

The background of the page is a circular genome map of *Bacillus licheniformis* DSM13. The map is a circular arrangement of colored segments (yellow, cyan, purple, red) representing different genomic regions. In the center, there is a plot with a dashed line and a label 'B. licheniformis [Mbp]'. Overlaid on the map is the text 'Technische Universität München' and 'Lehrstuhl für Mikrobiologie' at the top, and 'Doktors der Naturwissenschaften' at the bottom.

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Verwendung von gerichteten und ungerichteten Mutagenese-Methoden zur Untersuchung des Acetyl-CoA Stoffwechsels von *Bacillus licheniformis* DSM13

Melanie Pfaffenhäuser

B. licheniformis
[Mbp]

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 30.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.07.2012 angenommen.

	Abkürzungsverzeichnis.....	i
	Danksagung.....	iii
I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Einleitung.....	4
II.1	Die Gattung <i>Bacillus</i> und ihre industrielle Relevanz.....	4
II.2	<i>B. licheniformis</i> als industriell bedeutender Organismus.....	5
II.3	Der Acetat-Metabolismus in Bakterien.....	7
II.3.1	Der Glyoxylatzyklus.....	8
II.3.1.1	Der Glyoxylatzyklus in <i>Escherichia coli</i>	8
II.3.1.2	Der Glyoxylatzyklus in <i>C. glutamicum</i>	11
II.4	Die Verwertung von Acetoin unter Beteiligung des <i>acu</i> - und <i>aco</i> -Operons....	12
II.4.1	Untersuchungen zum <i>acu</i> -Operon in <i>B. subtilis</i>	13
II.4.2	Untersuchungen zum <i>aco</i> -Operon in <i>B. subtilis</i>	14
II.4.3	Der Acetoin-Metabolismus in <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	14
II.5	Identifizierung von Genen mittels Transposonmutagenesen.....	15
II.5.1	Transposons und ihre Eigenschaften.....	16
II.5.2	Verwendete Transposons zur zufälligen Mutagenese in <i>B. subtilis</i>	17
II.6	Sporulation in <i>Bacilli</i>	18
III.	Material und Methoden.....	20
III.1	Material.....	20
III.1.1	Bakterienstämme.....	20
III.1.2	Plasmide.....	21
III.1.3	Oligonukleotide.....	22
III.1.4	Enzyme.....	27
III.1.5	Nährmedien und Zusätze.....	28
III.1.5.1	Nährmedien.....	28
III.1.5.2	Zusätze zu Nährmedien.....	29
III.1.6	Puffer und Lösungen.....	30
III.1.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	32
III.1.8	Software und Datenbanken.....	32
III.2	Methoden.....	33
III.2.1	Kultivierung von Bakterienzellen.....	33
III.2.1.1	Bakterienanzucht.....	33
III.2.1.2	Archivierung von Bakterienstämmen.....	33

Inhaltsangabe

III.2.2	Darstellung von DNA.....	33
III.2.2.1	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	33
III.2.3	DNA-Isolierung.....	34
III.2.3.1	Isolation chromosomaler DNA aus <i>B. licheniformis</i>	34
III.2.3.2	Kochlyse.....	35
III.2.3.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose- Gelelektrophorese.....	35
III.2.3.3.1	Aufreinigung nach dem QIAquick Gel-Extraktion Kit.....	35
III.2.3.4	Plasmidisolierung mittels Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit.....	36
III.2.4	Restriktion und Modifikation von DNA.....	37
III.2.4.1	DNA-Restriktion mit TypII-Restriktionsendonukleasen.....	37
III.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
III.2.5.1	„Inverse-PCR“.....	38
III.2.5.2	„Vectorette-PCR“.....	39
III.2.5.3	RT-PCR.....	41
III.2.5.4	QIAquick PCR-Purification Kit Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten.....	42
III.2.6	„GeneSOEing“ („Gene Splicing by Overlap Extensions“) (Horton <i>et al.</i> , 1989).....	42
III.2.7	„Ligation“.....	43
III.2.7.1	„Sticky-end Ligation“.....	43
III.2.7.2	„Blunt-end Ligation“.....	44
III.2.8	DNA-Transfertechniken.....	44
III.2.8.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	44
III.2.8.1.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
III.2.8.1.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
III.2.8.2	DNA-Transfer in <i>B. licheniformis</i> MW3.....	45
III.2.8.2.1	DNA-Transfer mittels Protoplastentransformation (verändert nach Chang & Cohen, 1979).....	45
III.2.8.2.2	DNA-Transfer mittels Konjugation.....	46

Inhaltsangabe

III.2.9	Erstellen von <i>B. licheniformis</i> DSM13-Deletions-Mutanten.....	47
III.2.10	Phänotypische Charakterisierungen von <i>B. licheniformis</i> -Deletions- Mutanten.....	48
III.2.10.1	Ansetzen der Wachstumsexperimente.....	49
III.2.10.2	Test zur Untersuchung der Sporulation.....	49
III.2.11	RNA-Isolation.....	50
III.2.12	„RLM-RACE“ Analysen.....	51
III.2.13	„Northern Blot“ Analysen.....	52
III.2.14	„Southern Blot“ Analysen.....	56
IV.	Ergebnisse.....	58
IV.1	Untersuchungen zum Glyoxylatzyklus von <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	59
IV.1.1	Bestimmung des Startpunktes des Glyoxylat-Operons.....	60
IV.1.2	Untersuchungen zur Organisation der Glyoxylat-Gene von <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	62
IV.1.2.1	RT-PCR Experimente zur Bestimmung der Transkripte der Glyoxylat- Gene.....	63
IV.1.2.2	„Northern Blot“ Analysen zur Bestimmung der Transkripte der Glyoxylat- Gene.....	64
IV.1.3	Erstellen von Deletions-Mutanten der Gene des Glyoxylat-Operons.....	66
IV.1.4	Phänotypische Charakterisierung der Deletions-Mutanten des Glyoxylat- Operons.....	71
IV.1.5	Untersuchungen zu dem „hypothetical small protein“ des Glyoxylat- Operons.....	77
IV.1.6	Komplementations-Experimente für die Definition der Funktion des hypothetischen ORF`s des Glyoxylatzyklus.....	81
IV.1.6.1	Konstruktion der Expressionsvektoren für die Komplementation des HSP`s.....	81
IV.1.6.2	Wachstumsexperimente zur Untersuchung der Komplementation und Überexpression des HSP`s.....	84
IV.1.7	Komplementation des gesamten Glyoxylat-Operons	88
IV.1.7.1	Erstellen des Expressionsvektors für das gesamte Glyoxylat-Operon.....	88
IV.1.7.2	Untersuchungen zur Lethalität des Glyoxylat-Operons.....	90
IV.1.8	Untersuchungen des Acetoin-Abbaus in <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	92
IV.1.8.1	Erstellen der Deletions-Mutanten des <i>acu</i> - und <i>aco</i> -Operons.....	93

Inhaltsangabe

IV.1.8.2	Charakterisierung der Deletions-Mutanten des <i>acu</i> - und <i>aco</i> -Operons.....	97
IV.2	Entwicklung einer Transposonmutagenese für die Identifizierung weiterer Gene des C2-Metabolismus.....	102
IV.2.1	Experimente zur Bestimmung der Integrationseigenschaften.....	103
IV.2.2	Konstruktion der konjugativen Transposon-Vektoren, pMB1 und pMB2....	113
IV.2.3	Entwicklung eines Protokolls zur Mutagenese.....	116
IV.2.3.1	Mutagenese-Prozedur 1.....	116
IV.2.3.2	Mutagenese-Prozedur 2.....	119
IV.2.4	Untersuchung der Funktion der Plasmide, pMB1 und pMB2, im <i>B. licheniformis</i> Stamm E.....	121
IV.2.4.1	Untersuchungen zum Integrationsverhalten des <i>TnYLB1</i> Transposons im <i>B. licheniformis</i> Stamm E.....	122
IV.2.4.1.1	Experimente mit dem Transposon-Vektor pMB1.....	122
IV.2.4.1.2	Experimente mit dem Transposon-Vektor pMB2.....	125
IV.3	Erstellen eines sporulations-defizienten <i>B. licheniformis</i> MW3.....	127
IV.3.1	Deletion des SpoIV-Homologs <i>yqfD</i> in <i>B. licheniformis</i> MW3.....	127
IV.3.2	Phänotypische Untersuchungen zur Deletions-Mutante von <i>yqfD</i>	130
V.	Diskussion.....	132
V.1	Glyoxylatzyklus von <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	132
V.2	Das <i>acu</i> -Operon in <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	138
V.3	Das <i>aco</i> -Operon in <i>B. licheniformis</i> DSM13.....	140
V.4	Entwicklung einer Methode zur zufälligen Transposonmutagenese.....	141
V.5	Sporulations-defizienter <i>B. licheniformis</i> MW3.....	143
VI.	Literaturverzeichnis.....	144
	Anhang.....	151
	Lebenslauf.....	168

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ace	Acetoin
AcetylCoA	Acetyl-Coenzym A
ad	bis auf angegebenes Volumen auffüllen
Amp	Ampicillin
AoDHE1	pyrophosphatabhängige Acetyl-Transferase
AoDHE2	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase
AoDHE3	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase
AoDHES	Acetoin-Dehydrogenase-Enzym-System
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	‚Basic local Alignment Search Tool‘
bp	Basenpaare (‚base pair‘)
C	Pyrimidinbase Cytosin
CIP	‚calf intestine phosphatase‘
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (‚Desoxyribonucleicacid‘)
dNTP	deoxyribonukleotid Triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
Erm	Erythromycin
<i>et al.</i>	Und Weitere (‚et alii‘)
g	Gramm
G	Guanin
Glc	Glukose
h	Stunde
HSP	hypothetical small protein
ICDH	Isocitratdehydrogenase
ICDHKP	Isocitratdehydrogenase Kinase/ phosphatase
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
Kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase
LB	Luria-Bertani
m	milli
M	Molar (mol/l)
MCS	Multiklonierungsstelle (‚multiple cloning site‘)
MDa	Megadalton
min	Minute
Na ₃ -Citrat	Trisodiumcitrat
NB	Nutrient broth

Abkürzungsverzeichnis

OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
Ori	Replikations-Ursprung
OriT	Transferursprung („Origin of transfer“)
PAB	Pennasy broth
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Poly	Polymyxin B
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“
Sec.	Sekunde
SOE	„Splicing by overlap extensions“
Sp.	Spezies
Spc	Spectinomycin
SSC	Saline sodium citrate
Suc	Succinat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	„tobacco acid pyrophosphatase“
Tc	Tetracyclin
TCA	Tricarbonsäurezyklus („tricarboxylic acid cycle“)
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tn	Transposon
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminmethan
U	Einheit der Enzymaktivität („Unit“)
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vol.	Volumen
W/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
XGal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
n	Nano

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Referenten Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl, meinem Betreuer Dr. Armin Ehrenreich und der Firma Henkel AG & Co. KGaA für die Ermöglichung dieser Dissertation und die interessanten Anregungen und Ratschläge während der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Vogel und Prof. Dr. Schwechheimer als Mitglieder der Prüfungskommission.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern Wilfried und Beate Bauch und bei meinen Geschwistern Stefan und Janine Bauch für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und meiner Dissertation bedanken, da sie mir immer mit viel Liebe und Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Ehemann Jens Pfaffenhäuser, der trotz 600 km Distanz immer zu mir und meinen Entscheidungen gestanden und mich in allen Situationen unterstützt hat. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Schwiegermutter Mechthild Pfaffenhäuser für jegliche Unterstützung.

Vielen Dank auch an unsere technischen Assistentinnen des Institutes, aber ganz besonders an Helga Gänge für ihre Mitarbeit an einigen Projekten, die zu interessanten Ergebnissen geführt haben.

Zu guter letzt möchte ich nun allen Kolleginnen und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe, der AG Ehrenreich und aus allen anderen Arbeitsgruppen für die netten Gespräche und die interessanten Diskussionen danken, wodurch ein nettes Arbeitsklima entstehen konnte.

I. Zusammenfassung

Um einen Produktionsprozess mit seiner maximalen Effektivität durchführen zu können sollte man den Stoffwechsel des verwendeten Bakteriums genau kennen. Die Bestimmung der Genomsequenz von *Bacillus licheniformis* DSM13 zeigte eine hohe Kolinearität zu *Bacillus subtilis*, wodurch die Funktion vieler Gene bereits bekannt ist. *B. licheniformis* DSM13 wies aber auch Unterschiede zu *B. subtilis* auf. So besitzt er z.B. Homologe zu einer Malat-Synthase und einer Isocitrat-Lyase, was für das Vorhandensein eines Glyoxylatzyklus spricht, den *B. subtilis* nicht besitzt (Veith *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass *B. licheniformis* eine höhere Exoenzymproduktion aufweist, als *B. subtilis* (Schallmeyer *et al.*, 2004), weshalb Unterschiede im Stoffwechsel untersucht werden sollten, um die Ursachen für die erhöhte Produktion von Exoenzymen in Fermentationen verstehen zu können. Der Beitrag dieser Arbeit bestand aus der Untersuchung des C2-Metabolismus von *B. licheniformis* DSM13 mit Hilfe von gerichteten und ungerichteten Mutagenese-Methoden.

Wie oben bereits erwähnt, hat *B. licheniformis* DSM13 im Gegensatz zu *B. subtilis* die Fähigkeit, Substrate, welche über C2-Körper abgebaut werden, als einzige Kohlenstoffquellen nutzen zu können (Veith *et al.*, 2004). Bisher existieren noch keine Kenntnisse zum Glyoxylatzyklus in *Bacillen*, weshalb dieser Stoffwechselweg in dieser Arbeit in dem Bakterium *B. licheniformis* DSM13 untersucht worden ist. Diese Untersuchungen erfolgten mit Hilfe einer, in der Arbeitsgruppe von Dr. Ehrenreich erarbeiteten, markerfreien Deletions-Methode. Parallel wurde begonnen, eine Methode zur ungerichteten Mutagenese zu entwickeln, um bisher unbekannte Gene des C2-Metabolismus identifizieren zu können.

Erste Ergebnisse von Wachstumsuntersuchungen zeigten bereits, dass *B. licheniformis* DSM13 ein funktionelles Glyoxylat-Operon besitzen muss, da dieser in der Lage ist Acetat als alleinige C-Quelle zu nutzen (Veith *et al.*, 2004). Der Startpunkt des potentiellen Glyoxylat-Operons konnte in dieser Arbeit mittels ‚RLM-RACE‘-Analysen auf 230 bp ‚upstream‘ der Malat-Synthase bestimmt werden. Eine nähere Betrachtung des ‚upstream‘ Bereichs identifizierte einen 45 AS kleinen hypothetischen ORF in diesem Bereich. Daraufhin wurde mittels RT-PCR und ‚Northern Blot‘ Analysen die Organisation dieser Gene untersucht. Diese zeigten, dass es sich um ein Glyoxylat-Operon, bestehend aus einem 45 Aminosäuren (AS) kleinen hypothetischen ORF (HSP) ‚upstream‘ des Gens für die Malat-Synthase, aus einem Gen für die Malat-Synthase und aus einem Gen für die Isocitrat-Lyase, handelt. Durch die Erstellung von Deletions-Mutanten des HSP's, der Malat-Synthase, der

Zusammenfassung

Isocitrat-Lyase und des gesamten Operons konnte gezeigt werden, dass der Glyoxylatzyklus essentiell ist für das Wachstum auf Medien mit Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol als alleinige Kohlenstoffquelle. Die physiologischen Untersuchungen der Deletions-Mutante des HSP's ließen vermuten, dass dieses essentiell für die Funktion des Glyoxylatzyklus ist, da eine Deletion dieses Gens in einem totalen Wachstumsverlust auf den oben genannten Substraten resultierte. Deshalb wurde der ORF in BLAST Vergleichen näher betrachtet und es ergab sich, dass Orthologe dieses ORF's in mehreren unterschiedlichen *Bacillen* existieren. In *B. subtilis* z.B. existiert ein Homolog ‚upstream‘ der Isocitrat-Lyase, was dafür sprechen könnte, dass es hier ebenfalls an der Regulation des Glyoxylatzyklus beteiligt sein könnte. In anderen *Bacillen* existieren aber auch Homologe in unterschiedlichen metabolischen Zusammenhängen. In dieser Arbeit konnte eine Toxizität von Teilen des Glyoxylat-Operons, welche das HSP in verschiedenen Kombinationen enthielt, für *E. coli* nachgewiesen werden. Diese Tatsachen könnten möglicherweise für eine vollkommen neue Art der Regulation durch diese Art von potentiellen kleinen hypothetischen Proteinen in *Bacillen* sprechen.

Weitere Untersuchungen zum C2-Metabolismus beschäftigten sich mit den Funktionen des *acu*- und des *aco*-Operons. In *B. subtilis* sind diese beiden Operons im Zusammenhang mit dem Acetoin Stoffwechsel untersucht worden (Grundy *et al.*, 1994; Silbersack *et al.*, 2006). Hier konnte gezeigt werden, dass das *acu*-Operon für die CoA-Homöostase und die Sporulation in *B. subtilis* (Grundy *et al.*, 1994) und das *aco*-Operon für die Actoin-Verwertung zuständig ist (Silbersack *et al.*, 2006). Die Rolle dieser beiden Operons wurde in dieser Arbeit in *B. licheniformis* DSM13 untersucht. Nach einer erfolgreich erstellten Deletion von den Genen *acuA* und *acuC* mit Hilfe der markerfreien Deletions-Methode (Rachinger, Dissertation, 2010) konnte in physiologischen Untersuchungen für *acuA* eine Beteiligung am Acetatmetabolismus und an der Sporulation von *B. licheniformis* DSM13 nachgewiesen werden. Für die Deletions-Mutante von *acuC* konnte gezeigt werden, dass bei Deletion dieses Gens die Fähigkeit verloren geht, Acetat zu verwerten. Dies spricht für eine Aktivierung der Acetyl-CoA-Synthetase durch *AcuC*. Das bedeutet, das *acu*-Operon wirkt vermutlich regulierend auf dieses Enzym, wobei das Gen *acuA* den Gegenspieler zu *acuC* darstellt und die Aktivität der Acetyl-CoA Synthase mindert. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte ist die Acetyl-CoA-Synthetase, wie in *B. subtilis*, verantwortlich für den Abbau von Acetat zu Acetyl-CoA.

Mit Hilfe der markerfreien Deletion der Gene *acoB* und *acoR* konnte gezeigt werden, dass *B. licheniformis* die Verwertung von Acetoin über das *aco*-Operon bewerkstelligt. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit konnte *acoR* als Regulator des *aco*-Operons identifiziert

Zusammenfassung

werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Deletions-Mutanten des *aco*-Operons nicht mehr in der Lage waren auf Acetoin- und 2,3-Butandiol als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Daraus konnte geschlossen werden, dass 2,3-Butandiol über Acetoin zu Acetyl-CoA abgebaut wird und anschließend in den TCA- bzw. Glyoxylatzyklus einfließt. Innerhalb dieser Arbeit war es allerdings nicht möglich ein Gen zu identifizieren, welches für den Abbau von 2,3-Butandiol zu Acetoin verantwortlich ist.

Für die Entwicklung der Transposonmutagenese zur Identifikation weiterer am C2-Metabolismus beteiligten Gene, konnte in dieser Arbeit das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* als das Transposon identifiziert werden, welches in der Lage ist zufällig in das Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 und *B. licheniformis* Stamm E zu integrieren. Des Weiteren wurden die konjugativen Transposon-Vektoren, pMB1 und pMB2, konstruiert, um die Effektivität der Übertragung in *Bacillus* zu steigern. Der Transfer der Plasmide war stets sehr effizient und es konnten einige wenige Transposon-Mutanten identifiziert werden.

Für die Anwendung von geplanten Modellfermentationen in unserem Labor wurde in dieser Arbeit ein sporulations-defizienter *B. licheniformis* MW3 erstellt. Es wurde das *yqfD* Gen deletiert, welches Homologien zu SpoIV Genen aufwies (Nahrstedt *et al.*, 2005). Der erzeugte Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delyqfD war nicht mehr in der Lage hitzeresistente Sporen auszubilden.

II. Einleitung

II.1 Die Gattung *Bacillus* und ihre industrielle Relevanz

Bei der Gattung *Bacillus* handelt es sich um Gram-positive Eubakterien mit niedrigem GC-Gehalt, die zu der Familie der *Bacillaceae* gehören (Garrity & Holt, 2001; Priest, 1993) und taxonomisch den *Firmicutes* (lat. Firmitas: Stärke; cutes: Hülle) zugeordnet werden. Die Familie der *Bacillaceae* umfasst stäbchenförmige, aerobe bis fakultativ anaerobe Bakterien mit saprophytischer Lebensweise und ubiquitärem Vorkommen, die aufgrund ihrer peritrich angeordneten Begeißelung in der Lage sind sich in ihrem Lebensraum frei fortzubewegen. Des Weiteren haben Vertreter dieser Familie die besondere Fähigkeit zur Bildung von thermo-, UV- und chemoresistenter Endosporen unter Mangelbedingungen (Errington *et al.*, 2003).

Bacillen können sehr leicht kultiviert werden und zeichnen sich durch eine heterogene Physiologie aus. So gibt es z.B. psychrophile, mesophile, thermophile, alkophile, neutrophile und acidophile Spezies (Gibson und Gordon, 1975). Die Gattung *Bacillus* beinhaltet eine Vielzahl von industriell relevanten Stämmen, wie z.B. *B. subtilis*, *B. subtilis* und auch *B. licheniformis* (Schallmey *et al.*, 2004). Besonders interessant für eine industrielle Anwendung von Vertretern dieser Gattung sind Eigenschaften, wie z.B. die hohen Wachstumsraten, die ausgeprägte Sekretion extrazellulärer Enzyme oder ihre Apathogenität gegenüber Pflanzen, Tieren und Menschen. Eine Ausnahme bildet allerdings die *B. cereus* Gruppe, mit verschiedenen Lebensmittelverderbern sowie dem Milzbranderreger *B. anthracis* und insektenpathogenen Formen wie *B. thuringiensis* (Priest *et al.*, 2004).

Von weiterem großem industriellem Interesse ist die Fähigkeit der *Bacilli* auf kostengünstigen Substraten, wie Cellulose, Stärke oder Pektin mit hohen Raten zu wachsen und eine Vielzahl an biotechnologisch relevanten Proteinen in das Kulturmedium zu sekretieren (Zukowski *et al.*, 1989; Priest *et al.*, 1977). Deshalb werden einige Vertreter dieser Gattung von der Industrie hauptsächlich für die Produktion von Exoenzymen in mikrobiologischen Fermentationen eingesetzt (Schallmey *et al.*, 2004). Von den produzierten Exoenzymen sind z.B. alkalische Proteasen, Amylasen, Pullulanasen, und β -Glukanasen, die vor allem ihre Verwendung in der Reinigungsmittel-, Textil-, Back- und Getränkeindustrie finden von großer industrieller Bedeutung. Ein weiteres Exoenzym, welches seine Verwendung als Waschmittelzusatz findet, ist eine Serinprotease (Subtilisin), wobei die

Einleitung

jährliche Produktion durch *B. licheniformis*, *B. pumilus* und *B. subtilis* ca. 500 Tonnen beträgt (Rao *et al.*, 1998). Die *Bacilli* finden ihren industriellen Einsatz aber auch in der fermentativen Produktion von Antibiotika wie Bacitracin und Surfactin (Nakano *et al.*, 1997).

II.2 *B. licheniformis* als industriell bedeutender Organismus

Wie oben bereits erwähnt stellt *B. licheniformis* einen industriell sehr interessanten Organismus dar, da die Exoenzym-Produktion und –Sekretion höher ist als bei dem industriell viel genutzten Modellorganismus *B. subtilis* (Schallmey *et al.*, 2004).

B. licheniformis (Abb. II-1) ist ein ubiquitäres, nicht-pathogenes, Gram-positives, sporenbildendes Bakterium. Es wurde weltweit aus Boden- und sich zersetzendem Pflanzenmaterial isoliert und als mesophiler Organismus identifiziert, welcher in der Lage ist sowohl aerob als auch anaerob zu wachsen (Sneath *et al.*, 1986). *B. licheniformis* ist in der Lage über einen weiten Temperaturbereich zu wachsen, der sich von 32 bis 55°C erstreckt, wobei das Temperatur-Optimum zwischen 37 und 45°C liegt (Sneath *et al.*, 1986).

Innerhalb der Gattung *Bacillus* wurden die verschiedenen Arten aufgrund Untersuchungen der rRNA in mehrere phylogenetische Gruppen unterteilt (Stackebrandt *et al.*, 1987; Ash *et al.*, 1991). Die Gruppe I oder auch die *B. polymyxa* Gruppe (Paenibacillaceae) wurde im Jahre 1993 von der Gattung *Bacillus* getrennt und in *Paenibacillus polymorpha* umbenannt (Ash *et al.*, 1993). Vertretern der Gruppe II (*B. subtilis* Gruppe) sind in der Lage auf diversen Zuckern Säuren zu produzieren und bilden bei Mangelbedingungen ovale, zentrale oder subterminale, in der Mutterzelle lokalisierte Endosporen aus (Priest *et al.*, 1993). Zu dieser Gruppe II sind auch *B. licheniformis* (Priest *et al.*, 1993), *B. halodurans* (Takami *et al.*, 2000), *B. cereus* ATCC 10987 (Ivanova *et al.*, 2003) und *B. anthracis* Ames (Read *et al.*, 2003) und *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) zuzuordnen. Diese Arten sind in der Lage sowohl aerob als auch teilweise anaerob zu wachsen. Die genannten signifikanten Eigenschaften machen Bakterien dieser Gruppe zu industriell interessanten Organismen, da sie dadurch vielseitig in fermentativen Prozessen einsetzbar sind. Die Gruppen III (*B. brevis* Gruppe) und IV (*B. sphaericus* Gruppe) beinhalten meist strikt aerobe *Bacilli*.

Einleitung

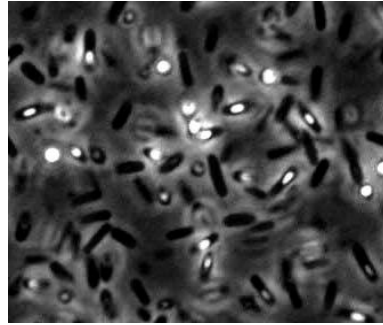


Abbildung II-1 Lichtmikroskopische Darstellung von *B. licheniformis* DSM13 (eigene Aufnahmen).

Ein in der Industrie viel genutzter Produktionsstamm ist *B. subtilis*. Untersuchungen mit *B. licheniformis* und *B. subtilis* zeigten aber, dass diese beiden Arten größere Mengen an Exoenzymen (20-25 g/l) sekretieren als *B. subtilis* (Schallmey *et al.*, 2004) und deshalb nun vermehrt industriell genutzt werden. Daher ist es von Interesse Stoffwechselwege dieser Bakterienarten genauer zu verstehen, um Produktionsprozesse optimieren zu können.

Untersuchungen von Veith *et al.* (2004) zeigten, dass das Genom von *B. licheniformis* DSM13 aus einem einzelnen Chromosom von 4 222 748 bp besteht und einen GC-Gehalt von 46,2 % aufweist. Außerdem konnte eine hohe Kolinearität zu *B. subtilis* nachgewiesen werden. Beide Stämme besitzen z.B. alle Gene der Glykolyse, des Pentose-Phosphat-Weges und des Citratzyklus. Im Gegensatz zu *B. subtilis* weist das Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 aber auch Gene auf, die für eine Isocitrat-Lyase und für eine Malat-Synthase kodieren und es diesem Bakterium ermöglichen auf C2-Substraten, wie z.B. Acetat wachsen zu können (Veith *et al.*, 2004). Ferner sind auch einige Gene von potentiell biotechnologischem Interesse vorhanden, die z.B. für Proteasen, Pektin-Lyasen, Lipasen und andere degradative Enzyme kodieren. Des Weiteren existieren in *B. licheniformis* DSM13 Gene, die für den Lichenysin-Synthase Komplex (Konz *et al.*, 1999) und für Cellulose-abbauende Exoenzyme (Cellulose-1,4- β -Cellobosidase, Endo-1,4- β -Mannosidase, Endo-1,4-Glucanase) kodieren (Veith *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu *B. subtilis*, der als Modellorganismus für Gram-positive Bakterien dient, ist *B. licheniformis* erst durch die Entschlüsselung des Genoms im Jahre 2004 (Veith *et al.*, 2004) für molekularbiologische Methoden zugänglich geworden. Seither ist z.B. die Anwendung von DNA-Microarray-Technologien möglich, die eine genaue Betrachtung der Regulationen, die im Organismus unter definierten Bedingungen ablaufen, ermöglicht. Eine Methode zur Klonierung in *B. licheniformis* DSM13 wurde erst im Jahre 2009 (Waschkau *et al.*) entwickelt, die allerdings noch das große Problem beinhaltet, dass die Transformation

Einleitung

über Protoplasten nicht sehr effizient war. Im Jahre 2010 wurde dann von unserer Arbeitsgruppe eine Methode entwickelt, die zuverlässig zu markerfreien Deletionen führt (Rachinger, Dissertation, 2010). Die Entwicklung dieser Methode zur Erstellung von ‚clean deletions‘ in *B. licheniformis* ermöglicht ein gezieltes deletieren einzelner Gene oder Genbereiche und so z.B. eine detaillierte Untersuchung einzelner Stoffwechselwege. Diese Methode kam in dieser Arbeit für die Untersuchungen des C2-Metabolismus und die Erzeugung einer sporulations-defizienten Deletions-Mutante des Ausgangsstammes *B. licheniformis* MW3 (Waschkau *et al.*, 2008) zum Einsatz.

In dieser Arbeit stand die Untersuchung des C2-Metabolismus mit Hilfe der gezielten Mutagenese im Mittelpunkt. Eine ungerichtete Methode zur Mutagenese soll der Identifikation von unbekannt Genen des C2-Metabolismus dienen. Die ersten Experimente für die Entwicklung eines effektiven Mutagenese-Protokolls wurden bereits in dieser Arbeit durchgeführt, welche in folgenden Arbeiten weiter geführt werden müssten. Mit Hilfe dieser Methode könnte z.B. eine Transposonmutanten-Bibliothek erstellt werden, mit Hilfe derer viele Gene von *B. licheniformis* DSM13 unbekannter Funktion charakterisiert werden könnten. Außerdem wäre eine Identifizierung produktionsrelevanter Gene für *B. licheniformis* möglich, wodurch die Produktion von Exoenzymen und Antibiotika optimiert werden könnte.

II.3 Der Acetat-Metabolismus in Bakterien

Eine besonders interessante Eigenschaft von *B. licheniformis* DSM13 und ein essentieller Unterschied zu *B. subtilis* ist seine Fähigkeit Acetat und andere, über C2-Körper abbaubare Substrate als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Beide Bakterienarten produzieren während des Wachstums auf Glukose oder Aminosäuren sogenannte ‚overflow‘ Metabolite, wie z.B. Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol. Die Verwertung dieser C2-Metabolite erfolgt in *B. subtilis* aber ausschließlich, wenn noch weitere bevorzugte Energie- und Kohlenstoffquellen vorhanden sind, da kein Glyoxylatzyklus vorhanden ist (Ramos *et al.*, 2000). *B. licheniformis* hingegen, welcher Homologe von Genen, die für eine Malat-Synthase und eine Isocitrat-Lyase kodieren, besitzt kann C2-Metabolite nicht nur verwerten, sondern auch als alleinige Kohlenstoffquellen nutzen. Auf Grund dieses Unterschiedes zwischen *B. subtilis* und *B. licheniformis* steht der Acetat-Metabolismus in dieser Arbeit im Mittelpunkt der metabolischen Untersuchungen.

Einleitung

In *E. coli* und anderen aeroben Organismen wird Acetat ausschließlich über den Tricarbonsäure Zyklus (TCA) vollständig oxidiert. Bei jedem Zyklus reagiert Acetat, in Form des Acetyl-CoA, mit Oxalacetat und bildet Citrat. Das Citrat wird durch schrittweise Oxidationen wieder zu Oxaloacetat. Während dieser Reaktionen werden zwei Moleküle Kohlenstoffdioxid und die Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ gebildet, welche in der Atmungskette dann Energie in Form von ATP liefern. Außerdem entsteht innerhalb dieses Zyklus Energie in Form von GTP (Krebs *et al.*, 1980). Da viele Intermediate des TCA-Zyklus auch als Vorläufer für wichtige Bestandteile der Zelle, wie z.B. für Aminosäuren, Glukose oder Fettsäuren dienen ist dieser Zyklus essentiell für das Wachstum von Mikroorganismen auf jeder beliebigen Kohlenstoffquelle (Roberts *et al.*, 1951). Acetat kann zwar von Mikroorganismen über den TCA-Zyklus verwertet werden, dies geht aber wie oben beschrieben mit dem Verlust von Vorläufern für die Biosynthese einher, wodurch der Abbau limitiert werden kann, wenn Oxalacetat als Acetyl-CoA Akzeptor nicht auf anderem Weg regeneriert wird. Deshalb ist es für viele Mikroorganismen von Vorteil, wenn sie den Glyoxylat-Bypass besitzen, um auf diese Weise Oxalacetat regenerieren zu können. Die genaue Funktion dieses besonderen Zyklus ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

II.3.1 Der Glyoxylatzyklus

Der Abbau von Acetat durch den Glyoxylatzyklus wurde bisher schon für eine Vielzahl von Bakterien beschrieben, wie z.B. *Acinetobacter calcoaceticus* (Hoyt *et al.*, 1991), *Corynebacterium glutamicum* (Wendisch *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004; Gerstmeir *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2008), *Pseudomonas putida* (Klinke *et al.*, 2000) und *Mycobacterium tuberculosis* (Smith *et al.*, 2003). In den beiden folgenden Kapiteln wird ausschließlich der Glyoxylatzyklus in dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* und in dem G+C-reichen Gram-positiven Bakterium *Corynebacterium glutamicum* beschrieben. Wie im Folgenden zu sehen sein wird, kann sich die Organisation des Glyoxylat-Operons und dessen Regulation in verschiedenen Organismen erheblich unterscheiden, weshalb die Untersuchung dieses Metabolismus in *Bacillen* besonders interessant ist.

