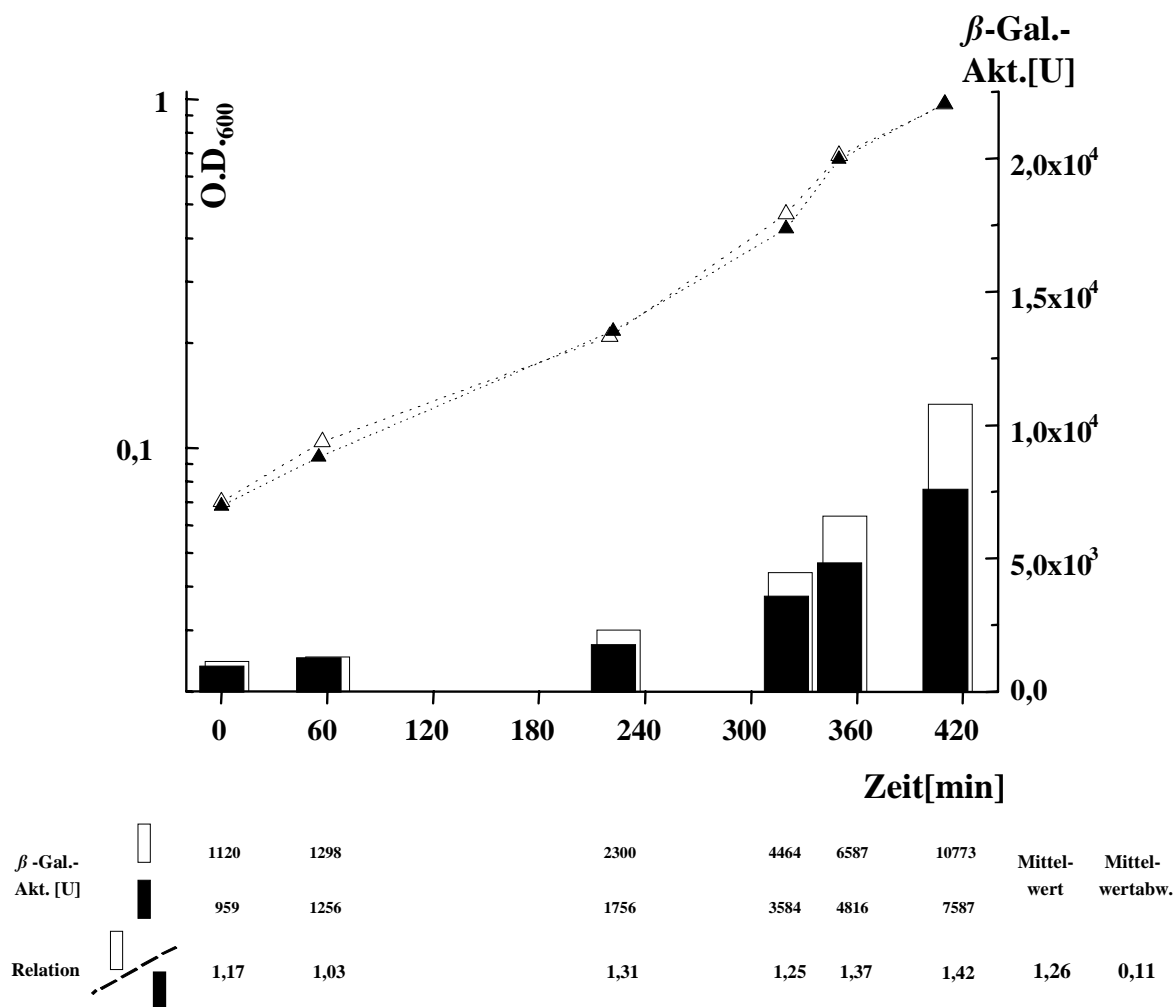
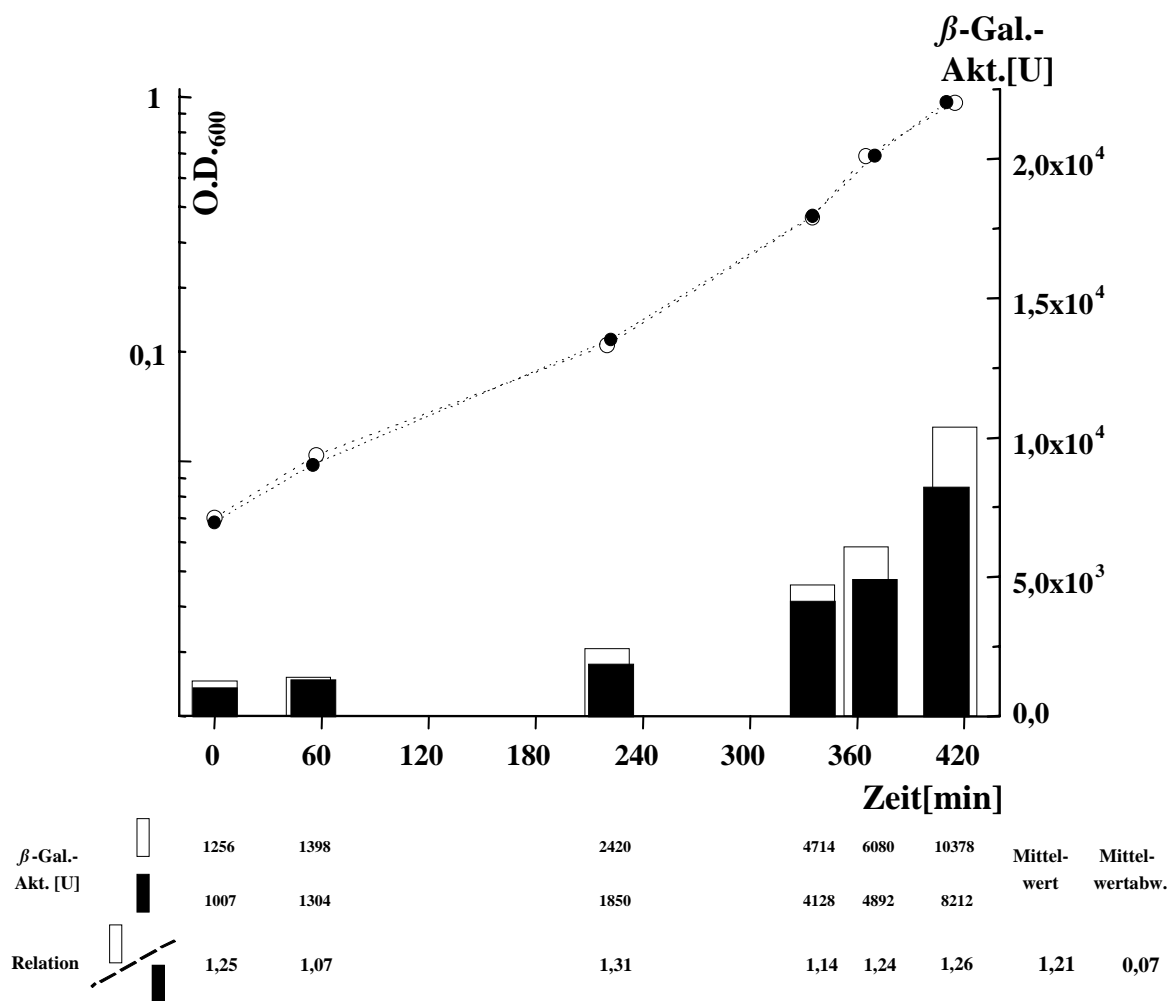


Abb. 4.1.2-1 Einfluß von PepR1 auf die Expression von *PpepQ(cre<sub>WT</sub>)::lacZ* in Doppeltransformanten von *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ). In der Abbildung dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die Aktivitäten ( $\beta$ -Gal-Akt [U], Balken) der Kulturen welche entweder die Plasmide pMCPQ2 (*cre<sub>WT</sub>*) und pFN476 (■, ■) oder pMCPQ2 und pFNP13 (*pepR1*) trugen (□, □). Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die aus den zu vergleichenden Aktivitäten errechneten Verhältniswerte (Relation), der sich hieraus ergebende Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in der untersten Zeile der Abbildung angegeben.



**Abb. 4.1.2-2** Einfluß von PepR1 auf die Expression von *PpepQ*(*cre*<sub>mut1</sub>)::*lacZ* in Doppeltransformanten von *E. coli* CM89 ( $\Delta$ *lac*). In der Abbildung dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die Aktivitäten ( $\beta$ -Gal-Akt [U], Balken) der Kulturen welche entweder die Plasmide pMCPQ3 (*cre*<sub>mut1</sub>) und pFN476 ( $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ) oder pMCPQ3 und pFNP13 (*pepR1*) trugen ( $\triangle$ ,  $\square$ ). Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die aus den zu vergleichenden Aktivitäten errechneten Verhältniswerte (Relation), der sich hieraus ergebende Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in der untersten Zeile der Abbildung angegeben.

Der Vergleich der in den Abbildungen 4.1.2-1 bis 4.1.2-3 dargestellten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der verschiedenen *PpepQ*::*lacZ*-Fusionskonstrukte zeigt jeweils deutlich mess- und in den Abbildungen sichtbare Aktivitätsunterschiede in An- bzw. Abwesenheit des Regulators PepR1. Der deutlichste Einfluß durch die Anwesenheit des Regulators ist beim unveränderten *pepQ*-Promotor in CM89(pMCPQ2/pFNP13) (Abb. 4.1.2-1) zu erkennen. Hier läßt sich eine Aktivierung des *pepQ*-Promotors im Bereich der abgebildeten logarithmischen Wachstumsphase erkennen. Die Aktivität in Gegenwart von *pepR1* (*in trans* exprimiert von Plasmid pFNP13) liegt bei CM89(pMCPQ2/pFNP13) im Vergleich zur Kontrolle CM89(pMCPQ2/pFN476) um einen Faktor von  $1,95 \pm 0,27$  höher (siehe Abb. 4.1.2-1). Für die eine Doppelmutation (CG  $\rightarrow$  TA) in den zentralen Nukleotiden der palindromischen *cre*-Sequenz tragende Variante des *pepQ*-Promotors in pMCPQ3 ist diese Aktivierung im Vergleich mit



**Abb. 4.1.2-3 Einfluß von PepR1 auf die Expression von  $PpepQ_{(cre_{mut2})}::lacZ$  in Doppeltransformanten von *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ).** Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die Aktivitäten ( $\beta$ -Gal- Akt. [U], Balken) der Kulturen welche entweder die Plasmide pMCPQ4 ( $cre_{mut2}$ ) und pFN476 (●, ■) oder pMCPQ4 und pFNP13 ( $pepR1$ ) trugen (○, □). Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die aus den zu vergleichenden Aktivitäten errechneten Verhältniszahlen (Relation), der sich hieraus ergebende Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in der untersten Zeile angegeben.

pMCPQ2 auf einen Faktor von  $1,26 \pm 0,11$  abgesunken (siehe **Abb. 4.1.2-2**). Das Konstrukt pMCPQ4, dessen Basenaustausche die Nukleotide +3 und +4 der rechten Halbseite der palindromischen  $cre$ -Sequenz betreffen (TT→CG), zeigt beim Vergleich von CM89(pMCPQ4/pFNP13) mit CM89(pMCPQ4/pFN476) ebenfalls eine geringere Aktivierung (siehe **Abb. 4.1.2-3**). Hier wurde ein Aktivierungsfaktor von  $1,21 \pm 0,07$  bestimmt.

Diese Resultate wiesen darauf hin, daß das *catabolite responsive element* tatsächlich die Operatorsequenz ist, über welche das PepR1-Protein eine aktivierende Wirkung auf die Transkriptionsinitiation am  $pepQ$ -Promotor (pMCPQ2,  $cre_{wt}$ ) ausübt. Insbesondere die reduzierte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die beim Konstrukt mit den Basenaustauschen in den zentralen Nukleotiden C und G ( $cre_{mut1}$ , pMCPQ3) im Vergleich zu pMCPQ2 ( $cre_{wt}$ ) meßbar war, zeigte dies deutlich. Plasmid pMCPQ3 ( $cre_{mut1}$ ) wies



Plasmid	Bezeichnung	(resultierende) <i>cre</i> -Sequenz	Faktor der Aktivierung durch PepR1
pMCPQ2	<i>cre</i> <sub>wt</sub>	5´-TGCAATCGCTTACA-3´ 3´-ACGTTAGCGAATGT-5´	1,95 + 0,27
pMCPQ3	<i>cre</i> <sub>mut1</sub>	5´-TGCAAT <b>T</b> ACTTACA-3´ 3´-ACGTT <b>C</b> ATTAATGT-5´	1,26 ± 0,11
pMCPQ4	<i>cre</i> <sub>mut2</sub>	5´-TGCAATCG <b>CC</b> GACA-3´ 3´-ACGTTAG <b>CG</b> CTGT-5´	1,21 ± 0,07

**Tab. 4.1.2-1** Aktivierungsfaktoren für die  $\beta$ -Galaktosidasaktivitäten bei den *PepQ*::*lacZ*-Translationsfusionen pMCPQ2 /..Q3 und ..Q4 in Anwesenheit von PepR1. Die Tabelle zeigt neben den Namen der Plasmide die entweder unveränderte *cre*-Doppelstrang-Sequenz (pMCPQ2) oder fett dargestellt die jeweiligen Basenaustausche im Vergleich zur Originalsequenz (pMCPQ3 u. pMCPQ4). Die rechte Spalte gibt den Aktivierungsfaktor in Anwesenheit von PepR1 (exprimiert von pFNP13) gegenüber der jeweiligen Vergleichskultur ohne PepR1 an.

gegenüber pMCPQ2 (*cre*<sub>wt</sub>) eine Abweichung von zwei Nukleotiden in der resultierenden *cre*-Sequenz auf. Der Unterschied zur *cre*-Konsensussequenz, welche von (Weickert und Chambliss, 1990) postuliert wurde, betrug 3 Nukleotide. (siehe **Tab. 4.1.2-2**). Demgegenüber wich die aus der Doppelmutation TT → CG resultierende *cre*-Sequenz *cre*<sub>mut2</sub> (pMCPQ4) nur in zwei Basen von der postulierten Konsensussequenz ab (siehe **Tab. 4.1.2-2**). Die Abweichung zur Originalsequenz des *cre* im *pepQ*-Promotor (pMCPQ2, *cre*<sub>wt</sub>) betrug bei dieser Variante ebenfalls zwei Basen. Dieser Unterschied von zwei Mutationen bei pMCPQ3 gegenüber der Einfachmutation beim *cre* in pMCPQ4 relativ zur Konsensussequenz (siehe **Tab. 4.1.2-2**), zeigte sich auch geringfügig bei den ermittelten Faktoren (siehe **Tab. 4.1.2-1**).

Plasmid	<i>cre</i> -Sequenz	Bezeichnung
pMCPQ2	5´-TGCAATCGCTTACA-3´ *	<i>cre</i> <sub>wt</sub>
pMCPQ3	** 5´-TGCAAT <b>T</b> ACTTACA-3´ * **	<i>cre</i> <sub>mut1</sub>
pMCPQ4	** 5´-TGCAATCG <b>CC</b> GACA-3´ * *	<i>cre</i> <sub>mut2</sub>
<i>cre</i> Konsensus (Weickert und Chambliss, 1990)	5´-TGWNANCGNTNWCA-3´	

**Tab. 4.1.2-2** Vergleich der *cre*-Sequenzen der untersuchten Varianten des *pepQ*-Promotors mit einer *cre*-Konsensus-Sequenz. Die *cre*-Sequenz ist jeweils einzelsträngig dargestellt. Die Abweichungen von *cre*<sub>mut1</sub>, *cre*<sub>mut2</sub> und *cre*<sub>wt</sub> zueinander sind oberhalb der Sequenzen mit \*, die Abweichungen bezogen auf die Konsensussequenz sind unterhalb der Sequenzen mit \* markiert.

## 4.2 Gel-Retardationsexperimente mit gereinigtem PepR1-Protein

Um nachzuweisen, daß die unter 4.1.2 dargestellten Resultate tatsächlich auf der spezifischen Interaktion von PepR1 mit den dort als klonierte PCR-Produkte untersuchten Promotor-Fragmenten *cre<sub>wt</sub>* und *cre<sub>mut1</sub>* (siehe Kap 4.1.1, Tab. 4.1.1-1) beruhen, sollten Band Shift Assays mit gereinigtem PepR1-Protein durchgeführt werden.

Die PepR1-Proteinreinigung und die Etablierung von Gel-Retardierungsexperimenten wurden von Beate Weber im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Weber, 1997; Schick *et al.*, 1999).

Im Fall der PepR1-Reinigung enthielt das aufgereinigte Protein sechs zusätzliche N-terminale Reste (Ile-Ser-Glu-Phe-Gly-Ser). Dies war bedingt durch den bei der Klonierung des *pepR1*-Genes in pMal-c2 zu wählenden Weg. Verschiedene für die Klonierung nutzbare Restriktionsschnittstellen des Polylinkers vom Vektor pMal-c2 befinden sich auch im zu klonierenden *pepR1*-Gen. Deshalb musste das *pepR1*-Gen durch PCR unter Verwendung eines Primerpaares amplifiziert werden. Den beiden Oligonukleotiden wurden zur gerichteten Insertion des Amplifikates in pMal-c2 entweder eine *Bam*HI- (5'-Ende v. *pepR1*) oder eine *Pst*I-Erkennungssequenz (3'-Ende von *pepR1*) angehängt. Diese Vorgehensweise bei der Klonierung des *pepR1*-Genes resultierte dann über die Schritte Expression, Aufreinigung und Spaltung des MBP-PepR1-Hybridproteins durch den Faktor X<sub>a</sub> in einem PepR1-Protein, welches die oben angegebenen sechs Aminosäuren zusätzlich vor der Aminosäure Methionin, dem originalen Start trug.

### 4.2.1 Nachweis der *in vitro* Bindung von PepR1 an nicht mutierte *pepQ*- (*cre<sub>wt</sub>*) und mutierte (*cre<sub>mut1</sub>*) Promotorfragmente

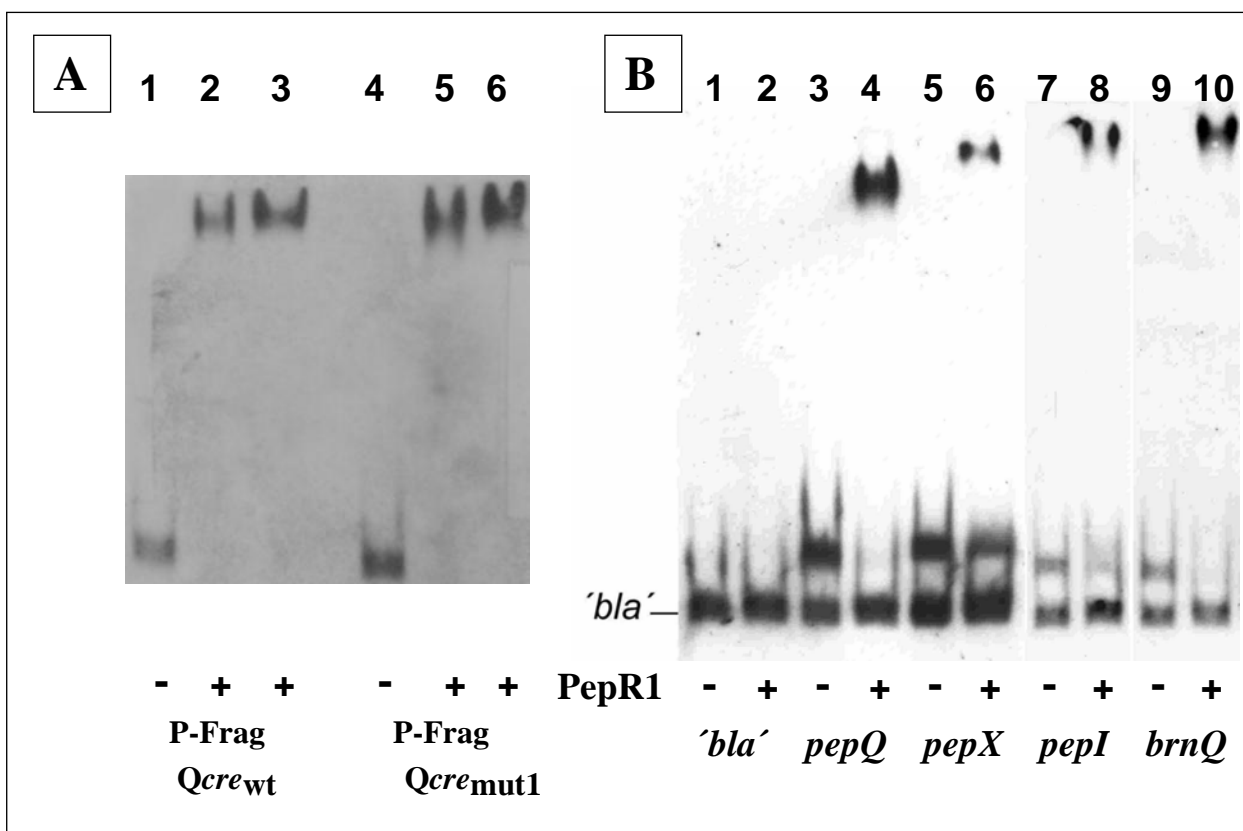
Die Möglichkeit der spezifische Bindung von aufgereinigtem PepR1-Protein (siehe 4.2) an ausgewählte Promotorfragmente der Peptidase Q, welche entweder die Originalsequenz widerspiegelten (*cre<sub>wt</sub>*) oder das mutierte *cre* enthielten (*cre<sub>mut1</sub>*), sollte *in vitro* untersucht werden. Für diese Experimente wurden die durch PCR erzeugten Fragmente P-FragQ*cre<sub>wt</sub>* und P-FragQ*cre<sub>mut1</sub>* ausgewählt. Sie entsprechen den in Kap. 4.1.1 nach pMC1871 klonierten und in Kap. 4.1.2 in die Ko-Expressionsexperimente mit dem *pepR1*-Gen eingesetzten Promotorfragmenten *cre<sub>wt</sub>* und *cre<sub>mut1</sub>* (siehe Tab. 4.2.1-1).

Die *in vitro*-Bindungsstudien sollten Aufschluß darüber geben, ob die in Kap. 4.1.2 gemessenen Unterschiede in der Expression der *PpepQ::lacZ*-Fusionskonstrukte tatsächlich auf einer signifikant schlechteren Bindung des *in trans* exprimierten Regulators PepR1 an das zweifach mutierte *cre* (*cre<sub>mut1</sub>*) beruht.

Bezeichnung Fragment	Bezeichnung (Kap 4.1.2)	Größe PCR-Produkt [bp]	resultierende <i>cre</i> -Sequenz	forward Primer	reverse Primer
<b>P-FragQ<i>cre<sub>wt</sub></i></b>	<i>cre<sub>wt</sub></i>	123	5' -TGCAATCGCTTACA-3'	Prim1	pQfus1
<b>P-FragQ<i>cre<sub>mut1</sub></i></b>	<i>cre<sub>mut1</sub></i>	123	5' -TGCAAT <b>T</b> ACTTACA-3'	Prim1	pQfusmut1

**Tab. 4.2.1-1 Die Amplifikate P-FragQ*cre<sub>wt</sub>* und P-FragQ*cre<sub>mut1</sub>*.** Die Tabelle zeigt die aus den erstellten PCR-Produkten resultierenden Nukleotidabfolge des *cre*, mutierte Basen sind hervorgehoben. Die zur Amplifizierung von *pepQ*-Promotorfragmenten benutzten Oligonukleotide, die Größen der jeweiligen PCR-Produkte, die Bezeichnung für das jeweilige Amplifikat und die Namen der resultierenden Fragmente sind angegeben.

Das Resultat des Gel-Retardierungsexperimentes mit den Amplifikaten P-FragQcre<sub>wt</sub> und P-FragQcre<sub>mut1</sub> zeigt **Abb. 4.2.1-1 A**. In den Spuren 1 bis 3 wurde das PCR-Produkt P-FragQcre<sub>wt</sub>, in den Spuren 4 bis 6 das PCR-Produkt P-FragQcre<sub>mut1</sub> eingesetzt. Die Spuren 1 und 3, die die jeweilige Kontrolle darstellen, enthalten kein PepR1-Protein. Deutlich erkennbar sind die Retardierung der DNA-Fragmente in den Spuren 2 und 3 (P-FragQcre<sub>wt</sub> + PepR1) im Vergleich zu Spur 1 (- PepR1) bzw. der Spuren 5 und 6 (P-FragQcre<sub>mut1</sub> + PepR1) im Vergleich zu Spur 4 (- PepR1). Beide Fragmente wurden ähnlich retardiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem nicht mutierten Promotorfragment (P-FragQcre<sub>wt</sub>) und dem mit einer Doppelmutation versehenen Fragment (P-FragQcre<sub>mut1</sub>).



**Abb. 4.2.1-1 A / 4.2.1-1 B** Band Migration Assays mit Promotorbereichen verschiedener Gene aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 und gereinigtem PepR1. Je 2 ng der mit Dig-11-dUTP markierten Fragmente wurden in Bindepuffer entweder in An- oder in Abwesenheit von PepR1 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Gelelektrophorese (6% Acrylamid; 150 V; ca. 2,5 Stunden) wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet und das Ergebnis durch Chemolumineszenz visualisiert.

**Abb. 4.2.1-1 A.** Das Laufverhalten der mit Digoxigenin markierten Amplifikate P-FragQcre<sub>wt</sub> (Spuren 1-3) und P-FragQcre<sub>mut1</sub> (Spuren 4-6) in Abwesenheit (Spuren 1 und 4) oder Anwesenheit (Spuren 2, 3 und 5, 6) von PepR1 (1,6 µg) ist dargestellt.

**Abb. 4.2.1-1 B.** Das Laufverhalten der mit Digoxigenin gelabelten Fragmente der Promotoren des *pepQ*- (Spuren 3, 4), *pepX*- (Spuren 5, 6), *pepI*- (Spuren 7, 8) und des *brnQ*-Genes (Spuren 9, 10) in An- (Spuren 4, 6, 8, 10) bzw. Abwesenheit (Spuren 3, 5, 7, 9) von PepR1 (1,6 µg) sowie des mit *'bla'* gekennzeichneten 148 bp Kontroll-Fragmentes aus der Ampicillin-Resistenzgen. Zur Kontrolle ist in den Spuren 1 und 2 das Laufverhalten des *'bla'*-Fragmentes in An- (Spur 2) und Abwesenheit (Spur 1) des potentiellen Regulatorproteines PepR1 ohne Zugabe eines weiteren Fragmentes gezeigt.

In Abbildung **4.2.1-1 B** sind zum Vergleich die Ergebnisse von Beate Weber (Weber, 1997, Schick *et al.*, 1999) aus weiteren Gelretardierungs-Experimenten dargestellt. Sie zeigt die Ergebnisse der *Gel mobility shift assays* mit der gesamten *pepQ*-Promotorregion (*pepQ-pepR1* intergene Region, 170 Basenpaare) in Spuren 3 und 4, sowie die auftretenden Retardierungen bei Interaktion von gereinigtem PepR1 mit DNA-Fragmenten, die die Upstream-Regionen und Promotoren dreier weiterer *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* Gene beinhalteten (**Abb. 4.2.1-1 B**, Spuren 5-10). Zusätzlich ist in den Spuren 1 und 2 von **Abb. 4.2.1-1 B** gezeigt, daß ein zum Zweck der unspezifischen Kompetition etabliertes Fragment, tatsächlich nicht von PepR1-Protein retardiert wurde. Bei diesem 148 bp großen Fragment handelt es sich um ein ebenfalls durch PCR generiertes Amplifikat aus dem Ampicillin-Resistenzgen (*bla*, Nukleotide +586 bis +732) von pBR322 (Sutcliffe, 1979). Desweiteren zeigen die Spuren 5 und 6 die Retardierung eines 188 bp großen Promotorabschnittes des *pepX*-Genes, welches für die X-Prolyl-Dipeptidyl-Amino-peptidase aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* codiert (Meyer-Barton *et al.*, 1993), sowie die durch PepR1 vermittelte Retardierung des 176 bp Abschnittes des Promotorbereiches des *pepI*-Genes (Peptidase I, Prolin-Imino-peptidase; Spuren 7 und 8) (Klein *et al.*, 1994a) und eines 183 bp großen Fragmentes der *brnQ*-Upstream-Region (Spuren 9 und 10) (Stucky *et al.*, 1995b). Bei Letzterem handelt es sich nicht um das Promotorfragment eines Peptidasegenes, sondern um das eines Transporters für verzweigt-kettige (branched-chain) Aminosäuren.

Beide Abbildungen (**Abb. 4.2.1-1 A u. B**) zeigen, daß das PepR1-Protein unter den gewählten experimentellen Bedingungen deutliche Affinität zu den eingesetzten *pepQ*-, *pepI*- und *brnQ*-Promotorfragmenten aufweist. Sie werden jeweils vollständig retardiert. Die Affinität gegenüber dem Fragment mit dem Promotor des *pepX* Genes ist geringer, das entsprechende Fragment wird nur partiell retardiert (**4.2.1-1 B**, Spuren 5 und 6).

#### 4.2.2 Analyse der in den Gel-Retardierungsexperimenten eingesetzten DNA-Fragmenten hinsichtlich potentieller *cre*-Sequenzen

Die Untersuchung der in den Bandshift-Assays des vorangegangenen Kapitels (**4.2.1**) eingesetzten DNA-Fragmente auf potentielle *cre*-Operatorsequenzen wurde durch Kombination zweier Vorgehensweisen durchgeführt:

- 1. Visuelle Analyse.** Bei dieser Herangehensweise wurden die jeweiligen Gen-Upstream- und Promotorregionen per Auge analysiert. Ausgehend von der von Weickert und Chambliss (1990) publizierten Konsensussequenz 5'-**TGWNANCGNTNWCA**-3' wurden die markanten „Nukleotidpaare“ dieses Motifs (**TG**, **CG** und **CA**) als Orientierungspunkte für das Auffinden der jeweiligen, 14 Basenpaare umfassenden putativen Operatorelemente genutzt.
- 2. In silico Untersuchung.** Mit Hilfe des Softwaretools „**findpatterns**“ des GCG Packages (Husar Geniusnet), welches für das Auffinden kurzer Sequenzen in definierten DNA-Fragmenten oder auch in komplexen Datenmengen wie z.B. kompletten Genomen geeignet ist. Vorgabe für die Analyse war die Konsensussequenz von Weickert und Chambliss (1990; **TGWNANCGNTNWCA**). Als weiterer Parameter wurde die Anzahl der erlaubten Fehlpaarungen (mismatches) zwischen vier und sechs variiert.

Die mit beiden Methoden parallel durchgeführten Analysen auf putative *cre*-Sequenzen resultierte bei allen untersuchten Fragmenten in mindestens einem positiven Resultat. Die hierbei gefundenen potentiellen *cre*-Operatoren sind in **Tabelle 4.2.2-1** dargestellt. Die Positionen der ermittelten Elemente

auf den jeweiligen Fragmenten verdeutlicht **Abb. 4.2.2-2**. Die potentiellen Operatoren für das *pepQ*-Gen (*pepQ*, P-FragQ<sub>cre</sub><sub>wt</sub>, P-FragQ<sub>cre</sub><sub>mut1</sub>, *pepR1*) und für das *brnQ*-Gen liegen stromaufwärts der jeweiligen putativen -35-Region. Die mögliche Sequenz für das *pepX*-Fragment liegt zwischen der -35- und -10-Region des *pepX*-Promotors. Für das *pepI*-Fragment konnten zwei mögliche Elemente gefunden werden, eines liegt stromaufwärts, eines stromabwärts der putativen Promotorregion. Letzteres überlappt mit den beiden äußersten Nukleotiden seiner linken Halbseite die Basen zwei und drei des ATG-Startkodons des *pepI*-Genes.

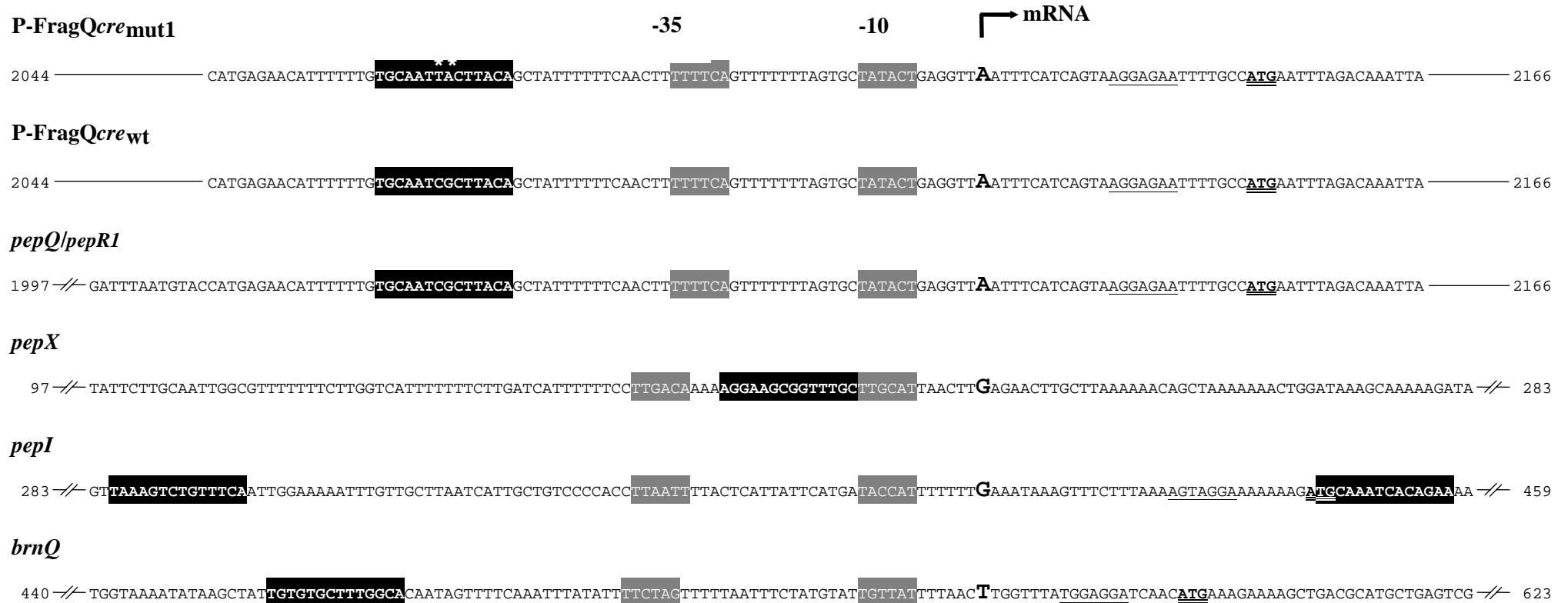
Fragment- bezeichnung	mögliche <i>cre</i> -Sequenzen																		nt Übereinstimmungen		
																			mit Kons.		innerh. der Lb. Sequ.
(„Gen“ bzw. Orientierung bzw. Mutation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	
	9	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
<i>pepR1</i>	G	C	T	G	T	A	A	G	C	G	A	T	T	G	C	A	C	A	13 / 14	14 / 18	11 / 14
P-FragQ <sub>cre</sub> <sub>mut1</sub>	<u>T</u>	G	T	G	<u>C</u>	A	A	T	T	A	<u>C</u>	T	T	A	C	A	G	C	11 / 14	12 / 18	9 / 14
<i>pepQ</i>								*	*												
P-FragQ <sub>cre</sub> <sub>wt</sub>	<u>T</u>	G	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	A	A	T	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	T	A	C	A	G	C	13 / 14	14 / 18	11 / 14
<i>pepX</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	A	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	G	C	<u>T</u>	<u>T</u>	10 / 14	15 / 18	8 / 14
<i>pepI</i> <sub>I</sub>	G	<u>T</u>	T	A	A	A	G	T	C	T	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	C	A	<u>A</u>	<u>T</u>	11 / 14	13 / 18	9 / 14
<i>pepI</i> <sub>II</sub>	G	<u>A</u>	T	<u>G</u>	<u>C</u>	A	A	<u>A</u>	T	C	<u>A</u>	C	<u>A</u>	G	A	A	<u>A</u>	<u>A</u>	8 / 14	12 / 18	5 / 14
<i>brnQ</i>	<u>A</u>	<u>T</u>	T	G	T	G	T	G	C	T	T	T	G	G	C	A	C	A	11 / 14	12 / 18	7 / 14
<i>cre</i> Konsensus 1 (Weickert u. Chambliss, 1990)	T G W N A N C G N T N W C A																				
<i>cre</i> Konsensus 2 (Miwa, Fujita <i>et al.</i> , 2000.)	W	W	T	G	N	A	A	R	C	G	N	W	W	C	A	W	W				

**Tabelle 4.2.2-1 Analyse der putativen *cre*-Operatorsequenzen.** Die Bezeichnungen für die Fragmente und den auf ihnen gefundenen potentiellen *cre*-Operatoren sind in der linken Spalte angegeben. Sie beziehen sich auf die in Kapiteln 4.2.1 experimentell untersuchten Gen-Upstream-Regionen. Zusätzlich ist die mit *pepR1* bezeichnete Sequenz angeführt, welche die invertierte *pepQ*-Sequenz (P-FragQ<sub>cre</sub><sub>wt</sub>) darstellt. Die bei P-FragQ<sub>cre</sub><sub>mut1</sub> experimentell mutierten Basen sind mit einem \* markiert. Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz 1 sind fett dargestellt, Übereinstimmungen mit dem Konsensus 2 sind unterstrichen, Die in der zweiten Spalte markierten Übereinstimmungen bei der Mehrheit der analysierten *Lactobacillus*-Sequenzen sind grau unterlegt. Die Relationen in den drei rechten Spalten geben die jeweilige Summe der Übereinstimmung zur Zahl der betrachteten Nukleotide an. Die Übereinstimmungen zu Konsensus 1 und innerhalb der Gruppe der analysierten *cre*'s aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 beziehen sich auf 14 Nukleotide, die Spalte Konsensus 2 betrachtet 18 Nukleotide. N steht für alle vier möglichen Nukleotide, W für die Basen A oder T, R steht für A oder G.

Vergleicht man die Übereinstimmungen (**Tab. 4.2.2-1**) aller gefundenen Elemente zur *cre*-Konsensussequenz 1 (Weickert & Chambliss, 1990) so beträgt das Verhältnis mindestens zehn von 14 möglichen Nukleotiden. Die Ausnahme bildet der als *pepI*<sub>II</sub> bezeichnete potentielle Operator. Er stimmt mit der Konsensussequenz 1 in nur acht von 14 Basen überein.

Beim Vergleich mit der Konsensus 2 (Miwa *et al.*, 2000), die beidseitig um zwei Nukleotide zur Konsensussequenz 1 erweitert ist, liegt die minimale Übereinstimmung für alle ermittelten potentiellen *cr*-Operator-Elemente bei zwölf von 18 Nukleotiden.

Betrachtet man die Übereinstimmungen, die sich innerhalb der Gruppe der potentiellen *Lb. lactis cre*-Operatoren ergibt, so erkennt man eine größere Schwankungsbreite als beim getrennten Vergleich der jeweiligen potentiellen Operatoren zu den beiden Konsensussequenzen. Hier findet sich ein Maximum an Übereinstimmungen bei elf von 14 Nukleotiden bei dem Element der *pepQ-pepRI* intergenen Region (*pepQ*, **P-FragQ***cre*<sub>wt</sub>; *pepRI*) und ein Minimum bei fünf von 14 bei *pepI* (*pepI*<sub>II</sub>) bzw. sieben von 14 bei *brnQ*. Die potentiellen *cre* bei *pepX*, *brnQ* und *pepI* (speziell *pepI*<sub>II</sub>), die im Vergleich zu den anderen potentiellen *cre* aus DSM7290 und teilweise auch bezüglich der Übereinstimmung zu Konsensus 1 (Ausnahme: *brnQ*) schwächer abschneiden, gleichen dies jedoch durch eine stärkere Übereinstimmung bei den peripheren Nukleotiden (Positionen -9, -8 sowie +8, +9) des um 4 Basen erweiterten Konsensus 2 wieder aus. Bei ihnen beträgt die Quote der Übereinstimmung bezüglich dieser vier zusätzlich in die Analyse einbezogenen randständigen Nukleotide minimal drei von vier Basen (75 %).



**Abb. 4.2.2-1 Cre-ähnliche Sequenzen in Promotor-Fragmenten verschiedener Gene.** Die Nukleotidsequenzen der in Abb. 4.2.1-1 A und 4.2.1-1 B abgebildeten DNA-Fragmente (P-FragQcre<sub>mut1</sub>, P-FragQcre<sub>wt</sub>, pepQ, pepX, pepI, brnQ) wurden bezüglich ihrer mRNA Startpunkte (geknickter Pfeil), die von Matern (Matern *et al.*, 1994) bestimmt wurden, ausgerichtet. Die angegebenen Nummern beziehen sich jeweils auf das erste und letzte Nukleotid der bei den Gel-Retardierungs-Experimenten eingesetzten Fragmente. Die Nummerierung der Abschnitte entspricht den jeweiligen Genbank-Einträgen Z54205 (P-FragQcre<sub>wt</sub>, P-FragQcre<sub>mut1</sub>; pepQ/pepR1), Z14230 (pepX), Z26948 (pepI) und Zw48676 (brnQ). Mögliche cre-Sequenzen sind schwarz hinterlegt. Die experimentell eingefügten Basenaustausche der cre-Sequenz in P-FragQcre<sub>mut1</sub> sind zusätzlich mit einem \* markiert. Die -10- und -35-Regionen der jeweiligen Fragmente sind mit weißer Schrift auf grauem Hintergrund dargestellt. Putative Ribosomenbindestellen sind einfach unterstrichen, die Translationsinitiationscodons (ATG) sind fett hervorgehoben und doppelt unterstrichen.

### 4.3 Analyse des Einflusses von PepR1 auf Translationsfusionen der *pepI*- und *pepX*-Promotoren mit dem *lacZ*-Gen im heterologen *E. coli* System

Zur Überprüfung der bei den Bandshift Assays (Kap. 4.2) dargestellten *in vitro* Resultaten für die Fragmente des *pepI* und des *pepX* Promotors wurde derselbe *in vivo* Untersuchungsansatz gewählt, der bereits in Kap. 4.1 für die verschiedenen *pepQ*-Promotorfragmente angewandt wurde. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten je einer Translationsfusion mit dem *lacZ*-Gen im Vektor pMC1871 für den *pepI*- und den *pepX*-Upstream-Bereich sollte in *E. coli* in An- und Abwesenheit von PepR1 bestimmt werden.

#### 4.3.1 Subklonierung der *pepI*- und *pepX*-Promotorfragmente in pMC1871

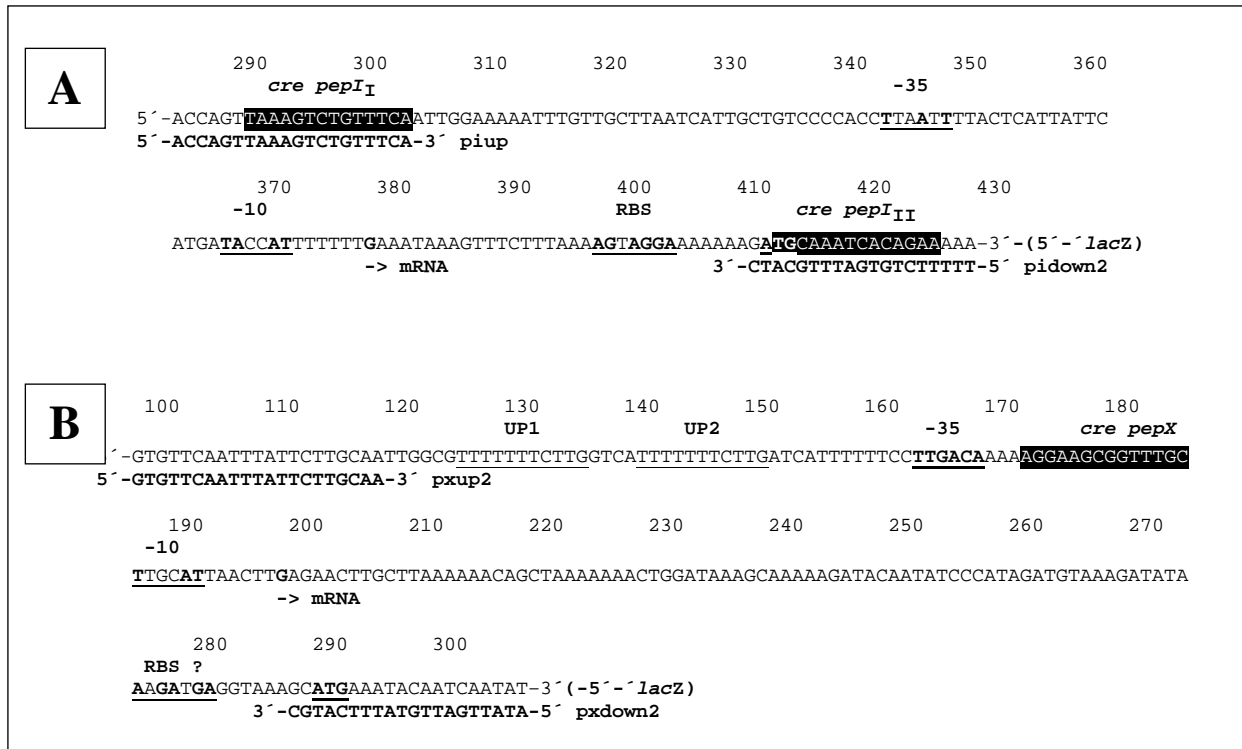
Zur Klonierung in pMC1871 wurden die Promotorfragmente für die beiden Peptidasenpromotoren durch PCR-Reaktion mit der ULTma Polymerase erzeugt. Die hierzu verwendeten template-DNAs, Primer und die Größen der resultierenden PCR-Produkte gibt **Tab. 4.3.1-1** wieder. Die Klonierungen sowie die Überprüfungen der resultierenden Plasmide pMCPI2 (*PpepI*::*lacZ*) und pMCPX2 (*PpepX*::*lacZ*) erfolgte analog der in Kap. 4.1.1 bei der Klonierung der verschiedenen *pepQ*-Promotorfragmente dargestellten Vorgehensweise.

Bezeichnung Fragment	forward Primer	reverse Primer	template DNA	Größe PCR-Produkt [bp]	resultierendes Plasmid	Größe result. Plasmid [bp]
<i>PpepI</i>	piup	pidown2	pJK502	145	pMCPI2	7623
<i>PpepX</i>	pxup2	pxdown2	pJK433	209	pMCPX2	7687

**Tab. 4.3.1-1 Daten zur Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMCPI2 und pMCPX2.** Die Tabelle zeigt die aus der Subklonierung der generierten PCR-Produkten resultierenden Plasmide und deren Größe. Die zur Erzeugung von *pepI*- und *pepX*-Promotorfragmenten benutzten Oligonukleotide sind wie die Größen der jeweiligen PCR-Produkte, der Bezeichnung für das jeweilige Fragment und der Bezeichnung der bei der Amplifikation eingesetzten Plasmide (template-DNA) angegeben.

Die Sequenzen, der mit dem *lacZ*-Gen fusionierten DNA-Fragmente *PpepI* und *PpepX*, sind in der Abbildung 4.3.1-1 dargestellt. Beide Promotorfragmente enthalten entweder ein (*PpepX*) oder zwei (*PpepI*) potentielle *catabolite responsive elements*. Neben der Basenzusammensetzung der möglichen Operatoren, die in Abschnitt 4.2.2 genauer analysiert wurde, ist auch die Lage relativ zu den jeweiligen Transkriptions- und Translationsstartpunkten für ihre Funktionalität von Bedeutung. Dieser letzte Aspekt wird in den **Abb. 4.2.2-1** sowie **4.3.1-1 A** und **B** dargestellt und in Kap. 4.2.2 beschrieben.





**Abb. 4.3.1-1 A / B Nukleotidsequenz des *PpepI*- und des *PpepX*-Fragmentes.** Neben den potentiellen -35- und -10-Regionen sind die möglichen Ribosomenbindestellen (RBS), die mRNA Startpunkte sowie die Startkodons (fett und unterstrichen dargestellt) markiert. Die potentiellen *catabolite responsive elements* (*cre*) sind in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund dargestellt. Die zur Subklonierung verwendeten Primer sind unterhalb der von ihnen ausgehend amplifizierte Sequenzbereiche fett gedruckt angegeben. Bei der *pepX*-Sequenz sind zusätzlich zwei potentielle Upstream-Elemente (UP1 bzw. UP2) markiert. Die Nummerierung der Sequenzabschnitte bezieht sich für *PpepI* auf den Genbankeintrag Z26948 (Klein *et al.*, 1994a) und für *PpepX* auf Z14230 (Meyer-Barton *et al.*, 1993).

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Unterschiede in Lage und Nukleotidabfolge bei den verschiedenen potentiellen Operatoren der Fragmente *PpepI* und *PpepX* sich in unterschiedlichen Aktivitäten der Fusionskonstrukte mit dem *lacZ* in An- bzw. Abwesenheit des potentiellen Regulators PepR1 ausdrückt.

#### 4.3.2 Einfluß des potentiellen Regulators PepR1 auf die Expression des *PpepI*::*lacZ*- und des *PpepX*::*lacZ*-Translationsfusions-Konstruktes im heterologen *E. coli* System

Die unter 4.3.1 erstellten Konstrukte wurden in *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ) jeweils mit einem zweiten kompatiblen Plasmid, pFNP13 (Stucky *et al.*, 1996), welches das gesamte *pepRI*-Gen einschließlich seines eigenen Promotors als 1325 bp PCR-Fragment in der *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pFN476 trug, co-transformiert. Der Ampicillinresistenz vermittelnde Vektor pFN476, welcher das Fragment mit dem *pepRI*-Gen nicht trug, diente als Kontrolle. Kolonien, die auf LB-*X-Gal*-Agarplatten, die mit Tetracyclin und Ampicillin versetzt waren, Blaufärbung zeigten, wurden abgeimpft, die Plasmide durch Minipräparation isoliert und mit Hilfe geeigneter Restriktionsschnittstellen analysiert. Anhand von über den Zeitverlauf der wachsenden Kultur entnommenen Aliquots wurden die jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidase-

Aktivitäten bestimmt. Die Abbildungen 4.3.2-1 und 4.3.2-2 zeigen die Resultate der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen für das *PpepI-lacZ*- und das *PpepX-lacZ*-Translationsfusions-Konstrukt in An- und Abwesenheit von *pepRI* (pFNP13 bzw. pFN476). Wie die Abbildung (Abb. 4.3.2-1) veranschaulicht, war die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ausgehend von dem *PpepI-lacZ*-Translationsfusionkonstrukt in Abwesenheit des potentiellen Regulators PepR1 über den Kulturverlauf niedriger als in Anwesenheit von PepR1. Die gemessenen Aktivitäten beider Kulturen bewegten sich auf einem niedrigen Niveau. Sie lagen zwischen 7.800 und 13.000 Units bei Präsenz von PepR1 und zwischen 7.600 und 10.000 Units bei Abwesenheit desselben. Die Anwesenheit von PepR1 erhöhte die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *PpepI-lacZ*-Fusionskonstruktes gegenüber der Vergleichskultur um einen gemittelten Faktor von  $1,15 \pm 0,09$ . (Abb. 4.3.2-1). Diese geringe Aktivierung deutet darauf hin, daß PepR1 einen modulierenden Einfluß bei der Transkriptionsinitiation am *pepI*-Promotor ausübt.

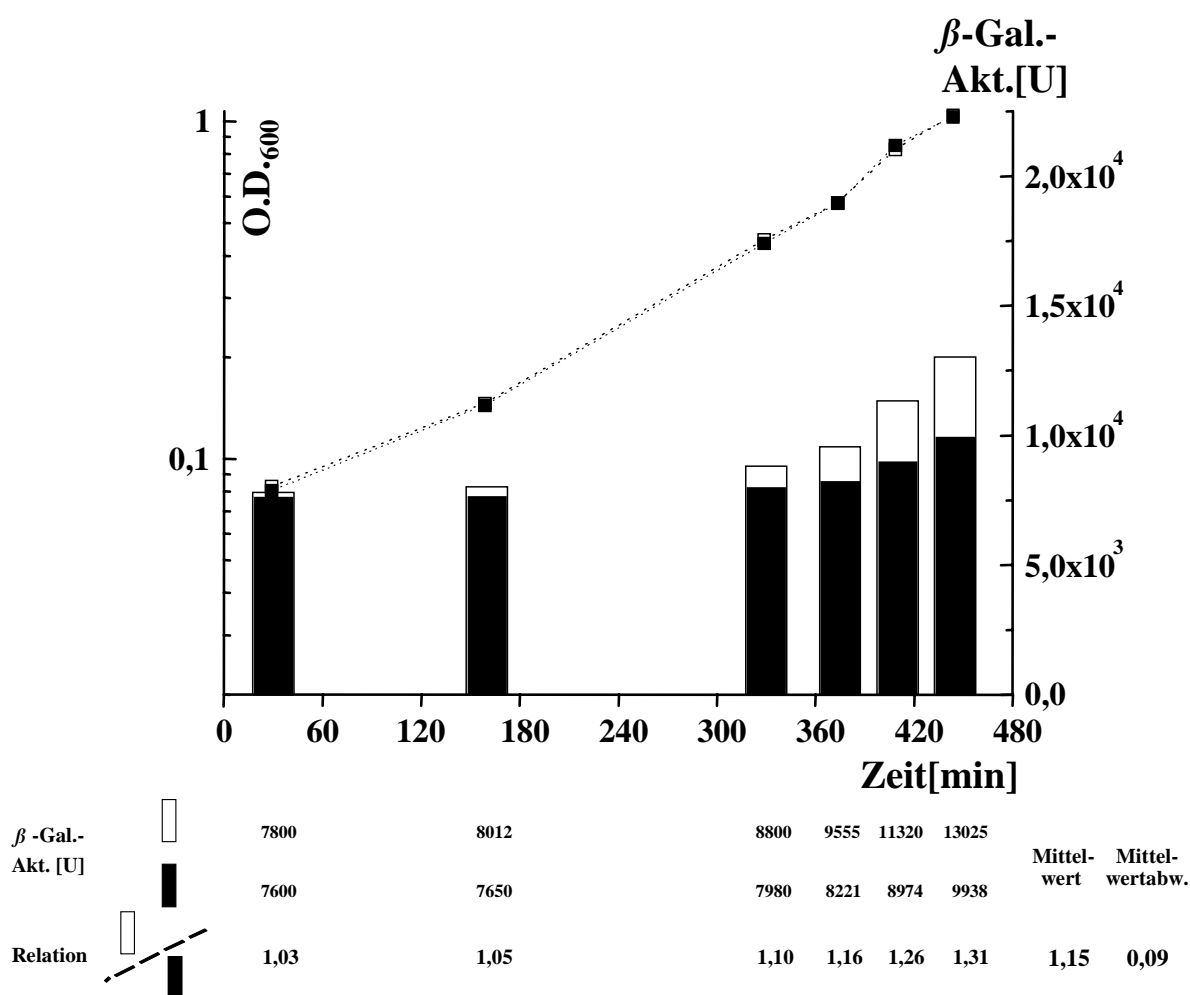


Abb. 4.3.2-1 Einfluß von PepR1 auf die Expression von *PpepI-lacZ* in Doppeltransformanten von *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ). Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die Aktivitäten ( $\beta$ -Gal-Akt [U], Balken) der Kulturen, welche entweder die Plasmide pMCPI2 (*PpepI-lacZ*) und pFN476 (■, ■) oder pMCPI2 und pFNP13 (*pepRI*<sup>+</sup>) trugen (□, □). Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die aus den zu vergleichenden Aktivitäten errechneten Verhältniszahlen (Relation), der sich ergebende Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in der untersten Zeile der Abbildung angegeben.

Für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Translationsfusion des *pepX*-Promotors mit dem '*lacZ*-Gen zeigte sich ein anderes Resultat (Abb. 4.3.2-2) wie für die Aktivitäten des fusionierten *pepI*-Promotors. Die Aktivitäten der *PpepX-lacZ*-Fusion bewegten sich bis hin zu einer Zehnerpotenz höher als die der *PpepI-lacZ*-Fusion gemessenen Werte. Sie lagen im Bereich von 33.000 bis 82.000 Units, was bereits auf eine höhere Basisaktivität des *pepX*-Promotors hindeutet. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der untersuchten Einzelkulturen lagen zwischen 33.000 und 70.000 Units bei Präsenz und zwischen 38.000 und 82.000 Einheiten bei Abwesenheit von *PepR1*. Die Anwesenheit von *PepR1* (CM89(pMCPX2 + pFNP13)) erniedrigte die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *PpepX::lacZ*-Fusionskonstruktes gegenüber der Vergleichskultur (CM89(pMCPX2 + pFN476)) über den Kulturverlauf um einen gemittelten Faktor von  $1,19 \pm 0,096$ . Diese Ergebnisse lassen auf eine (reprimierende) Modulation der Transkriptionsinitiation am Promotor des *pepX*-Genes schließen.

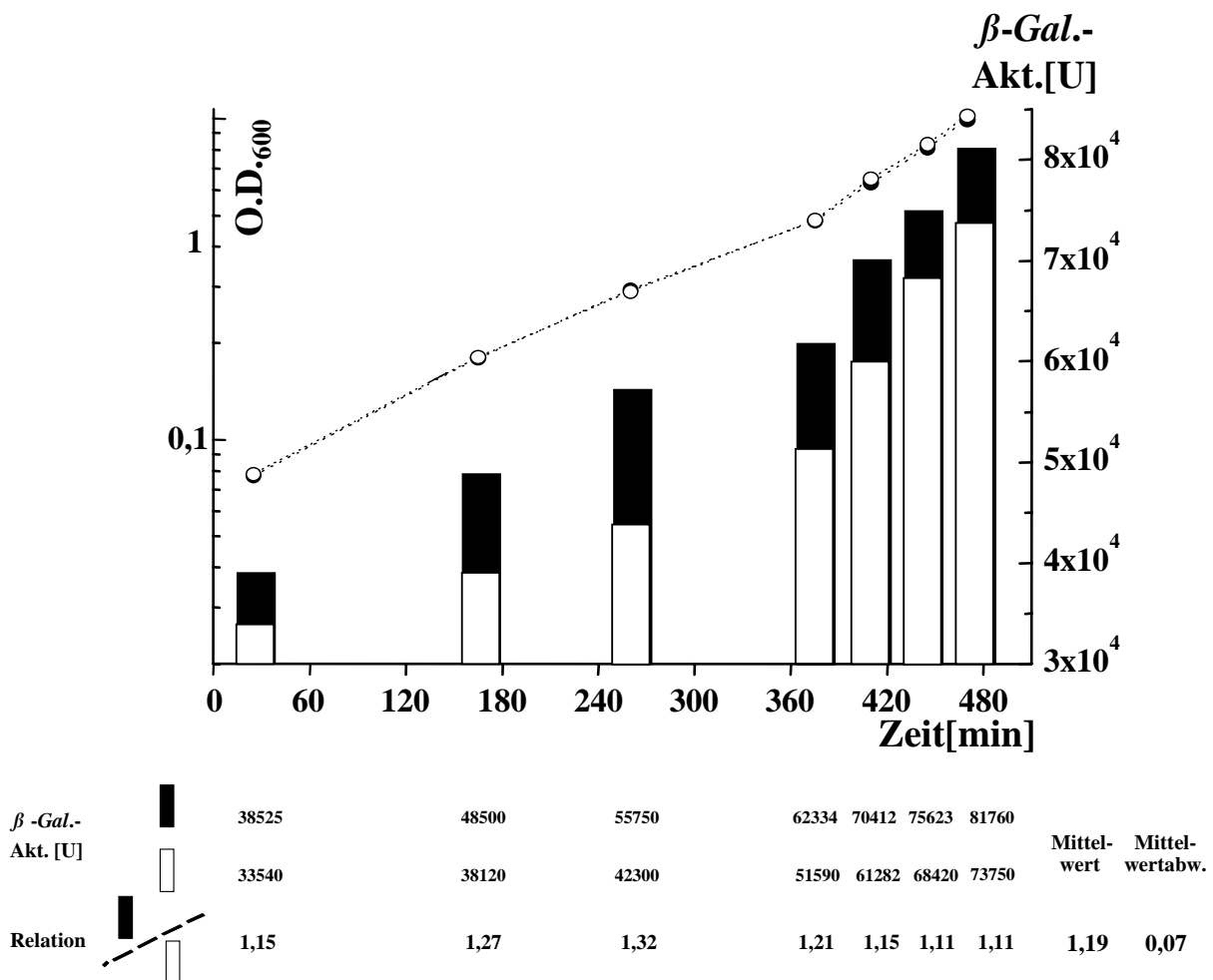


Abb. 4.3.2-2 Einfluß von *PepR1* auf die Expression von *PpepX-lacZ* in Doppeltransformanten von *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ). Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die Aktivitäten ( $\beta$ -Gal-Akt [U], Balken) der Kulturen, welche entweder die Plasmide pMCPX2 (*PpepX-lacZ*) und pFN476 (●, ■) oder pMCPX2 und pFNP13 (*pepR1*<sup>+</sup>) trugen (○, □). Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die aus den zu vergleichenden Aktivitäten errechneten Verhältniszahlen (Relation), der sich hieraus ergebende Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in der untersten Zeile der Abbildung angegeben

#### 4.4 Komplementation einer CcpA-Mutation in *Staphylococcus xylosus* C2a durch das *pepR1*-Gen von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis*

Auf der Basis von Sequenzvergleichen (Stucky *et al.*, 1996) konnte gezeigt werden, daß PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in die LacI/GalR-Familie von Transkriptionsregulatoren gehört (Weickert und Adhya, 1992). Innerhalb dieser Gruppe teilt PepR1 signifikante Sequenzähnlichkeiten mit der Subfamilie der Catabolite control proteins A (CcpA's) (siehe **Tabelle 4.4-1**).

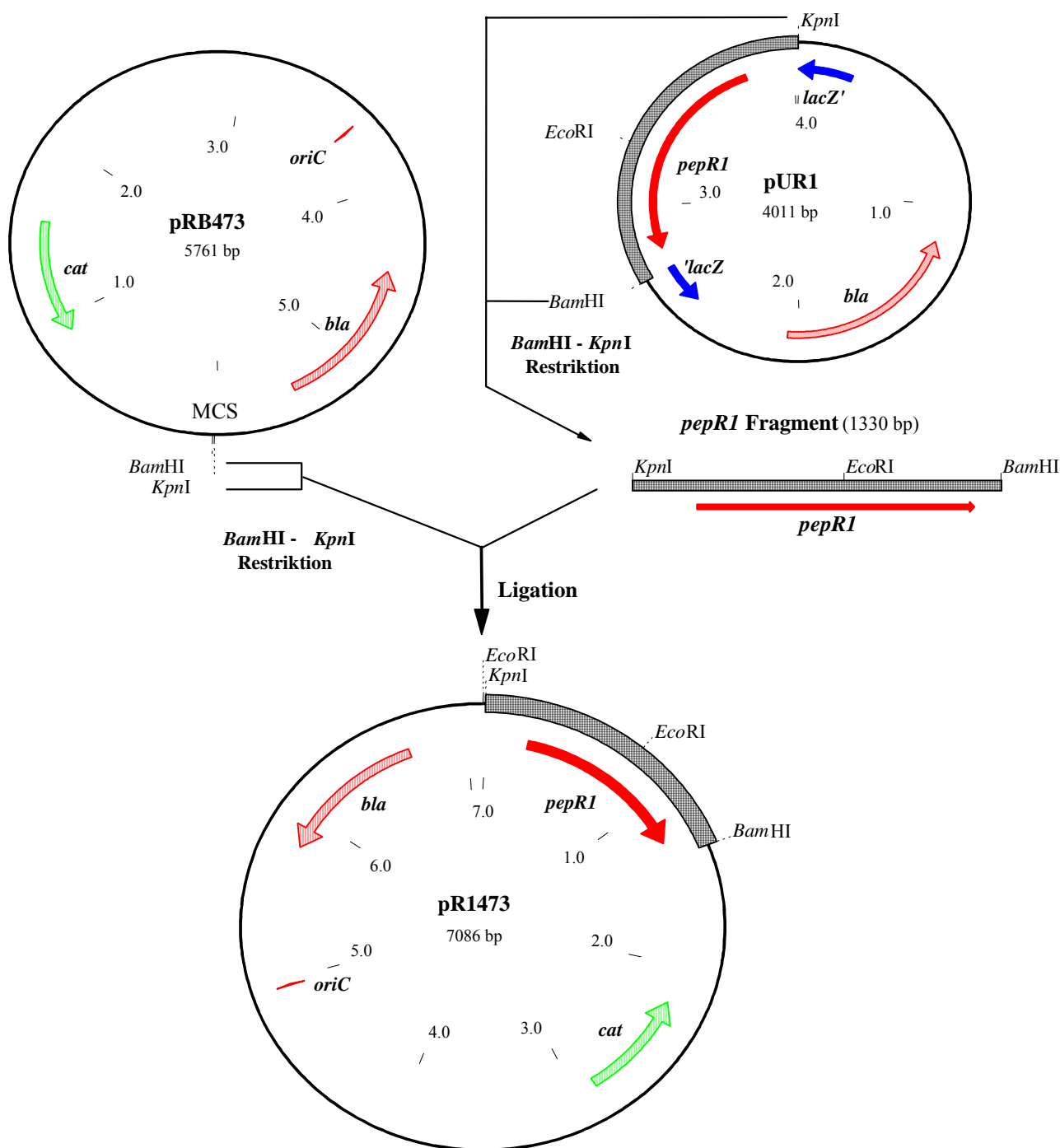
	<b>Bmeg_CcpA</b>		<b>Bsub_CcpA</b>		<b>Sxyl_CcpA</b>		<b>Lbpe_CcpA</b>		<b>Lbca_CcpA</b>		<b>Lbdb_PepR1</b>	
	identische AS [%]	ähnliche AS [%]	identische AS [%]	ähnliche AS [%]	identische AS [%]	ähnliche AS [%]	identische AS [%]	ähnliche AS [%]	identische AS [%]	ähnliche AS [%]	identische AS [%]	ähnliche AS [%]
<b>Bmeg_CcpA</b>			75,90	76,79	58,05	70,00	55,40	61,30	56,36	69,65	<b>44,82</b>	66,16
<b>Bsub_CcpA</b>	75,90	76,79			56,53	69,49	55,05	61,64	55,29	69,87	<b>43,03</b>	66,57
<b>Sxyl_CcpA</b>	58,05	70,00	56,53	69,49			46,50	58,45	51,37	67,80	<b>44,04</b>	66,12
<b>Lbpe_CcpA</b>	55,40	61,30	55,05	61,64	46,50	58,45			65,51	63,63	<b>48,42</b>	58,49
<b>Lbca_CcpA</b>	56,36	69,65	55,29	69,87	51,37	67,80	65,51	63,63			<b>47,58</b>	68,16
<b>Lbdb_PepR1</b>	<b>44,82</b>	66,16	<b>43,03</b>	66,57	<b>44,04</b>	66,12	<b>48,42</b>	58,49	<b>47,58</b>	68,16		

**Tabelle 4.4-1 Vergleich der Proteinsequenzen von repräsentativen CcpAs und PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290.** Dargestellt sind die Prozentsätze der paarweise identischen oder ähnlichen Aminosäuren. Die mit ClustalW verglichenen Sequenzen entsprechen den folgenden Genbank-Accession-Nummern: *Bacillus megaterium* CcpA (**Bmeg\_CcpA**), sw|P46828; *Bacillus subtilis* CcpA (**Bsub\_CcpA**), sw|P25144; *Staphylococcus xylosus* CcpA (**Sxyl\_CcpA**), pir|S44187; *Lactobacillus pentosus* CcpA (**Lbpe\_CcpA**), gb|AF176799; *Lactobacillus casei* CcpA (**Lbca\_CcpA**), embl|LC28137 und *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* (**Lbdb\_PepR1**), gb|Z54205

Um die Signifikanz dieser Ähnlichkeiten von PepR1 zu CcpA-Proteinen anderer Bakterien zu überprüfen, sollten Komplementationsexperimente mit einer zur Verfügung stehenden *ccpA* knock-out Mutante von *Staphylococcus xylosus* C2a durchgeführt werden.

##### 4.4.1 Subklonierung des *pepR1*-Gens in den *Staphylococcus-E. coli*-Shuttle-Vektor pRB473

Zur Expression in der *Staphylococcus xylosus* C2a *ccpA*-Mutante (TX154, *ccpA::ermB*) mußte das *pepR1*-Gen in einen passenden Expressionsvektor subkloniert werden. Geeignet hierzu war der Vektor pRB473 (Brückner, 1992), der von Dr. Reinhold Brückner (Univ. Tübingen, Abt. Mikrobielle Genetik) zusammen mit dem *Staphylococcus xylosus* Wildtyp Stamm C2a (Götz *et al.*, 1983) zur Verfügung gestellt wurde. Die *Staphylococcus xylosus* C2a *ccpA*-Mutante, bei der das *ccpA*-Gen durch Insertion des *ermB*-Genes des Transposons Tn551 inaktiviert wurde, stammte von Dr. Oliver Egeter und Dr. Reinhold Brückner (Egeter und Brückner, 1996).



**Abb. 4.4.1-1 Konstruktion des Plasmides pR1473.** Die Abbildung zeigt die Schritte zur Insertion des 1330 bp DNA-Fragmentes mit dem *pepRI*-Gen sowie dessen up- und downstream-Region in den Shuttle-Vektor pRB473 (Brückner, 1992). Gezeigt sind die Größen der Ausgangsplasmide, des klonierten Fragmentes sowie des resultierenden Plasmides, die relevanten (Resistenz-) Gene und Restriktionsschnittstellen. Von der multiple-cloning site (MCS) des Vektors pR1473 sind nur die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI, *Kpn*I) angegeben. *bla*,  $\beta$ -Lactamase-Gen; *cat*, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen; *lacZ'* und *lacZ*, Fragmente des *lacZ*-Genes; *oriC*, Startpunkt der Plasmidreplikation;

Der Vektor pRB473 (siehe **Abb. 4.4.1-1**) setzt sich aus Komponenten von *E. coli*- und *Staphylococcus*-Plasmiden zusammen (R. Brückner, pers. Mitteilung, (Brückner, 1992)). Das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*) stammt von *Staphylococcus aureus*, die  $\beta$ -Lactamase (*bla*) aus dem *E. coli* Vektor pBR322. Ferner enthält der Vektor mindestens einen deutlichen Replikationsursprung (*oriC*) und eine *multiple-cloning site* (MCS).

Zur Subklonierung des *pepR1*-Gens in pRB473 wurde ein 1330 bp *KpnI*-*BamHI*-Fragment, welches das *pepR1*-Gen zusammen mit 102 Nukleotiden upstream- und 229 Nukleotiden downstream-Sequenz trug, aus dem Plasmid pUR1 (Stucky *et al.*, 1996) ausgeschnitten und in den mit *BamHI* und *KpnI* restringierten Vektor pRB473 inseriert (siehe **Abb. 4.4.1-1**). Der Ligationsansatz sowie ein Kontrollansatz, der nur den doppelt geschnittenen und religierten Vektor alleine enthielt, wurden nach *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Analyse der aus den *E. coli*-Transformanten isolierten Plasmide auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel zeigte, daß zehn der zwölf aus den Kolonien des Ligationsansatzes stammenden Plasmide gegenüber dem Ausgangsvektor vergrößert waren. Von den sechs Isolaten aus dem Kontrollansatz hatten vier die gleiche Größe wie der zum Vergleich aufgetragene Vektor, zwei waren vergrößert. Die Plasmide aus dem Kontrollansatz wurden nicht weiter analysiert. Von den zehn vergrößerten Plasmiden des Ligationsansatzes konnten nach Restriktion mit den einmal im gewünschten Konstrukt schneidenden Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *KpnI* sowie dem zweifach schneidenden Restriktionsenzym *EcoRI* sechs Klone mit dem gewünschten Insert in richtiger Orientierung bestätigt werden. Eines dieser Plasmide, als pR1473 bezeichnet, wurde nach Re-Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt, erneut überprüft und in die weiteren Experimente eingesetzt.

