

# Bacillus subtilis

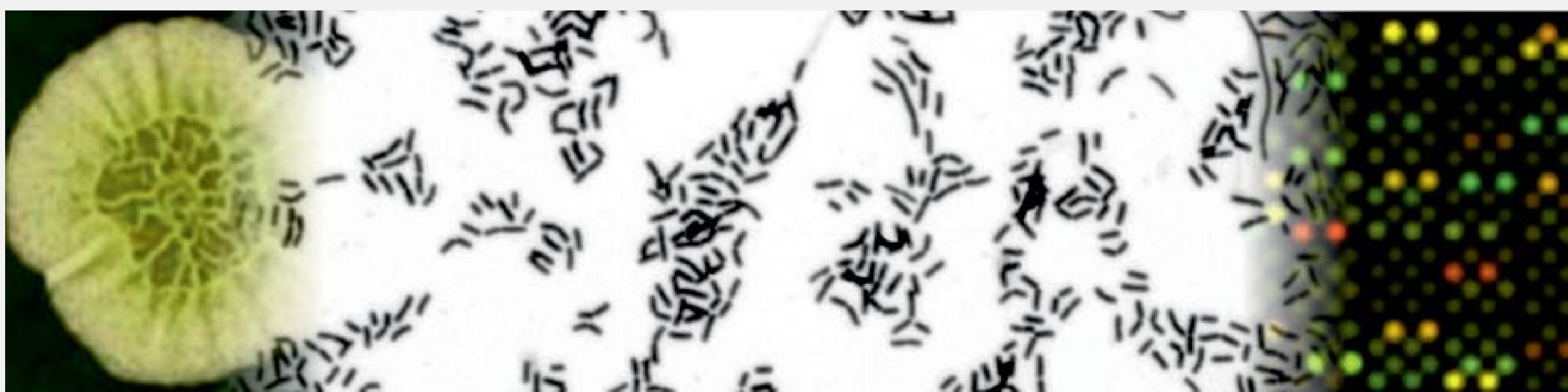
## - Stressantwort und biotechnologische Anwendung -

J. Heinrich, S. Drechsel, A. Ohlig, M. Mildner, T. Wiegert

Labor für Mikrobiologie, Hochschule Zittau/Görlitz, Theodor-Körner-Allee 16, D-02763 Zittau

### Bakterien und Biotechnologie

Bakterien werden in der Öffentlichkeit vornehmlich als Krankheitserreger wahrgenommen. Allein aus der Tatsache, dass den Menschen schätzungsweise zehnmal mehr Bakterienzellen bewohnen als er eigene Körperzellen besitzt, wird jedoch die große Bedeutung dieser Kleinstlebewesen im menschlichen Alltag ersichtlich. Ohne Bakterien könnte kein Leben auf der Erde existieren. Aufgrund ihrer immensen Stoffwechselvielfalt und der in der Regel einfachen molekularbiologischen Zugänglichkeit werden Bakterien von der Produktion von Wirkstoffen bis hin zur Bodensanierung in einer Vielzahl von biotechnologischen Prozessen und Verfahren angewendet. Die hohe Persistenz und Produktivität von Bakterien resultiert dabei auch aus der ausgeprägten Fähigkeit, sich an plötzlich veränderte Bedingungen anzupassen. Signale aus der Umwelt führen zur Aktivierung genetischer Programme, die einem Stress entgegenwirken. Die Untersuchung solcher Antworten auf Umweltstress ist sowohl für die grundlagen- als auch anwendungsorientierte Forschung von wichtiger Bedeutung, und kann zur Optimierung energie- und umweltschonender biotechnologischer Prozesse und Herstellungsverfahren, sowie zum Verständnis pathogener Vorgänge, beitragen.