II.3.1.1 Der Glyoxylatzyklus in *E. coli*

Bestens untersucht ist der Glyoxylatzyklus in *E. coli*, welches ein Gram-negatives fakultativ anaerobes Bakterium ist und seit Jahrzehnten als Modellorganismus für

Einleitung

mikrobiologische Untersuchungen dient.

Der Glyoxylatzyklus (Abb. II-2) besteht aus sechs der acht Reaktionen des TCA-Zyklus und unterscheidet sich im Wesentlichen dadurch, dass 2 Oxalacetat Moleküle als Acetyl-CoA Akzeptoren gebildet werden und die Reaktionssequenz Akzeptor für ein weiteres Acetyl-CoA Molekül ist.

Vom Isocitrat aus werden statt α -Oxoglutarat Succinat und Glyoxylat gebildet, welches dann unter Einbezug von Acetyl-CoA direkt zu Malat umgesetzt werden kann (Abbildung II-2) (Kornberg und Madsen, 1957; Kornberg und Krebs, 1957). Die Reaktion von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat wird in *E. coli* von der Isocitrat-Lyase katalysiert (Saz *et al.*, 1954) und die sich anschließende Kondensation vom Acetyl-Co-Enzym mit Glyoxylat zu Malat von der Malat-Synthase (Wong und Ajl, 1955). Durch diesen Bypass ist es dem Bakterium möglich aus C₂-Substraten, wie z.B. Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol, Zellkomponenten aufzubauen und diese als einzige Energiequelle zu nutzen (Kornberg *et al.*, 1966).

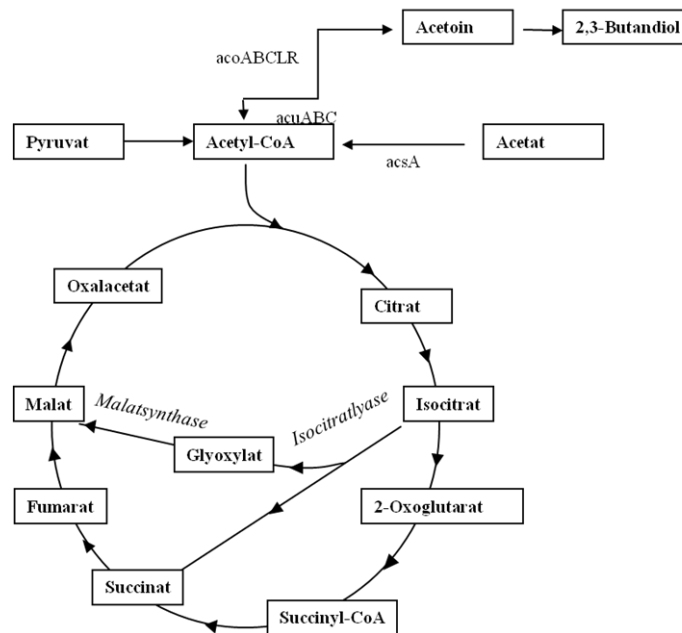


Abbildung II-2: Darstellung des Tricarbonsäurezyklus mit dem integrierten Glyoxylatzyklus in *Escherichia coli*. (verändert nach Kornberg *et al.*, 1966)

Das Glyoxylat-Operon von *E. coli* besteht aus den Genen *aceB*, welches für die Malat-Synthase kodiert, *aceA*, welches für die Isocitrat-Lyase kodiert und *aceK*, welches für die Isocitratdehydrogenase/kinase/phosphatase kodiert (Chung *et al.*, 1988). Die Expression des Glyoxylat-Operons (*aceBAK*) ist bei Wachstum auf Acetat induziert (Kornberg *et al.*, 1966; Maloy *et al.*, 1982). Es ist allerdings eine Umstellung von dem TCA-Zyklus auf den

Einleitung

Glyoxylatzyklus notwendig, welcher einen Schaltvorgang an der Isocitratdehydrogenase (ICDH) voraussetzt. Dieses Umschalten ist in *E. coli* intensiv untersucht worden und es wurden mehrere Regulationen des Schaltvorgangs identifiziert, die im Folgenden beschrieben werden.

Eine wichtige Rolle für das Umschalten spielt die Phosphorylierung der ICDH, wodurch deren Aktivität gemindert wird. Das Isocitrat wird daraufhin in den Glyoxylatzyklus geleitet und anschließend von der Isocitrat-Lyase zu Succinat und Glyoxylat abgebaut (LaPorte *et al.*, 1983/ 1985; Nimmo *et al.*, 1984), wodurch es zu einer optimalen Verteilung des Kohlenstoffflusses zwischen dem TCA-Zyklus und dem Glyoxylatzyklus kommt (Nimmo *et al.*, 1984). Die reversible Phosphorylierung der ICDH wird von der Isocitratdehydrogenasekinase/ phosphatase (IDHKP) katalysiert (LaPorte *et al.*, 1983; Nimmo *et al.*, 1984). Die IDHKP benötigt ATP als Phosphat Donor für die Kinase Reaktion und als Kofaktor für die Dephosphorylierungsreaktion (LaPorte *et al.*, 1983; Nimmo *et al.*, 1984). Die Aktivität der IDHKP wird allosterisch durch die Level unterschiedlicher Metabolite in der Zelle reguliert, die als Input-Signale dieses Systems agieren (Nimmo *et al.*, 1984). Dieser Mechanismus ist abhängig von der Anwesenheit der entsprechenden Kohlenstoffquellen, d.h. bei Anwesenheit von Acetat erfolgt die Umstellung auf den Glyoxylatzyklus. Bei Wachstum auf Substraten, die direkt über Acetyl-CoA abgebaut werden, werden über die Bildung von Malat und Succinat, während des Glyoxylatzyklus, zwei Oxalacetate gebildet. Das bedeutet, dass dem Bakterium trotz der Verwendung von Intermediaten für Biosynthesen immer genügend Oxalacetat als Akzeptor für das Acetyl-CoA zur Verfügung steht und der Zyklus am Laufen gehalten werden kann.

Weitere Untersuchungen zeigten zusätzlich eine Regulation des Schaltvorganges über eine direkte Einwirkung durch die Produkte von *iclR* und *fadR* auf das Glyoxylat-Operon (Kornberg *et al.*, 1966; Maloy *et al.*, 1982). *IclR* liegt ‚downstream‘ des *ace*-Operons und kodiert für ein Repressorprotein (Kornberg *et al.*, 1966; Maloy *et al.*, 1982), welches mit dem Transkriptionsenzym um dieselbe Bindestelle am Promotor des *ace*-Operons konkurriert (Cortay *et al.*, 1991). Das Produkt von *fadR* reprimiert eigentlich das *fad* Regulon, welches Gene des Fettstoffwechsels beinhaltet (Nunn *et al.*, 1986). Es ist aber auch an der Regulation des *ace*-Operons beteiligt (Maloy *et al.*, 1980; Maloy *et al.*, 1982), indem es an den Promotor von *iclR* bindet und dadurch dessen Expression aktiviert (Gui *et al.*, 1996). *IclR* kann dann an den Promotor des *ace*-Operons binden und dessen Expression reprimieren (Cortay *et al.*, 1991).

II.3.1.2 Der Glyoxylatzyklus in *C. glutamicum*

C. glutamicum ist ein nicht-pathogenes fakultativ anaerobes, G+C-reiches Gram-positives Bakterium, welches für die industrielle Produktion von zahlreichen Metaboliten wie Aminosäuren und organischen Säuren industriell genutzt wird (Kinoshita *et al.*, 1972 und Nishimura *et al.*, 2007).

Für diese Arbeit ist es besonders interessant, dass *C. glutamicum*, als Gram-positives Bakterium, in der Lage ist auf Medium mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die meisten Untersuchungen zum Acetat- und im speziellen zum Glyoxylatzyklus beschäftigten sich nämlich hauptsächlich mit Gram-negativen Bakterien oder Pflanzen. Die Fähigkeit dieses Bakteriums zum Wachstum auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle ließ auf das Vorhandensein von Genen, die für die Proteine des Glyoxylatzyklus kodieren, schließen.

Die ersten Untersuchungen zum Glyoxylatzyklus in *C. glutamicum* beschäftigten sich deshalb mit der Charakterisierung der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase (Reinscheid *et al.*, 1994a; Reinscheid *et al.*, 1994b). Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zu *E. coli* eine andere Organisation der Isocitrat-Lyase (*aceA*). Das *aceA* Gen von *C. glutamicum* trägt ‚upstream‘ einen Promotor (500 bp Region) und die Strukturen, die für die Regulation notwendig sind. Außerdem ist das Gen nicht an das ‚upstream‘ Gen (*aceB*) gekoppelt, sondern ist monocistrisch organisiert. Die Funktion der Isocitrat-Lyase stimmt aber mit der von *E. coli* überein; sie katalysiert die Konversion von Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat. Ihre Aktivität kann durch Fructose-1,6-bisphosphat, 6-Phosphogluconat, 3-phosphoglycerat, PEP und Succinat inhibiert werden (Reinscheid *et al.*, 1994a). Die Untersuchungen zur Malat-Synthase bestätigten die oben genannten Ergebnisse der unterschiedlichen Organisation des Glyoxylat-Operons im Vergleich zu *E. coli*. Es konnte gezeigt werden, dass die vorhandene Malat-Synthase (*aceB*) dieselbe Funktion besitzt, wie die von *E. coli*. Sie katalysiert auch in *C. glutamicum* die Kondensation von Glyoxylat mit Acetyl-CoA zu Malat (Reinscheid *et al.*, 1994b).

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Regulation der Gene des Glyoxylatzyklus in *C. glutamicum*. Die Ergebnisse zeigten, dass die Gene *aceA* und *aceB* über einen Zweifachmechanismus reguliert werden. Kim *et al.* (2004) beschreiben in Anwesenheit von cAMP die Repression der Glyoxylat-Gene durch die Bindung von GlxR Proteinen an die *aceA/aceB* intergenische Region (Gerstmeir *et al.*, 2004). Anschließende Experimente zeigten eine Kopplung dieser Regulation mit der auf transkriptionaler Ebene

Einleitung

durch den Repressor RamB. RamB mindert, in Anwesenheit von Glukose, die Transkription der Acetat-Kinase, der Phosphotransacetylase, der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase durch eine Bindung des Proteins an die jeweilige Promotor-Region der entsprechenden Gene (Gerstmeir *et al.*, 2004). In nachfolgenden Untersuchungen wurde RamA als ein weiterer Regulator identifiziert, der an der Adaption von *C. glutamicum* an Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle beteiligt ist. Die Deletion dieses Gens führte zu einem Wachstumsverlust auf Acetat als einzige Kohlenstoffquelle und es konnte ein vollständiger Aktivitätsverlust der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase gezeigt werden. Die Resultate zeigten demnach, dass es sich bei RamA um einen Aktivator der Gene des Glyoxylatzyklus *aceA* und *aceB* handelt (Cramer *et al.*, 2006).

II.4 Die Verwertung von Acetoin unter Beteiligung des *acu*- und *aco*-Operons

Acetoin und 2,3-Butandiol sind, genau wie Acetat, ein Produkt des fermentativen Metabolismus vieler prokaryotischer und eukaryotischer Mikroorganismen. Es ist bekannt, dass Acetoin während der stationären Phase produziert wird. Dies erfolgt bei einem niedrigen pH-Wert, um diesen innerhalb der Zelle stabil zu halten. Die α -Acetolactat-Synthase (*alsS*) bildet dabei zunächst aus 2 Molekülen Pyruvat ein Molekül Acetolaktat, welches anschließend durch eine Acetolaktatdecarboxylase (*alsD*) zu Acetoin umgewandelt wird (Zahler *et al.*, 1976). Es ist bereits seit vielen Jahren bekannt, dass Bakterien, wie *B. licheniformis* DSM13, ebenfalls in der Lage sind Acetoin bzw. 2,3-Butandiol als einzige Kohlenstoffquelle für ihr Wachstum zu nutzen (Williams *et al.*, 1928).

Studien zum Acetoin-Metabolismus wurden bereits in verschiedenen Organismen, wie z.B. in *Clostridium magnum* (Krüger *et al.*, 1994), *Pelobacter carbinolicus* (Oppermann *et al.*, 1991/1994) oder *Klebsiella pneumoniae* (Deng *et al.*, 1994) durchgeführt. Bei diesen Bakterien erfolgt der Acetoin-Abbau über das Acetoin-Dehydrogenase-Enzym-System (AoDH ES), welches aus der Pyrophosphat-abhängigen Acetoin-Dehydrogenase (AoDH E1), der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (AoDH E2) und der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (AoDH E3) besteht (Oppermann *et al.*, 1991/1994). Die Strukturgene dieses Enzym-Systems *acoA* (kodiert für die α -Untereinheit von AoDH E1), *acoB* (kodiert für die β -Untereinheit von AoDH E1) und *acoC* (kodiert für AoDH E2) wurden in den oben genannten Bakterien bereits als ‚Cluster‘ in kolinearer Orientierung identifiziert (Deng *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1994; Oppermann *et al.*, 1994).

Einleitung

Im folgenden Abschnitt wird der Acetoin-Metabolismus in *B. subtilis* näher beschrieben, da *B. subtilis* Acetoin während der exponentiellen Wachstumsphase über das *als*-Operon produzieren kann (Renna *et al.*, 1993) und es als externen Kohlenstoffspeicher oder als Kohlenstoff- und Energiequelle während der Sporulation in der stationären Phase verwenden kann (Lopez *et al.*, 1976). Eingehende Untersuchungen der Acetoin-Verwertung in *B. subtilis* beschäftigten sich vorwiegend mit der Studie zweier Operons, dem *acuABC* (Grundy *et al.*, 1993/ 1994; Turinski *et al.*, 2000) und dem *acoABCL*-Operon (Huang *et al.*, 1999; Silbersack *et al.*, 2006).

II.4.1 Untersuchungen zum *acu*-Operon in *B. subtilis*

Die ersten Arbeiten von Grundy *et al.* legten ihren Fokus vorwiegend auf die Regulation des Acetoinabbaus durch das *acu*-Operon. Dabei wurden die Gene *acsA*, welches für die Acetyl-Coenzym A-Synthetase kodiert, und die Gene *acuABC* downstream von *ccpA*, einem globalen Regulator für die Glukose-reprimierte *amyE* Expression identifiziert (1993). Bei einer Anzucht von *B. subtilis* in Medium mit Glukose und Acetat bzw. Acetoin oder 2,3-Butandiol führte die Inaktivierung von *acsA* und der *acuABC* Gene zu einem verminderten Wachstum und einer geringeren Sporulation (Grundy *et al.*, 1993). Innerhalb der *acsA-acuABC* Promotorregion konnten außerdem zwei Sequenzen identifiziert werden, die der *amyO* Zielsequenz gleichen. Fortführende Studien von Grundy *et al.* (1994) untersuchten die Funktion dieser Sequenzen im Zusammenhang mit der Repression der Transkription dieser Gene durch die Anwesenheit von Glukose. Die Ergebnisse zeigten bei Zugabe von Glukose ins Medium eindeutig eine Repression der Expression der *acsA* und *acuABC* Gene, die sowohl von CcpA als auch von den oben erwähnten *amyO*-ähnlichen Sequenzen abhängig ist (Grundy *et al.*, 1994). Die Gene des *acuABC*-Operons zeigten keine Ähnlichkeiten zu den oben erwähnten Genen des Acetoin-Dehydrogenase-Enzym-Systems. Sie weisen aber Ähnlichkeiten zum *ato*-Operon aus *E. coli* auf, welches in den Acetoacetat-Metabolismus involviert ist. Deshalb wird vermutet, dass dieses Operon den Acetoinabbau oder eines unbekanntes Derivats über einen ähnlichen Mechanismus katalysiert, wie z.B. über einen Coenzym A Transfer und die darauffolgende Spaltung, wie es beim *ato*-System erfolgt (Grundy *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen des *acuABC*-Operons von Gardner *et al.* (2006/2008) zeigten, dass es sich bei diesem Operon um ein putatives posttranslationales Acetylierungs/Deacetylierungs-Modifikations-System handelt, welches der Zelle hilft, die

Einleitung

CoA Homöostase während des Wachstums auf Acetat oder Acetoin aufrecht zu erhalten (Gardner *et al.*, 2006; Starai *et al.*, 2002/2003).

II.4.2 Untersuchungen zum *aco*-Operon in *B. subtilis*

Aufgrund der nicht vorhandenen Ähnlichkeit der Gene des *acu*-Operons zum Acetoin-Dehydrogenase Enzym-System (AoDH ES) wurden in weiteren Untersuchungen zum Acetoin-Metabolismus in *B. subtilis* die Gene des *aco*-Operons als mögliches AoDH ES identifiziert (Huang *et al.*, 1999). Das Operon wird in Anwesenheit von Glukose reprimiert und in Anwesenheit von Acetoin und 2,3-Butandiol induziert (Ali *et al.*, 2001). Die Regulation des Operons erfolgt sowohl über Sigma L als auch über den Aktivator AcoR, dessen kodierendes Gen downstream der *acoABCL*-Region liegt. AcoR wird in Anwesenheit von Glukose durch CcpA reprimiert und wird demnach ausschließlich in Abwesenheit von Glukose exprimiert (Ali *et al.*, 2001). Der Aktivator erkennt und bindet an eine Sequenz, welche 90 bp ‚upstream‘ des Promotors des *acoABCL*-Operons lokalisiert ist, wodurch das Operon in Anwesenheit von Acetoin exprimiert werden kann. Die Beteiligung des Operons am Acetoin-Metabolismus wurde durch die Inaktivierung des *acoA*-Gens untersucht. Diese resultierte in einem Defekt in der Aktivität der AoDH E1, so dass Acetoin aus dem Medium nicht mehr durch *B. subtilis* während der stationären Phase assimiliert werden kann (Huang *et al.*, 1999).

II.4.3 Der Acetoin-Metabolismus in *B. licheniformis* DSM13

Transkriptionsanalysen von *B. licheniformis* DSM13 zeigten Homologe sowohl für das *acuABC*-Operon als auch für das *acoABCLR*-Operon. Daraus kann man schließen, dass dieser Organismus in der Lage ist die Overflow-Metabolite, Acetoin und 2,3-Butandiol, zu verwerten und als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Erste Untersuchungen zum Wachstum von *B. licheniformis* auf Medium mit diesen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle zeigten, dass es im Gegensatz zu *B. subtilis* in der Lage ist, diese als einzige C-Quelle zu nutzen (Veith *et al.*, 2004). Mit Hilfe dieser Eigenschaft kann die Verwertung von Acetoin als einzige C-Quelle durch einfache Wachstumsexperimente mit verschiedenen erzeugten Mutanten untersucht werden, wodurch eindeutige Ergebnisse über die Acetoinverwertung erhalten werden können. Dadurch ist es möglich eine definierte

Einleitung

Zuständigkeit der beiden Operons für den C2-Metabolismus zu ermitteln. Mögliche Gene des Acetoinabbaus und die Einordnung in den Zentralmetabolismus von *B. licheniformis* DSM13 sind in Abb. II-3 dargestellt.

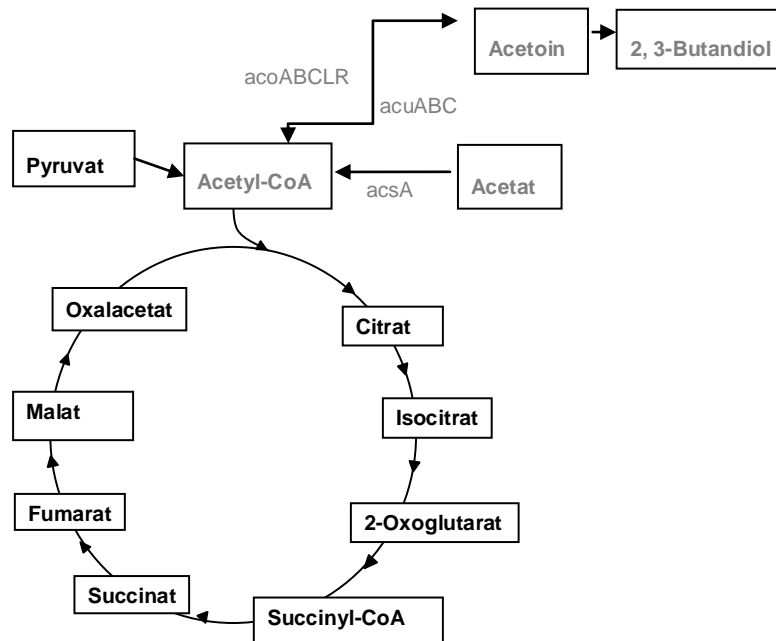


Abbildung II-3: Darstellung des möglichen Abbauweges von 2,3-Butandiol und Acetoin. Dargestellt sind ebenfalls die daran möglicherweise beteiligten Gene und die Einmündung in den TCA-Zyklus (Veith *et al.*, 2004).

II.5 Identifizierung von Genen mittels Transposonmutagenesen

Für die Identifikation von bisher unbekanntem Genen des C2-Metabolismus wurden in dieser Arbeit erste Experimente für die Entwicklung einer Transposonmutagenese durchgeführt. Im Allgemeinen zählen Transposonmutagenesen zu den Standardtechniken in der Bakteriengenetik, um Mutationen mit Hilfe von Transposons auszulösen (Schlegel *et al.*, 1992). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Mutagenese ungerichtet erfolgt und auf diese Weise nicht-essentielle Gene auch unbekannter Funktion mutiert werden können. Durch die Integration eines Transposons werden Gene in ihrer Funktion ausgeschaltet und es können nicht-essentielle Gene identifiziert und somit ein ‚Core-Genom‘ definiert bzw. produktionsrelevante Gene erkannt werden. Mit Hilfe der erhaltenen Mutanten können außerdem bisher unbekannte Stoffwechselwege identifiziert und analysiert werden.

Einleitung

Wichtig für die Entwicklung einer ungerichteten Mutagenese-Methode ist es, dass das verwendete Transposon möglichst unspezifisch in das Chromosom des Bakteriums integrieren kann, d.h. es sollte keine definierten Zielsequenzen für die Integration benötigen. Im folgenden Abschnitt werden die allgemeinen Eigenschaften von Transposons vorgestellt und es werden Transposons beschrieben, welche bereits in *B. subtilis* für Mutagenesen genutzt werden.

II.5.1 Transposons und ihre Eigenschaften

Transposons sind kurze DNA-Doppelstränge bestimmter Länge im Genom, die ein oder mehrere Gene umfassen können. Sie werden regelmäßig als genetische Werkzeuge genutzt, die zufällig in mikrobielle Genome integrieren können (Polard und Chandler, 1995) und sind in der Lage ihren Standort innerhalb eines Genoms oder auch zwischen dem Bakterienchromosom und beispielsweise einem Plasmid durch Transposition zu verändern und sich so an einer von vielen möglichen Stellen des Genoms zu integrieren (Schlegel *et al.*, 1992). Transposons sind allerdings nicht zur autonomen Replikation fähig und benötigen daher einen Träger (Vehikel), der es von Bakterienzelle zu Bakterienzelle überführt. Bei diesen Vehikeln handelt es sich meistens um ein Plasmid oder einen Bakteriophagen (Schlegel *et al.*, 1992).

Das ‚Springen‘ des Transposons von einem Genombereich in einen anderen Bereich nennt sich Transposition, von der es zwei unterschiedliche Arten gibt: Bei der ‚konservativen Transposition‘ wird das Transposon aus seiner ursprünglichen Insertionsstelle herausgeschnitten, um anschließend an einer anderen Stelle im Genom wieder eingebaut zu werden (‚cut & paste‘-Mechanismus). Dabei bleibt die Kopienzahl des Transposons pro Genom unverändert. Bei der ‚replikativen Transposition‘ dagegen wird die Kopienzahl des Transposons erhöht, da das Transposon kopiert wird und diese Kopie dann an anderer Stelle eingebaut werden kann. Das Ursprungs-Transposon bleibt dabei an derselben Stelle integriert. Beide Arten der Transposition erfolgen mit Hilfe des Enzyms Transposase (Munk *et al.*, 2001).

II.5.2 Verwendete Transposons zur zufälligen Mutagenese von *B. subtilis*

Da eine große Anzahl von Transposons existiert, die für Mutagenese-Prozeduren in verschiedenen Bakterien verwendet werden können, musste vor der Entwicklung der Mutagenese-Methode, die Wahl der möglicherweise zu verwendenden Transposons eingeschränkt werden. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *B. subtilis* werden im Folgenden ausschließlich Transposons vorgestellt, welche häufig für zufällige Transposonmutagenesen in diesem Bakterium verwendet worden sind.

Eines der ersten Transposons, welches in *B. subtilis* für Mutagenesen genutzt wurde, ist das *Tn917*. Dieses 3.3-MDa große Transposon ist aus *Streptococcus faecalis* isoliert worden und trägt 280 bp große ‚inverted repeats‘ und eine Antibiotika-Resistenz (meist Erythromycin), durch die die Transposition induziert werden kann. Das Transposon kann in das Chromosom von *B. subtilis* integrieren, wobei dies allerdings nur bedingt zufällig erfolgt (Youngman *et al.*, 1983). *Tn917* integriert zu 99% in bestimmte Regionen des *B. subtilis* Chromosoms, den so genannten ‚Hot-Spot‘-Regionen (Youngman *et al.*, 1985). Es wurde vielfach für Transposonmutagenesen in *B. subtilis* genutzt (Youngman *et al.*, 1983; Perkins *et al.*, 1984; Sandman *et al.*, 1987) dennoch ist es wegen seiner relativ hohen Integrationspezifität nicht der geeignete Kandidat für die Entwicklung einer ungerichteten Mutagenese in *B. licheniformis*.

Ein weiteres Transposon, welches häufig in *B. subtilis* Verwendung findet, ist das aus *E. coli* isolierte *Tn10* (Petit *et al.*, 1990). Dieses zusammengesetzte Transposon ist 9.300 bp groß und besteht aus einer Antibiotika-Resistenz (meist Tetracyclin) und aus den Insertionssequenzen (IS10-Rechts & links). IS10-Rechts kann im Gegensatz zum IS-Links als individuelle Einheit transponieren, da es eine intakte Transposase beinhaltet (Kleckner, 1984; Bender *et al.*, 1986). *Tn10* kann in das *B. subtilis* Chromosom integrieren und zeigt dort keine ‚Hot-Spot‘-Regionen, bevorzugt aber eine 6-bp- Zielsequenz (Halling *et al.*, 1982). Diese Sequenz wiederholt sich im *B. subtilis* Chromosom in 4-kbp Intervallen, wodurch die Anzahl von potentiellen *Tn10*-Insertionen limitiert und die Effektivität von *Tn10* als Werkzeug für eine zufällige Mutagenese reduziert werden kann. Trotz der möglichen Limitation wurde dieses Transposon für die Entwicklung der Mutagenese getestet.

Das ‚mariner‘ Transposon *Himar1* besteht aus zwei ‚inverted repeats‘ und einer Antibiotika-Resistenz. Es wurde aus der Hornfliege *Haematobia irritans* isoliert (Robertson

Einleitung

et al., 1995) und bevorzugt im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Transposons ausschließlich das Dinukleotid TA als Integrationsort im Chromosom (Lampe *et al.*, 1996). Die Integration dieses Transposons erfolgt zufällig in das Chromosom und ist somit ideal für die Entwicklung der zufälligen Transposonmutagenese in *Bacilli*. In *B. subtilis* war die Methodenentwicklung mit Hilfe dieses Transposons bereits erfolgreich (LeBreton *et al.*, 2006). Das genutzte Transposon wurde bereits auch in anderen Gram-positiven Bakterien erfolgreich verwendet, wie z.B. in *B. anthracis* (Wilson *et al.*, 2007) und *Enterococcus faecalis* (Kristich *et al.*, 2008) und *Clostridium difficile* (Cartman *et al.*, 2010). Aufgrund der genannten Eigenschaften und der erfolgreichen Anwendung dieses Transposons in einer Anzahl von Gram-positiven Organismen ist das Transposon ebenfalls in dieser Doktorarbeit verwendet worden.

II.6 Sporulation in *Bacilli*

Wie bereits mehrfach erwähnt ist die Bildung von Endosporen unter Mangelbedingungen eine wichtige Eigenschaft der *Bacilli*. Diese sichern dem Bakterium das Überleben und sind wichtig für die Adaption an variierende Umweltbedingungen, da sie hitzeresistent, lichtbrechend und resistent gegenüber Chemikalien sind (Priest *et al.*, 1993). Aber genau diese Eigenschaften können den fermentativen Produktionsprozess stören und machen es schwierig, die verwendeten Fermentationsbehälter zu dekontaminieren. Die UV- und hitzeresistenten Sporen können den Prozess des Autoklavierens überleben, welches ausschließlich durch mehrfache Wiederholungen des Prozesses zu beheben ist. Für die Durchführung von Modellfermentationen war es wichtig einen sporulations-defizienten Stamm von *B. licheniformis* MW3 zu konstruieren. Im Folgenden wird der Prozess der Sporulation beschrieben, um zu verdeutlichen an welcher Stelle dieser Prozess durch die erzeugte Deletion unterbrochen wird.

Der eigentliche Prozess der Sporulation gliedert sich in sieben Stadien. In der ersten Phase (SpoI) erfolgt eine asymmetrische Teilung der Zelle, welche in der zweiten Phase (SpoII) vervollständigt wird, wodurch schließlich zwei Kompartimente, d.h. zwei Tochterzellen, entstehen. Man bezeichnet das größere Kompartiment als Mutterzelle. Das kleinere Kompartiment, die Tochterzelle oder auch Prospore bildet sich anschließend zur Endospore aus. Dabei wird das schmalere der beiden Kompartimente von der Mutterzelle eingehüllt (SpoIII). Anschließend erfolgt eine Einlagerung von Peptidoglycan zwischen die

Einleitung

beiden, durch die Einstülpung, entstandenen Membranen und die Ausbildung des Cortexes der Spore (SpoIV), welcher z.B. für die Ausbildung der Hitze-Resistenz der Sporen essentiell ist. Aus diesem Grund werden die verantwortlichen SpoIV-Gene sehr häufig für die Erstellung eines sporulations-defizienten Stamms deletiert. In der fünften Phase erhält die Spore einen Sporenmantel, der aus einer komplexen Struktur von Proteinen besteht (SpoV). Die anschließende Reifung der Spore führt zur endgültigen Ausbildung der Resistenzen gegen Hitze-, UV- und Chemikalien. Die Spore wird unbeweglich und erlangt ihre Kapazität zur Keimung (SpoVI). In einer abschließenden Reaktion wird die Mutterzelle lysiert und die trockene, lichtbrechende Spore freigegeben (SpoVII). Abschließend kann die Spore in Anwesenheit einer reichhaltigen Umgebung durch Keimung den vegetativen Wachstumszyklus wiederaufnehmen (Hilbert *et al.*, 2004).

In *B. subtilis* wurde ein Gen-Cluster, bestehend aus *yqfC-yqfD-phoH*, identifiziert, welchem eine generelle Bedeutung für die Sporulation in diesem Bakterium zugeordnet wurde (Wittchen *et al.*, 1998). In *B. licheniformis* DSM13 konnte ein Homolog zu dem *yqfD* Gen aus *B. subtilis* identifiziert werden, welches als ein SpoIV-Homolog annotiert wurde. *YqfD* ist auch in *B. licheniformis* von Genen umgeben, welche Homologien zu den bekannten Genen *yqfC* und *phoH* aus *B. subtilis* aufweisen (Veith *et al.*, 2004). Wie oben bereits beschrieben bilden diese Gene in *B. subtilis* ein Gen-Cluster, welches wichtig für die Sporulation ist. Aufgrund der Identifizierung als SpoIV-Homolog ist es mit großer Wahrscheinlichkeit an der Bildung des Cortexes der Spore beteiligt. SpoIV-Mutanten weisen generell einen totalen Verlust der Hitzeresistenz auf (Nahrstedt *et al.*, 2005), welches mit der Bildung eines unvollständigen Cortex und einem fehlenden Sporenmantel zu erklären ist.

In dieser Arbeit wurde das *yqfD*-Gen deletiert, damit der erzeugte Deletionsstamm keine hitzeresistenten Sporen mehr ausbilden kann und so die Fermentationsgefäße leichter zu dekontaminieren sind.

III. Material und Methoden

III.1 Material

III.1.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden für die unterschiedlichen Experimente verschiedene Bakterienstämme verwendet, welche in Tab. III-1 dargestellt sind.

Tabelle III-1 Verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	Wildtypstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3	DSM13, Δ hsdR1, Δ hsdR2 (Typ I Restriktionssysteme)	Waschkau <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus licheniformis</i> Stamm E	Isolat Henkel AG & Co KGaA	Henkel AG & Co KGaA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294, thi RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 chromosomal integriert	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ Glyox	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ Glyoxylat-Operon	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ Iso	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ Isocitrat-Lyase	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ Mal	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ Malat-Synthase	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ acuA	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ acuA	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ acuC	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ acuC	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ acoB	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ acoB	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ acsA	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ acsA	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ acoR	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ acoR	Diese Arbeit
<i>Bacillus licheniformis</i> MW3 Δ yqfD	Mutante von <i>Bacillus licheniformis</i> MW3; Δ hsdR1, Δ hsdR2, Δ yqfD	Diese Arbeit

III.1.2 Plasmide

Für die in dieser Arbeit angewendeten Methoden wurden bekannte Plasmide verwendet oder eigene Plasmide konstruiert. Diese sind in Tab. III-2 zusammengefasst.