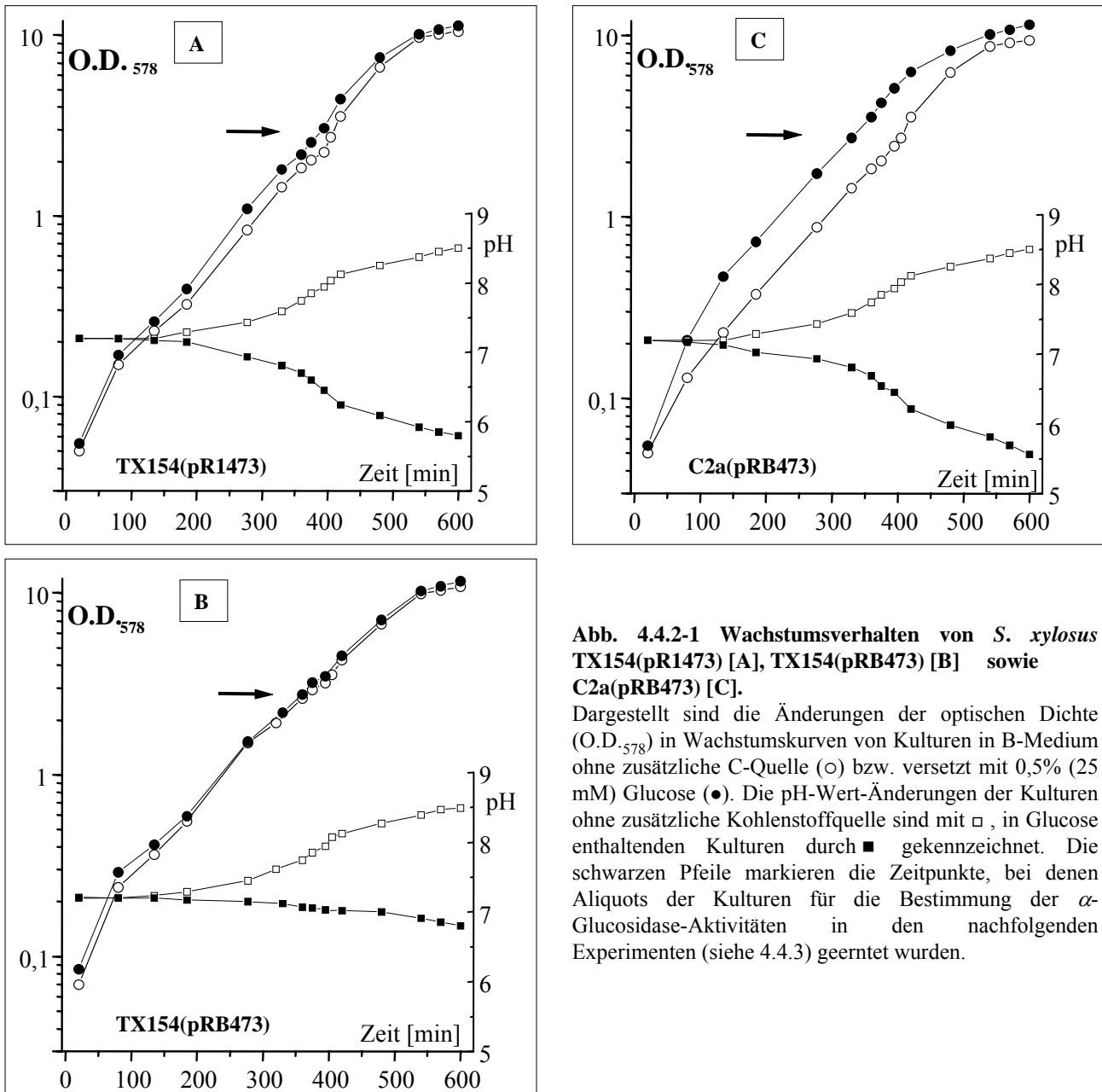
#### 4.4.2 Plasmidkodierte Expression von *PepR1* aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* in *Staphylococcus xylosus* TX154

Für die Komplementationsstudien mit der *ccpA* knock-out Mutante von *S. xylosus* C2a, TX154 (*ccpA::ermB*), wurde das Plasmid pR1473, dessen Konstruktion unter **4.4.1** gezeigt ist, verwendet. Es wurde hierzu durch Elektroporation in elektrokompente Zellen von TX154 transformiert. Als Kontrollansätze für die weiteren Experimente dienten sowohl Transformanten von TX154 als auch vom C2a-Wildtyp mit dem Vektor pRB473.

Zur Durchführung von Wachstumsexperimenten wurde B-Medium mit den nötigen Antibiotikazusätzen versehen, dieses mit jeweils einer gut gewachsenen Einzelkolonie der zu vergleichenden Klone beimpft und Übernachtskulturen bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die gut bewachsenen Kulturen wurden dann am nächsten Morgen in frisches, alle nötigen Antibiotika-Zusätze enthaltendes B-Medium, welches entweder mit 0,5% Glukose oder nicht supplementiert war, zu einer optischen Dichte von 0,05 beimpft.

Die Kulturen wurden durch Messung der O.D.<sub>578</sub> und des pH-Wertes des Kulturmediums verfolgt. Die Resultate der Messungen sind in **Abb. 4.4.2-1** dargestellt. Bei einer O.D. von ca. 2,5 wurden 40ml-Aliquots der Kulturen geerntet, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Herstellung zellfreier Extrakte aufbewahrt.

Der Stamm TX154(pR1473) zeigte eine Wachstumsrate ( $\mu$ ) von 0,582 in B-Medium ohne Glukose (siehe **Abb. 4.4.2-1 A**). Die Wachstumsrate desselben Stammes in B-Medium mit 0,5 % Glukose betrug 0,588. Am Ende des gemessenen Wachstums der Kultur in B-Medium mit 0,5 % Glukose wurde eine



**Abb. 4.4.2-1** Wachstumsverhalten von *S. xylosus* TX154(pR1473) [A], TX154(pRB473) [B] sowie C2a(pRB473) [C].

Dargestellt sind die Änderungen der optischen Dichte ( $O.D._{578}$ ) in Wachstumskurven von Kulturen in B-Medium ohne zusätzliche C-Quelle ( $\circ$ ) bzw. versetzt mit 0,5% (25 mM) Glucose ( $\bullet$ ). Die pH-Wert-Änderungen der Kulturen ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle sind mit  $\square$ , in Glucose enthaltenden Kulturen durch  $\blacksquare$  gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte, bei denen Aliquots der Kulturen für die Bestimmung der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten in den nachfolgenden Experimenten (siehe 4.4.3) geerntet wurden.

geringfügig höhere O.D. erreicht. Die pH-Werte der entsprechenden Kulturmedien stieg über den Kulturverlauf von 7,2 nach 8,5 bzw. fiel auf den Wert von 5,8 in der Kultur ohne Glukose. Der Kontrollstamm TX154(pRB473) zeigte eine im Vergleich mit TX154(pR1473) geringere Wachstumsrate von 0,528; B-Medium versetzt mit Glukose führte in diesem Fall zu einem negativ beeinflussten Wachstum (Wachstumsrate  $\mu=0,486$ ; siehe **Abb. 4.4.2-1 B**). TX154(pRB473) erreichte jedoch sowohl in B-Medium als auch in B-Medium mit Glukose die gleiche O.D. wie TX154(pR1473). Der pH-Wert des Kulturmediums (B-Medium) stieg bei TX154(pRB473) auf 8,5; beim Wachstum in B-Medium mit Glukose sank er nur geringfügig von anfangs 7,2 auf 6,8 zu Ende des Kulturverlaufes.

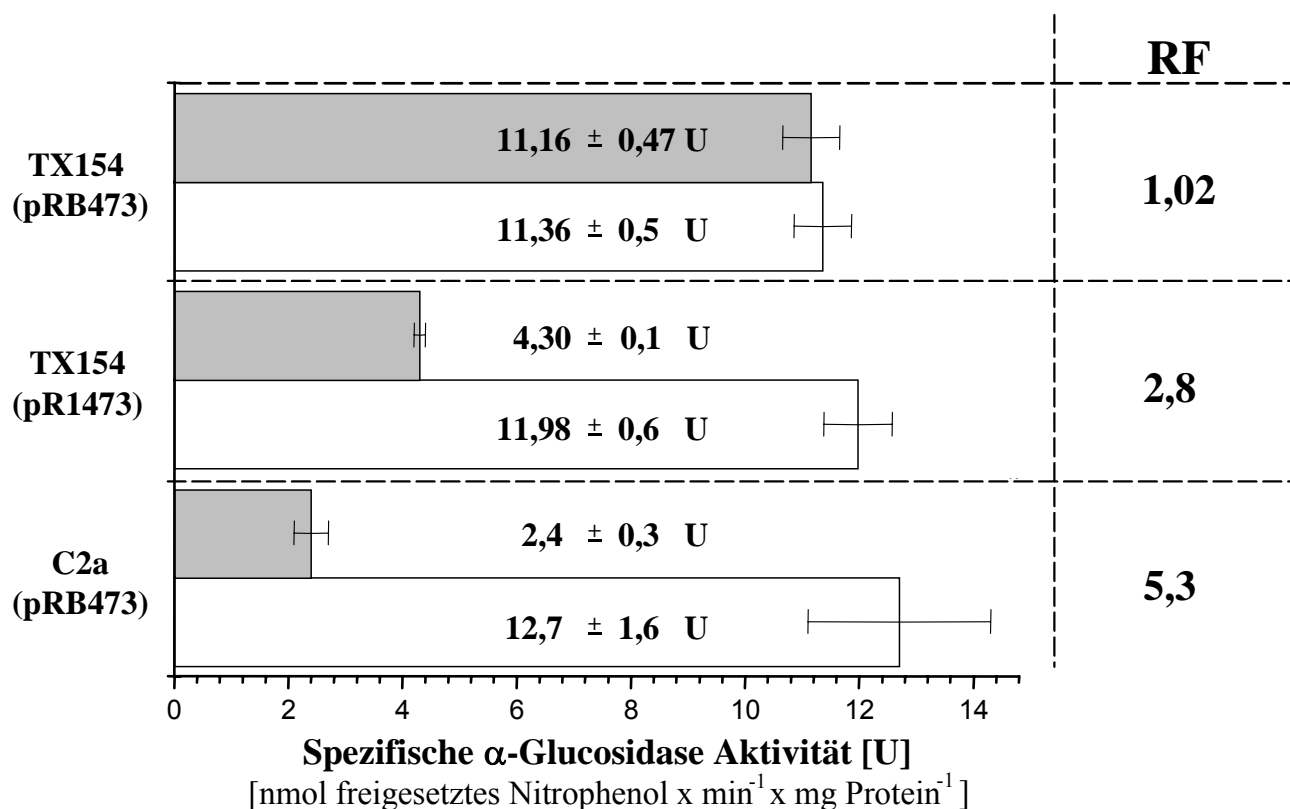
Der den Wildtyp des Stammes *S. xylosus* C2a repräsentierende Kontrollstamm C2a(pRB473) wuchs mit einer Wachstumsrate von 0,546 in Abwesenheit von Glukose, die mit Glukose gewachsene Kultur wuchs geringfügig besser ( $\mu=0,6$ ) (siehe **Abb. 4.4.2-1 C**). Der pH-Wert des Mediums ohne Glukose stieg über den Wachstumsverlauf auf 8,5, beim Medium mit Glukose sank er von 7,2 auf 5,6.

#### 4.4.3 Bestimmung der $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität der Stämme *S. xylosus* C2a und TX154 in Abhängigkeit von PepR1

Die potentielle CcpA-komplementierende Wirkung von PepR1 auf die Glukose- und *cre*-vermittelte transkriptionelle Regulation von Genen der *Staphylococcus xylosus* *ccpA*-Mutante TX154 konnte anhand von Messungen der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten der einzelnen untersuchten Stämme bestimmt werden. Das *malA*-Gen, welches für eine  $\alpha$ -1,4-Glucosidase oder Maltase von *Staphylococcus xylosus* C2a kodiert, liegt in einem dicistronischen Operon mit dem *malR*-Gen, welches für einen Transkriptionsregulator codiert. (Egeter und Brückner, 1995). Das *malRA* Operon steht weder unter Maltose-spezifischer Kontrolle, noch wird es durch MalR-vermittelte Autoregulation kontrolliert. Eine palindromische Sequenz im Promotorbereich von *malRA* weist eine signifikante Ähnlichkeit zu CcpA-spezifischen *cre*-Operatoren auf. Wie die Inaktivierung von *ccpA* bewirkte auch die Deletion dieses Elementes den Verlust der Kataboliten-vermittelten Repression von *malRA* (Egeter und Brückner, 1996). Da gezeigt war, daß *malA* allein der *ccpA*-vermittelten Kontrolle in Abhängigkeit von der Zuckerquelle unterlag, konnte die zugehörige Enzymaktivität der  $\alpha$ -Glucosidase als Meßgröße für die durch PepR1 von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* in TX154 ausgeübten Kontrolle auf die Genexpression und somit die zu messende Aktivität des Enzymes benutzt werden. Hierzu wurden von den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Zellpellets der sechs Vergleichskulturen (siehe Kap. 4.4.2) wie im Methodenteil beschrieben zellfreie Extrakte hergestellt und die  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten mit dem Substrat *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid bei Einsatz von 60-600  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Reaktionsansatz bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten sind in **Abb. 4.4.3-1** dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wiesen die Extrakte des Kontrollstammes C2a(pRB473) in B-Medium gewachsen die höchste  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität auf. Bei in B-Medium mit Glukose gewachsener Kultur sank diese Aktivität um einen Faktor von ca. 5. Bei der Kultur TX154(pR1473) unterschieden sich die Aktivitäten der  $\alpha$ -Glucosidase aus den in B-Medium gewachsenen Zellen von denen, die in B-Medium mit Glucose gewachsen waren, um einen Faktor von ca. 3. Für TX154(pRB473) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten bei Wachstum der Kulturen in B-Medium mit und ohne Glucose (**Abb. 4.4.3-1**).

Vergleicht man die Repressionsfaktoren, die sich aus den Relationen der spezifischen  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten von in B-Medium mit und ohne Glukose-Zugabe gewachsenen Kulturen der drei zu vergleichenden Stämme (siehe **Abb. 4.4.3-1**), so erkennt man, daß der nur mit dem Vektor (pRB473) versehene Wildtyp C2a mit 5,3 den höchsten Repressionsfaktor (RF) besitzt. Demgegenüber weist TX154(pRB473) (RF=1,02) keine Repression auf. In TX154(pR1473) ist die Repression der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität in Gegenwart von PepR1 und Glucose teilweise wieder hergestellt. Hier wurde





**Abb. 4.4.3.-1 Partielle Komplementation des *ccpA*-Defektes von *S. xylosus* TX154 durch *pepR1* von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis*.** Die angegebenen spezifischen  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten (bestimmt mit dem Substrat *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid (10 mM)) und die Standardabweichungen repräsentieren die Resultate von wenigstens drei unabhängigen Messungen. Die Repressionsfaktoren (RF) stellen das berechnete Verhältnis der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivitäten gemessen mit zellfreien Extrakten (60-600 $\mu$ g Gesamtprotein pro Reaktionsansatz) aus Kulturen, die in B-Medium ohne ( $\square$ ) oder mit 25 mM Glucose ( $\blacksquare$ ) gewachsen waren, dar.

ein Repressionsfaktor von 2,8 gemessen. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß PepR1 die Glucose- und *cre*-vermittelte Repression der *malA* Transkription und somit die  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität partiell wieder herstellt. Dies deutet darauf hin, daß PepR1 in der Lage ist, den *ccpA*-Defekt der Mutante TX154 teilweise zu kompensieren.

#### 4.5 Expression von *pepR1* in *Lactobacillus casei* LK1

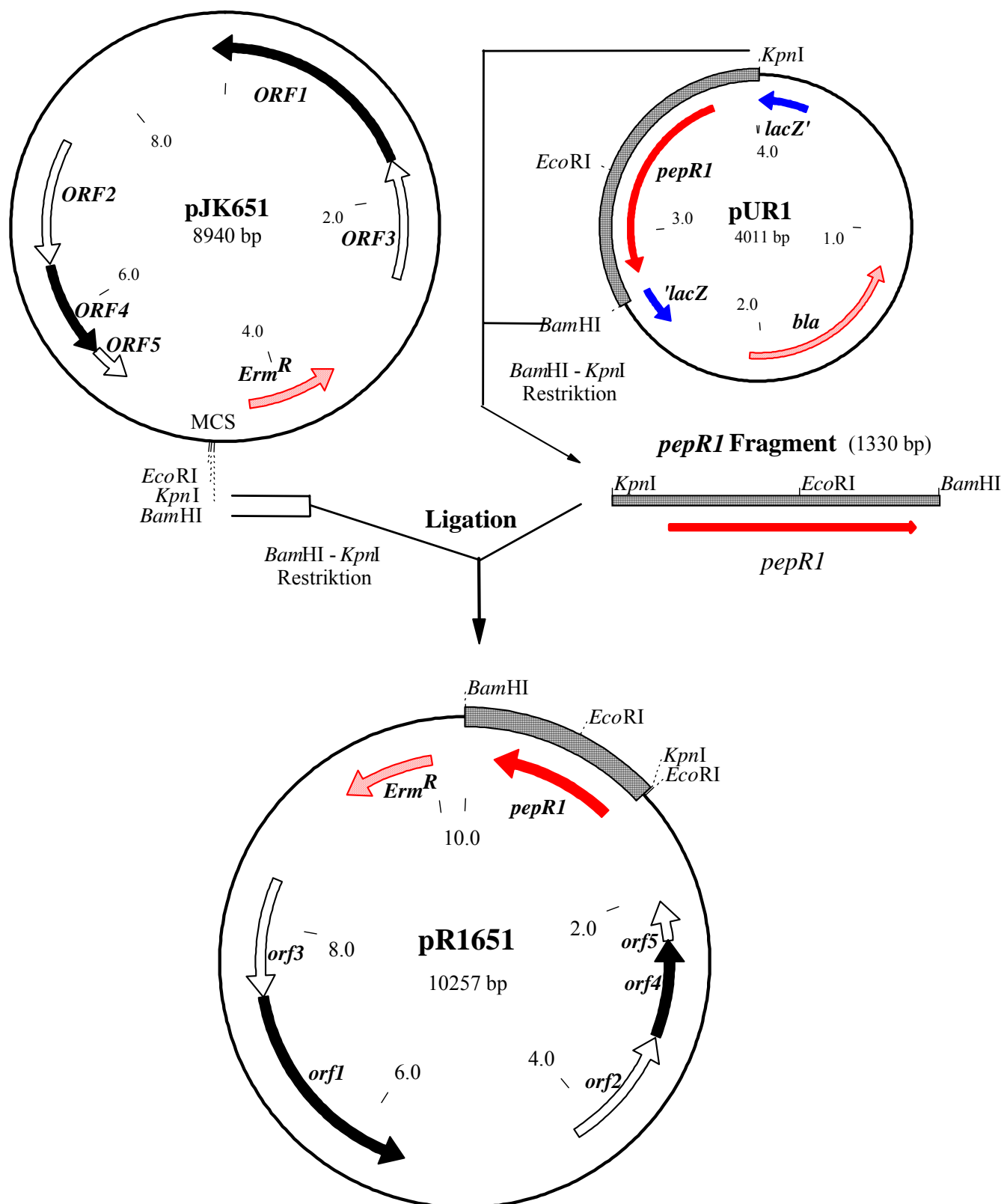
Die Expression von *pepR1* in einem für genetische Manipulationen zugänglichen *Lactobacillus* Stamm sollte zeigen, ob die Anwesenheit des potentiellen Regulator(gen)s aus *Lb. lactis* DSM7290 in *trans* zusätzlich zum *cis*-aktiven PepR1 (oder CcpA) dieses Stammes eine Veränderung des Wachstumsverhaltens bewirkt. Zu diesem Zweck sollte das *pepR1*-Gen in das nur in *Lactobacillus*-Stämmen replizierende Plasmid pJK651 inseriert und in dem transformierbaren *Lactobacillus casei* Stamm LK1 exprimiert werden. Die Analyse des Wachstumsverhaltens der Transformanten von

*Lb. casei* LK1 (DSM7290-*pepRI*<sup>+</sup>) in MRS-Medium, welches mit verschiedenen Zuckern supplementiert war, sollte zeigen, ob die Anwesenheit von PepR1 einen messbaren Einfluss auf das Wachstum der Transformanten ausübt.

#### 4.5.1 Subklonierung des *pepRI*-Gens in den *Lactobacillus*-Vektor pJK651

Bei dem Plasmid pJK651, welches zur Klonierung von *pepRI* benutzt wurde, handelt es sich um ein Derivat von pWS58. Dieses 8 kB große Replikon stammt aus dem Stamm *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* WS58. Es ging aus einer Untersuchung von über 100 *Lactobacillus*-Stämmen hervor. Es handelte sich hierbei um kommerziell genutzte Stämme sowie um Isolate von Emmentaler Käse (Klein *et al.*, 1995a), die auf ihre enthaltenen Plasmide hin untersucht wurden. Das Plasmid pWS58, dessen Wirtstamm *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* WS58 aus Emmentaler-Käse isoliert wurde, wurde vollständig sequenziert. Bei der Analyse der Nukleinsäuresequenz konnten fünf offene Leserahmen ermittelt werden (siehe **Abb. 4.5.1-1**, *ORF1-5*). Drei dieser Leserahmen zeigten signifikante Homologien zu bekannten DNA-Replikations und -Rekombinationsfunktionen. Basierend auf diesen Homologie-Daten konnte angenommen werden, daß die Plasmidreplikation über einen doppelsträngigen Mechanismus verläuft, also dem  $\theta$ -Mechanismus doppelsträngiger Replikation folgt. Die nach dem  $\theta$ -Mechanismus replizierenden Plasmide sind von besonderem Interesse für molekulargenetisches Arbeiten und industrielle Anwendungen, da von ihnen berichtet wurde, daß sie deutlich stabiler sind, als die nach dem *rolling circle* Prinzip replizierenden Plasmide (Janni re *et al.*, 1990; Kiewiet *et al.*, 1993). Dem pWS58-Replikon wurde die *ermC*-Resistenz (siehe **Abb. 4.5.1-1** *Erm*<sup>R</sup>) aus pE194 (Horinouchi & Weisblum, 1982) als Resistenzmarker in eine unique *SacI*-Restriktionsschnittstelle inseriert, welche auf einem Abschnitt des Plasmides pWS58 liegt, der keine Gene für die Plasmidreplikation oder sonstige essentiellen Funktionen beherbergt. In die vor der *SacI*-site liegende *XbaI*-Schnittstelle wurde eine aus zwei 51 bp langen hybridisierten komplementären synthetischen Oligonukleotiden bestehende multiple-cloning site (MCS) mit zehn teilweise überlappenden Schnittstellen gebräuchlicher Restriktionsenzyme ((*XbaI*)-*MluI*-*PstI*-*BamHI*-*PvuII*-*NarI*-*AvaI*-*KpnI*-*SacII*-*ApaI*-*EcoRI*-(*XbaI*)) zur Klonierung von DNA-Fragmenten inseriert (Klein *et al.*, 1995a). Je nach Orientierung dieses Polylinkers wurden die resultierenden Vektoren als pJK650 oder pJK651 bezeichnet. Für beide Vektoren wurde gezeigt, daß sie in *Lb. casei* LK1 auch in Abwesenheit des Selektionsdrucks auf die Erythromycin-Resistenz (*ermC*, *Erm*<sup>R</sup>) für mehr als 110 Generationen stabil propagiert werden konnten (Klein *et al.*, 1995a).

Zur Subklonierung des *pepRI*-Gens in pJK651 wurde wie bei der Konstruktion von pR1473 (siehe Kapitel 4.4.1) ein *KpnI*-*BamHI*-Fragment mit dem vollständigen Gen aus dem Plasmid pUR1 (Stucky *et al.*, 1996) in den Vektor pJK651 inseriert (siehe **Abb. 4.5.1-1**). Der Unterschied zur vorangegangenen Subklonierung bestand darin, daß die Konstruktion des Plasmides pR1651 aufgrund des ausschließlich in *Lactobacillus* replizierenden Vektors pJK651 auch ausschließlich in *Lb. casei* LK1 durchgeführt wurde. Ein 1330 bp *KpnI*-*BamHI*-Fragment, welches das *pepRI*-Gen zusammen mit 102 Nukleotiden seiner upstream- und 229 Nukleotiden downstream-Sequenz trug, wurde aus dem Plasmid pUR1 (Stucky *et al.*, 1996) ausgeschnitten und in den mit *BamHI* und *KpnI* restringierten Vektor pJK651 inseriert (siehe **Abb. 4.5.1-1**). Der Ligationsansatz sowie ein Kontrollansatz, der nur den mit *BamHI* und *KpnI* doppelt geschnittenen und religierten Vektor enthielt, wurden in elektrokompente Zellen von *Lb. casei* LK1 transformiert.



**Abb. 4.5.1-1 Konstruktion des Plasmides pR1651.** Die Abbildung zeigt die Insertion des 1330 bp DNA-Fragmentes mit dem *pepRI*-Gen sowie dessen up- und downstream-Region in den *Lactobacillus*-Vektor pJK651 (Klein *et al.*, 1995a). Gezeigt sind die Größen der Ausgangsplasmide und des resultierenden Plasmides pR1651 sowie die relevanten (Resistenz-) Gene und Restriktionsschnittstellen. Von der multiple-cloning site (MCS) des Vektors pJK651 sind nur die für die Klonierung relevanten sites (*BamHI*, *KpnI* und *EcoRI*) angegeben. *bla*,  $\beta$ -Lactamase-Gen; *Erm<sup>R</sup>*  $\approx$  *ermC*, Erythromycin-Resistenz(-gen); *lacZ'* und *lacZ*, Fragmente des *lacZ $\alpha$* . Die Bezeichnungen ORF1-5 stehen für die offenen Leserahmen von pJK651 bzw. pR1651, die teilweise für Proteine kodieren, welche an der Plasmidreplikation beteiligt sind. (Weitere Erläuterungen: siehe Text.)

Aus den nach der Elektroporation von *Lb. casei* LK1 erhaltenen Kolonien des Ligationsansatzes wurden dann wie im Methodenteil beschrieben 30, vom Kontrollansatz sechs Plasmide präpariert. Die Analyse der isolierten Plasmide auf einem entsprechenden Agarose-Gel zeigte, daß vierzehn der 30 Isolate aus den Kolonien des Ligationsansatzes gegenüber dem Ausgangsvektor vergrößert waren. Von den sechs Isolaten aus dem Kontrollansatz hatten fünf die gleiche Größe wie der zum Vergleich aufgetragene Vektor pJK651, eines war vergrößert. Die Plasmide aus dem Kontrollansatz wurden nicht weiter analysiert. Von den vierzehn vergrößerten Plasmiden des Ligationsansatzes konnten nach Restriktion mit den einmal im gewünschten Konstrukt schneidenden Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Kpn*I sowie dem zweifach schneidenden Restriktionsenzym *Eco*RI fünf Klone mit dem gewünschten Insert in richtiger Orientierung bestätigt werden. Eines dieser Plasmide, als pR1651 bezeichnet, wurde nach Re-Transformation in *Lb. casei* LK1 vermehrt, die über CsCl-Dichte-zentrifugation gewonnene Plasmid-DNA erneut überprüft und der bestätigte Klon in die weiteren Experimente eingesetzt.

#### 4.5.2 Plasmidkodierter Expression von PepR1 aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* in *Lactobacillus casei* LK1

Zur Durchführung von Wachstumsexperimenten wurde MRS-Medium mit 2 % (respektive 3 %) der Zucker Glucose, Fructose und Ribose sowie dem zur Selektion auf die Plasmide nötigen Antibiotikumzusatz versetzt. Diese Ansätze wurden mit einer gut gewachsenen Einzelkolonie von LK1(pR1651) oder der Kontrolle LK1(pJK651) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die bewachsenen Kulturen wurden dann am nächsten Morgen in frisches, den Antibiotikum-Zusatz und den jeweiligen Zucker in gewünschter Konzentration enthaltendes, MRS-Medium zu einer Anfangs-Dichte von ca. 0,1 überimpft. Die Kulturen wurden durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Die Resultate der Messungen sind in **Abb. 4.5.2-1 [A] – [D]** dargestellt. Bei einer O.D. von ca. 1,4- 1,6 wurden 20 ml-Aliquots der Kulturen geerntet, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Herstellung zellfreier Extrakte aufbewahrt. Parallel zur Zellernte wurden für alle Ansätze Zellaliquots entnommen, um die Plasmide aus den logarithmisch wachsenden Kulturen zu präparieren. Dies diente dazu, mögliche Unterschiede in der Plasmidkopienzahl und Veränderungen bei der Stabilität der Plasmide erkennen zu können. Diese Untersuchungen wurden auch beim Animpfen der verschiedenen Kulturen und nochmals am Ende der Wachstumsmessungen durchgeführt. Für alle untersuchten Ansätze konnten hierbei keine Veränderungen oder Auffälligkeiten bezüglich Plasmidkopienzahl und Plasmidgröße oder Plasmidinstabilitäten erkannt werden (Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man die Wachstumsverläufe von LK1(pJK651) und LK1(pR1651) in MRS-Medium mit 3 % Glukose (**Abb. 4.5.2-1 [A]**), so erkennt man, dass LK1(pR1651) im Vergleich zum Kontrollstamm LK1(pJK651) mit geringerer Wachstumsrate ( $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ) wuchs. LK1(pJK651) wies im Bereich des logarithmischen Wachstums eine Rate von 0,53 auf. Der Stamm LK1(pR1651) wuchs somit im Vergleich zu LK1(pJK651) mit einem 1,78-fach kleinerem  $\mu$ . Obwohl LK1(pR1651) langsamer wuchs, erreichten beide Kulturen eine nahezu gleiche End-Dichte. Für den Vergleich des Wachstums von LK1(pJK651) und LK1(pR1651) in MRS-Medium mit 2 % Glukose (**Abb. 4.5.2-1 [B]**) ergab sich ein fast deckungsgleiches Bild wie beim in **Abb. 4.5.2-1 [A]** dargestellten Wachstum in MRS-Medium mit 3 % Glukose. LK1(pJK651) wuchs in der logarithmischen Phase mit der 1,72-fachen Rate des Stammes LK1(pR1651). Auch hier erreichten beide Stämme letztlich dieselbe End-Dichte.

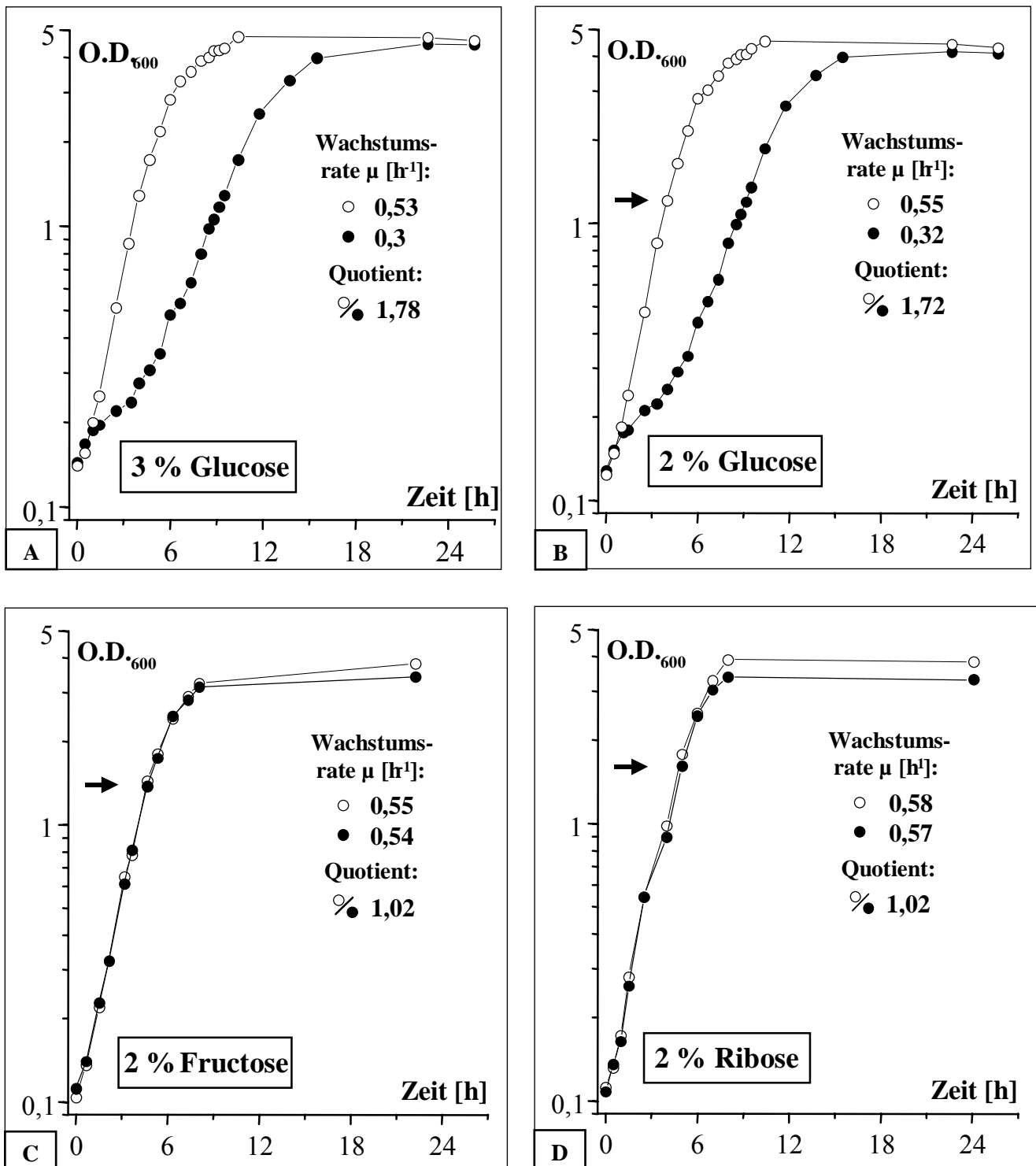
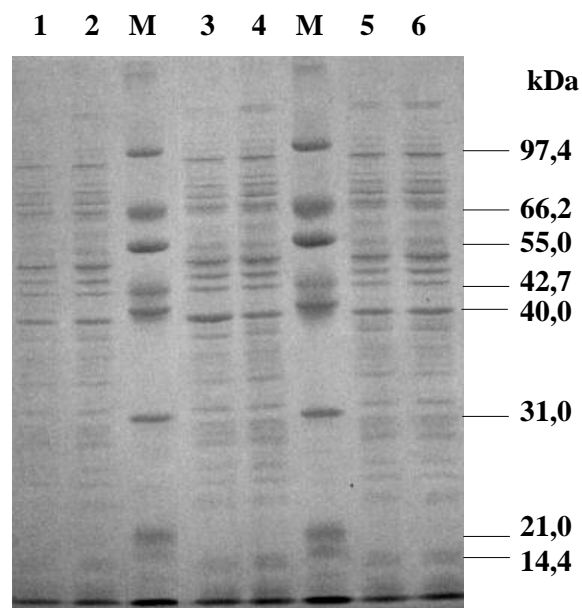


Abb. 4.5.2-1 [A] – [D] Wachstumskurven von *Lb. casei* LK1(pJK651) und *Lb. casei* LK1(pR1651) in MRS-Medium supplementiert mit verschiedenen Zuckern. Die verwendeten Zucker und deren zugesetzte Konzentration zu Beginn des Wachstums sind in der jeweiligen Teil-Abbildung angegeben. Die Wachstumskurven des Kontrollstammes LK1(pJK651) sind mit ○, die des PepR1-exprimierenden Stammes LK1(pR1651) mit ● dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte, bei denen Aliquots der Kulturen zur Präparation zellfreier Extrakte geerntet wurden. Neben den Wachstumskurven sind die Wachstumsraten und die Quotienten der Wachstumsraten der von LK1(pJK651) und LK1(pR1651) im jeweiligen Medium angegeben.

Der aus den Wachstumskurven in **4.5.2-1 [B]** ermittelte Quotient aus den Wachstumsraten der Kontrolle LK1(pJK651) und der *pepR1*-exprimierenden Kultur (LK1(pR1651)) fiel beim Wachstum in 2% Glukose mit 1,72 kleiner aus als in Medium mit 3% Glukose (1,78), was daraufhin deutet, daß nicht nur ein Zucker-spezifischer, sondern auch ein Zuckerkonzentrations-abhängiger Einfluß von PepR1 vorliegt.

Für die in den Abbildungen **4.5.2-1 [C]** und **[D]** gezeigten Wachstumsverläufe von LK1(pJK651) und LK1(pR1651) in MRS supplementiert mit 2 % Fruktose oder 2% Ribose stellte sich ein anderes Bild dar. Alle Stämme erreichten eine geringere O.D.<sub>600</sub> am Ende des Kulturverlaufes als die in MRS mit 2 % respektive 3 % Glukose gewachsenen Kulturen in **Abb. 4.5.2-1 [A] + [B]**, wobei die Kontrollkulturen (LK1(pJK651)) etwas höher wuchsen als die Kulturen mit dem Plasmid pR1651. Die Wachstumskurven der jeweils zwei zu vergleichenden Kulturen in **Abb. 4.5.2-1 [C]** und **Abb. 4.5.2-1 [D]** verliefen annähernd deckungsgleich. Im Vergleich zu seiner Kontrolle (LK1(pJK651)) wurde der Stamm LK1(pR1651) beim Wachstum in MRS-Medium mit Fruktose oder Ribose als C-Quelle nur wenig bis gar nicht behindert.

Die elektrophoretische Analyse (siehe **Abb. 4.5.2-2**), der entsprechenden zellfreien Extrakte auf einem 12%igen SDS-PAA-Gel zeigte keine signifikanten und auf Überexpression von PepR1 (~37 kDa) in den verschiedenen Kulturen hinweisenden Unterschiede.



**Abb. 4.5.2-2 SDS-PAA-Gel (12%ig) von zellfreien Extrakten der unter 4.5.2.1-1 [B]-[D] gezeigten LK1-Kulturen.** In den beiden Spuren M wurden 2 µg eines Proteinstandards zur Größenbestimmung (Midrange-Marker, Promega) aufgetragen. Die Spuren 1-6 enthalten je 10 µg der zellfreien Extrakte. Spur 1 und 2 enthalten den Extrakt von LK1(pJK651) bzw. LK1(pR1651) der in 2% Glukose enthaltendem MRS kultivierten Zellen. Die Spuren 3 und 4 die zu vergleichenden Extrakte aus LK1(pJK651) und LK1(pR1651), gewachsen in mit 2% Fruktose supplementierten MRS; Spuren 5 und 6: Extrakte aus LK1(pJK651) und LK1(pR1651), kultiviert in MRS-Medium mit 2% Ribose.

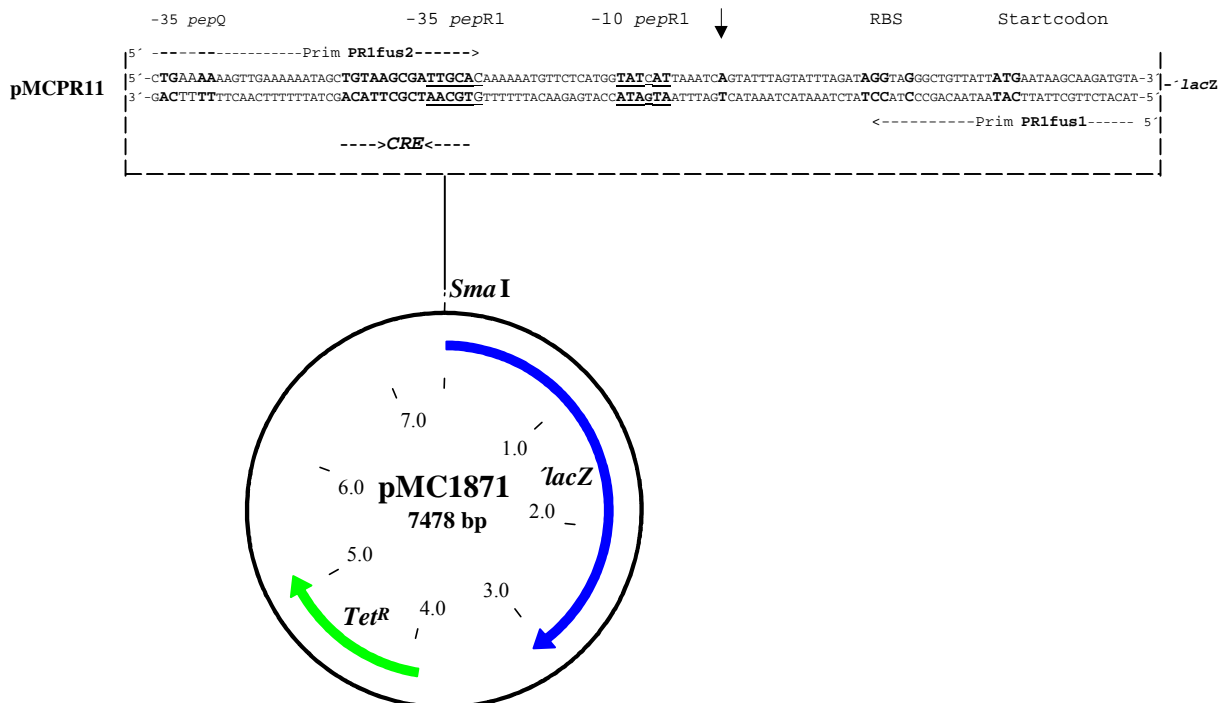
Die dargestellten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die moderate *in trans* Expression von plasmidkodiertem *pepR1*, welches zusätzlich zu dem in *Lactobacillus casei* LK1 präsenten *ccpA* vorliegt, in die fein balancierten C-Quellen-abhängigen zellulären Regulationsprozesse dieses Organismus eingreift und somit in Abhängigkeit von der Art des vorliegenden Zuckers und seiner Konzentration eine die unterschiedlichen Wachstumsraten erklärende negative Transdominanz ausüben könnte.

#### 4.6 Untersuchung der Autoregulation des *pepRI*-Promotors durch PepR1 im heterologen *E. coli*-System

Die vorangegangene funktionelle Analyse der potentiellen *cre*-Elemente und ihrer regulatorischen Einflüsse bei der transkriptionellen Regulation des Promotors der Peptidase Q (siehe **Kap. 4.1**), der Promotoren der Peptidasegene *pepI* und *pepX* (siehe **Kap. 4.3**) sowie der nur partiellen Komplementation des *ccpA*-Defektes der *S. xylosum*-Mutante TX154 (siehe **Kap. 4.4**) warfen die Frage auf, ob PepR1 auch seine eigene Expression reguliert. Neben den oben angeführten Resultaten lässt auch die Lage des *cre* in der intergenischen Region diese Hypothese berechtigt erscheinen. Bei der chromosomalen Organisation der intergenischen Region zwischen *pepRI* und *pepQ* fällt auf, daß das hier lokalisierte *cre* Operator mit seiner rechten Halbseite die -35-Region des *pepRI*-Promotors fast vollständig überlappt (siehe **Kap 4.1, Abb. 4.1-1**). Bedingt durch die in den Kapiteln **4.1** bis **4.4** bereits dargestellten Resultate und durch die vorliegende chromosomale Struktur, sollte nun auch die Auswirkung der PepR1-Expression auf die transkriptionelle Regulation seiner eigenen Expression untersucht werden. Dazu wurde der schon bei der Untersuchung der Promotoren der Peptidasegene *pepQ*, *pepI* und *pepX* eingeschlagene Weg gewählt.

##### 4.6.1 Klonierung des *pepRI*-Promotors in pMC1871

Die Erzeugung des PCR-Produktes des *pepRI*-Promotorbereiches (*PpepRI*), die Klonierung des aufgereinigten PCR-Fragmentes in die *SmaI*-Restriktionsschnittstelle des Vektors pMC1871 und die



**Abb. 4.6.1-1 Konstruktion des Plasmides pMCPR11.** Die Abbildung zeigt den Vektor pMC1871 und das in die *SmaI*-Restriktionsschnittstelle von pMC1871 inserierte Fragment der *pepRI*-Promotorregion. Die relevanten Elemente des klonierten *PpepRI*-Fragmentes sind fett gedruckt dargestellt und beschriftet. Die zur Synthese des klonierten PCR-Produktes notwendigen Primer (Prim) sind ober- bzw. unterhalb des amplifizierten, klonierten DNA-Fragmentes eingezeichnet. Der Startpunkt des *pepRI*-Transkripts (Stucky *et al.*, 1996) ist mit einem Pfeil (↓) markiert. *Tet<sup>R</sup>*, Tetracyclin-Resistenz; *lacZ*, 5'-trunkiertes *lacZ*-Gen.

Selektion und Sequenzüberprüfung der als richtig identifizierten Plasmide erfolgte wie unter **4.1.1** für die Subklonierung des *pepQ*-Promotors und mutierter Varianten beschrieben. Als Template für die mit der ULTma DNA-Polymerase unter Standardbedingungen durchgeführte PCR diente das Plasmid pMS1, als Primer für die Polymerasenkettenreaktion wurden die Oligonukleotide **PR1fus1** und **PR1fus2** (siehe **Abb. 4.6.1-1**; Sequenz der Oligonukleotide, siehe Anhang) verwendet. Die Sequenzierung zur Überprüfung der Basenabfolge klonierter PCR-Produkte erfolgte mit dem Primer pMCkon (siehe Anhang). Eines der als richtig identifizierten Plasmide, wurde pMCPR11 genannt und in die weiteren Experimente eingesetzt.

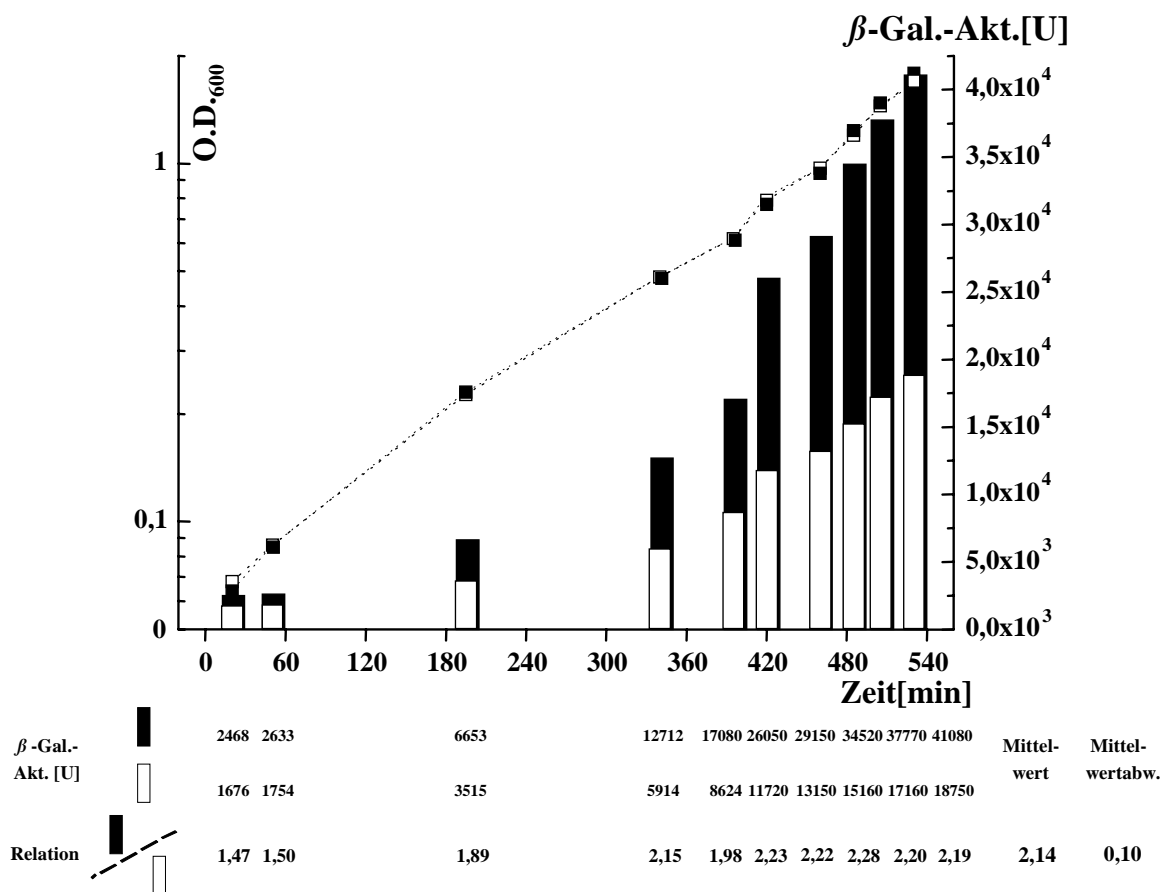
#### 4.6.2 Einfluß von PepR1 auf die Expression der *PpepR1::lacZ*-Translationsfusion in *E. coli*

Das unter **4.6.1** konstruierte Plasmid wurde wie unter **4.1.2** bereits beschrieben in *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ) mit einem zweiten, kompatiblen Plasmid, pFNP13 (Stucky *et al.*, 1996), welches das gesamte *pepR1*-Gen einschließlich seines eigenen Promotors trug, co-transformiert. Der Ampicillinresistenz vermittelnde Vektor pFN476, welcher das Fragment mit dem *pepR1*-Gen nicht trug, diente als Kontrolle. Kolonien, die auf LB-X-Gal-Agarplatten, die mit Tetracyclin und Ampicillin versetzt waren, Blaufärbung zeigten, wurden abgeimpft, die Plasmide durch Minipräparation isoliert und mit Hilfe geeigneter Restriktionenschnittstellen analysiert. Von den überprüften gewachsenen Kulturen wurden -80°-Glycerinkulturen angelegt. Zum Einsatz in  $\beta$ -Galaktosidase-Messung (Miller, 1972) wurden 5 ml-Übernachtskulturen aus diesen Stocks angelegt und die Messungen anschließend mit frisch überimpften Übertagkulturen durchgeführt. Anhand von der wachsenden Kultur über die Zeit entnommenen Aliquots wurden die jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Die Abbildung **4.6.2-1** zeigt die grafische Darstellung der Resultate der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen und die aus den Messergebnissen der beiden zu vergleichenden Kulturen berechneten Repressionsfaktoren (Relation).

Die Betrachtung der in Abbildung **4.6.2-1** dargestellten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *PpepR1::lacZ*-Fusionskonstrukte zeigt deutliche Aktivitätsunterschiede in An- bzw. Abwesenheit des Regulators PepR1. Die Anwesenheit von PepR1 *in trans* übt einen Einfluß auf die Expression des *PpepR1::lacZ*-Fusionskonstruktes in CM89(pMCPR11/pFNP13) aus (**Abb. 4.6.2-1**). Die grafische Darstellung läßt eine deutliche Reprimierung der Aktivität der *pepR1*-Promotor-Fusion über den gesamten untersuchten Verlauf der Kulturen erkennen. Für diese Repression der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *PpepR1::lacZ*-Konstruktes (pMCPR11) in Gegenwart von *pepR1* *in trans* (exprimiert von Plasmid pFNP13) konnte bei CM89(pMCPR11/pFNP13) im Vergleich zu CM89(pMCPR11/pFN476) ein Mittelwert für die Repression von  $2,14 \pm 0,10$  (siehe **Abb. 4.6.2-1**) ermittelt werden.

Diese Resultate ließen darauf schließen, daß das PepR1-Protein eine auto-regulierende Wirkung auf die Transkriptionsinitiation an seinem eigenen Promotor ausübt. Auch hier liegt der begründete Verdacht nahe, daß das *catabolite responsive element* (cre) die Operatorsequenz ist, welche sowohl im heterologen *E. coli* als auch in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 diese transkriptionelle (Auto-) Regulation vermittelt.



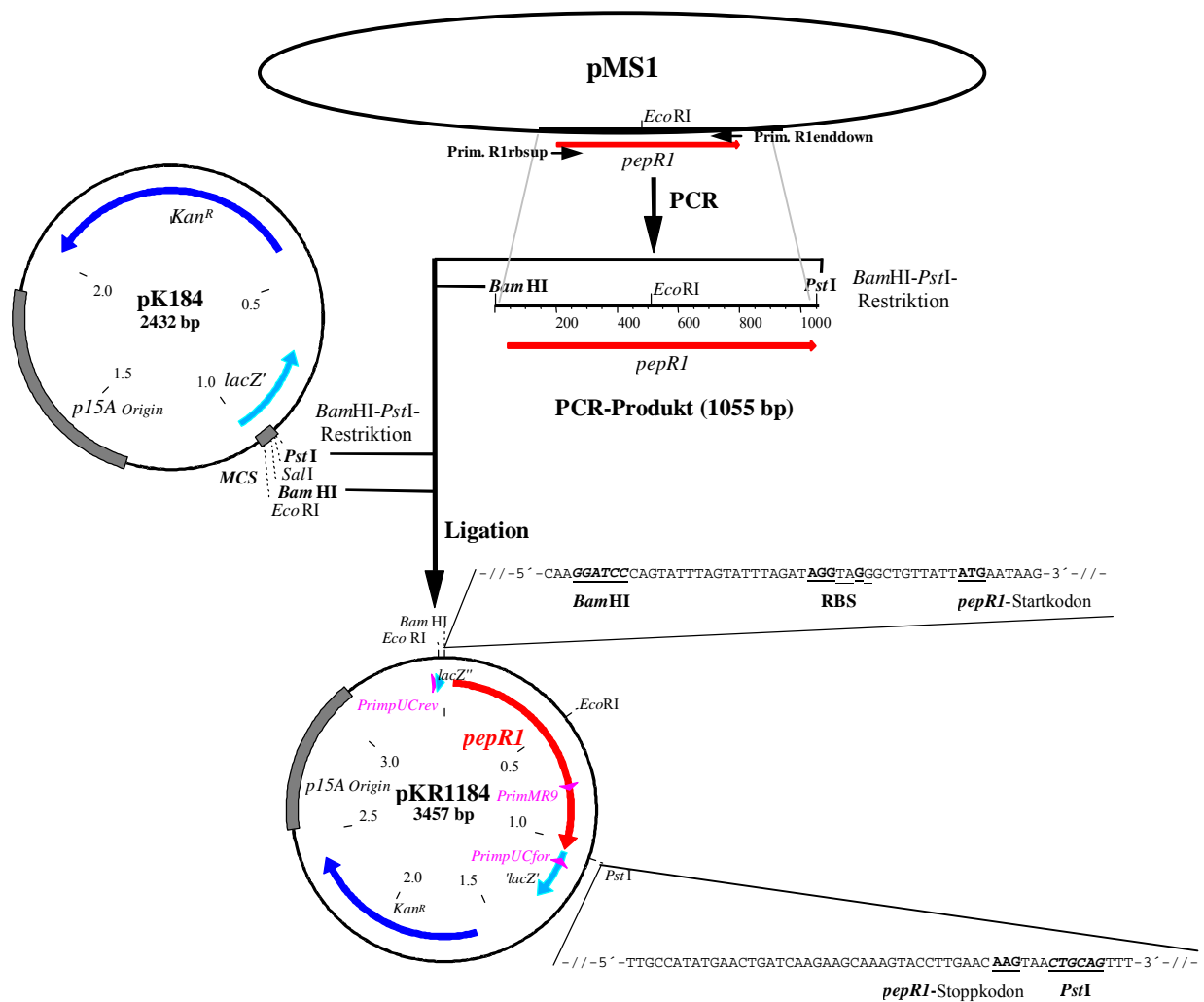


**Abb. 4.6.2-1 Einfluß von PepR1 auf *PpepR1::lacZ* in Doppeltransformanten von *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ).** Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ( $\beta$ -Gal.-Akt [U], Balken) der CM89-Kulturen welche entweder die Plasmide pMCPR11 und pFN476 (■, ▨) oder pMCPR11 und pFNP13 (□, □) trugen. Die Zahlwerte repräsentieren die durch Balken in der Grafik abgebildeten gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die Relationen ergeben sich aus den Aktivitäten der beiden verglichenen Kulturen. Der aus den einzelnen Verhältniswerten ( $\approx$  Represionsfaktoren, RF) errechnete Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in den beiden rechten Spalten bei den Zahlenwerten der Abbildung angegeben.

#### 4.6.3 Klonierung des *pepR1*-Genes in den Expressionsvektor pK184

Um die bei 4.6.2 gemessenen Aktivitätsunterschiede bei An- bzw. Abwesenheit des Regulators PepR1 zu überprüfen, sollte das *pepR1*-Gen ohne seinen eigenen Promotor unter die Kontrolle des *E. coli lac*-Promotors gestellt werden. Bei *in trans* Expression des resultierenden Konstruktes pKR1184 (*Plac::pepR1*) mit pMCPR11 sollte dann die Aktivität der *PpepR1::lacZ*-Translationsfusion unter Ausschaltung möglicher *cis*-autoregulatorischer Einflüsse, die beim Untersuchungsansatz in 4.6.2 durch die Bindung von PepR1 an die Operatorsequenz (*cre*) des Promotors von *pepR1* (Plasmid pFNP13) parallel zur Bindung an das *cre* des *PpepR1::lacZ*-Translationsfusionskonstrukts (pMCPR11) die festgestellte transkriptionelle Repression beeinflusst haben könnte, bestimmt werden. Als Vektor für die Klonierung von *pepR1* stromabwärts des mit IPTG induzierbaren *E. coli lac*-Promotors wurde das Plasmid pK184 (Jobling und Holmes, 1990) gewählt. Dieser in *E. coli* in mittlerer Kopienzahl propagierte

Vektor besitzt ein Replikon des p15A-Typs und ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion. Beide Eigenschaften machen diesen Vektor kompatibel zu pMCPR11, der ein Replikon des ColE1-Typs aufweist, und ermöglichen die parallele Vermehrung beider Plasmide in *E. coli*. Die Subklonierung von *pepRI* als transkriptionelle Fusion erfolgte durch Insertion eines 1047 bp PCR-Produktes mit künstlich eingeführten *Bam*HI und *Pst*I sticky-ends in pK184. Die Konstruktion ist in Abbildung 4.6.3-1 schematisch dargestellt. Das PCR-Produkt enthielt das komplette *pepRI*-Gen sowie 35 Basenpaare der Gen-upstream-Region, auf welcher auch seine putative Ribosomenbindestelle (RBS) lokalisiert ist (siehe Abb. 4.6.3-1). Die PCR wurde mit der ULTma-Polymerase, pMS1-Plasmid-DNA als Matrize, sowie den Primern **R1rbsup** und **R1enddown** unter Standardbedingungen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde

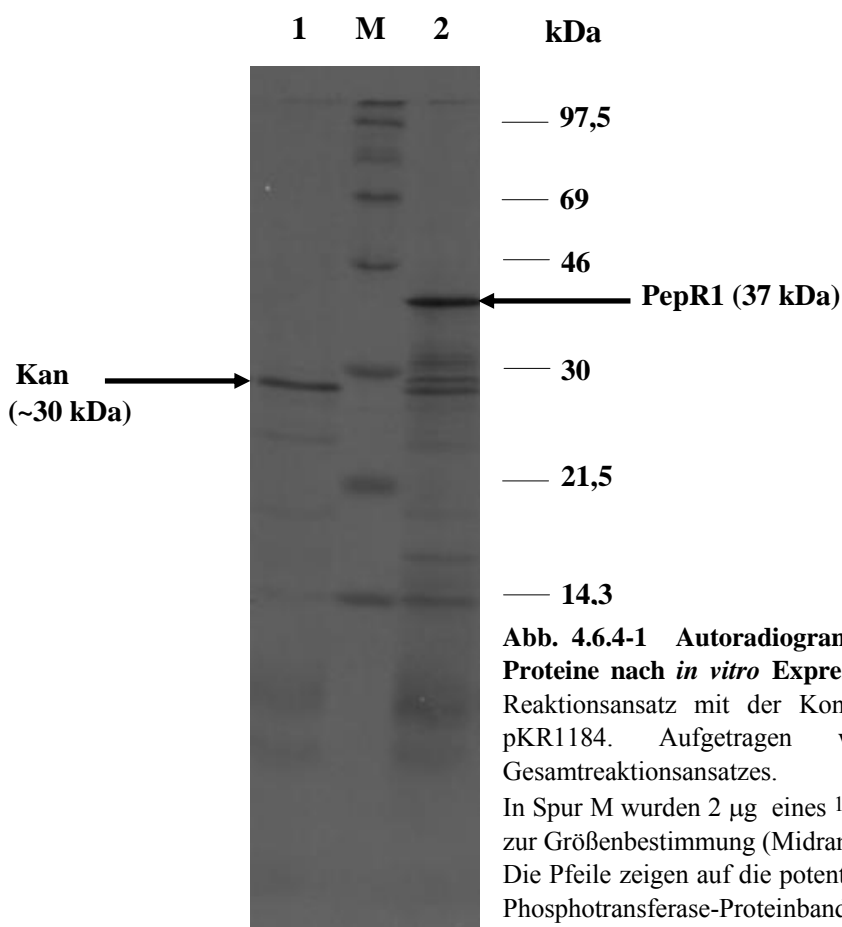


**Abb. 4.6.3-1 Konstruktion des Plasmides pKR1184.** Erzeugung und Insertion des restringierten PCR-Fragmentes (*pepRI*<sup>+</sup>, 1047 bp) in den Vektor pK184 (Jobling und Holmes, 1990). Gezeigt sind der Vektor, das als Template-DNA verwendete Plasmid pMS1, die zur Amplifikation des Fragmentes verwendeten Primer (Prim. R1rbsup, Prim. R1enddown) und das resultierende Plasmid pKR1184. Von der multiple-cloning site (MCS) des Vektors pK184 sind nur die für die Klonierung und die anschließende Restriktionsanalyse benutzten Schnittstellen (*Bam*HI, *Pst*I, *Sal*I und *Eco*RI) angegeben. *Kan<sup>R</sup>* steht für Kanamycin-Resistenzgen (Kanamycin-Phosphoptransferase); *lacZ'*, *lacZ'* und *lacZ''* stehen für *lacZ*α-Fragmentanteile. Zusätzlich sind bei pKR1184 die zur Sequenzierung des *pepRI*-Inserts benutzten Primer (PrimpUCrev, PrimpUCfor und PrimMR9) entsprechend ihrer Lokalisation eingetragen. Die beiden Detailausschnitte neben pKR1184 bilden die *pepRI* upstream-Sequenz sowie das 3'-Ende des Genes mit den künstlich eingeführten *Bam*HI- und *Pst*I-Schnittstellen ab.

nach Restriktion der künstlich eingeführten Schnittstellen für *Bam*HI und *Pst*I in die korrespondierenden Schnittstellen von pK184 ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen mit geeigneten doppelt oder einfach schneidenden Restriktionsenzymen überprüft. Bei drei der als das gewünschte Konstrukt identifizierten Plasmide wurde das inserierte Fragment durch Sequenzreaktionen mit den Primern **pUCrev**, **pUCfor** und **MR9** (siehe **Abb. 4.6.3-1**) überprüft. Eines der als das gewünschte Konstrukt pKR1184 identifizierte Plasmid wurde in die weitergehenden Untersuchungen eingesetzt.

#### 4.6.4 Gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation von pKR1184

Um zu klären, ob das bei pKR1184 unter die Kontrolle des *E. coli lac*-Promotors gestellte *pepR1*-Gen bei den nachfolgenden *in vivo* Experimenten auch transkribiert und translatiert werden würde, sollte seine Expression mit Hilfe eines gekoppelten *in vitro* Transkriptions/Translationssystems (Promega) untersucht werden. Das Plasmid pKR1184 diente hierbei als Matrize, zur Kontrolle wurde der Vektor pK184 eingesetzt. Die durch den Einbau von <sup>35</sup>S-Methionin markierten neusynthetisierten Proteine wurden auf einem 12%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt (**Abb. 4.6.4-1**).



**Abb. 4.6.4-1** Autoradiogramm der <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proteine nach *in vitro* Expression von pKR1184. Spur 1 enthält den Reaktionsansatz mit der Kontrolle pK184, Spur 2 den Ansatz mit pKR1184. Aufgetragen wurde jeweils die Hälfte des Gesamtreaktionsansatzes.

In Spur M wurden 2 µg eines <sup>14</sup>C radioaktiv-markierten Proteinstandards zur Größenbestimmung (Midrange-Marker, Promega) aufgetragen.

Die Pfeile zeigen auf die potentielle PepR1- (Spur2) und die Kanamycin-Phosphotransferase-Proteinbande (Spur 1).

Eine prominente zusätzliche Proteinbande, deren Molekulargewicht durch Vergleich mit den Markerbanden auf ca. 37 kDa bestimmt werden konnte, trat nur bei der Spur des Reaktionsansatzes mit pKR1184 auf, die Kontrolle mit pK184 zeigte diese Bande nicht. Dieses Molekulargewicht stimmt gut mit den berechneten 36.955 Da von PepR1 überein. Als weitere deutliche Bande von ca. 30 kDa tritt daneben die Kanamycin-Phosphotransferase, das Genprodukt des Kanamycin-Resistenzgenes (*kan*), welches sich sowohl auf dem Vektor als auch auf dem Plasmid pKR1184 befindet, auf. Aus diesem Ergebnis konnte abgeleitet werden, daß das auf pKR1184 plasmidkodiert vorliegende *pepR1* Gen korrekt transkribiert und translatiert werden kann.

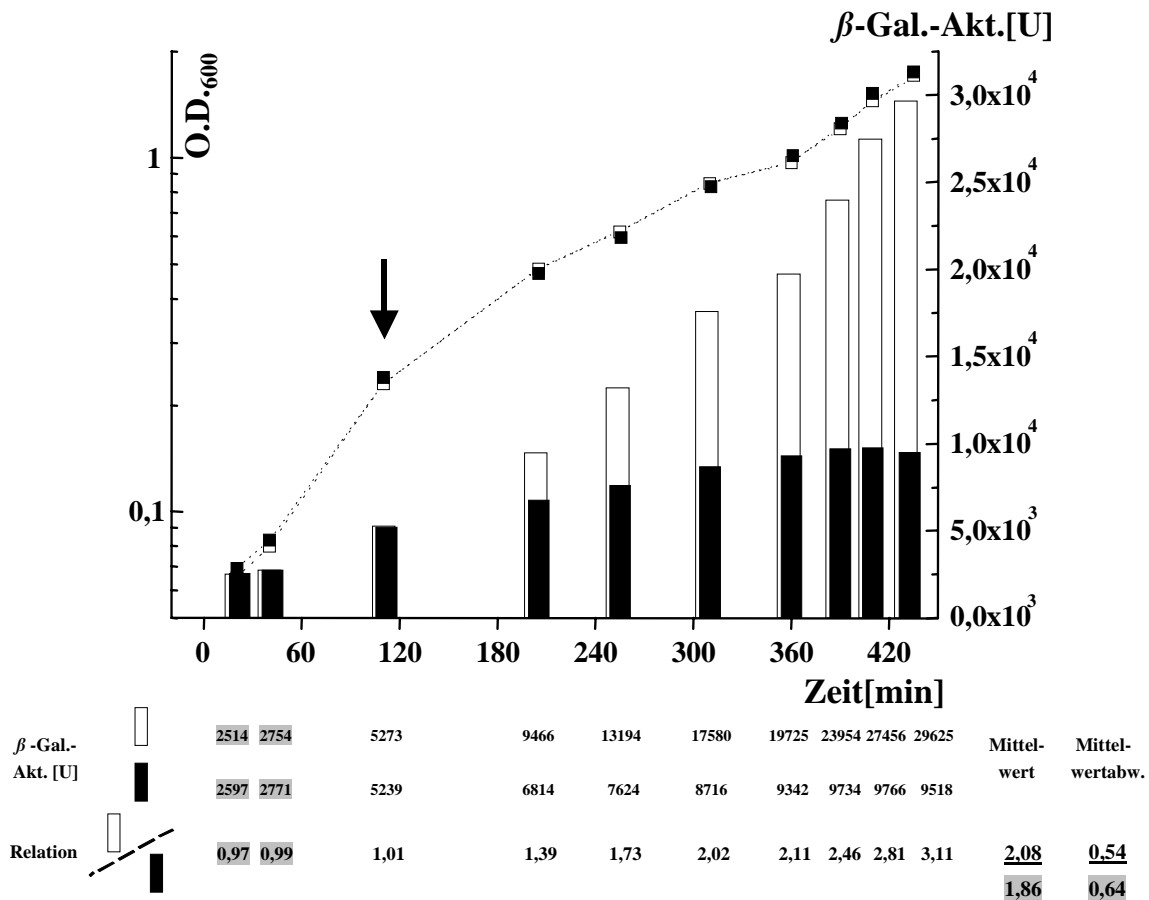
#### 4.6.5 Einfluß von PepR1 (*P<sub>lac</sub>::pepR1*) auf die Expression der *P<sub>pepR1</sub>::lacZ*-Translationsfusion in *E. coli*

Zur Analyse der simultanen Expression von pKR1184 (*P<sub>lac</sub>::pepR1*) und pMCPR11 (*P<sub>pepR1</sub>::lacZ*) in *E. coli* JM109 wurde abgesehen von kleinen experimentellen Abweichungen wie in Abschnitt 4.6.2 vorgegangen. Nach der gleichzeitigen Transformation der *E. coli* JM109 Zellen mit beiden oben genannten Plasmiden wurden von Kolonien, die auf LB-X-Gal-Agarplatten, die mit Tetracyclin und Kanamycin versetzt waren, Blaufärbung zeigten, die Plasmide isoliert und analysiert. Von verifizierten Klonen wurden 5 ml-Übernachtskulturen angelegt und die Messungen anschließend mit zwei frisch überimpften Übertagkulturen durchgeführt. Für die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase (Miller, 1972) wurden den wachsenden Kulturen über den zeitlichen Verlauf Aliquots entnommen und die jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt. Bei einer O.D.<sub>600</sub> von 0,22 wurde einer der beiden Ansätze durch Zugabe IPTG zu einer Endkonzentration von 5 mM induziert. Beide Ansätze wurden dann schüttelnd weiter inkubiert.

Die Abbildung 4.6.5-1 zeigt die grafische Darstellung der Resultate der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen und die aus den Messergebnissen der beiden zu vergleichenden Kulturen berechneten Repressionsfaktoren (Relation).

Die in Abbildung 4.6.5-1 dargestellten Messungen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten des *P<sub>pepR1</sub>::lacZ*-Fusionskonstruktes (pMCPR11) zeigen deutliche Effekte bei Induktion (pKR1184, IPTG<sup>+</sup>) des Gens für den Regulator PepR1. Die Induktion und nachfolgende Expression von PepR1 in *trans* übt einen Einfluß auf die Expression des *P<sub>pepR1</sub>::lacZ*-Fusionskonstruktes in JM109(pMCPR11/pKR1184) aus (Abb. 4.6.5-1). Es ist eine deutliche Reprimierung der Aktivität der *pepR1*-Promotor-Fusion startend mit dem Zeitpunkt der IPTG-Zugabe zur Kultur erkennen. Für diese Repression der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *P<sub>pepR1</sub>::lacZ*-Konstruktes (pMCPR11) in Gegenwart von *pepR1* in *trans* (exprimiert von Plasmid pKR1184) konnte bei JM109(pMCPR11/pKR1184, IPTG<sup>-</sup>) im Vergleich zu JM109(pMCPR11/pKR1184, IPTG<sup>+</sup>) ein Mittelwert für die Repression von  $2,08 \pm 0,54$  (siehe Abb. 4.6.5-1) ermittelt werden.

Diese Resultate zeigen im Vergleich mit den Resultaten aus 4.6.2 keinen sichtbaren Unterschied zwischen *cis*- und *trans*-Expression von *pepR1* ( $\pm$  *cre pepR1*). Sie deuten aber wie die Messergebnisse aus 4.6.2 darauf hin, daß das PepR1-Protein eine autoregulierende Wirkung auf die



**Abb. 4.6.5-1** Einfluß von *PepR1* (*Plac::pepR1*) auf *PpepR1::lacZ* in Doppeltransformanten von *E. coli* JM109 (*lac*<sup>-</sup>). Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ( $\beta$ -Gal.-Akt [U], Balken) der JM109-Kulturen, welche die Plasmide pMCPR11 und pKR1184 trugen; und entweder mit 5 mM IPTG induziert (■, ▨) oder nicht induziert wurden (□, □). Zeitpunkt der Induktion, siehe Pfeil. Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kultur. Die aus den zu vergleichenden Aktivitäten errechneten Verhältniswerte (Relation), der sich hieraus ergebende Mittelwert und die Mittelwertabweichung sind in den beiden rechten Spalten bei den Zahlenwerten angegeben. Die grau schattierten Werte wurden nicht in die Berechnung des Mittelwertes und der Mittelwertabweichung einbezogen. Wurden die grau schattierten Werte in die Berechnung des Mittelwertes einbezogen, dann wurden der grau unterlegte Mittelwert und die grau unterlegte Mittelwertabweichung erzielt.