**Abb. 1: Bacillus subtilis als Modellorganismus**

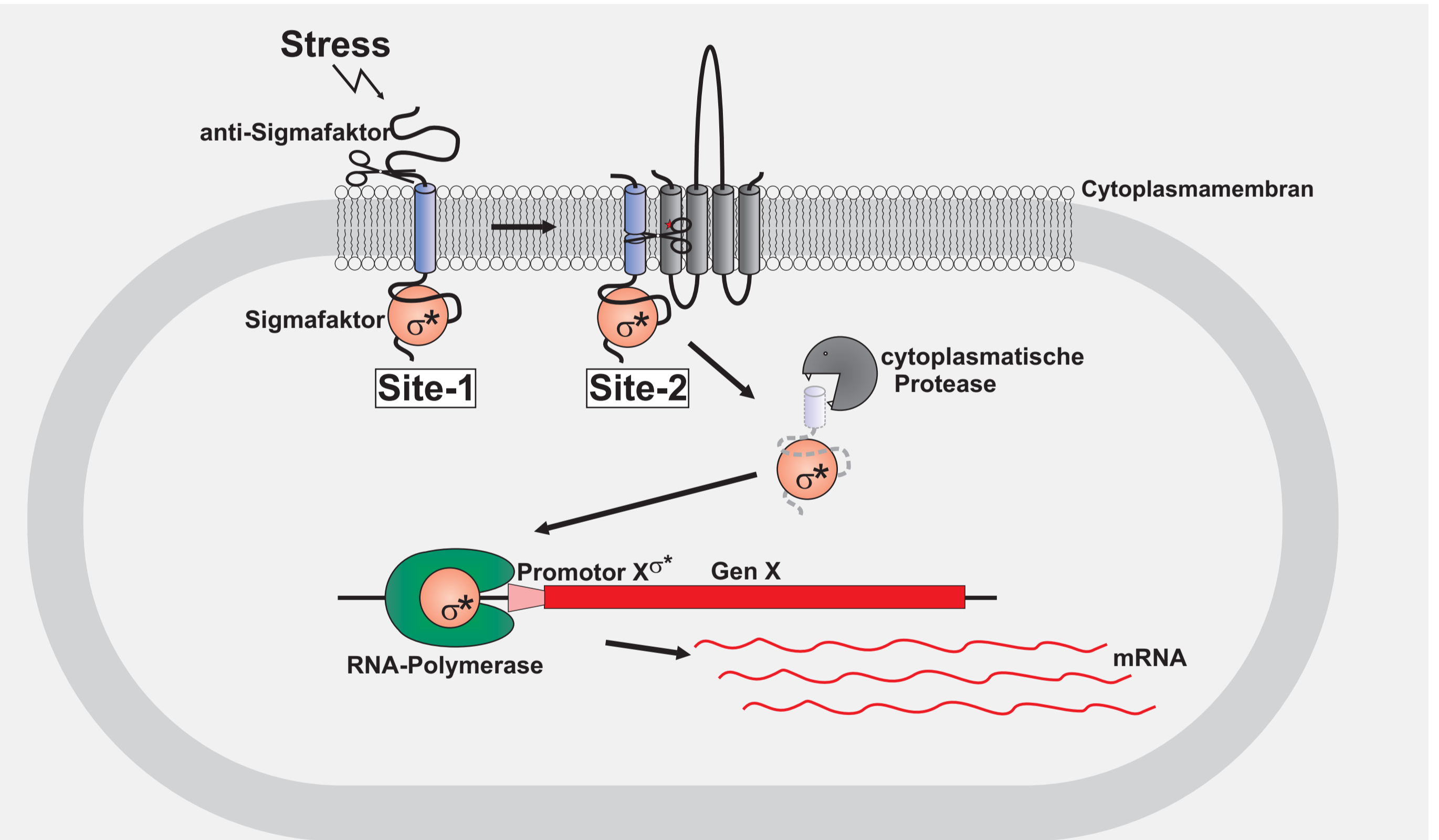
- Gram-positives Eubakterium (Firmicutes), bildet Endosporen
- ubiquitär verbreitet, kann aus Boden, Wasser und Luft isoliert werden ('Heubacillus')
- Modellbakterium zur Untersuchung zellulärer Mechanismen, wie der Differenzierung (Sporulation), der Kompetenz (Aufnahme von DNA) und der bakteriellen Stressantwort (differentielle Genregulation)
- Anwendung in der biotechnologischen Industrie, u.a. zur Produktion von Enzymen und Vitaminen

### Das Modellbakterium Bacillus subtilis

*Bacillus subtilis* ist einer der bislang am besten untersuchten Organismen, mit außerordentlich hohem biotechnologischen Potential. Wegen der einfachen Zugänglichkeit für genetische Manipulationen gilt es als Gram-positives Modellbakterium (Abb. 1), an dem stoffwechselphysiologische und regulatorische Phänomene grundlegend aufgeklärt wurden. Daneben gehört *B. subtilis* zu den 'generell unbedenklichen' Mikroorganismen, welcher im Gegensatz zu *Escherichia coli* uneingeschränkt zur Anwendung in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie zugelassen ist.