Tabelle III-2 verwendete Plasmide und ihre Eigenschaften

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
pE194	Vektor aus <i>Staphylococcus aureus</i> , Erm ^R , ori ^{ts}	Iordanescu, 1976
pIC333	Tn10-Transposon, Transposase, Spc ^R , Erm ^R , ori ^{ts} , pUC ori	Steinmetz <i>et al.</i> , 1994
pMAD	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , Amp ^R	Arnaud <i>et al.</i> , 2004
pKVM1	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R	Rachinger, Dissertation, 2010
pDG148stu	<i>lacI</i> , P _{spac} , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>bla</i>	Joseph <i>et al.</i> , 2001
pBAD	<i>araC</i> , Para _{BAD} , <i>myc</i> , polyhis, <i>rrnB</i> , <i>bla</i> , pBR322-ori,	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pMADdelacuA	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , ,delacuA	Diese Arbeit
pMADdelacoB	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , ,delacoB	Diese Arbeit
pMADdelIso	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delIsocitrat-Lyase	Diese Arbeit
pKVM1delacuC	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delacuC	Diese Arbeit
pKVM1delacoR	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delacoR	Diese Arbeit
pKVM1delacsA	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , ,delacsA	Diese Arbeit
pKVM1delyqfD	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delyqfD	Diese Arbeit
pKVM1delMal.	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delMal	Diese Arbeit
pKVM1delGlyox_ges	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delGlyox_ges	Diese Arbeit
pKVM1delHP	<i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , delHP des Glyoxylatzyklus (Gen ,upstream‘ der Malat-Synthase)	Diese Arbeit
pMarB	PB, <i>Himar1</i> , <i>TnYLB1</i> , Amp ^R , Kan ^R , Erm ^R , ori ^{ts} , ori pBR322	Le Breton <i>et al.</i> , 2006

Material und Methoden

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
pMarA	PA, <i>Himar1</i> , <i>TnYLB1</i> , Amp ^R , Kan ^R , Erm ^R , ori ^{ts} , ori pBR322	Le Breton <i>et al.</i> , 2006
pMarC	PA, <i>TnYLB1</i> , Amp ^R , Kan ^R , Erm ^R , ori ^{ts} , ori pBR322	Le Breton <i>et al.</i> , 2006
pMB1	β-Galaktosidase-Gen <i>bgaB</i> , ori ^{ts} , Erm ^R , oriT, <i>traJ</i> , Amp ^R , <i>TnYLB1</i> , PB, <i>Himar1</i>	Diese Arbeit
pMB2	β-Galaktosidase-Gen <i>bgaB</i> , Erm ^R , Amp ^R , <i>TnYLB1</i> , PB, <i>Himar1</i>	Diese Arbeit
pBADGlyox	<i>araC</i> , <i>Para_{BAD}</i> , <i>myc</i> , polyhis, <i>rrnB</i> , <i>bla</i> , pBR322-ori, Glyoxylat-Operon aus DSM13	Diese Arbeit
pBADMal	<i>araC</i> , <i>Para_{BAD}</i> , <i>myc</i> , polyhis, <i>rrnB</i> , <i>bla</i> , pBR322-ori, <i>Malat-Synthase</i> aus DSM13	Diese Arbeit
pBADIso	<i>araC</i> , <i>Para_{BAD}</i> , <i>myc</i> , polyhis, <i>rrnB</i> , <i>bla</i> , pBR322-ori, Isocitrat-Lyase aus DSM13	Diese Arbeit
pBADHP-Mal	<i>araC</i> , <i>Para_{BAD}</i> , <i>myc</i> , polyhis, <i>rrnB</i> , <i>bla</i> , pBR322-ori, hyp. Protein und <i>Malat-Synthase</i> aus DSM13	Diese Arbeit
pDG148Glyox	<i>lacI</i> , <i>P_{spac}</i> , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>bla</i> , gesamtes Glyoxylat-Operon aus DSM13	Diese Arbeit
pDG148Mal	<i>lacI</i> , <i>P_{spac}</i> , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>bla</i> , <i>Malat-Synthase</i> aus DSM13	Diese Arbeit
pDG148Iso	<i>lacI</i> , <i>P_{spac}</i> , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>bla</i> , <i>Isocitrat-Lyase</i> aus DSM13	Diese Arbeit
pDG148HP-Mal	<i>lacI</i> , <i>P_{spac}</i> , <i>kan</i> , <i>ble</i> , <i>bla</i> , hyp. Protein und <i>Malat-Synthase</i> aus DSM13	Diese Arbeit

III.1.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG/Operon (Ebersberg) synthetisiert und sind in den folgenden Tab. III-3 bis III-8 dargestellt.

Tabelle III-3 verwendete Oligonukleotide für die Transposonmutagenese

Name	Sequenz
Primer für das Plasmid pMarB	
TnYLB1Himar1_fwd_EcoRI	TGATGAATTCCTACACTTGCTGCTAATGC
TnYLB1Himar1_rev_BamHI	GACTGGATCCTTATGCTTCCGGCTCGTATG
pMarB_fwd	AGCTCACGCTGTAGGTATCTC

Material und Methoden

Name	Sequenz
pMarB_rev	GCCCTCCCGTATCGTAGTTATC
TnYLB1_fwd	TCGGCTCCGTCGATACTATG
TnYLB1_rev	CTCCCAATCAGGCTTGATCC
Primer für das Plasmid pKVM1	
pMAD_fwd	TCCTCTGGCCATTGCTCTG
pMAD_rev	GCCGGAAGCGAGAAGAATC
ori_pE194_fwd	GAGAAACAGCGTACAGAC
ori_pE194_rev	CTGCAATCTGCGGAATAG
ermC_fwd	AATCAGCACAGTTCATTATC
ermC_rev	CAATTCCTGCATGTTTTAAG
Primer für die ‚Vectorette-PCR‘	
Bubble-1_taqI	CGGAAGGAGAGGGACGCTGTCTGTCAAAAGGTA AAGAACGGACGAGAGAAGGGAGAG
Bubble_2	GACTCTCCCTTCTCGAATCGTAACCGTTCGTACGA GAATCGCTGTCCTTCCTTC
Bubble_PCR	CCGTTCGTACGAGAATCGC

Tabelle III-4 verwendete Oligonukleotide für die Konstruktion der Deletions-Mutanten.

Name	Sequenz
acoB_FA_fwd_BamHI	TGCTGGATCCGGCGGATCGATGCATATTG
acoB_FA_rev	CAATCGCAGCGAGCAATACGGCTGACATGCTGATTTTC
acoB_FB_fwd	GAAATCAGCATGTCAGCCGATTGCTCGCTGCGATTG
acoB_FB_rev_EcoRI	TGCTGAATTCTCCCTCTCCTTCAGATACTTG
acoB_check_fwd	AGGCATGATGGCCGAGATATAC
acoB_check_rev	TTTGCTCTCCTGCGTTTGTTTC
acoR_FA_fwd_BamHI	TGCAGGATCCCGCTGTTCCAATCGAGTCC
acoR_FA_rev	GTATTAAGCTTGCCCGCTTGATGAGCGCGGGTTTGC
acoR_FB_fwd	GCAAACCCGCGCTCATACACGGCCAAGCTTAATAC
acoR_FB_rev_EcoRI	TGACGAATTCTTCCGCGCTGCATCTATAC
acoR_check_fwd	ATCCCATGCCTCAGGCAGAGAC
acoR_check_rev	AAACGCCTCTTCCGGATCG
acuA_FA_fwd_BamHI	TGCTGGATCCGCACCCGTTCAAGCAATTCC
acuA_FB_fwd	CAGCCTTTCGCCCATCACAAAAGATGATGAATGCCGGAGGAC

Material und Methoden

Name	Sequenz
acuA_FB_rev_EcoRI	TGCTGAATTC GTTTGAACGCGAAACACGAG
acuA_check_fwd	TACGCCTTCTCCAACGAC
acuA_check_rev	CCGGCCAAAGAACCTGATAC
acuC_FA_fwd_BamHI	TGCAGGATCCGCATCATCGGCATCCAATC
acuC_FA_rev	GCATTTGAACCGGGAGAAACCGTTGCCAAAGCC CTTTATC
acuC_FB_fwd	GATAAAGGGCTTTGGCAACGGTTTCTCCCGGTT CAAATGC
acuC_FB_rev_EcoRI	ACGTGAATTCATGATGAATGCCGGAGGAC
acuC_check_fwd	AACGCTCGGTCCGAATATG
acuC_check_rev	ATGATGGATCCGCAGATGG
HP_FA_fwd_BamHI	TGCTGGATCC ATATTATTCGTT CGGCTTAC
HP_FA_rev	GTTTTCATGTCTCCCTACTTCAAGCTCATT TGTA TAACC
HP_FB_fwd	GGTTATACAAATGAGCTTGAAGTAGGGAGACAT GAAAAC
HP_FB_rev_EcoRI	TGCTGAATTC CAGCTCTTTT GCGTTATG
HP_check_fwd	GCGCTGTATACTGTACTACAAC
HP_check_rev	TGCGCATAAACAATACGTC
Isoc_FA_fwd_BamHI	ATGCGGATC CTTGATGAAGTCCCGCCTGTC
Isoc_FA_rev	GTTTGTCCGATTGTGGCACTGCTCGCCTACAAC TG
Isoc_FB_fwd	CAGTTGTAGGCGAGCAGTGCCACAATCGGAGCA AAC
Isoc_FB_rev_EcoRI	GTACGAATTC ACGCTGGAAAGGGATCAC
Isoc_check_fwd	AAGCAAGCCGCCAATGAC
Isoc_check_rev	CGCGGAGTTTCTAACGATACC
glyox_FA_fwd_BamHI	TGCTGGATCC AAGCACAGAGTTGGTTTGG
glyox_FA_rev	GATAGACAACAAGCAAGCCGGGGAACATAAAG AGGTGAAAG
glyox_FB_fwd	CTTTCACCTCTTTATGTTCCCCTT GCTTGTTGTCT ATC
glyox_check_fwd	CTCCTCAAAGCCGTTTCATATC
glyox_check_rev	GCAGCAAGACGGCTAATATCTC
mal_FA_fwd_2_BamHI	GTACGGATCC CGATCAGGCAGGCTGAAATTG
mal_FA_rev_2	GGTATCGTTAGAACTCCGCGAGGGAGTAGGCT CTCATGTTG
mal_FB_fwd_2	CAACATGAGAGCCTACTCCCTCGCGGAGTTTCT AACGATACC
mal_FB_rev_2_EcoRI	GTACGAATTC CGGGCCAATTC AAACATGC
Mal_check_2_fwd	GAATCCGGAAGAGTCGAATG

Material und Methoden

Name	Sequenz
Mal_check_2_rev	AATGGAGCGGCCTTAGTATG
yqfD_FA_fwd_BamHI	TGCTGGATCC GCAAACAGCGCAGATATGG
yqfD_FA_rev	CCATTCTCGCTCGTTTC GAAGCCTCTGATGACCTTCC
yqfD_FB_fwd	GGAAGGTCATCAGAGGCTTC GAAACGAGCGAGATGG
yqfD_FB_rev_EcoRI	TGCTGAATTC ATGGAGCGCATCGTACAG
yqfD_check_fwd	TTATCATGGCGGCCATCATC
yqfD_check_rev	TCGTATTCTGCGCTTCATCC
AcsA_FA_fwd_BamHI	GCTAGGATCCTCTTT CAAGCGGGTCTGG
AcsA_FA_rev	CTCAAGGCGATGAACGCTTC ATCCCGGCTTTGTTGG
AcsA_FB-fwd	CCAACAAAGCCGGGAATGA AGCGTTCATCGCCTTGAG
AcsA_FB-rev_EcoRI	CCATGAATTC TGGAGCTTACCGTATCCTTGG
AcsA_Check_fwd	TGTCCGTGACAATGCCTATG
AcsA_Check_rev	TCCGATTTGCCGATGAGTTC

Tabelle III-5 verwendete Oligonukleotide für die Komplementationsexperimente.

Name	Sequenz
oriT TraJ_fwd_PciI	TGCAACATGTTGTAGGCGCCCTTCCTTTC
oriT TraJ_rev_BamHI	GTCAGGATCCCGCTGCATAACCCTGCTTC
pDG148_fwd	ATAGTCCTGTCGGGTTTCG
pDG148_rev	CGATCTTTCAGCCGACTCAAAC
HP_OE_fwd	GTAGCCCTTGCCCTACCTAGC
HP_OE_rev	CGGCATACTCTGCGACATC
HP_OE_2_fwd_HindIII	ACGTAAGCTTGCCTGTATACTGTACTACAAC
HP_OE_2_rev_SalI	GTACGTCGACGTTCAAGACGTCCGATAAACTC
OE_Glyox_fwd_XbaI	TGACTCTAGAGCGCTGTATACTGTACTACAAC
OE_Glyox_rev_XbaI	ACTGTCTAGAAAGCAAGCCGCCCAATGAC
HP_rev_SalI	CGTAGTCGACCTACTCGCCTTTTT TGGCAAG
Mal_fwd_HindIII	GTCAAAGCTTATGAAAACAGAGGAGAAGAGAA TTCAT
Mal_rev_XbaI	CGTATCTAGATTATATATTTT CATAAGCCGGTATCGTTA
Mal_rev_HindIII	CGTAAAGCTTTTATATATTTT CATAAGCCGGTATCGTTA
Iso_fwd_XbaI	TGCATCTAGAATGCTGAAAGAAAAACA ACTC
Iso_rev_SalI	TGCAGTCGACTTATGATTGAAACTGTTCCGC
Mal_fwd_XbaI	CGTATCTAGAATGAAAACAGAGGAGAAGAGAA TTCAT
Iso_rev_XbaI	CGTATCTAGATTATGATTGAAACTGTTCCGC

Material und Methoden

Name	Sequenz
OE_Gl_r1	ATGTCAATTGCTAACTTGATAGAC
OE_HP_f_1	GAATTAACCATGAGCTTGAAAAGTCCGATG
OE_HP_r_1	CTACTCGCCTTTTTTGGCAAG
OE_HP_f_2	AGCTTGAAAAGTCCGATG
OE_HP_R_2	GAGTTTTTGTTCCTACTCGCCTTTTTTGGCAAG
OE_Mal_f_1	GAATTAACCATGATGAAAACAGAGGAGAAGAG AATTCAT
OE_Mal_r_1	TTATATATTTTCATAAGCCGGTATCGTTA
OE_Mal_f_2	ATGAAAACAGAGGAGAAGAGAATTCAT
OE_Mal_r_2	GAGTTTTTGTTCCTTATATATTTTCATAAGCCGGT ATCGTTA
OE_Iso_f_1	GAATTAACCATGATGCTGAAAGAAAAACAACCTC
OE_Iso_r_1	TTATGATTGAAACTGTTCCGC
OE_Iso_f_2	ATGCTGAAAGAAAAACAACCTC
OE_Iso_r_2	GAGTTTTTGTTCCTTATGATTGAAACTGTTCCGC
pBAD_check_fwd	TCACGGCAGAAAAGTCCAC
pBAD_check_rev	TCTCATCCGCCAAAACAGC
pDG148_OE_fwd_1	GTCAAAGCTTTTTTTCAGGAATTTTAGCA
pDG148_OE_rev_1	AAGCTTAAGGAGGTGATCT
pDG148_OE_fwd_2	TTTTTCAGGAATTTTAGCA
pDG148_OE_rev_2	CGTATCTAGAAAGCTTAAGGAGGTGATCT
pBAD_OE_fwd_1	GTCAAAGCTTAAGCCGTCAATTGTCTGATT
pBAD_OE_rev_1	CAGATCCTCTTCTGAGAT
pBAD_OE_fwd_2	AAGCCGTCAATTGTCTGATT
pBAD_OE_rev_2	CGTATCTAGACAGATCCTCTTCTGAGAT

Tabelle III-7 verwendete Oligonukleotide für die RLM-RACE Experimente.

Name	Sequenz
RACE-Adapter	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUG GCUUUGAUGAAA
Glyox-RACE- outer	TCAATTTTCAGCCTGCCTGATCG
Glyox-RACE-inner	GCAGCAATTCCCGTCTTCTTC
5'-RACE Outer Primer	TCAATTTTCAGCCTGCCTGATCG
5'-RACE Inner Primer	CGCCGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGAT G

Material und Methoden

Tabelle III-8 verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR Analysen

Name	Sequenz
BLi04209_fwd	CCATCATCAGCTTGTGCGTG
HP_OE_fwd	GTAGCCCTTGCCTACCTAGC
RT_HP_rev	CTACTCGCCTTTTTTGGCAAG
RT_Mal_f	ATGAAAACAGAGGAGAAGAGAATTCAT
RT_Mal_r	TTATATATTTTCATAAGCCGGTATCGTTA
RT_Iso_f	ATGCTGAAAGAAAAACAACCTC
RT_Iso_r	TTATGATTGAAACTGTTCCGC
RT_04209_f	GCGGTTTATCTACTGATACGAATCC
RT_04206_r	ATGATGATGTTTATCTTGATTTTGACAATGG

Tabelle III-9 verwendete Oligonukleotide für die Northern Blot Analysen

Name	Sequenz
HP-fwd_2	GCGCTGTATACTGTACTACAAC
HP-rev_T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTCAAGAC GTCCGATAAACTC
Iso-fwd_2	GGGTTCTTCAAACAAAGCCTGG
Iso_rev_T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATTATGATTG AAACTGTTCCGCTTC
Mal-rev-T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATTATATATT TTCATAAGCCGGTATCGTTA
Mal-fwd-2	CATGACGGAACATGGATCGC

III.1.4 Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme stammten in den meisten Fällen von der Firma Fermentas. In der Tab. III-9 sind die verwendeten Enzyme, ihre jeweiligen Merkmale und die Hersteller-Firma dargestellt.

Tabelle III-10 verwendete Restriktionsenzyme

Name	Typ	Merkmal	Hersteller
<i>Bam</i> HI	Restriktionsnuklease	GGATCC*	Fermentas
<i>Cla</i> I	Restriktionsnuklease	ATCGAT*	Fermentas
<i>Eco</i> RI	Restriktionsnuklease	GAATTC*	Fermentas
<i>Eco</i> RV	Restriktionsnuklease	GATATC*	Fermentas
<i>Hinc</i> II	Restriktionsnuklease	GTYRAC*	Fermentas
<i>Hind</i> III	Restriktionsnuklease	AAGCTT*	Fermentas

Material und Methoden

Name	Typ	Merkmal	Hersteller
<i>NdeI</i>	Restriktionsnuklease	CATATG*	Fermentas
<i>PacI</i>	Restriktionsnuklease	TTAATTAA*	New England Biolabs
<i>Pfu</i>	DNA-Polymerase	<i>proof-reading</i>	Fermentas
<i>Phire</i>	DNA-Polymerase		Biozym
<i>Phire II</i>	DNA-Polymerase		Biozym
<i>PstI</i>	Restriktionsnuklease	CTGCAG*	Fermentas
<i>SalI</i>	Restriktionsnuklease	GTCGAC*	Fermentas
<i>T4-Ligase</i>	Ligase		Fermentas
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase		Fermentas
<i>XbaI</i>	Restriktionsnuklease	TCTAGA*	Fermentas

* Erkennungssequenz

III.1.5 Nährmedien und Zusätze

III.1.5.1 Nährmedien

Die im Folgenden dargestellten verwendeten Nährmedien wurden vor Verwendung für 20 min bei 120°C durch autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von festen Nährmedien wurden vor dem Autoklavieren 1,5% Agar hinzugegeben.

LB-Medium (Luria-Bertani-Broth-Medium)

Bacto Trypton	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	5	g/l
	pH 7,4	

NB-Medium

Nutrient broth	8	g/l
----------------	---	-----

SMMP-Medium (Protoplasten-Elektroporation)

BSA (,bovine serum albumin')	0,3	%
2 M Saccharose	5	%
4 · PAB	25	%
2 · SMM-Puffer	50	%

1· PAB (Pennassay-broth-Medium)

Rinderextrakt (BSA)	1,5	g/l
Hefeextrakt	1,5	g/l
Pepton	5	g/l
Dextrose	1	g/l
Natriumchlorid	3	g/l
Dipotassium Phosphat	3,68	g/l
Monopotassium Phosphat	1,32	g/l

DM3-Medium

(Protoplastenregeneration)

Natriumsuccinat; pH 7,3	250	ml
1 M Casaminoacids	50	ml
5 % Hefeextrakt	25	ml
10 % K ₂ HPO ₄ +		
1,5 % KH ₂ PO ₄	50	ml
3,5 % Glukose	2,5	ml
20 % MgCl ₂	10	ml
steriles 2 % BSA		
(bei 55°C)	2,5	ml
Bei Bedarf 4 % Agar pro 100		ml

Alle Komponenten getrennt autoklavieren und dann zusammen geben.

Material und Methoden

SMMP-Medium (Protoplasten-Transformation)

2 SMM-Puffer	500	ml
4· PAB	500	ml
BSA-Zusatz optional	2	%

Minimal-Medium

1 M NH ₄ Cl	10	ml
500 mM MgSO ₄	1	ml
100 mM CaCl ₂	1	ml
Phosphatpuffer (400 mM Na ₂ HPO ₄ + 400 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.5)	100	ml
SL9	1	ml
C-Quelle	x	ml
H ₂ O	ad 1000	ml

Spurenelementlösung 9 (SL9) modifiziert nach Tschsch und Pfennig (1984)

Titriplex I (Nitrilotriacetat)	12,8	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2	g
CoCl ₂ · 2 H ₂ O	190	mg
MnCl ₂ · 2 H ₂ O	100	mg
ZnCl ₂	70	mg
H ₃ BO ₃	6	mg
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24	mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2	mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36	mg
H ₂ O bidest	ad 1000	ml
Mit NaOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren. Lagerung bei -20°C langfristig oder 4°C.		

Schaeffer`s Sporulationsmedium

NB-Medium	0.8	%
KCl	27	mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2	mM
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1	mM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.1	mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1	µM

III.1.5.2 Zusätze zu Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zusätze zu den Nährmedien wurden nicht autoklaviert, da sie nicht hitzeresistent sind. Deshalb wurden die in Tab. III-11 verwendeten Substanzen vor Zugabe zum Medium steril filtriert.

Tabelle III-11 Zusätze zu verwendeten Nährmedien

Zusatz	Abkürzung	Konzentration (<i>E. coli</i>)	Konzentration (<i>B. licheniformis</i>)
Tetracyclin	Tc	10 mg/l	-
Spectinomycin	Spc	150 mg/l	150 mg/l
Erythromycin	Erm	-	1,5 – 5 mg/l
Kanamycin	Kan	50 mg/l	50 – 150 mg/l
Ampicillin	Amp	100 mg/ml	-
Polymyxin B	Poly	20 – 40 mg/ml	-
Glukose	Glc	50 mM	50 mM
Acetat	Ac	60 mM	60 mM
Acetoin	Ace	30 mM	23 mM
2,3-Butandiol	But	30 mM	30 mM

Material und Methoden

Zusatz	Abkürzung	Konzentration (<i>E. coli</i>)	Konzentration (<i>B. licheniformis</i>)
7 AS-Mix (Prolin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Aspartat, Alanin, Glycin)	7 AS	-	je 10 mM
IPTG	IPTG		0,1 – 1 mM
XGal	XGal	-	5 %

III.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen werden vor der Anwendung autoklaviert. Ausnahmen sind für die jeweiligen Puffer angegeben.

2 x SMM-Puffer (Protoplasten-

Elektroporation)

Sacharose	1	M
Maleinsäure	40	mM
MgCl ₂	40	mM
	pH 6,5	

PEG₆₀₀₀ (40 %)

PEG ₆₀₀₀	22,5	%
SMM-Puffer ad	1000	ml

TE-Puffer

Tris/HCl	150	mM
EDTA	20	mM
pH	8.0	

Lösungen für den Southern Blot

Depurinierungslösung

25 mM HCl	16,66	ml
H ₂ O _{bidest} ad	800	ml

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl	70,13	ml
50 mM NaOH	16,00	ml
H ₂ O _{bidest} ad	800	ml

Neutralisierungslösung

50 mM Tris-HCl (pH7,5)	48,46	g
3 M NaCl	140,26	g
H ₂ O _{bidest} ad	800	ml

Transferlösung = 20x SSC pH 7,0

3 M NaCl	140,26	g
30 mM Na ₃ -Citrat	70,58	g
H ₂ O _{bidest} ad	800	ml

Prähybridisierungslösung =

Hybridisierungslösung

Lösen bei 60°C und 50 ml Aliquots bei -20°C lagern; nicht autoklavieren!
5·SSC, 1% Blocking Stammlösung, 0,1% N-Laurylsarcosin, 0,02% SDS

20 · SSC	12,5	ml
10 % Blocking Stammlsg.	5,0	ml
10 % N-Laurylsarcosyl (aut.)	0,5	ml
10 % SDS (nicht autokl.)	0,1	ml
zuletzt zugeben		
H ₂ O _{bidest} ad	50	ml

Material und Methoden

Maleinsäurepuffer, pH 7,5

0,1 M Maleinsäure	9,29	g
0,15 M NaCl	7,01	g
0,175 M NaOH	5,6	g
H ₂ O _{bidest}	ad 800	ml

10% Blocking Stammlösung

Lagerung bei 4°C oder besser in Aliquots bei -20°C.

Blocking Reagent (Roche)	10	g
Maleinsäurepuffer	ad 100	ml

In Mikrowelle erhitzen und lösen.
Anschließend autoklavieren und Lagerung in 10 ml Aliquots bei -20°C.

Puffer 1

2x SSC/ 0,1% SDS		
20 · SSC	80	ml
10 % SDS	8	ml
H ₂ O _{bidest}	ad 800	ml

Puffer für den Northern Blot

Prähybridisierungslösung

Formamid	400	ml
20 x SSC	200	ml
10 % N-Lauroyl-sarcosin	8	ml
Blockierungs-Reagenz (Roche)	16	g
SDS	56	g
H ₂ O	ad 800 ml	

20 x SSC

3 M NaCl
30 mM Natriumcitrat
pH 7,0 mit 10 M NaOH einstellen.

Waschpuffer 1

0,1 · SSC	
0,1 % SDS	

Waschpuffer 2

2·SSC	
0,1 % SDS	

Waschpuffer 3

2·SSC	
1 % SDS	

Puffer 2

0,1x SSC/.0,1% SDS		
20 · SSC	4	ml
10% SDS	8	ml
H ₂ O _{bidest}	ad 800	ml

Puffer 3= Blocking Solution

Frisch ansetzen und nicht autoklavieren.

10 % Blocking Solution	5	ml
Maleinsäurepuffer	45	ml

Waschpuffer

Frisch ansetzen und nicht autoklavieren.

Tween 20	150	µl
Maleinsäurepuffer	ad 50	ml

Detektionspuffer, pH 9,5

10 mM Tris-HCl	9,69	g
10 mM NaCl	4,67	g
H ₂ O _{bidest}	ad 800	ml

10 x Puffer 1, pH 7,5

Maleinsäure	1,0M
NaCl	1,5M
Tween 20	0,3%

10 % Blockierungsreagenz

Blockierungsreagenz (Roche)	20	g
10 x Puffer 1	20	ml
H ₂ O	ad 200	ml

20 min autoklavieren.

Puffer 2

10 x Puffer 1	100	ml
10 % Blockierungsreagenz	100	ml
H ₂ O	ad 1000	ml

Puffer 3

Diethanolamin	9,63	ml
pH 9,5 mit 6 N HCl		
H ₂ O	ad 1000	ml

III.1.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen meist von den Firmen Roth, Merck oder Sigma (soweit nicht anders angegeben) und sind in Tab. III-12 aufgelistet.

Tabelle III-12 verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Material	Anmerkung	Bezugsquelle
dNTP's		Fermentas
Längenstandard	100 bp, 1 kbp	Fermentas
QIAquick PCR-purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAprep Gelextraction Kit	Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	Qiagen
RNeasy Midi Kit		Qiagen
DIG markierter DNA Marker III	Längenstandard, DIG markiert	Roche
DIG markierter RNA Marker II	Längenstandard, DIG markiert	Roche

III.1.8 Software und Datenbanken

Für die weitere Auswertung und Planung der Experimente wurden die in Tab. III-13 dargestellten Programme verwendet.

Tabelle III-13 Verwendete Software

Name	Funktion	Hersteller
Excel	Erstellen von Tabellen und Diagrammen	Microsoft
Clone Manager 6.0	Primer design, virtuelle Klonierung	Sci Ed Central
GenePix Pro 6.0	Auswertung von Microarray Daten	Molecular Devices
BLAST	Homologievergleiche mit Datenbanken	www.ncbi.nlm.gov/blast Altschul et al., 1990
Word	Erstellen von Textdokumenten	Microsoft
Power Point	Erstellen von Präsentationen	Microsoft
Illustrator CS	Erstellen von Grafiken	Adobe
Photoshop CS	Bearbeiten von Grafiken oder Bilddateien	Adobe

III.2 Methoden

III.2.1 Kultivierung von Bakterienzellen

III.2.1.1 Bakterienanzucht

Die Anzucht von Bakterienzellen erfolgt sowohl in Flüssigmedium als auch auf Festmedien. Bei Bedarf werden die oben aufgeführten Zusätze in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

Die Anzucht von *B. licheniformis* erfolgt in der Regel bei 30-55°C in Vollmedium (LB-, NB-, oder PAB). Eine gute Belüftung sollte durch Schütteln des Wachstumsgefäßes bei mindestens 150 rpm gewährleistet sein. Auf Festmedien werden die beimpften Agarplatten für ca. 1-10 Tage, je nach Versuch, inkubiert. Bakterienkulturen, welche Plasmide mit dem temperatursensitiven Origin *oriR* aus pE194 enthielten, wurden bei 30°C kultiviert, um eine Replikation des Plasmids zu gewährleisten.

Die Anzucht von *E. coli* Zellen für die Transformation erfolgt bei 37°C in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen.

Für Wachstumstests werden aus einer Vorkultur jeweils eine definierte Anzahl an Bakterienzellen in entsprechende Medien überimpft.

III.2.1.2 Archivierung von Bakterienstämmen

Für eine längere Lagerung von Bakterien, wie z.B. für den Zweck zur Erstellung einer Stammsammlung können die Bakterien in 50 % (v/v) Glycerin und bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Bakterien werden dafür über Nacht spezifisch in Flüssigkultur angezogen. Am nächsten Tag werden 800 µl Zellkultur mit 200 µl Glycerin (87 %) gemischt. Anschließend kann die Glycerinkultur bei -20°C gelagert werden.

III.2.2 Darstellung von DNA

III.2.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Darstellung und Größenbestimmung von DNA-Molekülen erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Proben werden hierbei mit BPB-Ladepuffer vermischt

Material und Methoden

und in die Geltaschen eines zuvor erstellten Agarosegels pipettiert. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Nettoladung zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit eines DNA-Fragments im Gel ist umgekehrt proportional zu seinem Molekulargewicht, so dass die Größenbestimmung über den Vergleich mit DNA-Längenstandards bekannter Größe erfolgen kann. Die Agarosekonzentration und Laufbedingungen können hierbei je nach erwarteten Fragmentgrößen variiert werden.

Die gewünschten Agarosemengen werden abgewogen und in 1xTAE aufgekocht. Anschließend wird die Agarose luftblasenfrei in eine mit Kamm bestückte Horizontalkammer gegossen und nach Aushärten mit 1xTAE überschichtet. Die DNA-Proben werden dann mit BPB-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wird der Gellauf gestartet und die DNA dann mit Ethidiumbromid angefärbt. Zur Dokumentation wird das Gel unter UV-Anregung auf dem Transilluminator fotografiert.

III.2.3 DNA-Isolierung

II.2.3.1 Isolation chromosomaler DNA aus *B. licheniformis*

Für die Isolation von DNA aus *B. licheniformis* werden die Zellen zunächst in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Von dieser Übernachtskultur werden 2 ml in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei 13000 rpm 5 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge plus, Heraeus) abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wird das Bakterienpellet in 900 µl STE-Puffer resuspendiert und anschließend 150 µl Lysozym (40 mg/ml) zugegeben. Es folgt für die Lyse der Zellen eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Im Anschluss an die Lyse erfolgt eine Denaturierung der Proteine und eine Permeabilisierung der Membran durch die Zugabe von 140 µl 10% SDS, 120 µl 0,5 M Na-EDTA und 10 µl Tris-HCl. Anschließend wird die RNA mit Hilfe von 50 µl DNase-freier RNase für 10 min bei Raumtemperatur verdaut. Um sämtliche Proteine aus der DNA-Lösung zu entfernen erfolgt ein Proteinase K-Verdau durch Zugabe von 50 µl Proteinase K (10mg/ml). Es wird dann bei 37°C für mindestens 3 h inkubiert. Anschließend werden die Proteine noch durch die Zugabe von 300 µl 5 M Na-Perchlorat und anschließende Zentrifugation (Tischzentrifuge: 20 min, 12000 rpm, RT) gefällt. Der Überstand wird dann in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und anschließend 2x mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; Roth) gewaschen (Tischzentrifuge: 10 min, 12000 rpm, RT). Die DNA-haltige Phase wird anschließend vorsichtig mit der Pipette abgenommen, mit einem Volumen Isopropanol (Sigma) versetzt

Material und Methoden

und durch Zentrifugation (Tischzentrifuge: 10 min, 12000 rpm, RT) gefällt. Dann wird die DNA erneut mit 70% Ethanol für 10 min bei 12000 rpm bei RT gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols erfolgt die Trocknung der DNA im Heizblock mit offenem Deckel bei 37°C für ca. 10 min. Abschließend wird die DNA in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen, gelöst und bei -20°C gelagert.

III.2.3.2 Kochlyse

Mit Hilfe der Kochlyse kann ein DNA-haltiger Überstand gewonnen werden, der als Vorlage bei der PCR eingesetzt werden kann. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt rein physikalisch durch Aufkochen. Die Zelltrümmer werden abzentrifugiert (6000 rpm, 1 min, RT) und der Überstand dann für die PCR eingesetzt. Der DNA-haltige Überstand kann jedoch nicht dauerhaft gelagert werden.

Die Bakterienzellen werden in 50 µl Wasser gründlich resuspendiert und anschließend für 15 min bei 100°C inkubiert. Anschließend werden die Zelltrümmer 1 min bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und 4 µl des Überstandes dann für die PCR eingesetzt.

II.2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach größenabhängiger elektrophoretischer Trennung der Fragmente im Gel, wird ein Agaroseblock mit dem gewünschten DNA-Fragment aus dem Gel herausgetrennt. Die Aufreinigung erfolgt mittels des folgenden Kits.

III.2.3.4.1 Aufreinigung nach dem QIAquick Gel-Extraktion Kit

Alle mit * gekennzeichneten Puffer sind Bestandteil des Kits.