Transkriptionsinitiation an seinem eigenen Promotor ausüben könnte. Auch hier liegt der Verdacht nahe, daß das *catabolite responsive element* (*cre*) der Operator ist, welcher sowohl im heterologen *E. coli* als auch in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 diese transkriptionelle (Auto-) Regulation vermittelt.

#### 4.7 Analyse der Transkripte von *pepR1*, *pepQ*, *pepI* und *pepX* sowie der spezifischen Aktivitäten der Peptidasen PepQ, PepI und PepX bei Wachstum in modifiziertem chemisch definiertem Medium (CDM<sub>mod</sub>) mit verschiedenen Zuckerquellen

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel zur regulatorischen und autoregulatorischen Kontrolle der Transkription der Peptidasen Q, I und X (Kap. 4.1, 4.3) und des Regulators PepR1 (Kap. 4.6 und 4.5) in den heterologen Organismen *E. coli* CM89 und JM109 sowie *Lb. casei* LK1 warfen die Frage auf, ob die Expression und/oder die Aktivität dieser Peptidasen sowie die Transkription des *pepR1*-Genes in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 einer Regulation oder Modulation durch Milieufaktoren wie z.B. der jeweiligen Kohlenstoff- oder Aminosäure-Quelle unterliegt.

Diese Fragestellung wird neben der bereits beschriebenen „chromosomalen Nähe“ von *pepR1* und *pepQ* (Stucky *et al.*, 1996, Stucky *et al.*, 1995a) auch wie einleitend beschrieben durch die Existenz weiterer potentiell regulatorischer Gene in unmittelbarer Nachbarschaft verschiedener Peptidasegene wie zum Beispiel des *pepI*- (Dick A., 1999; Klein *et al.*, 1994a) und des *pepC*-Genes (Weber A., 1998) untermauert.

Diese Konstellationen im Genom von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 und die damit einhergehende Verbindung zu Regulationsvorgängen wie möglicherweise der Katabolitrepression warfen zusätzlich die Frage auf, ob die Expression oder die Aktivität der Peptidasen auch durch die Wachstumsphase, in der sich die Kultur befindet, beeinflusst wird. Diese Fragen sollte nun anhand von Studien an den bereits in früheren Arbeiten charakterisierten prolinspezifischen Peptidasen Proliniminopeptidase (PepI; Dick A., 1999; Klein *et al.*, 1994b), Prolidase (PepQ; Stucky *et al.*, 1995a) und X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase (PepX; Meyer-Barton *et al.*, 1993) näher beleuchtet werden. Diese prolinspezifischen Peptidasen wurden aus zwei Gründen ausgewählt. Zum Ersten ist ihre Funktion bedingt durch die Prolin-Auxotrophie von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 für das Wachstum des Stammes von besonderer Bedeutung und zum Zweiten liegen zwei der drei Gene (*pepI*, *pepQ*) (Dick A., 1999; Klein *et al.*, 1994a, Stucky *et al.*, 1995b) in chromosomaler Nachbarschaft zu Genen mit potentiell regulatorischer Funktion (*pepR2*, *pepR1*) (Dick A., 1999; Stucky *et al.*, 1996)

Daneben sollte untersucht werden, ob C-Quellen- und Wachstumsphasen-spezifische Unterschiede beim *pepR1*-Transkript zu beobachten sind. Der Fokus hierbei lag gezielt auf dem Vergleich von Transkriptmengen des Regulatorgenes und des Gehaltes an spezifischer mRNA sowie der enzymatischer Aktivitäten der Peptidasen zu verschiedenen Kultivierungszeiten beim Wachstum von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM720 in einem definierten Minimalmedium, welchem 2 % Casamino acids (Difco), einer Mischung aus Aminosäuren und Peptidsubstraten im Verhältnis 1:4, beigefügt wurde und welches entweder Glukose oder Laktose als Kohlenstoffquelle enthielt.

Der Grund der Beschränkung auf die Zucker Glukose und Laktose liegt in der Tatsache begründet, daß das Milchsäurebakterium *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 nur eine kleine Anzahl verschiedener Zucker effizient als Energiequelle verwertet. Von 44 überprüften Verbindungen vermitteln die Hexosen Fruktose, Galaktose, Glukose und Mannose sowie N-Acetyl-Glucosamin schwaches bis sehr gutes Wachstum. Die Disaccharide Laktose, Saccharose und Trehalose können von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ebenfalls sehr effizient, Maltose dagegen nur schlecht verwertet werden (Tab. 4.7-1; J. Klein, persönliche Mitteilung). Das Unvermögen von *Lb. delbrückii*, die untersuchten Pentosen als Energiequelle zu nutzen, beruht auf dem Fehlen des Schlüsselenzymes des Pentosephosphatweges, der

Phosphoketolase, was ein typisches Merkmal für obligat homofermentative Milchsäurebakterien ist (Barre, 1978).

Wie **Tab. 4.7-1** zeigt, kann *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 sowohl das Monosaccharid Glukose als auch das Disaccharid Laktose effizient verwerten. Da Glukose in der Mehrzahl PTS-abhängig und Laktose in der Mehrzahl PTS-unabhängig in die Zelle geschleust wird, beide Zucker also bezüglich ihrer allgemeinen Stellung bei der Katabolitenrepression zu unterschiedlichen Gruppen gehören, sollte der Vergleich der möglicherweise durch sie stimulierten unterschiedlichen Regulation oder Modulation der Expressionsniveaus sowohl der Peptidasegene als auch des potentiellen *pepRI*-Regulatorgens interessante Ergebnisse liefern können.

Substrat	Verwertung	Substrat	Verwertung
<b>Glukose</b>	++++	Gentibiose	-
<b>Laktose</b>	++++	Glukonat	-
Mannose	++++	Glycerin	-
Trehalose	++++	Glykogen	-
Saccharose	+++	Inosit	-
Galaktose	++	Inulin	-
N-Acetyl-Glukosamin	++	Ketoglukonat (2/5)	-
Fruktose	+	Lyxose (D-)	-
Maltose	+	Mannit	-
$\beta$ -Methyl-D-Xylosid	-	Melezitose	-
$\alpha$ -Methyl-Glukosid	-	Melibiose	-
$\alpha$ -Methyl-Mannosid	-	Raffinose	-
Adonit	-	Rhamnose	-
Amygdalin	-	Ribose	-
Arabinose (D/L)	-	Salicin	-
Arabit (D/L)	-	Sorbit	-
Arbutin	-	Sorbose	-
Cellobiose	-	Stärke	-
Dulcit	-	Tagatose (D-)	-
Erythrit	-	Turansäure	-
Esculin	-	Xylit	-
Fukose (D-)	-	Xylose (D/L)	-

**Tab. 4.7-1: Zuckerspektrum von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290** (mod. nach Dick A., 1999; Klein J., pers. Mitteilung). – keine Verwertung, + sehr schwaches, ++schwaches, +++ gutes, ++++ sehr gutes Wachstum.

Um die mögliche Beeinflussung proteolytischen Funktionen durch die Art der Energiequelle zu untersuchen, wurden die spezifischen Aktivitäten der Peptidasen I, X, und Q bei Wachstum von *Lb. delbrückii* in modifiziertem CD-Medium, versetzt mit 2 % Casamino acids, in dem entweder 2 % Glukose (CDM<sub>Gluk.</sub>) oder 2 % Laktose (CDM<sub>Lak.</sub>) als Energiequelle diente, analysiert. Eine Übersicht über die verwendeten Substrate zur Bestimmung der jeweiligen Peptidaseaktivitäten gibt **Tab. 4.7-2**.

Peptidase	Substrat	Konzentration
PepI	Pro-pNA	2 mM
PepQ	Leu-Pro	8 mM
PepX	Ala-Pro-pNA	2 mM

Tab. 4.7-2: Substrate, die zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet wurden.

Das entweder mit 2 % Glukose oder mit 2 % Laktose supplementierte CDM wurden mit einer Übernachtskultur des Stammes DSM7290 beimpft und bei 42°C bebrütet. Anschließend wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten während des Wachstumsverlaufs, zu Beginn und während der exponentiellen Wachstumsphase sowie beim Übergang in die stationäre Phase, Aliquots entnommen, aus denen mit Hilfe der Methode nach Chomczynski (Chomczynski, 1989; Chomczynski, 1994) Gesamt-RNA isoliert wurde. Zur Bestimmung der entsprechenden Enzymaktivitäten wurde mit Hilfe der Vibrogen-Zellmühle (Bachhofer) ein Teil der der jeweiligen Kultur entnommenen Zellen aufgebrochen und zu zellfreiem Extrakt weiterverarbeitet. Die Wachstumsverläufe mit den entweder mit 2 % Glukose oder 2 % Laktose supplementierten Nährmedium (CDM<sub>Gluk.</sub>, CDM<sub>Lak.</sub>) sind in den **Abb. 4.7.1-1** und **4.7.2-1** wiedergegeben.

Für jedes der zu überprüfenden Peptidasegene, bzw. für das Regulatorgen *pepRI* wurde anschließend eine Northern Blot Analyse (**Abb. 4.7.1-1 C**, **Abb. 4.7.2-1 C/E**) sowie im Falle der Peptidasen eine Bestimmung ihrer spezifischen Aktivitäten (**Abb. 4.7.1-1 B**, **Abb. 4.7.2-1 B/D**) durchgeführt. Eine Übersicht über die in den Northern Hybridisierungsexperimenten eingesetzten, <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden zeigt **Tab. 4.7-3**.

Sonde	Größe (bp) / Position (von/bis) im Genbank-Eintrag	Template-DNA (Plasmid)	Primer	Genbank Eintrag / Referenz
<i>pepI</i>	881 / (413-1293)	pJK502	I8037start I8037stop	Z26948 / Klein <i>et al.</i> , 1994a
<i>pepQ</i>	1108 / (2148-3255)	pMS1	Q8037start Q8037stop	Z54205 / Stucky <i>et al.</i> , 1995b
<i>pepRI</i>	1002 / (1996-995)	pMS1	pepR1-rca-start pepR1-pst-stop	Z54205 / Stucky <i>et al.</i> , 1995b, 1996
<i>pepX</i>	2377 / (291-2667)	pJK433	pepX-start-2.AS pepX-stop-Xbai	Z14230 / Meyer-Barton <i>et al.</i> , 1993

Tab. 4.7-3: Übersicht der PCR-Produkte, die nach Markierung mit <sup>32</sup>P als Sonden zur Northern Blot Analyse eingesetzt wurden. Die Sonden wurden durch PCR-Amplifikation hergestellt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang (**Tab. 7.1-1**) aufgeführt. Die zur Herstellung der Sonden verwendeten Primer wurden ursprünglich zur Verwendung in Klonierungsexperimenten ausgewählt. Sie besitzen an ihren 5'-Enden in der Mehrzahl durch Modifikation der Orginalsequenz künstlich erzeugte Restriktionsschnittstellen sowie weitere nicht paarende Nukleotide.



#### 4.7.1 Analyse der Transkripte von *pepRI* und *pepQ*, sowie der spezifischen Aktivität der Peptidase Q bei Wachstum in modifiziertem chemisch definiertem Medium (CDM<sub>mod.</sub>) mit den Zuckern Laktose oder Glukose

Zur Untersuchung eines möglichen durch die Art der Zuckerquelle bedingten Effektes auf die Expression von *pepQ* und *pepRI* sowie die Aktivität der Peptidase Q wurde *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in chemisch definiertem Medium mit 2 % Casamino acids kultiviert. Als Zuckerquelle dienten Laktose (CDM<sub>Lak.</sub>) oder Glukose (CDM<sub>Gluk.</sub>). Die Ergebnisse dieser Analysen zeigt **Abb. 4.7.1-1 A-D**. Bei der Betrachtung der Wachstumskurven in **Abb. 4.7.1-1 A** erkennt man, daß die in CDM<sub>Lak.</sub> wachsende Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase eine größere Steigung aufwies und zu einer höheren O.D.<sub>600</sub> am Ende des Experimentes auswuchs. Die über die log-Phasen der Kulturen berechneten Wachstumsraten  $\mu$  betragen 0,19 für die in CDM<sub>Lak.</sub> und 0,16 für die in CDM<sub>Gluk.</sub> gewachsenen Zellen. Diese Besonderheit, daß *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in diesem modifizierten chemisch definierten Medium besser auf dem Nicht-PTS-Substrat Laktose als auf Monosaccharid und PTS-Substrat Glukose wuchs, wird in den nachfolgenden Abschnitten des Ergebnisteiles zur Expression und Regulation des *lac*-Operons von DSM7290 noch genauer zu analysieren sein.

Vergleicht man die ermittelten spezifischen PepQ-Aktivitäten (**Abb. 4.7.1-1 B**) in den Proben der drei Entnahmezeitpunkte, dann sind diese bei der früh- und spät-exponentiellen (Entnahmezeitpunkte **1** und **2**) sowie in der früh-stationären Wachstumsphase (Entnahmezeitpunkt **3**) in den Zellen der Kultur in CDM<sub>Gluk.</sub> um die Faktoren 1,6 und 1,9 sowie 1,7 höher als in den Zellen der Kultur im Medium CDM<sub>Lak.</sub>. Dieser Effekt war in mehreren Experimenten reproduzierbar.

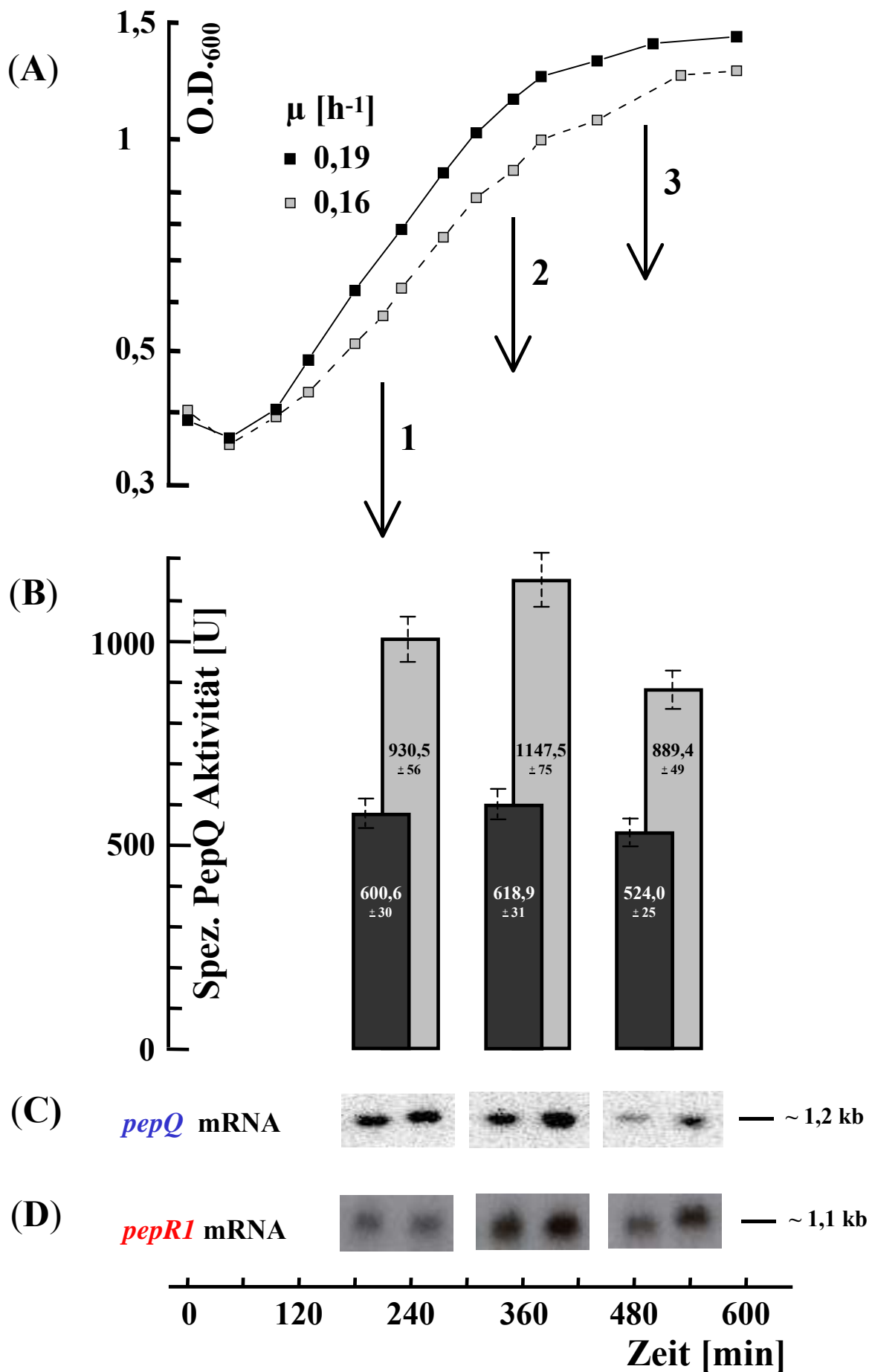
Die anhand der angefertigten Northern Blots (**Abb. 4.7.1-1 C**) abgeschätzten Mengen an *pepQ*-mRNA korrelierten für beide Kulturen (CDM<sub>Gluk.</sub> und CDM<sub>Lak.</sub>) partiell mit den bestimmten Aktivitätsunterschieden, was zumindest teilweise auf eine Regulation/Modulation der *pepQ* Transkription zurückzuführen sein könnte. Diese Korrelation zwischen der Intensität der *pepQ* mRNA-Signale mit den gemessenen PepQ-Aktivitäten gegenüber dem spezifischen Substrat Leu-Pro ist für die Proben der spät-exponentiellen Phase (Zeitpunkt **2**) beider Kulturen am deutlichsten. Der Vergleich der Hybridi-

#### **Abb. 4.7.1-1 A-D: Einfluß der Zuckerquelle auf die Aktivität der Peptidase Q sowie die Expression der Gene *pepQ* und *pepRI* in modifiziertem chemisch definiertem Medium.**

**(A)** Wachstum von DSM7290 in mit 2 % Casamino acids supplementiertem chemisch definiertem Medium, welches entweder 2 % Glukose (□) oder 2 % Laktose (■) als Kohlenstoffquelle enthält.  $\mu$ , Wachstumsrate.

**(B)** Zu drei durch Pfeile (↓) symbolisierten Zeitpunkten wurden Zellaliquots der Kulturen geerntet und zellfreie Extrakte präpariert. Die spezifischen PepQ-Aktivitäten aus den mit Glukose (graue Balken) oder mit Laktose (schwarze Balken) gewachsenen Zellen wurden in Verdünnungen der zellfreien Extrakte (Proteingehalt: 60-100 µg/ml) bestimmt. Die dargestellten Aktivitäten und die zugehörigen Abweichungen (als Balken und als Zahlenwerte eingetragen) resultieren aus jeweils drei Einzelmessungen. Die Einheiten (Units, U) der spezifischen PepQ-Aktivität wurden definiert als nmol freigesetztes Prolin pro (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> und min<sup>-1</sup>.

**(C) / (D)** Northern-Analysen mit je 10 µg RNA pro Spur, die aus den jeweiligen Zellaliquots der mit den zwei verschiedenen Zuckern gewachsenen Kulturen präpariert wurde; Hybridisierungen mit einer *pepQ*-spezifischen **(C)** und einer *pepRI*-spezifischen **(D)** Sonde (**Tab. 4.7-3**).



sierungssignale der *pepQ*-spezifischen Transkripte beider Kulturen (CDM<sub>Gluk.</sub> gegenüber CDM<sub>Lak.</sub>) zueinander sowie mit den enzymatischen Aktivitäten der Peptidase Q lassen diese Korrelation für den früh-exponentiellen (Entnahmepunkt **1**) und den früh-stationären Wachstumszeitpunkt (Entnahmepunkt **3**) nicht erkennen. Eine mögliche Erklärung für diese mangelnde Übereinstimmung könnten post-transkriptionelle oder post-translationale Einflüsse auf die Regulation der PepQ-Expression sein.

Die ebenfalls untersuchten, circa 1,1 kb großen, *pepRI*-spezifischen Transkripte (**Abb. 4.7.1-1 D**) wiesen, ähnlich wie die *pepQ*-Transkripte, vom Medium und der Wachstumsphase der Kultur abhängige Unterschiede in ihrer Signalintensität auf. In der früh-exponentiellen Wachstumsphase (Zeitpunkt **1**) konnte für die Kulturen in CDM<sub>Gluk.</sub> und CDM<sub>Lak.</sub> eine ähnliche Menge *pepRI*-mRNA abgeschätzt werden. In der spät-exponentiellen Phase (Zeitpunkt **2**) stieg der *pepRI*-mRNA-Gehalt für die Kultur in CDM<sub>Gluk.</sub> auf das ungefähr 3-fache an, während die Transkriptmenge in CDM<sub>Lak.</sub> nur das ungefähr 2- bis 2,5-fache im Vergleich zum Entnahmezeitpunkt **1** ausmachte. Zum Zeitpunkt **3** (früh-stationäre Wachstumsphase) betrug der *pepRI*-mRNA-Gehalt bei den Zellen der Kultur in CDM<sub>Gluk.</sub> das etwa 2- bis 2,5-fache, bei CDM<sub>Lak.</sub> das 1- bis 1,5-fache im Vergleich zur früh-exponentiellen *pepRI*-Transkriptmenge.

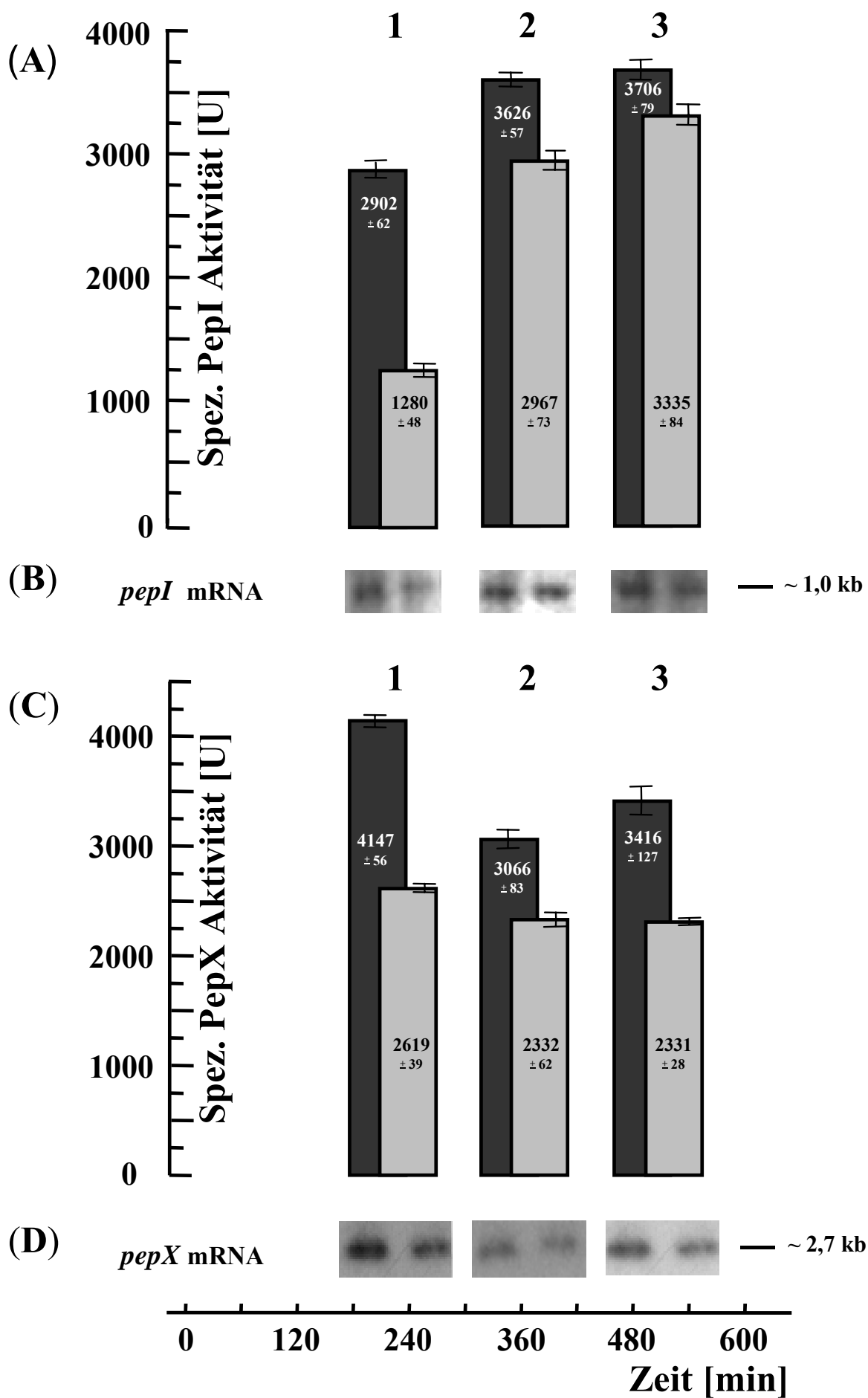
Diese lediglich um den Faktor 2-3 schwankende Veränderung des Gehaltes an *pepRI*-mRNA deutet auf eine transkriptionelle Regulation von *pepRI* hin, die mit großer Wahrscheinlichkeit als Autoregulation von PepRI ausgeübt wird.

Die jeweiligen Veränderungen bei der *pepRI*-Transkriptmenge beider Kulturen korrelieren in allen Wachstumsphase mit den dort ermittelten Veränderungen bei der Menge an *pepQ*-Transkript, was die Hypothese einer transkriptionellen Regulation der *pepQ*-Transkription in Verbindung bringt mit der parallel hierzu ablaufenden (Auto-) Regulation von *pepRI*.

#### 4.7.2 Analyse der Transkripte von *pepI*, *pepX* sowie der spezifischen Aktivitäten der korrespondierenden Enzyme PepI und PepX bei Wachstum in modifiziertem chemisch definierten Medium mit den C-Quellen Laktose oder Glukose

Die Untersuchung der spezifischen Aktivitäten von PepI und PepX sowie der zugehörigen Northern-Hybridisierungen ihrer mRNAs wurden analog der in Kapitel 4.7.1 dargestellten Analysen für die Peptidase Q und die Expression des *pepQ* Genes durchgeführt.

Die PepI-Aktivität der *Lb. delbrückii* subsp. *lactis*-Kultur mit Laktose als C-Quelle war zu allen Entnahmezeitpunkten größer als die der mit Glukose gewachsenen Kultur (**Abb. 4.7.2-1 A**). Sie stieg von 2902 Units in der früh-exponentiellen Phase des Wachstum über 3226 in der spät-exponentiellen bis auf 3706 enzymatischen Einheiten beim früh-stationären Entnahmezeitpunkt an. Demgegenüber konnten für die in Glukose-haltigem modifiziertem CDM kultivierten DSM7290-Zellen nur Werte von 1280, respektive 2967 und 3335 Units bestimmt werden, was bedeutet, daß die spezifischen PepI-Aktivitäten in CDM<sub>Lak.</sub> gegenüber CDM<sub>Gluk.</sub> für die Probenahmezeitpunkte **1**, **2** und **3** um die Faktoren 2,27, 1,22 und 1,11 höher waren. Hierbei steigt die PepI-Aktivität in den Zellen aus CDM<sub>Lak.</sub> von früh-exponentieller nach früh-stationärer Wachstumsphase nur um einen Faktor von 1,28 an, während die PepI-spezifische



**Abb. 4.7.2-1 A-D: Einfluß der Zuckerquelle auf die Aktivitäten der Peptidasen PepI und PepX sowie der Genexpression von *pepI* und *pepX* in modifiziertem chemisch definiertem Medium.**

(A) / (C) Zu drei durch die Zahlen 1 – 3 symbolisierten Zeitpunkten (vgl. Abb. 4.7.1-1 A) wurden Zellaliquots der Kulturen geerntet und zellfreie Extrakte präpariert. Die spezifischen PepI- (A) oder PepX-Aktivitäten (C) aus den mit Glukose (graue Balken) oder mit Laktose (schwarze Balken) gewachsenen Zellen wurden in Verdünnungen der zellfreien Extrakte (Proteingehalt: 60-150 µg/ml) bestimmt. Die dargestellten Aktivitäten und die zugehörigen Abweichungen (als Balken und als Zahlenwerte eingetragen) resultieren aus jeweils drei Einzelmessungen. Die Einheiten (Units, U) der spezifischen PepI u. PepX-Aktivitäten wurden definiert als nmol freigesetztes *p*-Nitroanilin pro (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> und min<sup>-1</sup>.

(B) / (D) Northern-Analysen mit je 10 µg RNA pro Spur, die aus den jeweiligen Zellaliquots der mit den zwei verschiedenen Zuckern gewachsenen Kulturen präpariert wurde, durch Hybridisierungen mit einer *pepI*-spezifischen (B) und einer *pepX*-spezifischen (D) Sonde (Sonden: siehe Tab. 4.7-3).

Aktivität der Kultur in CDM<sub>Gluk.</sub> um einen Faktor von 2,6 zunimmt. Diese Werte lassen einerseits die Abhängigkeit der spezifischen PepI-Aktivitäten von der Art der Kohlenstoffquelle, viel stärker aber noch von der jeweiligen Wachstumsphase, erkennen. Betrachtet man die Intensitäten der circa 1 kb großen mRNA-Banden, die mit der *pepI*-spezifischen Sonde in der eingesetzten Gesamt-RNA detektiert wurden (Abb 4.7.2-1 B), so spiegeln sich im Wesentlichen die bei den enzymatischen Messungen ermittelten Unterschiede wieder.

Bei den gemessenen PepX-spezifischen Aktivitäten waren die ermittelten Werte von in CDM<sub>Lak.</sub> gewachsenen Zellen bei allen Entnahmepunkten höher als die der in CDM<sub>Gluk.</sub> gewachsenen Zellen des Stammes DSM7290 (Abb. 4.7.2-1 C). Die PepX-Aktivität der Kultur in CDM<sub>Lak.</sub> war in der früh-exponentiellen Phase mit 4147 Einheiten am höchsten, sank dann zur spät-exponentiellen Phase hin um einen Faktor von 1,35 auf 3066 Units ab, um schließlich von hier zur früh-stationären Wachstumsphase wieder um einen Faktor von 1,11 auf 3416 Einheiten anzusteigen. Bei den in CDM<sub>Gluk.</sub> gezogenen Zellen war ebenfalls von Entnahmezeitpunkt 1 nach 2 ein geringes Absinken der spezifischen PepX-Aktivität erkennbar (2619 nach 2332 Units) erkennbar, welches sich dann bis zur früh-stationären Wachstumsphase (Zeitpunkt 3) aber nicht mehr weiter fortsetzte (2331 U), sondern auf demselben Niveau stagnierte. Vergleicht man die zu den drei Zeitpunkten gemessenen spezifischen PepX-Aktivitäten aus CDM<sub>Lak.</sub> und CDM<sub>Gluk.</sub>, so bewegt sich der Unterschied zwischen Faktor 1,58 (Entnahmezeitpunkt 1) und Faktor 1,31 (Entnahmezeitpunkt 2).

Vergleicht man die Intensitäten für die *pepX*-spezifischen Transkripte der einzelnen Proben untereinander und mit den jeweiligen spezifischen Aktivitäten (Abb. 4.7.2-1 D), so läßt sich im Rahmen der Genauigkeit der enzymatischen Bestimmungen sowie der Northern-Hybridisierungsexperimente eine gute Korrelation feststellen. Auch bei der Expression des *pepX*-Genes und der spezifischen Aktivität seines Genproduktes (PepX) kann man also von einer zucker- und wachstumsphasenspezifischen Regulation oder Modulation sprechen.

#### 4.8 Klonierung und Sequenzierung der an der Laktoseverwertung beteiligten Gene und ihrer flankierenden Bereiche aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290

Die Bedeutung des CcpA-homologen transkriptionellen Regulators PepR1 bei der Regulation des Zuckerstoffwechsels von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 sollte exemplarisch am Beispiel der Laktoseverwertung dargestellt werden. Hierzu mußten die beteiligten Gene zuerst identifiziert und durch Klonierung, Sequenzierung für eine molekulare Untersuchung ihrer Regulation sowie eine Analyse ihrer Expression zugänglich gemacht werden. Sequenzdaten und Analysen zu den am Transport und an der Spaltung der Laktose beteiligten Genen (*lacS*, *lacZ*) für die Laktose-Permease (LacS) und die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) waren aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991) bereits bekannt. Sie konnten als Grundlage für Sequenzdatenvergleiche und weitere Untersuchungen herangezogen werden. Die parallel zu der hier vorgelegten Arbeit durchgeführten Studien zur Regulation der Laktoseverwertungsgene von *Staphylococcus xylosus* (Bassias u. Brückner, 1998; Egeter und Brückner, 1996) und zur Kontrolle des Zuckerstoffwechsels in *Streptococcus thermophilus* (van den Bogaard *et al.*, 2000) bildeten den aktuellen Rahmen für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.

##### 4.8.1 Sequenzierung des Inserts von pUH89*lac*

Den Startpunkt für die Klonierung der Laktoseverwertungsgene bildete ein *E. coli* Klon mit einem rekombinanten Plasmid, welches ein kloniertes *SalI*-Fragment chromosomaler DNA von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 als Insert beherbergte. Das Plasmid stammte aus der Diplomarbeit von A. Orschiedt (1997). Dort wurde versucht, eine Genbank von *SalI*-Fragmenten der Größe vier bis sieben kb, die in die *SalI*-Schnittstelle im mutierten Lysegens E des Phagen  $\theta$ X174 lokalisiert im Vektor pUH89 (Henrich und Schmidtberger, 1995) inseriert waren, auf autolytische Funktionen von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 zu screenen. Die Detektion positiver Klone beruhte auf der Aktivität der Genprodukte der plasmidkodiert im heterologen Wirtsorganismus *E. coli* vorliegenden möglichen Autolysegene. Die Expression dieser Gene sollte bei Induktion des  $P_{lac}/P_{lac}$ -Promotors auf IPTG-/X-Gal-Agarplatten zur Pemeabilisierung der Zellmembran führen, was an einer verringerten Koloniegröße und an der Bildung von blauen Höfen um die Zellen zu erkennen wäre. Verschiedene Kolonien zeigten hierbei den gewünschten Phänotyp der „Leakiness“ oder Durchlässigkeit. Die Plasmide aus diesen rekombinanten Klonen wurden isoliert, zur Größenbestimmung der enthaltenen chromosomalen *SalI*-Fragmente einer Restriktionsanalyse unterzogen und anschließend mit den die *SalI*-Schnittstelle flankierenden Primern **E-gen-revers** und **E-gen-forward** (Primersequenzen, siehe Anhang; **Tabelle 7.1-2**) sequenziert. Die Analyse der bei einem der isolierten Plasmide ermittelten Nukleotidsequenz zeigte, daß anstatt der beabsichtigten Identifizierung eines Autolysegens, die Klonierung eines Bereiches der *lac*-Region von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gelungen war. Auf diese Weise wurde der nachfolgend pUH89*lac* genannte Klon identifiziert (siehe **Abb. 4.8.1-2**). Die Abbildung **4.8.1-1** zeigt das phänotypische Erscheinungsbild von *E. coli* JM109(pUH89*lac*) auf LB-X-Gal-Agarplatten. Aus dem Vergleich der im Bild nebeneinander dargestellten nicht bzw. mit IPTG in einer Endkonzentration

von 5 mM induzierten Kolonien von *E. coli* JM109(pUH89lac) läßt sich der oben beschriebene „leaky“-Phänotyp erkennen. Die auf der mit dem Induktor versetzten LB-*X-Gal*-Agarplatte gewachsenen Kolonien (Abb. 4.8.1-1, rechte Bildseite) sind verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4.8.1-1, linke Bildseite) bei nahezu gleichem Durchmesser der Farbstoffhöfe wesentlich kleiner, was auf eine Schädigung der Zellen durch eines (oder mehrere) der vermutlich unter Kontrolle des  $P_{tac}/P_{lac}$ -Promotorkonstruktes exprimierten Genprodukte hindeutet.

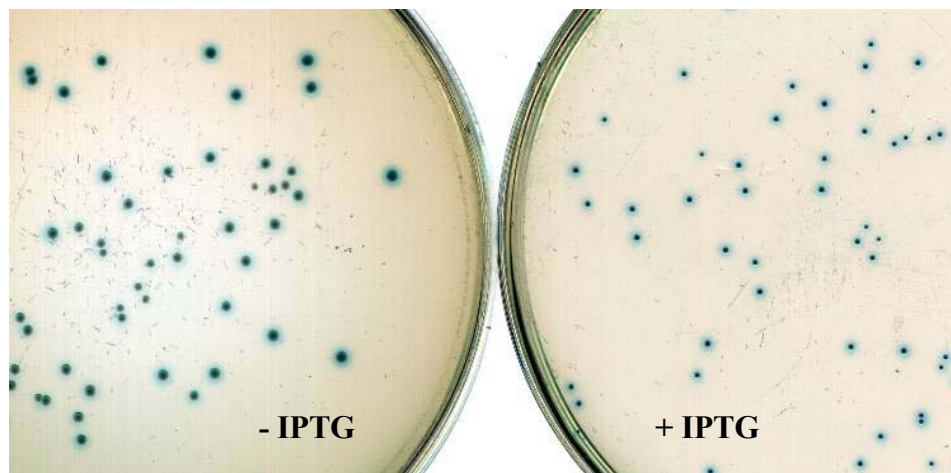
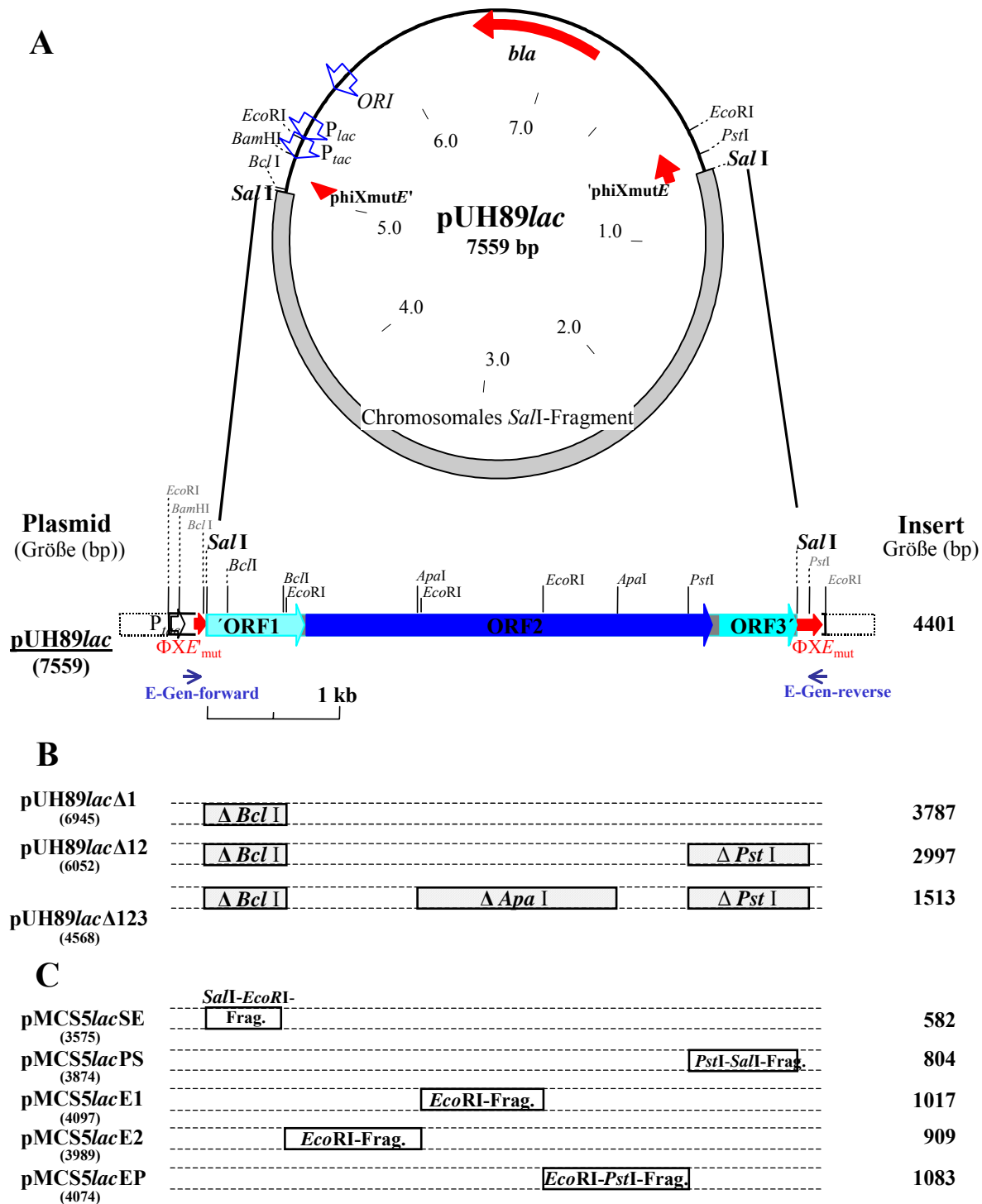


Abb. 4.8.1-1 Phänotyp von Kolonien aus *E. coli* JM109-Zellen mit dem Plasmid pUH89lac auf LB-*X-Gal*-Agarplatten (Links ohne, rechts mit dem Induktor IPTG [5 mM]).

Das Plasmid pUH89lac wurde von A. Orschiedt freundlicherweise für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Untersuchungen überlassen. Die initial erhaltene Sequenz mit dem Primer **E-gen-forward** wies, wie BlastN-Analysen zeigten, einen am seinem 5'-Ende unvollständigen offenen Leserahmen (ORF, Open Reading Frame) von 738 bp (ORF1, siehe Abb. 4.8.1.1-1) mit ca. 95 % Identität auf Nukleinsäure-Ebene zu dem in dem EMBL-Datenbank-Eintrag (Acc.-Nummer M55068) geführten Gen *lacS* aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991) auf. Hierbei handelt es sich um ein 1881 bp großes Gen, welches für die Lactose-Permease (LacS) aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 kodiert. Die mit dem Primer **E-gen-reverse** ermittelte Sequenz des 3'-Endes des *Sall*-Inserts wies zum Zeitpunkt der Sequenzierung keine Übereinstimmungen zu bekannten Genen auf. Das komplette *Sall*-Fragment des Plasmides pUH89lac wurde dann basierend auf den bereits bekannten Sequenzdaten und durch Restriktionsanalysen kartiert. Durch gezielte Deletionen von flankierenden Vektoranteilen zusammen mit Fragmenten bereits sequenzierter Abschnitte der 5'- bzw. 3'-Bereiche sowie eines zentralen *ApaI*-Fragmentes des Inserts wurden schrittweise drei pUH89lac-Deletionsderivate erzeugt (siehe Abb. 4.8.1-2 B), die aufgrund der bei ihnen deletierten Abschnitte eine weitere Sequenzierung ausgehend von den Primern **E-gen-reverse** und **E-gen-forward** zur Mitte des chromosomalen Inserts hin ermöglichten. In Ergänzung zu dieser auf der Herstellung von Deletionsklonen basierenden Sequenzierungsstrategie wurden fünf weitere Fragmente, deren Lokalisation auf pUH89lac in Abb. 4.8.1-2 C schematisch gezeigt ist, gerichtet in komplementäre Schnittstellen des auf dem ColE1-Replikon basierenden Vektor pMCS5 subkloniert und mit Hilfe der Primer **pUC/M13-forward** und **pUC/M13-reverse** doppelsträngig sequenziert.



**Abb. 4.8.1-2 Sequenzierung der im Plasmid pUH89lac klonierten lac-Region von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290.** **A** Plasmid pUH89lac mit dem Fragment chromosomaler DNA aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (*SalI*-Fragment). Neben den Funktionen der das Insert flankierenden Vektorbereiche sind die für die Deletionen und Subklonierungen relevanten Restriktionsenzymststellen und die Lokalisation der Primer **E-Gen-forward** und **E-Gen-reverse** markiert. **B** zeigt die ausgehend von pUH89lac schrittweise erzeugten Deletionsderivate, **C** die Lokalisation der aus pUH89lac in pMCS5 subklonierten Fragmente. Die Längen der Inserts der jeweiligen Plasmide sind im rechten Teil der Abbildung angegeben, die Plasmidbezeichnungen und -größen stehen links. *bla*,  $\beta$ -Laktamasegen;  $\Delta$ , Deletion; *ORI*, Replikationsursprung des Plasmides; *phiXmutE'* bzw. 'phiXmutE, 5'- bzw. 3'-Anteil des mutierten Lysegenes *E*, des Phagen  $\theta$ X174; *P<sub>lac</sub>*-/*P<sub>tac</sub>*, fusionierter Promotor aus *E. coli* *P<sub>lac</sub>* und *P<sub>tac</sub>*



4.8.1.1 Analyse der Nukleotidsequenz des Inserts von pUH89*lac*

Durch die vollständige Sequenzierung der Inserts der von pUH89*lac* abgeleiteten Deletions- und Subklone konnte eine 4401 bp lange Nukleotidsequenz doppelsträngig bestimmt werden. Der G+C-Gehalt des gesamten sequenzierten DNA-Bereichs liegt bei 52,3 % und korreliert mit dem von Weiss *et al.* (1983) für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* ermittelten Durchschnittswert von 50%.

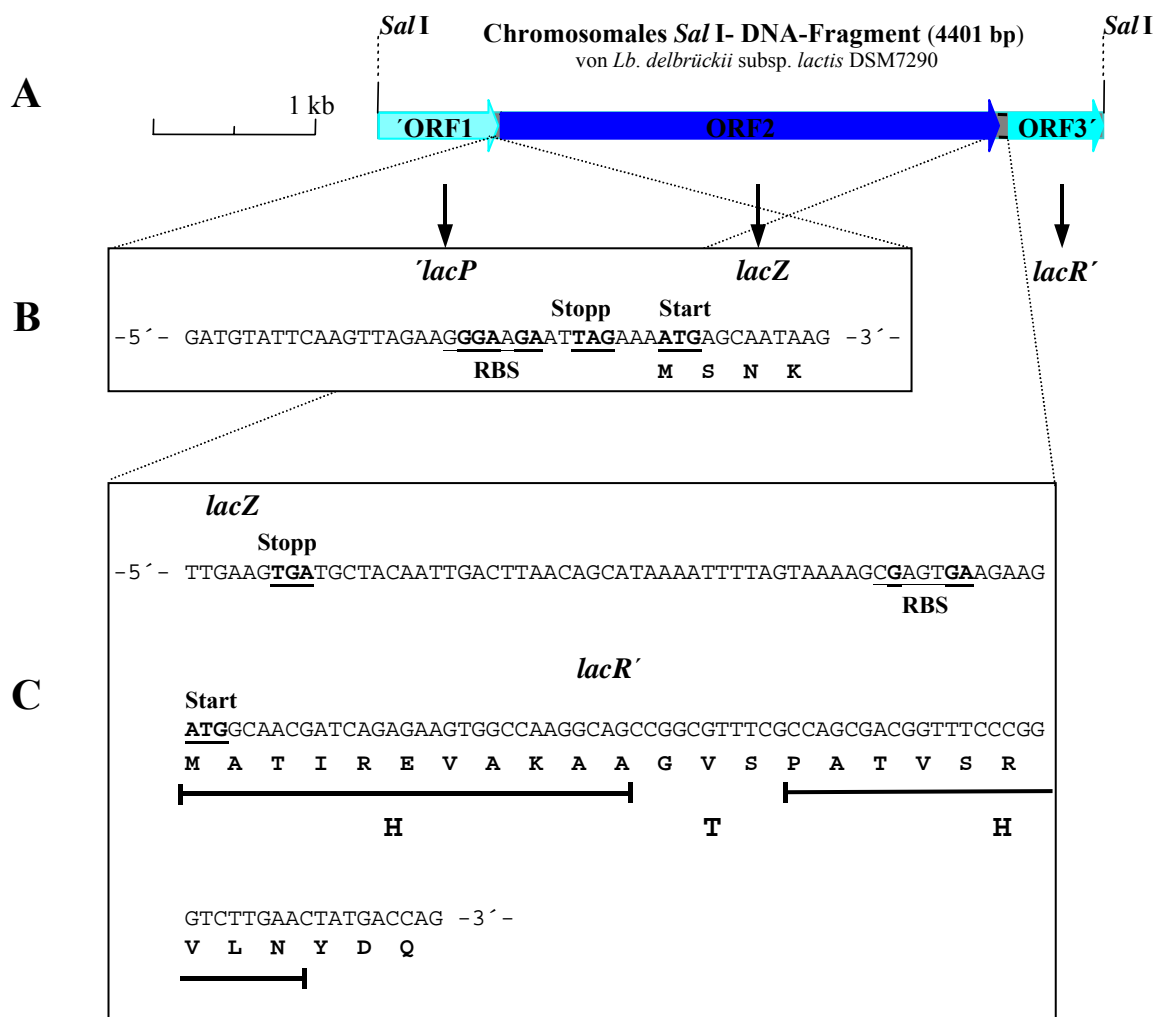
Die ermittelte Sequenz von 4401 Basenpaaren wurde in allen der sechs möglichen Leserahmen auf das Vorhandensein offener Leseraster (ORF) untersucht. Die Analyse wurde mit dem Programm "Genemark" (Lukashin und Borodovsky, 1998; Borodovsky und McIninch, 1993) durchgeführt. Dabei wurde die von Klein *et al.* (1994) für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 erstellte Kodonpräferenztafel (erweitert durch Daten aus 10 Genen dieses Stammes; Klein *et al.*, 1995) verwendet. Die Häufigkeit, mit der von diesem Stamm bevorzugte Kodons innerhalb eines offenen Leserasters verwendet werden, gibt dabei einen Hinweis darauf, ob ein vorhandenes offenes Leseraster *in vivo* tatsächlich für ein Protein kodiert. Insgesamt konnte ein vollständiges (ORF2) und zwei unvollständige offene Leseraster ('ORF1, ORF3') bestimmt werden (**Abb. 4.8.1-1 A** und **Abb. 4.8.1.2-1 A**). Aufgrund ihres Kodongebrauchs wurden alle drei ORF's als wahrscheinlich kodierend identifiziert. 'ORF1 hat eine Länge von 738 bp, ORF2 umfaßt 3024 bp, ORF3' ist 579 Basenpaare groß. Die Leseraster 'ORF1 und ORF2 sind direkt benachbart und weisen die gleiche Orientierung auf. Das Stoppkodon von 'ORF1 und das Startkodon von ORF2 sind nur durch drei Nukleotide voneinander getrennt. In einer Entfernung von neun bp (typisch: 5-9 nt) vor dem ATG-Startkodon von ORF2 läßt sich mit 5'-gGGAaGA-3' eine Ribosomenbindestelle (RBS) (Shine und Dalgarno, 1974) lokalisieren (siehe **Abb. 4.8.1-1 A** und **Abb. 4.8.1.2-1 B**), die innerhalb des 3'-Endes von 'ORF1 zwei Basenpaare upstream des „amber“-Stoppkodons (TAG) von 'ORF1 liegt. Sie weicht in den beiden mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Positionen von der von Matern *et al.* (1994) ermittelten Konsensussequenz 5'-AGGAGGA-3' ab. Bei einer Analyse des stromaufwärts von ORF2 gelegenen Bereiches ('ORF1) auf Promotorstrukturen für ORF2, die unter Berücksichtigung der Promotor-Konsensussequenz für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* (Matern *et al.*, 1994) und möglicher Abweichungen von dieser durchgeführt wurde, konnten keine potentielle -35- und -10-Region (Pribnow-Box) identifiziert werden. Angesichts der vorliegenden Daten, konnte die Hypothese abgeleitet werden, daß 'ORF1 und ORF2 als Einheit transkribiert und translatiert werden könnten.

51 Basenpaare stromabwärts von ORF2 beginnt der an seinem 3'-Ende unvollständige ORF3', der in gleicher Orientierung wie 'ORF1 und ORF2 angeordnet ist (siehe **Abb. 4.8.1-1 A** und **Abb. 4.8.1.2-1 C**). Seinem ATG-Startkodon geht im Abstand von 5 bp eine schwach konservierte potentielle Ribosomenbindestelle (5'-cGagtGA-3') voraus, die in vier (Kleinbuchstaben) von sieben Nukleotiden von der für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ermittelten Konsensussequenz (Matern *et al.*, 1994) abweicht. Bei der Analyse der intergenen Region zwischen ORF2 und ORF3' konnte mit dem Programm "Terminator" (HUSAR GeniusNet) nach der Methode von Brendel und Trifanov (1984) stromabwärts vom ORF2-Stoppkodon keine für *rho*-unabhängige Terminatoren typische Sekundärstruktur gefunden werden. Des Weiteren konnten in der 5' nicht-kodierenden Region von ORF3' auch keine potentiellen Promotorstrukturen identifiziert werden. Das Fehlen einer Terminatorschleife in Verbindung mit dem fehlenden Promotor und der engen Nachbarschaft von ORF2 zu ORF3' könnte wie schon bei 'ORF1 und ORF2 auf eine Kotranskription der Gene hinweisen. Dies bedeutet, daß alle drei erkannten offenen Leserahmen ausgehend von einem Promotorbereich transkribiert werden könnten.

#### 4.8.1.2 Analyse der offenen Leserahmen 'ORF1, ORF2 und ORF3' sowie ihrer abgeleiteten Genprodukte

Wie erste, unter 4.8.1 beschriebene, BlastN-Analysen gezeigt hatten, handelte es sich bei dem an seinem 5'-Ende unvollständigen offenen Leserahmen 'ORF1 (738 bp, siehe **Abb. 4.8.1-1 A** und **Abb. 4.8.1.2-1 A** u. **B**) um einen kodierenden Bereich mit ca. 95 % Nukleinsäuresequenzidentität zum 3'-Ende des in der EMBL-Datenbank (Acc.-Nr. M55068) geführten Gens *lacS* (1881bp) aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991), welches für die Laktose-Permease (LacS) aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 kodiert. Die Gene *lacS* und *lacZ* (3024 bp) dieses Stammes weisen die gleiche chromosomale Organisation wie 'ORF1 und ORF2 von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 auf und werden ausgehend von einem Promotor, der stromaufwärts von *lacS* liegt, gemeinsam transkribiert.

Bedingt durch die vorab aufgewiesene Analogie in der Organisation dieser beiden Gene in den beiden eng verwandten *Lactobacillus*-Stämmen wurde 'ORF1 nun, noch bevor seine fehlende 5'-DNA-Sequenz zusammen mit dem vor dem offenen Leserahmen vermuteten Promotor ermittelt war, als '*lacP*' bezeichnet.



**Abb. 4.8.1.2-1** Organisation der in pUH89*lac* klonierten *lac*-Region von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. **A** Übersicht des chromosomalen *Sal*I-Fragmentes aus pUH89*lac* mit den ermittelten offenen

Leserahmen 'ORF1, ORF2 und ORF3' sowie den aus Nukleotidsequenzanalysen abgeleiteten Genbezeichnungen. **B** zeigt die 'lacP-lacZ, **C** die lacZ-lacR' intergene Region. Die N-terminalen Aminosäureabfolgen der abgeleiteten Genprodukte LacZ und LacR sind unterhalb der DNA-Sequenz angegeben. RBS, Ribosomenbindungsstelle; Stopp, Stoppkodon; Start, Startkodon; H T H, Helix-Turn-Helix-Motiv DNA-bindender Proteine;

Der Leserahmen ORF2 (3024 bp) besitzt einen G+C-Gehalt von 52,1 % und kodiert für ein Protein aus 1008 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 114.125 Da und einem isoelektrischen Punkt (IEP) von 4,83. Eine Datenbankanalyse zeigte, daß die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF2 signifikante Ähnlichkeiten zu zahlreichen  $\beta$ -Galaktosidasen aus Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien aufwies. Diese Ähnlichkeit ließ vermuten, daß ORF2, der im folgenden lacZ genannt wurde, eine  $\beta$ -Galaktosidase von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 kodiert. Die  $\beta$ -Galaktosidasen von Eubakterien, die auch Laktasen genannt werden, gehören zur Familie 2 der Glykosyl-Hydrolasen (Henrissat, 1991), die terminale D-Galaktosereste aus  $\beta$ -D-Galaktosiden abspalten. Verschiedene konservierte Regionen, die sich bei  $\beta$ -Galaktosidasen über die gesamte Proteinsequenz erstrecken (Jacobson *et al.*, 1994), konnten auch bei der  $\beta$ -Galaktosidase von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gefunden werden. Die höchste Ähnlichkeit weist LacZ mit 95 % identischen und 97 % ähnlichen Aminosäuren zur  $\beta$ -Galaktosidase von zwei *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* Stämmen auf (Schmidt *et al.*, 1989; Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991), was sich auch mit Identitäten von 95 bzw. 94 % auf der Ebene der Nukleinsäuresequenzen niederschlägt. Diese Werte wurden gefolgt von den mit verschiedenen *Streptococcus* Subspezies ermittelten Homologien, zu denen durchschnittlich 46 % identische (44 – 48 %) und 62 % ähnliche (59-65 %) Aminosäuren vorlagen (Bolotin *et al.*, 2004).

Der Leserahmen ORF3' (579 bp) hat einen G+C-Gehalt von 52,5 % und kodiert für ein C-terminal unvollständiges Protein von 193 Aminosäuren. Beim wiederholten Vergleich seiner DNA-Sequenz sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit verschiedenen Datenbanken unter Benutzung der Algorithmen BlastN und BlastX wurden keine signifikanten Homologien mit vorhandenen Genbank-Einträgen gefunden. Durch die Analyse seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Protein-Domänen-Datenbank Prodom konnte am N-Terminus des Proteins ein für Regulatoren der LacI-GalR-Familie transkriptioneller Regulatoren charakteristisches Helix-Turn-Helix Motiv (siehe **Abb. 4.8.1.2-1 C**) aufgezeigt werden (Brennan und Matthews, 1989; Weickert und Adhya, 1992). Die Identifikation von ORF3' als potentieller transkriptioneller Regulator erfolgte schließlich aufgrund neuerer Arbeiten zur Plastizität der lac-Region in verschiedenen *Lactobacillus delbrückii* Subspezies (Lapierre *et al.*, 2002). Die verfügbare Sequenz von ORF3' weist eine Identität von 99 % bezogen auf die DNA-Ebene sowie von 98 % auf Aminosäureebene zu dem als LacR, (332 AS; lacR, 996 bp) bezeichneten transkriptionellen Regulator aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* LL44 (Genbank.-Nr. AY040212) auf, der als negativer Regulator des lac-Operons (lacSZ) dieses Stammes charakterisiert wurde. Der vorhandene ORF3'-Sequenzabschnitt von 579 bp aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 weist zu lacR aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* LL44 in nur drei Nukleotiden einen Unterschied auf. Bedingt durch die Übereinstimmung mit lacR wurde ORF3' als lacR' bezeichnet. Weitergehende Untersuchungen zu lacR' aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290, wie z.B. die Vervollständigung seiner fehlenden 3'-DNA-Sequenz oder eine nähere funktionelle Charakterisierung erfolgten im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht. Aufgrund der Tatsache, daß die in den Kapiteln 4.9 und 4.10 beschriebenen Untersuchungen vor der abschließenden Identifikation von ORF3' als lacR' durchgeführt wurden, konnte bei diesen Experimenten auch nur von einem Operon, welches aus den Genen lacP und lacZ besteht (lacPZ), ausgegangen werden.

#### 4.8.2 Komplettierung des *lacP*-Gens und der stromaufwärts gelegenen Promotorregion

Um die transkriptionelle Regulation der in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 vermeintlich als Operon organisierten Gene *lacP* und *lacZ* untersuchen zu können, mußte das nur partiell auf dem 4401 bp großen *Sall*-Fragment chromosomaler DNA aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* im Plasmid pUH89*lac* enthaltene '*lacP*-Gen vervollständigt und die DNA-Sequenz seiner Upstream-Region ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden zwei Wege verfolgt: Erstens wurde durch das Screening einer *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290-Genbank, die freundlicherweise von Dr. Jürgen Klein zur Verfügung gestellt wurde, versucht, Plasmide mit dem gesamten *lacPZ*-Operon, also auch mit dem kompletten *lacP*-Gen und dem stromaufwärts von *lacP* vermuteten Promotor, zu finden. Bei dieser Genbank handelt es sich um partiell *Sau3AI* restringierte größenfraktionierte chromosomale Fragmente von vier bis zehn kb Größe, die in die *Bam*HI-Schnittstelle des *low-copy-number*-Vektors pLG339 inseriert wurden (Klein *et al.*, 1994a).

Zweitens wurde versucht, mit Hilfe der Inversen PCR-Technik, ausgehend vom bekannten Sequenzbereich von '*lacP*, dessen 5'-Genbereich zusammen mit der stromaufwärts gelegenen Promotorregion zu klonieren.

##### 4.8.2.1 Screening einer Genbank von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7270 auf für die Laktoseverwertung positive Klone

Zum Screening der oben erwähnten Genbank-Plasmide auf das komplette Laktoseverwertungsoperon (*lacPZ*) von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in der *E. coli*  $\Delta$ *lac*-Mutante CM17 (Miller u. Schwartz, 1978) wurde ein Aliquot des Plasmidgemisches in elektrokompente Zellen dieses Stammes transformiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde dann auf MacConkey-Agarplatten ausplattiert, welche mit 0,5 % Laktose und zur Selektion auf den Resistenzmarker des Vektors pLG339 mit Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg pro ml versetzt waren.

Bei der Nährlösung nach MacConkey (McConkey, 1905) handelt es sich um ein Indikatormedium zur Bestimmung der Kohlenhydratverwertung bei Gram-negativen Bakterien. Der Nachweis erfolgte über die pH-Wert-Absenkung, die durch Fermentation des dem Medium zugesetzten Kohlenhydrates, wie in diesem Falle der Laktose, verursacht wurde. Die mit der Fermentation des zugesetzten Zuckers einhergehende Ansäuerung wird durch einen Farbumschlag des Indikators Neutralrot (Umschlagsbereich: pH 6,8-8,0) von hellrosa nach purpurrot angezeigt. Die entsprechenden Kolonien und bei längerer Inkubationszeit auch der umgebende Agar werden dadurch hellrot bzw. rosa gefärbt. In der Verwertung negative Kolonien müssen zum Wachstum andere, im Medium enthaltene C-Quellen verwerten. Dies führt zu einer Alkalisierung des Agars in diesem Bereich und einem Farbumschlag des Indikators nach gelb. Der pH-Anstieg bei Verwertung der anderen C-Quellen im Medium hat den Vorteil, daß die Differenzierung zwischen positiven und negativen Kolonien eindeutig ist.

Mit Hilfe dieses Indikatormediums konnten unter den ungefähr 23.000 gescreenten Transformanten nach 16 bis 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C fünf Klone identifiziert werden, die zu einer positiven Indikatorreaktion, d.h. zu hellroten Kolonien, führten. Zur Verifizierung wurden die positiven Klone nochmals auf frische MacConkey- sowie auf LB-*X-Gal*-Agarplatten mit den notwendigen Supplementen (Laktose, Kanamycin) überpickt. Nach Übernachtinkubation zeigte sich erneut die bereits bekannte

Indikatorreaktion bei den Kolonien auf MacConkey-Agar. Der auf der Spaltung des Farbstoffes *X-Gal* beruhende Nachweis auf mit 0,5 % Laktose versetzten LB-Agarplatten war ebenfalls positiv. Nach der Inkubation bei 37°C zeigten sich blaue bis tiefblaue Kolonien. Die entsprechenden Kontrollen mit dem Vektor pLG339 im Stamm *E. coli* CM17 zeigten diese Farbnachweisreaktionen nicht. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, daß zumindest das stromabwärts vom *lacP*- erwartete *lacZ*- Gen aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290, dessen funktionelles Genprodukt, die  $\beta$ -Galaktosidase LacZ, direkt für die Spaltung des Farbstoffes *X-Gal* verantwortlich ist, auf dem klonierten Insert aller Klone vorlag.

Die Plasmide aus den fünf Klonen (pLGlacOP5 - pLGlacOP9) wurden durch Plasmid-Minipräparationen isoliert, durch Restriktionsanalysen grob charakterisiert und die Inserts chromosomaler DNA von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 schließlich ausgehend von den zur *Bam*HI Restriktionsschnittstelle des Vektors flankierend angeordneten Primern **pLG-forward** und **pLG-reverse** ansequenziert (Primersequenzen siehe Anhang, **Tab. 7.1-2**). Die Auswertung der Sequenzdaten und der Restriktionskartierungen zeigte, daß alle fünf analysierten Plasmide das gleiche chromosomale Insert trugen (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Nukleotidsequenz dieses Genom-Abschnittes mit dem in pUH89*lac* klonierten *Sal*I-Fragment (4401 bp) aus dem Chromosom von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 zeigte, daß der in den fünf pLG339-Derivaten klonierte chromosomale Bereich maximal 4188 bp groß war und komplett innerhalb des bereits sequenzierten *Sal*I-Fragmentes von pUH89*lac* lag. Eine Ausweitung der bisher bestimmten Nukleinsäuresequenz in Richtung des 5'-Endes von *lacP* konnte deshalb mit dieser Strategie nicht erzielt werden. Zusätzlich warf dieses Ergebnis auch die Frage auf, ob das *lacP*-Gen möglicherweise nicht komplett in *E. coli* klonierbar ist, weil seine Expression zu einem für diesen heterologen Organismus letalen Genprodukt führt.

#### 4.8.2.2 Amplifikation des fehlenden 5'-*lacP*-Genabschnittes durch Inverse PCR

Bedingt durch die Annahme, daß das Genprodukt des *lacP*-Gens in *E. coli* letal wirken könnte, schien die am Anfang des Kapitels bereits erwähnte zweite mögliche Strategie, nämlich die Klonierung des fehlenden Sequenzabschnittes durch *in vitro*-Amplifikation mittels Inverser PCR vielversprechender zu sein, da so nicht das vollständige Gen kloniert, sondern nur der fehlende 5'-Bereich seiner Sequenz ergänzt werden würde.

Die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes durch eine Standard-PCR-Reaktion setzt voraus, daß der betreffende Bereich von zwei konvergierenden Primern eingerahmt wird. Regionen, die außerhalb eines bekannten Sequenzabschnittes liegen bzw. an diesen angrenzen, sind mit dieser Standardtechnik nicht amplifizierbar, da sie nur von einer Seite her zugänglich sind. Dieses Problem umgeht man bei der Inversen PCR, indem lineare Restriktionsfragmente, die sowohl die bekannten Abschnitte oder einen Teil der bekannten Sequenz als auch die angrenzende Region beinhalten, zum Ring geschlossen werden. Im zirkularisierten Fragment wird die unbekannte Region zu beiden Seiten von bekannter Sequenz flankiert, so daß mit Hilfe von zwei Primern, die im bekannten Bereich nach außen orientiert sind, die Amplifikation der im zirkulären Zustand nun zwischen den Primern liegenden unbekanntem Region durchgeführt werden kann.

Für die inversen PCR-Reaktionen wurde die *Taq*-Polymerase benutzt, da sie bedingt durch die fehlende 3'-5'-Exonukleaseaktivität 3'-dA-Nukleotid-Überhänge generiert, die zur Klonierung der PCR-Amplifikate in mit einem 3'-dT-Überhang ausgestattete kommerziell verfügbare TA-Cloning-

Vektoren nützlich sind (Newton und Graham, 1994).

Ausgehend von den bisher bekannten *lacP*- sowie *lacZ*- und *lacR*'-Sequenzdaten mußten nun neben entsprechenden Primern auch geeignete Restriktionsschnittstellen für die Herstellung von Restriktionsfragmenten für die Inverse PCR ermittelt werden. Der Auswahl dieser Erkennungssequenzen lagen verschiedene Kriterien zugrunde:

- Der gesuchte Bereich des 5'-Endes von *lacP* sollte vollständig auf dem erzeugten Fragment enthalten sein.
- Das erzeugte Amplifikat sollte eine Größe von maximal drei bis vier kb nicht überschreiten, da bei einer Vervielfältigung größerer Fragmente unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase die Qualität der PCR-Produkte bedingt durch Strangabbrüche deutlich abnimmt.
- Die betreffende Schnittstelle sollte möglichst nahe am 5'-Ende der bereits bekannten Sequenz von *lacP* lokalisiert sein, so daß die statistische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer zweiten Schnittstelle in der Sequenz des unbekanntes Bereiches so gering wie möglich gehalten werden konnte.
- Ein in Frage kommendes kommerziell verfügbares Restriktionsenzym sollte eine Hexanukleotid-Erkennungssequenz besitzen, damit die Schnittstelle weder zu häufig, noch zu selten auftritt. Bei einem postulierten GC-Gehalt der Zielsequenz von ca. 50% beträgt die statistische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines beliebigen Hexanukleotides 1/4096, was einer mittleren Fragmentlänge von etwa vier kb entspricht.

Wegen der wesentlich geringeren Effizienz bei der Ligation glatter Enden sollten darüber hinaus keine *blunt-end* erzeugenden Restriktionsenzyme verwendet werden.

Von den kommerziell erhältlichen Restriktionsendonukleasen entsprachen die Enzyme *ApaI*, *AccIII*, *BclI* und *XmaI* diesen Kriterien am besten. Die Erkennungssequenz jedes dieser Restriktionsenzyme wurde entweder ein- (*AccIII*,) oder zweimal (*ApaI*, *BclI*, *XmaI*) im bereits sequenzierten Bereich von *lacP* bzw. in den stromabwärts von *lacP* gelegen Genen *lacZ* und *lacR*' (*SalI*-Fragment chromosomaler DNA aus pUH89*lac*, siehe **Abb. 4.8.1-2**) gefunden.

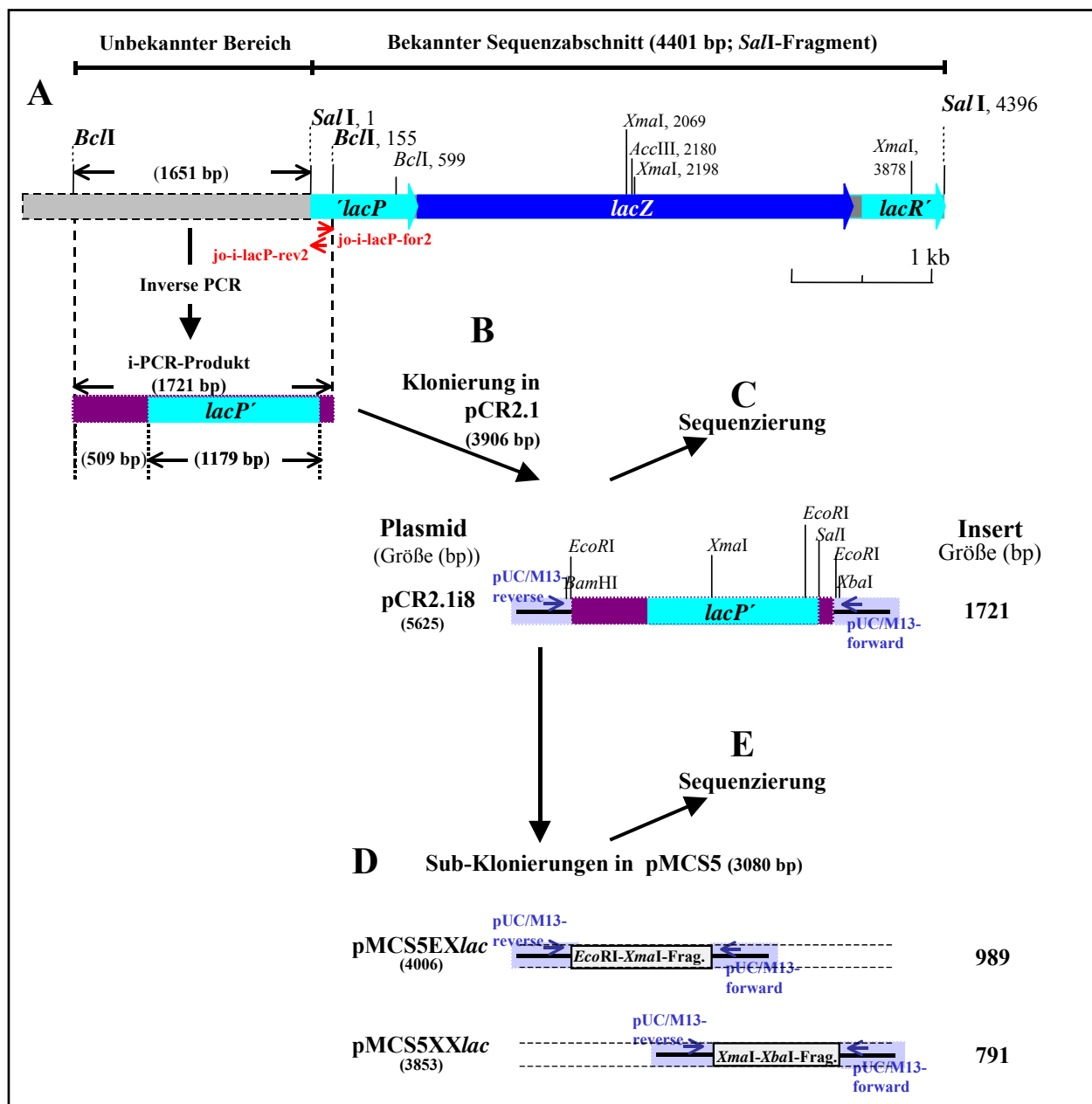
Die durch enzymatischen Verdau mit jeweils einem der vier oben genannten Restriktionsenzymen geschnittene und anschließend zirkularisierte chromosomale DNA von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wurden als Matrizen-DNA für die Inverse PCR eingesetzt. Als Primer wurden die am 5'-Ende der bekannten *lacP*-Sequenz zueinander invers ausgerichteten Oligonukleotide **jo-i-lacP-rev2** und **jo-i-lacP-for2** (siehe **Abb. 4.8.2.2-1 A**; Primersequenzen siehe Anhang, **Tab. 7.1-1**) verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte gemäß den Standardbedingungen für den Einsatz der *Taq*-Polymerase (Fa. Appligene) mit einer Annealing-Temperatur von 62°C und 36-facher Wiederholung des Reaktionszyklus.