**Abb. 2: Modell der Regulation der Aktivität eines Sigmafaktors über regulierte Proteolyse eines transmembranen Anti-Sigmafaktors.**

Der Sigmafaktor ist eine Untereinheit der RNA-Polymerase, der für die Erkennung des Promotors und damit die Initiation der Transkription zuständig ist. ECF Sigmafaktoren sind alternative Sigmafaktoren, welche Gene mit extracytoplasmatischer Funktion kontrollieren. Im inaktiven Zustand wird der Sigmafaktor durch einen transmembranen Anti-Sigmafaktor festgehalten, wodurch dessen Interaktion mit der RNA-Polymerase verhindert ist. Ein Stress-Signal aktiviert eine proteolytische Kaskade. Zunächst schneidet eine erste Protease ('Site-1' Schere in der Abbildung) in der extracytoplasmatischen Domäne des Anti-Sigmafaktors, welcher dann Substrat für eine zweite Protease wird ('Site-2' Schere), die im transmembranen Bereich schneidet. Der Sigmafaktor/Anti-Sigmafaktor Komplex wird darauf ins Cytoplasma entlassen, wo weitere ATP-abhängige Clp-Proteasen die Reste des Anti-Sigmafaktors vollständig abbauen. Damit ist der Sigmafaktor frei und interagiert mit der RNA-Polymerase, um die Transkription entsprechender Gene zu initiieren [1].



### Das Ziel der Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich vornehmlich mit der Aufklärung eines Mechanismus der Stressantwort in *B. subtilis*, welcher über einen proteolytischen Abbau regulatorischer Faktoren in der Membran vermittelt wird. Die Spaltung transmembraner regulatorischer Proteine durch "in der Membran schneidende" Proteasen ist an wichtigen Signaltransduktionswegen höherer Organismen beteiligt und beeinflusst dort zelluläre Vorgänge wie Apoptose, Differenzierung, Proliferation und Neurogenese. Fehlgeleitete intramembrane Proteolyse kann zu schwerwiegenden Erkrankungen beim Menschen, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, führen. Seit einigen Jahren gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass dieser als 'regulierte intramembrane Proteolyse' (RIP) bezeichnete Mechanismus auch in Bakterien existiert und eine entscheidende Rolle bei so unterschiedlichen Vorgängen wie Sporulation, Zellteilung, Regulation des Zellzyklus, Pheromon- und Toxin-Produktion, Ausbildung von Biofilmen und vor allem der Stressantwort spielt. In einigen Fällen besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Pathogenität von Bakterien und RIP. Bislang ist jedoch wenig über die Identität und über die molekularen Mechanismen der Regulation der Aktivität der beteiligten Proteasen bekannt.

Das Ziel unserer Forschungsarbeiten ist, zunächst am Beispiel einer Stressantwort des Gram-positiven Modellbakteriums *B. subtilis*, RIP im Detail aufzuklären. Wir konnten bislang die Proteasen des ersten ('Site-1'; PrsW) und zweiten ('Site-2'; RasP) Schritts der regulierten Proteolyse eines spezifischen Transkriptionsfaktors (RsiW) identifizieren und analysieren (Abb. 2). Ferner konnten wir zeigen, dass neben diesen spezifischen Proteasen die Aktivität unspezifischer Peptidasen im extra- und intra-cytoplasmatischen Raum eine wichtige Rolle spielt.

Unerwartet wurde die Beteiligung des bakteriellen Transkriptionsterminators Rho an der Regulation eines anderen Transkriptionsfaktors gefunden. Der Mechanismus, der vermutlich eine balancierte Expression sich überlappender Gene gewährleistet, ist neuartig und wurde in dieser Form noch nicht beschrieben. Die Erforschung dieses Mechanismus ist Thema der SMWK-Forschungsvorlauförderung in 2013/2014.

Alle unsere Arbeiten sind in einen engen internationalen Forschungsverbund integriert und werden u.a. mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.