Zunächst wird die Agarose-Gelelektrophorese nach Vorschrift durchgeführt und anschließend der Agaroseblock mit der gewünschten DNA-Bande mit dem Skalpell herausgetrennt. Das erhaltene Gelstück wird dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die 3-fache Menge an QG*-Puffer zugegeben. Dann erfolgt eine Inkubation bei 50°C für 10 min, um das Gelstück aufzulösen, wobei das Gefäß alle 2 min gevortext wird, um die Auflösung des Gels zu erleichtern. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und das Gemisch wird dann auf die Säule gegeben, 1 min bei 13000 rpm bei RT

Material und Methoden

zentrifugiert und der Durchlauf anschließend verworfen. Dann werden 750 µl QG*-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Zum Waschen wird dann PE-Puffer* auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert und die Säule dann in ein neues 1.5 ml-Gefäß gegeben. Nach Verwerfen des Durchlaufs erfolgt eine erneute Zentrifugation, um die Membran der Säule zu trocknen, an die sich dann die Elution mit 30 µl Wasser anschließt. Hierbei werden die 30 µl auf die Membran gegeben, eine Minute inkubiert und abschließend für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert.

III.2.3.5 Plasmidisolation mittels Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit

Alle mit * gekennzeichneten Puffer sind Bestandteil des Kits.

Eine einfache und schnelle Isolation von Plasmid-DNA aus *B. licheniformis* und anderen Bakterienstämmen kann mit Hilfe des Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit erfolgen. Diese Methode beruht auf der HB-Lyse, bei der die Zellwände der Bakterien durch eine kombinierte Detergenz- und NaOH-Behandlung lysiert werden. Für *B. licheniformis* ist zusätzlich noch eine Vorbehandlung mit Lysozym nötig, um die Zellwand aufzulösen und die DNA freizusetzen. Diese wird dann durch SDS-Einwirkung im alkalischen Milieu denaturiert. Durch eine Absenkung des pH-Wertes werden die Plasmide bei einer gleichzeitigen Quervernetzung der Chromosomen renaturiert. Durch Zentrifugation werden die Plasmide im Überstand angereichert und können aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung bei dem QIAgen-Kit erfolgt jedoch nicht durch Phenolisierung, wie bei der einfachen HB-Lyse, sondern durch eine Ionenaustauschersäule.

Die plasmidhaltigen Zellen werden über Nacht bei 37°C in 3 ml Vollmedium mit den entsprechenden Antibiotika inkubiert. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge: 12000 rpm, 5 min, RT) geerntet und in 250 µl P1-Puffer* resuspendiert. Anschließend gibt man 350 µl P2-Puffer* zu den Zellen, resuspendiert 8x und inkubiert die Zellsuspension für 5 min bei Raumtemperatur. Während dieses Schrittes werden die Zellen lysiert und die DNA denaturiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit gibt man 350 µl P3-Puffer* zu der Suspension und invertiert erneut 8x, um die Zellen zu neutralisieren. Nun schließt sich eine 10 minütige Zentrifugation (13000 rpm, RT) an. Der Überstand wird auf eine Spinprep-Säule gegeben und erneut 1 min zentrifugiert. Anschließend gibt man 750 µl PB-Puffer* auf die Säule, um die Zellen zu waschen. Es schließt sich eine erneute

Material und Methoden

Zentrifugation (13000 rpm, RT) an. Danach werden die Säulen trocken zentrifugiert. Für die Elution der gewünschten DNA werden nun 40 µl EB-Puffer* auf die Mitte der Säule gegeben, die in ein neues Gefäß gesetzt wurde. Dann folgt eine 1 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend eine erneute Zentrifugation (8000 rpm, RT). Das DNA-haltige Eluat kann bei -20°C gelagert werden.

III.2.4 Restriktion und Modifikation von DNA

III.2.4.1 DNA-Restriktion mit TypII-Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von TypII-Restriktionsendonukleasen können DNA-Moleküle an definierten Stellen geschnitten werden. Enzyme dieses Typs sind in der Lage, spezifische palindromische DNA-Sequenzen zu erkennen und den DNA-Strang an diesen Stellen aufzubrechen. In Abhängigkeit vom eingesetzten Restriktionsenzym entstehen hierbei glatte (*blunt-ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*). Die Kontrolle der Restriktion erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Bei Bedarf ist eine Inaktivierung der Enzyme durch entsprechende Inkubation bei 65 oder 80°C möglich. Ein standardisiertes Protokoll für die DNA-Restriktion ist im Folgenden dargestellt.

Es werden die gewünschten DNA-Mengen für die Restriktion eingesetzt, mit den entsprechenden Units des Enzyms und der nötigen Menge des spezifischen Puffers gemischt und auf das gewünschte Volumen mit sterilem Wasser aufgefüllt. Dann erfolgt eine Inkubation bei der optimalen Temperatur des jeweiligen Enzyms für 1 bis 3 Stunden. Nach Ablauf der Zeit werden die Restriktionsansätze aufs Agarosegel aufgetragen und anschließend unter UV-Anregung auf dem Transilluminator dokumentiert.

III.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR – polymerase chain reaction) bietet die Möglichkeit ‚in vitro‘ gezielte DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Abschnitten flankiert werden, zu vervielfältigen. Hierbei können verschiedene thermostabile Polymerasen verwendet werden, die sich in einigen Eigenschaften grundlegend unterscheiden. Hierzu zählen die Pufferbedingungen, die Polymerisationsgeschwindigkeit und das Vorhandensein einer 3`-5`-Exonukleaseaktivität.

Material und Methoden

Tabelle III-13 Standard PCR-Ansätze für die verwendeten Polymerasen

Komponente	Taq-Polymerase	Pfu-Polymerase	Phire- Polymerase
Puffer	5 µl (10x Puffer)	5 µl (10x Puffer)	10 µl (5x Puffer)
PCR dNTP-Mix (10mM)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer (10mM)	2 µl	2 µl	2 µl
„Template“ DNA	50 – 100 ng	50 – 100 ng	50 – 100 ng
Polymerase	1 U	1 U	1 U
Wasser	Auf 50 µl Reaktionsvolumen auffüllen.		

Tabelle III-14 Standard PCR-Bedingungen für die verwendeten Polymerasen

Schritt	Temperatur	Taq- Polymerase	Pfu- Polymerase	Phire-Polymerase
1. primäre Denaturierung	94 – 98 °C	90 sec	90 sec – 8 min	90 sec – 8 min
2. zyklische Denaturierung	95°C	30 sec	30sec	30 sec
3. Annealing		Primerabhängig		
4. Polymerisation	72°C	30 bp/sec	1 kb/2 min	1 kb/20 sec
5. Zyklen	25 – 30x			
6. finale Polymerisation	72°C	10 min	10 min	10 min
7. Kühlung	4°C	Bis Ende	Bis Ende	Bis Ende

Die angeführte Phire-Hot-Start-Polymerase ist aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit bei der Polymerisation besonders für die Amplifikation von großen Fragmenten (< 3 kb) geeignet.

III.2.5.1 „Inverse-PCR“

Die „Inverse-PCR“ Methode wird häufig für die Amplifizierung unbekannter DNA-Bereiche verwendet. Dadurch können z.B. Integrationsorte von Transposons identifiziert werden. Diese Methode funktioniert ähnlich zu der herkömmlichen PCR-Methode nur dass bei dieser PCR die Primer nicht aufeinander zu amplifizieren, sondern aus einem bekannten Bereich (z.B. das Transposon) heraus in einen unbekanntem Bereich hinein.

Zunächst wird die zu untersuchende DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, welches keine Erkennungssequenz in dem bekannten DNA-Bereich aufweist. Anschließend erfolgt eine „Ligation“, um kleine zirkuläre DNA-Fragmente zu erhalten, welche anschließend als „Template“ für die PCR-Reaktion dienen. Die PCR an sich wird wie eine herkömmliche

Material und Methoden

PCR durchgeführt (siehe III.2.7), nur das man die Elongationszeit anpassen muss, da sehr große Produkte entstehen könnten, je nachdem wie häufig das verwendete Enzym im Chromosom schneidet (Abbildung III-1). Man kann auch nach 1 Zyklus die Reaktion abbrechen und dieses Produkt als ‚Template‘ für eine PCR mit 30 Zyklen einsetzen, um die PCR spezifischer zu gestalten.

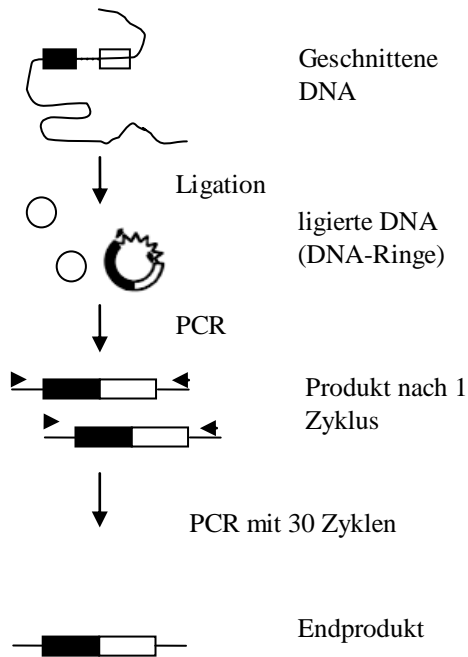


Abbildung III-1 Schematische Darstellung einer Inverse-PCR (IPCR; nach Ochman *et al.*, 1988).

III.2.5.2 ‚Vectorette‘-PCR

Die ‚Vectorette‘- oder auch ‚Bubble-PCR‘ genannt, wird ebenfalls zur Identifizierung von unbekanntem DNA-Bereichen, wie z.B. beim Sequenzieren, angewendet.

Bei dieser Methode werden Primer verwendet, die ausschließlich an den Enden komplementär sind. Aufgrund dieser Eigenschaft kann in einer Hybridisierungsreaktion eine ‚Bubble-Linker-DNA‘ entstehen, die an den komplementären Enden doppelsträngig vorliegt, an den nicht-komplementären Bereichen aber eine blasenähnliche Formation ausbildet.

Für die Durchführung der ‚Vectorette‘- oder ‚Bubble-PCR‘ werden 2,5 µg chromosomaler DNA in einem 20 µl Ansatz jeweils einem Enzym vollständig geschnitten:

Material und Methoden

x μl chrom. DNA
5 μl Enzym
2 μl Puffer (dem Enzym entsprechend)
6,5 μl H₂O

20 μl

Der Verdau erfolgt ü.N. bei 37 °C und die DNA kann dann am nächsten Morgen gleich ohne weitere Behandlung bis zur Benutzung bei -20°C eingefroren werden.

Für die Herstellung der Bubble-DNA werden die entsprechenden Oligonukleotide Bubble_1 und Bubble_2 (siehe Material und Methoden; Tabelle III-3) zu 500 μM in einem 84 μl Ansatz eingesetzt. Da die Primer von MWG-Eurofins in einer Konzentration von 100 μM geliefert werden, müssen dementsprechend 5 μl pro Oligonukleotid eingesetzt und anschließend mit 74 μl Wasser aufgefüllt werden. Es folgt eine Inkubation für 10 min bei 65°C auf dem Heizblock, die durch die Zugabe von 6 μl MgCl₂ (liegt der T4 Polymerase bei, 25 mM) abgestoppt werden kann. Anschließend muss der Reaktionsansatz bei RT ca. 30 min langsam abkühlen. Danach kann die erhaltene ‚Bubble-Linker-DNA‘ entweder eingefroren werden oder auf Eis bis zur Benutzung gelagert werden. Wichtig ist eine langsame Abkühlung, da sich der ‚Bubble‘ sonst nicht bildet und die DNA denaturiert bleibt!

Die ‚Ligation‘ der ‚Bubble-DNA‘ an die geschnittene chrom. DNA erfolgt bei 16°C über Nacht in einem PCR-Cycler und der Ansatz wird wie folgt zusammengegeben:

5 μl PEG 4000 (50 % w/v)
1 μl T4 Ligase
5 μl T4 Reaktionspuffer (10x)
3 μl ‚Bubble-DNA‘
20 μl DNA-Verdau
16 μl H₂O

Der Ligationsansatz kann bis zur Benutzung bei -20°C gelagert werden und direkt als ‚Template‘ (1 μl) für PCRs eingesetzt werden. Die PCR selbst wird mit wieder wie eine herkömmliche PCR durchgeführt (III.2.7). (Abb. III-2).

Material und Methoden

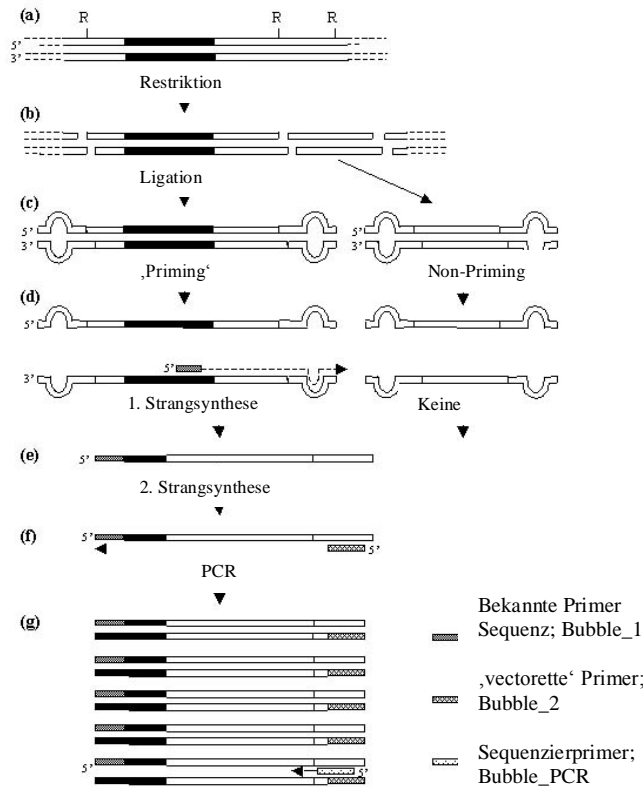


Abbildung III-2 Schematische Darstellung der Vectorette-PCR. (Nach <http://www.uu.nl/faculty/science/en/organisation/depts/biology/research/chairs/moleculargenetics/research/Pages/methods.aspx>)

III.2.5.3 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird zunächst RNA mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche dann als ‚Template‘ einer PCR (siehe Material und Methoden, III.2.5) dient. Beide Reaktionen werden mit dem OneStep RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem Schritt durchgeführt. Dieses Kit enthält ein Gemisch aus einer reversen Transkriptase und einer Taq-Polymerase, die erst durch Erhitzen auf 95 °C aktiviert wird. Bei den verwendeten Programmen erfolgt zunächst die reverse Transkription für 30 min bei 50 °C, anschließend wird die Taq-Polymerase durch eine Inkubation für 15 min bei 95 °C aktiviert und es folgt die Amplifikation der cDNA durch eine PCR, wobei die Bedingungen in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer und der Länge des erwarteten Produkts gewählt werden (III.2.5).

Material und Methoden

Reaktionsansatz:

2,5 µl	5 x OneStep RT-PCR Buffer
0,5 µl	dNTP (je 10 mM)
1 µl	forward Primer (10 mM)
1 µl	reverse Primer (10 mM)
1 µl	Enzyme Mix
x µl	„Template“
ad 25 µl	H ₂ O

III.2.5.4 QIAquick PCR Purification Kit Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt mittels des QIAquick PCR-Purification-Kit. Die Methode beruht auf der Bindung von einzel- oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten einer bestimmten Größenordnung an das Material einer Ionenaustauschersäule. Kleinere DNA-Fragmente, wie z.B. Primer oder große Moleküle, können nicht ans Säulenmaterial binden und werden durch Waschung der Säule herausgetrennt. Alle mit * gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des verwendeten Kits.

Das aufzureinigende PCR-Fragment wird mit dem fünffachen Volumen PB-Puffer* gemischt und auf die Säule gegeben. Es folgt eine Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm und der Durchlauf wird dann verworfen. Zum Waschen werden 750 µl PE-Puffer* auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT). Dann folgt eine weitere Zentrifugation unter denselben Bedingungen, um den Filter der Säule zu trocknen. Abschließend wird die Säule in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das erhaltene DNA-Eluat kann bei -20°C gelagert werden.

III.2.6 „Gene-SOEing“ („Gene Splicing by Overlap Extensions“)

Mit Hilfe der Methode des Gene Splicing by Overlap Extensions (Horton *et al.*, 1989) werden beliebige DNA-Sequenzen mittels PCR kombiniert, ohne dass geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden sein müssen. Auf diese Weise können

Material und Methoden

Deletionskonstrukte erzeugt werden, die den Ausgangspunkt für eine definierte Deletionsmutagenese bilden.

Die Methode gliedert sich in zwei voneinander unabhängige PCR-Reaktionen. Im ersten Schritt werden zwei PCR-Produkte erzeugt, die den zu deletierenden Bereich flankieren. Um Auswirkungen der Deletion auf die nachfolgenden Gene zu vermeiden, sollte der flankierte Bereich ‚in frame‘ liegen. Die hierbei verwendeten Primer haben an den jeweiligen 5'-Enden zueinander homologe Sequenzen (Extensions), so dass die daraus resultierenden PCR-Produkte ebenfalls homologe Sequenzen aufweisen. Die erstellten PCR-Produkte werden nach erfolgter Aufreinigung in einer zweiten PCR-Reaktion fusioniert, wobei die denaturierten Einzelstränge über die homologen Sequenzen eine komplette Basenpaarung eingehen können.

III.2.7 ‚Ligation‘

Das Enzym *T4-Ligase* ist in der Lage, endständige 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen unter Ausbildung von Phosphodiesterbrücken miteinander zu verknüpfen. Auf diese Weise können zuvor verdaute DNA-Fragmente miteinander verbunden werden. Grundlegende Voraussetzung ist jedoch, dass die DNA-Molekülen zueinander komplementäre Einzelstränge (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*) aufweisen. Bei der ‚Ligation‘ der unterschiedlichen Ansätze ist darauf zu achten, dass die Effektivität der *T4-Ligase* bei der ‚blunt-end Ligation‘, im Vergleich zur Verknüpfung von ‚sticky-ends‘, deutlich reduziert ist. Die ‚Ligation‘ von glatten DNA-Molekülen wird ebenfalls durch hohe ATP-Konzentration gehemmt, so dass alternative Pufferbedingungen verwendet werden. Typische Ligationsprozeduren sind im Folgenden kurz beschrieben.

III.2.7.1 ‚Sticky-end Ligation‘

Die verdaute Vektor-DNA und Insert-DNA werden im Verhältnis 1:5-15 in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit 1x Ligasepuffer vermischt und abschließend 2 Units *T4-Ligase* zugegeben. Das Reaktionsvolumen wird dann mit der entsprechenden Menge an Wasser aufgefüllt und es erfolgt dann eine Inkubation über Nacht bei 14-16°C.

III.2.7.2 ‚Blunt-end Ligation‘

Die verdaute Vektor-DNA und Insert-DNA wird im Verhältnis 1:7-15 in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit dem T4-Puffer, 4-15 Units der T4-*Ligase* und dem entsprechenden Volumen Wasser gemischt und dann über Nacht bei 22°C inkubiert.

III.2.8 DNA-Transfertechniken

III.2.8.1 Transformation von *Escherichia coli*-Zellen

III.2.8.1.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Um die DNA-Aufnahme durch *E. coli*-Zellen zu ermöglichen, werden diese in eiskalter CaCl₂-Lösung inkubiert. Diese Behandlung ermöglicht den Plasmiden bei der Transformation an der Oberfläche der Bakterienzellen zu binden, bevor sie ins Cytoplasma aufgenommen werden. Das verwendete Protokoll für die Herstellung ist im Folgenden dargestellt.

100 µl einer über Nacht Kultur von *E. coli* werden in 10 ml LB-Medium bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0.5 – 0.6 angezogen und für 5 min bei 6000 rpm und 0°C in einer Kühlzentrifuge (Hettich, Universal 320R) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wird in 5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung (0°C) resuspendiert und anschließend für 30 min bei 0°C inkubiert. Nach diesen 30 min wird erneut für 5 min bei 6000 rpm und 0°C zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das erhaltene Pellet dann in 1 ml CaCl₂-Lösung (0°C) resuspendiert. Für eine längere Lagerung bei -80°C werden 200 µl Glycerin (99.5%) zu der Suspension gegeben, diese in 100 µl Chargen aufgeteilt und dann bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

III.2.8.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Aufnahme des Plasmids in das Cytoplasma der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgt nach einem Hitzeschock bei 42°C. Das transformierte Plasmid verleiht den Bakterienzellen eine zusätzliche Antibiotika-Resistenz, so dass eine Kontrolle der Transformation durch Selektion auf entsprechendem antibiotikahaltigem Medium möglich ist. Das verwendete Protokoll ist im Folgenden beschrieben.

Material und Methoden

100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen werden mit 10 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt und für 30 min bei 0°C inkubiert. Darauf folgt ein 90 sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wird sofort 1 ml LB-Medium auf die Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Es folgt eine 45 min Inkubation bei 37°C. Nach abgeschlossener Transformation werden 100 µl des Ansatzes auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Die restlichen Zellen werden dann für 5 min bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und anschließend ebenfalls auf Selektionsplatten ausplattiert.

III.2.8.2 DNA-Transfer in *B. licheniformis* MW3

Der in dieser Arbeit verwendete *B. licheniformis* MW3 (Waschkau *et al.*, 2007) enthält im Gegensatz zum *B. licheniformis* DSM13 nicht mehr beide Typ-I-Restriktionssysteme und ist somit für genetische Manipulationen leichter zugänglich. Es gibt zwei Methoden des DNA-Transfers, die in dieser Arbeit für *B. licheniformis* MW3 angewendet worden sind und im Folgenden vorgestellt werden.

III.2.8.2.1 DNA-Transfer mittels Protoplastentransformation

B. licheniformis hat eine vielschichtige Zellwand, die eine Aufnahme von DNA in die Zelle erschwert. Deshalb ist es für eine erfolgreiche Transformation notwendig, die Zellwand zu zerstören. Der Abbau der Zellwand erfolgt durch den Einsatz von Lysozym, wodurch osmotisch sehr empfindliche Protoplasten entstehen, die in der Lage sind, in Gegenwart von Polyethylenglycol (PEG) Plasmid-DNA aufzunehmen. Im Folgenden ist das Protokoll für eine erfolgreiche Protoplastentransformation dargestellt (verändert nach Chang & Cohen, 1979).

Ausgehend von *B. licheniformis*-Einzelkolonien wird eine 20 ml-NB oder LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Am folgenden Tag erfolgt eine mikroskopische Kontrolle der Vorkultur auf eventuell vorhandene Kontaminationen und auf Vitalität der Zellen. Ausgehend von dieser Vorkultur wird eine 50 ml PAB-Hauptkultur im Vierschikane-Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.85-0.9 bei 37°C und 160 rpm kultiviert. Es folgt ein Ernten der Zellen bei 9000 rpm für 10 min bei 4°C. Das erhaltene Pellet wird in 5 ml kaltem SMMP resuspendiert und die Zellwand durch Zugabe von 150 µl Lysozym (10 mg/ml)

Material und Methoden

sukzessiv abgebaut. Die Protoplastierung erfolgt in einem 100 ml Erlenmyer-Kolben zwischen 30-120 min und 100 rpm bei 37°C. Der Grad der Protoplastierung wird regelmäßig mikroskopisch überprüft. Bei einem Protoplastierungsgrad zwischen 80-90% werden die Ansätze sofort für 5 min auf Eis inkubiert, um die Reaktion abzustoppen. Es folgt das Ernten der Protoplasten durch langsame Zentrifugation (10 min, 800 x g, 4°C), an die sich eine zweite etwas schnellere Zentrifugation anschließt (10 min, 2000 x g, 4°C). Das erhaltene lockere Pellet wird in 5 ml SMMP-Medium durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis inkubiert. Für die Transformation werden 500 µl-Aliquots mit 0.25 µg Plasmid-DNA und 1.5 ml 40%iger PEG₆₀₀₀-Lösung vermischt. Als Negativkontrolle dient ein 500 µl-Aliquot protoplastierter Zellen, welche keine Plasmid-DNA enthält. Die Transformationsansätze werden 2 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 5 ml eisgekühltes SMMP⁺-Medium zugegeben und die Protoplasten durch zweifache Zentrifugation (10 min, 800 x g, 4°C; 10 min, 2000 rpm, 4°C) abgetrennt. Das erhaltene Zellpellet wird in 1 ml SMMP⁺-Medium (enthält BSA) vorsichtig resuspendiert. Es folgt eine Regeneration der Protoplasten durch eine Inkubation für 2 Stunden bei 100 rpm und 30°C, da Plasmide mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung bei dieser Temperatur replizieren können. 300 µl der Zellen wurden anschließend auf DM3-Selektionsplatten gegeben und vorsichtig mit dem Spatel ausplattiert. Eine Kontrolle der Regenerationsfähigkeit der Protoplasten erfolgte durch Verteilung von 500 µl der transformierten Zellen auf DM3-Platten ohne Antibiotika. Nach 2 – 10 Tagen Inkubation bei 30°C können die Transformanten detektiert werden.

III.2.8.2.2 DNA-Transfer mittels Konjugation

Die Regeneration der Protoplasten bei der vorher beschriebenen Methode stellt zum Teil ein Problem dar, da die Wartezeit auf den Erhalt der Transformanten sehr lang ist (3 bis 10 Tage) und die Methode auch nicht immer Transformanten liefert. Deshalb wurde eine weitere Methode, die Konjugation, für den Transfer von Plasmid-DNA in *B. licheniformis* entwickelt (Rachinger, Dissertation, 2010). Ein Zerstören der Zellwand ist dabei nicht mehr erforderlich, da die Übertragung über Zell-zu-Zellkontakt durch Ausbildung von Pili erfolgt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Transfer-Gene (*tra*-Gene), die auf dem Vektor pKVM1 und die Mobilisierungsregion, die im Chromosom des verwendeten Donorstammes *E. coli* S17-1 lokalisiert sind.

Material und Methoden

Die entsprechenden Stämme werden in 10 ml LB-Medium (bei Bedarf mit dem nötigen Antibiotikum) über Nacht bei 37°C und 160 rpm kultiviert. Am folgenden Tag wird die *B. licheniformis* Kultur auf OD₆₀₀ 0,2 und die *E. coli* Kultur auf 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 – 1,4 kultiviert. Anschließend werden 2 ml der Donorkultur bei 6000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und 1 ml des Akzeptorstammes auf das Donorpellet gegeben. Es folgt eine erneute Zentrifugation unter denselben Bedingungen wie zuvor. Der Überstand wird verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension aus Donor- und Akzeptorzellen wird auf einen Nitrocellulosefilter gegeben, der auf die LB-Agar-Platte aufgelegt ist und über Nacht bei der für das verwendete Plasmid permissiven Temperatur (30°C) inkubiert. Anschließend wird das Zellgemisch von dem Filter abgeschwemmt, 100 µl auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C für 24-48 Stunden inkubiert.

III.2.9 Erstellen von *B. licheniformis* DSM13-Deletions-Mutanten

Zur Erstellung des Deletionskonstruktes (Abb. III-3) für die ‚clean deletion‘ Mutanten erfolgt mit Hilfe des ‚GeneSOEing‘ (siehe Material und Methoden, III.2.6). Dieses und der konjugative Vektor pKVM1 werden mit geeigneten Enzymen verdaut (Rachinger, Dissertation, 2011) und anschließend ‚ligiert‘ und in *E. coli* S17-1 transformiert. Bei Erhalt des korrekten Deletionsvektors erfolgt dessen Übertragung in *B. licheniformis* MW3 mittels Konjugation. Die erhaltenen Konjuganten werden dann auf den Erhalt des Plasmids per PCR überprüft und anschließend zu einem ersten ‚cross-over‘ Ereignis (Integration) gezwungen, bei dem der Deletionsvektor über die Flanken in das Genom integriert. Die Selektion auf dieses Ereignis erfolgt über entsprechende Antibiotika bei der für das Plasmid ‚restriktiven‘ Temperatur (37°C), d.h. das Bakterium kann ohne die Resistenz des Plasmids nicht überleben, das Plasmid wiederum kann bei dieser Temperatur nicht mehr replizieren. Es bleibt also lediglich die Integration des Plasmids in das bakterielle Chromosom, um das Überleben zu sichern. Nach Wegfall des Selektionsdrucks durch Antibiotika kann in einem zweiten ‚cross-over‘ Ereignis zum einen das deletierte Deletionskonstrukt im Genom verbleiben, wobei das native Gen mit dem Plasmid verloren geht. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass das Deletionskonstrukt wieder aus dem Genom herausrekombiniert und der ursprüngliche Phänotyp entsteht. Die Selektion auf den Verlust des Plasmids erfolgt bei der ‚restriktiven‘ Temperatur (37°C). Der Nachweis der erhaltenen Deletion erfolgt durch PCR mit spezifischen Primern und durch Sequenzierung des erhaltenen PCR-Produktes für die

Material und Methoden

Deletionsmutante. Zur Kontrolle auf Verlust des Plasmids werden ‚Southern Blot‘ Analysen mit einer plasmidspezifischen Sonde durchgeführt.

Bei Bedarf lassen sich mit dieser Methode auch Mehrfach-Mutanten eines Bakterienstammes erzeugen, ohne dass mehrere Antibiotika für die Selektion benötigt werden, wie es bei einer Deletion eines Gens durch Einfügen einer Antibiotika-Resistenz-Kassette der Fall ist.

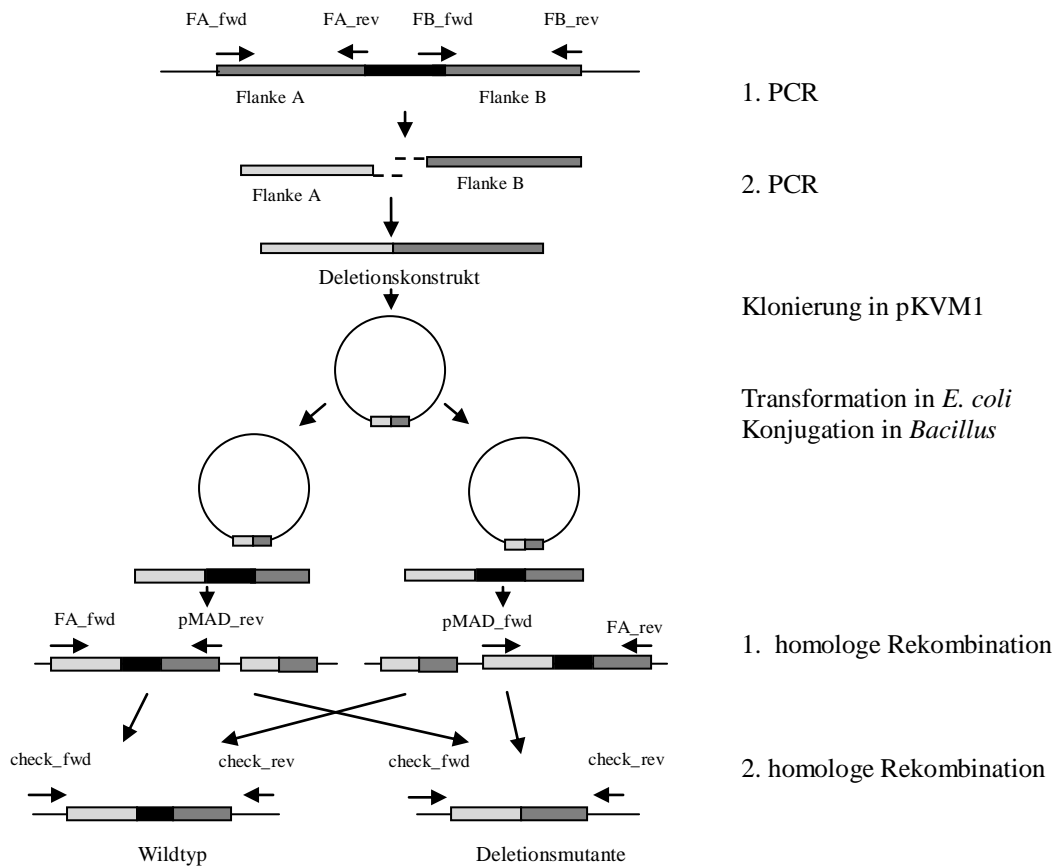


Abbildung III-3 Schematische Darstellung der Deletionsprozedur in *B. licheniformis* MW3.

III.2.10 Phänotypische Charakterisierungen von *B. licheniformis*-Deletions-Mutanten

Für die phänotypische Charakterisierung einer erstellten Deletionsmutante werden Wachstumsexperimente unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um eventuell resultierende Unterschiede im Wachstum zwischen den Deletions-Mutanten und dem Wildtyp

Material und Methoden

feststellen zu können. Hierbei werden Medien verwendet, die Substrate enthalten, bei denen eine Beteiligung des deletierten Gens vermutet wird.

III.2.10.1 Ansetzen der Wachstumsexperimente

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens eines Bakterienstammes müssen die Bakterienzellen in einem 25 ml Vierschikane-Erlenmeyer-Kolben in Vollmedium (hier: LB oder NB-Medium) über Nacht bei 37°C und 180 rpm angezogen werden. Ausgehend von dieser Bakterienvorkultur wird die erste Passage in Minimalmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle angeimpft. Hierbei wird eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 in einem Volumen von 10 ml in einem 100 ml Vierschikane-Erlenmeyer-Kolben benötigt. Diese erste Passage wird bei 37°C oder 42°C und bei 180 rpm inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen gemessen, um einen ersten Eindruck vom Wachstumsverhalten der getesteten Stämme zu erhalten. Anschließend wird analog zur ersten Passage die zweite Passage angeimpft und die entsprechenden Messdaten für die endgültige Wachstumskurve verwendet. In dieser zweiten Passage stehen den Bakterienzellen keine Reste vom Medium der Vorkultur mehr zur Verfügung und es können unverfälschte Daten für die Hauptkultur erhalten werden. Diese werden in einer Excel-Tabelle dokumentiert und in einer logarithmischen Wachstumskurve illustriert.