Die Analyse der PCR-Reaktionen im Agarose-Gel ergab kein PCR-Produkt für die *ApaI*-verdauten chromosomale DNA, für die *BclI* behandelten Fragmente konnte ein PCR-Produkt der ungefähren Größe von 1,7 - 1,8 kb erhalten werden. Die mit der *AccIII*- bzw. *XmaI*- verdauten DNA erzeugten Amplifikate waren ungefähr 3,2 und 2,8 kb groß.

Zu ihrer vollständigen Sequenzierung sollten die mit Hilfe des Magic™ PCR Preps Purification Kits (Fa. Promega) aufgereinigten PCR-Produkte in den linearisiert vorliegenden an seinen Enden mit 3'-dT-Überhängen ausgestatteten TA-Cloning-Vektor pCR2.1 (3906 bp, Fa. Invitrogen) inseriert werden. Dieser

auf dem ColE1-Replikon basierende Vektor ist mit einer Kanamycin- und einer Ampicillin-Resistenz ausgestattet. Er ermöglicht die direkte Klonierung von mit 3'-dA-Überhängen ausgestatteten PCR-Produkten durch Ligation mit den 3'-dT-Überhängen des linear vorliegenden Plasmides.

Die beabsichtigte Klonierung der durch die Inverse PCR erzeugten Amplifikate gelang nur im Fall des auf zirkularisierten *Bcl*I-Restriktionsfragmenten als Template-DNA basierenden PCR-Produktes (ca. 1,7 - 1,8 kb). Hier konnten mit Hilfe des bei diesem Vektor zur Selektion auf DNA-Inserts vorhandenen *lacZ* durch Blau-Weiß-Screening zwei weiße Kolonien identifiziert werden. Die als pCR2.1i8 und pCR2.1i18 bezeichneten Plasmide aus diesen *E. coli* JM109-Zellen wurden durch Plasmid-Minipräparation isoliert, anschließend wurden die Größen der Inserts durch Restriktion mit den die Insertionstelle des Fragmentes im Vektor pCR2.1 flankierend schneidenden Enzymen *Bam*HI und *Xba*I (siehe **Abb. 4.8.2.2-1 B/C**) bei



**Abb. 4.8.2.2-1** Komplettierung von *lacP* durch Klonierung und Sequenzierung eines durch Inverse PCR erzeugten Fragmentes. A Schematische Darstellung bereits klonierter und zu klonierender Bereiche der *lac*-Region

und ihrer Größen mit Angabe der Gene, der Positionen von Restriktionsschnittstellen sowie der bei der Inversen PCR verwendeten Primern **jo-i-lacP-rev2** und **jo-i-lacP-for2**. **B** Darstellung des zur Sequenzierung (C) in pCR2.1 klonierten PCR-Produktes (Plasmid pCR2.1i8), sowie der zur vollständigen Sequenzierung des Inserts (**E**) angefertigten pMCS5-Subklone (**D**).

beiden rekombinanten Plasmiden auf ca. 1,8 kb bestimmt. Diese Insertgröße lies darauf schließen, das die klonierten Fragmente bei beiden Plasmiden zwischen 1,7 und 1,8 kb groß waren. Die sich anschließende Sequenzierung (siehe **Abb. 4.8.2.2-1 C**) mit den flankierenden Primern **pUC/M13-forward** und **pUC/M13-reverse** (Primersequenzen siehe Anhang, **Tab. 7.1-2**) zeigte, daß tatsächlich der fehlende Teil des 5'-Endes von *lacP* sowie ein Bereich stromaufwärts von *lacP* kloniert worden war. Durch die Subklonierung zweier Fragmente des Inserts von pCR2.1i8 in pMCS5 entstanden die Plasmide pMCS5EX*lac* und pMCS5XX*lac* (**Abb. 4.8.2.2-1 D** und **E**) mit Hilfe derer die komplette Sequenz des ursprünglich in pCR2.1i8 enthaltenen inversen PCR-Produktes doppelsträngig bestimmt werden konnte. Die Größe des sequenzierten Inserts beträgt 1721 bp, was abzüglich der Überhänge des PCR-Produktes und der bereits bekannten Sequenzabschnitte eine Ausweitung der bekannten *lac*-Region um 1651 bp ergab (**Abb. 4.8.2.2-1 A**). Dieser neu sequenzierte Bereich beinhaltete den kompletten bisher fehlenden 5'-Anteil von *lacP* sowie einen Bereich von 508 Basenpaaren stromaufwärts von *lacP*.

Die mit *AccIII* bzw. mit *XmaI* behandelte chromosomale DNA erzeugten nicht klonierten PCR-Produkte wurden mit den Primern **jo-i-lacP-rev2** und **jo-i-lacP-for2** ansequenziert. Die Auswertung der so ermittelten Sequenzdaten konnte den Verdacht bestätigen, daß beide PCR-Produkte sich nicht weiter als das *BclI*-Fragment in die bisher unbekanntenen Bereiche von *lacP* und seiner stromaufwärts gelegenen Region erstrecken. Sie enden beide noch innerhalb des 5'-Endes des *lacP*-Gens. Das im Vergleich zum Insert von pCR2.1i8 (*BclI*-Fragment) circa 1 kb größere „*XmaI*-Fragment“ endet 440 bp vor dem Translationsstart des *lacP*-Gens, während das ungefähr 1,4 kb größere „*AccIII*-Fragment“ bis 167 bp stromabwärts des ATG-Startkodon von *lacP* reicht. Da ihre Ausdehnung lediglich weiter in Richtung der bereits bekannten Sequenz des 3'-Endes von *lacP* reichte (siehe **Abb. 4.8.2.2-1 A**), wurde weder die Sequenzierung dieser Fragmente noch ihre Klonierung weiter verfolgt.

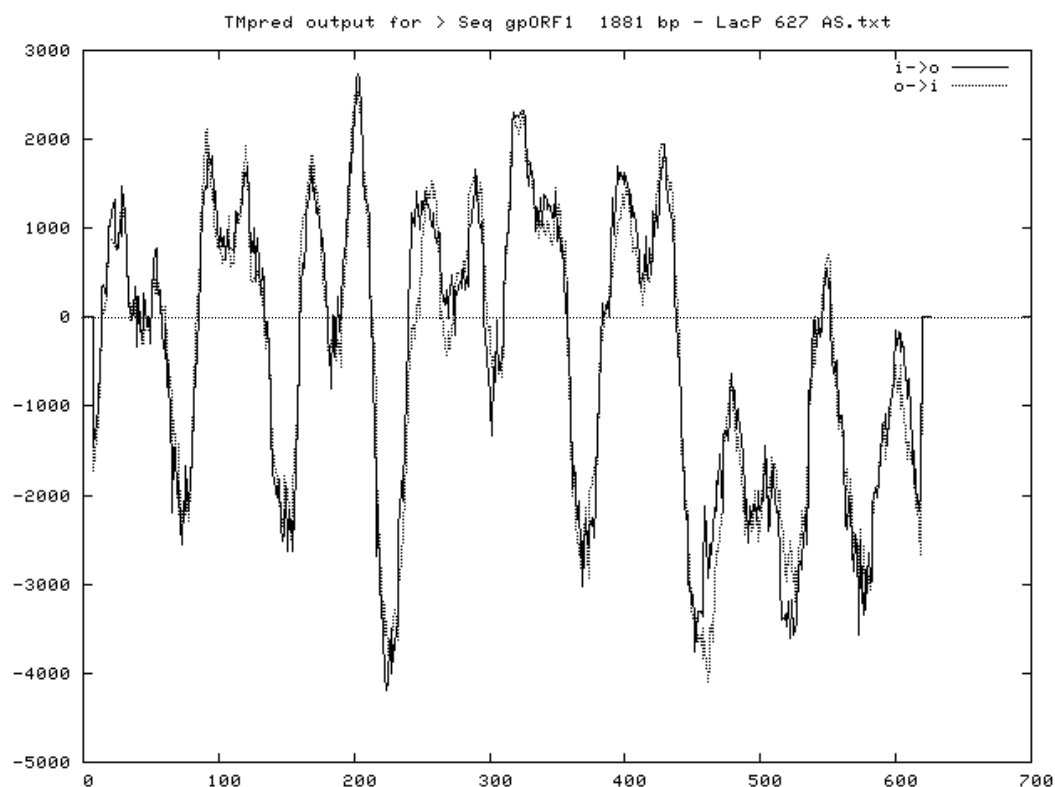
Die insgesamt bestimmte DNA-Sequenz der 6052 bp großen, an ihren Flanken nun durch eine *BclI* und eine *SalI*-Restriktionsschnittstelle begrenzten, *lac*-Region von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (**Abb. 4.8.2.2-1 A**, siehe auch **Abb. 4.8.2.4-1 A**) ist im Anhang (7.2) wiedergegeben. Der G+C-Gehalt des gesamten sequenzierten DNA-Bereichs liegt bei 51,4 % und korreliert gut mit dem von Weiss *et al.* (1983) für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* ermittelten Durchschnittswert von 50%.

#### 4.8.2.3 Analyse von *lacP* und des abgeleiteten Genproduktes LacP

Das komplettierte Gen *lacP* (1881 bp) beginnt bei Position 509 (die Gesamtsequenz mit der entsprechenden Numerierung ist im Anhang (7.2) angegeben) mit einem ATG-Kodon, und endet in Position 2389 mit dem „amber“ Stoppkodon TAG. Der Genbereich weist einen G+C-Gehalt von 53,7 auf. BlastN-Analysen mit dem vollständigen *lacP* zeigten 97 % Identität auf DNA-Ebene zu dem Gen *lacS* (1881bp) aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991). Das Gen *lacP* kodiert, wie *lacS* aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842, für ein Protein aus 627 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 68.236 Da und einem isoelektrischen Punkt



von 6,2 das wie bei *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATTC11842 auch signifikante Ähnlichkeiten zu zahlreichen Genbank-Einträgen von Laktose-Transportproteinen (80 % ähnliche Aminosäuren) aus verschiedenen *Streptococcus thermophilus* Stämmen aufwies. In Übereinstimmung zu den anderen Transport-Proteinen der GPH-Familie zeigt auch LacP aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 keine Ähnlichkeit zur Laktose-Permease LacY von *E. coli*. Das abgeleitete Protein LacP besitzt 46,6 %

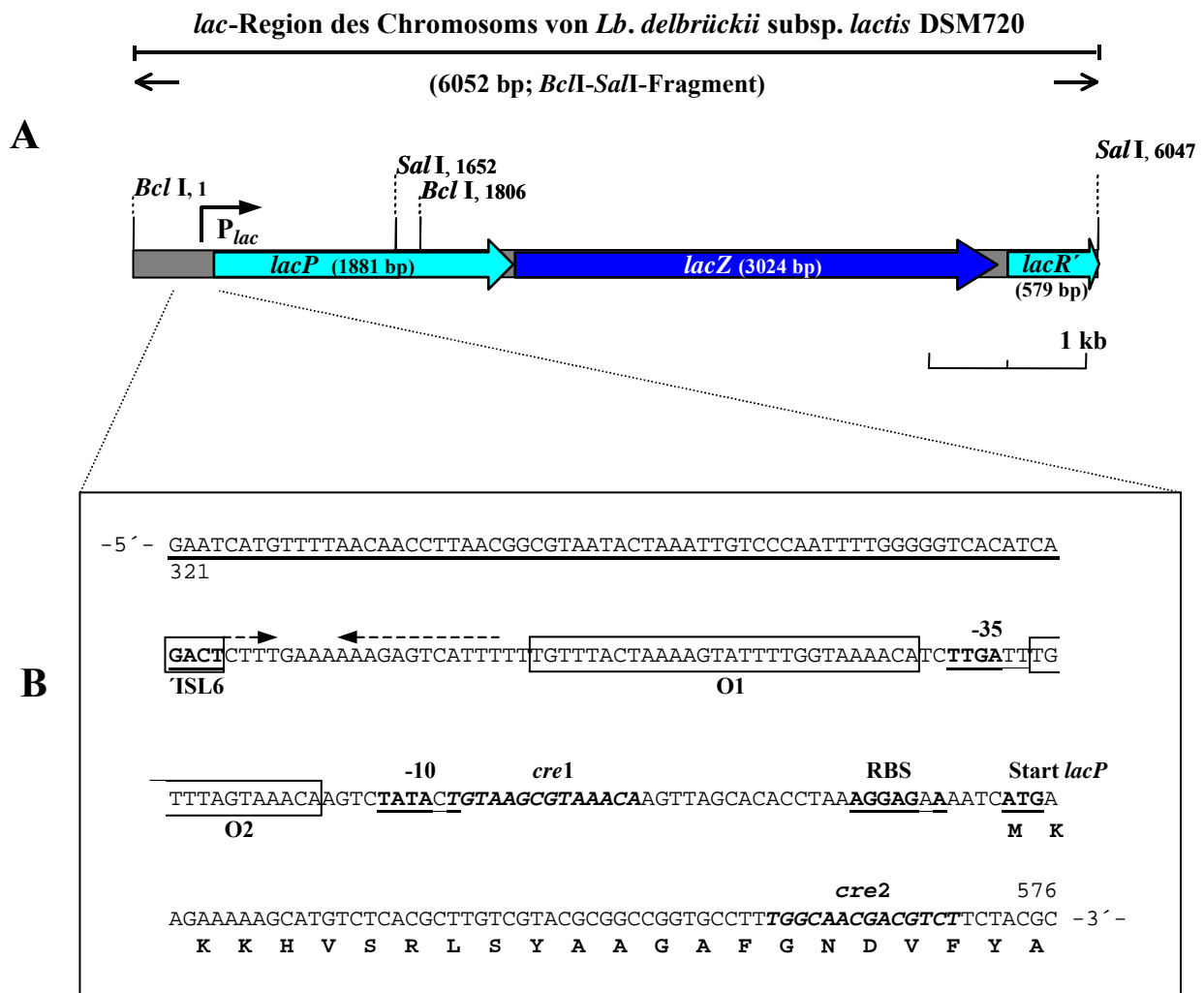


**4.8.2.3-1 Hydrophobizitätsdiagramm für die Laktose-Permease LacP aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290.** Das Diagramm wurde mit Hilfe der Web-Software TMpred nach dem Algorithmus von Hofmann und Stoffel (1993) erstellt. Die hydrophoben Aminosäurebereiche sind oberhalb, die hydrophilen unterhalb der gestrichelten Linie abgebildet.

hydrophobe Aminosäuren. Ein Hydrophobizitätsdiagramm für LacP ist in Abbildung 4.8.2.3-1 dargestellt. Nach der Berechnungsmethode von Hofmann und Stoffel (Hofmann und Stoffel, 1993) kann LacP als integrales Membranprotein betrachtet werden, für das 12 potentielle Transmembrandomänen (Programm TMpred) vorausgesagt werden.

#### 4.8.2.4 Analyse der 5' nicht-kodierenden Region stromaufwärts von *lacP*

Durch den Vergleich mit der Promotor-Konsensussequenz für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (Matern *et al.*, 1994) konnten in der 5' nicht-kodierenden Region von *lacP* (Abb. 4.8.2.4-1 A) potentielle



**Abb. 4.8.2.4-1** Genetische Organisation der stromaufwärts des *lacP*-Gens von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 identifizierten potentiellen Promotorelemente. **A** Übersicht des sequenzierten chromosomalen *Bcl*I-*Sal*I-Fragmentes mit den ermittelten Genen und ihren Größen. *P<sub>lac</sub>*, Promotor des *lac*-Operons; **B** Die Upstream- und 5'-Region des *lacP*-Gens. Die N-terminale Aminosäureabfolge des abgeleiteten Genproduktes LacP ist unterhalb der zugehörigen DNA-Sequenz angegeben. Die potentiellen -35- und -10-Regionen sowie die Ribosomenbindestelle (RBS) sind unterstrichen und in Fettschrift markiert. Die potentiellen *cre* Sequenzen (*cre1* bzw. *cre2*, *catabolite responsive element 1* bzw. 2) sind *kursiv* dargestellt; die potentiellen Operatoren O1 und O2 sind von einer Box umgeben; der für eine Transposase kodierende Bereich, der zum partiellen IS-Element ISL6 gehört, ist fett unterstrichen, die Integrationssequenz (GATC) von 'ISL6 ist unterstrichen und von einer Box umgeben; die beiden konvergierenden Pfeile markieren eine nach 'ISL6-Integration partiell verbliebene Struktur eines *rho*-unabhängigen Terminators; Start, Startkodon;

Promotorstrukturen identifiziert werden (**Abb. 4.8.2.4-1 B**). Vier Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstart (**ATG**) befindet sich mit 5-AGGAGaA-3' eine mögliche Ribosomenbindestelle (RBS; Shine-Dalgarno-Sequenz), die in einer Position von der Konsensussequenz abweicht. Die Sequenz 5'-TTGAtt-3' zeigt in vier von sechs Basen Übereinstimmung zur Konsensussequenz (5'-TTGnCa-3') für die -35-Region von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 und befindet sich 17 nt Entfernung stromaufwärts von der potentiellen -10-Region (5'-TATAcT-3'), die in sechs von sieben Basen mit dem ermittelten Konsensus (5'-TATAAT-3') übereinstimmt. Dieser Abstand entspricht dem

typischen Spacing von 17 Nukleotiden, der als Durchschnittswert sowohl für *Lactobacillus* als auch für *E. coli* gefunden wurde (Matern *et al.*, 1994). Direkt stromabwärts der –10-Region, mit dem ersten Nukleotid seiner linken Halbseite die letzte Base des 3'-Endes der –10-Region überlappend, befindet sich ein sehr gut konservierter potentieller *cre*-Operator (*cre1*, 5'-TGTAAGC GTaACA-3'; Position 469-482 bezogen auf die in **Abb. 4.8.2.4-1** angegebene Nummerierung der Gesamtsequenz der *lac*-Region), der nur in seiner internen Position +3 der rechten Halbseite (a), der von Weickert und Chambliss (1990) postulierten Konsensussequenz (TGWNANC GNTNWCA) für das *catabolite responsive element* (*cre*) nicht entspricht.

Stromabwärts des Translationstarts von *lacP* (Pos. 556-569) befindet sich mit 5'-TGgCAAC GAcGTcT-3' ein weiteres potentielles *cr*-Element, welches in den drei klein dargestellten Basen seiner Abfolge von der *cre*-Konsensussequenz (Weickert und Chambliss, 1990) abweicht. Ob diese beiden potentiellen Operatoren einzeln oder gemeinsam an der zuckerspezifischen CcpA- bzw. PepR1-vermittelten Regulation des *lac*-Operons über die Beeinflussung der vom potentiellen Promotor *P<sub>lac</sub>* ausgehenden Transkription beteiligt sind, soll in Kap. 4.10 näher untersucht werden.

Direkt stromaufwärts der -35-Region befindet sich eine Region von 52 bp (Pos. 389-440) mit einem hohen A+T-Gehalt von 76,9 %, die sich, wie von Lapierre *et al.* (2002) publiziert, bis zur Integrationsstelle (**GATC**, siehe **Abb. 4.8.2.4-1 B**) eines am 5'-Ende des sequenzierten *lac*-Bereiches lokalisierten partiellen IS-Elementes (ISL6, Lapierre *et al.*, 2002) erstreckt. Dieser AT-reiche Bereich (Upstream-Element, UP-Element), welcher stromaufwärts der –35-Region (bei ca. -40-bis -60) lokalisiert ist und deshalb auch –45- oder –43-Element genannt wird, findet sich in einer ganze Reihe von *E. coli*- und auch *Lactobacillus*-Promotoren (Matern *et al.*, 1994) Eine konservierte Sequenz konnte bisher nicht bestimmt werden. Bekannt ist lediglich, daß diese AT-reiche Region einen entscheidenden Einfluß auf die Effizienz der Promotorerkennung durch die RNA-Polymerase hat, indem es zu Wechselwirkungen zwischen diesem Element und der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase kommt.

Daneben wird die –35-Region noch von als *cis*-aktiven Sequenzen identifizierten Bereichen flankiert, die von Lapierre *et al.* (2002) als Operatoren 1 (**O1**) und 2 (**O2**) bezeichnet wurden. Sie gelten als potentielle Bindestellen für Repressoren des in *E. coli* identifizierten LacI- (Lehming *et al.*, 1987) oder RafR-Typs (Muiznieks *et al.*, 1994) transkriptioneller Regulatoren. Möglicherweise dienen einer oder beide Operatoren aber auch als Bindestelle für ein funktionelles LacR.

Zwei Basenpaare upstream des Operators O1 endet die durch Integration von ISL6 an ihrem 5'-Ende zerstörte Stem-loop Struktur eines *rho*-unabhängige Terminators (siehe **Abb. 4.8.2.4-1 B**, Pos. 389 – 408 divergierende Pfeile), die wie Nukleotidsequenzanalysen basierend auf den Daten von Lapierre *et al.* (2002) zeigten, vor der Integration von ISL6 (Gb AY040215), dem möglicherweise stromaufwärts von *lacP* lokalisierten *lacA* Gen (Gb AY040211) als *rho*-unabhängiger Transkriptions-Terminators gedient haben könnte.

Diese Organisation eines unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehenden *lacA*-Gens, welches von einem *rho*-unabhängigen Terminator gefolgt wird, an den sich stromabwärts die als Operon organisierte Genreihenfolge *lacS*, *lacZ* und *lacR* anschließt, wurde für *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* LL44 beschrieben (Lapierre *et al.*, 2002). Das *lacA*-Gen kodiert für ein Peptid von 189 Aminosäuren, und besitzt auf DNA-Ebene 50 % Sequenzidentität zum *lacA*-Gen aus *E. coli* (Hediger *et al.*, 1985), das für eine Thiogalaktosyl-Transacetylase kodiert.

#### 4.9 Expression von *lacPZ* in Abhängigkeit von der C-Quelle

Um die aus der Sequenzanalyse des vorangegangenen Kapitels abgeleitete Schlußfolgerung, daß *lacP* und *lacZ* ausgehend von einem gemeinsamen Promotor eine monocistronische Transkriptionseinheit bilden, zu verifizieren, wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten neben der Größenbestimmung der zugrunde liegenden mRNA auch die Korrelation zwischen der Menge an vorliegendem Transkript und der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) einschließen. Parallel hierzu sollte in den zellfreien Extrakten auch die spezifische Aktivität der *D*-Laktatdehydrogenase (*D*-LDH) verfolgt werden, die wie Ergebnisse aus *Lactococcus* und *Streptococcus* zeigten (Luesink *et al.*, 1998; van den Bogaard *et al.*, 2000), ähnlich dem *lac*-Operon unter CcpA-spezifischer Kontrolle stehen sollte. Für alle oben genannten Analysen wurden, wie bereits in Kapitel 4.7 (siehe Abb. 4.7.1-1 A) beschrieben, mRNA-Präparationen und zellfreie Extrakte der früh- (Entnahmezeitpunkt 1) und spät-exponentiellen (Entnahmezeitpunkt 2) bzw. der früh-stationären Wachstumsphase (Entnahmezeitpunkt 3) von in CDM<sub>Gluk.</sub> oder in CDM<sub>Lak.</sub> kultivierten Zellen von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 eingesetzt.

##### 4.9.1 Bestimmung des Temperaturoptimums der spezifischen $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

In einem Vorversuch wurde mit einer Mischung der zellfreien Extrakte der spät-exponentiellen (Entnahmezeitpunkt 2) sowie der früh-stationären Wachstumsphase (Entnahmezeitpunkt 3) aus den in CDM<sub>Lak.</sub> kultivierten Zellen (siehe Kap.4.7 Abb. 4.7.1-1 A und Abb. 4.9.2-1 A) wie im Methodenteil beschrieben das Temperaturoptimum der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ermittelt. Die Abbildung 4.9.1-1 zeigt die Ergebnisse dieser Meßreihe. Wie sich aus der Abbildung erkennen läßt, wurden

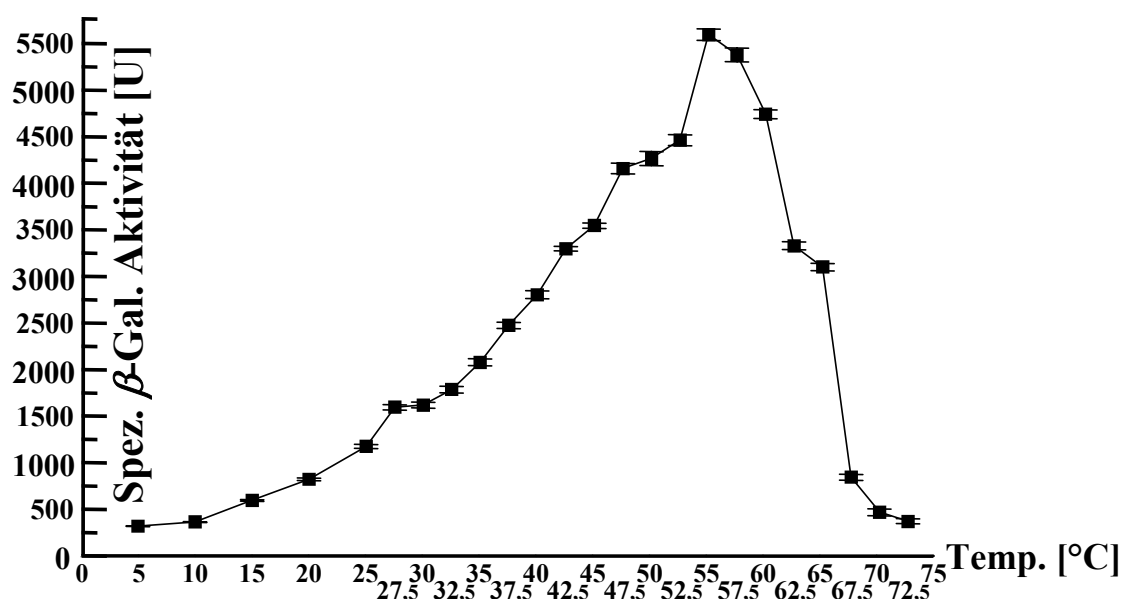


Abb. 4.9.1-1 Bestimmung des Temperaturoptimums der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Extrakten aus Zellen einer DSM7290-Kultur in CDM<sub>Lak.</sub>. Die dargestellten Aktivitäten und die zugehörigen Abweichungen

(Balken) resultieren aus jeweils drei Einzelmessungen. Die Einheiten (Units, U) der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden definiert als  $\mu\text{mol}$  aus *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid (ONPG) freigesetztem *o*-Nitrophenol pro mg Gesamtein und min.

im Temperaturbereich zwischen 5 und 72,5°C, zuerst in 5°C- dann in 2,5°C-Schritten, die spezifischen Aktivitäten der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt. Sie stiegen im Temperaturbereich zwischen 5 und 52,5°C sukzessive an, um dann nochmals sprunghaft zum Maximum bei circa 55°C (Bereich 53-58°C) anzusteigen. Bei den weiteren Inkubationstemperaturen schließlich fielen die Aktivitäten ausgehend vom Meßwert bei 60°C über die folgenden vier Meßpunkte bis zur letzten Inkubationstemperatur bei 72,5°C schnell ab. Somit wurde eine Temperatur von 55°C als Temperaturoptimum für die Aktivität des Enzymes LacZ bestimmt. Da bei 55°C (Temperaturbereich 53-58°C) weder die auf eine mögliche temperaturbedingte Protein-Denaturierung noch die auf Evaporation der Reaktionsansätze zurückgehenden Einflüssen in aufwendigen Meßreihen ausgeschlossen werden konnten, wurde für alle weiteren Meßreihen nicht 55°C sondern eine Temperatur von 42°C als Inkubationstemperatur gewählt. Bei dieser Temperatur, die der optimalen Wachstumstemperatur von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 entspricht, weist das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase verglichen mit der bei 55°C bestimmten Aktivität bereits circa 70 % des Maximalwertes auf.

#### 4.9.2 Analyse der *lacPZ*-Transkripte sowie der spezifischen Aktivitäten der $\beta$ -Galaktosidase und der *D*-Laktatdehydrogenase

Zur Untersuchung der Transkription der Gene *lacP* und *lacZ* sowie der Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) und der *D*-Laktatdehydrogenase (*D*-LDH) wurden Zellen von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in modifiziertem chemisch definiertem Medium (CDM<sub>mod.</sub>), welches entweder mit 2 % Glucose (CDM<sub>Gluk.</sub>) oder mit 2 % Laktose (CDM<sub>Lak.</sub>) versetzt war, kultiviert. Die gesamte Durchführung des Experimentes (wie Probenentnahme, Probenaufarbeitung, Präparation zellfreier Extrakte sowie mRNA-Isolierung) wurde bereits in Kapitel 4.7 beschrieben. Alle dort gewonnenen Proben wurden auch hier für die Bestimmung spezifischer Aktivitäten sowie zur Northern Hybridisierung verwendet.

Die Ergebnisse der Analysen und Messungen zeigt **Abb. 4.9.2-1**. Bei der Betrachtung der Wachstumskurven in **Abb. 4.9.2-1 A** erkennt man, daß die in CDM<sub>Lak.</sub> wachsende Kultur in der exponentiellen Wachstumphase gegenüber der in CDM<sub>Gluk.</sub> eine größere Steigung aufwies und zu einer höheren O.D.<sub>600</sub> am Ende des Experimentes auswuchs. Die über die log-Phasen der Kulturen berechneten Wachstumsraten ( $\mu$ ) betragen 0,19 für die in CDM<sub>Lak.</sub> und 0,16 für die in CDM<sub>Gluk.</sub> gewachsenen Zellen. Vergleicht man diese Resultate mit denen der enzymatischen Messungen, so erkennt man nicht nur eine höhere Wachstumsrate mit der C-Quelle Laktose, sondern im Vergleich der Kulturen CDM<sub>Lak.</sub> und CDM<sub>Gluk.</sub> auch eine für CDM<sub>Lak.</sub> um ein Vielfaches höhere Aktivität des für die Spaltung der Laktose in die Monomere Glukose und Galaktose verantwortlichen Enzymes  $\beta$ -Galaktosidase. Wie die Betrachtung von **Abb. 4.9.2.1-1 B** zeigt, konnten bei den drei Entnahmezeitpunkten für die

Kultur von DSM7290 in CDM<sub>Gluk.</sub> basale LacZ-Aktivitäten zwischen 47 und 77 Units bestimmt werden, während die Aktivitäten der in CDM<sub>Lak.</sub> wachsenden Kultur zwischen 3052 und 3252 Units lagen. Setzt man die Aktivitäten der jeweiligen Entnahmezeitpunkt der beiden zu vergleichenden Kulturen zueinander ins Verhältnis, so ergibt sich eine im Mittel 55-fach (minimal 40-fach, maximal 67-fach) höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität für die in Laktose gewachsene Kultur.

Parallel zu dieser Bestimmung der LacZ-Enzymaktivität wurde eine Northern Blot Analyse (**Abb. 4.9.2-1 C / D**) mit einer *lacZ*-spezifischen und einer *lacP*-spezifischen Sonde durchgeführt. Die Daten zur Erzeugung der beiden in den Northern Hybridisierungsexperimenten eingesetzten, <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden faßt **Tab. 4.9.2-1** zusammen.

Sonde	Größe (bp) / Position (von/bis) im sequenzierten Bereich	Template-DNA (Plasmid)	Primer
<i>lacP</i>	1479 (470-1948)	chrom. DNA von DSM7290	lacP-up1 (#253)
			lacP-down1 (#254)
<i>lacZ</i>	3052 (2371-5422)	pUH89 <i>lac</i>	lacZLbdel- <i>Bam</i> HI (#141)
			lacZLbdel- <i>Sph</i> I (#140)

**Tab. 4.9.2-1: Übersicht der PCR-Produkte, die als <sup>32</sup>P-markierte Sonden für Northern Blot Analysen der Transkripte von *lacP* und *lacZ* eingesetzt wurden.** Die Sonden wurden durch PCR-Amplifikation hergestellt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang (**Tab. 7.1-1**) aufgeführt. Die zur Herstellung der Sonden verwendeten Primer besitzen teilweise an ihren 5'-Enden durch Modifikation der Originalsequenz künstlich erzeugte Restriktionsschnittstellen sowie weitere nicht paarende Nukleotide.

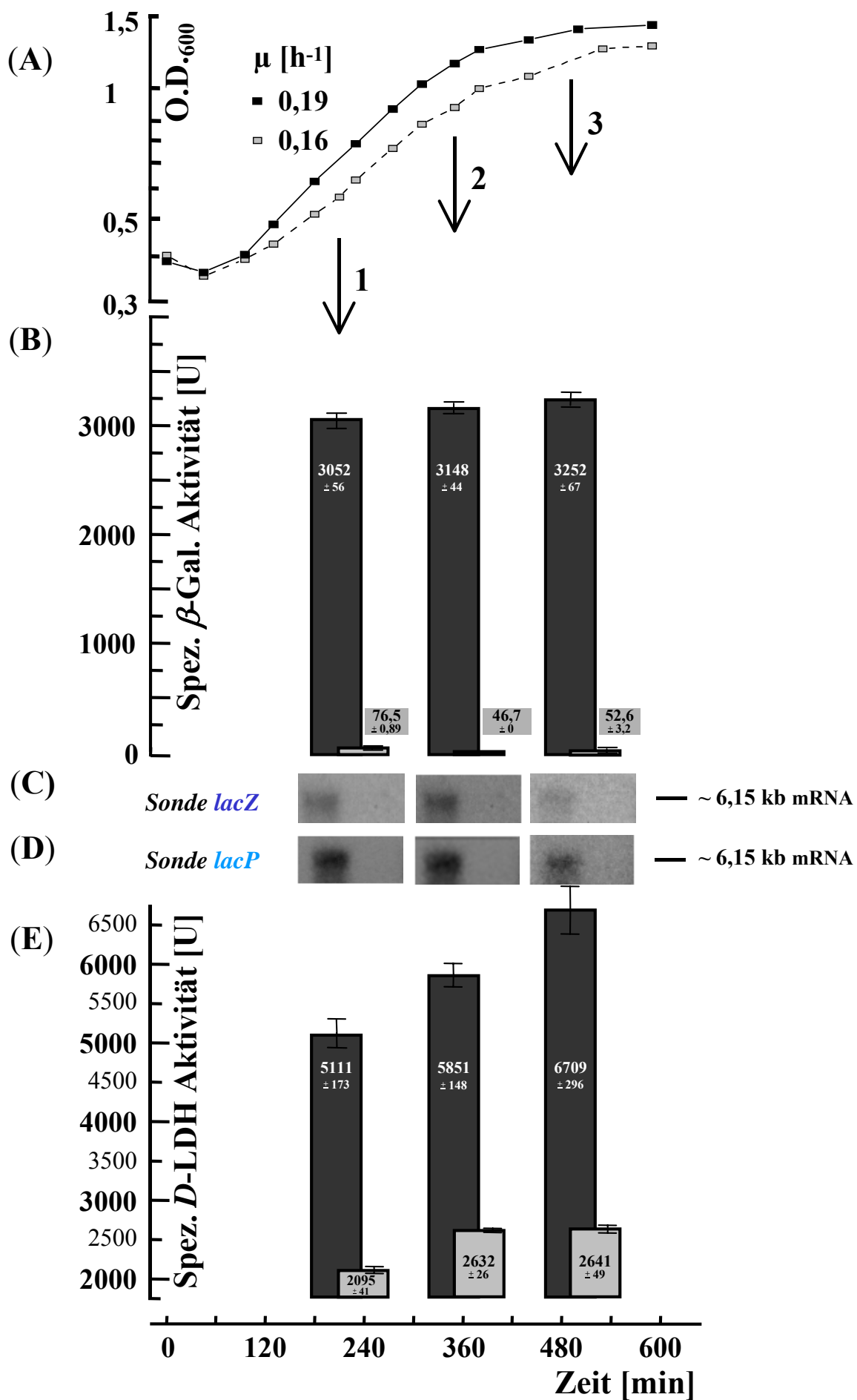
Die Northern Blots für die *lacZ*-mRNA zeigten ein Hybridisierungssignal bei einer Bande von circa 6,15 kb Größe (**Abb. 4.9.2-1 C**). Dieses Signal ist nur bei den drei Entnahmezeitpunkten der Kultur in CDM<sub>Lak.</sub> zu erkennen, nicht aber bei den in CDM<sub>Gluk.</sub> gewachsenen Zellen. Bezüglich der Kultur CDM<sub>Gluk.</sub> korreliert diese Resultate mit der nur sehr geringen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von 47 bis 77 Units (**Abb. 4.9.2-1 B**). Die Bandenintensität des mit der *lacZ*-Sonde hybridisierenden Transkripts für CDM<sub>Lak.</sub> korrelierte nicht vollständig mit den ermittelten LacZ-Aktivitäten. Zwar nahm

**Abb. 4.9.2-1 A-D: Einfluß der Zuckerquelle auf die Aktivitäten der  $\beta$ -Galaktosidase und der D-Laktatdehydrogenase sowie die Expression der Gene *lacP* und *lacZ* in modifiziertem CDM.**

(A) Wachstum von DSM7290 in mit 2 % Casamino acids supplementiertem chemisch definiertem Medium (CDM), welches entweder 2 % Glukose (□) oder 2 % Laktose (■) als Kohlenstoffquelle enthielt.  $\mu$ , Wachstumsrate. Die Abb. entspricht **Abb. 4.7.1-1 A**.

(B) / (E) Zu drei durch Pfeile (↓) symbolisierten Zeitpunkten wurden Aliquots der Kulturen geerntet und zellfreie Extrakte präpariert. Die spezifischen  $\beta$ -Gal- (B) und die D-LDH-Aktivitäten (E) aus den mit Glukose (graue Balken) oder mit Laktose (schwarze Balken) gewachsenen Zellen wurden in Verdünnungen der zellfreien Extrakte (Proteingehalt: 60-100  $\mu$ g/ml) bestimmt. Die dargestellten Aktivitäten und die zugehörigen Abweichungen (als Balken und als Zahlenwerte eingetragen) resultieren aus jeweils drei Einzelmessungen. Die Einheiten (Units, U) der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden definiert als  $\mu$ mol aus ONPG freigesetztes *o*-Nitrophenol pro mg Gesamtein und min, die der D-Laktatdehydrogenase als  $\mu$ mol umgesetztes NADH pro mg Gesamtein und min.

(C) / (D) Northern-Analysen mit je 10  $\mu$ g RNA pro Spur, die aus den jeweiligen Zellaliquots der mit den zwei verschiedenen Zuckern gewachsenen Kulturen präpariert wurde; Hybridisierungen mit einer *lacZ*- (C) und einer *lacP*-spezifischen (D) Sonde (**Tab. 4.9.2-1**).



die Intensität des Hybridisierungssignales genau wie die Aktivität von Entnahmezeitpunkt **1** nach **2** leicht zu, bei Punkt **3** war die Signalstärke jedoch geringer als bei den Entnahmezeitpunkten **1** und **2**, obwohl die Aktivität vom Messpunkt in der spät-logarithmischen (**2**) zu dem in der früh-stationären Wachstumsphase (**3**) nochmals geringfügig anstieg.

Die mit der *lacP*-spezifischen Sonde durchgeführten Hybridisierungen erbrachten genau wie bei der *lacZ*-Sonde ein Signal bei einer mRNA-Bande der ungefähren Größe von 6,15 kb (**Abb. 4.9.2-1 D**). Diese Größe deutet, wenn man die chromosomale Anordnung von *lacP* und *lacZ* sowie die Gengrößen von 1881 bp für *lacP* und 3024 bp für *lacZ* berücksichtigt, darauf hin, daß die beiden Gene kotranskribiert werden. Des weiteren legt die Größe des mit beiden Sonden detektierten Transkriptes die Vermutung nahe, daß neben den Genen *lacP* und *lacZ* noch das downstream von *lacZ* in gleicher Leserichtung angeordnete Gen *lacR* mit zu derselben Transkriptionseinheit gehören könnte, da eine anzunehmende Größe von 996 bp für das komplette *lacR*-Gen sowie 51 Basenpaare für die *lacZ-lacR* intergene Region die rechnerisch fehlenden ungefähr 1 kB zur Transkriptlänge von 6,15 kB ergäben. Mit der *lacP*-Sonde konnte ebenfalls nur mit der aus der CDM<sub>Lak.</sub>-Kultur isolierten mRNA ein Signal detektiert werden. Auch hier waren für CDM<sub>Gluk.</sub> keine Hybridisierungssignale zu erkennen. Die mit der *lacP*-Sonde über die drei Entnahmezeitpunkte bei CDM<sub>Lak.</sub> detektierten mRNA-Banden variierten in ihren Intensitäten analog den für dieselbe Kultur mit der *lacZ*-Sonde nachgewiesenen Banden. Die Detektion der *lacPZ*-mRNA-Bande mit der *lacP*-Sonde wies jedoch bezüglich der Signalstärke bei allen drei untersuchten Zeitpunkten, wie beim Vergleich der Abbildungen **4.9.2-1 C** und **4.9.2-1 D** zu erkennen ist, um einen Faktor von zwei bis drei höhere Intensitäten auf.

Die Aktivitäten des als Vergleich zur  $\beta$ -Galaktosidase (*LacZ*) untersuchten Enzymes *D*-Laktatdehydrogenase (*D*-LDH) veränderten sich über beide Kulturverläufe (CDM<sub>Lak.</sub> bzw. CDM<sub>Gluk.</sub>) ähnlich den für *LacZ* bestimmten Werten (**Abb. 4.9.2-1 E**). Sie stiegen für die Messpunkte der Kultur CDM<sub>Lak.</sub> kontinuierlich von früh-exponentieller (**1**) bis früh-stationärer (**3**) Wachstumsphase an. Die Werte für CDM<sub>Gluk.</sub> stiegen ebenfalls von Zeitpunkt **1** (2095 Units) nach **2** (2632 Units) und schließlich nach **3** (2641 Units) noch einmal leicht an. Im Fall der *D*-LDH sind die bei CDM<sub>Gluk.</sub> gemessenen Aktivitäten nicht so deutlich reduziert wie bei *LacZ*, da sie im Vergleich mit den Meßwerten bei CDM<sub>Lak.</sub> nur um die Faktoren 2,4 (Zeitpunkt **1**, früh-exponentielle Wachstumsphase), 2,2 (**2**, spät-exponentiell) und 2,6 (**3**, früh-stationär) geringer sind. Aber auch hier liegen die Aktivitäten des Enzymes beim Wachstum in Medium mit Laktose durchschnittlich um einen Faktor 2,4 höher als beim Wachstum mit Glukose (**Abb. 4.9.2-1 E**).

Der Vergleich der im Mittel 55-fach erhöhten Aktivitäten der  $\beta$ -Galaktosidase (*LacZ*) beim Wachstum in Medium mit Laktose (CDM<sub>Lak.</sub>) mit den durchschnittlich nur 2,4-fach erhöhten Aktivitäten der *D*-Laktatdehydrogenase (*D*-LDH) wirft die Frage auf, ob hier möglicherweise unterschiedliche regulative Mechanismen zugrunde liegen könnten. Die Aktivitätsunterschiede für die *D*-Laktatdehydrogenase könnten allein auf eine *PepR1*- (*CcpA*-) spezifische Regulation bzw. Modulation zurückzuführen sein, welche die Transkription des *D-ldh* Genes Glukose-vermittelt reprimiert und deshalb mit der C-Quelle Laktose zu höheren Aktivitäten der *D*-LDH führt. Der größere Unterschied bei den in CDM<sub>Gluk.</sub> und CDM<sub>Lak.</sub> gemessenen *LacZ*-Aktivitäten scheint nicht alleine durch *PepR1*-Wirkung begründbar. Ein möglicher Kandidat für eine weitere bei der *LacPZ*-Expression regulierend eingreifenden Komponente wäre das downstream von *lacPZ* lokalisierte potentielle Regulatorgen *lacR*, dessen Genprodukt *LacR* in Anwesenheit von Glukose als negativer Regulator der *lacPZ*-Transkription wirken könnte.



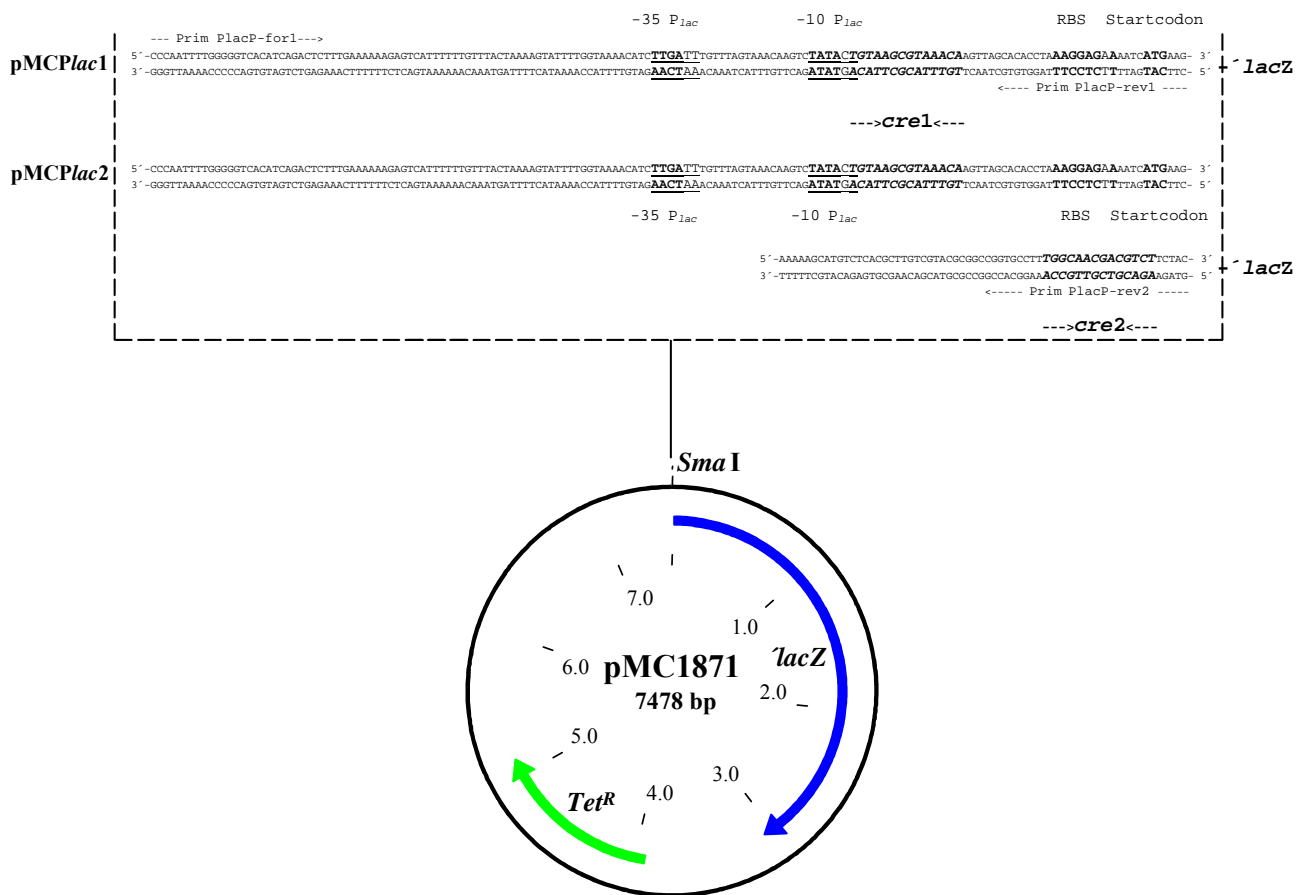
#### 4.10 Funktionelle Analyse der beiden *cre*-Operatoren der *lac*-Promotor- und *lacP*-5'-Region in den heterologen Organismen *E. coli*, *Staphylococcus xylosus* und *Lactococcus lactis*

Ausgehend von den Daten aus der Analyse der Nukleotidsequenz in Kapitel 4.8 sollten die beiden im Bereich des *lac*-Promotors beschriebenen potentiellen *cr*-Elemente (*cre*) hinsichtlich ihrer Funktion bei der möglichen PepR1-abhängigen Regulation des *lacPZ(R)*-Operons charakterisiert werden. Dies sollte durch die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zweier Translationsfusionen von *lac*-Promotorabschnitten mit dem promotorlosen *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidasegen bei Anwesenheit von PepR1 bzw. CcpA in drei verschiedenen heterologen Systemen untersucht werden. Die beiden zu klonierenden Promotorfragmente sollten entweder nur ein *cre* oder beide *catabolite responsive elements* enthalten.

##### 4.10.1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMCPlac1 und pMCPlac2

Zur heterologen Expression von Translationsfusionen des Promotorbereiches des *lacPZ*-Operons mit dem promotorlosen *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidasegen wurden mit die 5'-Region von *lacP* flankierenden Primern zwei PCR-Produkte unterschiedlicher Länge erstellt, welche entweder eine oder beide *cre* Operatoren der *lac*-Promotor- bzw. 5'-Region von *lacP* enthielten. Die PCR-Amplifikate für die im Folgenden näher zu beschreibende Klonierung wurden durch Kombination des Primers **PlacP-for1** mit den unterschiedlichen Gegenstrang-Primern (**Prim**) **PlacP-rev1** bzw. **PlacP-rev2** erzeugt (**Abb. 4.10.1-1**, **Tab. 4.10.1-1**; die Nukleotidsequenzen der Primer sind dem Anhang zu entnehmen). Die Fragmente, die den *lac*-Promotor einschließlich der Triplets enthielten, die für die ersten zwei (PCR-Produkt P<sub>lac1</sub>) bzw. 22 AS (PCR-Produkt P<sub>lac2</sub>) des LacP von *Lactobacillus lactis* DSM7290 kodieren, wurden in die *Sma*I-Schnittstelle des  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsvektors pMC1871 inseriert (**Abb. 4.10.1-1**).

Die Amplifikation der betreffenden Fragmente wurde mit der ULTma DNA-Polymerase durchgeführt. Als Template diente chromosomale DNA von *Lb. lactis* DSM7290. Die PCR-Reaktionen enthielten keine im Agarosegel sichtbaren Nebenprodukte unerwünschter Größe und konnten deshalb direkt in die Ligation des mit *Sma*I linearisierten Vektors pMC1871 eingesetzt werden. Die Ligationsansätze, wurden in *E. coli* JM109 transformiert. Nach 24-36 Stunden zeigten sich auf den LB-Agar-Platten, die Tetracyclin und *X-Gal* enthielten, Kolonien, welche durch die Spaltung des Farbstoffes *X-Gal* schwach blau bis blau waren. Diese Spaltung des Farbstoffes *X-Gal*, die von der durch das komplettierte *E. coli lacZ*-Gen kodierten  $\beta$ -Galaktosidase hervorgerufen wurde, konnte bei leicht blau gefärbten Klonen durch direktes Auftropfen einer 2 %igen *X-Gal*-Lösung auf die Kolonie auch unmittelbar nachgewiesen werden. Klone, die eines der gewünschten rekombinanten Plasmide enthielten, färbten sich dann binnen Sekunden tiefblau. Nachfolgend wurden für jedes der beiden zu erstellenden Konstrukte je zwölf Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Alle isolierten Plasmide wiesen die erforderliche Größe von 7,63 kB (pMCPlac1) bzw. 7,69 kB (pMCPlac2) auf, woraufhin pro Konstrukt je 6 Plasmide in die weitere Analyse eingesetzt wurden. Die rekombinanten Plasmide wurden desweiteren in Nachweis-PCR-Reaktionen eingesetzt, wobei der oben erwähnte Primer **PlacP-for1** mit dem Primer **pMCkon** (siehe



**Abb. 4.10.1-1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMCPlac1 und pMCPlac2.** Darstellung des Vektors pMC1871 und der zwei jeweils in die *SmaI*-Restriktionsschnittstelle (blunt) von pMC1871 inserierten Fragmente der *lac*-Promotor- und *lacP*-5'-Genabschnitte. Die beiden potentiellen *cre* sind kursiv und fett gedruckt. Die relevanten Elemente der beiden sich in ihrer Länge und der Anzahl enthaltener potentieller *cre* unterscheidenden *P<sub>lac</sub>*-Promotorfragmente sind fett gedruckt und unterstrichen, die zur Amplifikation der Sequenzabschnitte benutzten Primer als gestrichelte Pfeile angegeben. *Tet<sup>R</sup>*, Tetracyclin-Resistenz; *lacZ*, an seinem 5'-Ende unvollständiges *E. coli lacZ*-Gen.

Anhang) kombiniert wurde, der im *lacZ*-Gen entgegen dessen Leserichtung hybridisierte. Nur wenn das jeweilige *P<sub>lac</sub>*-Promotorfragment in der gewünschten Orientierung in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pMC1871 inseriert war, konnte bei der Standard-PCR-Reaktion entweder ein 712 bp (pMCPlac1) oder ein 772 bp (pMCPlac2) großes PCR-Produkt entstehen. Dies konnte bei mindestens

Forward Primer	Reverse Primer	Größe PCR-Produkt [bp]	Potentielle <i>cre</i> -Sequenz(en)	Bezeichnung PCR-Produkt	Resultierendes Plasmid
PlacP-for1	PlacP-rev1	152	5' - <u>TGTAAGCGTAAACA</u> -3'	<i>Plac1</i>	pMCPlac1
PlacP-for1	PlacP-rev2	212	5' - <u>TGTAAGCGTAAACA</u> -3' 5' - <u>TGGCAACGACGTCT</u> -3'	<i>Plac2</i>	pMCPlac2

**Tab. 4.10.1-1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide pMCPlac1 und pMCPlac2.** Die Tabelle zeigt die aus den verschiedenen Größen der erzeugten PCR-Produkte resultierenden Anzahl an potentiellen *cre* Operatoren. Die zur Subklonierung von *lac*-Promotorfragmenten benutzten Oligonukleotide für die PCR-Reaktionen sind ebenso wie die Namen und Größen der jeweiligen PCR-Produkte und die Namen der resultierenden Plasmide eingetragen.

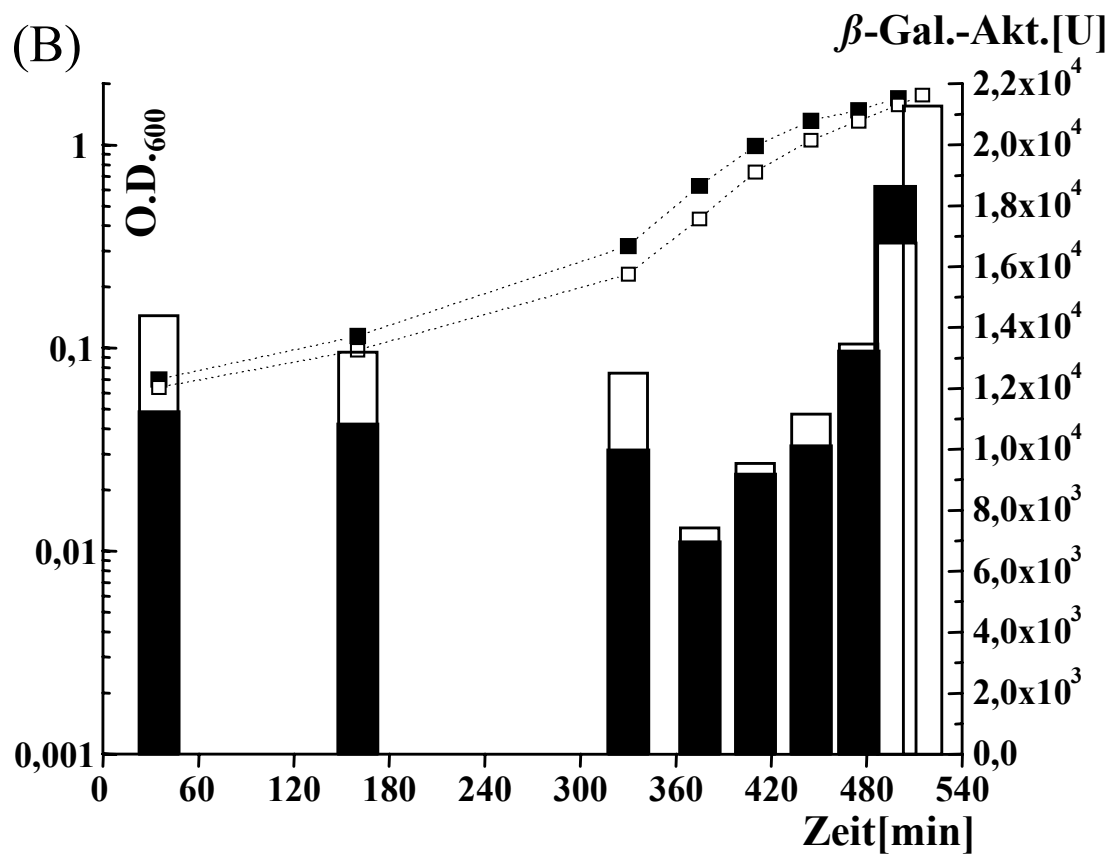
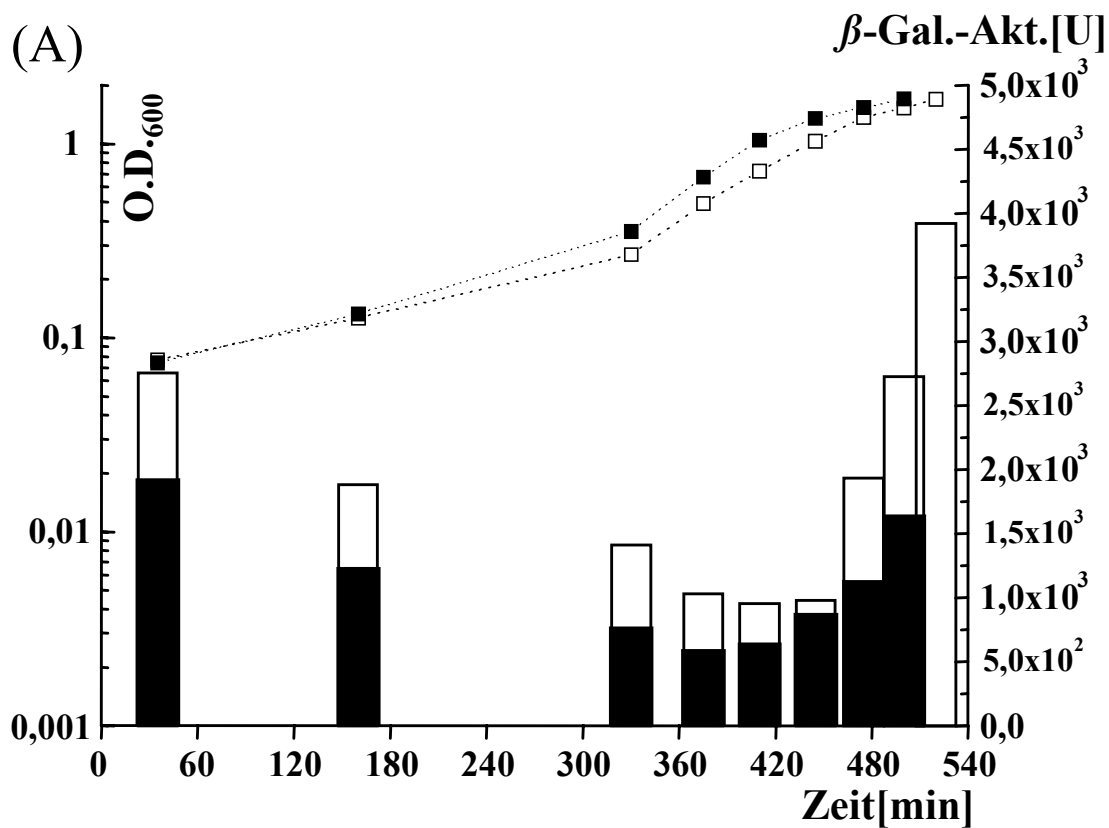
vier der sechs analysierten Plasmide gezeigt werden. Je drei der rekombinanten Plasmide, die bei dieser Nachweis-PCR-Reaktion ein positives Resultat zeigten, wurden zur abschließenden Sicherstellung der Richtigkeit der klonierten Sequenzabschnitte mit Hilfe des Primers **pMCkon** (siehe Anhang **Tabelle 7.1-2**) sequenziert. Je eines der Plasmide, dessen Sequenz bezüglich des klonierten Promotorabschnittes bestätigt werden konnte, wurde in die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

#### 4.10.2 Einfluß des Regulators PepR1 auf die Expression der beiden $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen im heterologen *E. coli* Wirt

Die unter **4.10.1** erstellten Konstrukte wurden nun in *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ) jeweils mit einem zweiten, kompatiblen Plasmid, pFNP13 (Stucky *et al.*, 1996), co-transformiert. Der Ampicillinresistenz vermittelnde Vektor pFN476, welcher das Fragment mit dem *pepR1*-Gen nicht trug, diente als Kontrolle. Kolonien, die auf LB-*X-Gal*-Agarplatten, die mit Tetracyclin und Ampicillin versetzt waren, Blaufärbung zeigten, wurden abgeimpft, die Plasmide durch Minipräparation isoliert und durch Restriktionsanalyse überprüft. Zum Einsatz in  $\beta$ -Galaktosidase-Messung (Miller, 1972) wurden 5 ml-Übernachtskulturen aus diesen Stocks angelegt und die Messungen anschließend mit frisch überimpften Übertagkulturen durchgeführt. Mit über den Zeitverlauf den wachsenden Kulturen entnommenen Aliquots wurden die jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt.

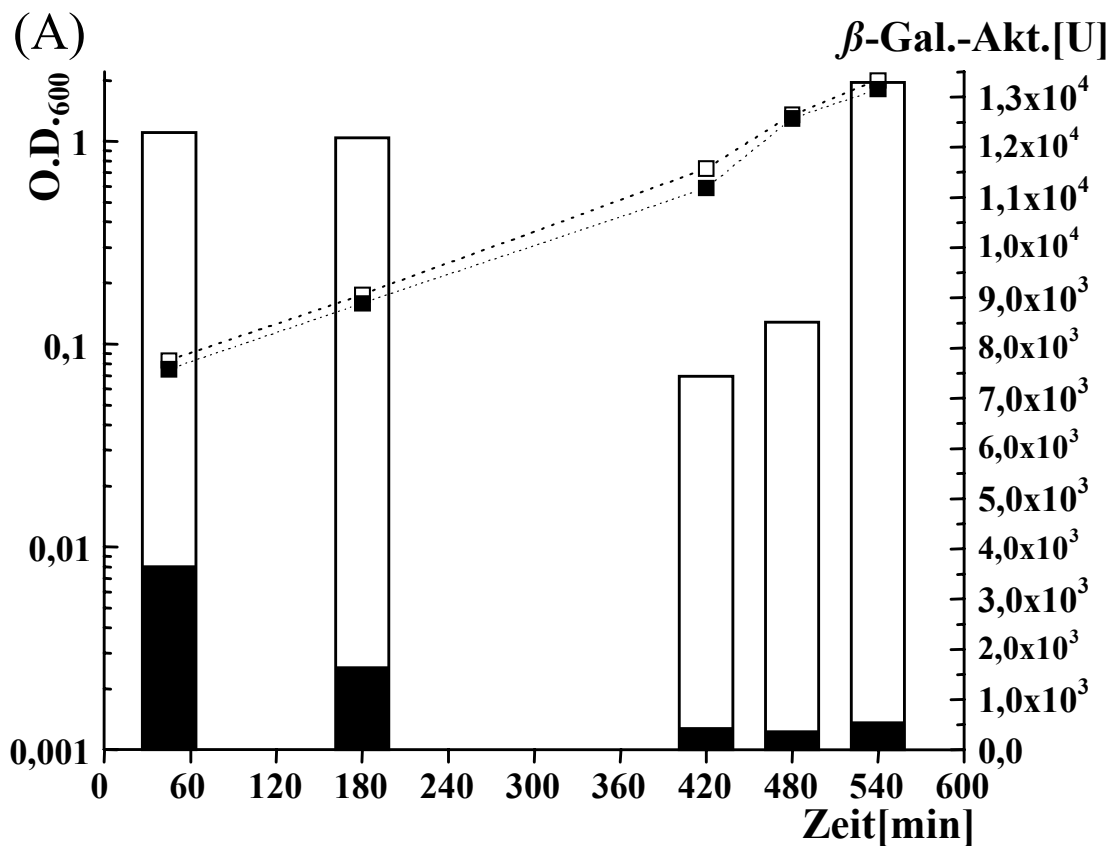
Die Abbildungen **4.10.2-1** und **4.10.2-2** zeigen die Resultate der Wachstums- und  $\beta$ -Galaktosidase-messungen. Die in den Abbildungen **4.10.2-1** und **4.10.2-2** dargestellten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der beiden  $P_{lac}::lacZ$ -Fusionskonstrukte zeigen jeweils deutlich sichtbare Aktivitätsunterschiede in An- bzw. Abwesenheit des Regulators PepR1. Vergleicht man die in **4.10.2-1 A** und **B** von  $P_{lac1}$ (pMCPlac1) und  $P_{lac2}$  (pMCPlac2) ausgehenden Aktivitäten, so ist erkennbar, daß die Änderungen der Aktivitäten bei beiden Konstrukten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von PepR1 einen ähnlichen Verlauf nehmen. Hierbei liegen die Aktivitäten des Konstruktes  $P_{lac1}::lacZ$  (pMCPlac1) in An- (pFNP13) bzw. Abwesenheit von *pepR1* (pFN476) in einem Bereich von 600 und 4.000 Units, während sich die Aktivitäten von  $P_{lac2}::lacZ$  (pMCPlac2) zwischen 8.000 und 20.000 Einheiten bewegen. Deshalb ist davon auszugehen, daß es sich bei  $P_{lac2}::lacZ$  um das Promotorkonstrukt handelt, welches bereits ohne *trans*-Beeinflussung durch PepR1 die höhere Promotoraktivität besitzt. Zu Beginn der Messreihen (lag- bzw. früh-exponentielle Wachstumsphase) besaßen alle Doppeltransformanten-Kombinationen bereits entsprechend hohe Aktivitäten, die dann in der Mitte des exponentiellen Wachstums mehr oder weniger stark abfielen um im spät-exponentiellen bis stationären Bereiches des Wachstums wieder auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Hierbei wurde die von  $P_{lac1}$  ausgehende Aktivität in Anwesenheit des Regulators PepR1 am stärksten beeinflusst. Ihre Aktivität lag im exponentiellen Wachstumsbereich der Kultur von CM89(pMCPlac1/pFNP13) im Vergleich zu CM89(pMCPlac1/pFN476) um einen Faktor

**Abb. 4.10.2-1 Einfluß von PepR1 auf die Expression der beiden  $P_{lac}::lacZ$ -Konstrukte in Doppeltransformanten von in LB-Medium wachsenden *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ).** Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ( $\beta$ -Gal.-Akt [U], Balken) der Kulturen, welche entweder **(A)** die Plasmide pMCPlac1 ( $P_{lac1}::lacZ$ ) und pFN476 (■, ■) oder pMCPlac1 und pFNP13 (*pepR1*<sup>+</sup>) (□, □) bzw. **(B)** pMCPlac2 ( $P_{lac2}::lacZ$ ) und pFN476 (■, ■) oder pMCPlac2 und pFNP13 (*pepR1*<sup>+</sup>) trugen (□, □).

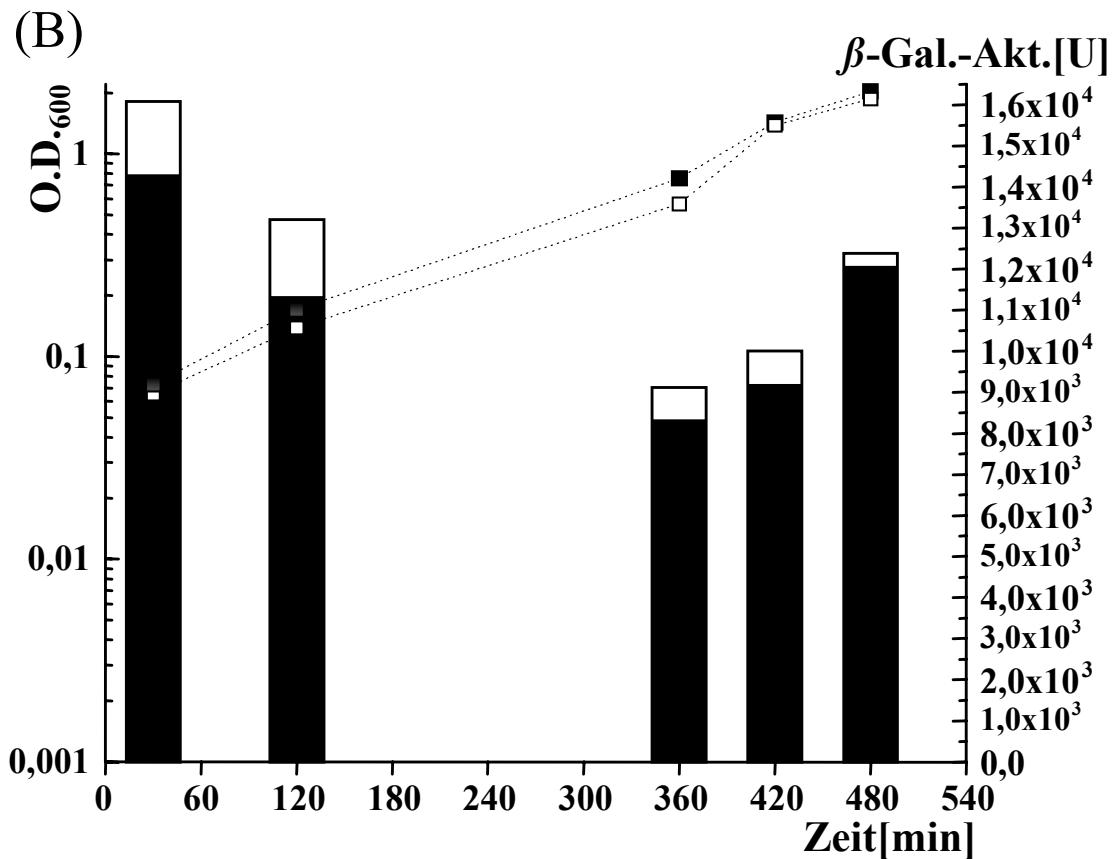


von zwei höher, während die Aktivierung von CM89(pMCPlac2/pFNP13) gegenüber CM89(pMCPlac2/pFN476) im selben Bereich (320 min) lediglich ein Maximum von 1,25 erreichte. Es zeigte sich also, daß die nur ein *cre* enthaltende  $P_{lac1}$ -Translationsfusion mit dem *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidasegen bei Anwesenheit von PepR1 erkennbar aktiviert wird, während die Anwesenheit des Regulators bei dem zwei *cre* tragenden Promotor  $P_{lac2}$  nur leicht aktivierenden Einfluß besitzt.

Um einen möglichen Glukose-Effekt sichtbar zu machen, wurde dem LB-Medium in einer zweiten Versuchsreihe zusätzlich zu der im Hefeextrakt des Mediums bereits enthaltenen geringen Menge an Glukose noch 0,5 % Glukose zugefügt. Die Abbildungen 4.10.2-2 A und B zeigen die Resultate dieser Wachstums- und  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen. Vergleicht man die Aktivitäten von  $P_{lac1}$  den vergleichbaren Aktivitätsverläufen auch deutliche Unterschiede erkennen. Die Aktivitäten des



**Abb. 4.10.2-2** Einfluß von PepR1 auf die Expression der beiden  $P_{lac}::lacZ$ -Konstrukte in Doppeltransformanten von in LB-Medium mit 0,5 % Glukose wachsenden *E. coli* CM89 ( $\Delta lac$ ). Dargestellt sind das Wachstum (O.D.<sub>600</sub>, gestrichelte Linien) und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ( $\beta$ -Gal.-Akt [U], Balken) der Kulturen, welche entweder (A) die Plasmide pMCPlac1 ( $P_{lac1}::lacZ$ ) und pFN476 (■, ■) oder pMCPlac1 und pFNP13 (*pepR1*<sup>+</sup>) (□, □) bzw. (B) pMCPlac2 ( $P_{lac2}::lacZ$ ) und pFN476 (■, ■) oder pMCPlac2 und pFNP13 (*pepR1*<sup>+</sup>) trugen (□, □). Die Zahlen unterhalb der Grafik repräsentieren die durch Balken abgebildeten gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Kulturen.



Konstruktes  $P_{lac1}::lacZ$  (pMCPlac1) lagen bei Wachstum der Kultur in LB-Medium mit 0,5 % Glukose in An- (pFNP13) bzw. Abwesenheit von *pepR1* (pFN476) in einem Bereich zwischen 400 und 13.000 Units, während sie sich beim vorangegangenen experimentellen Ansatz mit LB-Medium ohne Glukose zwischen 600 und 4.000 Units bewegten. Die Aktivitäten von  $P_{lac2}::lacZ$  (pMCPlac2) unterschieden sich weniger stark von denen in **Abb. 4.10.212 B**, sie lagen zwischen 8.000 und 16.000 Einheiten. Auch die bei Vorliegen von *pepR1* in *trans* messbare größte Aktivierung war bei diesem zweiten Untersuchungsansatz für  $P_{lac1}$  von der Mitte des exponentiellen Wachstums zur früh-stationären Wachstumsphase hin verschoben. Die Aktivität bei CM89(pMCPlac1/pFNP13) von 13.287 lag hier verglichen mit 563 Units bei CM89(pMCPlac1/pFN476) um einen Faktor von 24 höher. Die größte Aktivierung von CM89(pMCPlac2/pFNP13) gegenüber CM89(pMCPlac2/pFN476) hingegen lag im Bereich des früh-exponentiellen Wachstums bei einem Faktor von lediglich 1,17.

Während das Konstrukt  $P_{lac1}::lacZ$  (pMCPlac1) in LB-Medium mit Glukose im Vergleich zu den in LB-Medium gewachsenen Kulturen eine 12-fach erhöhte Expression zeigte, konnte dies für  $P_{lac2}::lacZ$  (pMCPlac2) bei einem geringfügig gesunkenen Wert von 1,17 gegenüber 1,25 für die Aktivierung in Anwesenheit von *PepR1* nicht verzeichnet werden. Die beobachtete Verschiebung des Bereiches der größten Aktivitätssteigerung bei Anwesenheit von *PepR1* gestaltete sich für beide Promotorfusionen in unterschiedlicher Weise. Sie erfolgte für  $P_{lac1}$  von der exponentiellen zur früh-stationären Wachstumsphase und für  $P_{lac2}$  vom exponentiellen zum früh-exponentiellen Wachstumsbereich.

Da aus den hier beschriebenen Resultaten für die Expression der zwei Translationsfusionskonstrukte ( $P_{lac1}$ ,  $P_{lac2}$ ) in den beiden unterschiedlichen Medien keine deutliche Schlußfolgerung abzuleiten war, mußte die Hypothese der *cre*-vermittelten transkriptionellen Regulation des *lac*-Promotors durch *PepR1* (*CcpA*) in weiteren Experimenten untersucht bzw. verifiziert werden.

#### 4.10.3 Expression der $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen in *lac*- bzw. *lac*- und *ccpA*-Mutanten von *Staphylococcus xylosus* C2a

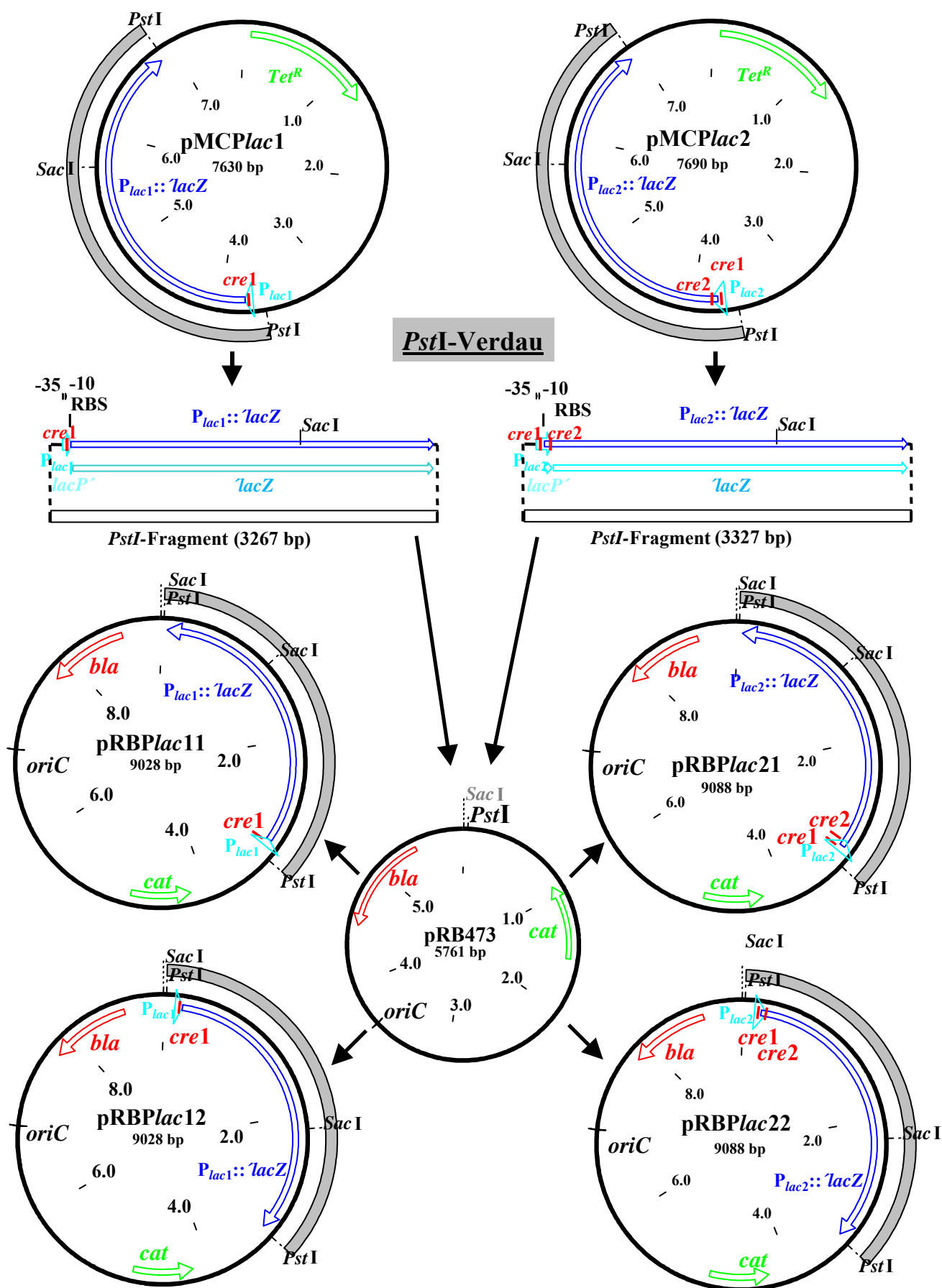
Da *pepR1* aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* den *ccpA*-Defekt einer *Staphylococcus xylosus* C2a-Mutante (Stamm TX154) partiell komplementieren konnte (Kap. 4.5), lag es Nahe für die Verifizierung der unter 4.10.2 gezeigten Resultate, entsprechende *Staphylococcus*-Mutanten zu verwenden. Diese Mutanten, die freundlicherweise von Frau Dr. Ivana Jankovic und Herrn Dr. Reinhold Brückner zur Verfügung gestellt wurden (Jankovic und Brückner, 2001), zeichneten sich durch ein inaktiviertes *lac*-Operon (Stamm TX300) sowie durch die Kombination dieses Genotyps mit einer *ccpA*-knock-out Mutation (Stamm TX600) aus. Diese genotypischen Unterschiede sollten es möglich machen, bei Wachstum in B-Medium ohne und mit Zugabe von Glukose entsprechende CcpA-abhängige Aktivitätsunterschiede der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten zu bestimmen, die von den beiden plasmidkodierten  $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen exprimiert werden.

##### 4.10.3.1 Subklonierung der $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen aus pMCPlac1 und pMCPlac2 in den *Staphylococcus-E. coli*-Shuttle-Vektor pRB473

Zur Expression der translationellen Fusionen des *lac*-Promotors mit dem promotorlosen *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidasegen in den *Staphylococcus xylosus* C2a Mutanten TX300 (*lacR*,  $\Delta$ *lacP*, *lacH*) und TX600 (TX300-Derivat, *ccpA::ermB*) mußten die entsprechenden Fragmente aus pMCPlac1 und pMCPlac2 in den hierfür geeigneten Vektor pRB473 (Brückner, 1992) umkloniert werden.

Zur Subklonierung von  $P_{lac1}::lacZ$  (pMCPlac1) und  $P_{lac2}::lacZ$  (pMCPlac2) in pRB473 (Brückner, 1992; siehe Abb. 4.10.3.1-1) wurde bei pMCPlac1 ein *PstI*-Fragment der Größe 3267 bp und bei pMCPlac2 ein entsprechendes Fragment von 3327 bp Länge ausgeschnitten und in den mit *PstI* restringierten Vektor pRB473 inseriert (siehe Abb. 4.10.3.1-1). Der Ligationsansatz sowie ein Kontrollansatz, der nur den geschnittenen und religierten Vektor alleine enthielt, wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Analyse der aus den *E. coli*-Transformanten isolierten Plasmide auf einem 0,8%igen Agarose-Gel zeigte, daß bei beiden Ligationsansätzen mindestens acht von zwölf der aus den entsprechenden Transformanten der Ligationsansätze stammenden Plasmide gegenüber dem Ausgangsvektor vergrößert waren. Von den vergrößerten Plasmiden des Ligationsansatzes

**Abb. 4.10.3.1-1 Konstruktion der Plasmide pRBPlac11 bzw. pRBPlac12 und pRBPlac21 bzw. pRBPlac22.** Die Abbildung zeigt die Schritte zur Insertion der beiden 3267 bp und 3327 bp großen *PstI*-Fragmente aus pMC1871 (pMCPlac1 bzw. pMCPlac2) mit den  $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen in jeweils zwei Orientierungen in den Shuttle-Vektor pRB473 (Brückner, 1992). Gezeigt sind die Größen der Ausgangsplasmide, der klonierten Fragmente und der resultierenden Plasmide sowie die relevanten Sequenzbereiche, (Resistenz-) Gene und Restriktionsschnittstellen. Vom Vektor pRB473 und den resultierenden Plasmiden sind nur die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen (*PstI*, *SacI*) angegeben. *bla*,  $\beta$ -Lactamase-Gen; *cat*, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen; *Tet<sup>R</sup>*, Tetracyclin-Resistenzmarker; *lacZ'*, promotorloses *lacZ*-Gene; *oriC*, Plasmidreplikationsursprung; RBS, Ribosomenbindestelle; *cre1* bzw. *cre2*, catabolite responsive element 1 bzw. 2;  $P_{lac}::lacZ$ , translationelle Fusion des Promotors des *lac*-Operons von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 mit dem promotorlosen *lacZ*-Gen aus *E. coli*.





konnte durch Restriktion mit dem zweifach schneidenden Restriktionsenzym *Pst*I das Vorhandensein des jeweils gewünschten Inserts kontrolliert werden. Da die Klonierung ungerichtet erfolgte, mußte mit der einmal im klonierten Fragment sowie einmal im Ausgangsvektor schneidenden Restriktionsendonuklease *Sac*I, durch die bei den unterschiedlichen Richtungen der Insertion sich ergebenden unterschiedlichen *Sac*I-Fragmentgrößen (siehe **Tab. 4.10.3.1-1**), die jeweilige Orientierung des Inserts im resultierenden Plasmid festgestellt werden.

Kloniertes Fragment / Größe (bp)	Orientierung siehe 4.10.3.1-1	Plasmid	Größen der <i>Sac</i> I-Fragmente (bp)
<i>P<sub>lac1</sub>::lacZ-Pst</i> I-Fragment (3267)	gg. Uhrzeigersinn	pRB <i>Plac</i> 11	7841 1187
	mit Uhrzeigersinn	pRB <i>Plac</i> 12	6882 2146
<i>P<sub>lac2</sub>::lacZ-Pst</i> I-Fragment (3267)	gg. Uhrzeigersinn	pRB <i>Plac</i> 21	7901 1187
	mit Uhrzeigersinn	pRB <i>Plac</i> 22	6882 2206

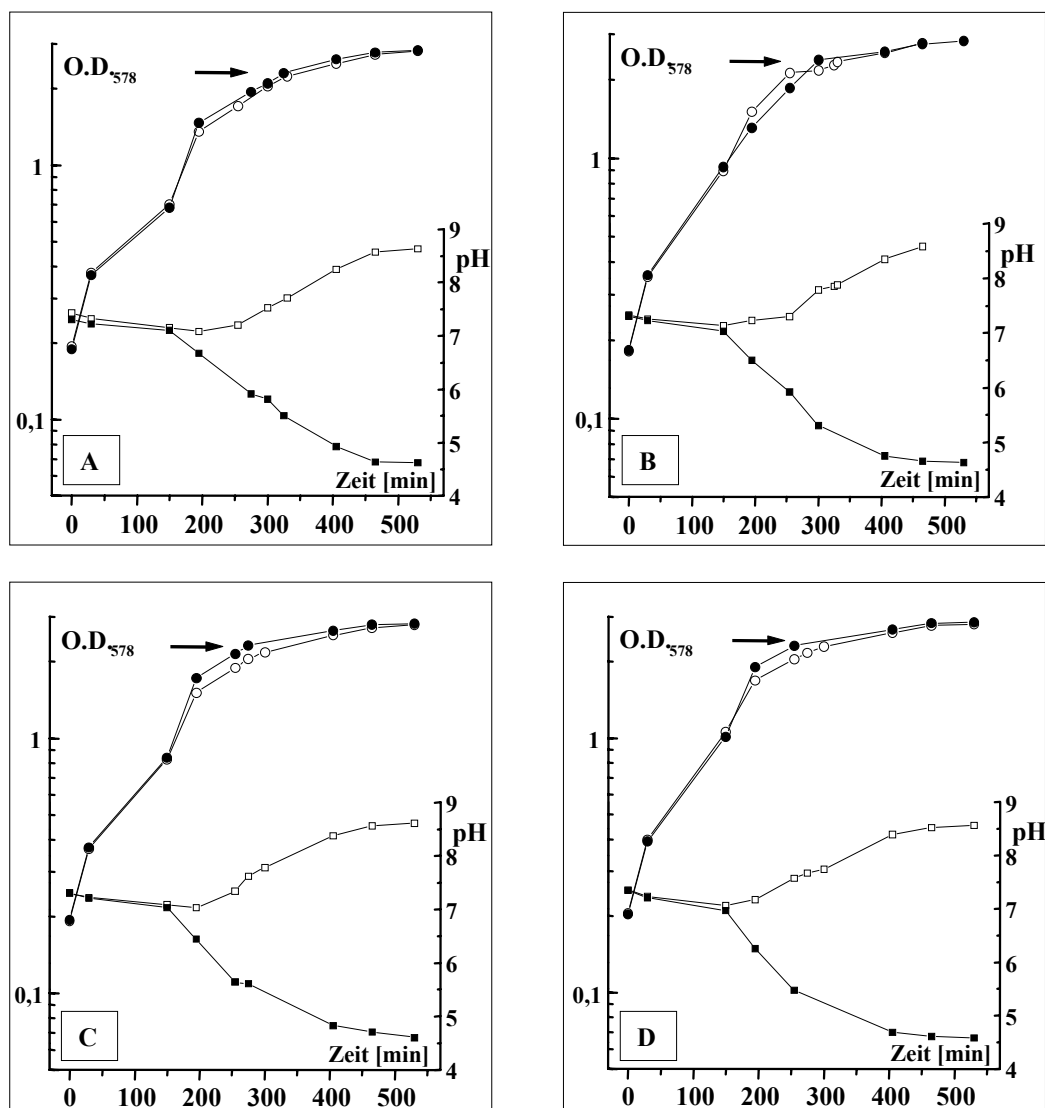
**Tab. 4.10.3.1-1** Größen der *Sac*I-Restriktionsfragmente in den resultierenden Plasmiden der Klonierung von *P<sub>lac1</sub>::lacZ* bzw. *P<sub>lac2</sub>::lacZ* in pRB473.

Für die beiden zu klonierenden Fragmente konnten jeweils mindestens zwei Klone mit dem gewünschten Insert in beiden möglichen Orientierungen bestätigt werden. Jeweils eines dieser Plasmide, als pRB*Plac*11 und pRB*Plac*12 bzw. pRB*Plac*21 und pRB*Plac*22 bezeichnet, wurde nach Re-Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt, erneut durch Restriktionsanalyse überprüft und in die weiteren Experimente eingesetzt.

#### 4.10.3.2 Plasmidkodierte Expression der beiden *lacZ*-Fusionen des *lac*-Promotors aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* in *Staphylococcus xylo*sus TX300 und TX600

Für die Expressionsstudien mit den *lac* knock-out Mutanten TX300 (*lacP*,  $\Delta$ *lacH*, *lacR*) und TX600 (TX300-Derivat, *ccpA::ermB*) von *S. xylo*sus C2a wurden die Plasmide pRB*Plac*11 bzw. pRB*Plac*12 und pRB*Plac*21 bzw. pRB*Plac*22, deren Konstruktion in Abb. 4.10.3.1-1 dargestellt ist, verwendet. Sie wurden durch Elektroporation in elektrokompente Zellen von TX300 und TX600 transformiert. Als Kontrollansätze für die weiteren Experimente dienten sowohl Transformanten von TX300 als auch von TX600 mit dem Vektor pRB473. Bei der Elektroporation konnten nur für pRB*Plac*11 und pRB*Plac*21 nicht aber für pRB*Plac*12 und pRB*Plac*22 Transformanten erhalten werden. Zur Durchführung der  $\beta$ -Galaktosidase-Assays wurde B-Medium mit den nötigen Antibiotikazusätzen versehen, dieses mit jeweils einer gut gewachsenen Einzelkolonie der zu vergleichenden Klone beimpft und Übernachtskulturen bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die gut bewachsenen Kulturen wurden dann am nächsten Morgen in frisches, alle nötigen Antibiotika-Zusätze enthaltendes B-Medium, welches entweder mit 0,5% Glucose oder nicht supplementiert war, zu einer optischen Dichte von 0,15 beimpft. Die Kontrollen von TX300 und TX600 mit dem Vektor pRB473 wurden nicht angezogen, da bei Ihnen, wie Vorversuche zeigten, keine spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt werden konnten.

Die Kulturen wurden durch Messung der  $O.D._{578}$  und des pH-Wertes des Kulturmediums verfolgt. Die Resultate der  $O.D.$ - und pH-Messungen sind in **Abb. 4.10.3.2-1 A-D** dargestellt. Parallel zur Messung der optischen Dichte wurden den Kulturen auch Aliquots für Plasmidminipräparation zur Plasmidkontrolle entnommen. Bei einer  $O.D._{578}$  von ca. 2,2 wurden 40 ml-Aliquots der Kulturen geerntet, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Herstellung zellfreier Extrakte aufbewahrt.



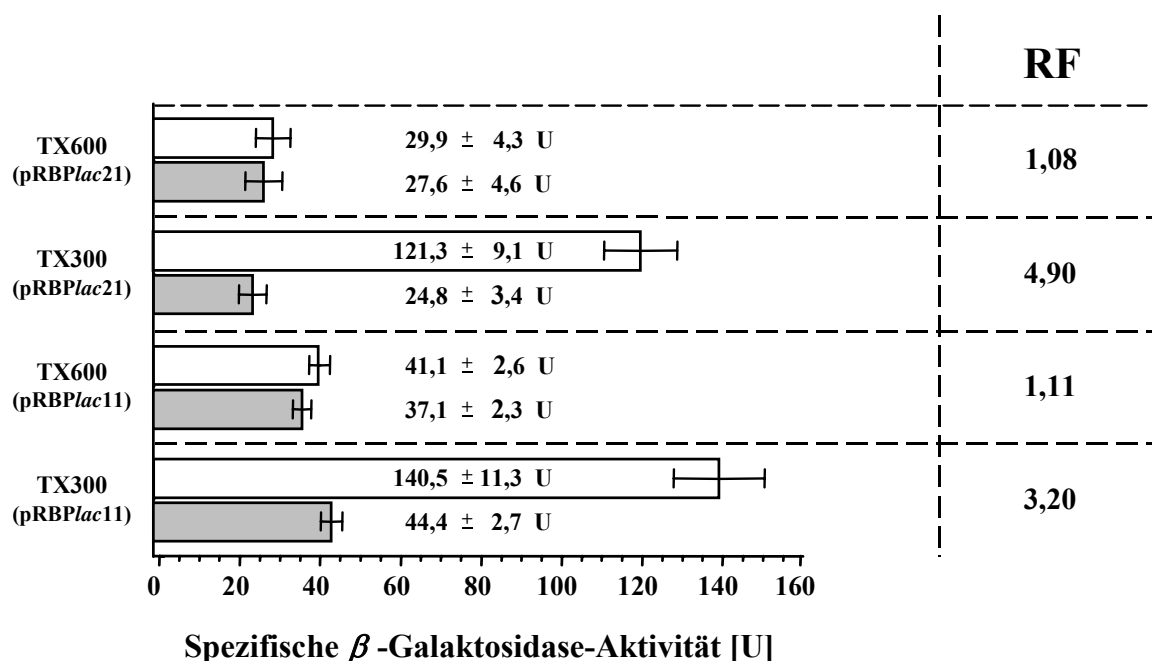
**Abb. 4.10.3.2-1** Wachstumsverhalten von *S. xylosus* TX300(pRBPlac11) [A], TX300(pRBPlac21) [B]; TX600(pRBPlac11) [C] und TX600(pRBPlac21) [D].

Änderungen der optischen Dichten ( $O.D._{578}$ ) in Wachstumskurven von Kulturen in B-Medium ohne zusätzliche C-Quelle (○) bzw. versetzt mit 0,5% (25 mM) Glukose (●). Die pH-Werte der Kulturen ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle sind mit □, bei Glukose enthaltenden Kulturen durch ■ gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte, bei denen Aliquots der Kulturen für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den nachfolgenden Messungen (siehe 4.10.3.3) geerntet wurden.

Die Auswertung der Wachstums- und pH-Wertkurven in **Abb. 4.10.3.2-1** zeigte, daß alle Kulturen ein annähernd gleiches Wachstumsverhalten aufwiesen. Die entsprechenden Kulturen in B-Medium mit 0,5 % Glukose wuchsen etwas schneller und zu höheren End-O.D.-Werten und säuerten das Medium während des Wachstum an, während die Kulturen in B-Medium ohne gesondert zugegebene Glukose das Medium alkalisierten.

#### 4.10.3.3 Bestimmung der Aktivitäten der $P_{lac}$ -Translationsfusionen mit dem *E.coli-lacZ*-Gen in den Stämmen *S. xylosus* TX300 und TX600

Um nun zu zeigen, ob die Expression der  $P_{lac}::lacZ$ -Fusionen einer Glukose-abhängigen CcpA-spezifischen Regulation unterliegt, wurden von den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Zellpellets der acht Vergleichskulturen (siehe Kap. 4.10.3.2) zellfreie Extrakte hergestellt und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bei Einsatz von 150  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Reaktionsansatz bestimmt. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten und ihre Abweichungen sind zusammen mit den errechneten Repressionsfaktoren in **Abb. 4.10.3.3-1** dargestellt.



**Abb. 4.10.3.3-1** Expression von  $P_{lac}::lacZ$ -Fusionen in den *Staphylococcus xylosus* C2a Mutanten TX300 und TX600. Die angegebenen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten und die Abweichungen repräsentieren die Resultate von wenigstens drei unabhängigen Messungen. Die Repressionsfaktoren (RF) stellen das berechnete Verhältnis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen mit zellfreien Extrakten (150  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Reaktionsansatz) aus Kulturen dar, die in B-Medium ohne ( $\square$ ) bzw. mit 25 mM Glukose ( $\blacksquare$ ) gewachsen waren, dar.

Wie man in der Abbildung **4.10.3.3-1** sehen kann, wiesen die Extrakte des Stammes TX300 mit den Plasmiden pRBPlac11 oder pRBPlac21 in B-Medium mit 140,5 beziehungsweise 121,3 Einheiten die höchsten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten auf. Die entsprechenden Aktivitäten in B-Medium mit 0,5 % Glukose lagen bei 44,4 respektive 24,8 Units. Hieraus ergab sich für TX300(pRBPlac11) ein Repressionswert von 3,2, für TX300(pRBPlac22) ein Repressionsfaktor von 4,9 für die Glukose-vermittelte Repression der jeweiligen  $P_{lac}::'lacZ$ -Translationsfusion. Hierbei wies die Fusion der 152 bp großen, ein *cr*-Element aufweisenden Promotorregion  $P_{lac1}$  mit dem *'lacZ*-Gen aus *E. coli* gegenüber der 212 bp großen, zwei *cr*-Elemente aufweisenden  $P_{lac2}::'lacZ$ -Translationsfusion die höhere Aktivität auf.  $P_{lac2}$  zeigte mit 4,9 allerdings einen, verglichen mit 3,2 von  $P_{lac1}$ , höheren Repressionsfaktor. Diese stärkere Repression könnte auf die kooperative Wirkung der beiden *cre* von  $P_{lac2}$  zurückzuführen sein.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von TX600 (*ccpA*<sup>-</sup>) lagen mit 41,1 bei pRBPlac11 bzw. 29,9 bei pRBPlac21 in B-Medium um einen Faktor 3,5 bis 4 niedriger als die vergleichbaren Aktivitäten von TX300. Die errechneten Repressionsfaktoren im Vergleich zu den Aktivitäten in B-Medium mit Glukose betragen lediglich 1,11 beziehungsweise 1,08, was bedeutete, daß in der *ccpA*-Mutante keine funktionelle Glukose-vermittelte Repression über CcpA mehr verfügbar war. Die insgesamt erniedrigten Aktivitäten bei TX600 im Vergleich zu TX300 in B-Medium sind allerdings auffällig, sie lassen sich vermutlich nicht durch die Inaktivierung der CcpA- und Glukose-vermittelten Repression erklären.

#### **4.10.4 Expression der $P_{lac}::'lacZ$ -Translationsfusionen im *Lactococcus lactis* Wildtyp MG1363 und der MG1363 *pepRI-pepQ*-Mutante (MG1363 *QR*<sup>-</sup>)**

Um die Analysen der vorangegangenen Kapitel (**4.10.2** und **4.10.3**) bezüglich der CcpA-spezifischen Regulation um Daten aus einem weiteren Gram-positiven Organismus zu erweitern sowie um mögliche Auswirkungen, des Regulators der Laktoseverwertungsgene, LacR, mit einzubeziehen, sollten nun zu den *Staphylococcus*-Experimenten des vorangegangenen Abschnitts analoge Untersuchungen in den *Lactococcus lactis* Stämmen MG1363 sowie der MG1363 *ccpA-pepQ*-Doppelmutante (MG1363 *QR*<sup>-</sup>) (Eshuis und Hellendoorn, persönliche Mitteilung; 1997) unternommen werden. Sowohl der Stamm *Lactococcus lactis* MG1363 als auch die Mutante MG1363 *QR*<sup>-</sup> wurden freundlicherweise von M. Hellendoorn und Dr. G. Buist zur Verfügung gestellt. Die in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* und auch in der Subspezies *bulgaricus* anzutreffende chromosomale Organisation von *pepRI* (oder *ccpA*) und *pepQ* (vgl. **Abb. 4.1-1**, Kap. **4.1**) findet sich in dieser Form auch in *Lactococcus lactis* MG1363. Bei MG1363 *QR*<sup>-</sup> handelt es sich um eine Doppelmutante, in der die gemeinsame Promotorregion sowie jeweilige 5'-Genbereiche der divergierend angeordneten Gene *pepRI* (bzw. *ccpA*) und *pepQ* deletiert sind. Richtigerweise müßte diese Mutante als *ccpA*<sup>-</sup> und *pepQ*<sup>-</sup> (MG1363*ccpA*<sup>-</sup>*pepQ*<sup>-</sup>) bezeichnet werden. Da die Bezeichnungen *ccpA* und *pepRI* in Anbetracht der Homologien der Gene und ihrer abgeleiteten Genprodukte synonym verwendbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit der ursprünglich für diese Mutante vergebene Name MG1363 *QR*<sup>-</sup> beibehalten.

Die Gene für die Laktoseverwertung und ihrer Regulation sind bei verschiedenen *Lactococcus*-Stämmen, wie zum Beispiel MG1363, nicht chromosomal kodiert, sondern befinden sich auf dem sogenannten Protease-Laktose-Plasmid pLP712. Deshalb befand sich pLP712 für die nachfolgenden Experimente sowohl in MG1363 als auch in MG1363 *QR*<sup>-</sup>.

#### 4.10.4.1 Konstruktion des *Lactococcus-E. coli*-Shuttle-Vektors pUK101

In Ermangelung geeigneter stabiler Vektoren, mußte in Vorbereitung der nachfolgend beschriebenen Klonierungen und Expressionsstudien zuerst ein verfügbarer Vektor (pNZ8020) modifiziert und stabilisiert werden. Die Konstruktion des Expressionsvektors pUK101 erfolgte auf Basis des Vektors pNZ8020 (de Ruyter *et al.*, 1996), welcher freundlicherweise von Dr. Oscar Kuipers (NIZO) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Plasmid basiert auf dem *Lactococcus*-Replicon pSH71 (Gasson, 1983) und beherbergt den durch das Lantibiotikum Nisin induzierbaren Promotor des *nisA*-Genes ( $P_{nisA}$ ), gefolgt vom 5'-Ende dieses Genes. Bei pSH71 handelt es sich um ein Replikon, welches nach dem  $\sigma$ -Modus – auch **Rolling Circle Mode of Replication (RCR)** genannt – repliziert. Aufgrund von Studien, die in *Bacillus subtilis* durchgeführt wurden, war bekannt, daß Plasmide die nach dem RCR-Mechanismus replizieren ein hohes Maß sowohl an struktureller als auch an segregationseller Instabilität aufweisen, welche in der Natur des Replikationsmechanismus durch die Bildung von Einzelstrangintermediaten begründet liegt (Gasson und de Vos, 1994). Weiterhin war bekannt, daß ein starkes Durchlesen der RNA-Polymerase in den Replikationsorigin von Plasmiden zu deren Destabilisierung führt (Platteeuw *et al.*, 1996). Deshalb bestand die Notwendigkeit zur Stabilisierung des Plasmides durch einen Terminator. Zu diesem Zweck wurde der Terminator des *brnQ* Genes von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ausgewählt. Dieser als  $T_{brnQ}$  bezeichnete starke, Rho-unabhängige transkriptionelle Terminator (Stucky *et al.*, 1995b) wurde subkloniert, um ein von den klonierten Sequenzbereichen ausgehendes Fortschreiten der Transkription in die Replikationsregion des Vektors zu verhindern. Zur Klonierung in pNZ8020 wurde  $T_{brnQ}$  zunächst als 193 bp großes Fragment vom Plasmid pKS1 (Stucky *et al.*, 1995b) mit der ULTma-Polymerase unter Verwendung des Primerpaares *XbaI*-/*XhoI*-*T-brnQ* (s. Anhang, **Tab. 7.1-1**) amplifiziert und nach Restriktion der künstlich eingeführten *XbaI*-/*XhoI*-Schnittstellen als Fragment von 183 bp Größe gerichtet in die korrespondierenden Schnittstellen des Vektors pNZ8020 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pUK100 genannt (siehe **Abb. 4.10.4.1-1**). Der Vektor pUK100 wurde für die weitere Modifikation im Rahmen dieser Arbeit freundlicherweise von Dr. Udo Wegmann (Wegmann, 2000) zur Verfügung gestellt. Der Shuttle-Vektor pUK101 schließlich entstand aus pUK100 durch die Deletion eines 354 bp großen *BspMI*/*BamHI*-Fragmentes von pUK100, auf welchem der Promotor von *nisA* ( $P_{nisA}$ ) liegt (**Abb. 4.10.4.1-1**). Die Deletion des *BspMI*/*BamHI*-Sequenzabschnittes bei pUK101 wurde durch Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung mit den Primern **delnis-uni** und **pnis-rev** (Primersequenzen siehe Anhang, **Tab. 7.1-1**) bestätigt. Einer der als richtig identifizierten Vektoren wurde für die nachfolgenden Klonierungen eingesetzt.

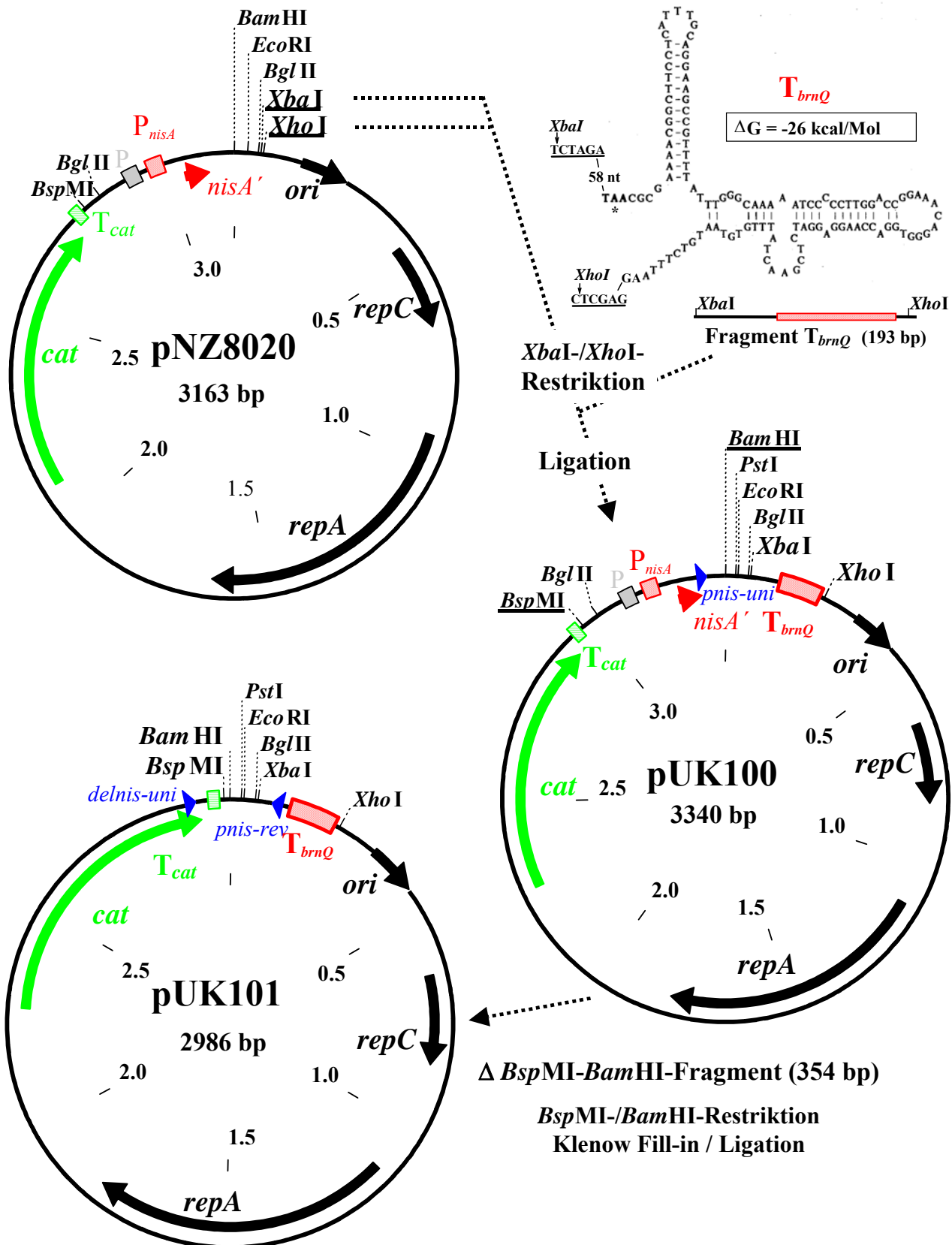


Abb. 4.10.4.1-1 Konstruktion des *E. coli*-*L. lactis* Shuttle-Vektors pUK101 aus den Vorläufern pUK100 und pNZ8020. Gezeigt sind der Ausgangsvektor pNZ8020 (de Ruyter *et al.*, 1996), die resultierenden Plasmide sowie die relevanten Sequenzbereiche, (Resistenz-) Gene und Restriktionsschnittstellen. Vom Vektor pUK101 sind nur die für die Modifikationen relevanten Restriktionsschnittstellen angegeben. *cat*, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen;  $P_{nisA}$  Promotor des 3'-trunkierten *nisA* Genes; *delnis-uni* / *pnis-uni* / *pnis-rev*, Primer zur Sequenzierung von klonierten Fragmenten und zur Überprüfung der  $P_{nisA}$ -Deletion; *ori*, Replikationsursprung; *repA* bzw. *repC*, Gene kodierend für Plasmid-Replikationsproteine;  $T_{cat}$  bzw.  $T_{brnQ}$ , transkriptionelle Terminatoren des *cat* bzw. des *brnQ* Genes.

#### 4.10.4.2 Subklonierung der zwei $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen aus den pMC1871-Derivaten (pMCPlac1 / 2) in den *Lactococcus-E. coli*- Shuttle-Vektor pUK101

Die Subklonierung von  $P_{lac1}::lacZ$  (pMCPlac1) und  $P_{lac2}::lacZ$  (pMCPlac2) in den Vektor pUK101 erfolgte analog der Klonierung der gleichen Fragmente in pRB473 (siehe 4.10.3.1, Abb. 4.10.3.1-1). Bei pMCPlac1 wurde ein 3267 bp großes *PstI*-Fragment und bei pMCPlac2 ein entsprechendes Fragment von 3327 bp Länge ausgeschnitten und in den mit *PstI* restringierten Shuttle-Vektor pUK101 inseriert (siehe Abb. 4.10.4.2-1). Der Ligationsansatz sowie ein Kontrollansatz, der nur den geschnittenen und religierten Vektor alleine enthielt, wurden in *E. coli* JM109 transformiert. Die Analyse der aus den *E. coli*-Transformanten isolierten Plasmide auf einem 0,8%igen Agarose-Gel zeigte, daß bei beiden Ligationsansätzen mindestens fünf von zwölf der aus den entsprechenden Transformanten der Ligationsansätze stammenden Plasmide gegenüber dem Ausgangsvektor vergrößert waren. Von den vergrößerten Plasmiden des Ligationsansatzes konnten durch Restriktion mit dem zweifach schneidenden Restriktionsenzym *PstI* das Vorhandensein des jeweils gewünschten Inserts kontrolliert werden. Da die Klonierung ungerichtet erfolgte, konnte mit der einmal im klonierten Fragment sowie einmal im Ausgangsvektor schneidenden Restriktionsendonuklease *SacI*, durch die bei den unterschiedlichen Richtungen der Insertion sich ergebenden unterschiedlichen *SacI*-Fragmentgrößen (siehe Tab. 4.10.4.1-1) die jeweilige Orientierung des Inserts im resultierenden Plasmid festgestellt werden. Für die

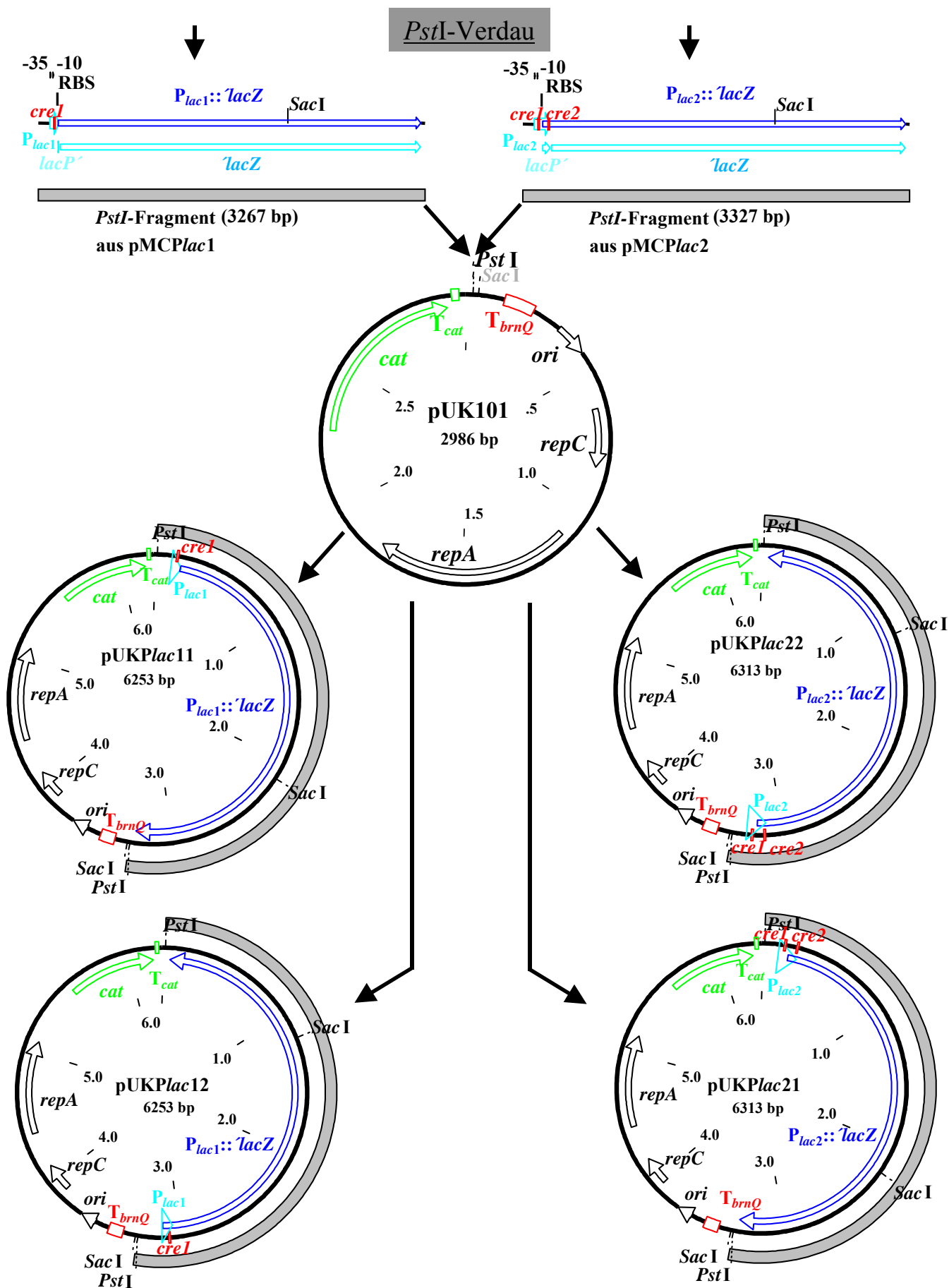
Kloniertes Fragment / Größe (bp)	Orientierung siehe 4.10.4.2-1	Plasmid	Größen der <i>SacI</i> -Fragmente (bp)
$P_{lac1}::lacZ$ - <i>PstI</i> - Fragment (3267)	mit Uhrzeigersinn	pUKPlac11	5081 1172
	gg. Uhrzeigersinn	pUKPlac12	4122 2131
$P_{lac2}::lacZ$ - <i>PstI</i> - Fragment (3267)	mit Uhrzeigersinn	pUKPlac21	5141 1172
	gg. Uhrzeigersinn	pUKPlac22	4122 2191

Tab. 4.10.4.2-1 Größen der *SacI*-Restriktionsfragmente von den resultierenden Plasmiden bei der Klonierung von  $P_{lac1}::lacZ$  bzw.  $P_{lac2}::lacZ$  in pUK101.

beiden zu klonierenden Fragmente konnten jeweils mindestens zwei Klone mit dem gewünschten Insert in beiden möglichen Orientierungen bestätigt werden. Jeweils eines dieser Plasmide, als pUKPlac11

#### Abb. 4.10.4.2-1 Konstruktion der Plasmide pUKPlac11 bzw. pUKPlac12 und pUKPlac21 bzw. pUKPlac22.

Die Abbildung zeigt die Insertion der beiden *PstI*-Fragmente aus pMC1871 (pMCPlac1, 3267 bp; bzw. pMCPlac2, 3327 bp) mit den  $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusionen in jeweils beiden Orientierungen in den Shuttle-Vektor pUK101. Gezeigt sind die klonierten *PstI*-Fragmente, die resultierenden Plasmide sowie die relevanten Sequenzbereiche, (Resistenz-) Gene und Restriktionsschnittstellen. Vom Vektor pUK101 und den resultierenden Plasmiden sind nur die relevanten Restriktionsschnittstellen (*PstI*, *SacI*) angegeben. *cat*, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen; *lacZ*, promotorloses *lacZ*-Gen (*E. coli*); *ori*, Replikationsursprung; *repA* bzw. *repC*, Gene kodierend für Replikationsproteine; RBS, Ribosomenbindestelle; *cre1* bzw. *cre2*, catabolite responsive element 1 bzw. 2;  $P_{lac1}::lacZ$  bzw.  $P_{lac2}::lacZ$ , translationelle Fusionen des Promotors des *lac*-Operons von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 mit dem promotorlosen *E. coli* *lacZ*-Gen;  $T_{cat}$  bzw.  $T_{brnQ}$ , transkriptionelle Terminatoren des *cat* bzw. des *brnQ* Genes.



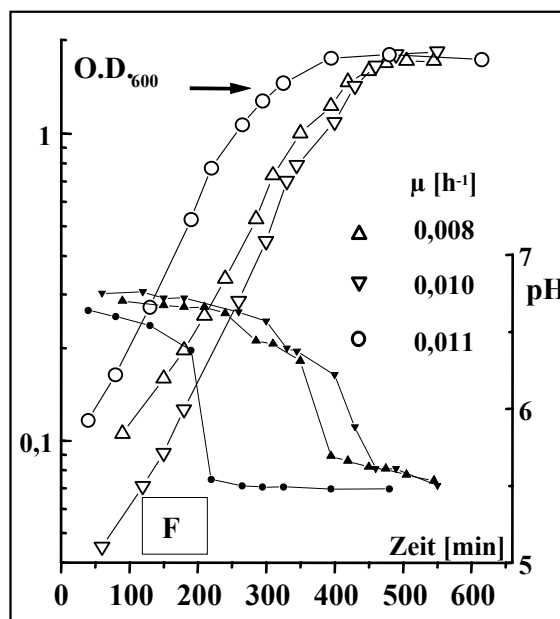
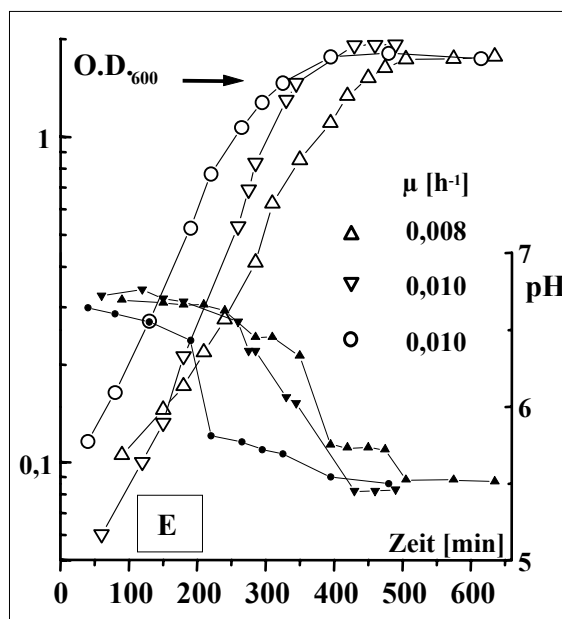
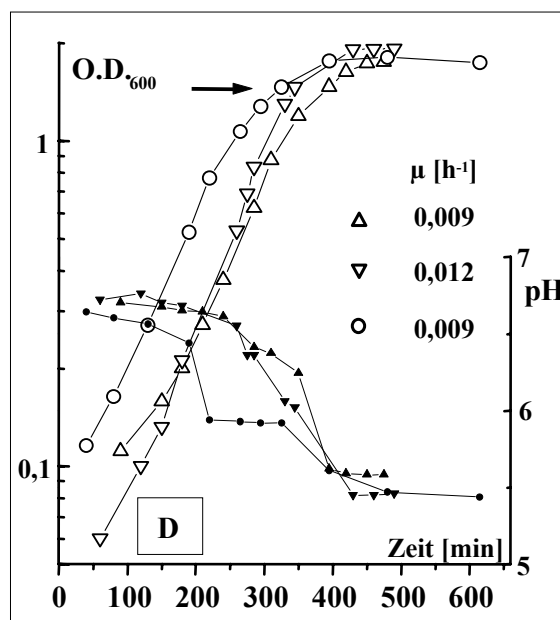
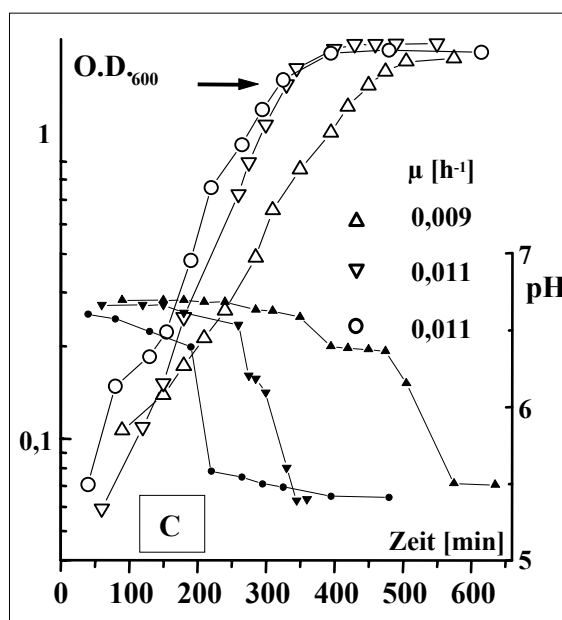
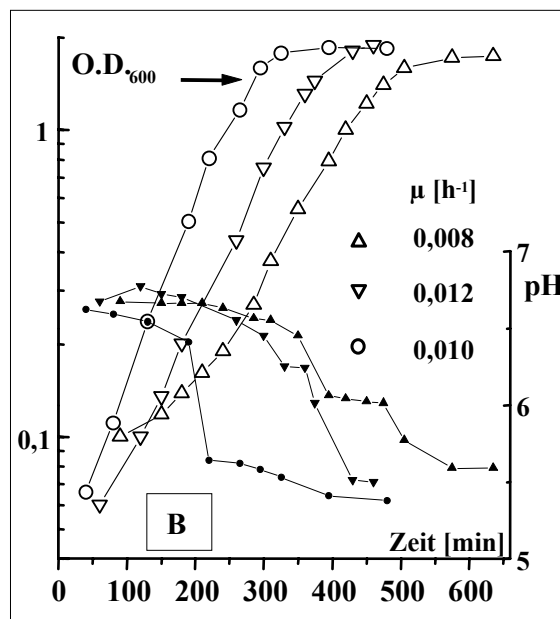
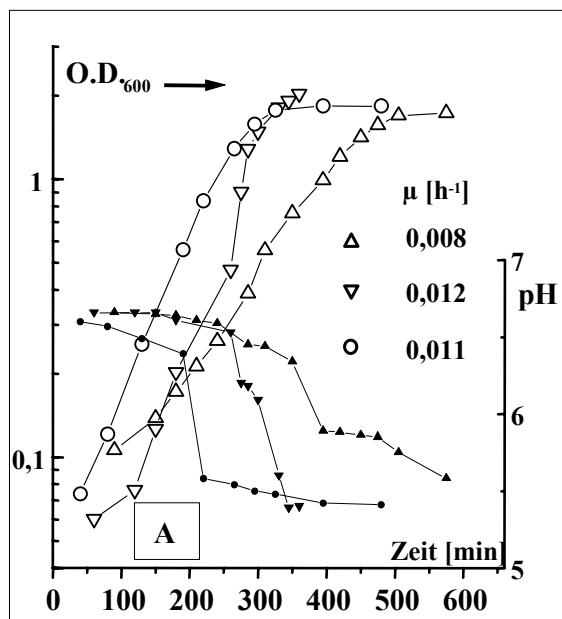


und pUKPlac12 bzw. pUKPlac21 und pUKPlac22 bezeichnet, wurde nach Retransformation in *E. coli* JM109 vermehrt, erneut durch Restriktionsanalyse überprüft und in die weiteren Experimente eingesetzt.

#### 4.10.4.3 Plasmidkodierte Expression der *'lacZ*-Fusionen des *lac*-Promotors aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* in *Lactococcus lactis* MG1363(pLP712) und MG1363 *QR*-(pLP712)

Für die Untersuchungen in den Stämmen *L. lactis* MG1363(pLP712) (*lac*<sup>+</sup>, *ccpA/pepRI*<sup>+</sup>, *pepQ*<sup>+</sup>) und *L. lactis* MG1363 *QR*-(pLP712) (*lac*<sup>+</sup>, *ccpA/pepRI*<sup>-</sup>, *pepQ*<sup>-</sup>) wurden die Plasmide pUKPlac11 bzw. pUKPlac12 und pUKPlac21 bzw. pUKPlac22, deren Konstruktion unter 4.10.4.2 gezeigt ist, verwendet. Sie wurden durch Elektroporation in elektrokompente Zellen von MG1363(pLP712) und MG1363 *QR*-(pLP712), die vorher durch Wachstum auf M17-Medium mit 0,5 % Laktose (M17<sub>Lak.</sub>) und durch den Proteasetest auf die funktionelle Integrität von pLP712 hin überprüft wurden, transformiert. Als Kontrollansätze für die weiteren Experimente dienten sowohl Transformanten von MG1363(pLP712) als auch von MG1363 *QR*-(pLP712) mit dem Vektor pUK101. Bei der Elektroporation konnten trotz einer Transformationseffizienz von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Transformanten/μg eingesetzter pUK101 Plasmid-DNA nur für pUKPlac11 und pUKPlac21, nicht aber für pUKPlac12 und pUKPlac22, Transformanten erzielt werden. Der Grund für das Ausbleiben von Transformanten für diese beiden Plasmide könnte in der Tatsache begründet liegen, daß die Orientierung der P<sub>*lac*</sub>::*'lacZ*-Fusionen bei ihnen gegenläufig zur Orientierung der Replikationsgene und des Replikationsursprungs (siehe Abb. 4.10.4.2-1, resultierende Plasmide pUKPlac2 und pUKPlac22) ist, was bei Expression der P<sub>*lac*</sub>::*'lacZ*-Fusionskonstrukte zu Kollisionen von Plasmidreplikation und Transkription der verschiedenen Fusionen geführt haben könnte. Hierbei könnte es dann zu einer mangelnden Expression der Chloramphenicol-Acetyltransferase, ausgehen vom *cat*-Gen, gekommen sein, was dazu geführt haben könnte, daß die notwendige Resistenz gegen das zugesetzte Antibiotikum Chloramphenicol nicht erreicht wurde.

Zur Durchführung der Wachstumsversuchen und der anschließenden  $\beta$ -Galaktosidase-Assays wurde M17-Medium mit dem nötigen Antibiotikumzusatz (Chloramphenicol, 12,5 μg/ml Endkonzentration) versehen, dieses mit jeweils einer gut gewachsenen Einzelkolonie der zu vergleichenden Klone beimpft und Übernachtskulturen bei 30°C inkubiert. Die gut bewachsenen Kulturen wurden dann am nächsten Morgen in frisches, alle nötigen Zusätze enthaltendes M17-Medium, welches entweder mit 0,5 % Glucose (M17<sub>Gluk.</sub>) oder mit 0,5 % Laktose (M17<sub>Lak.</sub>) bzw. mit 0,5 % Glucose und 0,5 % Laktose (M17<sub>Gluk./Lak.</sub>) supplementiert war, zu einer optischen Dichte bei 600 nm zwischen 0,05 und 0,1 beimpft. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der O.D.<sub>600</sub> und des pH-Wertes des Kulturmediums verfolgt. Die Resultate der O.D.<sub>600</sub>- und pH-Messungen sind in Abb. 4.10.4.3-1 A-F dargestellt. Parallel zur Messung der optischen Dichte wurden den Kulturen auch Aliquots für Plasmidminipräparation zur Kontrolle auf die physische Integrität der Plasmide entnommen. Bei einer O.D. zwischen 1,45 und 1,6 wurden Aliquots der Kulturen geerntet, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Herstellung zellfreier Extrakte mit der Zelmühle (siehe Methodenteil) aufbewahrt.



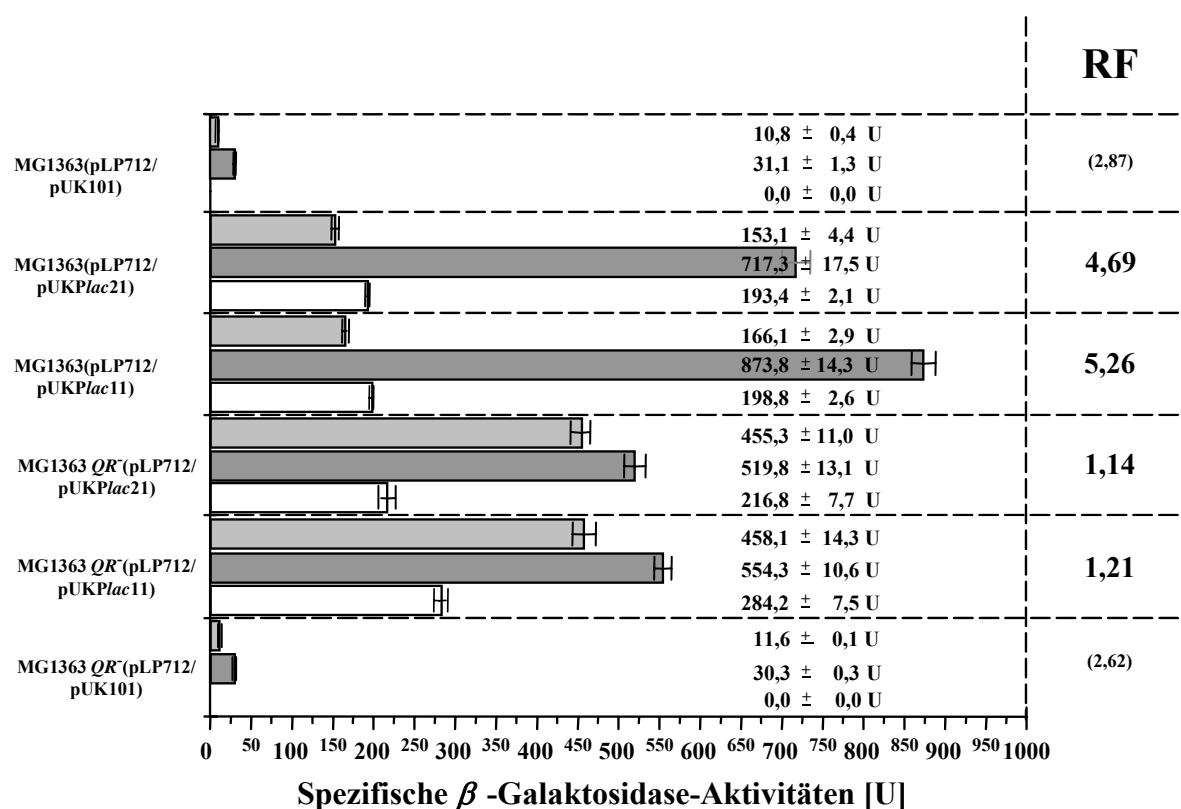
**Abb. 4.10.4.3-1** Wachstumsverhalten von *Lactococcus lactis* MG1363(pLP712) mit pUKPlac11 [A] bzw. pUKPlac21 [B] oder pUK101 [C] sowie MG1363 *QR*<sup>-</sup>(pLP712) mit pUK101 [D] bzw. pUKPlac11 [E] oder pUKPlac21 [F].

Verlauf der optischen Dichten (O.D.<sub>600</sub>) in Wachstumskurven von Kulturen in M17-Medium mit den C-Quellen 0,5% Glukose ( $\Delta$ ) bzw. 0,5% Laktose ( $\nabla$ ) oder 0,5% Glukose plus 0,5% Laktose ( $\circ$ ). Die pH-Werte der Kulturen sind mit den jeweiligen korrespondierenden kompakten Symbolen ( $\blacktriangle$ ,  $\blacktriangledown$ ,  $\bullet$ ) dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte, bei denen Aliquots der Kulturen für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den nachfolgenden Messungen (siehe 4.10.4.4) geerntet wurden.

Die Auswertung der Wachstums- und pH-Wertkurven in **Abb. 4.10.4.3-1 A-F** zeigte, daß alle Kulturen nur geringe Abweichungen hinsichtlich ihres Wachstumsverhalten aufwiesen. Bei allen zeigte sich eine ähnliche Ansäuerung des Mediums in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 6,1. Bezüglich der Wachstumsraten ( $\mu$ ) lagen alle Kulturen in einem Bereich von 0,12 bis 0,08. [h<sup>-1</sup>]. Eine im Durchschnitt geringfügig höhere Wachstumsrate läßt sich bei der Analyse der Teilabbildung (**Abb. 4.10.4.3-1**) und beim Vergleich der entsprechenden Werte für das Wachstum der jeweiligen Kulturen in M17-Medium mit 0,5 % Glukose (M17<sub>Gluk.</sub>) und M17-Medium mit 0,5 % Laktose (M17<sub>Lak.</sub>) erkennen. Hieraus konnte aber keine allgemeingültige Präferenz der verschiedenen Stamm- und Plasmidkombination für die Verwertung eines Zuckers bzw. der Zuckerkombination aus Glukose und Laktose abgeleitet werden.

#### 4.10.4.4 Bestimmung der Aktivitäten der *P*<sub>lac</sub>-Fusionen in Transformanten von *L. lactis* MG1363(pLP712) und MG1363 *QR*<sup>-</sup>(pLP712)

Für die sich anschließende Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten und die Klärung der Frage, ob die Expression der *P*<sub>lac</sub>::*lacZ*-Fusionen in *L. lactis* MG1363 einer C-Quellen-abhängigen CcpA-spezifischen Regulation und möglicherweise einer Beeinflussung ausgehend von LacR aus *L. lactis* unterliegen, wurden von den bei -80°C aufbewahrten Zellpellets der 18 Vergleichskulturen (siehe Kap. **4.10.4.3**) zellfreie Extrakte mit der Zelmühle hergestellt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden bei Einsatz von 100 bis 150  $\mu$ g Gesamtprotein pro Reaktionsansatz bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten und ihre Abweichungen sind zusammen mit den Repressionsfaktoren (RF) in **Abb. 4.10.4.4-1** dargestellt. Bei dem hier angeführten Repressionsfaktor handelt es sich nicht um das einfache Verhältnis der gemessenen Aktivität in Ab- bzw. Anwesenheit eines reprimierenden Zuckers wie beispielsweise der Glukose. Dies war für die Kultivierung von *L. lactis* MG1363 und der MG1363 *QR*<sup>-</sup>-Mutante nicht möglich, da diese Stämme in M17-Medium bzw. in M17-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle bzw. mit 0,5 % Ribose als Zuckerquelle, keine zur Kultivierung in Glukose (M17<sub>Gluk.</sub>) oder Laktose bzw. der Kombination aus beiden Zuckern vergleichbaren Wachstumsraten und entsprechende optische Dichten bei 600 nm erreichten (Daten nicht gezeigt). Die Berechnung erfolgte stattdessen anhand der bestimmten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der jeweiligen Stamm-/Plasmidkombinationen in M17<sub>Lak.</sub> geteilt durch den Messwert in Glukose (M17<sub>Gluk./Lak.</sub>). Wie aus der Abbildung **4.10.4.4-1** zu ersehen ist, wiesen die Extrakte des Stammes MG1313(pLP712) mit den Plasmiden pUKPlac11 oder pUKPlac21 in M17<sub>Lak.</sub>-Medium mit 873,8 beziehungsweise 713,3 Einheiten die höchsten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten auf. Die zugehörigen Aktivitäten in M17<sub>Gluk./Lak.</sub> lagen bei 198,8 und 193,4 Units. Hieraus ergab sich



**Abb. 4.10.4.4-1** Expression der  $\beta$ -Galaktosidase der beiden  $P_{lac}::lacZ$ -Fusionen in den *Lactococcus lactis* Stämmen MG1363(pLP712) und MG1363 QR-(pLP712). Die angegebenen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten und die Abweichungen repräsentieren die Resultate von wenigstens drei unabhängigen Messungen mit zellfreien Extrakten (100-150  $\mu$ g Gesamtprotein pro Reaktionsansatz) aus Kulturen, die in M17-Medium mit 0,5 % Glukose (□), mit 0,5 % Laktose (■) oder mit 0,5 % Glukose plus 0,5% Laktose (■) gewachsen waren. Der Repressionsfaktor (RF) stellt das Verhältnis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der in M17<sub>Lak.</sub> und M17<sub>Gluk./Lak</sub> gewachsenen Kulturen dar.

für MG1363(pLP712/pUKPlac11) ein Repressionsfaktor von 5,26, für MG1363(pLP712/pUKPlac21) ein RF von 4,69 als Wert für die Glukose-vermittelte Repression der jeweiligen  $P_{lac}::lacZ$ -Translationsfusion. Die Fusion der ein *cre* aufweisenden Promotorregion  $P_{lac1}$  mit dem  $lacZ$ -Gen aus *E. coli* wies also gegenüber der zwei *cre* aufweisenden  $P_{lac2}::lacZ$ -Translationsfusion die höheren Aktivitäten und auch den höheren Repressionsfaktor auf. Diese Resultate waren nicht in Übereinstimmung mit den unter 4.10.3.3 ermittelten Ergebnissen aus *Staphylococcus* Mutante TX300, wo  $P_{lac1}$  zwar im Vergleich zu  $P_{lac2}$  sowohl in B-Medium als auch in B-Medium mit Glukose die höheren Aktivitäten, nicht aber den höheren Repressionswert besaß. Der Vergleich der bei *Lactococcus* ermittelten Ergebnisse deutet auch nicht wie bei *Staphylococcus* (Kap. 4.10.3.3) auf eine sich hinsichtlich der Glukose-vermittelten Repression verstärkende Funktion durch die beiden *cre* bei  $P_{lac2}$  hin. Einschränkend kann allerdings angeführt werden, daß bedingt durch ein anderes stammspezifisches genetisches und deshalb auch physiologisches Umfeld und durch eine Berechnungsmethode, die ohne „echten“ Basiswert (M17-Medium ohne Zuckerzusatz) auskommen mußte, die jeweiligen Resultate sowie die abgeleiteten Schlußfolgerungen nicht direkt vergleichbar sind. Die ermittelten Repressionsfaktoren von 1,21 und 1,14 für die *Lactococcus ccpA*-Mutante MG1363 QR-(pLP712) mit pUKPlac11 bzw. mit

pUKPlac21 deuten auf das Fehlen der CcpA-spezifischen Glukose-vermittelten Repression hin. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von MG1363 *QR*-(pLP712) in M17-Medium<sub>Gluk.</sub> lagen mit 284,2 bei pUKPlac11 bzw. 216,8 für pUKPlac21 allerdings in derselben Größenordnung wie die vergleichbaren Aktivitäten von MG1313(pLP712) mit pUKPlac11 (198,8 U) bzw. mit pUKPlac21 (193,4 U). Deutlicher waren die Unterschiede von Wildty-Stamm (MG1363) zu Mutante (MG1363 *QR*-), wie Abbildung 4.10.4.4-1 zeigt, für den Vergleich der Aktivitäten in M17-Medium<sub>Gluk./Lak.</sub>. In diesem Fall waren die Aktivitäten für MG1363 *QR*-(pLP712/ pUKPlac11) verglichen mit MG1363 (pLP712/pUKPlac11) 2,8-fach, für MG1363 *QR*-(pLP712/ pUKPlac21) im Vergleich zu MG1363 (pLP712/pUKPlac21) 3-fach erhöht. Die Aktivitätswerte beim Wachstum der Kulturen in M17<sub>Lak.</sub> waren demgegenüber bei MG1363 *QR*-(pLP712/ pUKPlac11) verglichen mit MG1363 (pLP712/pUKPlac11) 1,6-fach, für MG1363 *QR*-(pLP712/ pUKPlac21) im Vergleich zu MG1363 (pLP712/pUKPlac21) 1,4-fach niedriger. Die für die Kontrollen mit dem Vektor pUK101 in beiden Stämmen (MG1363 (pLP712/pUK101) bzw. MG1363 *QR*-(pLP712/ pUK101)) ermittelten Aktivitäten (siehe **Abb. 4.10.4.4-1**) können als für die Spaltung von ONPG kryptische enzymatische Hintergrundexpression bezeichnet werden, die zwar Laktose- induziert und Glukose-reprimiert erscheint, aber aufgrund der Größenordnung der gemessenen Aktivitäten im Vergleich zu den mit den *Plac*-Translationsfusionen erzielten Resultaten, keine entscheidende Beeinflussung der gezeigten Ergebnisse erwarten läßt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Meßwerte der hier gezeigten Analysen auf eine schwächere Glukose-abhängige Repression von MG1363 *QR*-(pLP712/pUKPlac11) und MG1363 *QR*-(pLP712/pUKPlac21) gegenüber MG1363 (pLP712/pUKPlac11) und MG1363 (pLP712/pUKPlac21) hindeuten. In Zusammenhang mit dieser Schlußfolgerung sind auch die gemessenen, im Vergleich zu MG1363 (pLP712/pUKPlac11) und MG1363 (pLP712/pUKPlacPZ21) höheren,  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von MG1363 *QR*-(pLP712/pUKPlac21) und MG1363 *QR*-(pLP712/pUKPlacPZ21) bei alleinigem Vorhandensein der C-Quelle Laktose zu sehen. Inwieweit diese Beobachtung nur auf die Inaktivierung von PepR1 (bzw. CcpA) bei MG1363 *QR*- zurückgeführt werden kann, oder ob hier auch dem Einfluß durch eine mögliche transkriptionelle Kontrolle der beiden  $P_{lac}$ :*'lacZ*-Konstrukte durch LacR aus *Lactococcus lactis* eine Rolle beizumessen wäre, konnte durch die Resultate nicht abschließend geklärt werden.