III.2.10.2 Test zur Untersuchung der Sporulation

Es handelt sich dabei um Wachstumstests, bei denen die Anzahl der vegetativen Zellen mit der der Sporen verglichen wird. Für die Sporulationstests werden die Zellen in dem Medium von Interesse wie oben beschrieben kultiviert, aber es wird nicht die optische Dichte gemessen, sondern die vegetativen Zellen und die Sporen von der Agarplatte ausgezählt. Dafür werden die vegetativen Zellen 2x täglich auf Vollmedium-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Parallel erfolgt die Erstellung der Sporensuspension. Um diese auszählen zu können, werden die Bakterienzellen 25 min bei 80°C inkubiert und anschließend ebenfalls auf Vollmedium-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Messdaten werden dann in einer Excel-Tabelle dokumentiert und in einem Diagramm mit zwei Y-Achsen aufgetragen.

III.2.11.1 RNA-Isolation

Die Isolierung von RNA erfolgt mit Hilfe des RNeasy Midi Kits (Qiagen). Die Isolierung und Aufreinigung erfolgt auch bei diesem Kit über Säulen. Die mit * gekennzeichneten Puffer sind Bestandteil des Kits.

Zunächst werden die Bakterienzellen in entsprechenden Medien analog zu den Wachstumstests angezogen. Die Anzucht der zweiten Passage erfolgt allerdings in einem größeren Volumen. Es werden 100 ml Kultur in einem 1 l Vierschikane-Erlenmeyerkolben angezogen und über Nacht bei entsprechender Temperatur (30-42°C) und 180 rpm angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 werden 40 ml der Bakterienzellen in 10 ml Methanol durch Zentrifugation (-20°C, 9000 rpm, 5 min) geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Das erhaltene Pellet wird in 1 ml TE-Puffer resuspendiert, wobei zwei Pellets derselben Anzuchtbedingung in einem 2 ml Reaktionsgefäß vereinigt werden können. Die Bakteriensuspension wird anschließend für 2 min bei 13000 rpm und 9°C in einer Eppendorf-Tisch-Kühlzentrifuge (Heraeus) abzentrifugiert. Das Pellet wird in 300 µl TE-Puffer resuspendiert und die Zellwände im Dismembrator (Minidismembrator U, Sartorius) für 3 min bei 1600 rpm zerstört, um die RNA der Bakterienzellen isolieren zu können. Zu dem erhaltenen Zellmaterial (Pulverform) werden 4 ml RLT-Puffer* gegeben, der zuvor mit 40 µl Mercaptoethanol versetzt wurde. Es folgt eine 5 min Zentrifugation bei 9000 rpm und Raumtemperatur in der großen Kühlzentrifuge (Heraeus). Der erhaltene Überstand wird mit 2,8 ml Ethanol (-20°C) versetzt, gemischt, auf die RNA-Säule gegeben und für 10 min bei 9000 rpm und RT abzentrifugiert. Es folgt eine zweite Zentrifugation bei denselben Bedingungen, um das gesamte Probenvolumen für die Isolation zur Verfügung zu haben. Auf die Säule werden dann 4 ml RW1-Puffer* gegeben, erneut wie oben angegeben abzentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Der anschließende Waschschrift wird zwei Mal durchgeführt. Es werden 2,5 ml RPE-Puffer* auf die Säule gegeben und am Ende wird so lange zentrifugiert bis die Membran trocken ist. Auf die trockene Membran werden abschließend 2x 150 µl RNasefreies Wasser gegeben. Nach einer 5 min Inkubation erfolgt die Elution durch erneute Zentrifugation (3 min, 9000 rpm, RT).

An die RNA-Isolation schließt sich ein DNase-Verdau an, um die letzten Reste DNA aus dem Eluat zu entfernen. Dafür werden zu den 300 µl RNA, 65 µl 5x DNase-Puffer und 15 µl DNase (Roche) gegeben und für 90 min – 2h bei 22°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgt bei einer Inkubation von 10 min bei 70°C. Die Überprüfung des DNase-Verdau

Material und Methoden

erfolgt über PCR mit DNA-spezifischen Primern und dem sich anschließenden Agarosegel. Bei vollständigem DNase-Verdau erfolgt die Aufreinigung und Fällung der RNA über Phenol-Chloroform-Extraktion. Zu der RNA werden 500 µl der unteren Phase vom Roti-Aqua-Phenol gegeben, dieses 10 sec durch vortexen vermischt und anschließend für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) vermischt und erneut abzentrifugiert. Die obere Phase wird erneut in ein frisches Reaktionsgefäß, mit 30 µl Natrium-Acetat (pH 5.0) und 750 µl 100% Ethanol (-20°C) versetzt und bei -20°C über Nacht gefällt.

Die RNA wird am folgenden Tag für 30 min bei -20°C und 13000 rpm abzentrifugiert, um den Ethanol aus der Probe zu entfernen. Anschließend wird zum weiteren Waschen der RNA nochmals 70%iger Ethanol zugegeben und erneut abzentrifugiert. Der Ethanol wird vorsichtig abgenommen und bei 37°C für 30 min- 90 min inkubiert. Während dieser Inkubation verdampft der letzte Rest Ethanol, der noch im Gefäß vorhanden ist. Abschließend erfolgt die Elution der RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser. Eine 2 stündige Inkubationszeit ist für die vollständige Elution der RNA nötig.

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wird eine RT-PCR mit dem One-Step RT-PCR-Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierbei wird die erhaltene RNA in cDNA umgeschrieben und es wird ein Produkt mit den DNA-spezifischen Primern erhalten, wenn die Qualität der RNA gut ist. Die Überprüfung der PCR erfolgt über ein Agarosegel.

III.2.12 ‚RLM-RACE‘ Analysen

Die isolierte RNA kann für die Bestimmung von Startpunkten eines Gens oder Operons mit Hilfe des FirstChoice® RLM-RACE Kits verwendet werden. ‚RLM-RACE‘ steht für ‚RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA ends‘. Hierbei werden freie Phosphatgruppen am 5‘-Ende von RNA durch ‚*Calf Intestine Phosphatase*‘ (CIP) abgedaut und wird die CIP durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Anschließend werden die Triphosphatgruppen am 5‘-Ende von der RNA mittels ‚*Tobacco Acid Pyrophosphatase*‘ (TAP) gespalten. Dadurch entstehen freie Phosphatgruppen, an welche mit Hilfe der T4 RNA Ligase ein RNA-Adapter ‚ligiert‘ werden kann. Die Adapter-ligierten RNA-Fragmente werden dann mittels einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und eine anschließende Amplifizierung durchgeführt, wobei jeweils ein Adapter-spezifischer Primer (5‘ RACE Primer) und ein geeigneter genspezifischer Primer eingesetzt wird.

Material und Methoden

Die Durchführung bis einschließlich der reversen Transkription der, mit dem 5`RACE Adapter ‚ligierten‘ RNA erfolgt analog dem 5`RLM-RACE Protokoll für Standard Reaktionen mit dem FirstChoice® RLM-RACE Kit.

Outer 5`RLM-RACE PCR

2 µl RT-Reaktions-Ansatz
10 µl 5x Phire Puffer
4 µl dNTP-Mix
2 µl 5`RACE gene-specific Outer Primer (10µM)
2 µl 5`RACE Outer Primer
30 µl H₂O Nuclease frei

Zur Verbesserung des PCR-Produktes mit einer noch höheren Spezifität für die nachfolgende Sequenzierung kann das Produkt der ‚Outer-PCR‘ als ‚Template‘ für eine ‚Inner-PCR‘ eingesetzt werden.

Inner 5`RLM-RACE PCR

2 µl Outer-PCR-Produkt
10 µl 5x Phire Puffer
4 µl dNTP-Mix
2 µl 5`RACE gene-specific Outer Primer (10 µM)
2 µl 5`RACE Inner Primer
30 µl H₂O Nuclease frei

Anschließend werden die PCR-Produkte jeweils mit Hilfe des Qiagen PCR-Purification Kits aufgereinigt und anschließend von der Firma MWG (Ebersberg) sequenziert. Die erhaltene Sequenz wird abschließend über BLAST Vergleiche mit der Sequenz des entsprechenden Gens/Operons und der Adaptersequenz überprüft und auf diese Weise die genaue Position des Startpunktes bestimmt.

II.2.13 ‚Northern Blot‘ Analysen (Alwine *et al.*, 1977)

Die isolierte RNA ist auch für ‚Northern Blot‘ Analysen einsetzbar, bei dem es sich um eine Vorläufermethode der DNA-Microarrays handelt, die ebenfalls auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren beruht. Mit Hilfe eines Northern Blots können bestimmte Transkripte nachgewiesen werden, indem sie auf eine positiv geladene Membran fixiert und mit einer DNA- oder RNA-Sonde hybridisiert werden. Die Sonde ist meist DIG markiert. Im

Material und Methoden

Gegensatz zu DNA-Microarrays kann durch das ‚Northern Blot‘ Verfahren nur die Expression einzelner ausgewählter Gene untersucht werden. Der ‚Northern Blot‘ ermöglicht es aber neben der Expression von Genen auch die Länge der Transkripte zu bestimmen.

Die Herstellung DIG markierter RNA-Sonden erfolgt analog des DIG-Northern Starter Kits (Roche) durch *in vitro* Transkription. Hierbei werden zunächst PCR-Produkte hergestellt, die jeweils ca. 500 bp der zu untersuchenden ORFs umfassen und zusätzlich den T7-Promotor (CTAATACGACTCACTATAGGGAGA) enthalten. Dieser Promotor wird von der T7-RNA-Polymerase erkannt. Für die PCR-Reaktion wird jeweils ein Primer verwendet, welcher am 5'-Ende um den T7-Promotor verlängert ist. Die Wahl des Primers ermöglicht die Bildung der entsprechenden mRNA aus der ‚antisense‘ RNA bei der *in vitro* Transkription. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgt gelelektrophoretisch und nach Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) über die Bestimmung der Konzentration im Nanodrop.

Für die *in vitro* Transkription nach dem DIG Northern Starter-Kit (Roche) wird mit dem DIG RNA Labeling Mix durchgeführt, welcher neben nicht markierten NTPs auch DIG-markiertes UTP enthält.

Reaktionsansatz:

1 µg PCR-Produkt

2 µl 10 x DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)

2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics)

1 µl T7-RNA-Polymerase (Roche Diagnostics)

1 µl Protector RNase Inhibitor (Roche Diagnostics)

ad 20 µl H₂O

Die *in vitro* Transkription selbst erfolgt für 2 h bei 37 °C. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt und die markierte Sonde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol 1 h gefällt. Die markierte RNA wird durch Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 15 min) pelletiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das Pellet wird mit 50 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird quantitativ abgenommen und der restliche Ethanol bei RT abgedampft. Das Pellet wird in 100 µl RNase freiem H₂O durch Inkubation für 30 min bei 37 °C nach Zugabe von 1 µl ‚Protector RNase Inhibitor‘ gelöst. Die so hergestellte Sonden-Stammlösung wird zu je 20 µl aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Material und Methoden

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz werden Verdünnungsreihen der Sonden (100 bis 10⁻⁴) auf eine Nylonmembran gespottet und die DIG-Nachweis-Reaktion durchgeführt (s.u.). Zusätzlich erfolgt eine gelelektrophoretische Überprüfung der Sonden.

Die RNA wird in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend von dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) transferiert. Dies erfolgt mittels ‚download transfer‘ (Chomczynski, 1992), bei dem der Transferpuffer bzw. eine alkalische Transferlösung (10xSSC) durch Kapillarkräfte vom Pufferreservoir über eine Brücke aus Chromatographiepapier (Whatman) durch das Gel und die Membran in darunterliegendes trockenes Papier gesogen wird. Die RNA wird dabei mit transportiert und aufgrund ihrer negativen Ladung auf der positiv geladenen Membran gebunden.

Der Aufbau der Transfervorrichtung ist in Abbildung III-4 dargestellt. Der eigentliche Transfer erfolgt für 2-3 h. Anschließend wird die Membran zur kovalenten Fixierung der RNA 2-3 min in der Geldokumentationsanlage mit UV-Licht bestrahlt und kann dann zur Hybridisierung verwendet werden. Dabei wird darauf geachtet, dass die Membran niemals austrocknet.

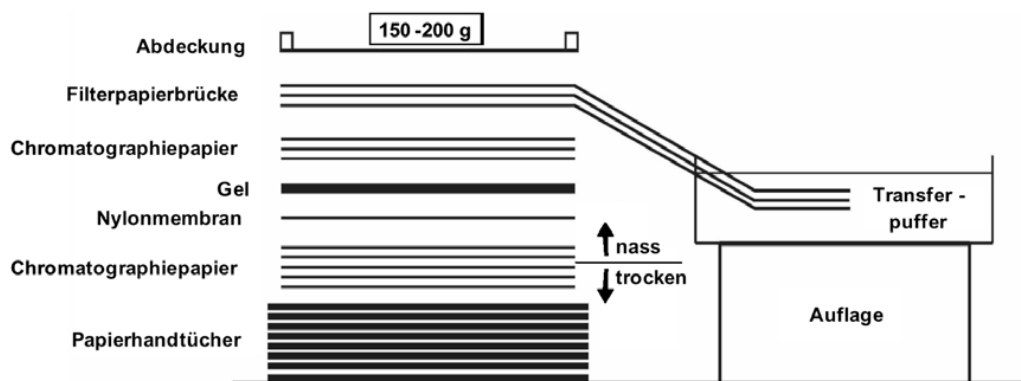


Abbildung III-4 Aufbau der ‚download transfer‘ Einrichtung (nach Chomczynski, 1992, modifiziert)

Vor der anschließenden Hybridisierung wird die Membran auf einem UV-Tisch in Streifen geschnitten und die Markerbanden auf der Membran markiert, um verschiedene Sonden einsetzen zu können. Anschließend wird jeder Membranstreifen in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit ca. 5 ml Prähybridisierungslösung versetzt und 1-2 h bei 68 °C (für RNA-Sonden) im Hybridisierungsofen inkubiert. Dann wird 1 µl der jeweiligen Sonde zugegeben, die vorher in 0,5 ml angewärmter Prähybridisierungslösung verdünnt wurde. Die

Material und Methoden

Hybridisierung erfolgt ü.N. im Hybridisierungssofen bei einer Hybridisierungstemperatur von 68 °C.

Am nächsten Tag wird die Membran 2 x 5 min bei RT mit Waschpuffer 1 und anschließend 2 x 15 min bei 68 °C mit Waschpuffer 2 oder Waschpuffer 3 gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Daraufhin kann die Membran zur Detektion der Sonden-RNA-Hybride eingesetzt werden.

RNA-RNA-Hybride werden mit Hilfe des Enzym-Immunoassays mit anschließender enzymatischer Lumineszenzreaktion nachgewiesen, wobei ein Anti- Dioxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat (Anti-DIG-AP-Konjugat) verwendet wird. Die Dephosphorylierung des AP-Substrats CDP-Star® (Dinatrium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3, 7]decan}-4-yl)-1-phenyl-phosphat) führt zur Bildung eines metastabilen, chemolumineszierenden Intermediates (Abbildung III-5). Die Chemolumineszenz kann mittels eines Chemolumineszenz-Filters an der Geldokumentationsanlage nachgewiesen werden.

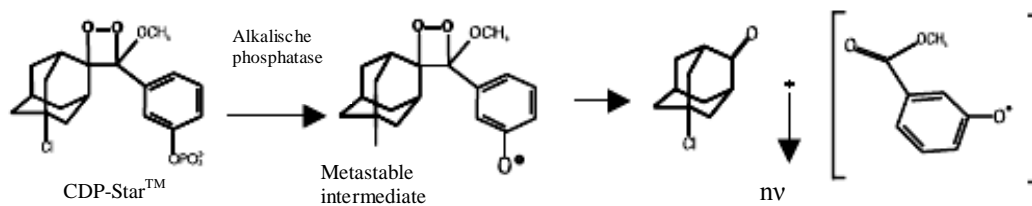


Abbildung III-5 Darstellung der Lumineszenzreaktion des CDP-Star®

Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert CDP-Star®, wodurch ein metastabiles Intermediat gebildet wird, dessen spontane Spaltung zu Chemilumineszenz führt. Der Nachweis der RNA schließt sich direkt an die Hybridisierung an. Zunächst wird die Membran für 5 min in 10 ml 1 x Puffer 1 gewaschen und danach für weitere 30 min in 10 ml Puffer 2 inkubiert, um unspezifische Antikörperbindstellen der Membran abzusättigen. Die Bindung des Anti-DIG-AP-Konjugats, das 1:10000 in 10-20 ml Puffer 2 verdünnt wurde, erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit 10 ml 1 x Puffer 1 entfernt. Anschließend wird die Membran für 10 min in 5 ml Puffer 3 äquilibriert und danach ausreichend mit 1:200 in Puffer 3 verdünnter

Material und Methoden

CDP-Star®- Lösung benetzt. Die Chemilumineszenz-Signale können anschließend mit dem Chemolumineszenz-Filter der Geldokumentationsanlage detektiert werden.

III.2.14 ‚Southern Blot‘ Analysen

Im Unterschied zu den ‚Northern Blot‘ Analysen benötigt man für die ‚Southern Blot‘ Analysen (nach Edwin Southern, 1975) DNA als ‚Template‘. Alle benötigten Puffer und Lösungen sind im Material- und Methodenteil II.6 aufgeführt.

Bei dem ‚Southern Blot‘ handelt es sich um eine molekularbiologische Untersuchungsmethode für DNA, welche den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch (z. B. dem gesamten Genom eines Organismus) ermöglicht, ohne dass sämtliche Sequenzen des Gemisches entschlüsselt werden müssen.

Zu Beginn dieser Methode wird zunächst die Sonde vorbereitet. Dazu werden spezifische Primer für den zu untersuchenden DNA-Bereich gewählt und diese in einer Test-PCR geprüft. Wird das erwartete Produkt erhalten erfolgt eine DIG-Markierung der Sonde. Dabei wird die PCR zur Sondenherstellung wie die Test-PCR durchgeführt, allerdings mit DIG-gelabeltem dNTP-Mix. Eine erfolgreiche Markierung stellt sich im Agarosegel im Vergleich zur Test-PCR als höher laufende Bande dar, da DIG in das PCR-Produkt eingebaut wird. Die Sonde wird anschließend aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und bei -20°C gelagert. Im nächsten Schritt werden die zu untersuchenden Proben vorbereitet. Dazu wird die chromosomale DNA isoliert und mit einem Enzym verdaut, welches nicht in dem zu detektierenden DNA-Bereich schneidet oder eine klare Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante zulässt. Der Restriktionsansatz wird bei vollständigem Verdau (Überprüfung erfolgt über Gelelektrophorese) hitzeinaktiviert und anschließend für das eigentliche Blotting-Gel verwendet. Die Beladung des Gels erfolgt mit einem 2xDIG-Marker (5 µl Ladepuffer + 5 µl DIG-1kb-Ladder) und 10 µl der zu testenden Proben. Der Gellauf erfolgt für 2 Stunden bei 60 V. Währenddessen bietet sich die Vorbereitung des Vakuumblotter (Model 785, Bio-Rad, München) an. Dafür wird zunächst eine Maske zugeschnitten, die in etwa der Größe des Gels entspricht. Anschließend erfolgt das Zuschneiden der Membran (nur mit Handschuhen anfassen!), die ca. 1 cm breiter sein sollte als die Maske. Auf die Membran des Vakuumblotter werden die Membran und dann die Maske luftblasenfrei aufgelegt und das Vakuum bei ca. 5 Hg gezogen. Das Blotting-Gel wird bei ausgeschalteter Vakuum-Pumpe auf die Membran luftblasenfrei aufgelegt und anschließend erneut das Vakuum gezogen. In den nun folgenden Schritten erfolgt die Zerlegung der DNA in Einzelstränge und die Übertragung

Material und Methoden

der DNA auf die Membran. Dazu wird die Membran zunächst für 10 min mit der Depurinierungslösung behandelt, bis der Blaumarker sich gelb verfärbt. Die Lösung wird 2x kurz mit Wasser abgespült, bevor 2x die Denaturierungslösung für jeweils 15 min auf das Gel gegeben wird. Nach 2-maligem Abwaschen der Denaturierungslösung mit Wasser wird 2x für 15 min mit der Neutralisierungslösung neutralisiert und anschließend ein letztes Mal mit Wasser gespült. Es schließt sich die Übertragung der DNA auf die Membran an, indem für mindestens 1 Stunde mit der Transferlösung geblottet wird. Zum Pufferwechsel wird die Kammer schräg gehalten und die Flüssigkeit mit einer Spritze abgenommen. Im Anschluss an das Blotten wird die DNA durch eine 1-minütige UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Diese kann dann in Whatman Papier getrocknet und anschließend in Alufolie bei RT über längere Zeit gelagert werden oder es kann sich sofort die Hybridisierung und die Detektion anschließen. Für die Hybridisierung wird die Membran luftblasenfrei in ein Hybridisierungsröhrchen (Deckel mit Dichtung!) gegeben und zwei Stunden bei 68°C im Hybridisierungsofen mit 25 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Während der Prähybridisierung wird die Sonde für 10 min bei 100°C denaturiert. Nach Ablauf der 2 Stunden wird die Sonde zum Hybridisieren gegeben (frisch: 100 µl zur Prähybridisierungslösung oder gebrauchte Sonde in 25 ml Prähybridisierungslösung gegen die Prähybridisierungslösung austauschen) und über Nacht bei 68°C unter ständiger Rotation inkubiert. Es folgt das Waschen der Membran mit Puffer 1 für 2x 5 min bei RT und mit Puffer 2 für 2x 15 min bei 68°C. Es schließt sich die Detektion an, indem die Membran für 30 min bei RT in Puffer 3 inkubiert wird. Nach diesen 30 min erfolgt die Antikörperbindung, indem 5 µl des Überstandes der abzentrifugierten Antikörper (Anti Digoxgen-AP Fab fragments, Roche) zu dem Puffer 3 gegeben werden und erneut eine 30 minütige Inkubation bei RT erfolgt. Die Membran wird in zwei Waschschritten von den nicht-gebundenen Antikörpern befreit (2x 50 ml Waschpuffer zur Membran geben) und anschließend durch Zugabe von 50 ml Detektionspuffers equilibriert. Abschließend wird die Membran in Folie eingeschweißt und 5 ml Detektionslösung (100µl NBT/BCIP Stock Solution/ 5ml Detektionspuffer) zugegeben. Dadurch wird eine Farbreaktion hervorgerufen, die das Ergebnis dieses Versuches visualisiert und durch anschließendes Einscannen dokumentiert werden kann.

IV. Ergebnisse

B. licheniformis weist eine höhere Produktionsrate an Exoenzymen auf, als der industriell vielgenutzte Stamm *B. subtilis* (Schallmey *et al.*, 2004). Diese Eigenschaft weckt bei der Industrie großes Interesse an *B. licheniformis* als Produktionsstamm von z.B. Proteasen. Da bisher nicht viele Kenntnisse über dieses Bakterium und seinen Stoffwechsel vorhanden sind, war es nun das Ziel seinen Metabolismus zu studieren.

Deshalb wurde zunächst nach Unterschieden im Stoffwechsel von *B. licheniformis* zu *B. subtilis* gesucht, welche eigentlich eine relativ hohe Ähnlichkeit zeigen (Veith *et al.*, 2004) aber dennoch unterschiedliche Produktionsraten an Exoenzymen aufweisen (Schallmey *et al.*, 2004). Bei Wachstumsexperimenten mit unterschiedlichen Substraten (Veith *et al.*, 2004) wurde die besondere Fähigkeit entdeckt, dass *B. licheniformis* DSM13 Substrate, welche über C2-Körper abgebaut werden, als alleinige Kohlenstoffquellen nutzen kann (Veith *et al.*, 2004). Zu diesen Substraten zählen z.B. Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol, welche von *B. licheniformis* während Fermentationsprozessen gebildet werden.

Auf Grund dieser Besonderheit konzentrierte sich diese Arbeit auf die Untersuchungen zum C2-Metabolismus von *B. licheniformis* DSM13, welche durch die Anwendung der markerfreien gerichteten Mutagenese-Methode (Rachinger, Dissertation, 2010) erfolgten. Mit Hilfe dieser Methode wurden potentielle Gene des C2-Metabolismus von *B. licheniformis* deletiert und die erstellten Deletions-Mutanten wurden anschließend für die Definition ihrer Funktion phänotypisch charakterisiert. Weitere, bisher unbekannte Gene des C2-Metabolismus sollen zukünftig mit Hilfe einer ungerichteten Mutagenese-Methode identifiziert werden, weshalb in dieser Arbeit erste Experimente für die Entwicklung einer Methode zur zufälligen Transposonmutagenese durchgeführt wurden. Eine effiziente Methode könnte zukünftig auch der Identifikation produktionsrelevanter Gen von *B. licheniformis* dienen. Dafür könnten z.B. Modellfermentationen durchgeführt und anschließend die, während des Produktionsprozesses induzierten Gene, mit Hilfe von ‚Microarray-Technologien‘ identifiziert werden. Verglichen werden sollte dabei die Expression der Gene von einer kontinuierlichen Kultur des Wildtyps *B. licheniformis* DSM13 mit einer, bestehend aus den Transposonmutanten der erzeugten Mutantenbibliothek. Die Kulturbedingungen sollten dabei den Bedingungen während des Produktionsprozesses gleichen. Die Endosporen von *B. licheniformis* sind hitzeresistent und durch Autoklavieren eines Fermenters schwer abzutöten. Dies hat zur Folge, dass das Überleben der Endosporen von Stämmen anderer

Ergebnisse

Genotypen zu Verfälschungen der Fermentations-Ergebnisse führen könnten. Um diesen Effekt vorzeitig ausschließen zu können wurde über die markerfreie gerichtete Mutagenese-Methode (Rachinger, Dissertation, 2010) ein sporulations-defizienter *B. licheniformis* Stamm *MW3ΔyqfD* konstruiert. Dieser Stamm kann keine hitzeresistenten Sporen mehr ausbilden und ist mikrobiologisch leicht zugänglich.

IV.1 Untersuchungen zum Glyoxylatzyklus von *B. licheniformis* DSM13

Die Bestimmung der Genomsequenz von *B. licheniformis* DSM13 im Jahre 2004 (Veith *et al.*) zeigte, dass dieses Bakterium im Gegensatz zu *B. subtilis* Homologe zu einer Isocitrat-Lyase und einer Malat-Synthase besitzt (Veith *et al.*, 2004). Das Vorhandensein dieser beiden Gene ließ vermuten, dass *B. licheniformis* DSM13 möglicherweise einen funktionellen Glyoxylatzyklus besitzt, welcher ihn dazu befähigen könnte Substrate, wie z.B. Acetat, als alleinige Kohlenstoffquellen zu nutzen. *B. subtilis* ist zwar in der Lage diese Substrate zu verwerten, aber ausschließlich dann, wenn ihm zusätzlich andere Kohlenstoffquellen wie z.B. Glukose zur Verfügung stehen. Dieser gravierende Unterschied im Zentralstoffwechsel zwischen diesen beiden Bakterien machte nähere Untersuchungen dieses potentiellen Glyoxylatzyklus von *B. licheniformis* DSM13 zu einem Leitthema der metabolischen Untersuchungen dieser Arbeit.

Vorrangegangene Arbeiten zeigten bereits, dass *B. licheniformis* DSM13 die Fähigkeit besitzt Substrate, welche über C2-Körper abgebaut werden, wie z.B. Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Das Wachstum erfolgte sowohl in flüssigem Mineralmedium als auch auf Agar-Platten (Veith *et al.*, 2004). Innerhalb dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse mittels Wachstumsexperimenten bestätigt werden. Aus diesem Grund ist *B. licheniformis* DSM13 sehr gut für die Untersuchung des C2-Stoffwechsels bei *Bacillen* geeignet.

In einer Diplomarbeit zur Untersuchung des Glyoxylatzyklus wurde zunächst das Wachstum von *B. licheniformis* DSM13 in Minimalmedium mit 60 mM Acetat und 50 mM Glukose dokumentiert. Dabei wurde der Verbrauch von Glukose und Acetat genauer untersucht, um einen detaillierteren Einblick in die Verwertung dieser Substrate zu erhalten. Die Ergebnisse zeigten, dass die Glukose innerhalb von 11 Stunden verbraucht worden ist und anschließend Acetat verwertet wurde (Diplomarbeit, Verena Schmidt, 2005). Dadurch konnte

Ergebnisse

gezeigt werden, dass Glukose die Acetatverwertung mit einer Katabolitrepression unterdrückt (Abb. IV-1).

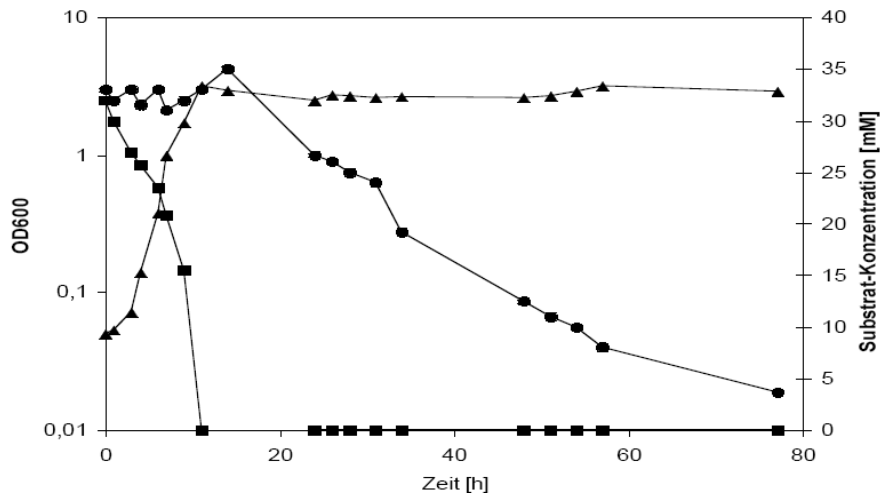


Abbildung IV-1 Vergleich der Substratkonzentrationen von Glukose und Acetat im Kulturüberstand zu der Zelldichte einer ‚batch‘-Kultur von *B. licheniformis* DSM13 in Abhängigkeit der Zeit. Auftragung der Acetatkonzentration (Kreis) und Glukosekonzentration (Rechteck) in mM, sowie der halblogarithmischen Auftragung der Zelldichte (OD600, Dreieck) in Abhängigkeit der Zeit. (Diplomarbeit Verena Schmidt, 2004)

Besonders interessant für die folgenden Untersuchungen zum C2-Metabolismus war, ob die vorhandenen Homologen der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase ein Glyoxylat-Operon in *B. licheniformis* bilden und wie es in *B. licheniformis* DSM13 organisiert und reguliert ist.

IV.1.1 Bestimmung des Startpunktes des Glyoxylat-Operons

Die ersten Experimente galten der Aufklärung der Organisation des in *B. licheniformis* DSM13 vorhandenen potentiellen Glyoxylat-Operons. In einer von mir betreuten Bachelorarbeit wurde der Startpunkt dieses Operons mit Hilfe einer ‚RLM RACE Analyse‘ bestimmt (Dieckmann, 2010).

Die Bakterienzellen von *B. licheniformis* DSM13 wurden in einem 250 ml Schikane-Kolben in 25 ml NB-Medium angeimpft und für 24 Stunden bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde die erste Passage in einem Minimalmedium mit 60 mM Acetat auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und über Nacht bei 180 rpm und 42°C inkubiert. Die zweite Passage wurde dann aus der 1. Passage in frisches Minimalmedium mit 60 mM Acetat

Ergebnisse

in einem 1000 ml Schikane-Kolben auf eine OD_{600} von 0,07 angeimpft und erneut bei 180 rpm und 42°C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD_{600} von ca. 0.5 wurden die Zellen für die anschließende RNA-Präparation geerntet. In dieser Wachstumsphase sind die Zellen noch mitten in der exponentiellen Phase und verwenden das Acetat als einzige Kohlenstoffquelle für ihr Wachstum.

Nach der Isolation der RNA (siehe III.2.11) erfolgte die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mit dem ‚FirstChoice® RLM-RACE Kit‘ (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). ‚RLM-RACE‘ steht für ‚RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA ends‘. Die Durchführung bis einschließlich der reversen Transkription der, mit dem 5`RACE Adapter ‚ligierten‘ RNA, erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers für Standardreaktionen (siehe III.2.12).

Bei dieser Methode wird nach der ‚Ligation‘ von RNA Linkern zunächst eine sogenannte ‚outer –PCR‘ mit den Primern 5`RACE gene-specific Outer und 5`RACE Outer durchgeführt (siehe Tab. III-7) durchgeführt. Um für das nachfolgende Sequenzieren ein PCR-Produkt mit einer noch höheren Spezifität zu erhalten, wurde das Produkt der ‚Outer-PCR‘ als ‚Template‘ für eine ‚Inner-PCR‘ mit den Primern 5`RACE gene-specific Outer und 5`RACE Inner (siehe Tab. III-7) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss aufgereinigt und zu der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) mit dem genomspezifischen Primer 5`RACE gene-specific Outer (siehe Tab. III-7) zum Sequenzieren gegeben. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von BLAST Analysen mit der Sequenz des Adapters (Sequenz des Adapters: siehe Material und Methoden, Tabelle III-7) und des Glyoxylat-Operons verglichen und anschließend der Startpunkt bestimmt (Abb. IV-2). Wie man an der Abb. IV-2 sehen kann, schloss sich an den zum Glyoxylat-Operon homologen Bereich der erhaltenen RACE-Sequenz (6-157 bp) die Adapter-Sequenz (187-157 bp) direkt an. Der abschließende BLAST-Vergleich mit der Glyoxylat-Sequenz ließ eine genaue Bestimmung des Startpunktes auf 230 bp ‚upstream‘ des ‚Startcodons‘ der Malat-Synthase und 50 bp ‚upstream‘ eines 46 Aminosäuren kleinen hypothetischen ORF's zu. Das Vorhandensein eines solchen potentiellen ‚hypothetical small proteins‘ (HSP) konnte innerhalb des Glyoxylatzyklus bisher für keinen Organismus beschrieben werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf erste Untersuchungen zu diesem HSP und dessen möglicher Funktion innerhalb des Glyoxylat-Operons gelegt.