---

## V. Diskussion

Ausgehend von vorangegangenen initialen Arbeiten (Stucky, 1995; Stucky *et al.* 1996) zum CcpA-äquivalenten Transkriptionsregulator PepR1 konnte angenommen werden, daß dieses Protein eine übergeordnete und zentrale Stellung bei der globalen zellulären zuckerabhängigen Kontrolle in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 einnimmt. Am Beispiel der Regulation von Peptidase- und Laktoseverwertungsgenen wurde diese Rolle im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Während die Regulation von an der Verwertung verschiedener Zucker beteiligter Gene durch CcpA und seine vorgeschalteten Signaltransduktionskaskade ein gut untersuchtes Feld darstellt (siehe Einleitung, Kap. 1.3) ist die Verbindung von Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus bisher weniger gut untersucht (Ludwig *et al.*, 2002; Wacker *et al.*, 2003)

### 5.1 Die LacI/GalR-Familie bakterieller Regulatoren

Aufgrund der Sequenzhomologien seiner Aminosäure-Primärsequenz kann PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in die LacI/GalR-Familie bakterieller transkriptioneller Regulatoren eingeordnet werden (Stucky *et al.*, 1996; Weickert und Adhya, 1992; Nguyen und Saier, 1995). Für die Regulation der DNA-Bindung werden kleinere Moleküle, wie zum Beispiel Zucker und ihre Stoffwechsel-Intermediate, oder andere Proteine als Kofaktoren benötigt. Meist führt die Bindung des Kofaktors zum Verlust der DNA-Bindfähigkeit und damit Transkription des regulierten Gens oder Operons. Seltener, wie im Falle des ebenfalls zur LacI/GalR-Familie gehörenden PurR aus *E. coli* (Rolfes und Zalkin, 1990) und des CcpA (Gösseringer *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1995) ist die DNA-gebundene Form des Proteins mit anderen Faktoren assoziiert, die folglich als Ko-Repressoren bezeichnet werden. Mit Ausnahme der tetramerbildenden Repressoren LacI, FruR und RafR liegen, soweit bekannt, alle Proteine der Familie als Dimere vor. Die Sequenzähnlichkeit der Proteine erstreckt sich über deren gesamte Proteinsequenz, wobei die Identität im Bereich des N-terminal gelegenen Helix-Turn-Helix-Motivs (HTH-Motiv, HTH) (Brennan und Matthews, 1989; Harrison und Aggarwal, 1990; Wintjens und Rooman, 1996) besonders hoch ist. Deshalb wurde die Existenz einer gemeinsamen ähnlichen Struktur der Proteine dieser Familie postuliert (Weickert und Adhya, 1992).

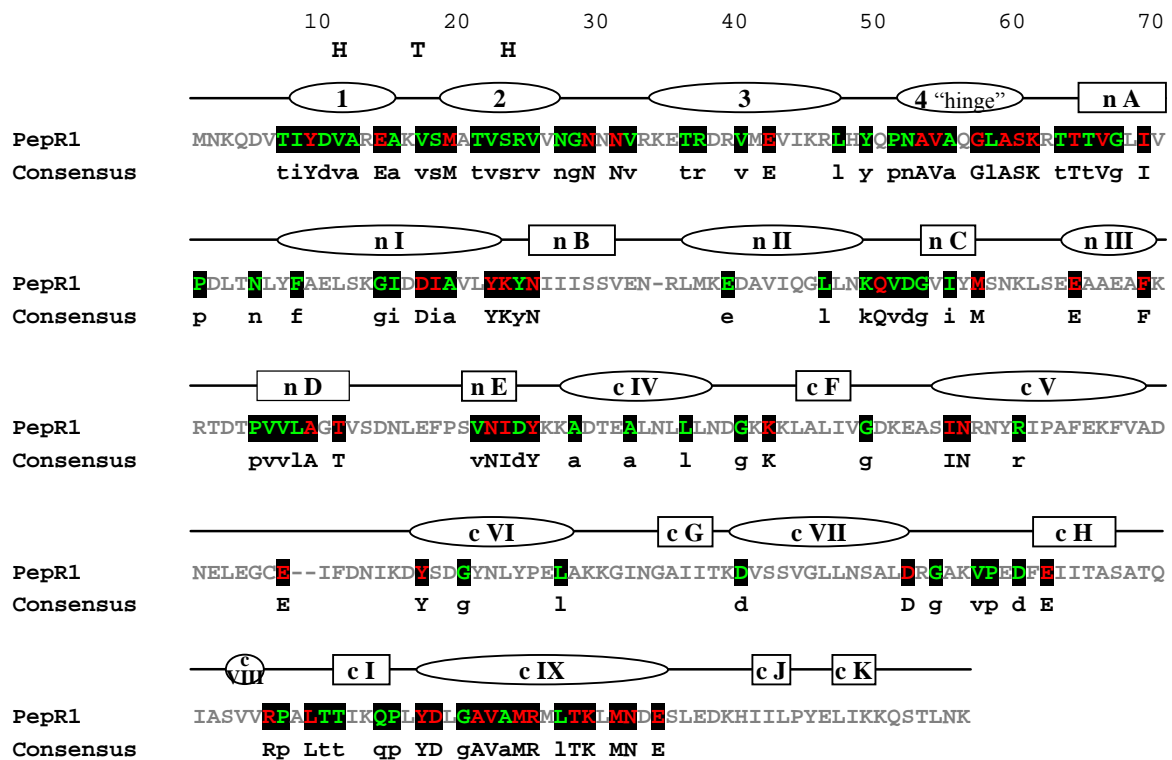
Diese Annahme bestätigte sich nach Auflösung der Kristallstrukturen von PurR (Schumacher *et al.*, 1994) und LacI (Friedman *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996). Beide Proteine bestehen aus einem DNA-Bindekopf, der vier Helices umfaßt, und einem Core-Protein, welches seinerseits in zwei Domänen unterteilt werden kann. Diese Subdomänen bestehen jeweils aus fünf bis sechs parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, um die sich vier bis fünf  $\alpha$ -Helices gruppieren. Der Raum zwischen den Subdomänen wird durch drei Verbindungen überbrückt, wodurch sich eine Tasche ausbildet, in welcher der jeweilige Kofaktor gebunden wird. Im DNA-Bindekopf sind die  $\alpha$ -Helices 1 und 2, die das HTH-Motiv darstellen, und zusätzlich die auch „hinge-helix“ genannte Helix vier an der DNA-Bindung beteiligt. Sieht man von der zusätzlichen Tetramerisierungsdomäne in LacI ab, sind die Strukturen von PurR und LacI, obwohl der Anteil an identischen Aminosäuren mit 26,8 % nicht außergewöhnlich hoch ist, kaum zu unterscheiden. Die Strukturdaten von PurR (Schumacher *et al.*, 1994) dienen vor der Analyse der Kristallstruktur des

*Bacillus megaterium* CcpA (Tebbe *et al.*, 2000), die mit einer Auflösung von 2,55°Å dargestellt wurde, als Grundlage für CcpA-Strukturmodelle. Durch die Auswertung der Daten von kristallisierten CcpA-Monomeren mit und ohne ein DNA-Fragment des möglichen Operators *cre* sowie mit HPr-Ser46-P, konnten das PurR-basierende funktionelle Modelle für CcpA bestätigt werden (Tebbe *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2004).

PurR ist der Repressor der Gene für die Purinsynthese. Sind genug Purine in der Zelle vorhanden, häufen sich Guanin und Hypoxanthin (ein Vorläufermolekül in der Purinsynthese) an und binden an PurR, welcher dadurch in die DNA-bindende Konformation übergeführt wird (Choi und Zalkin, 1992). Im Komplex mit Operator- DNA sind die Bindeköpfe so ausgerichtet, daß das HTH-Motiv Kontakte mit zur großen Furche der DNA ausbildet. Ein Leucinrest innerhalb der „hinge-helix“ interkaliert zwischen das zentrale CG Basenpaar des Operators. Dadurch wird die DNA auseinandergebogen (Schumacher *et al.*, 1994) In der DNA- und Korepressor-freien Form sind die N-terminalen Subdomänen des Core-Proteins gegeneinander verdreht, so daß die DNA-Bindeköpfe in eine Stellung gebracht werden, die eine effiziente DNA-Bindung unmöglich macht (Schumacher *et al.*, 1994). Ein ähnlicher Mechanismus ist für das CcpA von *Bacillus megaterium* gezeigt, wo HPr-Ser46-P (Schumacher *et al.*, 2004) und vermutlich auch Intermediate des Zuckerstoffwechsel wie Glukose-6-P als Korepressoren dienen oder dienen könnten (Gösseringer *et al.*, 1997). Zumindest *in vitro* ist einer dieser Kofaktoren für die Bindung von CcpA an seinen Operator *cre* nötig (Gösseringer *et al.*, 1997).

### 5.1.1 PepR1 gehört zur Subfamilie der CcpA-Proteine

Auf der Grundlage von erweiterten Sequenzvergleichen zwischen 12 CcpA's oder CcpA-homologen Proteinen und 32 weiteren Mitgliedern der LacI/GalR-Familie konnten von Kraus *et al.* (1998), wie schon von Weickert und Adhya (1992) festgestellt, innerhalb der gesamten Familie entweder konservierte Reste oder Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an der gleichen Position bestimmt werden. Im Gegensatz hierzu fielen Bereiche auf, die nur in CcpA-ähnlichen Proteinen konserviert sind, während das Auftreten der jeweiligen Aminosäuren in den übrigen Proteinen variabel erscheint. Die konservierten Positionen wurden als CcpA-spezifisch bezeichnet, wenn sie für neun von 12 CcpA-Sequenzen identisch waren und gleichzeitig mindestens  $\frac{3}{4}$  der anderen 32 LacI/GalR-Proteine an dieser Position eine andere Aminosäure aufweisen. Die Abbildung **5.1.1-1** zeigt die Projektion der so ermittelten CcpA- bzw. LacI/GalR-Konsensusreste auf die Primärsequenz von PepR1. Unterhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PepR1 sind die Übereinstimmungen mit den ermittelten CcpA-spezifischen Positionen in Großbuchstaben, die innerhalb der gesamten LacI/GalR-Familie konservierten Reste in Kleinbuchstaben angegeben. Bei der PepR1-Sequenz sind die CcpA-spezifischen Reste rot auf schwarzem Hintergrund, die Positionen identisch zur LacI/GalR-Familie grün auf schwarzem Hintergrund hervorgehoben. Zusätzlich zeigt die Abbildung (**5.1.1-1**) eine schematisierte Darstellung der auf PepR1 adaptierten PurR-CcpA-Sekundärstruktur oberhalb der PepR1-Aminosäureabfolge. Man erkennt eine Häufung spezifischer Reste in der N-terminalen Region, die verstärkt im Bereich des HTH-Motivs ( $\alpha$ -Helices 1 und 2) sowie im Bereich der Helix 4 („hinge“), um die konservierte Aminosäure Leucin an Position 58 des PepR1, auftreten. Dieser Leucin-Rest greift an der zentralen CG-Nukleotidsequenz von Operatoren in der kleinen Furche der DNA-Helix an und bewirkt ein Abknicken des Stranges um einen Winkel von 45°



**Abb. 5.1.1-1 Projektion des Vergleichs der PepR1-Aminosäuresequenz mit dem kombinierten CcpA-LacI/GalR-Konsensus auf die PurR/CcpA-Struktur.** Unterhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 sind die Übereinstimmungen mit CcpA-spezifischen Resten in Großbuchstaben, die bei der gesamten LacI/GalR-Familie konservierten Positionen in Kleinbuchstaben angegeben (Kraus *et al.*, 1998). Bei der PepR1-Sequenz sind CcpA-spezifische Reste rot auf schwarzem Hintergrund, Positionen identisch zur LacI/GalR-Familie grün auf schwarzem Hintergrund hervorgehoben. Bei der PurR/CcpA-analogen schematisierten Darstellung der möglichen PepR1-Sekundärstruktur sind potentielle  $\alpha$ -Helices als längliche Ovale,  $\beta$ -Faltblätter als Rechtecke dargestellt. Die  $\alpha$ -Helices des Bindekopfbereiches sind mit arabischen Ziffern, die des Core-Proteins mit römischen Ziffern durchnummeriert. Die  $\beta$ -Faltblätter sind mit Buchstaben bezeichnet. Strukturelemente der N-terminalen Subdomäne tragen mit Ausnahme der Helices 1 bis 4 ein **n**, die der C-terminalen Subdomäne ein **c**. HTH, Helix-Turn-Helix-Motiv (Helix 1 und 2) und die Helix 4 („hinge helix“) sind angegeben.

(Schumacher *et al.*, 1994). Die Zahl an Übereinstimmungen läßt im mittleren Drittel des Proteins mit einer Vielzahl über die Sequenz verstreuter spezifischer Positionen nach (Abb. 5.1.1-1), nimmt aber am C-Terminus wieder leicht zu. Carboxyterminal zeigen die Regulatoren der LacI/GalR-Familie Ähnlichkeit zu Zucker-Bindeproteinen (Vartak *et al.*, 1991; Weickert und Adhya, 1992), woraus sich ihre Fähigkeit zur Bindung von Kohlehydrat-Effektoren ableiten läßt. PepR1 weist, wie alle verglichenen CcpA's, die für die Oligomerisierung der Proteine bedeutsamen spezifischen Reste am C-Terminus des Proteins auf. Daneben findet man noch über die gesamte Sequenz verstreute spezifische Reste, was die Vermutung nahe legte, daß die Funktion der CcpA-Proteine bei der Katabolitrepresseion und anderen zellulären Regulationsvorgängen durch diese spezifischen Reste definiert ist (Kraus *et al.*, 1998) Durch die Projektion der spezifischen Positionen auf die PurR-Struktur (Kraus *et al.*, 1998) und bei der Verifizierung anhand der Kristallstrukturdaten (Tebbe *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2004) konnte

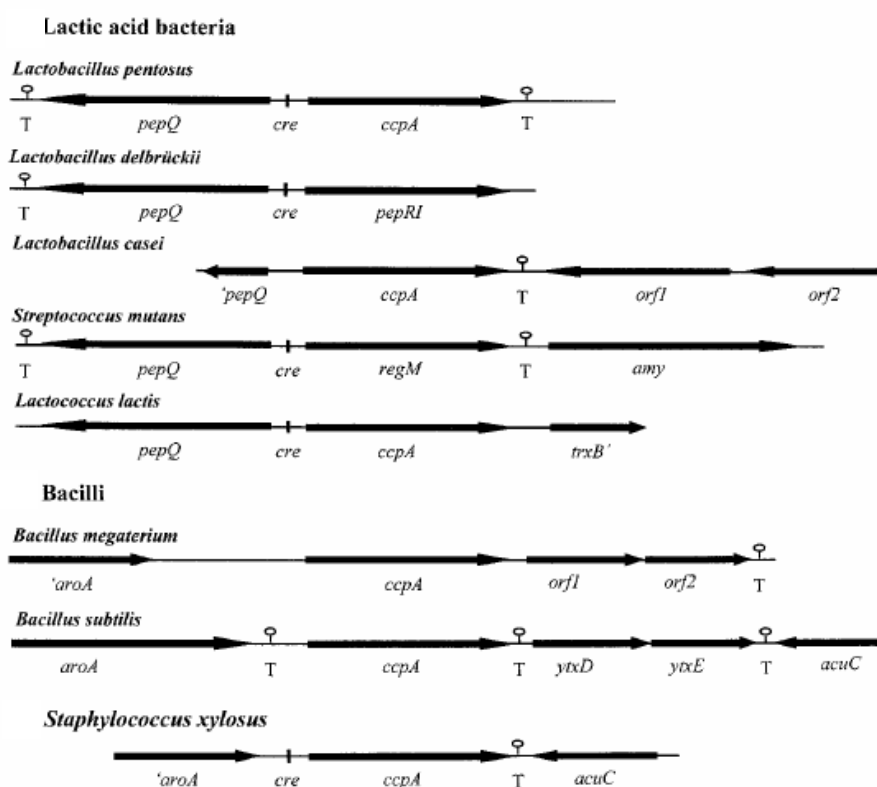


festgestellt werden, daß sich überraschend viele dieser Reste an der Oberfläche des Proteins befinden und dabei in einem Bereich der N-terminalen Subdomäne des Core-Proteins akkumulieren. Sie bilden damit vermutlich eine CcpA-spezifische Oberfläche aus. Da an der Oberfläche angeordnete Reste in der Regel variabel sind, sollte ihre Konservierung bei der Gruppe der CcpA's auch für eine funktionelle Bedeutung sprechen. Da für CcpA eine Wechselwirkung mit dem an Ser46 phosphorylierten HPr gezeigt wurde, ist anzunehmen, daß es sich bei der ausgebildeten Oberflächenstruktur um den Bereich handelt, der die Kontakte während dieser Wechselwirkung ausbildet. Diese Wechselwirkung von CcpA mit HPr-Ser46-P wurde sowohl biochemisch (Deutscher *et al.*, 1995; Gösseringer *et al.*, 1997)) als auch durch spektrometrische Methoden nachgewiesen (Jones *et al.*, 1997) werden. CD-Analysen von Titrationsstudien zeigten, daß ein CcpA-Dimer zwei Moleküle HPr-Ser46-P bindet (Jones *et al.*, 1997). Vergleicht man die Anzahl CcpA- und LacI/GalR-spezifischer Reste von PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM72090 mit denen anderer Milchsäurebakterien, so erkennt man, daß die Zuordnung von PepR1 zur Subfamilie der CcpA zulässig ist. Sowohl bei den CcpA-spezifischen als auch bei den LacR/Gall-spezifischen Resten weist PepR1 mit 49 und 69 Aminosäuren im Vergleich zum Konsensus (CcpA, 67; LacI/GalR, 94) die geringste Anzahl an übereinstimmenden Positionen innerhalb der Gruppe auf (siehe **Tab. 5.1.1-1**, vergleiche auch **Abb. 5.1.1-1**), da das Protein aber strukturell vergleichbar konserviert ist (siehe **Abb. 5.1.1-1**) und den geringeren Anteil an spezifischen Resten (identische Aminosäuren) mit

Organismus oder Sequenz	Protein	Anzahl an		Accession-Nr.
		CcpA-spezifische Resten	LacI-GalR- spezifische Resten	
<i>B. megaterium</i>	CcpA	61	83	P46828
<i>B. subtilis</i>	CcpA	63	80	P25144
<i>Streptococcus mutans</i>	RegM	60	78	O07329
<i>L. casei</i>	CcpA	64	79	U28137
<i>Lb. pentosus</i>	CcpA	61	79	AF176799
<i>Lactococcus lactis</i>	CcpA	51	75	AF106673
<i>Staphylococcus xylosus</i>	CcpA	55	82	Q56194
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	PepR1	49	69	Q48544
<b>Konsensus</b>		67	94	
<i>E. coli</i>	LacI	0	63	P03023
	GalR	0	69	P03024

**Tab. 5.1.1-1 Vergleich des Anteils an CcpA- und LacI/GalR-spezifischen Aminosäuren von PepR1 mit verschiedenen CcpA und CcpA-ähnlichen Proteinen aus Milchsäurebakterien bzw. Bacilli und mit den E. coli-Regulatoren GalR und LacI** (Daten basierend auf Kraus *et al.*, 1998; Tabelle modifiziert nach Mahr *et al.*, 2000). Die konservierten Positionen wurden als CcpA-spezifisch bezeichnet, wenn sie für neun von 12 CcpA-Sequenzen identisch waren und gleichzeitig mindestens  $\frac{3}{4}$  der anderen 32 LacI/GalR-Proteine an dieser Position eine andere Aminosäure aufwiesen. Für LacI/GalR-spezifische Reste galt dies bei Übereinstimmung von 75 % der nicht zu den CcpA zählenden Proteine an einer bestimmten Position.

(funktionell) ähnlichen Aminosäuren ausgleicht (siehe Kap. 4.4, Tab. 4.4-1), gehört es mit großer Wahrscheinlichkeit zu der von CcpA und CcpA-ähnlichen Proteinen gebildeten Subfamilie von Regulatoren (Kraus *et al.*, 1998; Mahr *et al.*, 2000). *Lactococcus lactis* und *Staphylococcus xylosus* besitzen mit 51 bzw. 55 Resten im Vergleich zu den anderen in der Tabelle angeführten Proteinen (60-64 Übereinstimmungen) einen ähnlich reduzierten Anteil an CcpA-spezifischen Resten wie PepR1 (49), den sie unter Umständen gegenüber PepR1 durch näher am ermittelten Konsensuswert (94) liegende Anzahlen an LacI/GalR-spezifischen Resten (CcpA *Lactococcus lactis*, 75; CcpA *Staphylococcus xylosus*, 82) wieder kompensieren. Zudem ist ihre Rolle bei der Katabolitrepresion in *Lactococcus lactis* und *Staphylococcus xylosus* klar gezeigt (Luesink *et al.*, 1998, Egeter *et al.*, 1996). Ein weitere Tatsache, die die Bildung einer CcpA-Subfamilie innerhalb der Gram-positiven Organismen und weiteren Untergruppierungen für beispielsweise die Milchsäurebakterien (LAB, Lactic Acid Bacteria) stützt, sind Befunde aus der Analyse der Nukleotidsequenzen der chromosomalen Regionen stromaufwärts von CcpA bzw. PepR1. Wie bei *pepRI* befindet sich bei allen bekannten *ccpA*- und *ccpA*-ähnlichen Genen von Milchsäurebakterien ein divergierend angeordnetes *pepQ*-Gen stromaufwärts des Regulators. Wie Abb. 5.1.1-2 zeigt, tritt die genetische Organisation *pepQ-ccpA* (oder *pepQ-ccpA*-homologes Gen) neben den *Lactobacillus delbrückii* Subspezies *lactis* und *bulgaricus* (mit *pepRI*; Stucky *et al.*, 1996, Schick *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 2001) unter



**Abb. 5.1.1-2 Vergleich der genetischen Organisation der *ccpA*- (*pepRI*-) Regionen verschiedener Milchsäurebakterien mit *Staphylococcus xylosus* und zwei *Bacillus* Spezies.** Dargestellt ist die chromosomale Lokalisation von *ccpA* und *ccpA*-ähnlichen Genen aus verschiedenen Gram-positiven Organismen sowie deren stromaufwärts bzw. stromabwärts benachbart liegenden Gene. *cre*, catabolite responsive element; T, potentielle Transkriptions-Terminations-Struktur; weitere Angaben zu Genbezeichnungen, Sequenzhomologien und funktionelle Beschreibungen befinden sich im Text. (Grafik modifiziert nach Mahr *et al.*, 2000).

anderem auch bei *Lactobacillus pentosus* (Mahr *et al.*, 2000), *Lactobacillus casei* (Monedero *et al.*, 1997), *Streptococcus mutans* (*regM*; Simpson und Russell, 1998) und *Lactococcus lactis* (Luesink *et al.*, 1998) auf. Im Gegensatz hierzu weisen die Sequenzen direkt stromabwärts von *ccpA* Unterschiede innerhalb der Gruppe der Milchsäurebakterien auf. Die offenen Leserahmen downstream der *ccpA*-Gene von *Lactococcus lactis* und *Streptococcus mutans* kodieren für Gene, die homolog zum Thioredoxin-Reduktase-Gen (*trxB*, Acc.-Nr. AF106673) und zum Gen für die  $\alpha$ -Amylase (*amy*) sind. In *Lb. pentosus* und *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* wurden zwar offene Leserahmen detektiert, ihre Sequenz weist aber keine Übereinstimmungen mit bekannten Genen auf (Mahr *et al.*, 2000; Stucky, 1995). Während für den mit ORF2 bezeichneten Leserahmen von *Lb. casei* keine Homologien bekannt sind, zeigt ORF1 Ähnlichkeit zu Genen, die für Transposasen der IS30-Familie von Insertionselementen kodieren (Monedero *et al.*, 1997).

Bei den drei anderen Gram-positiven Organismen zeigt sich ein von den oben dargestellten Genanordnungen abweichendes Bild. Stromaufwärts der *ccpA*'s von *B. megaterium*, *B. subtilis* und *S. xylosus* ist das *aroA*-Gen, dessen Genprodukt in *B. subtilis* Chorismat-Mutase-Aktivität zeigte (Bolotin *et al.*, 1995), konserviert. In *B. megaterium* und *B. subtilis* sind stromabwärts von *ccpA* zwei offene Leserahmen lokalisiert (ORF1 und ORF2 in *B. megaterium* sowie *ytxD* und *ytxE* in *B. subtilis*), die zu den Genen *motA* und *motB* von *B. subtilis* (Hueck *et al.*, 1994 b) homolog sind. MotA und MotB sind an der Flagellen-Rotation beteiligte integrale Membranproteine (Mirel *et al.*, 1992). Bei *Staphylococcus xylosus* findet man die *mot*-Gene nicht dem *ccpA* benachbart, statt dessen bilden hier das *acuC*-Gen und das weiter downstream ebenfalls divergierend angeordnete unvollständige *acuA*-Gen (Egeter *et al.*, 1996; in **Abb. 5.1.1-2** nicht gezeigt), die am Acetoin- und Butandiol-Stoffwechsel beteiligt sind (Grundy *et al.*, 1993), die benachbarten Gene. Das *acuC*-Gen von *B. subtilis* befindet sich, durch *ytxD* und *ytxE* von *ccpA* getrennt, wie bei *S. xylosus* ebenfalls in der näheren Nachbarschaft, was die genetische Organisation beider Organismen in dieser Region sehr ähnlich erscheinen läßt.

Wie dieser Vergleich zeigt, stellen die konservierten Abfolgen *aroA-ccpA* bei den Vertretern der *Bacilli* und bei *S. xylosus* sowie die divergierende Anordnung von *pepQ* und *ccpA* bei den verschiedenen Milchsäurebakterien die nicht variablen Komponenten in den jeweiligen *ccpA*-Regionen dar (Mahr *et al.*, 2000), während bei den weiteren um *ccpA* gruppierten Genen sowohl bei den Vertretern der LAB als auch bei den drei anderen Organismen einige Abweichungen und Variationen anzutreffenden sind. Die Tatsache, daß sich die genomische Organisation der *ccpA*-Region bei den möglicherweise in verschiedene Untergruppierungen einzuordnenden Mitgliedern der CcpA-Subfamilie so unterschiedlich darstellt, könnte implizieren, daß keines der sich stromaufwärts bzw. stromabwärts von *ccpA* befindenden Gene direkt oder indirekt an der Kohlenstoffkataboliten-Regulation beteiligt ist. Ob speziell die divergierende Anordnung der Gene *pepR1* (bzw. *ccpA*) und *pepQ*, deren Transkription von einer gemeinsamen Promotorregion die auch den Operator *cre* beinhaltet, aus erfolgt, eher auf eine direkte Funktion der Peptidase Q in der Katabolitrepression oder auf eine gleichfalls CcpA-regulierte Rolle an einer anderen Stelle des zellulären Stoffwechsels hindeutet, muß im Folgenden noch näher beleuchtet werden.

### 5.1.2 Komplementation der *Staphylococcus xylosus* C2a *ccpA*-Mutante TX154 durch *pepRI* aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290

Aufgrund der oben dargestellten Vergleiche der Sequenzdaten von PepR1 mit den CcpA's sowie der dargestellten chromosomalen Anordnung in der *ccpA*-Region wurde die funktionelle Signifikanz der aufgezeigten Identitäten und Ähnlichkeiten (siehe auch Kap. 4.4, Tab. 4.4-1) durch Komplementationsstudien mit einer *ccpA*-Mutante (TX154) von *Staphylococcus xylosus* C2a überprüft. Die Ergebnisse aus Kap. 4.4 zeigen, daß die CcpA-basierende Glukose-vermittelte Regulation der  $\alpha$ -Glukosidase (MalA, Maltase; Egeter und Brückner, 1995) bei Anwesenheit des plasmidkodiert vorliegenden PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 fast komplett wiederhergestellt wurde. Der Wildtyp-Stamm *S. xylosus* C2a wies bezüglich der MalA-Aktivitäten bei Wachstum in B-Vollmedium versetzt mit 25 mM Glukose einen Repressionsfaktor von fünf gegenüber den aus dem Vergleichsansatz in B-Medium ohne Glukose bestimmten Werte auf. Im Vergleich hierzu wies die Expression des unter der Kontrolle seines eigenen Promotors stehenden *pepRI*-Gens von Plasmid pR1473 in der *Staphylococcus xylosus* C2a *ccpA* knock-out Mutante TX154 einen RF-Wert von ca. drei auf. Die Anwesenheit von PepR1 bewirkte also zumindest die partielle Aufhebung der Deregulation des *malA*-Gens, was sich dann auch in den gemessenen  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivitäten ausdrückte.

Außer der Wiederherstellung der Regulation der MalA-Expression sind noch der Einfluß der PepR1-Expression auf die Wachstumsrate der Mutante sowie auf die beobachteten Veränderungen bei der Ansäuerung des Mediums relevant. Die Inaktivierung des *ccpA*-Gens in der *S. xylosus* C2a-Mutante TX154 hatte wohl zu einem pleiotropen Phänotyp geführt, indem sie das Wachstumsverhalten durch eine veränderte Genregulation beeinflusste (Egeter und Brückner, 1996). Während der Wildtyp noch eine leichte Stimulation des Wachstums durch die dem B-Medium zugesetzte Glukose gezeigt hatte, war diese in der *ccpA*-Mutante aufgehoben. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für Mutanten im *ccpA*-Gen bei beobachtet. Das Wachstum einer *B. megaterium ccpA*-Deletionsmutante war in einem nährstoffarmen Medium mit Glukose als C-Quelle stark eingeschränkt, eine *B. subtilis* Insertionsmutante in *ccpA* zeigte unter den gleichen Versuchsbedingungen einen völligen Wachstumsdefekt. (Hueck *et al.*, 1995a; Wray *et al.*, 1994). In Ermangelung eines geeigneten Minimalmediums für *S. xylosus* wurden die Untersuchungen von Egeter (Egeter und Brückner, 1996) als auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente in nährstoffreichem B-Medium durchgeführt, dem zusätzlich Glukose in einer Konzentration von 25 mM zugesetzt wurde. Wahrscheinlich ist, daß die *S. xylosus ccpA*-Mutante TX154 in einem geeigneten Minimalmedium einen ausgeprägteren Wachstumsdefekt gezeigt hätte. Eine mögliche Ursache für ein verlangsamtes Wachstum, welches bei Expression von PepR1 wieder ausgeglichen wurde, ist, daß der Mutante das CcpA als Aktivator von Genen, die eine Verstoffwechslung von Zuckern stimulieren, fehlt. In Promotoren verschiedener Gene, die an zentralen Stoffwechselwegen beteiligt sind, wurden *cre*-ähnliche Sequenzen gefunden (Hueck *et al.*, 1994a; Luesink *et al.*, 1998), die wie am Beispiel des *las*-Operons von *Lactococcus lactis* gezeigt, CcpA-vermittelt aktiviert werden (Luesink *et al.*, 1998). Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß in der Kultur der *S. xylosus ccpA*-Mutante TX154 mit dem Kontrollplasmid pRB473 der pH-Wert in Glukose-haltigem Medium über den Wachstumsverlauf konstant im neutralen Bereich blieb (pH 7,2 – 6,8) (Abb. 4.4.2-1 B), während er beim Wildtypstamm mit dem Kontrollplasmid auf den pH-Wert von 5,5 (Abb. 4.4.2-1 C) und bei der durch PepR1 (Plasmid pR1473) komplementierten Mutante TX154 auf 5,8 fiel (Abb. 4.4.2-1 A).

Untersuchungen in *Bacillus subtilis* haben gezeigt, daß dieser Organismus bei Wachstum in Glukosehaltigem Medium hauptsächlich Pyruvat und Acetat ausscheidet und dadurch eine signifikante Ansäuerung des Mediums bewirkt (Speck und Freese, 1973). CcpA aktiviert in Gegenwart von Glukose im Medium die Expression der Acetat-Kinase (Grundy *et al.*, 1993), welche die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat katalysiert, das ausgeschleußt wird. Acetyl-Co entsteht durch Umsetzung von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Ähnlich wie die *S. xylosus ccpA*-Mutante zeigt eine *B. subtilis* Mutante im Gen für die Acetat-Kinase (*ack*) einen Wachstumsdefekt in Medium mit Glukose (Grundy *et al.*, 1993; Turinsky *et al.*, 1998). Mit einem verlangsamten Acetyl-CoA Metabolismus in einer *ccpA*-Mutante könnte also eine Hemmung der Glykolyse und dadurch ein eingeschränktes Wachstum einhergehen (Turinsky *et al.*, 2000). Für *Lactococcus lactis* wurde Ähnliches beschrieben (Luesink *et al.*, 1998). Dieser Stamm bildet normalerweise unter anderem Laktat und einen geringen Anteil Acetat in einem bestimmten Verhältnis als Endprodukte des Zuckerstoffwechsels. Bei der *ccpA*-Mutante des Stammes *L. lactis* NZ9800 war die Menge an gebildetem Laktat um  $\frac{1}{4}$  abgesunken, während sich die Konzentration gebildeten Acetats verdoppelt hatte. Zusätzlich konnte nur in der Mutante aber nicht im Wildtyp dieses Stammes eine geringe Menge am Stoffwechselendprodukt Ethanol detektiert werden, was eines der Charakteristika der vorliegenden heterofermentativen Gärung ist (Luesink *et al.*, 1998).

Die oben diskutierten Ergebnisse deuten an, daß PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in der Lage sein sollte in CcpA-ähnlicher Weise mit den weiteren Elementen der Signaltransduktionskette, die für die funktionelle Ausprägung einer zuckervermittelten Kontrolle des Stoffwechsels in Gram-positiven Bakterien verantwortlich ist, zu interagieren (Hueck und Hillen, 1995b). Für eine CcpA-äquivalente Funktion von PepR1 spricht weiterhin, daß für die Expression des *malRA*-Operons von *Staphylococcus xylosus* C2a (Egeter und Brückner, 1995), das für die  $\alpha$ -Glukosidase MalA und den Regulator MalR kodiert, der Beweis erbracht wurde, daß CcpA hier seine reprimierende Wirkung auf Transkriptionsebene entfaltet. In Primer Extension Analysen wurde für den Wildtyp *S. xylosus* C2a eine starke Glukose-spezifische Reduktion von *malRA*-Transkripten gezeigt, die in der *ccpA*-Mutante *S. xylosus* TX154 vollkommen aufgehoben war (Egeter und Brückner, 1996). Die Regulation der  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität spiegelt sich also in der Transkription von *malRA* wieder und scheint exklusiv von CcpA abhängig zu sein. Zusätzlich hierzu wurde im Promotorbereich von *malRA* eine palindromische *cre*-Sequenz (5'-TGCAAAC GCTTGCA-3') entdeckt, die nur in den kursiv geschriebenen Nukleotiden von der Konsensussequenz (5'-TGWNANC GNTNWCA-3') von Weickert und Chambliss (1990) bzw. nur in der fett gedruckten Base von der von Hueck *et al.* (1994a, 5'-WGNAASC GNWWNCA-3') abweicht. Die Lage dieses vermutlichen Operators in unmittelbarer Nachbarschaft zur -35-Box des *malRA*-Promotors läßt vermuten, daß die Bindung von CcpA an diesen DNA-Bereich die Interaktion der RNA-Polymerase mit dem Promotor behindern und somit die Initiation der Transkription inhibieren könnte (Collado-Vides *et al.*, 1991; Egeter *et al.*, 1996). Die Funktion des potentiellen Operators wurde durch die chromosomale Deletion seiner rechten Halbseite, die zur Erzeugung der Mutante *S. xylosus* TX156 (*malRA* $\Delta$ *cre*) führte, überprüft. Die Mutation beeinflusste weder die Promotorstärke noch den Transkriptionsstartpunkt (Egeter und Brückner, 1995), wohl aber führte die Deletion zu einem kompletten Verlust der Repression der  $\alpha$ -Glukosidase durch die normalerweise für dieses Enzym reprimierend wirkenden Zucker Glukose, Fruktose, und Sukrose. Genau wie in der *ccpA*-Mutante TX154 war die Regulation der *malRA*-Transkription durch Glukose bzw. Glukose-Intermediate aufgehoben (Egeter und Brückner, 1996). Bedingt durch diese Beweiskette gilt als sicher, daß CcpA in *S. xylosus* diese Regulation ausübt, indem es an das *cre* des *malRA*-Promotorbereichs bindet und die Transkription des Operons verhindert (Egeter und Brückner, 1996).

Die Funktion von CcpA als pleiotroper Katabolit-Regulator in *S. xylosus* C2a wurde eindeutig nachgewiesen (Egeter und Brückner, 1996). In der *ccpA*-Mutante des Stammes (TX154) war die Repression der  $\alpha$ -Glucosidase- und der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in Gegenwart von Glukose, Fruktose, Sukrose und Glycerin fast vollkommen aufgehoben. Die Repression der  $\beta$ -Galaktosidase war zumindest teilweise verschwunden. Die verbliebene Glukose-spezifische Repression sowie die unbeeinflusste Glycerin-vermittelte Repression der induzierten  $\beta$ -Galaktosidase in der *S. xylosus ccpA*-Mutante TX154 könnten entweder auf CcpA-unabhängige Katabolitrepression, wie sie für *B. subtilis* beschrieben wurde (Krüger und Hecker, 1995; Saier *et al.*, 1996; Stülke *et al.*, 1995) zurückzuführen sein. Daneben könnten auch Prozesse wie Induktor-Ausschluß und Induktor-Ausschleussung beteiligt sein (Ye, 1994; Ye und Saier, 1995; Saier *et al.* 1996).

Für die nur partiell erfolgte Komplementation der *ccpA*-Mutation von *S. xylosus* TX154 durch PepR1 könnten verschiedene Aspekte verantwortlich sein. Neben der Option, daß eine schlechtere Operatorerkennung von PepR1 aufgrund geringfügiger Unterschiede bei den in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* und bei *S. xylosus* erkannten *cre*-Sequenzmotiven durch Spezies-spezifische Abweichungen von allgemeingültigen Konsensussequenzen bzw. verringerte Wechselwirkungen von PepR1 mit der DNA-Sequenz des *cre* von *P<sub>malRA</sub>* aufgrund einer sterisch leicht abweichenden Struktur des DNA-Bindekopfes von PepR1 verantwortlich sein könnten, besteht auch noch die Möglichkeit, daß PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 nur abgeschwächt mit dem HPr (Deutscher *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998) oder weiterer Komponenten der CCR-Signaltransduktionskaskade aus *S. xylosus* bzw. den potentiellen Effektoren, wie Glukose-6-P oder Fruktose-1,6-Diphosphat interagiert (Gösseringer *et al.*, 1997).

Daneben könnten Effekte, die auf dem Umstand beruhen, daß *pepRI* plasmidkodiert vorlag, einen Einfluß auf das Ausmaß der Komplementation des *ccpA*-Defektes bei *S. xylosus* TX154 durch PepR1 besessen haben. Zu nennen wären hier mögliche Titrationseffekte, die durch Bindung eines Anteils von PepR1-Proteinen an den ebenfalls vorhandenen Promotor des eigenen Gens, was möglicherweise sogar mit höherer Affinität erfolgt, zustande kämen. Diese Proteine hätten dann nicht mehr für die Ausübung der transkriptionellen Kontrolle am *malRA*-Promotor zur Verfügung gestanden und zusätzlich durch down-Regulation des *pepRI*-Promotors noch die Menge an gebildetem PepR1 reduziert. Darüber hinaus könnte an den *cre*-Operator des *pepRI*-tragenden Plasmide pR1473 gebundenes PepR1 noch die Plasmid-Replikation gestört haben, was über verringerte Plasmid-Kopienzahl zur reduzierten Ausprägung der Chloramphenicol-Resistenz geführt und dadurch zu Stress-bedingten Reaktionen der Zelle unter schlußendlicher Beeinflussung auch der *malRA*-Promotoraktivität führen könnte.

### 5.1.3 Expression von PepR1 aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* in *Lactobacillus casei* LK1

Die plasmidkodierte Expression von *pepRI* in dem heterologen *Lb. casei* LK1 sollte zeigen, welchen Einfluß PepR1 auf das Wachstum dieses Wildtypstammes (*ccpA*<sup>+</sup>) beim Wachstum in MRS-Medium mit 3 % oder 2 % der zu den Hexosen (Glukose, Fruktose) oder Pentosen (Ribose) gehörenden Zuckern besitzt (Kap. 4.5). Die Expressionskontrolle von zellfreien Extrakten aller PepR1-exprimierenden Kulturen und ihren Kontrollen in einem SDS-PAA-Gel ließ hierbei eine Überexpression von PepR1 nicht erkennen. Die Wachstumsraten von *Lb. casei* LK1/pR1651 (*pepRI*<sup>+</sup>) im Vergleich zur Kontrolle

(LK1/pJK651) waren bei Anwesenheit von 3 % Glukose als C-Quelle am stärksten beeinflusst. Die Kontrolle ( $\mu = 0,53 \text{ h}^{-1}$ ) besaß eine um den Faktor 1,78 höhere Wachstumsrate als der den Regulator exprimierende Stamm *Lb. casei* LK1/pR1651 ( $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ). Die Ergebnisse der beiden Vergleichskulturen in MRS mit 2 % Glukose waren bei einer um den Faktor 1,72 höheren Wachstumsrate für die Kontrolle ähnlich der mit 3 % Glukose gewachsenen Kulturen. Der Vergleich von Kontrollstamm (LK1/pJK651) und PepR1-exprimierendem Stamm (LK1/pR1651) beim Wachstum mit 2 % Fruktose bzw. mit 2 % Ribose ließ keinen negativen Effekt durch Zucker- und PepR1-vermittelte Hemmung des Wachstums von *Lb. casei* LK1 erkennen. Die Wachstumsraten lagen bei den Vergleichskulturen sowohl beim Wachstum in MRS mit 2 % Fruktose ( $\mu = 0,55 \text{ h}^{-1}$ ) als auch mit 2 % Ribose ( $\mu = 0,57 \text{ h}^{-1}$ ) bei ungefähr den Werten, den der Kontrollstamm (LK1/pJK651) in MRS mit 3 % ( $\mu = 0,53 \text{ h}^{-1}$ ) bzw. 2 % Glukose ( $\mu = 0,55 \text{ h}^{-1}$ ) aufwies. PepR1 bewirkt hier vermutlich einen ähnlichen Wachstumsdefekt, wie für die *ccpA*-Mutante von *Lb. casei* ATCC393 beschrieben (Monedero *et al.*, 1997). Durch die zuckervermittelte Bindung von entweder PepR1-Homodimeren oder PepR1-/CcpA-Heterodimeren, könnte es in *Lb. casei* LK1 zur Störung der PepR1- bzw. CcpA-vermittelten Genregulation gekommen sein, was sich dann negativ bei den Wachstumsraten niederschlug. Die vermeintliche negative Transdominanz (Kraus und Hillen, 1997) von PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 über das CcpA von *Lb. casei* LK1 war am ausgeprägtesten mit Glukose als C-Quelle, die Zucker Fruktose und Ribose ließen den Effekt nicht erkennen. Dies deutet auf eine Hierarchie der Zucker bzw. ihrer Metabolite bei der von PepR1 C-Quellen vermittelt ausgeübten Regulation hin.

## 5.2 Die *cre*-Operatoren der Promotorregionen der Peptidasegene *pepQ*, *pepI*, *pepX* und des Regulatorgens *pepRI* – *cis*-aktive Elemente für die durch PepR1 ausgeübte transkriptionelle Regulation ?

Ausgehend von der Hypothese, daß die genetische Organisation von *pepQ* und *pepRI* die Ausübung einer transkriptionellen Kontrolle der Expression von durch PepR1 beinhalten könnte, wurden verschiedene Untersuchungsansätze verfolgt. Da schon von Stucky *et al.* (1995a) gezeigt war, daß bei Versuchen zur Identifizierung von *pepQ* in einer Genbank des *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 Genoms nur rekombinante *pepQ* Plasmide durch Komplementation einer *E. coli* *pepQ*-Mutante (UK173) identifiziert werden konnten, wenn das Insert wenigstens einen 5'-Anteil von *pepRI* (nt 1-470) zusätzlich zum *pepQ*-Gen aufwies. Dieser Genabschnitt von *pepRI* weist den DNA-Anteil des Gens auf (nt 19-84), der für das HTH-DNA-Bindemotiv von PepR1 kodiert (siehe **Abb. 5.1.1-1** und **4.1-1**). Des weiteren ließ die Lage des *cre* in der intergenen Region von *pepQ* und *pepRI* 16 bp stromaufwärts der potentiellen -35-Region von *pepQ* und mit seiner rechten Halbseite gleichzeitig die potentielle -35-Region von *pepRI* überlappend das Postulat einer Doppelfunktion des Operators möglich erscheinen. Aufgrund seiner Lokalisation könnte durch den Einfluß von bindendem PepR1 an diese palindromische Sequenz von 14 bp einerseits die Transkription von *pepQ* positiv beeinflusst werden, während andererseits ein negativer Effekt auf die Transkription von *pepRI* zu erwarten sein könnte. Der Wirkung von *pepRI* auf die Regulation der vom *pepQ*- und vom *pepRI*-Promotor ausgehenden Transkription wurde mit Translationsfusionen des nicht-mutierten sowie zweier mutierter *PpepQ*-Varianten (Kap. 4.1) und von *PpepRI* (Kap. 4.6) mit einem promotorlosen *lacZ* aus *E. coli* durchgeführt. Die Daten wurden erweitert

um die analog zu *P<sub>pepQ</sub>* und *P<sub>pepRI</sub>* ausgeführte Analyse der Regulation des *pepI*- und des *pepX*-Promotors (Kap. 4.3), zweier weiterer Promotoren von Genen, die für Prolin-spezifische Peptidasen kodieren (Klein *et al.*, 1994a; Meyer-Barton *et al.*, 1993). Eine computergestützte Analyse auf weitere *cre*-ähnliche Nukleotidabfolgen bei bekannten Genen und deren stromaufwärts gelegen Sequenzabschnitte von bisher charakterisierten Peptidasen und weiteren Proteinen aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 hatte gezeigt (Weber, 1997; diese Arbeit), daß der *P<sub>pepI</sub>*- und die *pepI*-5'-Region zwei potentielle und der *P<sub>pepX</sub>* einen möglichen *cre*-Operator enthalten (Kap. 4.2). Die DNA-Fragmente der Promotoren und 5'-Abschnitte dieser Gene und wurden in Bandshift-Experimenten auf ihre Retardierung durch gereinigtes PepR1 hin untersucht (Kap. 4.2). Die Daten aus Regulationsstudien an Promotortranslationsfusionen mit *'lacZ*, die in An- bzw. Abwesenheit von *pepRI*/PepR1 in *E. coli* durchgeführt wurden (Kap. 4.1, 4.3, 4.6), werden ergänzt durch Gelshift-Experimente (Kap. 4.2) mit der nicht mutierten (P-FragQ<sub>*cre*wt</sub>) und einer der mutierten *pepQ*-Promotorvariante (P-FragQ<sub>*cre*mut1</sub>) und durch die Analyse der Transkripte (Kap. 4.7) von *pepQ* und *pepRI* (Kap. 4.7.1) sowie *pepI* und *pepX* (Kap. 4.7.2) in mit 2 % Glukose oder 2 % Laktose versetztem modifiziertem chemisch definiertem Medium (CDM<sub>mod</sub>).

### 5.2.1 Funktionelle Analyse von Wildtyp und Mutanten des *cre* der *pepQ-pepRI*-intergenen Region im heterologen *E. coli* System

Um den möglichen Einfluß von PepR1 auf die Transkription von *pepQ* zu untersuchen, wurde wie schon bei Stucky *et al.* (1996) ein Fragment des *pepQ*-Promotors und des 5'-Bereiches des *pepQ*-Gens (Position -77 bis +45 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des Gens) mit dem promotorlosen *'lacZ* aus *E. coli* translational fusioniert. Um gerichtete Mutationen des *cre* mit Hilfe mutagenisierender Primer einführen zu können, wurde im Vergleich zu der von Stucky *et al.* (1996) klonierten kompletten *pepQ-pepRI*-intergenen Region (170 bp), die bis zum Startkodon von *pepRI* reichte, ein um 47 bp kleineres Fragment (123 bp), welches sich nur bis zur potentiellen -35-Region von *pepRI* erstreckte, verwendet (siehe Abb.4.1-1). Die Signifikanz des *cre*-Operators für diese vermutlich bei der Transkription ausgeübte Regulation sollte durch zwei weitere Konstrukte überprüft werden, die mutierte Varianten des *cre*<sub>wt</sub> trugen. Bei *cre*<sub>mut1</sub> handelt es sich um den Austausch des zentralen CG-Dinukleotids des Operators zu TA, bei *cre*<sub>mut2</sub> wurden die Nukleotide TT an den Positionen +3 und +4 zu C (+3) und G (+4) getauscht. Im Vergleich zur Konsensussequenz von Weickert und Chambliss (1990, 5'-TGWNANCGNTNWCA-3') weist *P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>mut1</sub> (Plasmid pMCPQ3) drei, *P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>mut2</sub> (pMCPQ4) nur zwei Abweichungen auf. Für das *P<sub>pepQ</sub>*-Promotorkonstrukt mit der unveränderten *cre*-Sequenz 5'-TGcAATC GCTTACA-3' (*P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>wt</sub>, Plasmid pMCPQ2), welche eine Abweichung von der *cre*-Konsensussequenz von Weickert und Chambliss (1990, 5'-TGWNANC GNTNWCA-3') aufweist, zeigte es sich hierbei, daß die Anwesenheit des Regulators PepR1 die gemessene LacZ-Aktivität um einen Faktor von zwei gegenüber der Kontrolle erhöhte. Dieser meßbare Effekt war dabei unabhängig von der Wachstumsphase der Kultur. Bei den Promotorfragmenten *P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>mut1</sub> und *P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>mut2</sub> sank dieser Aktivierungsfaktor für die beiden translationalen Fusionskonstrukte mit *'lacZ* auf 1,26 (*P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>mut1</sub>, pMCPQ3) beziehungsweise 1,21 (*P<sub>pepQ</sub>cre*<sub>mut2</sub>, pMCPQ4). Auffällig an diesen Resultaten ist die Beobachtung, daß nicht wie



erwartet, die Doppelmutation in den zentralen Basenpaaren, sondern die Doppelmutation (TT-> CG) in der rechten Halbseite des Palindroms die geringere Aktivierung in Anwesenheit von PepR1 aufweist. Dies könnte daraufhin weisen, daß die Spezifität des *cre*-Operators nicht nur hinsichtlich der als hoch konserviert betrachteten zentralen Basen (Hueck *et al.*, 1994a), sondern auch unter den Nukleotiden in den peripheren Bereichen stärker ausgeprägt als postuliert sein könnte.

Die aus dem Vergleich mit dem *cre*<sub>wt</sub> zu den Mutationen des *cre* erhaltenen Daten lassen darauf schließen, das PepR1 analog den CcpA-Proteinen die Regulation des *pepQ*-Gens kontrolliert, *cre* also in diesem Fall das *cis*-aktive Element für transkriptionelle Kontrolle durch PepR1 darstellt. Auch die Beobachtung, daß *pepQ* durch die Wechselwirkung zwischen dem *cre*-Operator seines Promotors mit PepR1 aktiviert wird, ist in Übereinstimmung mit dem von Henkin (1996) vorgestellten regulativen Konzept, wonach die Lage eines *cre* relativ zum Transkriptionsstart bedingt, ob die Initiation der Transkription bei Bindung von CcpA/PepR1 positiv oder negativ beeinflusst wird. Dies korreliert im Falle der Aktivierung von *PpepQ* mit der Lage des *cre* 16 bp upstream der potentiellen -35-Region des *pepQ*-Promotors, was nach Henkin (1996) eine Position darstellt, die die Aktivierung der Transkription des entsprechenden Gens, in diesem speziellen Fall des *pepQ*-Gens, bei Bindung des Regulators PepR1/CcpA erwarten läßt.

### 5.2.2 Das *cre* der *pepQ-pepRI*-intergenen Region beeinflusst auch die Transkription von *pepRI*

Eine mögliche autogene Kontrolle der *pepRI*-Transkription könnte ebenfalls von dem in der intergenen Region der divergierend angeordneten Gene *pepQ* und *pepRI* vermittelt werden. Zur Untersuchung dieses Aspektes wurde ein 119 bp großes Fragment der *pepRI*-Promotorregion wie bei den *P<sub>pepQ</sub>*-Konstrukten translational mit dem *'lacZ* aus *E. coli* fusioniert (pMCPR11). Die Anwesenheit von plasmidkodiertem unter der Kontrolle seines eigenen Promotors stehendem (Plasmid pFNP13) *pepRI*, zeigte im heterologen Organismus *E. coli* dabei dieselbe Repression der *P<sub>pepRI</sub>'lacZ*-Fusion, wie das unter der Kontrolle des induzierbaren *E. coli lac*-Promotors stehende *pepRI*-Gen (Plasmid pKR1184) nach Induktion mit IPTG (Kap. 4.6). Der über den Wachstumsverlauf der Kulturen gemittelte Faktor der durch PepR1-vermittelten Autorepression von *PpepRI* besaß bei beiden Versuchsansätzen einen Wert von ungefähr zwei. Erst nach Induktion durch IPTG reprimierte das von *P<sub>lac</sub>* aus exprimierte PepR1 die Expression von *P<sub>pepRI</sub>'lacZ*. Auffällig war hierbei, daß auch das Ausschalten einer möglichen Bindung von PepR1 an den vorgelagerten eigenen Promotor bei Plasmid pKR1184 (*P<sub>lac</sub>::pepRI*) gegenüber pFNP13 (*P<sub>pepRI</sub>::pepRI*) den reprimierenden Effekt auf *P<sub>pepRI</sub>'lacZ* nicht erhöhte. Eine mögliche Ursache für diese Ergebnis ist, daß auch bei Erhöhung der vorhandenen Menge an PepR1 durch Induktion des *P<sub>lac</sub>::pepRI*-Konstruktes bei gleichbleibender Anzahl an zu bindenden Operatorsequenzen (pMCPR11), keine Verstärkung des gemessenen Effektes erlaubt.

Die Regulation oder Autoregulation von *ccpA* (oder *pepRI*) wurde auch in *B. subtilis* (Miwa *et al.*, 1994), *B. megaterium* (Hueck *et al.*, 1995a), *Staphylococcus xylosus* (Egeter und Brückner, 1996), *Lb. casei* (Monedero *et al.*, 1997), *Lb. pentosus* (Mahr *et al.*, 2000) und in dem zu *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 eng verwandten Stamm *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 (Morel *et al.*, 2001) untersucht. Western Blot Analysen und Resultate von *ccpA::lacZ*-Fusionen führten bei *B. subtilis* und

*B. megaterium* zu der Schlußfolgerung, daß CcpA konstitutiv exprimiert wird (Miwa *et al.*, 1994; Hueck *et al.*, 1995a). In beiden Fällen wurde allerdings kein Transkriptionsstartpunkt ermittelt. Bei *Lb. casei* wurde die Expression von CcpA durch Primer Extension- und Northern Blot-Analysen untersucht. Das *ccpA*-Gen dieses Stammes wird von einem Promotor ausgehend transkribiert, dem ein *cre*-Operator fehlt (siehe auch **Abb. 5.1.1-2**). Wohl auch wegen dieser Tatsache wurde bei *Lb. casei* auf eine konstitutive Expression von CcpA geschlossen (Monedero *et al.*, 1997). In *Lb. pentosus* und *S. xylosus* wird die Transkription von jeweils durch einen Tandem-Promotor kontrolliert und durch den *cre*-Operator vermittelt (auto-) reguliert. Bei *Lb. pentosus* sind beide Promotoren gut konserviert (P1: TTGCAT-17bp-TATATT; P2: TTGCAT-17bp-TATATT). Das *cre* (Pos. -107 bis -120) überlappt den zu dem als P2 bezeichneten, distal vom Translationsstart des Genes gelegenen Promotor gehörenden Transkriptionsstartpunkt (G, Pos. -119). Für den als P1 bezeichneten *ccpA*-Promotor von *Lb. pentosus*, der näher als P2 zum Translationsstart des Genes und stromabwärts des *cre* liegt konnten zwei Transkriptionsstartpunkte bestimmt werden (A, Pos. -58 und T, Pos. -55), die zwei Basen voneinander entfernt liegen. Da das von P2 ausgehende ein stärkeres Signal aufweisende Transkript nur in einer *ccpA*-Mutante bestimmt werden konnte und wahrscheinlich bei intaktem *ccpA* durch die CcpA-*cre* Wechselwirkung blockiert wird, schlußfolgerten die Autoren die Autoregulation von *ccpA* in *Lb. pentosus* (Mahr *et al.*, 2000). Für *S. xylosus* wurde gezeigt, daß die Expression von *ccpA* in Abhängigkeit von der C-Quelle autogen reguliert wird (Egeter und Brückner, 1996). In Anwesenheit von Glukose war die *ccpA*-Transkriptmenge um 50 % reduziert. Dementsprechend war auch die im Western-Blot detektierte Menge an CcpA-Protein verringert. Diese Repression war in der *ccpA*-Mutante TX154 aufgehoben. Es erscheint allerdings nicht sinnvoll, daß *S. xylosus* den CcpA-Spiegel zu einem Zeitpunkt senkt, wenn leicht verwertbare C-Quellen vorhanden sind und das Protein für die Katabolitrepression benötigt wird. Möglicherweise stellt diese Kontrolle eine Art Feinregulation dar, um die Konzentration an aktivem CcpA, wie auch bei den das *ccpA* vermutlich konstitutiv exprimierenden Gram-positiven Organismen *B. subtilis*, *B. megaterium* und *Lb. casei* postuliert, in der Zelle auf einem bestimmten Niveau zu halten (Egeter und Brückner, 1996). Die autogene Regulation der *ccpA*-Expression in *Staphylococcus xylosus* wird wahrscheinlich durch ein *cre* vermittelt, das in Position +29 bis +42 von Promotor P1 bzw. Position -1 bis +13 von P2 zu finden ist. Die Lage des *cre* in Bezug auf Promotor P2 läßt vermuten, daß durch die Bindung von CcpA die Transkriptionsinitiation inhibiert wird (Collado-Vides *et al.*, 1991). Die Transkription von P1 könnte durch einen Blockierungsmechanismus vorzeitig terminiert werden (Deuschle *et al.*, 1986; He und Zalkin, 1992). Da in Primer Extension Analysen gezeigt wurde, daß nur die Transkription von P2 signifikant reprimiert wird, ist anzunehmen, daß CcpA in *S. xylosus* die Transkription von Promotor P1 nicht effizient blockieren kann (Egeter und Brückner, 1996). In *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 wurde der Einfluß des wie bei *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 die -35-Region überlappenden *cre* (TGCAATC GCTTACA) auf die autogene Kontrolle von *pepRI* durch in *B. subtilis* und einer *ccpA*-Mutante analysierte transkriptionelle Fusionen des Promotors von *pepRI* ( $P_{pepRI}$ ) mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen gezeigt (Morel *et al.*, 2001). Im Wildtyp und der *ccpA*-Mutante des heterologen *B. subtilis* Organismus wurden je ein Fragment der *pepRI*-Promotor-Fusion mit den *lacZ* chromosomal integriert. Während eines der *pepRI*-Promotorfragmente ein vollständiges *cre* enthielt, war der Operator beim zweiten Fragment partiell deletiert. Ein vollständige Deletion des *cre* war nicht möglich, das es wie bei *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* die -35-Region des *pepRI*-Promotors überlappt. Im *B. subtilis* Wildtyp war die Expression der  $P_{pepRI}$ -*lacZ*-Fusion mit dem vollständigen *catabolite responsive element* bei Anwesenheit von Glukose gegenüber Medium ohne

Glukose um einen Faktor von 11,5 niedriger, während die  $P_{pepR1}$ - $lacZ$ -Fusion mit dem partiell

deletierten *cre* beim Vergleich der in Medium mit und ohne Glukose ermittelten Aktivitäten einen Repressionsfaktor von 4 aufwies. Diese verbliebene Repression wird durch die unvollständige Deletion des *cre*, die eine schwache Bindung durch das CcpA aus *B. subtilis* erlauben könnte, begründet. Die Aktivitäten beider  $P_{pepR1}$ -Promotorfusionen in der *ccpA*-Mutante zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede und keine Glukose-spezifische CcpA-vermittelte Repression. Die plasmidkodierte Expression von PepR1 in der Mutante komplementierte den *ccpA*-Defizit partiell und zeigte einen Repressionsfaktor von 2,8. Die nur teilweise erreichte Komplementation wurde durch die heterologe Expression der zwei unterschiedlichen  $P_{pepR1}$ - $lacZ$ -Fusion und des *pepR1* im *B. subtilis* Wirt begründet. Ausgehend von diesen Befunden schlossen die Autoren, daß es sich bei PepR1 um ein dem CcpA funktionell ähnliches Protein handelt und daß die *pepR1* Transkription über das *cre* seiner Promotorregion autogen reguliert wird.

### 5.2.3 Band-Shift-Analyse mit *pepQ*-Promotorfragmenten und gereinigtem PepR1

Der Band-Mobility-Shift ist eine in der Durchführung einfache und schnelle Methode um eine Proteinbindung an DNA nachzuweisen. Die Methode erlaubt auch Aussagen über die Affinität, wobei zu berücksichtigen ist, daß diese nur in Relation zu den verwendeten experimentellen Bedingungen betrachtet werden können. Die Bedingungen werden in diesen Versuchen in verschiedenen Parametern optimiert, zu denen unter anderem die Salz- und Glycerinkonzentration gehören, die nicht die *in vivo* Bedingungen repräsentieren, sondern auf eine möglichst gute Bindung im Experiment ausgerichtet sind. Es sind durch diese Methode auch keine Aussagen über die tatsächliche *in vivo* Bindung sowie möglicherweise notwendige Kofaktoren oder Induktoren möglich.

Gereinigtes PepR1 (Weber B., 1997) wurde benutzt um seine Bindung in Gel-Mobility-Shift-Experimenten an das 123 bp große *pepQ*-Promotorfragment (P-FragQ $_{cre_{wt}}$ ) sowie mögliche Veränderungen in der Affinität dieser Bindung bei der mit zwei Mutationen versehenen Variante dieses Fragmentes (P-FragQ $_{cre_{mut1}}$ ) zu untersuchen. Beide wurden hierbei bei Anwesenheit von PepR1 in 400-fachen molarem Überschuß gleich retardiert. Auf den Einsatz des von Weber (1997) für Band-Shift Experimente mit PepR1 für die unspezifische Kompetition etablierte Kontrollfragment ('*bla*'), eines 147 bp großen PCR-Produktes aus dem  $\beta$ -Laktamasegen (pBR322), wurde hierbei verzichtet, da seine Laufweite im Gel der des Fragmentes P-FragQ $_{cre_{wt}}$  bzw. P-FragQ $_{cre_{mut1}}$  entsprach (s. a. Abb. 4.2.1-1 A). Zusätzlich konnte bei der Retardierung des 170 bp großen  $P_{pepQ}$ -Fragmentes, welches die gesamte *pepQ-pepR1* intergene Region überspannte, keine Beeinträchtigung des retardierten Laufverhaltens des  $P_{pepQ}$ -PepR1-Komplexes bei Anwesenheit von '*bla*' gezeigt werden (Abb. 4.2.1-1 B; Weber, 1997; Schick *et al.*, 1999). Der Vergleich der Resultate der 170 bp mit der 123 bp *pepQ*-Promotorregion läßt zumindest eine Einengung des für die angenommene PepR1-Bindung notwendigen Sequenzbereiches der *pepQ-pepR1* Promotorregion um weitere 47 bp zu. Die Analyse der in verschiedenen Promotoren von Genen aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gefundenen *cre*-Operatoren (Kap. 4.2.2, Tab. 4.2.2-1) miteinander und gegenüber zwei postulierten *cre*-Konsensusmotiven (Weickert und Chambliss, 1990; Miwa *et al.*, 2000) verdeutlicht auch, warum das mutierte P-FragQ $_{cre_{mut1}}$  durch PepR1 im Gel retardiert

wird. Selbst sein in zwei Positionen veränderter *cre*-ähnlicher Operator weist noch in 11 von 14 bp mit dem von Weickert und Chambliss (1990) postulierten und in 12 von 18 bp zu dem um 4 bp erweiterten Konsensus von Miwa *et al.* (2000) Übereinstimmung auf. Er entspricht in seinem Konservierungsgrad immer noch sowohl den Konsensussequenzen als auch den *cre*, der in weiteren Band-Mobility-Shift Experimenten retardierten Promotoren anderer Gene aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. Während das Promotorfragment des *brnQ*- (Stucky *et al.*, 1995b) und des *pepI*-Gens (Klein *et al.*, 1994a), ähnlich dem *pepQ*-Promotorabschnitt, fast vollständig im Gel retardiert wurden, führte die Interaktion von PepR1 mit dem Fragment des Promotors des für die X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase kodierenden *pepX*-Gens (Meyer-Barton *et al.*, 1993) nur zu einer partiellen Retardierung (**Abb. 4.2.2-1 B**). Alle gezeigten Promotoren (**Abb. 4.2.2-1**) weisen potentielle *cre*-Operatoren auf, die in mindestens 10 von 14 Positionen mit dem Konsensus 1 genannten Motiv von Weickert und Chambliss (1990) übereinstimmen (**Tab. 4.2.2-1**; Weber, 1997; Schick *et al.*, 1999). Sie sind 16 (*pepQ*), 39 (*pepI*) und 22 bp (*brnQ*) stromaufwärts von der jeweiligen -35-Region des Promotors lokalisiert. Für *pepI* findet man eine zusätzliche potentielle *cre*-Sequenz, welche das Startkodons des Gens überlappt. Der potentielle Operator von *pepX* befindet sich zwischen der -35- und der -10-Region des Promotors (**Abb. 4.2.2-1**). Zusammen mit dem von PepR1 ausgeübten *cre*-vermittelten aktivierenden Effekt auf die Transkription des Gens für die Peptidase Q weist das Vorhandensein weiterer *cre*-ähnlicher Elemente in den Promotoren der beiden Peptidasegene (*pepI*, *pepX*) daraufhin, daß der Operator *cre* in die postulierten PepR1-DNA Interaktionen direkt involviert ist. Die Unterschiede in den Sequenzen der verschiedenen *cre* und ihre Lokalisation im Bezug auf den jeweiligen Promotor sowie der Transkriptions- bzw. Translationsstartpunkte könnten auch einen Beitrag zur Effizienz der Bindung und zur Ausprägung der durch PepR1 ausgeübten regulativen (positiven oder negativen) Wechselwirkung leisten. Im Allgemeinen wird angenommen, daß *cre*-Operatoren von durch CcpA/PepR1 aktivierten Genen stromaufwärts des jeweiligen Promotors liegen, während solche, die zur CcpA-vermittelten Repression von Genen beitragen, zwischen -35- und -10-Region oder am 5'-Ende des Gens zu finden sind (Henkin, 1996). Die Lokalisation des *cre* stromaufwärts des *pepQ*-Promotors sowie die gezeigte Bindung im Band-Shift-Experiment und die Aktivierung von  $P_{pepQ}$ -*lacZ* in *E. coli* sind im Einklang mit diesem Prinzip. Deshalb würde man schlußfolgern, daß *pepX* (mit einem im Promotor befindlichen *cre*) (siehe **Abb. 4.2.2-1**) und möglicherweise auch *pepI* (mit einem *cre* stromaufwärts des Promotors und einem am 5'-Ende des Gens) reprimiert werden, während *brnQ* (mit einem *cre* upstream seines Promotors) durch PepR1 aktiviert werden sollte. Bei Transportstudien wurde gezeigt, daß BrnQ von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 unter anderem die Aminosäure Leucin in die Zelle transportiert (Stucky *et al.*, 1995b). Die Peptidase Q hydrolysiert das Dipeptid Leu-Pro. Beide Mechanismen bewirken, daß *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ausreichend Leucin zum Wachstum zur Verfügung steht, da dieses Milchsäurebakterium Leucin-auxotroph ist und deshalb freies extrazelluläres Leucin in die Zelle transportieren und/oder intrazellulär durch Spaltung von Peptiden gewinnen muß. Eine gleichzeitige Aktivierung von *brnQ* und *pepQ*, wie sie aus den Band-Shift-Ergebnissen abzuleiten wäre, ist daher auch *in vivo* vorstellbar. Das Band-Shift-Experiment ergab eine hohe Affinität von PepR1 für das untersuchte *pepI*-Fragment, obwohl beide gefundenen *cre*-ähnlichen Elemente im Vergleich mit den Konsensusoperatoren und innerhalb der Gruppe der in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* identifizierten Operatoren nur mäßig konserviert sind. Es wäre jedoch denkbar, daß das kooperative Zusammenwirken beider cis-aktiver Elemente, oder auch ihr Abstand zueinander zu dieser hohen Affinität führen. Ob der regulatorische Effekt dabei positiv oder negativ ist, läßt sich aus ihrer Lage nur vermuten. Die Nähe zur RBS deutet aber auf negative

Regulation hin (Henkin, 1996). Die durchgeführten *in vitro* Studien von Weber (1996) und im Rahmen dieser Arbeit geben keinerlei Hinweise auf weitere, eventuell *in vivo* vorhandene, *trans*- oder *cis*-aktive Elemente, wie beispielsweise des HPr, die für die PepR1-Interaktion mit der jeweiligen potentiellen Operatorsequenz notwendig wären. Im Band-Shift-Experiment konnte unter optimierten Bedingungen für das gereinigte CcpA-Protein aus *Bacillus* Spezies eine Bindung sowohl mit, als auch ohne das *in vivo* benötigte HPr sowie der Zuckermetaboliten Glukose-6-P, Fruktose-1,6-Disphosphat, Glycerin-3-P oder NADP gezeigt werden (Gösseringer *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Ramseier *et al.*, 1995). Betrachtet man die experimentell gezeigte Affinität von PepR1 zu verschiedenen Promotorfragmenten und die hiervon abgeleitete Spezifität für *cre*-ähnliche Operatoren, wirft das die Frage auf, ob und wenn ja welche Kofaktoren oder Zuckermetabolite *in vivo* an der PepR1-Bindung an seine Zielsequenz notwendig sind. Als den oben genannten Zuckermetaboliten ähnliche Komponente, welche die PepR1-Bindung an DNA-Fragmente als Kofaktor getriggert haben könnte, kommt nur das Glycerin des für die Inkubation von DNA-Molekülen und PepR1-Protein benutzten Bindepuffers in Frage.

Für die Klärung der Fragestellung, ob PepR1 tatsächlich an die potentielle *cre*-Operatoren bindet und wie die Wechselwirkung aussehen könnte, d. h. welche Basen der Zielsequenz geschützt werden, müssten DNaseI-Footprint- oder *in vivo* Footprint-Experimente durchgeführt werden (Gösseringer *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Muscariello *et al.*, 2001). Zudem wäre erkennbar, ob ein im Experiment eingesetztes Fragment mehr als eine Bindestelle enthält. Eventuell für die PepR1-Bindung notwendige weitere Komponenten, wie z.B. HPr müssten hierzu aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 charakterisiert und isoliert oder von Organismen entliehen werden, bei denen sie bereits charakterisiert sind. Der Einsatz dieser Methoden würde weitere Aussagen über die Zielsequenz erlauben, beispielsweise Rückschlüsse auf deren genaue Länge. Das mit CcpA wechselwirkende *cre* ist eine 14 bp palindromische Sequenz. Möglicherweise ist die spezifische DNA-Bindestelle für das PepR1-Protein kürzer oder länger.

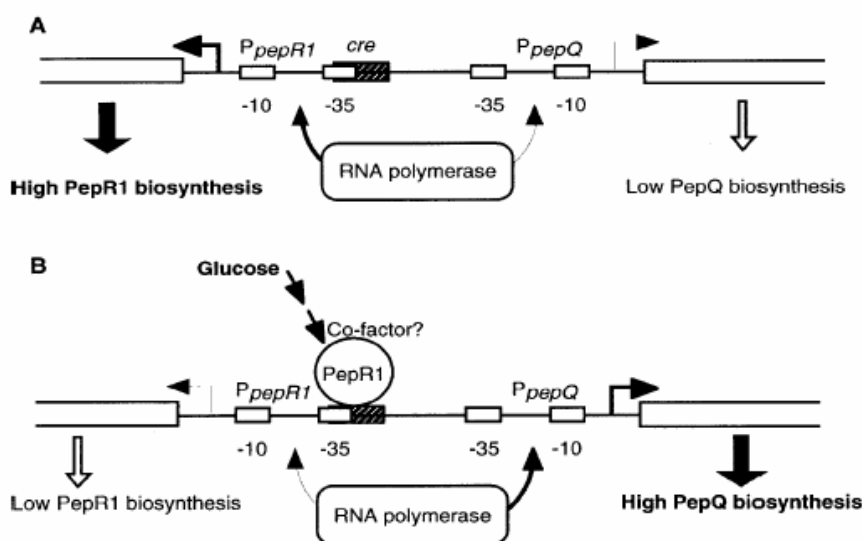
#### 5.2.4 Studien zur Transkription von *pepR1* und *pepQ* und zur Expression von PepQ bei Wachstum mit den C-Quellen Glukose oder Laktose

Um zu klären, ob die Expression von *pepQ* und *pepR1* aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 einer Regulation oder Modulation in Abhängigkeit von dem als C-Quelle verwerteten Zucker unterliegt, wurden die Transkripte der Gene sowie die Aktivität der Peptidase Q über den Verlauf des Wachstums einer Kultur von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in einem entweder mit 2 % Glukose oder mit 2 % Laktose versetzten chemisch definierten Medium (CDM) untersucht (Kap 4.7). Hierbei waren die spezifischen PepQ-Aktivitäten der in Glukose wachsenden Kultur bei den drei Entnahmezeitpunkten in der früh- und spät-exponentiellen sowie in der früh-stationären Wachstumsphase um die Faktoren 1,6; 1,9 und 1,7 höher als bei der in Laktose wachsenden Kultur (Abb. 4.7.1-1). Die detektierten Mengen an *pepQ*-mRNA variierten analog zu den bestimmten enzymatischen Aktivitäten, stimmten aber nicht vollständig überein, was einen Effekt darstellen könnte, der auf post-transkriptionelle oder post-translationale Einflüsse zurück zu führen wäre (Dick A., 1999). Die Diskrepanz zwischen spezifischen PepQ-Aktivitäten und Transkriptmenge war in den Proben der spät-exponentiellen und früh-stationären Wachstumsphase am stärksten ausgeprägt. Wie die PepQ-Aktivität war die Menge an *pepQ*-Transkripten jedoch bei allen Proben, die aus der mit Glukose gewachsenen Kultur stammten, größer als bei den aus der Kultur von mit Laktose versetztem CDM geernteten Zellen. Diese Beobachtungen könnten für einen

Glukose-spezifischen (oder Glukose-Intermediat-) spezifischen Aktivierungsmechanismus der Peptidase Q sprechen, oder in der unterschiedlichen Effizienz der Verwertung von Glukose und Laktose begründet liegen. Dieses den Energiehaushalt der Zelle repräsentierende Signal, von HPr-Ser-P an PepR1 weitergegeben, führt möglicherweise über die Bindung von PepR1 an das *cre* der *pepQ-pepR1* intergenen Region zur Aktivierung der Transkriptionsinitiation am *pepQ*-Promotor. Für einen solchen Aktivierungsmechanismus spricht die Beobachtung, daß die Menge an bestimmten *pepR1*-Transkript parallel zum *pepQ*-Transkript variiert. Sie weist gleich der *pepQ*-mRNA Medium- und Wachstumsphasen-spezifische Schwankungen auf. Die Schwankungsbreite besitzt einen Faktor von drei zwischen der früh- und spät-exponentiellen Wachstumsphase im mit 2 % Glukose versetzten Medium. Die geringe Varianz läßt auf einen Mechanismus schließen, der die Transkription von *pepR1* auf einem annähernd konstanten Niveau hält. Ob die Regulation der *pepQ*- und der *pepR1*-Transkription tatsächlich durch das gemeinsame *cre* der *pepQ-pepR1* intergenen Region gekoppelt ist, kann nur durch die Analyse der entsprechenden Transkripte oder der PepQ-Aktivität an einer *pepR1*-Mutante von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 abschließend geklärt werden.

In *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 konnte gezeigt werden, daß die PepQ-Aktivität in MRS-Medium supplementiert mit 2 % Glukose gegenüber Magermilchmedium (4,9 % Laktose) 2-fach erhöht war, während die Enzyme PepX (Atlan *et al.*, 1990, PepIP (Atlan *et al.*, 1994) und PepN (Atlan *et al.*, 1989) keine unterschiedlichen Aktivitätsniveaus zeigten (Morel *et al.*, 1999). Dieser Befund gleicht dem in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 für die Aktivität der Peptidase Q ermittelten Wert für eine in Anwesenheit von Glukose gegenüber Laktose circa 2-fach erhöhte Aktivität des Enzyms. Aufgrund dieser und der oben dargestellten Daten zur (Auto-) Regulation von *pepR1* (Morel *et al.*, 2001) wird das folgende Modell für *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 (siehe **Abb. 5.2.4-1**) vorgeschlagen:

In Abwesenheit von Glukose wird die *pepQ* Transkription nicht stimuliert, da PepR1 nicht mit dem *cre*



**Abb. 5.2.4-1** Vorgeschlagener Mechanismus für die Kataboliten-Kontrolle der PepQ durch PepR1 in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus*. **A** keine Glukose vorhanden **B** Glukose vorhanden (Abb. aus Morel *et al.*, 2001).

der *pepQ-pepRI* intergenen Region interagiert, welches die -35-Region des *pepRI*-Promotors überlappt. Die *pepRI*-Transkription wird folglich auch nicht inhibiert und erfolgt deshalb auf hohem Niveau (siehe **Abb. 5.2.4-1 A**). Bei Zugabe von Glukose in das Nährmedium bindet das in großer Menge vorhandene PepR1-Protein an den *cre*-Operator, vermittelt so die Stimulation der *pepQ*-Transkription und die gleichzeitige Inhibition der Transkription seines eigenen Gens (*pepRI*). Das Resultat ist eine starke Reduktion der PepR1 Biosynthese (**Abb. 5.2.4-1 B**). Dieses Feedback erlaubt die schnelle Übertragung des Signals „Glukose“ und verhindert eine zu starke Stimulation der PepQ Expression. Als Kofaktor für die PepR1-Bindung wurde HPr-Ser-P postuliert, welches nach Ergebnissen aus anderen Organismen (Fujita *et al.*, 1995; Galinier *et al.*, 1999) als entscheidende Komponente für die Übertragung dieses Signals zu CcpA/PepR1 zuständig ist. HPr-Ser-P, so wird postuliert, liegt bei Abwesenheit von Glukose nicht in ausreichender Menge vor, um die Bindung von PepR1 an *cre* stimulieren zu können. Bei einer Analyse des Proteoms von in MRS mit Glukose als C-Quelle vor-kultivierten und dann in Magermilchmedium transferierten Zellen von *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* durch 2D-Gelelektrophorese konnten die zwei Isoformen des HPr identifiziert werden (Rechinger *et al.*, 2000). Der Wechsel des Wachstumsmedium von MRS (2 % Glukose) nach Magermilchmedium (4,9 % Laktose) induzierte die Expression einer der Isoformen (HPr-Ser46-P). Deshalb schlagen die Autoren auch in *Lb. bulgaricus* eine Rolle von HPr-Ser46-P für die Bindung von PepR1/CcpA an *cre* und die dadurch ausgeübte regulatorische Wirkung vor (Morel *et al.*, 2001).

Das dargestellte Modell könnte in dieser Form auch für *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* Gültigkeit besitzen. Ein Schwachpunkt ist allerdings die für *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* vorgeschlagene geringe Biosyntheserate von PepR1 bei Anwesenheit von Glukose, die in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 zumindest auf der Ebene der Transkripte so nicht bestätigt werden konnte (siehe Kap. 4.7.1, **Abb. 4.7.1-1**). Die *pepRI*-Transkriptmenge schwankt sowohl bei Wachstum in CDM mit Glukose als auch mit Laktose maximal um einen Faktor von zwei bis drei und zeigt sich stärker von der Wachstumsphase abhängig als von der jeweiligen C-Quelle. Ein absoluter Mechanismus, der einem Ein- oder Ausschalten entspräche, ist mit den derzeit vorliegenden Daten nicht in Übereinstimmung zu bringen. Allerdings fehlen von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 vergleichbare Daten aus Western Blot Analysen, die Aussagen über die PepR1-Proteinmenge zuließen, was wiederum durch den Vergleich mit der Menge an *pepRI*-spezifischer mRNA einen Hinweis auf post-transkriptionelle Einflüsse geben könnte. Auch die Bedeutung der zumindest teilweise an die Regulation/Modulation von PepR1 gekoppelt scheinenden Regulation/Modulation von PepQ bleibt weiter unklar. Nicht zuletzt deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, die im bestmöglichen Fall den Vergleich von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 Wildtyp und *pepRI*-Mutante hinsichtlich ihrer Transkriptions- und Expressionsprofile einschließen würden. Des Weiteren wäre es notwendig die Interaktionen von PepR1 mit HPr, möglichen Kofaktoren sowie weiteren Komponenten der zuckerspezifischen Signalübertragungskaskade *in vitro* oder *in vivo* darzustellen.

### 5.2.5 C-Quellen-abhängige Transkription und Aktivität der Peptidasen I und X im Vergleich zur PepR1-Abhängigkeit der Aktivitäten der P<sub>pepI</sub>- bzw. P<sub>pepX</sub>-lacZ Translationsfusionen

Die Untersuchung der spezifischen Aktivitäten von PepI und PepX (Kap. 4.7.2) sowie der zugehörigen Northern-Hybridisierungen ihrer mRNAs wurden analog den Analysen für die Peptidase Q und die Expression des *pepQ* Genes durchgeführt. Die PepI-Aktivitäten waren in der früh-exponentiellen

Wachstumsphase bei den in Laktose gewachsenen Zellen von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* um einen Faktor von 2,26 höher als in der Vergleichskultur mit Glukose als C-Quelle. Die Aktivitäten aus beiden Kulturen stiegen dann über den spät-exponentiellen zum früh-stationären Zeitpunkt noch leicht an, während sich die Differenz der Aktivitäten aus in Laktose- zu in Glukose-gewachsenen Zellen über den Faktor 1,22 nach 1,11 verringerte. Die Menge an *pepI*-spezifischen mRNA korrelierte hierbei mit den bestimmten Aktivitäten. Bei den PepX-Aktivitäten war die Differenz von mit Laktose zu Glukose als C-Quelle gewachsenen Zellen in der früh-exponentiellen Wachstumsphase mit einem Faktor von 1,58 am klarsten, verringerte sich dann zur spät-exponentiellen Phase durch einen stärkeren Abfall der spezifischen PepX-Aktivitäten in Zellen aus der in Laktose wachsenden Kultur gegenüber dem mit Glukose supplementierten CDM. Zum früh-stationären Zeitpunkt hatte die PepX-Aktivität von mit Laktose-gewachsenen Zellen wieder einen leichten Anstieg zu verzeichnen, während die Glukose gewachsenen Zellen einen weiteren Abfall der PepX-Aktivität verzeichneten. Die *pepX*-spezifischen Transkripte der beiden unterschiedlich supplementierten Kulturen waren auch hier mit den gemessenen spezifischen Aktivitäten im Einklang.

Bei den Transkripten und spezifischen Aktivitäten der beiden Peptidasen PepI und PepX konnten also im Wesentlichen um einen durchschnittlichen Faktor von zwei variierende Veränderungen festgestellt werden. Die Kultur mit Laktose als C-Quelle führte hierbei zu geringfügig höherer Expression und Aktivitäten beider Prolin-spezifischer Peptidasen.

Die Analyse des Einflusses von PepR1 auf die  $P_{pepI}$  bzw. die  $P_{pepX}$ -*lacZ* Translationsfusion in *E. coli* konnte zeigen, daß der Regulator die vom *pepI*- bzw. die vom *pepX*-Promotor ausgehende Aktivität im Mittel um einen Faktor von 1,15 respektive 1,19 reprimiert (Kap. 4.3.2). Der negative Einfluß von PepR1 auf die  $P_{pepI}$ -*lacZ*-Aktivität war hierbei in der früh-stationären Wachstumsphase am stärksten ausgeprägt (Faktor 1,31; Abb. 4.3.2-1), während er bei  $P_{pepX}$ -*lacZ* im exponentiellen Bereich des Wachstum von *E. coli* CM89 lag (Faktor 1,32; Abb. 4.3.2-1). Der Vergleich der Resultate läßt nur Rückschlüsse auf eine Medien- und Wachstumsphasen-spezifische Regulation der Peptidasen I und X zu. Eine alleinige Kohlenstoffquellen-abhängige PepR1-vermittelte Regulation erscheint trotz des Vorhandensein potentieller *cre*-Operatoren fraglich. Bei der Regulation der PepI könnte eine regulatorische Vernetzung der von PepR1 ausgeübten Modulation mit der in der Einleitung (Kap. 1.2.1) beschriebenen Kontrolle von *pepI* durch PepR2 vorliegen, was die Kopplung des Energiestoffwechsels mit dem auf der Anwesenheit freier Aminosäuren basierenden Stickstoffstoffwechsels bei *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 bedeuten könnte.

### 5.2.6 Erweiterte vergleichende Betrachtungen zur Kontrolle von Genen durch CcpA/PepR1 und andere Regulatoren

Verglichen mit der Menge an Daten zur Klonierung und Charakterisierung von Peptidasen sowie weiterer Komponenten des proteolytischen Systems von Milchsäurebakterien (Christensen *et al.*, 1999) sind nicht viele Befunde zu ihrer Regulation auf der Ebene der Transkription oder Translation publiziert (Guédon *et al.*, 2002)

Durch Untersuchungen von A. Dick (1999) zu Peptidaseaktivitäten von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in Anwesenheit von Glukose oder Laktose konnten einige Charakteristika der



Peptidaseexpression in Abhängigkeit von der Energiequelle bestimmt werden: Die Aktivitäten von PepQ und N waren unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Wachstum in Vollmedium) in Anwesenheit von Laktose etwa um den Faktor zwei erniedrigt, wohingegen sich die PepI- nur geringfügig und die PepX-Aktivität so gut wie nicht veränderte. Die PepI-, PepQ-, Pep X- und PepN-Aktivitäten hatten allerdings gemeinsam, daß die wachstumsphasenabhängige Variation durch die Art der Energiequelle nicht beeinflußt wurde. Die Carnosinase PepV stellte dabei eine Ausnahme dar: Es handelte sich dabei um die einzige Peptidase, deren Aktivität in Anwesenheit von Laktose leicht erhöht statt erniedrigt war und deren zeitlicher Aktivitätsverlauf durch die Energiequelle nachweisbar beeinflußt wurde. Somit reagierten die meisten Peptidasen auf die Art der Energiequelle, wenn auch nur in geringem Umfang (Dick A., 1999).

Die oben dargestellten Beobachtungen lassen, vergleichbar den Resultaten aus dieser Arbeit, eine Katabolitenkontrolle von *pepQ* (wahrscheinlich auch *pepN*) in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* vermuten. Allerdings konnte in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397 nur die bei Wachstum in MRS-Medium mit Glukose im Vergleich zum Wachstum in Magermilchmedium (4,9 % Laktose) höhere Aktivität der PepQ und die unveränderten Aktivitäten von PepX und PepI, nicht aber die erhöhte Aktivität der Peptidase N bestätigt werden (Morel *et al.*, 1999)

Um die Regulation des proteolytischen Systems bei *Lactococcus lactis* genauer zu untersuchen, wurden die Transkriptionsprofile der bekannten Proteinasen, Peptidasen, Oligopeptid-, Dipeptid und Aminosäuretransportern in verschiedenen Medien analysiert (Guédon *et al.* 2001a, 2001b). Hierbei zeigte sich die Expression der Gene *prtP1*, *prtP2*, *pepC*, *pepN*, *pepX*, *pepDA2* und das Operon *opp-pepO1* durch Zugabe eines Peptidgemisches (Casiton) zwischen 5- und 150-fach reprimiert, während die Transkription der Gene *dtpT*, *pepP*, *pepA*, *pepF2*, *pepDA1*, *pepQ*, *pepT*, *pepM* und das *dtpP*-Operon nicht reduziert wird. Für die Peptidasen PepN, PepC, PepO1 und PepX war zuvor gezeigt worden, daß sie als wichtigste intrazelluläre Enzyme für den Abbau von aus dem Casein der Milch stammenden Oligopeptiden verantwortlich sind, die PepX hierbei für die Hydrolyse von Prolin enthaltenden Peptiden (Christensen *et al.*, 1999). Die Transkriptionsprofile einiger anderer Peptidasen waren bei den Untersuchungen von Guédon *et al.* (2001a) auffällig. Sie waren gering exprimiert und ihre Expression wurde nicht von den verschiedenen Peptiden moduliert. In diese Gruppe fiel auch die Peptidase Q von *Lactococcus lactis* IL1403. In der intergenen Region von *pepQ* und *ccpA* befindet sich bei diesem Stamm im Gegensatz zu *Lactococcus lactis* MG1363 (oder NZ9800; Luesink *et al.*, 1998) kein potentieller *cre*-Operator (siehe auch **Abb. 5.1.1-2**). Die Expression der Peptidase Q wurde also weder durch Peptide im Medium beeinflußt (Guédon *et al.* 2001a), noch scheint sie CcpA-reguliert zu sein. Die Autoren folgerten weiter, daß beispielsweise die Aminopeptidase PepP, welche im Promotor und in der 5'-Region ihres zugehörigen Gens (*pepP*) insgesamt vier *cre* aufweist (Matos *et al.*, 1998) und die PepM, eine Methionin-spezifische Aminopeptidase (Bolotin *et al.*, 2001), die N-terminale Methionin-Reste von Proteinen abspaltet, essentielle Enzyme sind, die bei der Reifung von Proteinen ihre zelluläre Rolle haben und nicht bei der Verwertung der angebotenen Casein-Fragmente. PepM besitzt verglichen mit dem PepM-Protein aus *Salmonella typhimurium* 46,8 % ähnliche Aminosäuren. Die Funktion von PepM aus *Salmonella typhimurium* als essentielle Methionin-spezifische Aminopeptidase, die in die Proteinreifung involviert ist, wurde von Miller *et al.* (1989) gezeigt. Für die Peptidase Q aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wurde von Stucky (1995; Stucky *et al.*, 1995a) ein Substratspektrum ermittelt, daß neben Valin- (X-Val, Val-X), Leucin (X-Leu, Leu-X) und Prolin-haltigen Peptiden (X-Pro, Pro-X) auch Methionin-haltige (X-Met, Met-X) Dipeptide umfasste. Aufgrund der Ähnlichkeit von PepQ zu PepM

(45,5 %) aus *Salmonella typhimurium* (Stucky, 1995; Stucky *et al.* 1995a) liegt der Verdacht nahe, daß auch PepQ aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 nicht am Caseinabbau, sondern am intrazellulären Protein-Turnover beteiligt ist.

Da bekannt war, daß das Vorhandensein der Dipeptide Leucin-Prolin und Prolin-Leucin im Medium zumindest teilweise die Transkription von *prtP* (Marrugg *et al.*, 1995; Marrugg *et al.*, 1996), *pepC*, *pepN* und das *opp-pepO1*-Operon (Guédon *et al.*, 2001a) kontrolliert, wurden dem chemisch definierten Medium bei der Suche nach dem spezifischen Signal dieser Casiton-vermittelten Regulation verschiedene Dipeptide verwendet (Guédon *et al.*, 2001b). Hierbei korrelierten Dipeptide, die aus ein oder zwei Resten von Isoleucin, Leucin und Valin bestanden, mit der Repression einer Fusion des *opp*-Promotors mit dem *lux*-Reporter gen. So konnte gezeigt werden, daß der intrazelluläre Pool an verzweigt-kettigen Aminosäuren (BCAA, branched-chain amino acids) Isoleucin, Leucin und Valin maßgeblich an der Regulation verschiedener Transportsysteme (Opp, DtpT und Dpp) beteiligt ist. Mit CodY wurde der Regulator identifiziert, über welchen das durch den BCAA-Pool wiedergespiegelte intrazelluläre Gehalt an für den Metabolismus verfügbaren freien Aminosäure sowohl an durch diesen Regulator kontrollierte Gene als auch an das regulatorische Netzwerk von *Lactococcus lactis* weitergibt (Guédon *et al.*, 2001b). Das CodY-Protein, das ein C-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv besitzt, weist auf Aminosäureebene 48 % Identität mit CodY aus *B. subtilis* auf, einem Repressor, der die Promotoren der Gene *dpp*, *comK* und *srfA* in Abhängigkeit vom Energiezustand der Zelle und vom Nährstoffgehalt des Medium bindet (Serror und Sonensheim 1996a; 1996b). In *B. subtilis* konnte ferner gezeigt werden, daß CodY den Promotor des Operons für die Biosynthese von verzweigt-kettigen Aminosäure (*ilvB*) und an diesem Promotor regulativ mit CcpA zusammen arbeitet (Shivers *et al.*, 2005). CcpA ist notwendig für die Transkription von *ilvB*, wirkt auf  $P_{ilvB}$  aktivierend, aber nur kooperativ mit anwesendem CodY. Für CcpA wurde zusätzlich gezeigt, daß der Regulator indirekt, durch die Modulation des intrazellulären Levels an BCAA durch die Kontrolle CcpA-spezifischer Zielgene, die Expression anderer CodY-regulierter Gene reguliert (Shivers *et al.*, 2005). In entsprechenden *B. subtilis* Mutanten konnte gezeigt werden, daß CcpA auch getrennt von einander ihre entsprechende positive (CcpA) oder negative (CodY) am *ilv-leu*-Operon entfalten können, wobei der aktivierende Einfluß durch Bindung des CcpA der durch CodY ausgeübten Repression untergeordnet ist (Tojo *et al.*, 2005). Diese Befunde werden gestützt durch ältere Daten aus *B. subtilis*, wonach der Wachstumsdefekt einer *ccpA*-Mutante damit begründet wurde, daß zur Aktivierung des *gltAB*-Operons, daß für die an der Stickstoff-Assimilation beteiligte Glutamat-Synthetase kodiert, ein intaktes CcpA notwendig ist (Faires *et al.*, 1999). In weiteren Studien fand man heraus, daß die Expression des *gltAB*-Operons von der Akkumulation glykolytischer Intermediate abhängt, die in einer *ccpA*-Mutante nicht auftreten. Das Ausbleiben der *gltAB*-Induktion scheint also den Flaschenhals für das Wachstum der *B. subtilis* *ccpA*-Mutante in Minimalmedium mit Glukose und Ammonium darzustellen (Wacker *et al.*, 2003). Die Autoren schlußfolgerten, daß die Kontrolle des *gltAB*-Operons durch CcpA eine bedeutende Verknüpfung zwischen Kohlenstoff- und Aminosäurestoffwechsel darstellt. Da der Wachstumsdefekt der *ccpA*-Mutante von *B. subtilis*, ausgelöst durch die verringerte Expression der Glutamat-Synthetase, aber auch durch Zugabe der Aminosäure Glutamat nicht aufzuheben war (Ludwig *et al.*, 2002) konnten weitere Untersuchungen zeigen, daß die *ccpA*-Mutante für optimales Wachstum noch die Zugabe von Methionin und der verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin bedurfte. Bei der Erforschung der Ursachen wurde ermittelt, daß die in der *ccpA*-Mutante nicht erfolgende Aktivierung des *ilv-leu*-Operons ursächlich für dieses Phänomen ist (Ludwig *et al.*, 2002).

Die CodY-Aktivität bei *Lactococcus lactis* IL1403 ist nur vom Level intrazellulärer verzweigt-kettiger Aminosäuren und nicht wie bei *B. subtilis* zusätzlich vom Gehalt an GTP abhängig (Petranovic *et al.*, 2004). Studien in *Lactococcus lactis* MG1363 haben gezeigt, daß CodY die Transkription der Gene *pepN*, *pepC*, des Operons *opp-pepO1* und möglicherweise auch *prrPM*, *pepX*, *pepDA2* in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle beeinflusst (den Hengst *et al.*, 2005). Mit Hilfe von *in vitro* DNA-Bindestudien und durch Einsatz der DnaseI-Footprinting-Technik wurde die Interaktion von CodY mit Regionen stromaufwärts des *opp*-Systems demonstriert. Die Resultate ließen den Schluß zu, daß mehrere CodY-Moleküle mit dem Promotor interagieren. Die Menge an gebundenem CodY war hierbei abhängig vom Level an vorhandenen verzweigt-kettigen Aminosäuren. Die Zugabe von Isoleucin, Leucin und Valin bei DnaseI-Footprinting-Experimenten vergrößerte die durch CodY geschützten Regionen der *oppD*-upstream Region. Die Bedeutung spezifischer Basen in der Promotorerkennung durch CodY konnte so bestimmt werden (den Hengst *et al.*, 2005).

Die oben dargestellten Befunde lassen die Rolle des CcpA-äquivalenten Regulators PepR1 aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* in einem anderen Licht erscheinen und eröffnen neue Perspektiven für zukünftige Studien. Besonders die Bedeutung von verzweigt-kettigen Aminosäuren sollte hierbei eine Rolle spielen. Möglicherweise aktiviert PepR1 die Expression von BrnQ, einem Transporter für verzweigt-kettige Aminosäuren von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (Stucky *et al.*, 1995b). In der Promotorregion des *brnQ*-Gens befindet sich eine gut konservierte *cre*-ähnliche Sequenz (siehe **Tabelle 4.2.2-1** und **Abb. 4.2.2-1**), die upstream der -35-Region des Promotors von *brnQ* zu finden ist (siehe **Abb. 4.2.2-1**). Dies entspräche der postulierten Lage für *cre*-Operatoren, die für die CcpA/PepR1-vermittelte Aktivierung von Genen dienen (Henkin, 1996). Ein *brnQ*-Promotorfragment wurde in Bandshift-Analysen mit gereinigtem PepR1-Protein unter den gewählten Bedingungen vollständig retardiert (siehe **Abb. 4.2.1-1 B**) (Weber B., 1997; Schick *et al.*, 1999). In weiteren Untersuchungen müsste die Rolle von PepR1 bei einer zu postulierenden Aktivierung der Transkription vom *brnQ*-Promotor genauer beleuchtet werden. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob PepQ tatsächlich an der Hydrolyse von aus dem Casein stammenden Peptiden beteiligt ist (Stucky *et al.*, 1995a), oder eher eine Rolle beim Abbau intrazellulärer Proteine durch die Abspaltung von N-terminalen Methioninresten, oder bei der gemeinsam von CodY und CcpA/PepR1 vermittelten Regulation von Genen durch die Freisetzung von verzweigt-kettigen Aminosäuren aus Dipeptiden und des damit verbundenen Beitrags zum intrazellulären BCAA-Pool, der das Signal für die CodY-Bindung an Zielsequenzen ist, besitzt.

Diese Fragen wären mit einer *pepR1* knock-out-Mutante von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gut zu untersuchen. Durch den Vergleich der vorhandenen Transkripte und ihrer Mengen sowie der exprimierten Proteine von Wildtyp und Mutante mit Hilfe von DNA-Microarrays und vergleichender 2D-Gelelektrophorese, könnten die bisher als durch PepR1 reguliert erachteten Gene/Proteine bestätigt oder ausgeschlossen sowie weitere potentielle Kandidaten ermittelt werden. Eine Möglichkeit eine solche PepR1-Mutante zu erzeugen, könnte die Adaption des für *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* und *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* entwickelten und inzwischen etablierten Transformationsprotokolls (Sasaki *et al.*, 1993; Serror *et al.*, 2002) für *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 sein. Damit sollte es möglich werden eine genügende Anzahl von Transformanten bei der initialen Elektroporation mit in DSM7290 nicht-replikativen (oder auch replikativen Plasmiden), die entsprechend präparierte Inserts (Deletionen) von Genen tragen, zu erzielen; um in den nächsten Schritten die chromosomale Integration mit sich anschließender Excision zur Ausschaltung des gewünschten Gens, wie hier im speziellen Fall von *pepR1*, zu vollziehen.

### 5.3 Das *lac*-Operon von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290

Bei der Aufklärung der Stoffwechselwege bei Milchsäurebakterien wurden vor allem zwei Bereiche umfassend charakterisiert. Dies sind zum einen das proteolytische System der LAB, das beim Wachstum in Milch ein bedeutender Faktor ist, zum anderen der Kohlenhydratstoffwechsel. Der überwiegende Zuckeranteil des natürlichen Habitats Milch wird durch den Milchzucker Laktose repräsentiert. Die Verwertung dieses Kohlenhydrats durch *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 war bisher nicht erforscht. Das Hauptaugenmerk der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen galt der postulierten übergeordneten Kontrolle der Laktoseverwertungsgene durch den CcpA-äquivalenten transkriptionellen Regulator PepR1.

#### 5.3.1 Nukleotidsequenzen, abgeleitete Genprodukte und Vergleich der genetische Organisation von *lacP*, *lacZ* und *lacR'* aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 mit anderen Organismen

Bei einem Versuch autolytische Funktion von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 zu klonieren, gelang, wie die Analyse der Nukleotidsequenz eines der aus *E. coli* isolierten Plasmide zeigte, anstatt der beabsichtigten Identifizierung eines Autolysegens (Orschiedt A., 1997), die Klonierung eines Bereiches der *lac*-Region von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. Die Sequenz des Inserts dieses Plasmides wurde durch die Erstellung von Subklonen und Deletionsderivaten vollständig ermittelt. Innerhalb des sequenzierten Insertbereichs (4401 bp) des pUH89*lac* genannten Plasmides, der für die Freisetzung des Farbstoffs 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo aus *X-Gal* bei *E. coli* verantwortlich ist, konnten durch Sequenzanalyse drei direkt aufeinanderfolgende offene Leseraster identifiziert werden, die alle drei die gleiche Orientierung aufweisen. Auf der Grundlage der Daten von Datenbankanalysen wurden sie als *lacP* (738 bp) *lacZ* (3024 bp) und *lacR'* (579 bp) bezeichnet (Kap. 4.8.1). Eine Komplettierung des fehlenden 5'-Endes von *lacP* durch das Screening einer Genbank chromosomaler DNA von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 im low-copy-number Vektor pLG339 war nicht erfolgreich (Kap. 4.8.2). Das komplette *lacP*-Gen (bzw. das *lacPZR*-Operon) ist vermutlich mit seinem eigenen Promotor nicht klonierbar, da das exprimierte Genprodukt LacP für *E. coli* letal sein könnte (De Vos und Vaughan, 1994). Dies zeigte auch der Vergleich von IPTG-induzierten und nicht-induzierten *E. coli* JM109(pUH89*lac*) (siehe Abb. 4.8.1-1, vgl. auch Abb. 4.8.1-2), wo das Insert mit dem *lac*-Bereich unter der Kontrolle des Promotors  $P_{lac'}$ - $P_{lac}$  exprimiert wird, was die Spaltung von *X-Gal* (blaue Höfe) anzeigt. Die auf der mit dem Induktor versetzten LB-*X-Gal*-Agarplatte gewachsenen Kolonien sind verglichen mit der Kontrolle bei nahezu gleichem Durchmesser der Farbstoffhöfe wesentlich kleiner, was auf eine Schädigung der Zellen durch eines (oder mehrere) der vermutlich unter Kontrolle des  $P_{lac'}$ - $P_{lac}$  exprimierten Genprodukte hindeutet. Ähnliche Befunde wurden auch für Klonierung des *lac*-Operons aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842 in *E. coli* JM105-8 (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991) und aus *Staphylococcus xylosus* für die Klonierung des *lacP* unter seinem eigenen Promotor (Bassias und Brückner, 1998) berichtet.

Durch Inverse PCR gelang die Klonierung und Sequenzierung des in pUH89*lac* fehlenden 5'-Genabschnittes (1143 bp) von *lacP* (1881 bp) sowie der *lac*-Promotorregion stromaufwärts des Gens (508 bp).

Die durch drei Basenpaare voneinander getrennten Gene *lacP* und *lacZ* (3024 bp) von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 bilden vermutlich zusammen mit *lacR* (996 bp), dessen Starkodon 51 bp downstream von *lacZ* liegt, ein Operon (Lapierre *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1989; Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991).

Die Laktose im Medium wird mit einer Permease (LacP, 627 AS), die vom *lacP*-Gen kodiert wird, in die Bakterienzelle transportiert. Die Laktose Permease von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 zeigt signifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen Transportproteinen aus der GPH-Familie. In dieser Familie, die in drei Untergruppen unterteilt wird, werden Transportproteine zusammengefaßt, die im Symport mit Kationen (H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>), Galaktoside, Pentosen und Hexunoride (GPH) transportieren (Poolman *et al.*, 1996). Die Transporter zeigen nicht nur Affinität gegenüber Laktose, sondern auch zu Melibiose, Galaktose und Raffinose.

Die Laktose-Permeasen wie LacS aus *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842 und das von *lacP* abgeleitete Genprodukt LacP aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gehören mit LacS aus *Leuconostoc lactis* NZ6009 (Vaughan *et al.*, 1996) und LacS aus *Lactobacillus helveticus* (Fortina *et al.*, 2003) zur LacS-Untergruppe der GPH-Transporterfamilie. Sie besitzen als Besonderheit an ihrem C-Terminus eine ca. 160 Aminosäuren lange hydrophile Verlängerung, die Ähnlichkeit zu EIIA-Domänen verschiedener PTS-System zeigt. Ihre N-terminale Aminosäuresequenz ähnelt der von Melibiose-Transportern. Beim LacS-Transporter von *Streptococcus thermophilus* konnte gezeigt werden, daß die EIIA-ähnliche Domäne in Anwesenheit von PEP, in einer EnzymI/HPr-abhängigen Reaktion phosphoryliert werden kann und dadurch die Laktose-Aufnahme inhibiert wird (Poolman *et al.*, 1995). Die Deletion der EIIA-ähnlichen Domäne beeinträchtigt den Laktose-Transport nicht, die Inhibition des Transports durch PTS-Zucker fällt jedoch weg, was darauf hin deutet, daß diese zusätzlich Domäne bei diesen Permeasen für die Regulation des Transports durch das PTS-System wichtig ist.

Die Aminosäuresequenzanalyse zur Vorhersage von Transmembrandomänen zeigen, daß LacP aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290, in Analogie zu den anderen Permeasen aus der GHP-Familie, ein integrales Transmembranprotein darstellt. Nach der Berechnungsmethode von Hofmann und Stoffel (1993, Programm TMPred) werden für LacP, wie für den Rest der Transportproteine der GHP-Familie, 12 potentielle transmembrane Segmente (Kap. 4.8.2.3, Abb. 4.8.2.3-1) vorausgesagt.

Die von *lacZ* kodierte  $\beta$ -D-Galaktosidase LacZ von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ist für die Hydrolyse von Laktose in Glukose und Galaktose verantwortlich. Sie gehört zur Familie 2 der Glykosyl-Hydrolasen (Henrissat, 1991) und zeigt Ähnlichkeit zu verschiedenen  $\beta$ -Galaktosidasen von Bakterien und Hefen.  $\beta$ -Galaktosidasen besitzen über ihre gesamte Proteinsequenz konservierte Regionen, die für die Substrat- und Magnesiumbindung, aber auch für die Aufrechterhaltung der Sekundärstruktur wichtig sind. Alle diese konservierten Regionen können auch im abgeleiteten Genprodukt LacZ von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 entdeckt werden. Die Aminosäuren Glu464 (Protonendonor), Glu537 (Nukleophil) und Tyr503 sowie Glu 416 und His 418, die für die Magnesium-Bindung der  $\beta$ -Galaktosidase LacZ von *E. coli* unentbehrlich sind und auch bei zahlreichen anderen  $\beta$ -Galaktosidasen verschiedener Organismen vorhanden sind (Jacobson *et al.*, 1994), können auch bei LacZ von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gefunden werden (siehe Anhang 7.2). Es sind dies die Aminosäuren Glu464 (Protonen-Donor), Glu 551 (Nukleophil) und Tyr 510 sowie Glu417 und His422.

Die chromosomale Organisation von *lacP* und *lacZ* bei *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (Kap. 4.8.1; 4.8.2) wurde auch für die Gene *lacS* und *lacZ* der *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* Stämme 131 und ATCC 11842 (Schmidt *et al.*, 1989; Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991) sowie *Streptococcus thermophilus*

(Poolman *et al.*, 1989; van den Boogaard *et al.*, 2000) gefunden. Das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase, *lacZ*, das Homologie zu *lacZ* von *E. coli* aufweist, ist bei beiden Stämmen mit *lacS* in einem Operon organisiert. Unterschiede bestehen nur in Bezug auf die stromaufwärts des *lacSZ*-Operons gelegenen Gene.

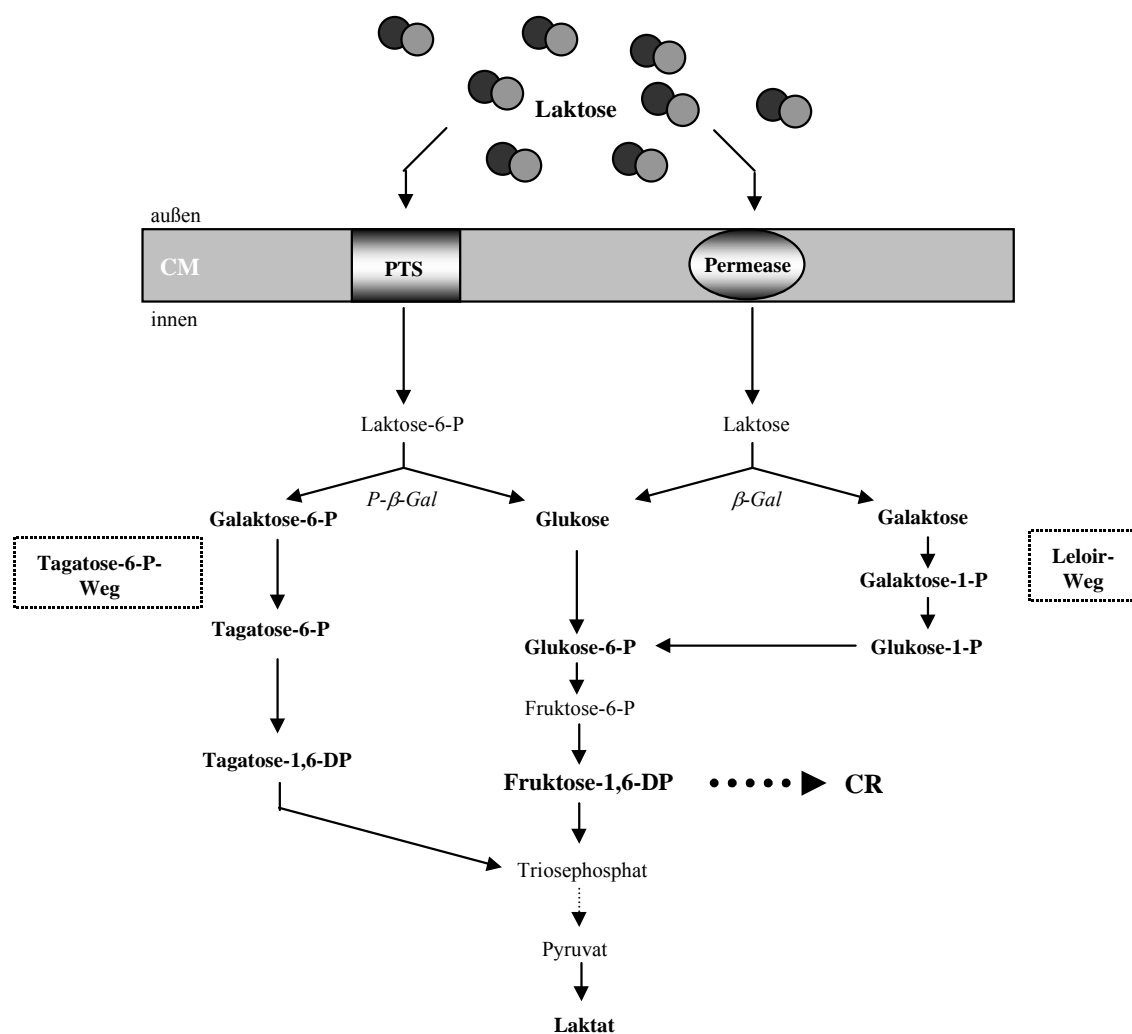
Die *lac*-Gene der Milchsäurebakterien sind in vielen Fällen auf Plasmiden lokalisiert, bei chromosomaler Kodierung findet man sie wie bei *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 auch (siehe Kap. 4.8.2.4, Abb. 4.8.2.4-1) oft in Nachbarschaft zu IS-Elementen (Lapierre *et al.*, 2002). Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Gene erst vor entwicklungsgeschichtlich gesehen relativ kurzer Zeit durch horizontalen Gentransfer erworben wurden (Germond *et al.*, 2003). Auch die hohen Sequenzhomologien dieser Systeme bei Arten mit sonst geringer Verwandtschaft deuten darauf hin (DeVos, 1996; DeVos und Vaughan, 1994).

Bei *S. thermophilus* handelt es sich bei den stromaufwärts der *lac*-Gene lokalisierten Genen um die Strukturgene des Leloir-Weges der Galaktose-Verwertung (Abb. 5.3.1-1) (DeVos und Vaughan, 1994; van den Boogaard *et al.*, 2001). Bei den Subspezies von *Lb. delbrueckii* fehlen diese Gene in direkter Nachbarschaft (Lapierre *et al.*, 2002). Allerdings konnte in einer breit angelegten Studie von Germond *et al.* (2003) mit einer *galT*-spezifischen Sonde gezeigt werden, daß alle getesteten *Lb. delbrückii* Subspezies *lactis* Stämme ein Hybridisierungssignal zeigten, während dies bei den Subspezies *bulgaricus* und *delbrückii* bei keinem Stamm der Fall war. Das *galT*-Gen, welches für die Galaktosyl-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (siehe Abb. 5.3.1-1) kodiert, die die Umsetzung von Galaktose-1-Phosphat zu Glukose-1-Phosphat katalysiert, war hierbei nicht in der Nachbarschaft der *lac*-Gene lokalisiert. Ob diverse Stämme von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* die weiteren Gene des Leloir-Weges zum Abbau von Galaktose besitzt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung dieser Autoren. Die Klärung dieser Fragestellung ist angesichts der Tatsache, daß die Mehrzahl der Stämme, die ein LacS aufweisen, Galaktose negativ ist, von besonderer Bedeutung, da LacS die Fähigkeit zum Laktose-/Galaktose-Antiport besitzt. Bei den Laktose-Permeasen (LacS) aus *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus*, wird der Transport durch einen elektrochemischen Gradienten angetrieben (Poolman *et al.*, 1989; 1993). Analog der LacY-Permease aus *E. coli* findet auch hier ein H<sup>+</sup>/Laktose-Symport statt, allerdings besteht keine Sequenzhomologie zwischen LacS und LacY. Für weitere Untersuchungen des LacP aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ist die biochemische Charakterisierung der Laktose-Permease durch Transportstudien ein wichtiger Aspekt, da der Stamm Galaktose verwertet (siehe Tab. 4.7-1), derzeit keine Klarheit über die Existenz der *gal*-Gene besteht und sich deshalb die Frage stellt, wie der Transport der Laktose über LacP verläuft. Der Befund, das *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in chemisch modifiziertem Medium mit Laktose als C-Quelle gegenüber Glukose eine höhere Wachstumsrate besaß und zu einer höheren End-O.D. auswuchs (Kap. 4.7.1, Abb 4.7.1-1 bzw. Kap. 4.9.2, Abb. 4.9.2-1), deutet entweder auf eine effizientere Verwertung der Laktose durch im Vergleich zum Glukosetransport höhere Transportraten und/oder eine effiziente Laktosespaltung bzw. weitere Verstoffwechslung hin. In diesem Zusammenhang ist auch die Ermittlung des Laktosetransports über LacP (H<sup>+</sup>/Laktose-Symport oder Laktose/Galaktose-Antiport) von Interesse.

Da die genetische Organisation der *lac*-Gene einer Vielzahl von Stämmen umfassend charakterisiert ist, kann man aufgrund der molekularbiologischen Daten innerhalb der Milchsäurebakterien neben der LacS/LacZ-Gruppe noch zwei weitere Gruppen unterscheiden (DeVos und Vaughan, 1994). Bei der LacLM/LacS-Gruppe sind die Permeasen, die in dieser Gruppe für den Laktose-Transport verantwortlich sind, zu den LacS-Permeasen, die für die LacZ/LacS-Gruppe beschrieben wurden, homolog und haben analoge Funktion (Vaughan *et al.*, 1996). Die Besonderheit der Gruppe besteht darin, daß die

$\beta$ -Galaktosidase von zwei getrennten, teilweise überlappenden Genen, *lacL* und *lacM* kodiert wird, wobei eine translationale Kopplung beider Gene wahrscheinlich ist (David *et al.*, 1992; DeVos und Vaughan, 1994). Diese recht ungewöhnliche Organisation beruht wahrscheinlich auf dem Auftreten von Deletionsereignissen in den Genen von LacZ-Typ- $\beta$ -Galaktosidasen. Sie wurde erstmals für *Leuconostoc lactis* beschrieben (David *et al.*, 1992), konnte aber mittlerweile auch bei *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* (Germond *et al.*, 1995), *Lb. plantarum* (Mayo *et al.*, 1994) *Lb. helveticus* (Zwahlen *et al.*, 1994) gefunden werden.

Die bisher bekannten *lacLM*-Gene bilden mit *lacS* kein Operon, sie sind zu diesem lediglich bei *Leuconostoc lactis* benachbart (2 kb Abstand) (David *et al.*, 1992). Bei *Lb. helveticus* befinden sich stromauf- und stromabwärts von *lacLM* Gene, die für Enzyme des Leloir-Weges beim Galaktose-Abbau (siehe **Abb. 5.3.1-1**) kodieren (Fortina *et al.*, 2003). Das dritte in LAB identifizierte System wird von der LacG/LacEF-Gruppe gebildet. Laktose wird über das Phosphotransferase-System transportiert, wobei eine Phosphorylierung am C-6 der Galaktoseeinheit stattfindet. Laktose-6-Phosphat wird dann in der



**Abb. 5.3.1-1: Schematische Darstellung der Hauptwege zur Laktoseverwertung in Milchsäurebakterien und Metabolisierung der Galaktoseeinheit über Tagatose-6-P-Weg oder Leloir-Weg** ( nach De Vos und Vaughan, 1994; mod. nach Dick A., 1999). [P:Phosphat, DP: Diphosphat, *P*- $\beta$ -Gal: Phospho- $\beta$ -Galaktosidase,  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galaktosidase; CM: Cytoplasmamembran; CR: Katabolitrepression]

Zelle durch eine Phospho- $\beta$ -Galaktosidase (P- $\beta$ -Gal) gespalten. Der PTS-Transport von Laktose bei gleichzeitiger Phosphorylierung stellt energetisch das effizienteste System der Laktoseverwertung dar. Es ist bisher nur bei Gram-positiven Bakterien nachgewiesen. Die daran beteiligten Gene *lacG* (P- $\beta$ -Gal), *lacE* (EIIBC<sup>Lac</sup>) und *lacF* (EIIA<sup>Lac</sup>) wurden aus einer ganzen Reihe von *L. lactis*- und *Lb. casei*-Stämmen kloniert und sequenziert (Porter *et al.*, 1987; DeVos und Gasson, 1989; De Vos *et al.*, 1990; Chassy und Alpert, 1989). Bei beiden Arten sind die *lac*-Gene in einem Operon organisiert und zeigen ausgeprägte Homologie zueinander. Bezüglich der genetischen Organisation der Operons lassen sich allerdings deutliche Unterschiede zwischen *L. lactis* und *Lb. casei* feststellen.

Bei *Lactococcus lactis* MG1820 sind die direkt an der Laktoseverwertung beteiligten Gene Teil des *lacABCDEFGX*-Operons. Die Gene *lacA*, *lacB*, *lacC* und *lacD* kodieren für Enzyme des Tagatose-6-Phosphat-Weges, die an der Verwertung des aus Laktose-6-Phosphat freigesetzten Galaktose-6-Phosphates beteiligt sind (Abb. 5.3.1-1). Die Funktion von *lacX* ist unbekannt, eine regulatorische Bedeutung wird diskutiert (DeVos und Vaughan, 1994). Der *lac*-Repressor LacR wird von einem Gen kodiert, das stromaufwärts des *lac*-Operons liegt und mit dazu entgegengesetzter Orientierung transkribiert wird (De Vos *et al.*, 1989).

Bei *Lactobacillus casei* 64H sind die Gene der Laktose- und Galaktoseverwertung nicht in einem gemeinsamen Operon organisiert. Auch die Reihenfolge der *lac*-Gene differiert von der bei *L. lactis* gefundenen insofern, als *lacG* hier zwischen *lacE* und *lacF* liegt. Während LacR nicht nachgewiesen werden konnte, wird hier LacT, das von dem ersten Gen dieses Operons kodiert wird, eine regulatorische Funktion als Antiterminator zugeschrieben (Chassy und Alpert, 1989; Gosalbes *et al.*, 1999).

In der Mehrzahl sind *lac*-Regulatoren divergierend zum Rest der Laktoseverwertungsgene angeordnet. Dies ist beispielweise der Fall bei *lacR* von *Lb. helveticus*, wo *lacR* eine gemeinsame intergene Region mit den überlappenden Genen *lacL/lacM*, die für eine  $\beta$ -Galaktosidase kodieren, besitzt. Das gleiche gilt für das *lac*-Operon von *Lactococcus lactis* MG1820, bei dem die Gene des *lacABCDEFGX*-Operons auf dem Laktose-Mini-Plasmid pMG820 (Maeda und Gasson, 1986) divergierend zu *lacR* angeordnet sind (van Rooijen *et al.*, 1990).

Die Anordnung des an seinem 5'-Ende unvollständigen '*lacR* 52 bp stromabwärts von *lacZ* in gleicher Leserichtung wie *lacP* und *lacZ* bei *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (Abb. 4.8.1.2-1) ist in dieser Form selten vorhanden in Milchsäurebakterien. Die identische genetische Organisation wurde bisher nur vom eng verwandten Stamm *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* LL44 beschrieben (Lapierre *et al.*, 2002). Die verfügbare Sequenz von *lacR'* weist eine Identität von 99 % auf DNA-Ebene sowie von 98 % auf Aminosäureebene zu dem als LacR (332 AS; *lacR*, 996 bp) bezeichneten transkriptionellen Regulator aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* LL44 auf, der als negativer Regulator des *lac*-Operons (*lacSZ*) dieses Stammes charakterisiert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beider offenen Leserahmen (*lacR'* und *lacR* aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* LL44) besitzen das zueinander identische Helix-Turn-Helix-Motiv der LacI/GalR-Familie transkriptioneller Regulatoren, zu der auch PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 gehört. Die Analyse der Promotorregionen beider *lacR*-Gene wies keine für *Lactobacillus* typischen Promotorstrukturen auf, was darauf hindeutet, daß sie mit den Genen *lacS* und *lacZ* (*Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* LL44) bzw. *lacP* und *lacZ* (*Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290) gemeinsam transkribiert werden.



### 5.3.2 Analyse der Transkription des *lac*-Operons und der LacZ-Aktivität in Abhängigkeit von der C-Quelle

Um die aus der Sequenzanalyse abgeleitete Schlußfolgerung, daß *lacP* und *lacZ* sowie möglicherweise auch *lacR'* ausgehend von einem gemeinsamen Promotor eine polycistronische Transkriptionseinheit (mRNA) bilden, zu verifizieren, wurden Transkriptionsanalysen für das *lac*-Operon von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* durchgeführt. Der Vergleich der mit einer *lacP*- und einer *lacZ*-spezifischen Sonde durchgeführten Northern-Hybridisierung mit einem Molekulargewichtsstandard konnte zeigen, daß mit beiden Sonden ein distinktes Signal für eine mRNA-Bande von ca. 6,15 kb Größe detektiert wurde. Dieses Signal war nur bei der Gesamt-RNA der Zellen aus einer Kultur von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in chemisch definiertem Medium mit Laktose als Kohlenstoffquelle zu erkennen (**Abb. 4.9.2-1**), nicht aber bei der RNA aus in Medium mit Glukose als C-Quelle kultivierten Bakterien. Die jeweiligen Intensitäten, der mit der *lacP*- und der *lacZ*-spezifischen Sonde detektierten Banden der einzelnen Entnahmezeitpunkte über den zeitlichen Verlauf der Kultur von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 korrelierten miteinander, wobei die mit der *lacP*-Sonde erzeugten Signale jeweils intensiver waren. Diese Befunde erlauben die Schlußfolgerung, daß die Gene *lacP* und *lacZ*, deren genetische Organisation eine Operonstruktur vermuten läßt (**Abb. 4.8.1.2-1**), bei Anwesenheit des Zuckers Laktose als Einheit transkribiert werden. Ob das potentielle Regulatorgen *lacR* ebenfalls Teil dieser Transkriptionseinheit sein könnte, kann nicht abschließend geklärt werden, da der Startpunkt des *lac*-Transkriptes ausgehend von  $P_{lac}$  nicht bestimmt wurde. Die Summe der Teilbefunde spricht aber für ein Transkript, welches *lacR* mit einschließt. Der Vergleich mit dem für *Lactobacillus* ermittelten Promotorkonsensus (Matern *et al.*, 1994) führte zum Auffinden einer gut konservierten Promotorregion stromaufwärts von *lacP*. Direkt stromaufwärts von *lacR* befinden sich keine den Konsensusmotiven für -35- und -10-Regionen ähnelnde Abschnitte. Die *lacZ-lacR'* intergene Region weist keine für einen *rho*-unabhängigen Terminator typische Sekundärstruktur auf. 122 bp stromaufwärts von *lacP* liegt das Zentrum der durch Integration des IS-Elementes ISL6 (Lapierre *et al.*, 2002) deletierten Terminatorstruktur von *lacA*. Alle Hinweise deuten darauf hin, daß sich der Transkriptionsstartpunkt des ca. 6,15 kb großen *lac*-Transkriptes zwischen *lacP* und dem stromaufwärts von *lacP* lokalisierten ISL6 im Bereich des mit  $P_{lac}$  bezeichneten potentiellen Promotors befinden sollte.

Die parallel zur Northern-Hybridisierung ermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten (Kap. 4.9.2) zeigten, daß der Gehalt an *lac*-mRNA und die enzymatischen Aktivitäten korrelierten. Die in Laktose kultivierten Zellen von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wiesen eine im Mittel 55-fach höhere Aktivität gegenüber der in Glukose gewachsenen Kultur auf. Für in Glukose gewachsene Zellen wurde bei allen Entnahmezeitpunkten eine basale Aktivität von durchschnittlich 60 Units bestimmt. Bei keinem der drei Meßpunkte konnte mit den beiden eingesetzten Sonden ein Transkript detektiert werden. Diese Befunde sprechen für die Aktivierung der Transkription der Laktoseverwertungsgene *lacP* und *lacZ* bei Anwesenheit von Laktose, sowie für die fast vollständige Repression durch Metaboliten anderer C-Quellen bei Abwesenheit von Laktose. Als weiterer enzymatische Marker wurden die Aktivitäten der *D-LDH*-Dehydrogenase bestimmt. Dieses Enzym hydriert das am Ende der Glykolyse anfallende Pyruvat zu *D*-Laktat (siehe **Abb. 5.3.1-1**), dem hauptsächlich Endprodukt des Zuckerstoffwechsels bei homofermentativen LAB wie *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 (Bernard *et al.*, 1991). Die Funktion dieses Enzyms setzt also, verglichen mit LacP und LacZ, die am Beginn der Laktoseverwertungskaskade stehen, erst ganz zum Schluß des Energiehaushaltes ein. Wie man aus den über alle Wachstumsphasen für das Wachstum mit Laktose 2,4-fach höheren *D-LDH*-Aktivitäten ableiten

kann, könnte hier möglicherweise eine regulative Anpassung an das Disaccharid Laktose stattgefunden haben. Gleichzeitig stellt sich die Frage nach der Sinnhaftigkeit der Regulation bzw. Anpassung einer solchen enzymatischen Funktion, da sie ja am Ende der Glykolyse eingreift, wo die verschiedenen Stoffwechselwege zum Transport und Abbau der unterschiedlichen Zuckersubstrate bereits in der Glykolyse zusammengeführt wurden. Für *Streptococcus thermophilus* konnte diese Frage beantwortet werden. Glukose, die das klassische Beispiel eines über PTS-Systeme schnell und effizient verwertbaren Zuckers darstellt, ist ein nicht-PTS Zucker für *S. thermophilus*. Solche schnell verwertbaren PTS-Zucker reduzieren normalerweise HPr-Ser-P/CcpA-vermittelt die Expression von Genen, die an der Verwertung anderer PTS- oder nicht-PTS-Substraten beteiligt sind. Neben der Tatsache, daß Glukose ein nicht-PTS-Zucker für *S. thermophilus* ist, handelt es sich für diesen Organismus auch um ein schlecht verwertbares Substrat (Poolman, 1993). Laktose ist ein nicht-PTS Zucker für diesen Organismus, aber ein sehr gutes Wachstumssubstrat, auf dem *S. thermophilus* sogar schneller wächst als zum Beispiel auf dem PTS-Zucker Sukrose. Das deutet an, daß *Streptococcus thermophilus*, ein homofermentatives Milchsäurebakterium, hochgradig auf das Wachstum mit Laktose als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle adaptiert ist. Das *S. thermophilus lac*-Operon kodiert für eine Laktose-Permease (*lacS*) und eine  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*), die für Transport und Hydrolyse von Laktose sorgen. Die Transkription der Gene ist induziert während des Wachstums der Spezies mit Laktose als C-Quelle (Poolman *et al.*, 1989). Im *lacSZ*-Promotor wurde ein *cre* gefunden, was auf daraufhin deutet, daß CcpA in die Kontrolle des Operons involviert ist. Die Gene *galM* und *galE*, die für Enzyme des Leloir-Abbauweges bei der Galaktose-Fermentation kodieren, befinden sich stromaufwärts des *lac*-Operons von *S. thermophilus*. Das komplette *galkTE*-Operon wurde in *S. thermophilus* CNRZ302 entdeckt (Vaughan *et al.*, 2001). Der Stamm ist, wie die meisten *S. thermophilus* Stämme, nicht in der Lage auf Galaktose zu wachsen. Das Gen für den Regulator *galR* liegt stromaufwärts des *galkTE*-Operons. Es kodiert für einen Regulator der LacI/GalR-Familie transkriptioneller Regulatoren, der als Aktivator des *gal*- und des *lac*-Operons in *S. thermophilus* CNRZ302 in Anwesenheit von Laktose und/oder Galaktose fungiert (Vaughan *et al.*, 2001). GalR aus *S. thermophilus* besitzt große Ähnlichkeit zu GalR aus *Streptococcus mutans* (75 % ähnliche Aminosäuren, 57 % identische Aminosäuren) und zu GalR aus *Lb. casei* (59 %, 40 %) (Ajdic *et al.* 1996; Bettenbrock und Alpert, 1998). Interessanterweise hat auch LacR aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* LL44 36 % identische Aminosäuren zu GalR aus *Streptococcus mutans* (Lapierre *et al.*, 2002). Diese Daten sprechen dafür, daß LacR aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* LL44 sowie das komplette LacR aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 auch als Aktivator des *lac*-Operons fungieren könnten. Zusätzlich konnte bei der Charakterisierung des CcpA aus *S. thermophilus* CNRZ32 (van den Boogard *et al.*, 2000) die Aktivierung der Laktat-Ddehydrogenase durch CcpA gezeigt werden. Der Promotor des *ldh*-Gens besitzt ein *cre* 29 bp stromaufwärts der -35-Region des Promotors, was die Reduktion der *ldh*-Expression in einer *ccpA*-Mutante von *S. thermophilus* um einen Faktor von zwei erklärt. Dies entspricht der laktose-spezifisch 2,4-fach höheren Aktivität der D-LDH aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. Das *D-ldh* aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 liegt nicht kloniert vor. Deshalb ist auch nicht bekannt, ob ein (oder mehrere) *cre* als Operator für die PepR1/CcpA-vermittelte Regulation in Frage kommen. Abschließend betrachtet, lassen die oben angeführten Daten den Schluß zu, daß bei *S. thermophilus* und *Lactobacillus delbrückii* eine ähnliche Adaption an die vorherrschende C-Quelle ihres bevorzugten Habitats Milch stattgefunden zu haben scheint.

### 5.3.3 Die Relevanz der *cre* des *lac*-Promotors für die durch PepR1/CcpA ausgeübte Katabolitrepression

Der Promotor des *lac*-Operons von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM 7290 besitzt direkt stromabwärts der potentiellen  $-10$ -Region, mit dem ersten Nukleotid seiner linken Halbseite die letzte Base des  $3'$ -Endes der  $-10$ -Region überlappend, einen sehr gut konservierter potentieller *cre*-Operator (*cre*1,  $5'$ -TGTAAGC GTaACA- $3'$ ; Position 469-482 bezogen auf die in **Abb. 4.8.2.4-1** und im Anhang , **7.2**, angegebene Gesamtsequenz der *lac*-Region), der nur in seiner internen Position +3 der rechten Halbseite (a), der von Weickert und Chambliss (1990) postulierten Konsensussequenz (TGWNANC GNTNWCA) für das *catabolite responsive element* (*cre*) nicht entspricht.

Stromabwärts des Translationstarts von *lacP* (Pos. 556-569) befindet sich mit  $5'$ -TGgCAAC GAcGTCt- $3'$  ein weiteres potentielles *cre*-Element, welches in den drei klein dargestellten Basen seiner Abfolge von der *cre*-Konsensussequenz (Weickert und Chambliss, 1990) abweicht. Ob diese beiden potentiellen Operatoren einzeln oder gemeinsam an der zuckerspezifischen CcpA- bzw. PepR1-vermittelten Regulation des *lac*-Operons über die Beeinflussung der vom potentiellen Promotor  $P_{lac}$  ausgehenden Transkription beteiligt sind, wurde in Kap. **4.10** näher untersucht.

Betrachtet man die Resultate der  $\beta$ -Galaktosidase-Assays in den unterschiedlichen Organismen und Mutanten dieser Stämme mit den beiden jeweils in geeignete Vektoren subklonierten  $P_{lac}$ -*lacZ*-Translationsfusionen vergleichend, so läßt sich direkt ein gravierender Unterschied zwischen den *E. coli*-Resultaten und den in den beiden Gram-positiven Organismen gewonnenen Ergebnissen feststellen. In *E. coli* werden werden beide Promotorfusionen durch die Anwesenheit von PepR1 aktiviert. Diese Beobachtung wird für eine der Promotorfusionen ( $P_{lac1}$ ) durch die Zugabe von 0,5 % Glukose sogar noch verstärkt. Dieses Resultat ist nicht im Einklang mit der aus der Position jedes einzelnen der beiden *cre*-Operatoren abzuleitenden Erwartung, daß jedes der Elemente für sich, möglicherweise auch beide zusammen, die Glukose-spezifische Repression des *lac*-Promotors von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 vermitteln (Henkin, 1996; Wray *et al.*, 1994). Es ist nicht auszuschließen, daß hier ein *E. coli* Regulator der LacI/GalR-Familie, wie zum Beispiel *Cra* (Saier und Ramseier, 1996) oder ein Regulator des RafR-Typs (Muiznieks und Schmitt, 1994) eine vorhandene Operatorsequenz stromaufwärts der putativen Promotorregion bindet, die RNA-Polymerase stimuliert und so für die Steigerung der Expression der Fusionskonstrukte mit dem *lacZ* sorgt.

Für die *Staphylococcus xylosus* Mutante TX300 mit der chromosomalen *lac*- bzw. der *lac-ccpA*-Deletion bot sich ein anderes Bild. Die LacZ-Aktivität in TX300(pRBPlac11) war in Anwesenheit von Glukose 3-fach reprimiert, während sie in TX300(pRBPlac21) 5-fach reprimiert war. Dieses Ergebnis bestätigt die kooperative Bindung der beiden *cre* des *lac*-Promotorfragmentes  $P_{lac2}$  durch CcpA. Die sich durch die Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten bei Wachstum von TX300(pRBPlac21) bzw. TX300(pRBPlac11) in Glukose-haltigem Medium ausdrückende Repression war bei den beiden anderen untersuchten Kombination (TX600(pRBPlac21) bzw. TX600(pRBPlac11)) nicht zu erkennen. Sie wiesen nur noch eine geringe Repression auf, die sich in den Repressionsfaktoren 1,08 (TX600(pRBPlac21)) und 1,11 (TX600(pRBPlac11)) ausdrückte. Hieraus kann geschlossen werden, daß PepR1/CcpA eine Glukose-vermittelte reprimierende Wirkung auf den Promotor des *lac*-Operons ausübt, die mit Wahrscheinlichkeit über beide *cre*-Operatoren kooperativ verläuft (Wray *et al.*, 1994).

### 5.4 Schlußbemerkung

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten und diskutierten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß in *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 ein CcpA-ähnliches System an der Koordination von proteolytischen Funktionen und Energiestoffwechsel beteiligt ist. Während des Wachstums in Milch sind Milchsäurebakterien auf die Energiegewinnung durch Vergärung des Milchzuckers Laktose angewiesen. Da exogene Proteinsubstrate (Caseine) und damit alle essentiellen Aminosäuren im Überschuß vorhanden sind, dürfte die Verfügbarkeit der Energiequelle den limitierenden Faktor darstellen. Die Expressionskontrolle degradativer Enzyme in Abhängigkeit vom Vorhandensein der Energiequelle könnte einen ökonomischer Umgang der Zelle mit dem Energievorrat bei Wachstum in Milch gewährleisten und somit einen Wachstumsvorteil darstellen (Dick A., 1999).

---

## VI. Zusammenfassung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die begonnene Analyse zur Genregulation durch den potentiellen Transkriptionsregulator PepR1 aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 fortgesetzt. PepR1 wurde aufgrund von Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten zu Proteinen der CcpA-Subfamilie, die zur GalR/LacI-Familie transkriptioneller Regulatoren gehört, identifiziert. Das *pepR1*-Gen ist divergierend zum *pepQ*-Gen angeordnet, welches für die Peptidase Q kodiert. Beide Gene besitzen eine gemeinsame intergene Region von 152 bp.

Bei Promotorstudien im heterologen *E. coli* mit einem partiellen  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*'lacZ*) aus *E. coli*, welches mit einem Teilbereich der intergenen Region von *pepR1* und *pepQ* sowie den ersten sechs Kodons des *pepQ*-Gens fusioniert wurde, erhöhte die Anwesenheit von PepR1 *in trans* die gemessene Aktivität des  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionskonstruktes um einen Faktor von 1,95, während zwei im *cre*-Operator mutierte Varianten desselben Promotors nur 1,26- bzw. 1,21-fach erhöhte Aktivitäten zeigten.

Analog ausgeführte Analysen mit den ebenfalls *cre*-ähnliche Elemente enthaltenden Promotorbereichen der Peptidasegene *pepI* und *pepX* ließen keine signifikante Beeinflussung der Expression der Reporterkonstrukte durch PepR1 erkennen.

Bandshift-Analysen mit gereinigten PepR1-Protein und dem nicht modifizierten *pepQ*-Promotorfragment sowie einer Variante mit einem in zwei Basenpaaren mutierten *cre*-Operator zeigten die vollständige Retardierung beider DNA-Fragmente. Diese Resultate konnten die 14 bp palindromische *cre*-Sequenz als den *cis*-aktiven Operator für die Wirkung des DNA-bindenden Regulators PepR1 bestätigen.

Die CcpA-äquivalente Funktion von PepR1 aus *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* als pleiotroper Regulator wurde durch die partielle Komplementation einer *ccpA*-Mutation von *Staphylococcus xylosus* C2a durch das *pepR1*-Gen von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* nachgewiesen. In der durch das plasmidkodiert vorliegende *pepR1*-Gen komplementierten *ccpA*-Mutante von *Staphylococcus xylosus* C2a war die Zucker-vermittelte Repression der  $\alpha$ -Glukosidase in Gegenwart von Glukose als Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp fast komplett wiederhergestellt. Die autogene Regulation von *pepR1* wurde in *E. coli* durch die parallele Expression des mit dem promotorlosen *'lacZ*-Gen translational fusionierten *pepR1*-Promotors und dem unter der Kontrolle des eigenen bzw. des *E. coli lac*-Promotors exprimierten PepR1 gezeigt. Die Anwesenheit von PepR1 *in trans* reprimierte in beiden Fällen die Aktivität des *PpepR1-lacZ*-Reporterkonstruktes um einen Faktor von zwei.

Die Transkripte der Peptidasegene *pepI*, *pepQ*, *pepX* und des *pepR1*-Gens wurden parallel zur Bestimmung der zugehörigen Aktivitäten der Peptidasen I, Q, und X über den Wachstumsverlauf von in Glukose oder Laktose wachsenden Zellen von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* verfolgt. Beim Wachstum mit Glukose war die PepQ-Aktivität gegenüber Laktose durchschnittlich um einen Faktor von 1,8 erhöht, die Menge an *pepQ*-mRNA korrelierte mit den Aktivitäten. Die Aktivitäten der Pep I und der Pep X waren bei in Laktose kultivierten Zellen leicht erhöht, sie zeigten jedoch Wachstumsphasen-abhängige Modulationen bei den Aktivitäten sowie Abweichungen bei der Korrelation von enzymatischer Aktivität zur Menge an spezifischer mRNA. Die Menge an *pepR1*-spezifischer mRNA variierte Wachstumsphasen-abhängig sowohl bei der Glukose- als auch der Laktose-Kultur mit einem Faktor von zwei bis drei.

Die *lac*-Region von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 wurde kloniert, sequenziert und partiell charakterisiert. Durch den Vergleich mit DNA-Sequenzdaten von bekannten *lac*-Genen anderer Milchsäurebakterien konnten drei offene Leserahmen ermittelt werden. Das *lacP*-Gen (1881 bp), dessen unvollständiger 5'-Genabschnitt durch Inverse PCR komplettiert wurde, kodiert für eine Permease. Drei Basenpaare stromabwärts von *lacP* beginnt das Gen *lacZ* (3024 bp) für die  $\beta$ -Galaktosidase, auf die in gleicher Leserichtung 51 bp stromabwärts, das an seinem 3'-Ende nur unvollständig vorliegende *lacR'* folgt. Northern-Blot-Analysen konnten zeigen, daß *lacP* und *lacZ* (sowie vermutlich auch *lacR'*) bei Wachstum von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 in Medium mit dem Zucker Laktose als mRNA von circa 6,15 kb Größe gemeinsam transkribiert werden. Die durch CcpA/PepR1-vermittelte Kontrolle über *cre*-Operatoren des *lac*-Promotors konnte mit zwei Translationsfusionen von  $P_{lac}$  mit dem *'lacZ* aus *E. coli* in *S. xylosus lac*- bzw. *lac*- und *ccpA*-Mutanten gezeigt werden.

## VII. Anhang

### 7.1 Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide

**Tabelle 7.1-1: Unmodifizierte Oligonukleotide** (Nicht paarende Basen sind klein geschrieben, mutierte Basen zusätzlich im Fettdruck dargestellt; Restriktionsschnittstellen *kursiv* und unterstrichen gedruckt.)