Ergebnisse

```
HSP→
RACE-Sequenz      ATTCCCTGAGTAGATTCCAGCCTGCTCCTCCATCTTTTCGCCGCATTTCAGGG
B. licheniformis ATTCCAGAGAAGAATCCAGCCTGCTCCTCCATCTTTTCGCCGCATTTCAGGG
                    * * *

HSP→
RACE-Sequenz      CACGTTTTTTTCGGAAGCGTTCTGAAAAATCCATCGGACTTTTCAAGCT
B. licheniformis CACGTTTTTTTCGGAAGCGTTCTGAAAAATCCATCGGACTTTTCAAGCT

HSP-
RACE-Sequenz      CATTTGTATAACCTCCTTTTTATAGAACAGTTTATGTTTTATATTTCTG
B. licheniformis CATTTGTATAACCTCCTTTTTATAGAACAGTTTATGTTTTATATTTCTG

Tr. Start
HSP ←|→ Adapter
RACE-Sequenz      TTTTTCTCAAACCCACAAAACGCGGTGTTT
B. licheniformis TTTTTCATCAAAGCCAGCAAACGCAGTGTTT
                    *** * ** *
```

Abbildung IV-2 Darstellung des Alignments der erhaltenen Sequenzen der RACE Analysen mit der Sequenz des verwendeten Adapters und des Glyoxylat-Operons. Die Sequenz des erhaltenen RACE-Produktes zeigte eine Homologie zu einem hypothetical small protein (HSP) ‚upstream‘ der Malatsynthese des Glyoxylat-Operons. Der Adapter schloss sich direkt an diesen Bereich an. Unterschiede in der Sequenz sind mit * gekennzeichnet. Der Transkriptionsstart konnte für das Glyoxylat-Operon 50 bp ‚upstream‘ des Startcodons eines sehr kleinen hypothetischen ORF`s und 230 bp ‚upstream‘ des Startcodons der Malat-Synthase bestimmt werden.

IV.1.2 Untersuchungen zur Organisation der Glyoxylat- Gene von *B. licheniformis* DSM13

Im Anschluss an die Bestimmung des Transkriptionsstarts galt das Interesse der Organisation der Gene des potentiellen Glyoxylat-Operons. Die Annotation des Genoms von *B. licheniformis* DSM13 durch Veith *et al.* (2004) zeigte bereits, dass die Gene des potentiellen Glyoxylat-Operons im Genom hintereinander angeordnet sind. Im folgenden Abschnitt wurden mit Hilfe von RT-PCR-Analysen und ‚Northern Blot‘ Experimenten die Transkripte der Glyoxylat-Gene bestimmt, wodurch die Organisation des potentiellen Operons definiert werden sollte. Des Weiteren sollte bestimmt werden, ob das HSP auf einem Transkript mit den Genen der Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase liegt und mit ihnen ein Operon bildet.

Sowohl für die RT-PCR als auch für die ‚Northern Blot‘ Analysen wurde die RNA der zu untersuchenden Bakterienkulturen isoliert. Die Bakterienzellen von *B. licheniformis* MW3 wurden dafür analog zu den RLM RACE Analysen in Minamalmmedium mit Acetat als einzige C-Quelle angezogen, die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0.5 geerntet und anschließend die RNA isoliert (siehe III.2.11).

Ergebnisse

IV.1.2.1 RT-PCR Experimente zur Bestimmung der Transkripte der Glyoxylat-Gene

Die erhaltene RNA diene als ‚Template‘ für die RT-PCR-Analysen. Die Durchführung erfolgte analog zum Protokoll des ‚One Step RT-PCR Kit‘ von Qiagen (siehe III.2.5.3). Die Primer (siehe Tab. III-8) wurden so gewählt, dass sie ein Produkt für jedes einzelne Gen des Glyoxylat-Zyklus und Produkte für verschiedene Kombinationen der Gene untereinander und mit den umliegenden Genen erzeugen konnten, sofern sie auf einem Transkript liegen (Abb. IV-3A+B).

Es wurden Transkripte für eine Kombination der Gene des HSP's ‚upstream‘ der Malat-Synthase mit der Malat-Synthase (HP_OE_fwd/ RT_Mal_r), für eine Kombination der Gene der Malat-Synthase und der Isocitrat-Lyase (RT_Mal_f/ RT_Iso_r) und für alle drei einzelnen Gene des Glyoxylat-Operons (HP_OE_fwd/ RT_HP__rev; RT_Mal_f/ RT_Mal_r; RT_Iso_f/ RT_Iso_r) erhalten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die getesteten Glyoxylat-Gene auf einem Transkript liegen und somit vermutlich als Operon organisiert sind. Mit demselben Mastermix wurden keine PCR-Produkte für die beiden angrenzenden Gene *yycA* (RT_04209_fwd/ RT_HP__rev) und *B*Li*04206* (RT_Iso_f/ RT_04206_rev) erhalten. Dies zeigte, dass diese beiden Gene kein Teil des Glyoxylat-Operons darstellen (Abb. IV-3A + B).

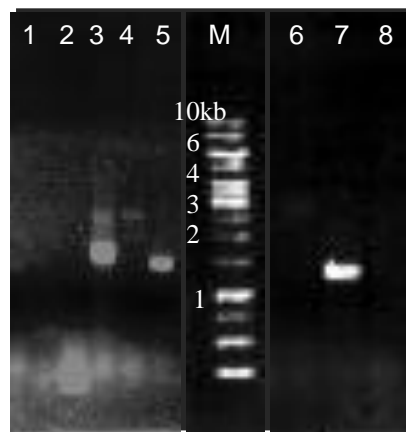


Abbildung IV-3A Darstellung der Agarosegelelektrophorese der RT-PCR der Glyoxylatgene. Mit M ist der 1 kb Marker gekennzeichnet. In Spur 1 ist das PCR-Produkt mit den Primern RT_04209_fwd/ RT_HP__rev aufgetragen, in Spur 2 das PCR-Produkt mit den Primern HP_OE_fwd/ RT_HP__rev, in Spur 3 das PCR-Produkt mit den Primern HP_OE_fwd/ RT_Mal_r, in Spur 4 das PCR-Produkt mit den Primern HP_OE_fwd/ RT_Iso_r, in Spur 5 das PCR-Produkt mit den Primern RT_Mal_f/ RT_Mal_r, in Spur 6 das PCR-Produkt mit den Primern RT_Mal_f/ RT_Iso_r, in Spur 7 das PCR-Produkt mit den Primern RT_Iso_f/ RT_Iso_r und in Spur 8 das PCR-Produkt mit den Primern RT_Iso_f/ RT_04206_rev.

Ergebnisse

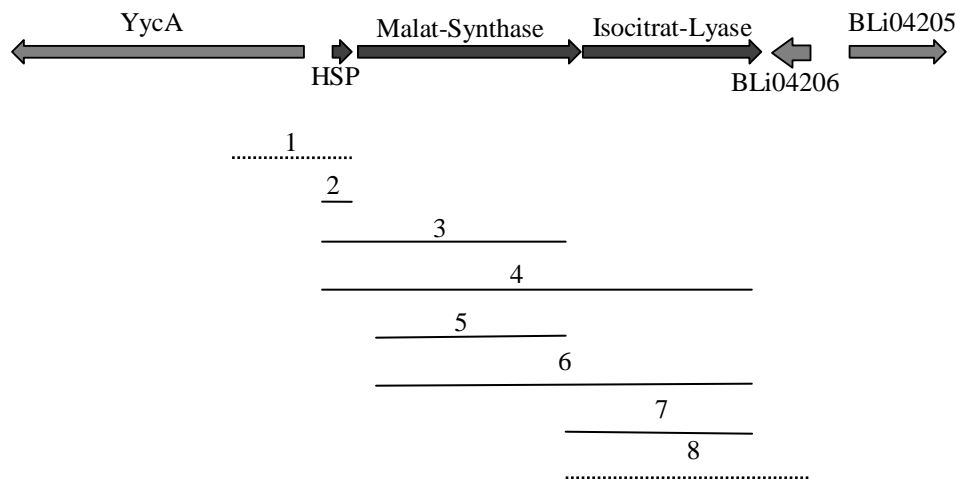


Abbildung IV-3B Schematische Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR-Analysen. 1: PCR-Produkt mit den Primern RT_04209_fwd/ RT_HP_rev, 2: PCR-Produkt mit den Primern HP_OE_fwd/ RT_HP_rev, 3: PCR-Produkt mit den Primern HP_OE_fwd/ RT_Mal_r, 4: PCR-Produkt mit den Primern HP_OE_fwd/ RT_Iso_r, 5: PCR-Produkt mit den Primern RT_Mal_f/ RT_Mal_r, 6: PCR-Produkt mit den Primern RT_Mal_f/ RT_Iso_r, 7: PCR-Produkt mit den Primern RT_Iso_f/ RT_Iso_r, 8: das PCR-Produkt mit den Primern RT_Iso_f/ RT_04206_rev. In durchgehenden Linien sind die erhaltenen PCR-Produkte für die RT-PCR dargestellt; in gestrichelten Linien die PCR-Reaktionen, die zu keinem Produkt geführt haben.

IV.1.2.2 ‚Northern Blot‘ Analysen zur Bestimmung der Transkripte der Glyoxylat-Gene

Wie oben bereits beschrieben zeigten die Ergebnisse der RT-PCR Analysen, dass das Glyoxylat-Operon vermutlich aus dem HSP, der Malat-Synthase und der Isocitrat-Lyase besteht. Eine Bestätigung dieses Ergebnis erfolgte mit Hilfe von ‚Northern Blot‘ Analysen. Dafür wurde die RNA aus den *Bacillus*-Zellen verwendet, die bereits für die RT-PCR Analysen (siehe IV.1.2.1) isoliert worden ist.

Die ‚Northern Blot‘ Analysen (siehe III.2.13) wurden mit Sonden für jedes einzelne Gen des potentiellen Glyoxylat-Operons durchgeführt (Tab. IV-1). Für das HSP wurde eine Sonde von 350 bp verwendet, für die Malat-Synthase eine Sonde von 515 bp und für die Isocitrat-Lyase eine Sonde von 524 bp Länge verwendet (Abb. IV-4). Die Primer (siehe Tab. IV-1) für die Herstellung der Sonden enthielten zusätzlich einen T7-Promotor (CTAATACGACTCACTATAGGGAGA), der von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird (siehe Tab. III-8). Dieses stellte sicher, dass bei der ‚in vitro‘ Transkription aus der ‚antisense‘ RNA die entsprechende mRNA gebildet wurde.

Ergebnisse

Tabelle IV-1 Sequenzen der für die ‚Northern Blot‘ Analysen verwendete Sonden

Name	Sequenz
Sonde hyp. ORF	5'-GCGCTGTATACTGTACTACAACAGAAATATAAAAACATAAAAAGTGTCTATAAAA AAGGAGGTTATACAAATGAGCTTAAAAAGTCCGATGGAATTTTTTCAGAACGCTTCC GAAAAAACGTGCCCTGAATGCGGCGAAAAAGATGGAGGAGCAGGCTGAATCTTAC TTCATGGAATGCGAGCGCTGTCTTGCCAAAAAAGGCGAGTAGGCCAACTGTTTTAT AACAAAGCATGTAAAGGGGTAGGGAGACATGAAAAACAGAGGAGAAGAGAATTCA TATAACCGGATCGATAAATCCGCATTATGAAGAGATTTTGC AAAAGAGAAGCGATGG AGTTTATCGGACGTCTTGAACCTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'
Sonde Malat-Synthase	5'-CATGACGGAACATGGATCGCGCATCCCGGCATGATTCAAACGGCGCTCGATGTA TTCAATCAGCATATGCCGTCGGCGAACAGATTCATAGAAAAGCGGAAAGACGTAA AGGTCGAGGAAAAAGACTTGCTGGAAGTACCGAAAAGGCAGAATTACAGAAGCAGG CGTCCGTACCAATATCAGCGCCGGCATCCGCTATTTAGCTTCATGGCTGTCCGGCA GAGGCGCCGCTCCGATCGACCACTTAATGGAGGACGCTGCAACGGCGGAGATTTT CAGAGCCCAGCTGTGGCAATGGATTGCGCATCCGAAAAGGAGTTCTTGACGATGGCC GGAAAGTCACCGCGGAAATGGTCAAGATGATGAAAAGAGAAAAGAAATGCAGAAAA TCATCGATGAAGCAGGCGTGGAAACATTTTCGGAGCGGCCGTTTGAAGAGGCCGG ACAGTTATTTGAACAGCTGATTTTGGATGATGAATTCGCGGAGTTTCTAACGATAC CGGCTTATGAAAATATATACTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'
Sonde Isocitrat-Lyase	5'-GGGTTCTTCAAAAACAAAGCCTGGCCTTGATCAGGCGATTGCCAGAGGCTTGGC GTATGCGCGTATGCCGATTTGATCTGGTGTGAAACGCTGAGCCGAATATTGAAG AAGCCCGCGGTTTGCACAGGCGATCCATGAAAAATTTCCGGGCAAACCTGCTCGCC TACAACGTTCCTTCGTTCAACTGGAAGGCCAAACTGGATGACAACACGATCTT GAACTTCCAGAAAACAGCTCAGTGAATGGGCTATAAATTTCAATTTGTCCACTGG CGGGCTTCCACGCCTTAAATCACGGCATGTTTGAATTTGGCCGCAATATAAGCAC CGCGGAATGGCGCGTACTCTGATCTGCAGCAGGCGGAGTTTGCAGCGAAGTCCA CGGCTATACGGCGACAAGGCATCAGCGGAAGTCGGAACGAGCTACTTTGATGAA GTCGCCCAGGTTGTGACAGGCGGGACTTCATCAACCCTGCACTGAAAGGGATCGAC TGAAGCGGAACAGTTTCAATCATACTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'

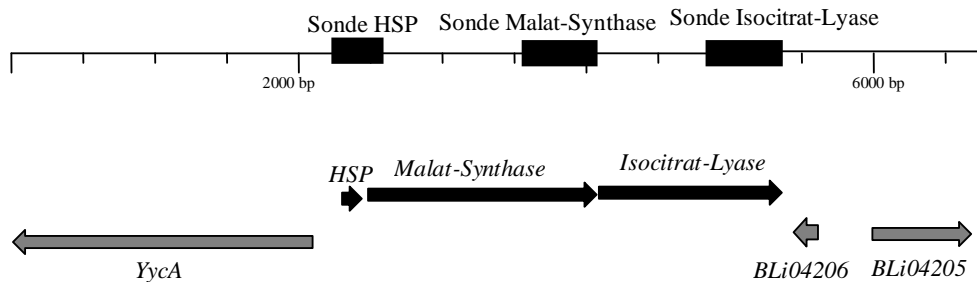


Abbildung IV-4 Schematische Darstellung der Lokalisation der gewählten Sonden innerhalb des Glyoxylat-Operons.

Die Ergebnisse der ‚Northern Blot‘ Analysen zeigten, dass das HSP, die Malat-Synthase und die Isocitrat-Lyase alle ein Signal auf derselben Höhe aufwiesen. Aufgrund des nicht hybridisierten Markers konnte die Größe des Transkripts nicht genau bestimmt werden, dennoch zeigten die ‚Northern Blot‘ Analysen deutlich, dass die drei Gene des Glyoxylatzyklus eine Größe des Transkripts aufweisen. Damit konnte bestätigt werden, dass die getesteten Gene alle auf einem Operon liegen (Abb. IV-5).

Ergebnisse

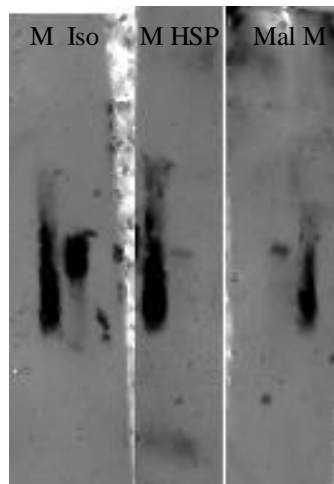


Abbildung IV-5 Darstellung der Ergebnisse der Northern Blot Analysen mit 1 µg RNA von in Minimalmedium mit 60 mM Acetat kultivierten *B. licheniformis* DSM13 Zellen. Mit M ist jeweils der Marker (Roche, DIG-RNA gelabelter MarkerII) dargestellt. Iso zeigt das erhaltene Transkript mit einer RNA-Sonde auf die Isocitrat-Lyase, HSP zeigt das erhaltene Transkript mit einer RNA-Sonde auf den sehr kleinen hypothetischen ORF und Mal zeigt das Transkript mit einer RNA-Sonde auf die Malat-Synthase.

Weitere Untersuchungen der Sequenz des Glyoxylat-Operons zeigten, dass eine GC-reiche Region, 11 bp hinter der Isocitrat-Lyase, zu finden war. Dabei könnte es sich um einen Terminator zum Abstoppen der Transkription des Glyoxylat-Operons handeln.

IV.1.3 Erstellen von Deletions-Mutanten der Gene des Glyoxylat-Operons

Nachdem die Transkripte des Glyoxylat-Operons untersucht worden sind und das Operon definiert werden konnte, galt das weitere Interesse der Funktion der einzelnen Gene innerhalb des Glyoxylat-Operons.

Für die Untersuchungen der Funktionen dieser Gene wurden mit Hilfe der gerichteten Mutagenese-Methode (Michael Rachinger, Dissertation, 2010) Deletions-Mutanten für die Gene der Isocitrat-Lyase (MW3del*Iso*), der Malat-Synthase (MW3del*Mal*), des HSP's ‚upstream‘ der Malat-Synthase (MW3del*HSP*) und des gesamten Glyoxylat-Operons (MW3del*Glyox*) konstruiert (Abb. IV-6; genaue Sequenzen siehe Anhang) und anschließend phänotypisch untersucht.

Ergebnisse

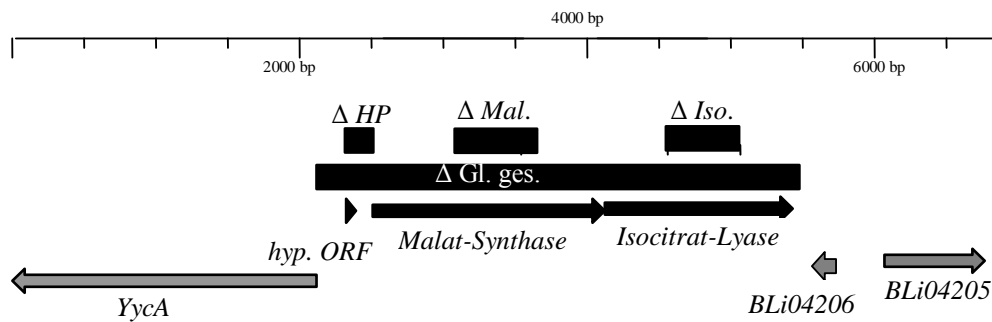


Abbildung IV-6A Physikalische Karte der Deletionen in der Region des Glyoxylat-Operons von *B. licheniformis* DSM13. Mit schwarzen Pfeilen sind die Gene des Glyoxylat-Operons, mit grauen Pfeilen die angrenzenden Gene dargestellt. Die Deletionen der einzelnen Gene sind mit schwarzen Kästen dargestellt.

```

1  ccatcgcttc tttgtcaaa atctcttcat aatgcggatt tatcgatccg gttatatgaa ttctcttctc
   L H R F F C Q N L F I M R I Y R S G Y M N S L L
                               520                               530

                               → Deletion HSP
Malat Synthase ←           -SD ←                               → HSP
71  ctctgttttc atgtctccct acccctttac atgctttggt ataaaacagt ttgcctactc gccttttttg
   L C F H V S L P L Y M L C Y K T V C L L A F F
                               540                               1

141  gcaagacagc gctcgcattc catgaagtaa gattcagcct gctcctccat cttttcgccg cattcagggc
   G K T A L A F H E V R F S L L L H L F A A F R
                               10                               20

                               Deletion HSP ← HSP ← → SD ←
211  acgttttttt cggaagcggt ctgaaaaatt ccatcggact tttcaagctc atttgataaa cctccttttt
   A R F F R K R S E K F H R T F Q A H L Y N L L F
   30                               40

                               Tr. Start ← → -10 ←
281  atagaacagt tttatgtttt atatttctgt tgtagtacag tatacagcgc aaaaatgaaa atgtacacac
   I E Q F Y V L Y F C C S T V Y S A K M K M Y T

351  ctttttccaa aaaatattta tttttttcca ttcaaacaaa aatagattgt
   P F S K K Y L F F S I Q T K I D C

```

Abbildung IV-6B Darstellung der Deletion des ‚hypothetical small proteins‘ (HSP). SD bezeichnet die Shine-Dalgarno Sequenz, HSP das ‚hypothetical small protein‘, Tr. Start den Transkriptionsstart und -10 die -10 Promotorregion.

Die Erstellung des jeweils benötigten Deletionskonstruktes erfolgte über die Technik des ‚GeneSOEing‘ (‚GeneSplicing by Overlap Extension‘; siehe III.2.6). Die Oligonukleotide für die PCR-Reaktionen (siehe Tab. III-4) wurden so ausgewählt, dass die Deletion ‚in frame‘ lag, um die Entstehung eines ‚frame shift‘ auszuschließen und um die ‚Stop-Codons‘ funktionell zu halten. Für die Erzeugung des Deletionskonstruktes für das HSP wurden mit

Ergebnisse

den Primern HP_FA_fwd_ *Bam*HI/ HP_FA_rev die 627 bp große Flanke A und mit den Primern HP_FB_fwd/ HP_FB_rev_ *Eco*RI die 606 bp große Flanke B erstellt. Für die Malat-Synthase wurden mit den Primern Mal_FA_fwd_2_ *Bam*HI/ Mal_FA_rev_2 die 1120 bp große Flanke A und mit den Primern Mal_FB_fwd_2/ Mal_FB_rev_2_ *Eco*RI die 783 bp große Flanke B erstellt. Für die Isocitrat-Lyase wurden mit den Primern Isoc_FA_fwd_ *Bam*HI/ Isoc_FA_rev eine 322 bp große Flanke A und mit den Primern Isoc_FB_fwd/ Isoc_FB_rev_ *Eco*RI eine 389 bp große Flanke B erstellt und für die Erzeugung der Deletion des gesamten Glyoxylat-Operons wurden mit den Primern Glyox_FA_fwd_ *Bam*HI/ Glyox_FA_rev die 766 bp große Flanke A und mit den Primern Glyox_FB_fwd/ Glyox_FB_rev_ *Eco*RI die 906 bp große Flanke B erstellt. Die jeweiligen Primer, FA_rev/ FB_fwd, wurden durch das Zufügen von Überhängen ‚revers komplementär‘ erstellt, so dass es durch eine weitere PCR möglich war, das jeweilige Deletionskonstrukt für die entsprechenden Gene zu erzeugen. Für die Deletion des HSP`s wurde ein Deletionskonstrukt von 1233 bp erzeugt, für die Malat-Synthase eines von 1903 bp, für die Isocitrat-Lyase eines von 711 bp und für die Deletion des gesamten Glyoxylat-Operons eines von 1672 bp. Das erhaltene Deletionskonstrukt wurde anschließend über die gewählten Restriktionsenzyme (*Bam*HI/ *Eco*RI) in das jeweilige Mutagenese-Plasmid (pMAD oder pKVM1) kloniert und der jeweilige Deletionsvektor dann in *B. licheniformis* MW3 (Meinhardt *et al.*, 2004) eingebracht. Für die Übertragung des Vektors wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Techniken verwendet. Zum einen wurde das Plasmid mit Hilfe der Protoplasten-Transformation (siehe III.2.8.2.1) übertragen (pMAD-Derivate) und zum anderen wurde es über den *E.coli* Stamm S17-1 nach *B. licheniformis* MW3 konjugiert (pKVM1-Derivate) (siehe III.2.8.2.2). Es folgten die Anzuchten auf die erste und zweite Rekombination, so dass am Ende die Deletions-Mutanten entstanden (siehe III.2.9). Der Nachweis der Deletion erfolgte durch eine Kontroll-PCR-Reaktion mit einem für das jeweilige Gen spezifischen chromosomalen Primerpaar, welches außerhalb der Flanken des Deletionskonstruktes liegt (HP_check_fwd/ HP_check_rev, Mal_check_fwd/ Mal_check_rev, Isoc_check_fwd/ Isoc_check_rev oder Glyox_check_fwd/ Glyox_check_rev; siehe Tab. III-4). Bei einer erfolgreichen Deletion erhält man für den Wildtyp eine im Agarosegel höher laufende PCR-Bande als für die Deletions-Mutanten, da durch die angewendete Methode ein Teil des Gens deletiert wurde. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten für die Deletions-Mutante des gesamten Glyoxylat-Operons ein um 3267 bp kleineres, für die Deletions-Mutante des HSP`s ein um 159 bp kleineres, für die Deletions-Mutante der Malat-Synthase ein um 621 bp

Ergebnisse

kleineres und für die Deletions-Mutante der Isocitrat-Lyase ein um 468 bp kleineres PCR-Produkt als der Ausgangsstamm (Abb. IV-7).

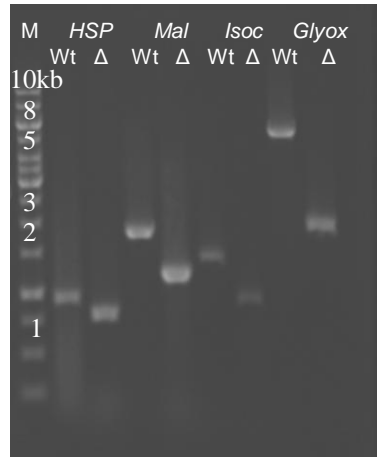


Abbildung IV-7 Darstellung der abschließenden PCR mit Primern außerhalb des zu deletierenden Gens. Es ist jeweils das PCR-Produkt für den Wildtyp *B. licheniformis* MW3 (Wt) und die erstellte Deletionsmutante (Δ) des entsprechenden Gens dargestellt. *HSP* steht für das ‚hypothetical small protein‘ ‚upstream‘ der Malat-Synthase, *Mal* für die Malat-Synthase, *Isoc* für die Isocitrat-Lyase und *Glyox* für das gesamte Glyoxylat-Operon.

Als Nachweis für den Erhalt der korrekten Deletion wurde das jeweils erhaltene PCR-Produkt sequenziert und anschließend über BLAST Analysen auf den Erhalt der korrekten Deletion überprüft. Die erhaltenen Sequenzen bestätigten den Erhalt der erwarteten Deletion für jede einzelne erzeugte Deletions-Mutante des Glyoxylat-Operons (siehe Anhang).

‚Southern Blot‘ Analysen mit einer plasmid-spezifischen Sonde auf die Erythromycin-Resistenz des Plasmids wurden durchgeführt, um den Verlust des Plasmids zu bestätigen. Die Sonde wurde über eine PCR-Reaktion mit DIG dNTP`s und den Primern pMAD_fwd/pMAD_rev erstellt. Als ‚Template‘ dienten 500 ng isoliertes Plasmid, pKVM1. Es wurde ein PCR-Produkt von 1091 bp Länge ohne DIG-Einbau und ein größeres Produkt mit DIG-Einbau erhalten, welches als Sonde für den Southern Blot verwendet wurde (Tab. IV-2).

Ergebnisse

Tabelle IV-2 Für die Southern Blots verwendete Sonde auf die Erythromycin-Resistenz von pKVM1 (bzw. pMAD).

Name	Sequenz
Sonde_Plasmid	5'-TCCTCTGGCCATTGCTCTGGGTTATAATCTCCTCCGTAACAAATTGAGGATA ACACATTCATAATTATCCCCCTAGCTAATTTTCGTTTAATTATAAAATTAAGTTAAAATT TAGGTACCTACGTAGGATCGATCCGATCCTTAATTATATTATAGTCCCAATATAATCATT TATCAACTCTTTTACACTTAAATTTCTAATATTGTAAATATTTTTTGAATAAAAAA TCTAGCTAATGTTACGTTACACATTAAGTACAGATCTATCGATGCATGCCATGGTAC CCGGGAGCTCGAATTCTAGAAGCTTCTGCAGACGCGTCGACGTCATATGGATCCGATAT CGCCCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTCCGGC-3'

Die Ergebnisse der ‚Southern Blot‘ Analysen zeigten bei allen erzeugten Deletions-Mutanten keine Signale für die Erythromycin-Resistenz des Plasmids. Die Negativkontrolle mit isolierter chromosomaler DNA des Wildtypstammes *B. licheniformis* MW3 zeigte ebenfalls kein Signal für die Erythromycinresistenz. Die Positivkontrolle mit dem isolierten Plasmid pKVM1 zeigte wie erwartet ein Signal. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten den Verlust des Plasmids in jeder erzeugten Deletions-Mutante (Abb. IV-8).

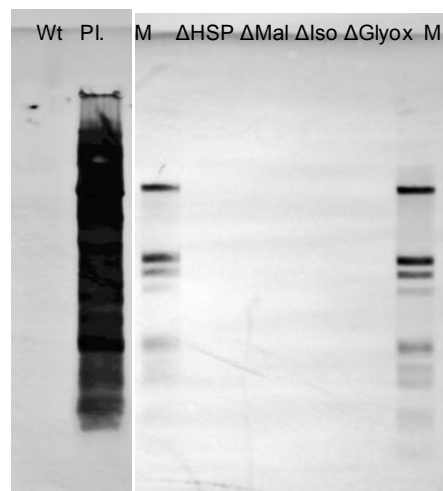


Abbildung IV-8 Darstellung des Southern Blot zur Überprüfung auf Verlust des Plasmids. Es wurden jeweils 1 µg RNA eingesetzt und mit der Sonde auf die Erythromycin-Resistenz (Primer für die Sondenherstellung: Erm_fwd/ Erm_rev) des Plasmids pKVM1 hybridisiert. Spur 1 zeigt das Ergebnis für den Wildtyp *B. licheniformis* DSM13 (Wt), Spur 2 den Wildtypstamm *B. licheniformis* MW3 mit dem Plasmid pKVM1 (Pl.), Spur 3 den ‚DNA Molecular Weight Marker III‘ (M), Spur 4 die Deletionsmutante des HSP's (Δ HSP), Spur 5 die Deletionsmutante der Malat-Synthase (Δ Mal), Spur 6 die Deletionsmutante der Isocitrat-Lyase (Δ Iso), Spur 7 die Deletionsmutante des gesamten Glyoxylat-Operons (Δ Glyox) und Spur 8 den ‚DNA Molecular Weight Marker III‘ (M).

IV.1.4 Phänotypische Charakterisierung der Deletions-Mutanten des Glyoxylat-Operons

Die Deletion der oben genannten Gene bedeutet für *B. licheniformis* DSM13 wahrscheinlich den Verlust seiner Fähigkeit Substrate, welche über C2-Metabolite abgebaut werden, als alleinige Kohlenstoffquellen nutzen zu können. Dies wurde mit Hilfe von phänotypischen Untersuchungen in Medien mit Substraten, welche über C2-Metabolite abgebaut werden als Kohlenstoffquellen analysiert, um die Funktion der entsprechenden Gene innerhalb eines Stoffwechselweges definieren zu können. Im Folgenden sind die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen für die konstruierten Deletions-Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm dargestellt.

Die Deletions-Mutanten wurden zunächst in 10 ml LB-Vorkultur bei 37°C in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben über Nacht angezogen und am folgenden Tag in die erste Passage in 10 ml Minimalmedium mit einer definierten Kohlenstoffquelle in einen neuen 100 ml Erlenmeyer-Kolben überimpft. Bei Wachstum in der ersten Passage erfolgte ein weiteres Überimpfen in die zweite Passage. Die Anzucht in Minimalmedium erfolgte bei der optimalen Wachstumstemperatur von 37-42°C und das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm überprüft. Das Wachstum der jeweiligen Deletions-Mutante wurde anschließend in einem Diagramm aufgetragen und mit dem Wachstum des Ausgangsstammes verglichen, welcher noch einen intakten Glyoxylatzyklus aufweist.

Aus Untersuchungen zum Glyoxylatzyklus ist bekannt, dass dieser die entsprechenden Organismen befähigt auf Substraten, die über C2-Körper abgebaut werden, wie höhere Fettsäuren, Acetat oder 2,3-Butandiol, zu wachsen (Bennett *et al.*, 1975). Deshalb wurde in einem ersten Experiment die Wachstumsfähigkeit der Deletions-Mutanten in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als einzige Kohlenstoffquelle untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 in der Lage war innerhalb von 48 Stunden auf eine OD₆₀₀ von 1,64 anzuwachsen. Die Deletions-Mutante des gesamten Glyoxylat-Operons (MW3delGlyox) zeigte lediglich eine OD₆₀₀ von höchstens 0,2 auf, wobei man nicht von Wachstum sprechen kann. Die Deletions-Mutanten der einzelnen Gene des Glyoxylat-Operons (MW3delMal, MW3delIso und MW3delHSP) wiesen höchstens eine OD₆₀₀ von 0,1 auf, wobei es sich wiederum um kein Wachstum handelt (Abb. IV-9). Diese Ergebnisse bestätigten, dass beim Fehlen der Gene des Glyoxylat-Zyklus Acetat nicht mehr als alleinige

Ergebnisse

Kohlenstoffquelle genutzt werden kann und dies wiederum bedeutet, dass der in *B. licheniformis* vorhandene Glyoxylatzyklus funktionell ist.

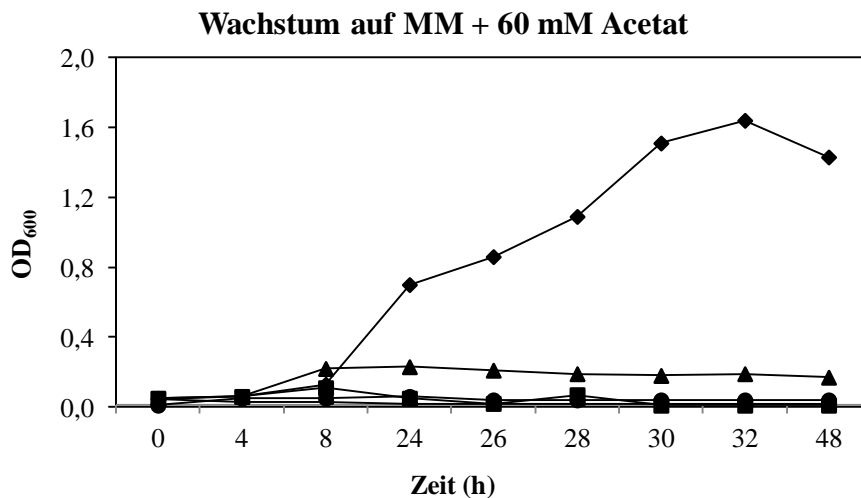


Abbildung IV-9 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten MW3delHP, MW3delMal und MW3delIso im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in MM + 60 mM Acetat. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (♦), der Deletionsstamm des gesamten Operons, MW3delGlyox (▲), der Deletionsstamm der Isocitrat-Lyase, MW3delIso (●), der Deletionsstamm der Malat-Synthase, MW3delMal (■) und der Deletionsstamm des ‚hypothetical small proteins‘, MW3delHSP (-).