Primer (Primer-Nummer)	Länge in bp	Nukleotidsequenz (5'-3')
Prim1	34	TTT GTA ATT TGT CTA AAT TCA TGG CAA AAT TCT C
pQfus1 (P1)	30	TAA TTT GTC TAA ATT CAT GGC AAA ATT CTC
pQfusmut1 (P3)	32	CAT GAG AAC ATT TTT TGT GCA ATt aCT TAC AG
pQfusmut2 (P4)	32	CAT GAG AAC ATT TTT TGT GCA ATC GcC gAC AG
piup	20	ACC AGT TAA AGT CTG TTT CA
pidown2	19	TTT TTC TGT GAT TTG CAT C
pxup2	21	GTG TTC AAT TTA TTC TTG CAA
pxdown2	20	ATA TTG ATT GTA TTT CAT GC
PR1fus1 (P11)	33	TAC ATC TTG CTT ATT CAT AAT AAC AGC CCT ACC
PR1fus2 (P12)	38	CTG AAA AAA GTT GAA AAA ATA GCT GTA AGC GAT TGC AC
I8037start (#66)	37	CAA ATC ACA GAA AAA TAT CTT CCA TTT GGA AAT TGG C
I8037stop (#67)	41	atg <u>gat</u> <u>cc</u> T AGT CCT GGC TGA TTA ACC AGT CAG ACA ACA GC
Q8037start (#68)	46	att <u>CAT</u> <u>GAA</u> TTT AGA CAA ATT ACA AAA CTG GCT GCA <u>GGA</u> AAA CGG G
Q8037stop (#56)	48	atg <u>gat</u> <u>c</u> CT TAT TCC TTA ACT GGC AGA ACC TTC AAT TCC TTG CTA GTG
pepR1-rca-start (#180)	44	atT <u>cAT</u> <u>GAA</u> TAA GCA AGA TGT AAC CAT TTA CGA TGT TGC TCG GG
pepR1-pst-stop (#181)	37	aaA <u>ctg</u> <u>cag</u> TTA CTT GTT CAA GGT ACT TTG CTT CTT G
pepX-start-2.AS (#182)	37	AAA TAC AAT CAA TAT GCC TAC GTT GAA ACC AGT CCG G
pepX-stop-Xbai (#183)	39	Gct <u>cta</u> <u>Ga</u> T TAT TTC CGG TAG AGC AAA AGA GCA GTT CCG

Fortsetzung **Tabelle 7.1-1:**

Primer (Primer-Nummer)	Länge in bp	Nukleotidsequenz (5'-3')
R1rbsup (PR11)	37	caa <u>gga</u> <u>tcc</u> CAG TAT TTA GTA TTT AGA TAG GTA GGG C
R1enddown (PR12)	37	AAA <u>ctg</u> <u>cag</u> TTA CTT GTT CAA GGT ACT TTG CTT CTT G
jo-i-lacP-rev2 (#161)	28	CAA ACC AGT TGG ACA AGG CCC CGC CCA G
jo-i-lacP-for2 (#162)	30	GCT ATG TTT GCC TTC CCG GCA GTC ATG CTC
lacP-up1 (#253)	33	GTA AGC GTA AAC AAG TTA GCA CAC CTA AAG GAG
lacP-down1 (#254)	27	GAC TGG GGT GGC CAA AGT GAA GCT TTC
PlacP-for1 (#260)	27	CCC AAT TTT GGG GGT CAC ATC AGA CTC
PlacP-rev1 (#261)	27	CTT CAT GAT TTT CTC CTT TAG GTG TGC
PlacP-rev2 (#208)	28	GTA GAA GAC GTC GTT GCC AAA GGC ACC G
<i>Xho</i> I-T- <i>brnQ</i>	36	taC <u>TCG</u> <u>AGC</u> TTA AAG ACA TTA CAC AAA TAG TTC GAG
<i>Xba</i> I-T- <i>brnQ</i>	35	taT <u>CTA</u> <u>GAG</u> TCA CTG TTA TCT TCG CTA TTT TAG CC
lacZLbdel-SphI (#140):	39	atc <u>gta</u> <u>cgT</u> CAC TTC AAT AGA AGT GGC TGA ATC ACC AGC
lacZLbdel- <i>Bam</i> HI (#141)	39	cgg <u>gat</u> <u>ccc</u> AAG TTA GAA GGG AAG AAT TAG AAA ATG AGC

**Tabelle 7.1-2: IRD800- bzw. IRD41-markierte Primer**

Primer (Primer-Nummer)	Länge in bp	Nukleotidsequenz (5'-3')
pUC/M13- forward	24	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
pUC/M13- reverse	22	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
MR9	24	TCA ACG GGG CCA TCA TCA CCA AGG
pMCKon	25	CAT CAC CGC GAG GCG GTT TTC TCC G

Fortsetzung Tabelle 7.1-2

Primer (Primer-Nummer)	Länge in bp	Nukleotidsequenz (5'-3')
delnis-uni (IR#3)	24	TGT CAG ATA GGC CTA ATG ACT GGC
pnis-rev (IR#2)	24	TTT GCT GAT AAC ACC CTT AAT GGC
pnis-uni (IR#1)	24	AGG TGC ATC ACC ACG CAT TAC AAG
E-gen-forward (IR#4/Udo1)	24	CTG CGT TGA GGC TTG CGT TTA TGG
E-gen-revers (IR#5/Udo2)	24	GTG TTT CCT GCG CGT ACA CGC AAG
pLG-forward (IR#8)	24	CTG CTC GCT TCG CTA CTT GGA GCC
pLG-revers (IR#9)	24	ACC TGT GGC GCC GGT GAT GCC GGC
pUH89-bam (IR#49)	29	CCC CCT GTT GAC AAT TAA TCA TCG GCT CG

## 7.2 Nukleotid-und Aminosäuresequenzen

Gezeigt ist die Nukleotidsequenz des sequenzierten *lac*-Bereiches (6052 bp) von *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen von LacP, LacZ und LacR'. Transkriptions- und Translationssignale der Gene sind kursiv bzw. fett gedruckt, die *cre*-ähnlichen Sequenzen sind fett gedruckt und grau unterlegt. Die Stoppkodons sind durch Sterne (\*) markiert. Bei LacZ konservierte Reste sind fett gedruckt und grau unterlegt dargestellt.

```

1  TGATCAGCATTGAGAAGCACCCGGCTCTTAACGGGCTTATTTTCCACTCAGACCGTGGCTGGCAATATCAGCACCAAGC 80
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
81  ATATCAAGCCGCTCTGGCTAACAGAGGGATCGATCAAAGTATGTCCAGGTTGGTAATTCTCTTGATGACGGCTTAATGG 160
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
161 AGGGCTTCTTCGGCATTCTTAAGCGGGAGATGTTCTACGGCCAAGAACATAAAATACAAGGACCTAAATGAGCTTGAGCAA 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
241 GCTATTCACAAATACATCGATTACTACAACAACGTAAGAATCAAGACAGGACGAAAAACATGACCCCGATTGAATATCG 320
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
321 GAATCATGTTTTAACAACCTTAACGGCGTAATACTAAATTGTCCCAATTTGGGGGTACATCAGACTCTTTGAAAAAAG 400
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                                     -35 lacP                               -10 lacP      creI
401 AGTCATTTTTTGTCTTACTAAAAGTATTTTGGTAAAACATCTTGATTGTTTAGTAAACAAGTCATATCTGTAAGCGTAAA- 480
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```



**RBS *lacP***

481 CAAGTTAGCACACCTAAAGGAGAAAATCATGAAGAAAAGCATGTCTCACGCTTGTTCGTACGCGGCCGGTGCCTTGGCA- 560  
M K K K H V S R L S Y A A G A F G N -  
LacP =>

***cre2***

561 ACGACGCTCTCTACGCGACTCTGTCAACCTACTTTATCGTCTTCGTCAACCACCCACTCTTTAATGCCAGTGACCACAAG 640  
D V F Y A T L S T Y F I V F V T T H L F N A S D H K -  
ATGATCTTTATCATCACCAACTTGATCGCCGCCATCCGGATCGGGGAAGTCTGATCGACCCCTTGATCGGTAACGCCAT  
641 M I F I I T N L I A A I R I G E V L I D P L I G N A I - 720  
CGACCGGACCAGAAAGCCGATGGGGGAAGTTCAGCCCTGGGTGTGGGCGGGGGATCATCAGCTCATTAGCCCTCTTAG  
721 D R T E S R W G K F K P W V V G G G I I S S L A L L A - 800  
CCCTCTTTACCGACTTTGGCGGCCTTAACCAAAGCAACCCCGTTGTTTACTTAGTAATCTTCGGTATTGTTTACTTGATT  
801 L F T D F G G L N Q S N P V V Y L V I F G I V Y L I - 880  
ATGGATATCTTCTACTCATTTAAAGACACTGGCTTCTGGCCATGATCCCGCCCTTGTCCCTGGACTCCCGGAAAGAGA  
881 M D I F Y S F K D T G F W A M I P A L S L D S R E R E - 960  
GAAGACCTCCACCTTCGCCAGAGTCGGCTCCACCATCGGGGCCAACCTGGTCGGGTAGTCATACCCCAATCGTCTCT  
961 K T S T F A R V G S T I G A N L V G V V I T P I V L F - 1040  
TCTTCTCGCCAGCAAGGGCAACCCACCGGGATAAGCAGGGTGGTTCTTCTTTCCTTGATCGTGGCCATTGTCGGC  
1041 F S A S K G N P T G D K Q G W F F F A L I V A I V G - 1120  
ATCTTGACCTCAATTGCCGTTGGTCTTGGTACTCACGAAGTAAAATCCGCCCTGCGGAAAGCAAGAAAAGACCACTTT  
1121 I L T S I A V G L G T H E V K S A L R E S K E K T T L - 1200  
GAAGCAGGTCTTTAAGTCTGGGGCAAACGACCAGCTCCTCTGGCTGGCCTTTCCTACTGGTTCTACGGCCTGGGTG  
1201 K Q V F K V L G Q N D Q L L W L A F A Y W F Y G L G V - 1280  
TCAACACCCTGAACGCTCTGCAACTTTACTACTTTTCATACATCTTAGCGATGCCACGGCTACAGCCTGCTTTACACC  
1281 N T L N A L Q L Y Y F S Y I L G D A H G Y S L L Y T - 1360  
ATCAACACCTTTGTCGGTTTAATCTCTGTATCCTTCTTCCCATCACTGGCCAATAAGTTCAACAAAAGCGCCTCTTCTA  
1361 I N T F V G L I S V S F F P S L A N K F N K K R L F Y - 1440  
CGCCTGCATCGCGGTGATGCTGTTAGGGATCGGGTCTTCTCCGTGGCCAGCGTCTCTGGCCCTGTCCCTTGTGGGG  
1441 A C I A V M L L G I G V F S V A S G S L A L S L V G A - 1520  
CAGAATTCCTTTATTCCGCAGCCTCTGGCCTTCCTGGTCTGTTTGTATGATCCTCTCTGACGCTGTTGAATACGGCCAG  
1521 E F F F I P Q P L A F L V V L M I L S D A V E Y G Q - 1600  
CTGAAAACCTGGCCACAGAGACGAAGCTTTGACCCTGTCTGTCCGCCATTGGTCGACAAGCTGGGCGGGGCCCTTGTCCAA  
1601 L K T G H R D E A L T L S V R P L V D K L G G A L S N - 1680  
CTGGTTGTTTCTTGTATTGCCGTAACCTGCCGCATGACCGTGGGGCGACTGCCTCAACAATTACCGCTCATGGCCAGA  
1681 W F V S L I A V T A G M T A G A T A S T I T A H G Q M - 1760  
TGGTCTTCAAGTTAGCTATGTTTGCCTTCCCGGAGTCATGCTCTTGTACTGTTTCTATTTTCGCCAAAAGGTCCTC  
1761 V F K L A M F A F P A V M L L I T V S I F A K K V L - 1840  
TTGACTGAAGAAAAGCACGCGAAATCGTCGATCAGCTGGAAGTCAATTTCGCCAAAAGCCATGCCAAAAGCCGGCGCA  
1841 L T E E K H A E I V D Q L E A Q F G Q S H A Q K P A Q - 1920  
AGAAAGCTTCACTTTGGCCACCCAGTCTCCGGCAATTAATGAACCTGGACATGGTTGACGACCCGGTCTTTGCCGACA  
1921 E S F T L A T P V S G Q L M N L D M V D D P V F A D K - 2000  
AAAAGTTAGGCGACGGCTTTGCGCTGGTGCCAGCAGACGGTAAGGGCGTACGCGCGGAGTTGCCGGTACTGTCCGCCAG  
2001 K L G D G F A L V P A D G K G V R A R V A G T V R Q - 2080

```

CGGGCCAAGACACGGCACTCGATCGTCCTGGAAAATGAACATGGGGTCTTGGTCTTGATTATATATGGCCTGGGCACGGT
2081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
   R A K T R H S I V L E N E H G V L V L I H I G L G T V -

CAAATTAACGGGACTGGCTTTGTCTAGCTATGTTGAAGAGGGCAGCCAGGTAGAAGCCGGCCAGGAGATCCTGGAATTCT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2240
   K L N G T G F V S Y V E E G S Q V E A G Q E I L E F W -

GGGACCCGGTGATCAAGCAGGCCAAGCTGGACGACACGGTAGTCGTGACCGTCATCAACAGCGAACTTTTCGCAAATAGC
2241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2320
   D P V I K Q A K L D D T V V V T V I N S E T F A N S -
                                     RBS lacZ
CAGCTGCTCTTGCCGATCGGCCACAGCGTCCAAGCCCTGGATGATGATTCAAGTTAGAAGGGGAAGAATTAGAAAATGAG
2321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
   Q L L L P I G H S V Q A L D D V F K L E G K N * M S -
                                               LacZ =>

CAATAAGCTAGTAAAAGAAAAAGAGTTGACCAGGCAGACCTGGCCTGGCTGACTGACCCGGAAGTTTACGAAGGCAATA
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2480
   N K L V K E K R V D Q A D L A W L T D P E V Y E G N T -

CAATTCCCCCGCACTCCGACCATGAGTCCCTCAAAGCCAGGAAGAACTGGAGGAGGGCAAGTCCAGTTTGTAGTCAGTCC
2481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2560
   I P P H S D H E S L Q S Q E E L E E G K S S L V Q S -

CTGGACGGGAAGTGGCTGATTGACTACGCTGAAAACGGCCAGGGACCAGTCAACTTCTATGCAGAAGACTTTGACGATAG
2561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
   L D G N W L I D Y A E N G Q G P V N F Y A E D F D D S -

CAATTTTAAGTCAGTCAAAGTACCCCGCAACCTGGAACCGCAAGGCTTTGGCCAGCCCCAGTATGTCAACATCCAATATC
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2720
   N F K S V K V P R N L E P Q G F G Q P Q Y V N I Q Y P -

CATGGGACGGCAGTGAGGAGATCTTCCCGCCCCAAGTTCCAAGCAAAAATCCGCTCGCTTCTTATGTCTAGATACTTTGAC
2721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2800
   W D G S E E I F P P Q V P S K N P L A S Y V R Y F D -

CTGGATGAAGCTTTCTGGGACAAGGAAGTCAGCTTGAAGTTTGCCGGGGCGGAACAAGCCATCTATGTCTGGCTGAACGG
2801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
   L D E A F W D K E V S L K F A G A E Q A I Y V W L N G -

CCACTTCGTCGGCTACGGGGAAGACTCCTTTACCCCAAGCGAGTTTATGGTTACCAAGTTTCTCAAGAAAGAAAATAACC
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2960
   H F V G Y G E D S F T P S E F M V T K F L K K E N N R -

GCCTGGCAGTGGCTCTCTACAAGTATTCTTCCGCTCCTGGCTGGAAGACCAGGACTTCTGGCGCTTGTCTGGTTTGTTC
2961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3040
   L A V A L Y K Y S S A S W L E D Q D F W R L S G L F -

AGATCAGTGACTCTTCAGGCCAAGCCGCTTCTGCACTTGAGGACCTTAAGCTTACGGCCAGCTTGACCGATAACTACCA
3041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
   R S V T L Q A K P L L H L E D L K L T A S L T D N Y Q -

AAAAGGAAAGCTGGAAGTCGAAGCCAATATTGCCTACCGCTTGCCAAATGCCAGCTTTAAGCTGGAAGTGCGGGATAGTG
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3200
   K G K L E V E A N I A Y R L P N A S F K L E V R D S E -
AAGGTGACTTTGGTTGCTGAAAAGCTGGGCCCAATCAGAAGCGAGCAGCTGGAATTCACTCTGGCTGATTTGCCAGTAGCT
3201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3280
   G D L V A E K L G P I R S E Q L E F T L A D L P V A -

GCCTGGAGCGCGAAAAGCCTAACCTTTACCAGTCCGCCTGTATTTATACCAGGCAGGCAGCCTCTTAGAGGTTAGCCG
3281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
   A W S A E K P N L Y Q V R L Y L Y Q A G S L L E V S R -

GCAGAAAGTGGGTTTCCGCAACTTTGAACATAAAGACGGGATATGTACCTTAACGGCCAGCGGATCGTCTTCAAGGGGG
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3440
   Q K V G F R N F E L K D G I M Y L N G Q R I V F K G V -

TCAATCGGCACGAATTTGACAGTAAGTTGGGCCGGCTATCACGGAAGAGGATATGATCTGGGACATCAAGACCATGAAG
3441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3520
   N R H E F D S K L G R A I T E E D M I W D I K T M K -

CGAAGCAACATCAATGCTGTCCGCTGCTCTCACTACCCGAACCAAGTCCCTCTTTTACCGCTCTGTGACAAGTACGGCT
3521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
   R S N I N A V R C S H Y P N Q S L F Y R L C D K Y G L -

TTACGTCATTGATGAAGCTAACCTGGAAGCCACGGCACCTGGGAAAAGTGGGGGGGCACGAAGATCCTAGCTTCAATG
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3680
   Y V I D E A N L E S H G T W E K V G G H E D P S F N V -

```

```

3681  TTCCAGGCGATGACCAGCATTGGCTGGGAGCCAGCTTATCCCGGTGAAGAACATGATGGCTCGGACAAAGAACCATGCT 3760
      P G D D Q H W L G A S L S R V K N M M A R D K N H A -
3761  TCAATCCTGATCTGGTCTTTAGGCAATGAGTCTTACGCCGGCACTGTCTTTGCCCAAATGGCTGATTACGTCCGGAAGGC 3840
      S I L I W S L G N E S Y A G T V F A Q M A D Y V R K A -
3841  TGATCCGACCCGGGTTTCAGCACTATGAAGGGGTGACCCACAACCGAAGTTTGACGACGCCACCCAGATTGAAAGCAGGA 3920
      D P T R V Q H Y E G V T H N R K F D D A T Q I E S R M -
3921  TGTATGCACCCGGCCAAGAAGATTGAAAAGTACTTGACCAAGAAGCCGGCAAAGCCATTTATCTCAGTTGAATACGCCAC 4000
      Y A P A K K I E K Y L T K K P A K P F I S V E Y A H -
4001  GCCATGGCAAACCTCCGTGCGTGACCTGGCCGCCTACACGGCCCTGGAAAAATACCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTG 4080
      A M A N S V G D L A A Y T A L E K Y P H Y Q G G F I W -
4081  GGACTGGATTGACCAAGGACTGAAAAAGACGGGCACCTGCTTTATGGGGCGACTTCGATGACCGCCAACCGACTATG 4160
      D W I D Q G L E K D G H L L Y G G D F D D R P T D Y E -
4161  AATTCTGCGGAAACGGCCTGGTCTTTGCTGACCGGACTACGTCTCCGAAACTGGCCAATGTCAAGGCTCTGTACTCCAAC 4240
      F C G N G L V F A D R T T S P K L A N V K A L Y S N -
4241  CTTAAGCTAGAAGTAAAAGATGGGCAGCTCTTCCTTAAAAACGACAATTTATTTACCAACAGCTCAGCCTATTACTTCTT 4320
      L K L E V K D G Q L F L K N D N L F T N S S A Y Y F L -
4321  GACCAGTCTCTTAGTTGACGGCAAATTGACCTATCAGAGTCAGCCTTTGACCTTTGGCTTAGAACCTGGTGAATCAGGGA 4400
      T S L L V D G K L T Y Q S Q P L T F G L E P G E S G T -
4401  CCTTTGTCCTTCTTGGCCGGAAGTCGAAGATGAAAAAGGGGAGATCGTCTACCAGGTAACAGCTCACTTGAAGAAGAC 4480
      F V L P W P E V E D E K G E I V Y Q V T A H L K E D -
4481  TTGCCATGGGCGGATGAGGGCTTCACTGTGGCTGAAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGG 4560
      L P W A D E G F T V A E A E E V A Q K L P E F K P E G -
4561  GCGGCCAGATTTAGTTGATCCGACTACAACCTAGGCCTGAAAGGAAATAACTTCCAAATTCCTTCTCCAAGGTCAAGG 4640
      R P D L V D S D Y N L G L K G N N F Q I L F S K V K G -
4641  GCTGGCCGGTTTCCCTCAAGTATGCCGGTAGGGAATACTTGAAGCGGCTGCCGGAATTTACCTTCTGGCGGGCCCTGACG 4720
      W P V S L K Y A G R E Y L K R L P E F T F W R A L T -
4721  GACAACGACCCGGGAGCTGGTTACGGCTATGATCTGGCCCGGTGGGAAAATGCCGGCAAGTATGCCCGCTTGAAGACAT 4800
      D N D R G A G Y G Y D L A R W E N A G K Y A R L K D I -
4801  CAGCTGCGAGGTCAAGGAAGACTCCGTTTTGGTCAAGACTGCCTTTACGTTGCCTGTGCGCTTAAAGGGTGATTTAACCG 4880
      S C E V K E D S V L V K T A F T L P V A L K G D L T V -
4881  TGACCTATGAAGTCGATGGACGGGCAAGATTGCTGTAACAGCTGACTTCCCTGGCGGGAAGAAGCCGGCCTCTTGCCA 4960
      T Y E V D G R G K I A V T A D F P G A E E A G L L P -
4961  GCCTTTGGCTTGAACCTTGCCTTGCCAAAAGAACTCAGCGACTACCGCTACTATGGCTTAGGGCCAAATGAAAGCTATGC 5040
      A F G L N F A L P K E L S D Y R Y Y G L G P N E S Y A -
5041  CGACCGCTTGAAGGCAGATCCCTTGGCATTACCTGGGAGCGGTGGAAAAGAACTTCACTCCATACCTGCGTCCGCAAG 5120
      D R L E G R S L G I Y L G A V E K N F T P Y L R P Q E -
5121  AAGTGGCAAACCGGAGCAAGGTCCGCTACTACCAGCTCTTTGATGAAGAAAGCGGGCTGGAGTTTACCCTAATGGGGCA 5200
      A G N R S K V R Y Y Q L F D E E S G L E F T A N G A -
5201  GACTTGAACCTGTGACCCCTGCCATATTCAGCCGCGCAAATGAAAGCTGCAGACCATGCTTTTGAACCTATCTAACAAATTA 5280
      D L N L S A L P Y S A A Q I E A A D H A F E L S N N Y -
5281  CACCTGGGTGACAGCTTTAGCGGCCAGATGGGTGTCGGTGGGGATGACTCCTGGGGCAGAAGGTTTCATCCAGAATTTT 5360

```

```

      T W V R A L A A Q M G V G G D D S W G Q K V H P E F C -
GTCTGGATGCTCAGGAAGCCCGCCAGCTCAAGCTGGTGATTGAGCCACTTCTATTGAAGTGATGCTACAATTGACTTAAAC
5361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5440
      L D A Q E A R Q L K L V I Q P L L L K *
      RBS lacR'
AGCATAAAATTTTAGTAAAAGCGAGTGAAAGAAGATGGCAACGATCAGAGAAGTGGCCAAGGCAGCCGGCGTTTCGCCAGC
5441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
      M A T I R E V A K A A G V S P A -
      LacR' =>
GACGGTTTCCCGGGTCTTGAACCTATGACCAGACCCTGTTCGGTCAATGAGGCAACGCGGCAGAAGATATTCAAAACTGCTG
5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5600
      T V S R V L N Y D Q T L S V N E A T R Q K I F K T A E -
AAGCCATGCACTACCATAAGAGCCGGAAGACCAGAAAGAGCAAGCAAAAGCGCCTGGCGATCTGCCTGTGGTGTGACCAA
5601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5680
      A M H Y H K S R K T R K S K Q K R L A I C L W C D Q -
GACCAGGAGATCAAGGACCTCTATTACTATTCAATCAGAATCAGCGCGCAAGCAGAGGCCAAGAAGCAGGGACTTGAAAG
5681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
      D Q E I K D L Y Y Y S I R I S A Q A E A K K Q G L E S -
CCAGGTCATTTATCCGGCTGATCCTTTGCCCGATCCAGCTGCTTTAGGCGGGATCATCATGATTGGCTACCAGCAGTATT
5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5840
      Q V I Y P A D P L P D P A A L G G I I M I G Y Q Q Y S -
CGCCAGACCGCTTGAATGAAGTCAAAAAGTCTGGCCTGCCCTGGTCTTTGTCGATACTGACACCTTAAAATTGGGTTAC
5841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5920
      P D R L N E V K K S G L P L V F V D T D T L K L G Y -
TGCTCAGTTTGGCTGACTTTGGCCAGGCCATGCAGGAGGCGCTAGAGGTCCTTCTGGGGCAGGGCAGGGAGCGGATCGC
5921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6000
      C S V V A D F G Q A M Q E A L E V F W G Q G R E R I A -
CCTTTTGGATGGTGATTTGGACAGTAATTTTGATAAAAACAACCTTGGTCGAC
6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6052
      L L D G D L D S N F D K N N L V D

```

---

## VIII. Literaturverzeichnis

- Ajdic, D.**, Sutcliffe, I. C., Russell, R. R., & Ferretti, J. J. (1996). Organization and nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* galactose operon. *Gene* 180, 137-144.
- Altschul, S. F.**, Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215: 403-410
- Altschul, S. F.**, Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic.Acids.Res.* 25: 3389-3402.
- Anderson, D. G.** & McKay, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl.Enviro.Microbiol.* 46: 549-552.
- Atlan, D.**, Gilbert, C., Blanc, B. & Portalier, R.(1994). Cloning, sequencing and characterization of the *pepIP* gene encoding a proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397. *Microbiology* 140: 527-535.
- Ausubel, F. M.**, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1990). *Current protocols in molecular biology*. Massachusetts general hospital, Harvard Medical School; J Wiley & Sons; New York.
- Baankreis, R.** & Exterkate, F.A. (1991). Characterisation of a peptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* that hydrolyses di- and tripeptides containing proline or hydrophobic residues as the amino-terminal amino acid. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 323.
- Bachman, B. J.** (1991). Linkage map of *Escherichia coli* K12, Edition 8. *Microbiol.Rev.* 55: 191 ff.
- Barre, P.** (1978). Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic, pentose-utilizing lactobacilli from high temperature fermenting grape-musts. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 337-344
- Bassias, J.** & Brückner, R. (1998). Regulation of lactose utilization genes in *Staphylococcus xylosus*. *J. Bacteriol.* 180: 2273-2279.
- Bernard, N.**, Ferain, T., Garmyn, D., Hols, P. & Delcour, J. (1991). Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 290(1-2): 61-64.
- Bettenbrock, K.** & Alpert, C. A. (1998). The *gal* genes for the Leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2013-2019.
- Birnboim, H.C.** & Doly, J.(1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* 7: 1513-1523.
- Bolotin, A.**, Khazak, V., Stoyanova, N., Ratmanova, K., Yomantas, Y. & Kozlov, Y. (1995). Identical amino acid sequence of the *aroA(G)* gene products of *Bacillus subtilis* 168 and *B. subtilis* Marburg strain. *Microbiology* 141: 2219-2222.
- Bolotin, A.**, Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753.
- Borodovsky M.** & McIninch J. (1993). Recognition of genes in DNA sequence with ambiguities. *Biosystems.* 30: 161-71.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-54.
- Brendel, V.** & Trifanov, E. N. (1984). A computer algorithm for testing potential prokaryotic terminators. *Nucleic.Acids.Res.* 12: 4411-4427.

- Brennan, R. G.** & Matthews, B.W. (1989). The helix-turn-helix DNA binding motif. *J.Biol.Chem.* 264: 1903-1906.
- Brochu, D.** & Vadeboncoeur, C. (1999). The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J. Bacteriol.* 181: 709-717.
- Brückner, R.** & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 141-148.
- Brückner, R.** (1992). A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 122: 187-192.
- Brückner, R.** (1997). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 1-8.
- Brückner, R.,** Wagner, E. & Götz, F. (1993). Characterization of a sucrase gene from *Staphylococcus xylosus*. *J. Bacteriol.* 175: 851-857.
- Busby, S.** & Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293: 199-213.
- Carey, J.** (1991). Gel Retardation. *Methods Enzymol.* 208: 103-117.
- Casadaban, M. J.** & Cohen, S.N.(1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 138: 179-207.
- Chaillou, S.,** Postma, P.W. & Pouwels, P.H. (2001) Contribution of the phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system to carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*. *Microbiology* 147: 671-679.
- Chassy, B. M.,** Alpert, C.A. (1989). Molecular characterization of the plasmid-encoded lactose-PTS of *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 157-166.
- Chauvaux, S.,** Paulsen, I.T. & Saier, M.H. Jr. (1998) CcpB, a novel transcription factor implicated in catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 491-497.
- Chen, G. F. T.** & Inouye, M.(1994). Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 8: 2641-2652.
- Choi, K. Y.** & Zalkin, H. (1994). Role of the purine repressor hinge sequence in repressor function. *J. Bacteriol.* 176: 1767-1772.
- Choi, K.Y.** & Zalkin, H. (1992). Structural characterization and corepressor binding of the *Escherichia coli* purine repressor. *J. Bacteriol.* 174: 6207-6214.
- Chomczynski, P.** (1989). Product and Process for Isolating RNA. *Appl. Num.* 123107; *US. Pat. Num.* [4843155]: 1-6.
- Chomczynski, P.** (1994). Shelf-Stable Product and Process for Isolating RNA, DNA and Proteins. *Appl. Num.* 826984; *US. Pat. Num.* [5346994]: 1-10.
- Chopin, A.** (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.Rev.* 12: 21-37.
- Christensen, J. E.,** Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 217-246.
- Church, G.M.** & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81: 1991-1995
- Collado-Vides, J.,** Magasanik, B., & Gralla, J. D. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55: 371-394.
- Colland, F.,** Barth, M., Hengge-Aronis, R. & Kolb, A. (2000) Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Irp transcription factors. *EMBO J.* 19: 3028-3037.
- Collins, J.** (1979). Cell free synthesis of protein coding for mobilisation functions of ColE1 and transposon functions of Tn3. *Gene* 6: 29-42.

- David, S.**, Stevens, H., van Riel, M., Simons, G., DeVos, W. M. (1992). *Leuconostoc lactis*  $\beta$ -galactosidase is encoded by two overlapping genes. *J. Bacteriol.* 174: 4475-4481.
- De Man, J. C.**, Rogosa, M. & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135
- De Ruyter, P. G.**, Kuipers, O.P. & de Vos, W.M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food- grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3662-3667.
- De Vos, W. M.** (1996). Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *A. van Leeuwenhoek* 70: 223-242.
- den Hengst, C. D.**, Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O. P. & Kok, J. (2005). Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 187: 512-521.
- Deuschle, U.**, Gentz, R. & Bujard, H. (1986). *lac* Repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 4134-4137.
- Deutscher, J.**, Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. & Hillen, W. (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15: 1049-1053.
- Deutscher, J.**, Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier, M.H. Jr. & Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 3336-3344.
- DeVos, W. M.** (1996). Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *A. van Leeuwenhoek* 70: 223-242.
- DeVos, W. M.**, Boerrigter, I., van Roojen, R. J., Reiche, B., Hengstenberg, W. (1990). Characterization of the lactose specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 265: 22554-22560.
- DeVos, W. M.**, Gasson, M. J. (1989). Structure and expression of the *Lactococcus lactis* Gene for phospho- $\beta$ -galactosidase (*lacG*) in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1833-1846.
- DeVos, W. M.**, Vaughan, E. E. (1994). Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 217-237.
- DeVries, J. K.** & Zubay, G. (1967). DNA-directed peptide synthesis, II. The synthesis of the  $\alpha$ -fragment of the enzyme  $\beta$ -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 1010-1012.
- Dick, A.** (1999). Charakterisierung, Lokalisation und Kontrolle von Peptidasen aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290: am Beispiel von PepI, PepV und des potentiellen Regulators PepR2. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Djordjevic, G. M.**, Tchieu, J.H. & Saier, M.H., Jr. (2001) Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183: 3224-3236.
- Dossonnet, V.**, Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Pérez-Martínez, G. & Deutscher, J. (2000) Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J. Bacteriol.* 182: 2582-2590.
- Dower, W. J.**, Miller J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145
- Egeter, O.** & Brückner, R. (1996). Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol. Microbiol.* 21: 739-749.

- Egeter, O.** & Brückner, R. (1995). Characterization of a genetic locus essential for maltose-maltotriose utilization in *Staphylococcus xylosus*. J.Bacteriol. 177: 2408-2415.
- El Soda, M. A.** (1993) The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiol.Rev. 12: 239-252.
- Exterkate, F. A.** (1984) Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 177-183.
- Exterkate, F. A.,** Alting, A.C. & Bruinenberg, P.G. (1993) Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3640-3647.
- Faires, N.,** Tobisch, S., Bachem, S., Martin-Verstraete, I., Hecker, M. & Stulke, J. (1999) The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1: 141-148.
- Feinberg, A. P.** & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal.Biochem. 132: 6-13.
- Fisher, S. H.,** Strauch, M.A., Atkinson, M.R. & Wray, L.V., Jr. (1994) Modulation of *Bacillus subtilis* catabolite repression by transition state regulatory protein AbrB. J. Bacteriol. 176: 1903-1912.
- Fortina, M. G.,** Ricci, G., Mora, D., Guglielmetti, S., & Manachini, P. L. (2003). Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3238-3243.
- Foucaud, C.,** Kunji, E.R., Hagting, A., Richard, J., Konings, W.N., Desmazeaud, M. & Poolman, B. (1995). Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. J. Bacteriol. 177: 4652-4657.
- Friedman, A. M.,** Fischmann, T. O., & Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of *lac* repressor core tetramer and its implications for DNA looping. Science 268: 1721-1727.
- Fujita, Y.,** Miwa, Y., Galinier, A., & Deutscher, J. (1995). Specific recognition of the *Bacillus subtilis* *gnt* cis-acting catabolite- responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. Mol.Microbiol. 17: 953-960.
- Galinier, A.,** Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1999). Phosphorylation of either Crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis* *xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. J. Mol. Biol. 286: 307-314.
- Galinier, A.,** Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1997) The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 8439-8444.
- Gasson, M. J.** (1993) Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 3-20.
- Gasson, M. J.** & Davies, F.L.(1980). High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. J.Bacteriol. 143: 1260-1264.
- Gasson, M. J.** & de Vos, W.M. (1994) Genetics and biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, First edition.
- Gasson, M. J.** (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J.Bacteriol. 154: 1-9.
- Gering, M.** & Brückner, R. (1996). Transcriptional regulation of the sucrase gene of *Staphylococcus xylosus* by the repressor ScrR. J. Bacteriol. 178: 462-469.
- Germond, J. E.,** Lapiere, L., Delley, M., & Mollet, B. (1995). A new mobile genetic element in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Mol. Gen. Genet. 248: 407-416.



- Germond, J. E.**, Lapiere, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2003). Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Mol. Biol. Evol.* 20: 93-104.
- Gilbert, C.**, Atlan, D., Blanc, B. & Portalier, R.(1994). Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: purification and characterization. *Microbiology* 140: 537-542.
- Gonzales, T.** & Robert-Baudouy, J. (1996) Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 319-344.
- Görke, B.** & Rak, B. (1999) Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* 18: 3370-3379.
- Gosalbes, M.J.**, Esteban, C.D. & Pérez-Martínez, G. (2002) In vivo effect of mutations in the antiterminator LacT in *Lactobacillus casei*. *Microbiology* 148: 695–702.
- Gosalbes, M.J.**, Monedero, V. & Pérez-Martínez, G. (1999) Elements involved in catabolite repression and substrate induction of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 181: 3928-3934.
- Gösseringer, R.**, Küster, E., Galinier, A., Deutscher, J. & Hillen, W. (1997) Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J. Mol. Biol.* 266: 665-676.
- Götz, F.**, Zabielski, J., Philipson, L., & Lindberg, M.(1983). DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 9: 126-137.
- Gribskov, W.**, Devereux, J., & Burgess, R.R.(1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucleic.Acids.Res.* 12: 539-549.
- Grundy, F. J.**, Waters, D.A., Takova, T.Y. & Henkin T.M. (1993). Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 10: 259-271.
- Grundy, F.J.**, Waters, D.A., Allen, S.H., and Henkin, T.M. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J. Bacteriol.* 175: 7348-7355.
- Guedon, E.**, Jamet, E., & Renault, P. (2002). Gene regulation in *Lactococcus lactis*: the gap between predicted and characterized regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 93-112.
- Guedon, E.**, Moore, C. M., Que, Q., Wang, T., Ye, R. W., & Helmann, J. D. (2003) The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and sigmaB regulons. *Mol. Microbiol.* 49: 1477-1491.
- Guedon, E.**, Renault, P., Ehrlich, S. D., & Delorme, C. (2001b). Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J. Bacteriol.* 183: 3614-3622.
- Guedon, E.**, Serror, P., Ehrlich, S. D., Renault, P., & Delorme, C. (2001a). Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 40: 1227-1239.
- Gunnewijk, M.G.** & Poolman, B. (2000) Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 275: 34073-34079.
- Gunnewijk, M.G.**, van den Bogaard, P.T., Veenhoff, L.M., Heuberger, E.H., de Vos, W.M., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P. & Poolman, B. (2001) Hierarchical control versus autoregulation of carbohydrate utilization in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 401-413.
- Hammes, W. P.**, Weiss, N., & Holzapfel, W. (1992). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The prokaryotes* (eds. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., und Schleifer, K.-H.).
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166: 557-580.

- Harley, C. B.** & Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15: 2343-2361.
- Harrison, S. C.** & Aggarwal, A. K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 933-69.
- He, B.** & Zalkin, H. (1992). Repression of *Escherichia coli purB* is by a transcriptional roadblock mechanism. *J. Bacteriol.* 174: 7121-7127.
- Hediger, M. A.,** Johnson, D.F., Nierlich, D.P. & Zabin, I. (1985). DNA sequence of the lactose operon: the *lacA* gene and the transcriptional termination region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6414-6418.
- Henkin, T. M.** (1996) The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.
- Henkin, T. M.,** Grundy, F.J., Nicholson, W.L. & Chambliss, G.H. (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* LacI and GalR repressors. *Mol. Microbiol.* 5: 575-584.
- Henrich, B.** & Schmidtberger, B.(1995). Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of phi X174 phage gene E. *Gene* 154: 51-54.
- Henrich, B.,** Backes, H., Klein, J.R., & Plapp, R.(1992) The promoter region of the *Escherichia coli pepD* gene: deletion analysis and control by phosphate concentration. *Mol.Gen.Genet.* 232: 117-125.
- Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.* 280: 309-316.
- Hofmann, K.** & Stoffel, W.(1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 347: 166.
- Hogema, B. M.,** Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H. & Postma, P.W. (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol. Microbiol.* 30: 487-498.
- Holck, A.** & Naes, H.(1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *J.Gen.Microbiol.* 138: 1353-1364.
- Honjo, M.,** Nakayama, A., Fukazawa, K., Kawamura, K., Ando, K., Hori, M. & Furutani, Y. (1990). A novel *Bacillus subtilis* gene involved in negative control of sporulation and degradative-enzyme production. *J. Bacteriol.* 172: 1783-1790.
- Horinouchi, S.** & Weisblum, B.(1982). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J.Bacteriol.* 150: 804-814.
- Hoskins, J.,** Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S. & De Hoff, B.S. (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183: 5709-5717.
- Hueck, C.,** Kraus, A., & Hillen, W.(1994b) Sequences of *ccpA* and two downstream *Bacillus megaterium* genes with homology to the *motAB* operon from *Bacillus subtilis*. *Gene* 143: 147-148.
- Hueck, C. J.** & Hillen, W.(1995b). Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol.Microbiol.* 15: 395-401.
- Hueck, C. J.,** Hillen, W., & Saier, M.H.J.(1994a). Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Res.Microbiol.* 145: 503-518.
- Hueck, C. J.,** Kraus, A., Schmiedel, D. & Hillen, W. (1995a) Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. *Mol. Microbiol.* 16: 855-864.
- Jacobson, R. H.,** Zhang, X. J., Du Bose, R. F., & Matthews, B. W. (1994). Three-dimensional structure of *beta-galactosidase* from *E. coli*. *Nature* 369: 761-766.

- Jankovic, I.,** Egeter, O., & Brückner, R. (2001). Analysis of catabolite control protein A-dependent repression in *Staphylococcus xylosus* by a genomic reporter gene system. *J. Bacteriol.* 183: 580-586.
- Janniere, L.,** Bruand, C., & Ehrlich, S.D.(1990). Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene* 87: 53-61.
- Jobling, M. G.** & Holmes, R.K.(1990). Construction of vectors with the p15A replicon, kanamycin resistance, inducible *lacZa* and pUC18 or pUC19 multiple cloning sites. *Nucleic.Acids.Res.* 18: 5315-5316.
- Jones, B.E.,** Dossonnet, V., Küster, E., Hillen, W., Deutscher, J. & Klevit, R.E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272: 26530-26535.
- Jourlin-Castelli, C.,** Mani, N., Nakano, M. & Sonenshein, A.L. (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 295: 865-878.
- Juillard, V.,** Le Bars, D., Kunji, E.R., Konings, W.N., Gripon, J.C. & Richard, J. (1995) Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3024-3030.
- Kandler, O.** & Weiss, N. (1986). Regular, nonsporulating, Gram-positive rods - Genus *Lactobacillus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology Williams & Wilkins, 428 East Preston Street, Baltimore, MD21202, USA 2, I: 1208-1234.
- Kiewiet, R.,** Kok, J., Seegers, J., Venema, G., & Bron, S.(1993). The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl.Environ.Microbiol.* 59: 358-364.
- Kim J. H.,** Voskuil M.I. & Chambliss GH (1998) NADP, corepressor for the *Bacillus* catabolite control protein CcpA. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 95: 9590-9595.
- Kim, J. H.** & Chambliss, G.H.(1997). Contacts between *Bacillus subtilis* catabolite regulatory protein CcpA and *amyO* target site. *Nucleic.Acids.Res.* 25: 3490-3496.
- Kim, J. H.,** Guvener, Z.T., Cho, J.Y., Chung, K.C., & Chambliss, G.H.(1995). Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J.Bacteriol.* 177: 5129-5134.
- Kim, J. H.,** Yang, Y.K., & Chambliss, G.H. (2005). Evidence that *Bacillus* catabolite control protein CcpA interacts with RNA polymerase to inhibit transcription. *Mol. Microbiol.* 56: 155-162.
- Kiwaki, M.,** Ikemura, H., Shimizu-Kadota, M. & Hirashima, A. (1989) Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO763. *Mol. Microbiol.* 3: 359-369.
- Klein, J. R.,** Dick, A., Schick, J., Matern, H.T., Henrich, B., & Plapp, R.(1995b). Molecular cloning and DNA sequence analysis of *pepL*, a leucyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290. *Eur.J.Biochem.* 228: 570-578.
- Klein, J. R.,** Henrich, B., & Plapp, R.(1994b). Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM7290 cysteine aminopeptidase gene *pepC*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124: 291-299.
- Klein, J. R.,** Klein, U., Schad, M., & Plapp, R.(1993a). Cloning, DNA sequence analysis and partial characterization of *pepN*, a lysyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM7290. *Eur.J.Biochem.* 217: 105-114.
- Klein, J. R.,** Schick, J., Henrich, B., & Plapp, R.(1997). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290 *pepG* gene encodes a novel cysteine aminopeptidase. *Microbiology.* 143: 527-537.
- Klein, J. R.,** Schmidt, U., & Plapp, R.(1994a). Cloning, heterologous expression, and sequencing of a novel proline iminopeptidase gene, *pepI*, from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 7290. *Microbiology.* 140: 1133-1139.

- Klein, J. R.,** Ulrich, C., Wegmann, U., Meyer-Barton, E., Plapp, R., & Henrich, B.(1995a). Molecular tools for the genetic modification of dairy *lactobacilli*. *Sys.Appl.Microbiol.* 18: 493-503.
- Kok, J.** (1996) Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 129-145.
- Kok, J.,** & Venema, G. (1988) Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 475-488.
- Konings, W. N.,** Poolman, B. & Driessen, A.J. (1989). Bioenergetics and solute transport in *lactococci*. *Crit. Rev. Microbiol.* 16: 419-476.
- Kraus, A. & Hillen, W.**(1997). Analysis of CcpA mutations defective in carbon catabolite repression in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 221-226.
- Kraus, A.,** E. Küster, A. Wagner, K. Hoffmann, & W. Hillen. (1998). Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30: 955-963.
- Kravanja, M.,** Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N. & Hengstenberg, W. (1999) The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol. Microbiol.* 31: 59–66.
- Krawczak, M.,** Reiss, J., Schmidtke, J., & Rosler, U. (1989). Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. *Nucleic.Acids.Res.* 17: 2197-2201.
- Krüger, S. & Hecker, M.** (1995). Regulation of the putative *bglPH* operon for aryl-beta-glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 177: 5590-5597.
- Kuipers, O. P.,** de Ruyter, P.G., Kleerebezem, M., & de Vos, W.M.(1997). Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15, 135-140.
- Kumar, A.,** Malloch, R.A., Fujita, N., Smillie, D.A., Ishihama, A., & Hayward, R.S.(1993). The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J.Mol.Biol.* 232, 406-418.
- Kunji, E. R.,** Hagting, A., De Vries, C.J., Juillard, V., Haandrikman, A.J., Poolman, B. & Konings, W.N. (1995). Transport of beta-casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 270: 1569-1574.
- Kunji, E. R.,** Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W.N. (1996a) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187–221.
- Kunji, E. R.,** Mierau, I., Poolman, B., Konings, W.N., Venema, G. & Kok, J. (1996b). Fate of peptides in peptidase mutants of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 21: 123-131.
- Kunst, F.,** Msadek, T., Bignon, J. & Rapoport, G. (1994). The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* 145: 393-402.
- Küster-Schöck, E.,** Wagner, A., Völker, U. & Hillen, W. (1999) Mutations in catabolite control protein CcpA showing glucose independent regulation in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 181: 7634-7638.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamarque, M.,** Morel, F., Bissardon, I., Galinier, A., Portalier, R., & Atlan, D. (2000). Relationship between carbon catabolite repression and the biosynthesis regulation of the prolidase PepQ from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397. *Le lait* 67: 675-682.
- Lapierre, L.,** Mollet, B., & Germond, J.E. (2002). Regulation and adaptive evolution of lactose operon expression in *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Bacteriol.* 184: 928-935.
- Law, B. A.,** & Kolstad, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49: 225-245.

- Leboeuf, C.,** Auffray, Y. & Hartke, A. (2000a) Cloning, sequencing and characterization of the *ccpA* gene from *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 109–113.
- Leboeuf, C.,** Leblanc, L., Auffray, Y. & Hartke, A. (2000b) Characterization of the *ccpA* gene of *Enterococcus faecalis*: identification of starvation-inducible proteins regulated by *ccpA*. *J. Bacteriol.* 182: 5799–5806.
- Ledesma, O. V.,** Aida, P., De Ruiz Holgado & Oliver, G. (1977). A synthetic medium for comparative nutritional studies of *lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 123-133.
- Lehming, N.,** J. Sartorius, M. Niemoller, G. Genenger, B. Wilcken-Bergmann & B. Muller-Hill (1987). The interaction of the recognition helix of *lac* repressor with *lac* operator. *EMBO J.* 6: 3145-3153.
- Leong-Morgenthaler, P.,** Zwahlen, M.C., & Hottinger, H. (1991). Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved. *J. Bacteriol.* 173: 1951-1957.
- Lewis, M.,** Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., & Lu, P. (1996). Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271: 1247-1254.
- Lokman, B. C.,** Heerikhuisen, M., Leer, R.J., van den Broek, A., Borsboom, Y., Chaillou, S., Postma, P.W. & Pouwels, P.H. (1997) Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus xylAB* operon. *J. Bacteriol.* 179: 5391-5397.
- Luchansky, J. B.,** Muriana, P.M., & Klaenhammer, T.R.(1988). Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol.Microbiol.* 2: 637-646.
- Ludwig, H. & Stulke, J.** (2001) The *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA exerts all its regulatory functions by DNA-binding. *FEMS Microbiol.Lett.*203(1): 125-129.
- Ludwig, H.,** Homuth, G., Schmalisch, M., Dyka, F.M., Hecker, M. & Stülke, J. (2001) Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol. Microbiol.* 41: 409-422.
- Ludwig, H.,** Meinken, C., Matin, A., & Stülke, J. (2002) Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis ccpA* mutant. *J. Bacteriol.* 184: 5174-5178.
- Luesink, E. J.,** Beumer, C.M., Kuipers, O.P. & De Vos, W.M. (1999) Molecular characterization of the *Lactococcus lactis ptsHI* operon and analysis of the regulatory role of HPr. *J. Bacteriol.* 181: 764-771.
- Luesink, E. J.,** van Herpen, R.E.M.A., Grossiord, B.P., Kuipers, O.P., & de Vos, W.M.(1998). Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and the catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol.Microbiol.* 30: 789-798.
- Lux, R.,** Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J.S. & Lengeler, J.W. (1995) Coupling the phosphotransferase system and the methylaccepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11583-11587.
- MacConkey, A.** (1905). Lactose-fermenting bacteria in feces. *J. Hyg.* 8: 333-379.
- Maeda, S.,** Gasson, M. J. (1986). Cloning, expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- $\beta$ -galactosidase. *J. Gen. Microbiol.* 132: 331-340.
- Mahr, K.,** Esteban, C.D., Hillen, W., Titgemeyer, F. & Pérez-Martínez, G. (2002) Cross communication between components of carbon catabolite repression of *Lactobacillus casei* and *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 489-494.
- Mahr, K.,** Hillen, W. & Titgemeyer, F. (2000) Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 277-283.

- Marasco, R.**, Muscariello, L., Varcamonti, M., De Felice, M. & Sacco, M. (1998) Expression of the *bg/H* gene of *Lactobacillus plantarum* is controlled by carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* 180: 3400-3404.
- Marshall, V. M.** (1987). Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects [published erratum appeared in *J. Dairy Res.* 54: 559-574.
- Marugg, J. D.**, Meijer, W., van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P.G. & de Vos, W.M. (1995) Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *J. Bacteriol.* 177: 2982-2989.
- Marugg, J. D.**, van Kranenburg, R., Laverman, P., Rutten, G.A. & de Vos, W.M. (1996) Identical transcriptional control of the divergently transcribed *prtP* and *prtM* genes that are required for proteinase production in *Lactococcus lactis* SK11. *J. Bacteriol.* 178: 1525-1531.
- Matern, H. T.**, Klein, J.R., Henrich, B., & Plapp, R. (1994). Determination and comparison of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM7290 promoter sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 121-128.
- Matos, J.**, M. Nardi, H. Kumura, & V. Monnet (1998). Genetic characterization of *pepP*, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect *Lactococcus lactis* growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4591-4595.
- Maxam, A. M.** & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 560-564.
- Mayo, B.**, González, B., Arca, P., Suárez, J. E. (1994). Cloning and expression of the plasmid encoded  $\beta$ -D-galactosidase gene from a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 145-152.
- McKay, L.L.** & Baldwin, K.A. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 7: 3-14.
- McKay, L.L.** (1983) Functional properties of plasmids in lactic *streptococci*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49: 259-274.
- Meijer, W.C.** & Hugenholtz, J. (1997). Proteolytic enzyme activity in lactococci grown in different pretreated milk media. *J. Appl. Microbiol.* 83: 139-146.
- Meyer-Barton, E.** (1995) Analyse des X-Prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase-Gens (*pepX*) aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290 und Charakterisierung des Genprodukts. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Meyer-Barton, E. C.**, Klein, J.R., Imam, M., & Plapp, R. (1993). Cloning and sequence analysis of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase gene (*pepX*) from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM7290. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 82-89.
- Mierau, I.**, Kunji, E.R., Leenhouts, K.J., Hellendoorn, M.A., Haandrikman, A.J., Poolman, B., Konings, W.N., Venema, G., & Kok, J. (1996). Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. *J. Bacteriol.* 178: 2794-2803.
- Mierau, I.**, Kunji, E.R., Venema, G., & Kok, J. (1997). Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 14: 279-301.
- Miller, C. G.**, A. M. Kukral, J. L. Miller, & N. R. Movva (1989). *pepM* is an essential gene in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 171: 5215-5217.
- Miller, C. G.** & Schwartz, G. (1978). Peptidase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 135: 603-611.
- Miller, J.** (1972). *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Mills, O. E.**, & Thomas, T.D. (1981) Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 16: 43-55.

- Mirel, D. B.**, V. M. Lustre, & Chamberlin M. J. (1992). An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the  $\sigma^D$  form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 174: 4197-4204.
- Miwa, Y.** & Fujita, Y. (2001) Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*iol*) operon. *J. Bacteriol.* 183: 5877-5884.
- Miwa, Y.**, Nagura, K., Eguchi, S., Fukuda, H., Deutscher, J. & Fujita, Y. (1997) Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol. Microbiol.* 23: 1203-1213.
- Miwa, Y.**, Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M., & Fujita, Y. (2000) Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 28: 1206-1210.
- Miwa, Y.**, Saikawa, M., & Fujita, Y. (1994). Possible function and some properties of the CcpA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140: 2567-2575.
- Monedero, V.**, Gosalbes, M.J. & Pérez-Martínez, G. (1997) Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J. Bacteriol.* 179: 6657-6664.
- Monedero, V.**, Kuipers, O.P., Jamet, E. & Deutscher, J. (2001) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 183: 3391-3398.
- Monedero, V.**, Poncet, S., Mijakovic, I., Fieulaine, S., Dossonnet, V., Martin-Verstraete, I., Nessler, S., & Deutscher, J. (2001) Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *EMBO J.* 20: 3928-3937.
- Morel, F.**, Frot-Coutaz, J., Aubel, D., Portalier, R. & Atlan, D. (1999) Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. *Microbiology* 145: 437-446.
- Morel, F.**, Lamarque, M., Bissardon, I., Atlan, D. & Galinier, A. (2001) Autoregulation of the biosynthesis of the CcpA-like protein, PepR1, in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 63-66.
- Moreno, M. S.**, Schneider, B.L., Maile, R.R., Weyler, W. & Saier, M.H., Jr. (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole genome analyses. *Mol. Microbiol.* 39: 1366-1381.
- Msadek, T.**, Kunst, F., Henner, D., Klier, A., Rapoport, G. & Dedonder, R. (1990). Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* 172: 824-834.
- Muiznieks, I.**, & R. Schmitt. (1994). Role of two operators in regulating the plasmid-borne *raf* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 242: 90-99.
- Muscariello, L.**, Marasco, R., De Felice, M. & Sacco, M. (2001) The functional *ccpA* gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2903-2907.
- Navarre, W. W.** & Schneewind, O. (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 14: 115-121.
- Newton, C. R.** & Graham, A. (1994). PCR. Spektrum Akad. Verlag; Heidelberg - Berlin - Oxford.
- Nguyen, C. C.** & Saier, M. H. Jr. (1995). Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors. *FEBS Lett.* 377: 98-102.
- Nissen-Meyer, J.**, Lillehaug, D. & Nes, I.F. (1992). The plasmid-encoded lactococcal envelope-associated proteinase is encoded by a chromosomal gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* BC101. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 750-753.
- Olson, N. F.** (1990). The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 131-148.

- Orschiebt A.** (1997). Partielle Charakterisierung des Lysins des *Lactobacillus gasseri* Bakteriophagen  $\phi$ adh und Versuche zur Identifizierung der Autolysingene von *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- O'Sullivan, D. J.** & Klaenhammer, T. R. (1993). High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. *Gene* 137: 227-231.
- Petranovic, D.,** Guedon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., & Renault, P. (2004). Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* 53: 613-621.
- Platteeuw, C.,** van Alen-Boerrigter, I., van Schalkwijk, S., & de Vos, W.M.(1996). Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1008-1013.
- Plumbridge, J.** (2001) Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 371-380.
- Poolman, B.** (1993). Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria. *Lait* 73: 87-96.
- Poolman, B.,** Knol, J., & Lolkema, J. S. (1995). Kinetic analysis of lactose and proton coupling in Glu379 mutants of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 270: 12995-13003.
- Poolman, B.,** Knol, J., Mollet, B., Nieuwenhuis, B., & Sulter, G. (1995). Regulation of bacterial sugar-H<sup>+</sup> symport by phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I/HPr-mediated phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 778-782.
- Poolman, B.,** Knol, J., van der Does, C., Herderson, P. J. F., Liang, W. J., Leblanc, G., Pourcher, T., Mus-Veteau, I. (1996). Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Mol. Microbiol.* 19: 911-922.
- Poolman, B.,** Royer, T. J., Mainzer, S. E., Schmidt, B. F. (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to melibiose carrier and Enzyme III of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J. Bacteriol.* 171: 244-253.
- Porter, E. V.,** Chassy, B. M. (1987). Nucleotide sequence of the  $\beta$ -D-phosphogalactoside galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei*: comparison to analogous *pbg* genes of other Gram-positive organisms. *Gene* 62: 263-276
- Postma, P. W.,** Lengeler, J.W. & Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- Pouwels, P. H.** & Leunissen, J.A.(1994). Divergence in codon usage of *Lactobacillus species*. *Nucleic Acids Res.* 22: 929-936.
- Presecan-Siedel, E.,** Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P. & Martin-Verstraete, I. (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 6889-6897.
- Pritchard, G. G.** & Coolbear, T. (1993) The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 179-206.
- Raleigh, E. A.** & Wilson, G.(1986). *Escherichia coli* K12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 9070.
- Ramseier, T. M.,** Reizer, J., Kuster, E., Hillen, W., und Saier, M.H. Jr. (1995). In vitro binding of the CcpA protein of *Bacillus megaterium* to *cis*-acting catabolite responsive elements (CREs) of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 207-213.
- Rechinger, K. B.,** Siegumfeldt, H., Svendsen, I., and Jakobsen, M. (2000). «Early» protein synthesis of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in milk revealed by [<sup>35</sup>S]-methionine labeling and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 21: 2660-2669.



- Reizer, J.,** Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M.H., Jr. & Stülke, J. (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis – the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145: 3419-3429.
- Reizer, J.,** Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M.H., Jr. & Hillen, W. (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* 27: 1157-1169.
- Rolfes, R. J. &** Zalkin, H. (1990). Purification of the *Escherichia coli* purine regulon repressor and identification of corepressors. *J. Bacteriol.* 172: 5637-5642.
- Ross, W.,** Aiyar, S.E., Salomon, J., & Gourse, R.L.(1998). *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. *J. Bacteriol.* 180: 5375-5383.
- Saier, M. H., Jr. &** Ramseier, T.M. (1996) The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 3411-3417.
- Saier, M. H., Jr;** (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* 53: 109-120.
- Saier, M.H., Jr.,** Chauvaux, S., Cook, G.M., Deutscher, J., Paulsen, I.T., Reizer, J. & Ye, J.J. (1996) Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 142: 217-230.
- Saier, M. H., Jr.;** Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J. & Ye, J.J. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in gram- negative versus gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 20: 267-271.
- Saiki, R. K.,** Scharf, S., Falcoona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Sambrook, J.,** Fritsch, E., & Maniatis, T.(1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., USA.
- Sanger, F.,** Nicklen, S., Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sankar, P.,** Hutton, M.E., VanBogelen, R.A., Clark, R.L., & Neidhardt, F.C.(1993). Expression analysis of cloned chromosomal segments of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 175: 5145-5152 [published erratum in: *J. Bacteriol.* 176(3):939].
- Sasaki, T.,** Ito, Y., & Sasaki, Y.(1993). Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *FEMS Microbiol. Reviews* 12: 8.
- Schick, J.,** Weber, B., Klein, J.R., & Henrich, B.(1999). PepR1, a CcpA-like transcription regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Microbiology.* 145: 3147-3154.
- Schmidt, B. F.,** Adams, R. M., Requadt, C., Power, S. & Mainzer, S.E. (1989). Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus*  $\beta$ -galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 625-635.
- Schumacher, M. A.,** Allen, G. S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., & Brennan, R.G. (2004). Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118: 731-741.
- Schumacher, M. A.,** Choi, K. Y., Zalkin, H. & Brennan, R.G. (1994). Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: Minor groove binding by  $\alpha$ -helices. *Science* 266: 763-770.
- Seok, Y. J.,** Koo, B.M., Sondej, M. & Peterkofsky, A. (2001) Regulation of *E.coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(3): 385-393.
- Seok, Y. J.,** Sun, J., Kaback, H.R. & Peterkofsky, A. (1997) Topology of allosteric regulation of lactose permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13515-13519.

- Serror, P.** & Sonenshein, A. L. (1996a). Interaction of CodY, a novel *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, with the *dpp* promoter region. *Mol. Microbiol.* 20: 843-852.
- Serror, P.** & Sonenshein, A. L. (1996b). CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J. Bacteriol.* 178: 5910-5915.
- Serror, P.,** Sasaki, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 46-52.
- Shapira, S. K.,** Chou, J., Richaud, F.V., & Casadaban, M.J.(1983). New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of beta-galactosidase. *Gene* 25: 71-82.
- Shine, J.** & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 1342-1346.
- Shivers, R. P.** & Sonenshein, A. L. (2005). *Bacillus subtilis* *ilvB* operon: an intersection of global regulons. *Mol. Microbiol.* 56: 1549-1559.
- Simpson, C.L.** & Russell RR (1998). Identification of a homolog of CcpA catabolite repressor protein in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 66: 2085-92.
- Sizemore, C.,** Buchner, E., Rygus, T., Witke, C., Götz, F., & Hillen, W. 1991. Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. *Mol. Gen. Genet.* 227: 377-384.
- Sizemore, C.,** Wieland, B., Götz, F., & Hillen, W. 1992. Regulation of *Staphylococcus xylosus* xylose utilization genes at the molecular level. *J. Bacteriol.* 174: 3042-3048.
- Smid, E. J.,** Plapp, R., & Konings, W.N.(1989). Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. *J. Bacteriol.* 171: 6135-6140.
- Soutourina, O.,** Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. & Bertin, P. (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* 181: 7500-7508.
- Speck, E. L.** & Freese, E. (1973). Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 78: 261-275.
- Spector, T.** (1978). Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal. Biochem.* 86: 142-146.
- Stoker, N. G.,** Fairweather, N.F., & Spratt, B.G.(1982). Versatile low-copy-number vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* 18: 335-341.
- Strauch, M. A. H. J. A.** (1993) Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Micro-Review Mol. Microbiol.* 7: 337-342.
- Stucky, K.** (1995). Isolierung und Analyse eines Prolidasegens (*pepQ*), eines Aminosäuretransportgens (*brnQ*) und eines Transkriptionsregulationsgens (*pepR1*) aus *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Stucky, K.,** Hagting, A., Klein, J.R., Matern, H., Henrich, B., Konings, W.N., & Plapp, R.(1995b). Cloning and characterization of *brnQ*, a gene encoding a low-affinity, branched-chain amino acid carrier in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. *Mol. Gen. Genet.* 249: 682-690.
- Stucky, K.,** Klein, J.R., Schüller, A., Matern, H., Henrich, B., & Plapp, R.(1995a). Cloning and DNA sequence analysis of *pepQ*, a prolidase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290 and partial characterization of its product. *Mol. Gen. Genet.* 247: 494-500.

- Stucky, K.**, Schick, J., Klein, J.R., Henrich, B., & Plapp, R. (1996). Characterization of *pepR1*, a gene coding for a potential transcriptional regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290. FEMS Microbiol.Lett. 136: 63-69.
- Stülke, J.** & Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annu. Rev. Microbiol. 54: 849-880.
- Stülke, J.**, Arnaud, M., Rapoport, G. & Martin-Verstraete, I. (1998) PRD-a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. Mol. Microbiol. 28: 865-874.
- Stülke, J.**, Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Klier, A., Deutscher, J., & Rapoport, G. (1995). The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *levanase* operon. J. Bacteriol. 177: 6928-6936.
- Sutcliffe, J. G.** (1979). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 43 Pt 1: 77-90.
- Tanaka, T.** & Kawata, M. (1988). Cloning and characterization of *Bacillus subtilis iep*, which has positive and negative effects on production of extracellular proteases. J Bacteriol 170: 3593-3600.
- Tebbe, J.**, Orth, P., Küster-Schöck, E. K., Hillen, W., Saenger, W., & Hinrichs, W. (2000) Crystallization and preliminary X-ray analyses of catabolite control protein A, free and in complex with its DNA-binding site. Acta Crystallogr. D. Biol. .56: 67-69.
- Thompson, J. D.**, Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G.(1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic.Acids.Res. 25(24): 4876-4882.
- Titgemeyer, F.**, Mason, R.E. & Saier, M.H., Jr. (1994) Regulation of the raffinose permease of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. J. Bacteriol. 176: 543-546.
- Tobisch, S.**, Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J. & Hecker, M. (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181: 6996-7004.
- Tojo, S.**, Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., & Fujita, Y. (2005). Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. Mol. Microbiol. 56: 1560-1573.
- Turinsky, A. J.**, Moir-Blais, T. R., Grundy, F. J. & Henkin, T. M. (2000). *Bacillus subtilis ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. J.Bacteriol. 182: 5611-5614.
- Turinsky, A.J.**, Grundy, F.J., Kim, J.H., Chambliss, G.H. & Henkin, T.M. (1998) Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. J. Bacteriol. 180: 5961-5967.
- Tynkkynen, S.**, Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G. & Haandrikman, A. (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 175: 7523-7532.
- Ueguchi, C.**, Misonou, N. & Mizuno, T. (2001) Negative control of *rpoS* expression by phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183: 520-527.
- van den Bogaard, P. T.**, Hols, P., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M., & de Vos, W.M. (2001). Sugar utilisation and conservation of the *gal-lac* gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. Syst. Appl. Microbiol. 27: 10-17.
- van den Bogaard, P. T.**, Kleerebezem, M., Kuipers, O.P. & de Vos, W.M. (2000) Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system sugar. J. Bacteriol. 182: 5982-5989.

- van Rooijen, R. J.** & de Vos, W. M. (1990). Molecular cloning, transcriptional analysis, and nucleotide sequence of *lacR*, a gene encoding the repressor of the lactose phosphotransferase system of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 265: 18499-18503.
- Vandenbergh, P.A.** (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221-238.
- Varmanen, P.,** Rantanen, T. & Palva, A. (1996) An operon from *Lactobacillus helveticus* composed of a proline iminopeptidase gene (*pepI*) and two genes coding for putative members of the ABC transporter family of proteins. *Microbiology* 142: 3459-3468.
- Vartak, N. B.,** Reizer, J., Reizer, A., Gripp, J. T., Groisman, E. A., Wu, L. F., Tomich, J. M., & Saier, M. H. Jr. (1991). Sequence and evolution of the FruR protein of *Salmonella typhimurium*: a pleiotropic transcriptional regulatory protein possessing both activator and repressor functions which is homologous to the periplasmic ribose-binding protein. *Res. Microbiol.* 142: 951-963.
- Vaughan, E. E.,** David, S., & de Vos, W. M. (1996). The lactose transporter in *Leuconostoc lactis* is a new member of the LacS subfamily of galactoside-pentose-hexuronide translocators. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1574-1582.
- Viana, R.,** Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Pérez-Martínez, G. & Deutscher, J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol. Microbiol.* 36: 570-584.
- Visser, S.** (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: An overview. *J. Dairy Sci.* 76: 329-350.
- Vongerichten, K. F.,** Klein, J.R., Matern, H., & Plapp, R. (1994). Cloning and nucleotide sequence analysis of *pepV*, a carnosinase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 7290, and partial characterization of the enzyme. *Microbiology.* 140: 2591-2600.
- Vos, P.,** Simons, G., Siezen, R.J. & de Vos, W.M. (1989a) Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 264: 13579-13585.
- Vos, P.,** van Asseldonk, M., van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G. & de Vos, W.M. (1989b) A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* 171: 2795-2802.
- Voskuil, M. I.,** Voepel, K. & Chambliss, G.H. (1995). The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 17: 271-279.
- Wacker, I.,** Ludwig, H., Reif, I., Blencke, H.M., Detsch, C. & Stülke, J. (2003). The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology* 149: 3001-3009.
- Wagner, E.,** Marcandier, S., Egeter, O., Deutscher, J., Götz, F. & Brückner, R. (1995). Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosum*. *J. Bacteriol.* 177: 6144-6152.
- Weber, A.** (1998). Die potentiellen Regulatorgene *regU* und *regX* aus *Lactobacillus delbrückii* ssp. *lactis*: Nukleotidsequenz, Expression und Einfluß der Genprodukte auf die Funktion der extrazellulären Protease. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- Weber, B.** (1997). Reinigung und funktionelle Analyse des potentiellen Transkriptionsregulators PepR1 von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *lactis* DSM 7290. Diplomarbeit. Universität Kaiserslautern.
- Weber, B. A.,** Klein, J.R., & Henrich, B. (1998). The *arbZ* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* confers to *Escherichia coli* the ability to utilize the beta-glucoside arbutin. *Gene* 212: 203-211.
- Wegmann, U.** (2000). Kontrollierte Expression ausgewählter Peptidasegene aus *Lactobacillus delbrückii* ssp. *lactis* in *Lactococcus lactis*. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- Weickert, M. J.** & Adhya, S. (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* 267: 15869-15874.

- Weickert, M. J.** & Chambliss, G.H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6238-6242.
- Weiss, N.**, Schillinger, U., Kandler, O. (1983). *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. System. Appl. Microbiol. 4: 552-557.
- Wells, J.M.**, Robinson, K., Chamberlain, L.M., Schofield, K.M. & Le Page, R.W. (1996). Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. Antonie Van Leeuwenhoek 70: 317-330.
- Wintjens, R.** & Rooman, M.(1996). Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. J.Mol.Biol. 262, 294-313.
- Wray, L. V., Jr;** Pettengill, F. K. & Fisher, S. H. (1994) Catabolite repression of the *Bacillus subtilis hut* operon requires a cis-acting site located downstream of the transcription initiation site. J. Bacteriol. 176: 1894-1902.
- Yanisch-Perron, C.**, Vieira, J. & Messing, J.(1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.
- Yaron, A.**, & Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28: 31-81.
- Ye, J. J.** & Saier, M. H. Jr. (1995a). Allosteric regulation of the glucose:H<sup>+</sup> symporter of *Lactobacillus brevis*: cooperative binding of glucose and HPr(ser-P). J. Bacteriol. 177: 1900-1902.
- Ye, J. J.** & Saier, M. H. Jr. (1995b). Cooperative binding of lactose and the phosphorylated phosphocarrier protein HPr(Ser-P) to the lactose/H<sup>+</sup> symport permease of *Lactobacillus brevis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 417-421.
- Ye, J. J.**, Reizer, J., Cui, X. & Saier, M. H. Jr. (1994b). Inhibition of the phosphoenolpyruvate:lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein HPr. J. Biol. Chem. 269: 11837-11844.
- Yebra, M.J.**, Veyrat, A., Santos, M.A. & Pérez-Martínez, G. (2000) Genetics of L-sorbose transport and metabolism in *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol. 182(1): 155-163.
- Yoshida, K.**, Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C.M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T. & Fujita, Y. (2001) Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 29(3): 683-692.
- Zahn, K.** (1996). Overexpression of an mRNA Dependent on Rare Codons Inhibits Protein Synthesis and Cell Growth. J.Bacteriol. 178: 2926-2933.
- Zubay, G.** (1973). In vitro synthesis of protein in microbial systems. Ann.Rev.Genet. 7: 267- 287.
- Zwahlen, M.C.** & Mollet, B. (1994). ISL2, a new mobile genetic element in *Lactobacillus helveticus*. Mol. Gen. Genet. 245: 334-338.



## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name: Joachim SCHICK  
Anschrift: Heideweg 4  
47623 Kevelaer  
Geburtsdatum: 14. July 1969  
Geburtsort: Landstuhl  
Familienstand: verheiratet, eine Tochter  
Staatsangehörigkeit: deutsch

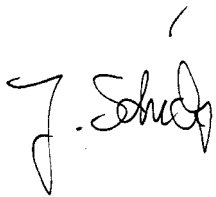
### **Bildungsgang:**

1975 - 1979 Grundschole in Rodenbach  
1979 - 1985 Staatliche Realschole Kaiserslautern  
1985 - 1988 Staatliches Heinrich-Heine-Gymnasium Kaiserslautern  
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife  
July 1988 - Wehrdienst  
September 1989  
Oktober 1989 - Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern  
April 1995 Diplomprüfung und Diplomarbeit mit dem Thema:  
„Untersuchungen zur Charakterisierung von Peptidasen aus  
*Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290.“  
Mai 1993 - Praktikum bei der Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim,  
July 1993 Präklinische Forschung, Mediatorpharmakologie Prof. Dr. U. Tibes,  
Aufgabenstellung: Aufbau eines Radioimmunoassays für Inosin-Triphosphat.  
July 1995 - Wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Promotion / Promotionsstudent / wissen-  
Januar 2001 schaftlicher Mitarbeiter im Lehrbereich Mikrobiologie / FB Biologie  
der Universität Kaiserslautern  
November 1997 - Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) zum  
Februar 1998 Gastaufenthalt in der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik (Prof. Dr. Gérard  
Venema), Reichsuniversität Groningen, Niederlande

### **Beruflicher Werdegang:**

Januar 2001 - Produktentwickler für Joghurt- und Dessertprodukte bei der  
Januar 2003 Campina GmbH, Heilbronn  
Februar 2003 - Senior Produktentwickler für fermentierte und funktionelle Lebensmittel bei  
Juni 2005 Campina Innovation, Wageningen; Niederlande  
Seit July 2005 - Produktentwickler für Joghurt- und Dessertprodukte bei der  
Campina GmbH, Heilbronn

Hiermit erkläre ich , die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Schick'. The signature is stylized with a large initial 'J' and a cursive 'Schick'.

(Joachim SCHICK)

47623 Kevelaer, den 29.07.2005