Als weitere interessante über C2-Körper abgebaute Verbindungen, die ebenfalls als Endprodukte einer unvollständigen Oxidation oder Gärung durch *B. licheniformis* entstehen können, wurden Acetoin (23 mM) und 2,3-Butandiol (30 mM) als einzige Kohlenstoffquellen gewählt. Über deren Verwertung ist in *B. licheniformis* DSM13 bisher ebenfalls nichts bekannt. Untersuchungen in *B. subtilis* zeigten, dass Acetoin über das *aco*-Operon abgebaut wird. Für den Abbau von 2,3-Butandiol konnte in *B. subtilis* das Gen *ydjI* (*bdhA*) identifiziert werden, welches für eine Acetoin Reduktase/ 2,3-Butandiol Dehydrogenase kodiert (Nicholson, 2008). Der Abbau von Acetoin und 2,3-Butandiol in *B. licheniformis* DSM13 wird in dieser Arbeit genauer untersucht. Aber zunächst war der Abbau des Acetyl-CoA's von großem Interesse, welches vermutlich beim Abbau von Acetoin und 2,3-Butandiol entsteht.

Die Ergebnisse dieser Wachstumsexperimente ließen ein vergleichbares Ergebnis zu den Experimenten mit Acetat als einziger C-Quelle erkennen: Die Deletions-Mutanten des Glyoxylatzyklus waren im Gegensatz zu dem Ausgangsstamm alle nicht mehr in der Lage auf diesen beiden Substraten als einziger Kohlenstoff-Quelle zu wachsen (Abb. IV-10 und 11).

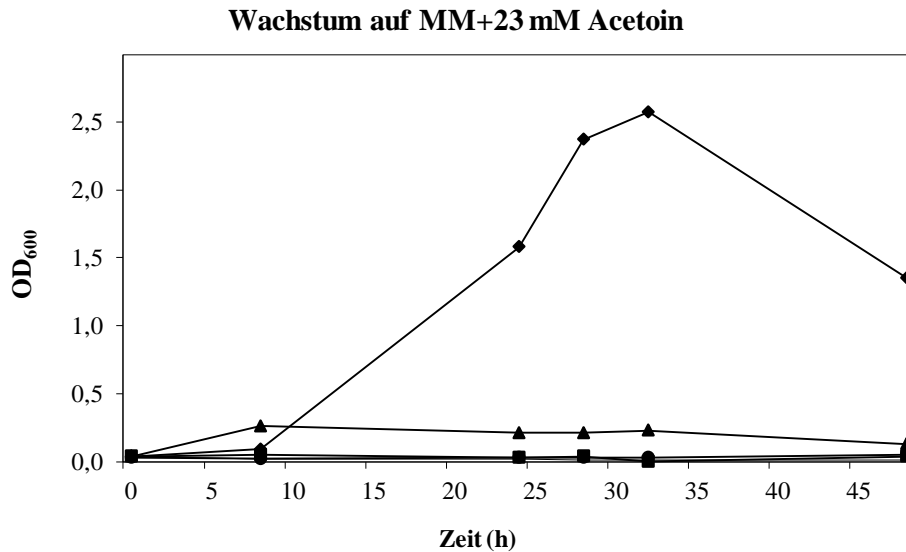


Abbildung IV-10 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten MW3delHP, MW3delMal und MW3delIso im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in MM + 23mM Acetoin. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (♦), der Deletionsstamm des gesamten Operons, MW3delGlyox (▲), der Deletionsstamm der Isocitrat-Lyase, MW3delIso (●), der Deletionsstamm der Malat-Synthase, MW3delMal (■) und der Deletionsstamm des ‚hypothetical small proteins‘, MW3delHSP (-).

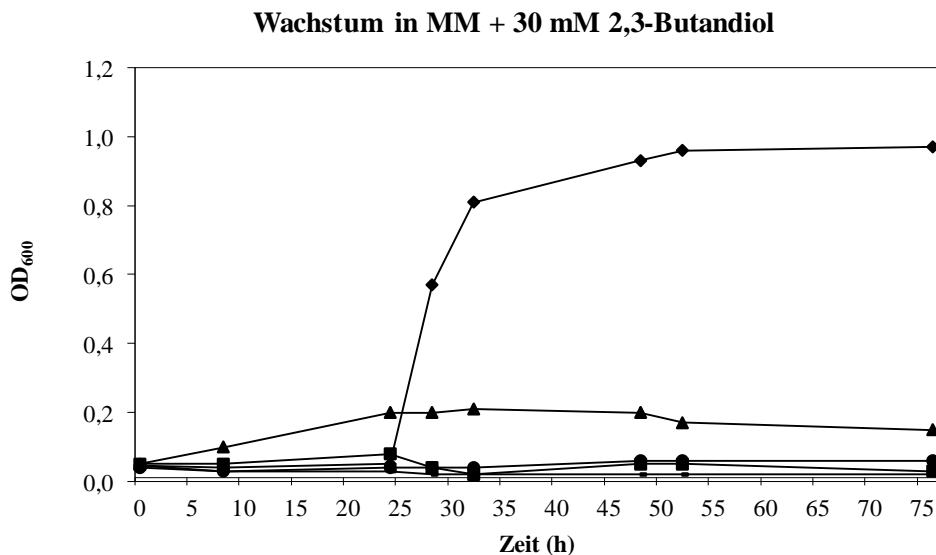


Abbildung IV-11 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten MW3delHP, MW3delMal und MW3delIso im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in MM + 30M 2,3-Butandiol. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (♦), der Deletionsstamm des gesamten Operons, MW3delGlyox (▲), der Deletionsstamm der Isocitrat-Lyase, MW3delIso (●), der Deletionsstamm der Malat-Synthase, MW3delMal (■) und der Deletionsstamm des ‚hypothetical small proteins‘, MW3delHSP (-).

Ergebnisse

Zur Überprüfung der Deletions-Mutanten auf ihre generelle Fähigkeit zu wachsen, wurden Substrate gewählt, die nicht über den Glyoxylatzyklus abgebaut werden (LB-Medium und Minimalmedium mit 50 mM Glukose). In LB-Medium wurden keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen den Deletions-Mutanten der Glyoxylatgene und dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 detektiert (Abb. IV-12).

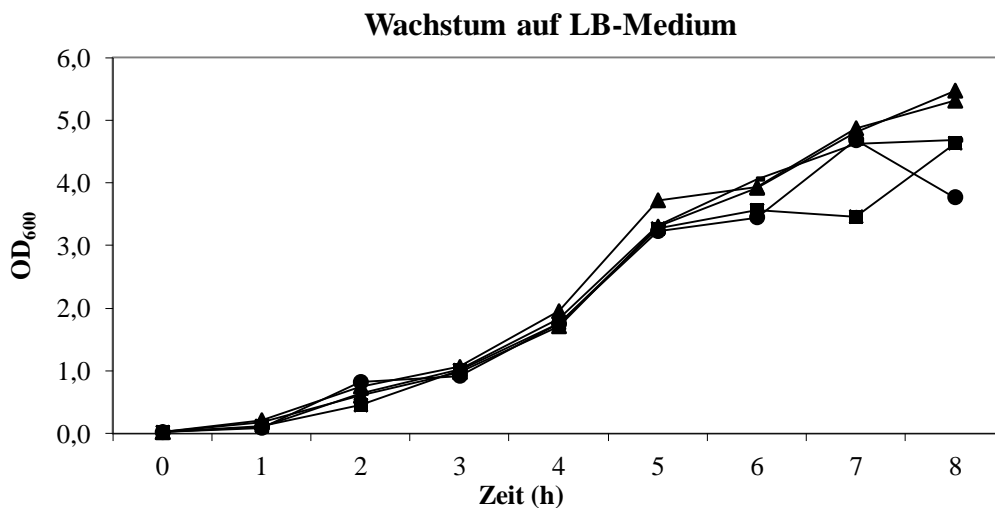


Abbildung IV-12 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten MW3delHP, MW3delMal und MW3delIso im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in LB-Medium. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (◆), der Deletionsstamm des gesamten Operons, MW3delGlyox (▲), der Deletionsstamm der Isocitrat-Lyase, MW3delIso (●), der Deletionsstamm der Malat-Synthase, MW3delMal (■) und der Deletionsstamm des ‚hypothetical small proteins‘, MW3delHSP (×).

In Minimalmedium mit 50 mM Glukose konnte für alle Deletions-Mutanten ein minimaler Wachstumsvorteil während der exponentiellen Phase detektiert werden. Dieser ist aber in der stationären Phase nicht mehr vorhanden, da die End-OD annähernd gleich ist (Abb. IV-13).

Ergebnisse

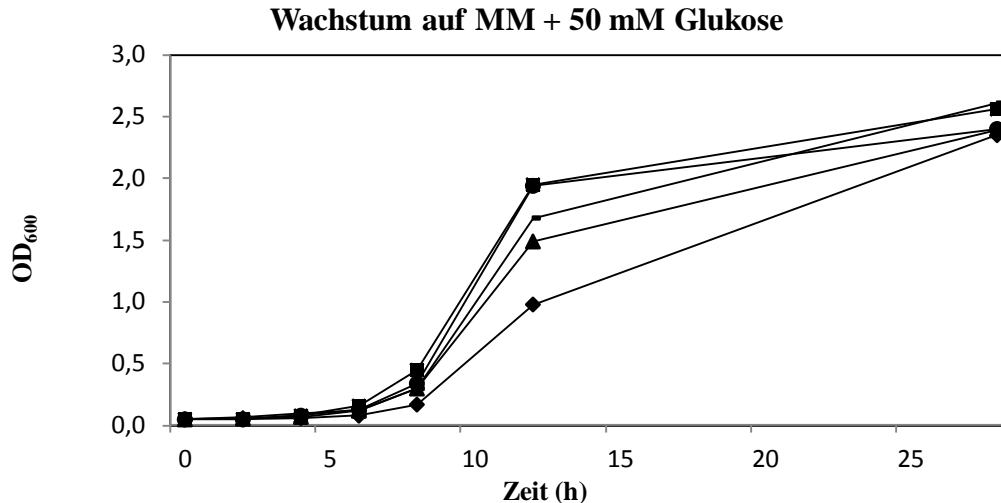


Abbildung IV-13 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten MW3delHP, MW3delMal und MW3delIso im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in MM+50mM Glukose. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (◆), der Deletionsstamm des gesamten Operons, MW3delGlyox (▲), der Deletionsstamm der Isocitrat-Lyase, MW3delIso (●), der Deletionsstamm der Malat-Synthase, MW3delMal (■) und der Deletionsstamm des ‚hypothetical small proteins‘, MW3delHSP (-).

Marco Schwarzer konnte in seiner Promotion über den Aminosäurestoffwechsel von *B. licheniformis* DSM13 zeigen, dass die Isocitrat-Lyase und die Malat-Synthase beim Wachstum der Zellen auf einem 7 Aminosäuremix am Ende der exponentiellen Phase eine erhöhte Expression aufwiesen als Zellen, welche in Glukose angezogen worden sind. Deshalb wurden die Deletions-Mutanten zur Überprüfung auf eine Beteiligung des Glyoxylatzyklus am Aminosäureabbau zusätzlich in Minimalmedium mit einem je 10 mM Aminosäuremix aus Alanin, Prolin, Arginin, Glutamat, Asparagin, Glutamin und Aspartat getestet. Diese sieben Aminosäuren können von *B. licheniformis* DSM13 sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle genutzt werden (Doktorarbeit von Marco Schwarzer, 2010). In diesem Medium konnte kein Unterschied im Wachstum der Deletions-Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 beobachtet werden (Abb. IV-14), wodurch eine direkte Beteiligung des Glyoxylatzyklus am Aminosäureabbau der getesteten Aminosäuren ausgeschlossen werden konnte.

Ergebnisse

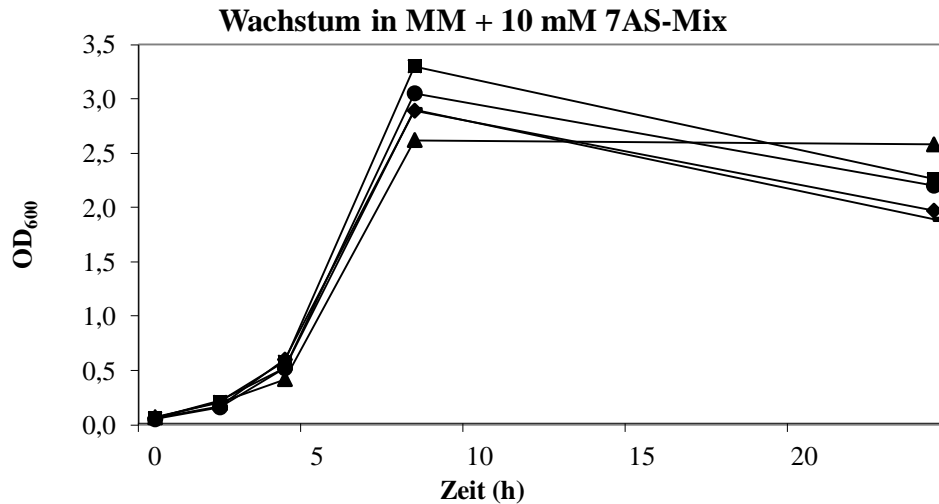


Abbildung IV-14 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten MW3delHP, MW3delMal und MW3delIso im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in MM+10 mM AS-Mix. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (◆), der Deletionsstamm des gesamten Operons, MW3delGlyox (▲), der Deletionsstamm der Isocitrat-Lyase, MW3delIso (●), der Deletionsstamm der Malat-Synthase, MW3delMal (■) und der Deletionsstamm des ‚hypothetical small proteins‘, MW3delHSP (-).

In der Doktorarbeit von Marco Schwarzer stellte sich heraus, dass während des Wachstums in einem aminosäurehaltigem Medium Acetat gebildet und anschließend wieder verwertet wird (Dissertation, Marco Schwarzer, 2010). Dies könnte möglicherweise die erhöhte Expression der Malat-Synthase und der Isocitrat-Lyase erklären. Deshalb wurde die Rolle des Glyoxylatzyklus bei der Verwertung des Acetats, in der von mir betreuten Bachelorarbeit von Frau Christiane Dieckmann, untersucht. Dafür wurde die Deletions-Mutante des gesamten Glyoxylat-Operons mit Hilfe von Transkriptions-Analysen charakterisiert. Die Expression der in diesem Medium benötigten Gene im Wildtyp und der Deletions-Mutante des gesamten Glyoxylat-Operons wurden verglichen. Dafür wurden die Zellen in Minimalmedium mit einem 10 mM AS-Mix kultiviert und für die RNA-Isolation in der späten stationären Phase geerntet. Die HPLC-Analysen von Marco Schwarzer zeigten, dass in dieser Phase das, während des Wachstums gebildete Acetat, verbraucht wird (Dissertation, Marco Schwarzer, 2010). Die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen zeigten, dass in einem Aminosäurehaltigem Medium die Gene des Glyoxylatzyklus nicht exprimiert werden. Die Gene des TCA-Zyklus waren aber in beiden Stämmen hochreguliert, was nahe legt, dass die Verwertung des gebildeten Acetats über den TCA Zyklus abläuft (Bachelorarbeit, Christiane Dieckmann, 2010). Diese Ergebnisse bestätigten nochmals, dass die Gene des Glyoxylatzyklus nicht an der Verwertung von Aminosäuren beteiligt ist.

Ergebnisse

Die erhöhte Expression der Gene des Glyoxylat-Operons und die Ergebnisse der Wachstumsexperimente in Minimalmedium mit einem 7AS-Mix und der ‚Microarray‘-Analysen zeigte, dass die Gene des Glyoxylatzyklus in Anwesenheit von Glukose vermutlich reprimiert werden.

IV.1.5 Untersuchungen zu dem ‚hypothetical small protein‘ des Glyoxylat-Operons

Mit Hilfe der phänotypischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das ‚hypothetical small proteins‘ ‚upstream‘ der Malat-Synthase essentiell für die Funktion des Glyoxylat-Operons ist. Dies könnte bedeuten, dass dieser an der Regulation dieses Zyklus beteiligt ist, wobei die Funktion solcher ‚small proteins‘ oder ‚sproteins‘ von weniger als 50 Aminosäuren Länge bislang sehr wenig untersucht sind (Hobbs *et. al.*, 2011).

Zunächst wurden Sequenzvergleiche dieses hypothetical small proteins mit Hilfe von TBLASTN Analysen durchgeführt, um ein Vorkommen von Orthologen in weiteren Prokaryonten zu identifizieren. Die ersten Ergebnisse der BLAST Analysen konnten die Existenz eines hochkonservierten orthologen ORF`s (87 % Identität) ‚upstream‘ der Isocitrat-Lyase von *B. clausii* aufzeigen (Abb. IV-16A+B). Das Gen für die Malat-Synthase *G* ist in *B. clausii* an einer anderen Stelle im Genom ‚downstream‘ der Isocitrat-Lyase lokalisiert und nicht direkt hinter der Isocitrat-Lyase, wie in *B. licheniformis* DSM13.

```
B. licheniformis MSLKSPMEFFRTLPLPKKTCPECGEKMEEQAESYFMECERCLAKKGE
B. clausii       MSLKNPIDFYRTLPRKTCPECGEQMEEQAESYFMECERCLAKKGE
                **** * * **** *****
Identische AS    MSLK P F R TLP KTCPECGE MEEQAESYFMECERCLAKKGE
```

Abbildung IV-15A Ergebnis des Alignments des HSP's ‚upstream‘ der Malat-Synthase im Genom von *B. licheniformis* DSM13 mit dem Genom von *B. clausii*. Ein Homolog zu dem HSP aus *B. licheniformis* DSM13 konnte mit einer Identität von 87% ‚upstream‘ der Isocitrat-Lyase identifiziert werden. Mit * sind die identischen Aminosäuren in *B. clausii* dargestellt.

Ergebnisse

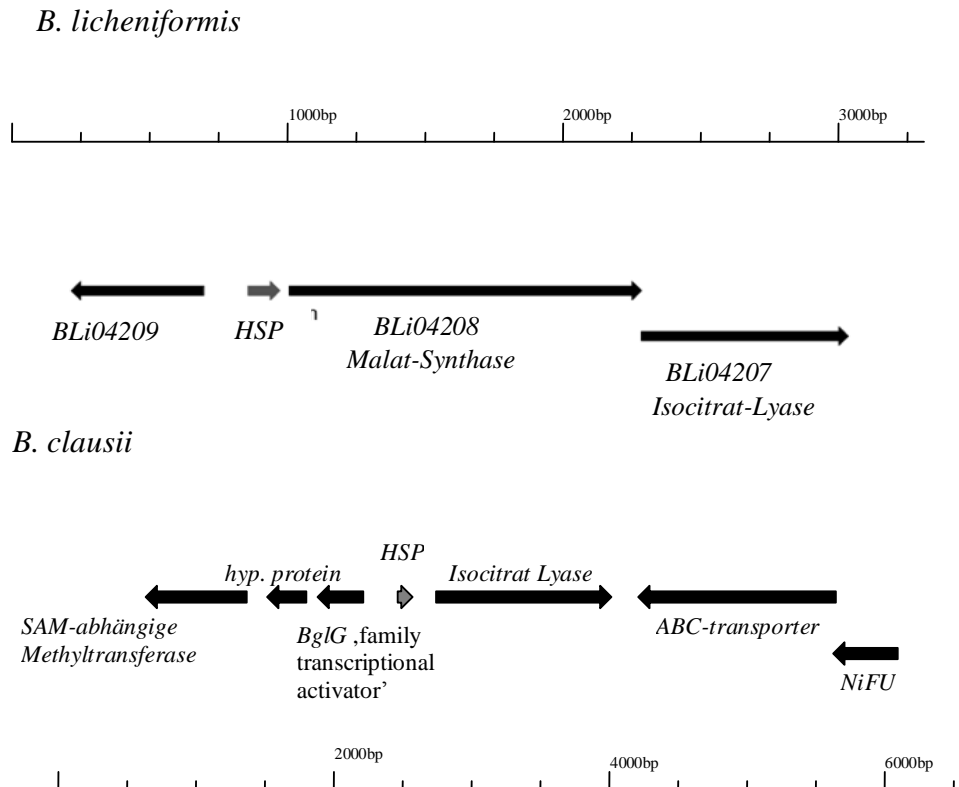


Abbildung IV-15B Schematische Darstellung der Lokalisation des HSP's ,upstream' der Malat-Synthase im Genom von *B. licheniformis* DSM13 (oben) und ,upstream' der Isocitrat-Lyase von *B. clausii* (unten).

Die genomweiten Vergleiche dieses HSP's zeigten außerdem das Vorkommen von weiteren homologen Sequenzen dieses HSP's in weiteren Prokaryonten. Auffällig dabei war, dass die Orthologen hauptsächlich in unterschiedlichen *Bacillus* Stämmen zu finden waren (Tab. IV-3). Dies könnte ebenfalls für eine neue Art der Regulation durch die HSP's speziell in *Bacillen* sprechen. Die Orthologen in den *Bacillen* sind aber nicht ausschließlich an den Glyoxylatzyklus gebunden. Sie existieren in vielen unterschiedlichen genetischen Zusammenhängen (siehe Tab. IV-4). Diese Tatsache spricht dafür, dass eine mögliche Regulation durch Orthologe des HSP's nicht spezifisch auf den Glyoxylatzyklus beschränkt ist, sondern globaler erfolgen könnte. Dies wäre eine absolute Neuheit in der Regulation von prokaryotischen Genen.

Ergebnisse

Tabelle IV-3 Darstellung der Ergebnisse zu den genomweiten Vergleichen mit Hilfe von TBLASTN. ‚Max. Score‘ gibt den normalisierten Wert für die lokale Sequenzübereinstimmung an; ‚total Score‘ gibt alle Werte für die Sequenzübereinstimmung an; ‚Query coverage‘ gibt die Länge der Übereinstimmenden Sequenzen mit der Suchsequenz in Prozent an; ‚Max. identity‘ gibt die höchste Übereinstimmung der Sequenzübereinstimmungen in Prozent an. Orthologe des kleinen ORF`s des Glyoxylatzyklus von *B. licheniformis* DSM13 konnten hauptsächlich für unterschiedliche *Bacillus* Stämme identifiziert werden.

Bakterienstamm	‚Max. Score‘	‚Total Score‘	‚Query coverage‘	‚Max. Identity‘
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580, komplettes Genom	90.1	131	100%	100%
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13, komplettes Genom	90.1	131	100%	100%
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 DNA, komplettes Genom	85.1	85.1	100%	86%
<i>Bacillus cereus</i> AH820, komplettes Genom	50.8	50.8	84%	50%
<i>Bacillus anthracis str.</i> Ames, komplettes Genom	50.1	50.1	84%	50%
<i>Bacillus thuringiensis serovar konkukian str.</i> 97-27, komplettes Genom	50.1	50.1	84%	50%
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4, komplettes Genom	48.5	48.5	84%	50%
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41, komplettes Genom	48.1	48.1	82%	56%

Bei näherer Betrachtung der Proteinsequenzen zeigte sich, dass Homologe zu den HSP`s besonders für die Bakterien *B. licheniformis* und *B. subtilis* und für *B. cereus* AH820, *B. anthracis str.* Ames und *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 hochkonserviert sind. Bei einem globalen Vergleich der Sequenzen des HSP`s fiel auf, dass in vielen *Bacillen* in einem konservierten Muster vier Cysteine enthalten sind, welche eine wichtige Rolle für die mögliche Funktion des HSP`s darstellen könnten.

Ergebnisse

Tabelle IV-4 Darstellung der BLAST Analysen des potentiellen HSP`s mit anderen *Bacillus* Stämmen. Die Orthologen des HSP`s in den unterschiedlichen *Bacillus* Stämmen sind in unterschiedlichen Zusammenhängen lokalisiert. Dargestellt sind die Alignments der Orthologen mit der Sequenz des HSP`s aus *B. licheniformis* DSM13. Ähnliche Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Proteinsequenzen des HSP`s in allen *Bacillen* vier Cysteine aufweisen und hochkonserviert sind.

Stamm/ Gen-ID/ Genzusammenhang	Sequenz
<i>B. licheniformis</i> DSM13/ int. Region BLi04208- BLi04209/ YycA, malate synthase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE
<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580/ ATCC:14580/ Hyp. protein, isocitrate-lyase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE *****
<i>B. licheniformis</i> DSM13/ int. Region BLi04208- BLi04209/ YycA, malate synthase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 DNA/ int. Region ABC2972-ABC2973/ BglG family transc. Antiterm. ‚Isocitrate lyase‘	MSLKNPIDFYRTL PPKT C PECGEQMEEQAES YFM E CER C LAKKGE **** * * *****
<i>B. licheniformis</i> DSM13/ int. Region BLi04208- BLi04209/ YycA, malate synthase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE
<i>Bacillus cereus</i> AH820/ BCAH820_1165/ sugar-binding transcriptional regulator, LacI family metallo-beta-lactamase family protein	IDQPMEFFRNLPK T CAHCGKEI DEQHEAYHN K CD D CV ***** ** * * * * * * * * * *
<i>B. licheniformis</i> DSM13/ int. Region BLi04208- BLi04209/ YycA, malate synthase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE
<i>Bacillus anthracis str. Ames</i> / GBAA1087/ acetyltransferase, GNAT family metallo- beta-lactamase family protein	IDQPMEFFRNLPK T CAHCGKEI DEQHEAYHN K CD D CV ***** ** * * * * * * * * * *
<i>B. licheniformis</i> DSM13/ int. Region BLi04208- BLi04209/ YycA, malate synthase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4/ BcerKBAB4_1004/ transcriptional regulator, LacI family beta-lactamase domain protein	IDQPMEFFRNLPK T CAHCGKEI DEQHEAYHN K CD D CV ***** ** * * * * * * * * * *
<i>B. licheniformis</i> DSM13/ int. Region BLi04208- BLi04209/ YycA, malate synthase	MSLKSPMEFFRTL PPKT C PECGEKMEEQAES YFM E CER C LAKKGE
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41/ Bsph_0420/ conserved hypothetical protein Probable lipote-protein ligase A	LENVVEFFKNLPA K Q C TECGEKIEEQSECYSNT C E K * ** * * * * * * * * * * * *

IV.1.6 Komplementations-Experimente für die Definition der Funktion des HSP`s des Glyoxylatzyklus

Um erste Informationen über die Funktion des HSP`s zu erhalten, beschäftigten sich weitere Untersuchungen zum Glyoxylatzyklus mit der Komplementation der einzelnen Gene in den entsprechenden Deletions-Mutanten. Ein besonderes Interesse galt dabei vor allem den Mutanten des HSP`s ‚upstream‘ der Malat-Synthase und der Deletion des gesamten Glyoxylat-Operons.

Mit Hilfe von Expressionvektoren sollten die entsprechenden Gene in dem jeweiligen Deletionsstamm ‚in trans‘ komplementiert werden.

IV.1.6.1 Konstruktion der Expressionsvektoren für die Komplementation des HSP`s

In *B. subtilis* wird häufig der Shuttle-Vektor pDG148*stu* (Joseph *et al.*, 2001) als Expressionsvektor genutzt. Dieser Vektor enthält einen IPTG-induzierbaren Promotor P_{Spac}, den *lac* Repressor von *E. coli*, *lacI*, den ‚Origin of transfer‘, *oriT*, ein Kanamycinresistenz-Gen, *kan*, eine Bleomycinresistenz-Gen, *ble* und ein Ampicillin-Resistenz-Gen, *bla*. Aufgrund des induzierbaren Promotors P_{Spac} kann er für die Expression individueller Gene genutzt werden, welche als Insert hinter den Promotor kloniert werden können. In dieser Arbeit diente dieser bekannte Expressionsvektor als Grundlage für die Experimente für die Komplementation und Überexpression ausgewählter Glyoxylat-Gene.

Für die Anwendung in *B. licheniformis* DSM13 musste der Vektor zunächst konjugationsfähig gemacht werden. Dafür wurden aus dem Mutagenesevektor pKVM1 der *oriT* und das *traJ* Gen per PCR mit den Primern *oriT_TraJ_fwd_PciI* und *oriT_TraJ_rev_BamHI* (siehe Tab. III-5) amplifiziert und über die Schnittstellen *PciI*/ *BamHI* in den pDG148*stu* kloniert. Der erhaltene pDG148*oriT* wurde dann, nach einem erfolgreichen Test auf die Fähigkeit zur Konjugation, für die weiteren Konstruktionen genutzt (Abb. IV-16).

Ergebnisse

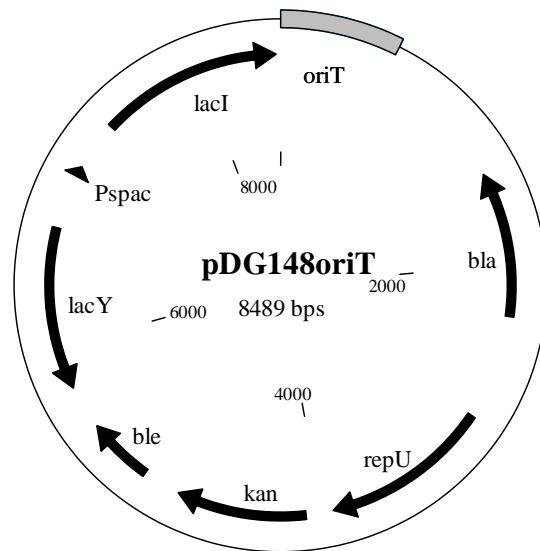


Abbildung IV-16 Plasmidkarte von pDG148oriT. Der Expressionsvektor enthält einen IPTG-induzierbaren Promotor P_{Spac}, den lac Repressor von *E. coli lacI*, den ‚Origin of transfer‘ *oriT*, eine Kanamycinresistenz *kan*, eine Bleomycinresistenz *ble* und eine Ampicillinresistenz *bla*.

Von großem Interesse waren zunächst die Untersuchungen zu dem HSP ‚upstream‘ der Malat-Synthase. Dafür wurden mit spezifischen Primern verschiedene Genbereiche des HSP`s aus *B. licheniformis* DSM13 per PCR amplifiziert (Abb. IV-18). Für die PCR-Reaktion mit 100 ng *B. licheniformis* DSM13 DNA als ‚Template‘ für die Erstellung des OE_1-Produktes wurden die Primer HP_OE_fwd/ HP_OE_rev, für das OE_2-Produkt die Primer HP_OE_2_fwd/ HP_OE_2_rev und für das OE_3-Produkt die Primer HP_OE_1_fwd/ HP_OE_2_rev verwendet (siehe Tab. III-5; Abb. IV-17). Das erhaltene Produkt wurde über die Schnittstellen *XbaI*/ *SalI* als Insert in den Vektor *pDG148oriT* (Abb. IV-16) kloniert und das jeweilige Expressions-Plasmid *pDG148oriTHP* (Abb. IV-18) erhalten.

Ergebnisse

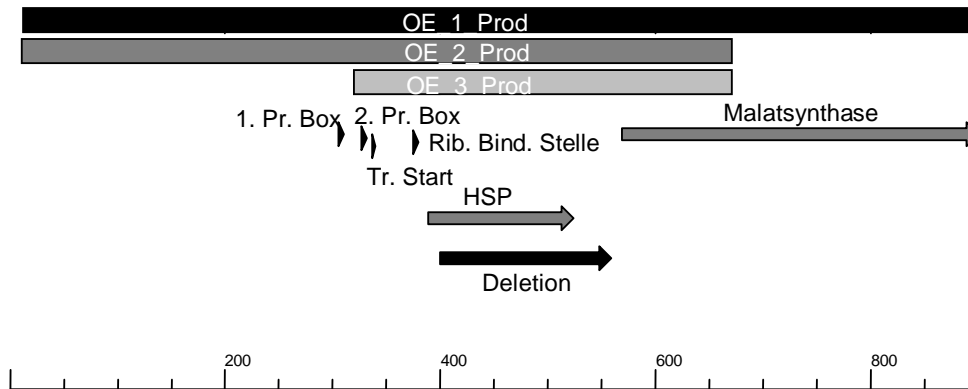


Abbildung IV-17 Darstellung der verschiedenen Kombinationen des ‚hypothetical small proteins‘ für die Erstellung des Expressionsvektors. OE_1_Prod beinhaltet den vollständigen Promotorbereich und die vollständige Malat-Synthase (Primer: HP_1_fwd/HP_1_rev), OE_2_Prod enthält lediglich die zweite Promotorbox (1. Box fehlt) und einen Bruchteil der Malat-Synthase (HP_OE_2_fwd/HP_OE_2_rev) und OE_3_Prod enthält den vollständigen Promotorbereich und einen Bruchteil der Malat-Synthase (HP_OE_1_fwd/HP_OE_2_rev).

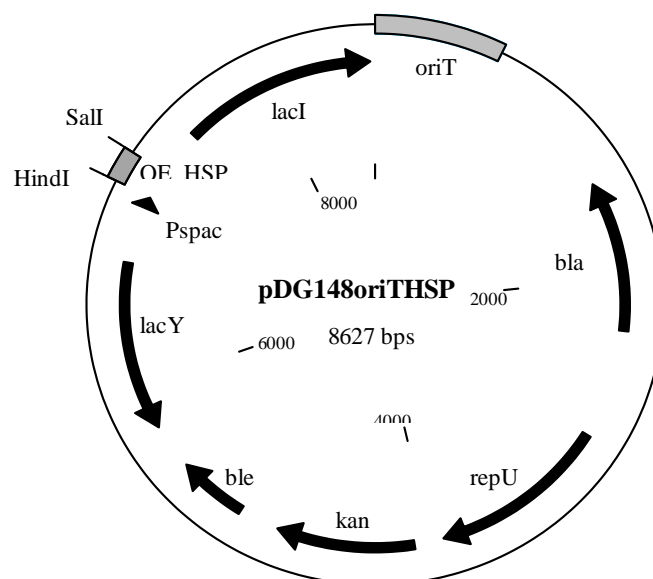


Abbildung IV-18 Plasmidkarte des Expressionsvektors für die Komplementation des sehr kleinen hypothetischen Proteins ‚upstream‘ der Malat-Synthase. Die jeweiligen Produkte zur Komplementation des hypothetischen ORF's (HP) wurden hinter den induzierbaren Promotor P_{Spac} kloniert.

Ergebnisse

IV.1.6.2 Wachstumsexperimente zur Untersuchung der Komplementation und Überexpression des HSP`s

Nach der Erstellung der entsprechenden Expressions-Vektoren wurden diese in den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delHP konjugiert, per PCR auf Erhalt des korrekten Plasmids überprüft und anschließend Wachstumsexperimente in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als einzige Kohlenstoffquelle durchgeführt, um die Komplementation der Deletion sehen zu können.

Der Nachweis des Erhalts des Expressionsvektors in *B. licheniformis* MW3 erfolgte über eine PCR Reaktion mit den Primern pDG148_fwd/ rev (siehe Tab. III-5). Der Erhalt des erwarteten PCR-Produktes bestätigte das Vorhandensein des Expressionsvektors mit den jeweiligen Konstrukten des sehr kleinen hypothetischen ORF`s in den getesteten Konjuganten. Das Konstrukt OE_HSP3 hat eine Größe von 660 bp, das OE_HSP2 Konstrukt eine Größe von 351 und das OE_HSP1 Konstrukt eine Größe von 889 bp.

Zur Untersuchung der Komplementation wurden die einzelnen Stämme mit den unterschiedlichen Expressionsvektoren für das HSP ‚upstream‘ der Malat-Synthase in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als einzige Kohlenstoffquelle angezogen und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Die Ergebnisse zeigten ausschließlich für den Stamm mit dem Expressionsplasmid, welches das Konstrukt OE_HSP1 trug, ein wiedererlangtes Wachstum. Die anderen drei Stämme mit den Expressionsplasmiden pDG148oriTHSP2 und pDG148oriTHSP3 zeigten, wie der Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delHSP keinerlei Wachstum und damit auch keine Fähigkeit zur Komplementation des Deletionsstammes MW3delHSP (Abb. IV-19).

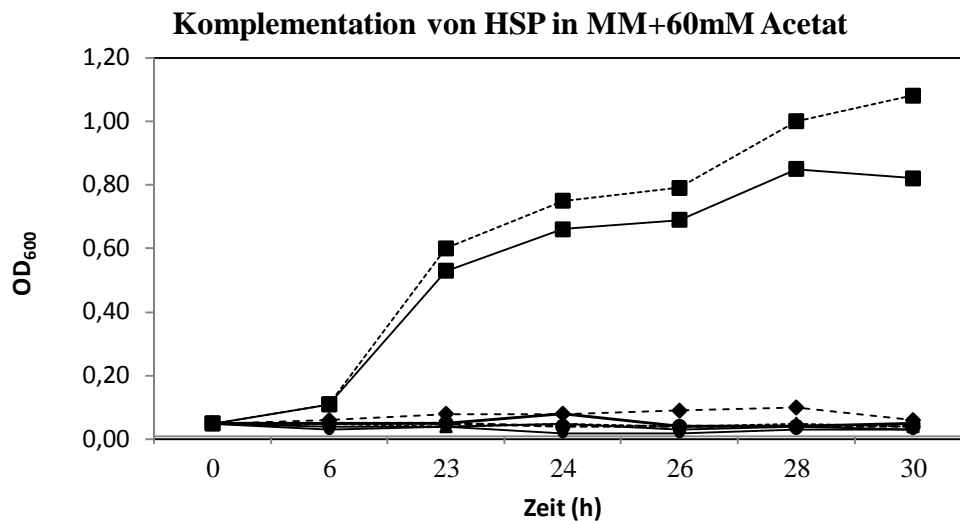


Abbildung IV-19 Darstellung der Komplementations-Wachstumsexperimente des Deletionsstammes MW3delHSP. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Mit ♦ dargestellt ist das Wachstum für den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delHSP, mit ■ dargestellt ist das Wachstum für den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delHSP mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP1, mit ● dargestellt ist das Wachstum für den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delHSP mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP2 und mit ▲ dargestellt ist das Wachstum für den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delHSP mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP3. Die durchgezogenen Linien zeigen das Wachstum ohne Induktion mit IPTG und die gestrichelten Linien zeigen das Wachstum mit 1 mM IPTG.

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Komplementations-Wachstumsexperimente wurde aus den Anzucht-Kulturen DNA isoliert und diese per PCR mit den Primern HSP_check_fwd/ HSP_check_rev (siehe Material und Methoden, Tab. III-4) auf das Vorhandensein der Deletion in dem verwendeten Stamm überprüft.

Anhand der Ergebnisse dieser Überprüfung konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion in der Kultur, welche vermeintlich eine Komplementation zeigte, nicht mehr vorhanden war. In den anderen getesteten Stämmen mit den entsprechenden Expressionsvektoren war die Deletion zwar noch vorhanden, es fand aber keine Komplementation statt (Abb. IV-20). Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass es nicht möglich war das HSP zu komplementieren. Es scheint aber eine entscheidende Rolle für die Funktion des Glyoxylat-Operons darzustellen.

Ergebnisse

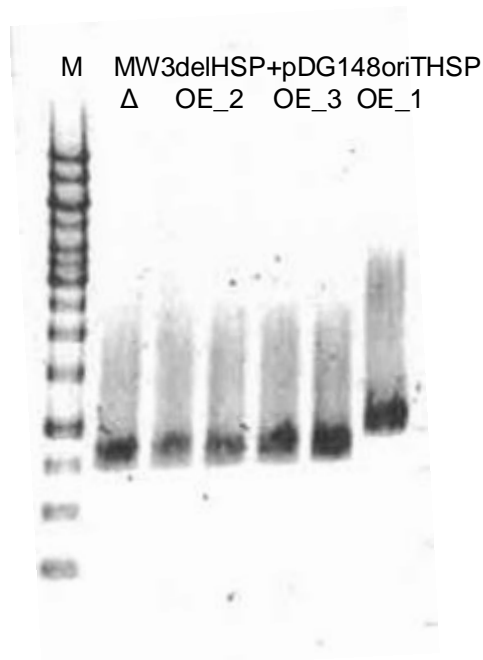


Abbildung IV-20 Darstellung der Ergebnisse der PCR mit 100 ng isolierter DNA aus den komplementierten Stämmen wurde mit den Primern pDG148_fwd/ pDG148_rev durchgeführt. Diese PCR diente der Überprüfung auf das Vorhandensein der HSP-Deletion in den komplementierten Stämmen. M steht für den 1 kb Marker, Δ für das PCR-Produkt des Deletionsstammes *B. licheniformis* MW3delHSP, es folgen die PCR-Produkte für den Deletionsstamm mit dem jeweiligen Expressionsplasmid pDG148oriTOEHSP_2,3 und 1 nach der Anzucht für die Komplementation.

Zur weiteren Untersuchung des HSP`s wurden zusätzlich Überexpressionsversuche mit den erstellten Expressionsplasmiden durchgeführt. Dafür wurden diese in den *B. licheniformis* MW3 Stamm konjugiert, welcher das intakte Glyoxylat-Operon besitzt. Mit diesem Experiment sollte getestet werden, ob eine Überexpression des hypothetischen ORF`s eine Auswirkung auf das Wachstum von *B. licheniformis* hat. Dafür wurden die plasmidhaltigen Stämme in Minimalmedium mit 60 mM Acetat (Abb. IV-21) und auch in Minimalmedium mit 50 mM Glukose (Abb. IV-22) angezogen.

Die Anzucht in Minimalmedium mit 60 mM Acetat wurde für die Überexpression gewählt, da das Glyoxylat-Operon unter diesen Bedingungen induziert wird und mit einer Überexpression des hypothetischen ORF`s eine Verbesserung des Wachstums für die Stämme mit den Expressionsvektoren zu erwarten gewesen wäre. Es wurde ein leichter Wachstumsnachteil für die Stämme mit den Expressionsvektoren und den HP2 und HP3-Konstrukten detektiert, welche aber nicht signifikant waren. Es war auch keine Veränderung bei einer Induktion des Promotors mit 1 mM IPTG nachzuweisen (Abb. IV-21).

Ergebnisse

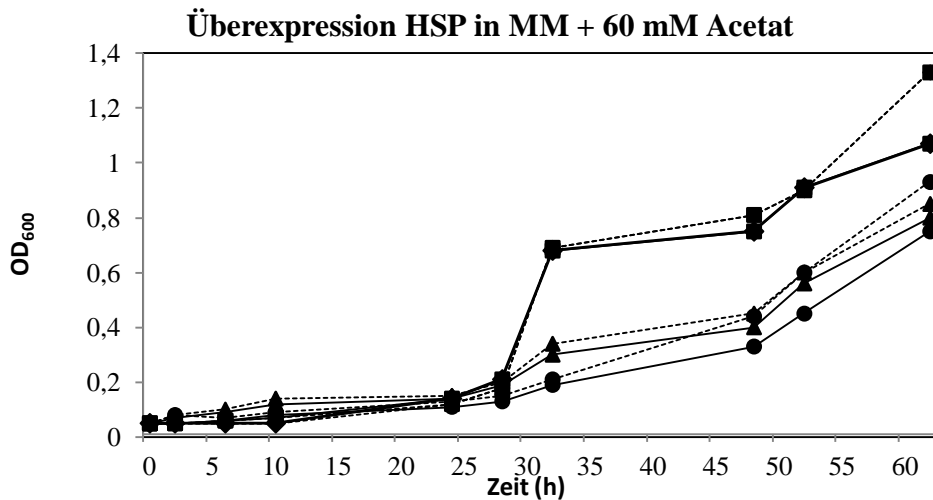


Abbildung IV-21 Darstellung der Überexpressions-Wachstumsexperimente in MM + 60 mM Acetat. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Mit ◆ dargestellt ist das Wachstum für den Wildtyp *B. licheniformis* MW3, mit ■ dargestellt ist das Wachstum für den *B. licheniformis* MW3 mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP1, mit ● dargestellt ist das Wachstum für den *B. licheniformis* MW3 mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP2 und mit ▲ dargestellt ist das Wachstum für den *B. licheniformis* MW3delHSP mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP3. Die durchgezogenen Linien zeigen das Wachstum ohne Induktion mit IPTG und die gestrichelten Linien zeigen das Wachstum mit 1 mM IPTG.

In einem zweiten Überexpressionsversuch wurden die Stämme in Minimalmedium mit 50 mM Glukose angezogen. Wie die Transkriptionsanalysen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Frau Christiane Dieckmann (2010) zeigten, wird das Glyoxylat-Operon unter diesen Bedingungen reprimiert. Für die Wachstumsexperimente in diesem Medium wurde vermutet, dass eine Überexpression des sehr kleinen hypothetischen ORF`s zu einem veränderten Wachstum führen könnte. Im Vergleich zum *B. licheniformis* Stamm MW3 war lediglich eine sehr schwache Verminderung des Wachstums der Stämme mit den Expressionsplasmiden zu erkennen, die aber nicht signifikant waren. Es war erneut keine Einwirkung des IPTG`s auf das Wachstumsverhalten zu sehen (Abb. IV-22), wodurch bestätigt wurde, dass die Überexpression des kleinen ORF`s in dem hier durchgeführten Versuch keine Wirkung zeigte.

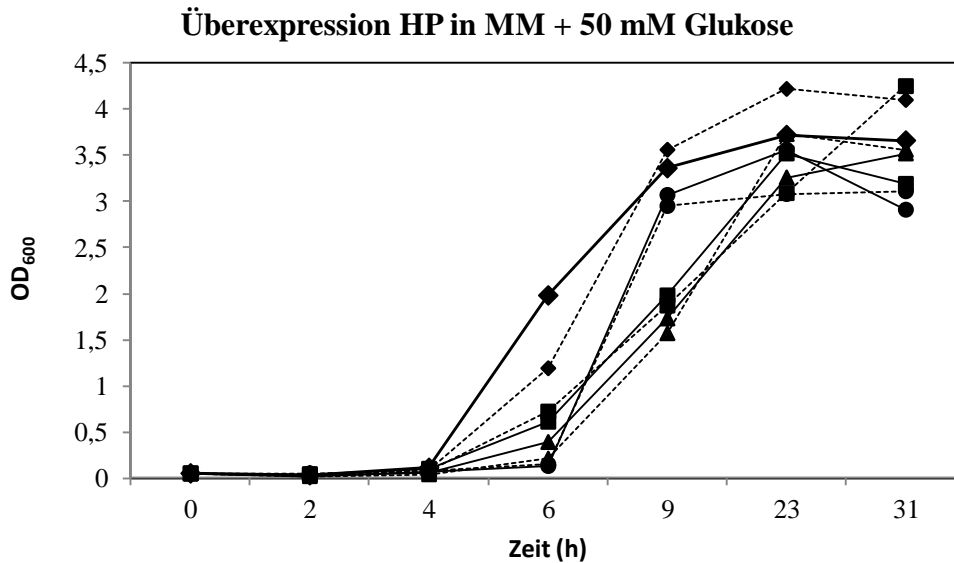


Abbildung IV-22 Darstellung der Überexpressions-Wachstumsexperimente in MM+50mM Glukose. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm. Mit ◆ dargestellt ist das Wachstum für den Wildtyp *B. licheniformis* MW3, mit ■ dargestellt ist das Wachstum für den *B. licheniformis* MW3 mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP1, mit ● dargestellt ist das Wachstum für den *B. licheniformis* MW3 mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP2 und mit ▲ dargestellt ist das Wachstum für den *B. licheniformis* MW3delHSP mit dem Expressionsplasmid pDG148oriTHSP3. Die durchgezogenen Linien zeigen das Wachstum ohne Induktion mit IPTG und die gestrichelten Linien zeigen das Wachstum mit 1 mM IPTG.

IV.1.7 Komplementation des gesamten Glyoxylat-Operons

IV.1.7.1 Erstellen des Expressionsvektors für das gesamte Glyoxylat-Operon

Für weitere Komplementationsversuche sollte in der von mir betreuten Bachelorarbeit ein Vektor erstellt werden, welcher ein Insert des gesamten Glyoxylat-Operons enthält (Christiane Dieckmann, 2010). Dieser Vektor sollte es ermöglichen, die Deletions-Mutante des gesamten Glyoxylat-Operons zu komplementieren und *B. subtilis* durch Einbringen dieses Vektors dazu zu befähigen Acetat als alleinige Kohlenstoff-Quelle zu nutzen. Für die Konstruktion dieses Komplementations-Vektors wurde das gesamte Glyoxylat-Operon aus dem Chromosom von *B. licheniformis* MW3 mit den Primern (OE_Glyox_fwd_XbaI/OE_Glyox_rev_XbaI; siehe Tab. III-5) amplifiziert und über die Schnittstelle *XbaI* in den Vektor pDG148oriT kloniert. Daraus resultierte der Expressionsvektor pDG148oriTGlyox (Abb. IV-23).

Ergebnisse

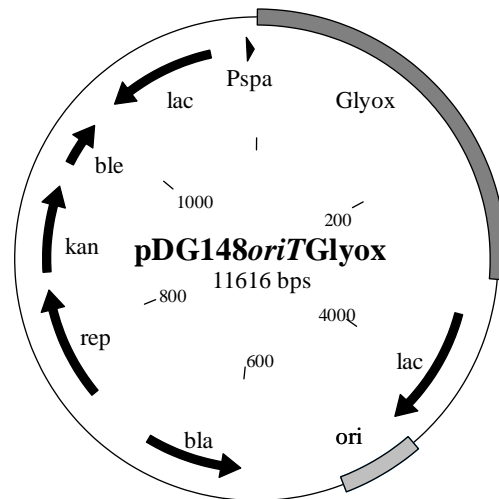


Abbildung IV-23 Plasmidkarte des Expressionsvektors für die Komplementation des gesamten Glyoxylat-Operons. (aus der Bachelorarbeit Dieckmann, 2010) Das gesamte Glyoxylat-Operon wurde mit den Primern OE_Glyox_fwd_XbaI/ OE_Glyox_rev_XbaI aus *B. licheniformis* DSM13 amplifiziert und über die Schnittstelle XbaI hinter den P_{Spac} in den Vektor pDG148oriT kloniert.

Der Erhalt des Glyoxylat-Konstruktes auf dem Expressionsplasmid konnte mittels PCR mit den Primern pDG148_fwd/rev (Tab. III-5) in den *E. coli* S17-1 Transformanten nachgewiesen werden. Allerdings stellte sich heraus, dass der Vektor nicht stabil war (Abb. IV-25). Das Konstrukt wurde bei nachfolgenden Anzuchten oder bei längerer Lagerung aus dem Plasmid herausgeschnitten, welches die Vermutung nahe legte, dass das Glyoxylat-Operon oder zumindest ein Teil dieses Operons lethal für die *E. coli* Zellen ist (Bachelorarbeit, Christiane Dieckmann, 2010).

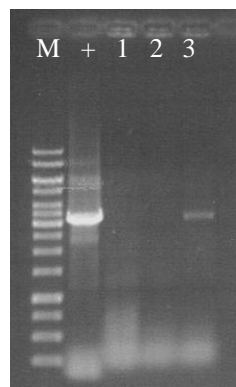


Abbildung IV-24 Darstellung der Gelelektrophorese der Kontroll-PCR mit den Primern pDG148_fwd/ rev auf Erhalt des Expressions-Plasmids in *E. coli* S17-1. (aus der Bachelorarbeit Dieckmann, 2010) In Spur 1 ist der 1 kb Marker (M) dargestellt, in Spur 2 die positiv Kontrolle auf das Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 und in den Spuren 3-5 die *E. coli*-Kolonien 1, 2 und 3. Spur 3 zeigte den Erhalt des korrekten Plasmids.

IV.1.7.2 Untersuchungen zur Lethalität des Glyoxylat-Operons

Zur Untersuchung, welcher Teil des Operons lethal für *E. coli* ist, wurden in den folgenden Experimenten jedes einzelne Gen und Kombinationen von Genen des Glyoxylat-Operons in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert. Die Konstruktion erfolgte über PCR-Experimente. Mit den im Methodenteil angegebenen Primern (Tab. III-5), wurden das Plasmid und das entsprechende Konstrukt in je 2 Strängen amplifiziert und die erhaltenen PCR-Produkte dann für eine Fusions-PCR eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden mit jeweils homologen Überhängen erstellt, so dass das erwünschte doppelsträngige Expressionsplasmid durch Hybridisierung der einzelnen PCR-Produkte entstehen konnte.

Es wurde der Expressionsvektor pBAD verwendet, da der Promotor des Plasmids pDG148*oriT* nicht vollkommen dicht zu sein scheint, wodurch auch ohne Induktion mit IPTG das Operon transkribiert wird. Das Plasmid pBAD (Abb. IV-25) enthält einen ‚origin of replication‘ aus dem *E. coli* Plasmid pBR322, ein Ampicillin-Resistenz-Gen *bla*, ein *araC* Gen, einen Arabinose Promotor, ein *rmB_term*, einen ‚bidirektionalen Terminator‘ und ein polyhis-Gen. Dieser Vektor kann allerdings ausschließlich der Untersuchung der Lethalität in *E. coli* dienen, da er keinen ‚Origin‘ für Gram-positive Bakterien besitzt.

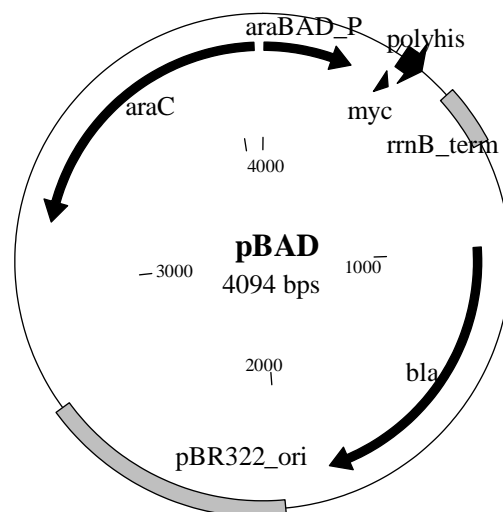


Abbildung IV-25 Plasmidkarte des Vektors pBAD. Das Plasmid enthält einen ‚Origin‘ aus dem *E. coli* Plasmid pBR322, ein Ampicillin-Resistenz-Gen *bla*, ein *araC* Gen, einen Arabinose Promotor *araBAD_P*, ein *rmB_term* und ein polyhis-Gen.

Ergebnisse

Die Expressionsvektoren pBADHSP-Mal, pBADMal, pBADIso und pBADGlyox konnten erfolgreich konstruiert und in *E. coli* transformiert werden. Über Plasmid-Isolation (siehe III.2.3.4) und anschließenden Testverdau (III.2.4) mit *EcoRI*, welches die Plasmide linearisierte, konnte der Erhalt der jeweiligen Konstrukte in *E. coli* nachgewiesen werden (Abb. IV-26 und IV-27).

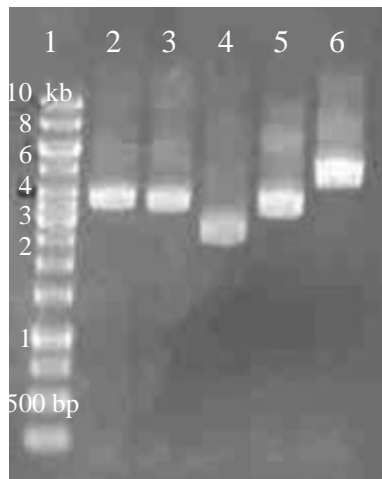


Abbildung IV-26 Darstellung Ergebnisse der Plasmidisolierung der Expressionsvektoren. Spur 1 zeigt den 1 kb Marker, Spur 2 das Plasmid pBADHSP-Mal, Spur 3 das Plasmid pBADMal, Spur 4 das Plasmid pBAD, Spur 5 das Plasmid pBADIso und Spur 6 das Plasmid pBADGlyox.

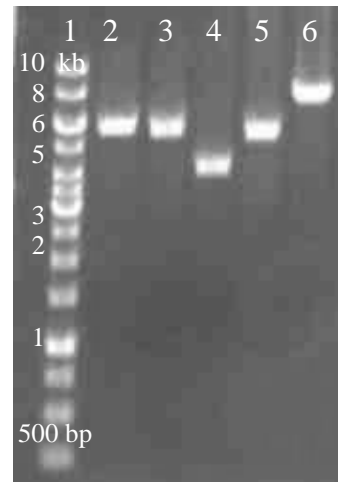


Abbildung IV-27 Darstellung der Ergebnisse des Restriktionsverdaus der erhaltenen Plasmide mit *EcoRI*. Spur 1 zeigt den 1 kb Marker, Spur 2 das Plasmid pBADHSP-Mal, Spur 3 das Plasmid pBADMal, Spur 4 das Plasmid pBAD, Spur 5 das Plasmid pBADIso und Spur 6 das Plasmid pBADGlyox.

Anschließend wurden die erstellten Expressionsvektoren in einem weiteren Wachstumsexperiment auf ihr lethales Verhalten auf *E. coli* getestet. Dafür wurden die *E. coli* Zellen LB-Medium und parallel in LB-Medium versetzt mit 2% Arabinose angezogen und regelmäßig die OD₆₀₀ gemessen. Die *E. coli* Zellen wiesen ein vermindertes Wachstum auf, sobald das HSP und die Malat-Synthase in Kombination auf dem mit Arabinose induzierten Plasmid vorhanden waren (Abb. IV-28, gestrichelte Linien). Die Gegenprobe ohne Induktion durch Arabinose zeigten keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zu dem *E. coli* Stamm mit dem Ursprungplasmid (Abb. IV-28, durchgezogene Linien).

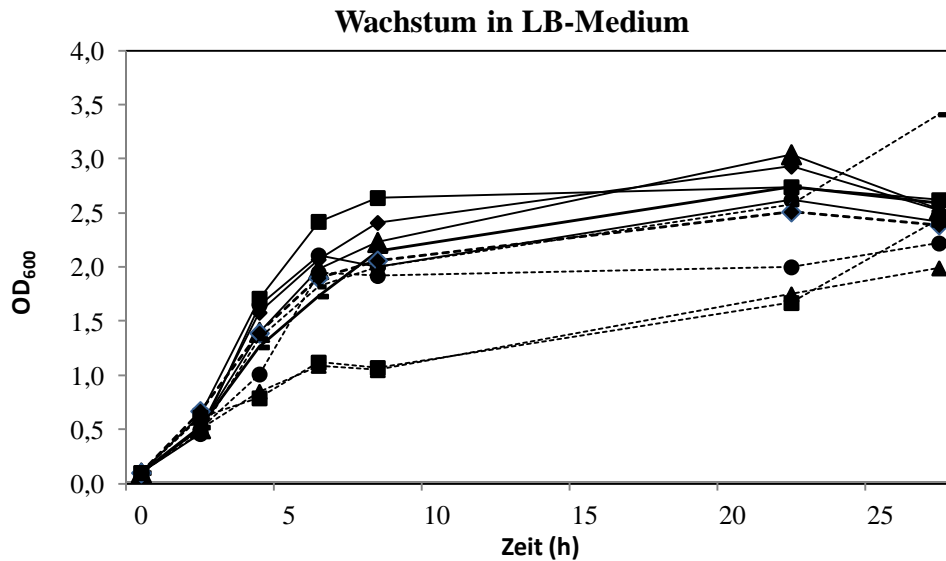


Abbildung IV-28 Darstellung der Ergebnisse der Wachstumsexperimente in LB-Medium (durchgezogene Linien) und in LB-Medium mit 2% Arabinose (gestrichelte Linie). Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs des Wachstum von *E. coli* mit den Plasmiden pBAD (◆), pBADGlyox (■), pBADMal (-), pBADIso (●) und pBADHSP-Mal (▲).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die entsprechenden Konstrukte in den Vektor pDG148 $oriT$ umklontiert werden. Diese erfolgte ebenfalls über die Konstruktion mit Hilfe der PCR-Fusion (s.o.). Der Nachweis erfolgte über eine Kolonie-PCR mit den Primern pDG148 $_{fwd}$ / rev (siehe Tab. III-5). In weiteren Arbeiten müssen noch Stabilitätstests für die Vektoren durchgeführt und diese Vektoren in *Bacillus* konjugiert werden.

Als erweiterte Untersuchungen zum C2-Metabolismus beschäftigte sich der nächste Teil dieser Arbeit mit dem Acetoin- und 2,3-Butandiol-Metabolismus.

IV.1.8 Untersuchungen des Acetoin-Abbaus in *B. licheniformis* DSM13

B. subtilis kann wie *B. licheniformis* DSM13, während des Fermentationsprozesses, Acetoin und 2,3-Butandiol produzieren und auch anschließend wieder verwerten. Der Unterschied besteht aber darin, dass *B. subtilis* Acetoin ausschließlich dann verwerten kann, wenn ihm andere Kohlenstoffquellen wie z.B. Glukose zur Verfügung stehen. *B. licheniformis* DSM13 kann aber, wie im vorangegangenen Kapitel bereits

Ergebnisse

beschrieben, Substrate wie Acetoin als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen und benötigt keine zusätzlichen Kohlenstoffquellen.

In *B. subtilis* wurden bereits Untersuchungen zur Verwertung von Acetoin durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf dem *acu*- und dem *aco*-Operon (Grundy *et al.*, 1993/1994; Ali *et al.*, 2001; Silbersack *et al.*, 2006). Die genaue Zuständigkeit dieser beiden Operons für die Regulation des Acetoin-Metabolismus konnte aber nicht eindeutig geklärt werden. Da *B. licheniformis* keine zusätzlichen Kohlenstoffquellen benötigt, könnten Wachstumsexperimente durchgeführt werden, welche eindeutige Aussagen zur Acetoinverwertung ermöglichen könnten. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Funktion dieser beiden Operons in *B. licheniformis* DSM13 näher untersucht.

IV.1.8.1 Erstellen der Deletions-Mutanten des *acu*- und *aco*-Operons

Zunächst wurden ausgewählte Gene der beiden Operons *acuABC* und *acoABCLR* von *B. licheniformis* nach der bereits beschriebenen gerichteten Mutagenese-Methode deletiert. Bei dem *acuABC*-Operon wurden die Gene *acuA*, welches in *B. subtilis* für eine Klasse 1 Acylase kodiert (Gardner *et al.*, 2008), *acuC*, welches in *B. subtilis* Ähnlichkeiten zu einer Klasse 1 Histon Deacetylase besitzt und das angrenzende Gen *acsA*, welches in *B. subtilis* für eine Acetyl-CoA-Synthetase kodiert (Gardner *et al.*, 2008), deletiert. Bei dem *acoABCLR*-Operon wurden die Gene *acoB*, welches in *B. subtilis* für eine Komponente der Acetoindehydrogenase kodiert (Huang *et al.*, 1999) und *acoR*, welches für den transkriptionellen Aktivator des Acetoindehydrogenase Operons (*aco*-Operon) kodiert (Huang *et al.*, 1999), deletiert. Die Deletion der einzelnen Gene diente der Definition ihrer Funktion in *B. licheniformis* DSM13.

Der erste Schritt für eine ‚clean deletion‘ war die Erstellung von, den Deletionsbereich umgebenden Flanken für jedes Gen. Diese erfolgte über je zwei PCR Reaktionen. Für die Deletion des Gens *acsA* wurden die Primer *acsA_FA_fwd_BamHI/acsA_FA_rev* und *acsA_FB_fwd/acsA_FB_rev_EcoRI*, für das Gen *acuA* die Primer *acuA_FA_fwd_BamHI/acuA_FA_rev* und *acuA_FB_fwd/acuA_FB_rev_EcoRI*, für das Gen *acuC* die Primer *acuC_FA_fwd_BamHI/acuC_FA_rev* und *acuC_FB_fwd/acuC_FB_rev_EcoRI*, für das *acoB* die Primer *acoB_FA_fwd_BamHI/acoB_FA_rev* und *acoB_FA_fwd/acoB_FB_rev_EcoRI* und für das Gen *acoR*, die Primer *acoR_FA_fwd_BamHI/acoR_FA_rev* und *acoR_FB_fwd/acoR_FB_rev_EcoRI*. Es

Ergebnisse

entstanden für das Gen *acsA* eine 657 bp große Flanke A und eine 1015 bp große Flanke B, für das Gen *acuA* eine 773 bp große Flanke A und eine 742 bp große Flanke B, für das Gen *acuC* eine 922 bp große Flanke A und eine 957 bp große Flanke B, für das Gen *acoB* eine 729 bp große Flanke A und eine 747 bp große Flanke B und für das Gen *acoR* eine 897 bp große Flanke A und eine 771 bp große Flanke B (Abb. IV-29 und IV-30).

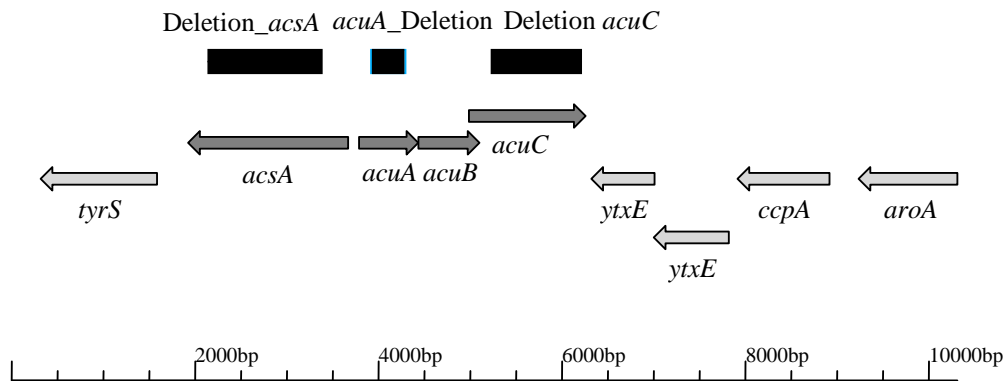


Abbildung IV-29 Physikalische Karte der Region des *acu*-Operons von *B. licheniformis* DSM13. In dunkelgrau sind die Gene des *acu*-Operons, in hellgrau die umliegenden Gene dargestellt. Die Deletion der einzelnen Gene ist in weiß und die Flanken (FA und FB) in schwarz dargestellt.

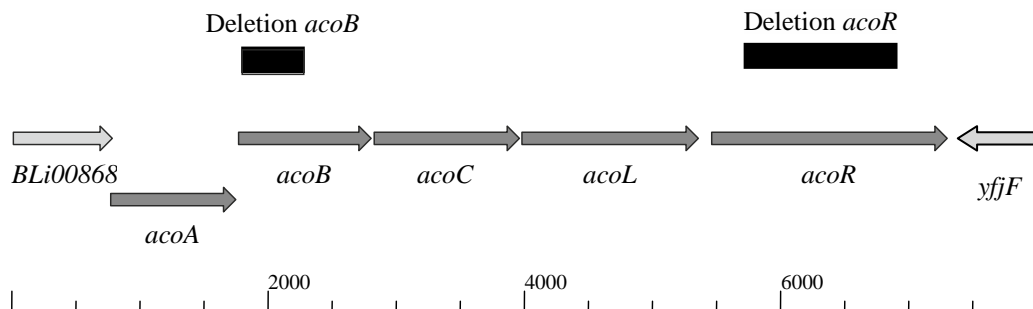


Abbildung IV-30 Physikalische Karte der Region des *aco*-Operons von *B. licheniformis* DSM13. In dunkelgrau sind die Gene des *aco*-Operons, in hellgrau die umliegenden Gene dargestellt. Der deletierte Bereich der einzelnen Gene ist in weiß und die Flanken (FA und FB) in schwarz dargestellt.

Ergebnisse

Die erstellten Flanken wurden in jeweils einer weiteren PCR zu einem Deletionskonstrukt fusioniert. Für das Gen *acsA* wurde die PCR mit den Primern *acsA_FA_fwd_BamHI/ acsA_FB_rev_EcoRI*, für das Gen *acuA* mit den Primern *acuA_FA_fwd_BamHI/ acuA_FB_rev_EcoRI*, für das Gen *acuC* mit den Primern *acuC_FA_fwd_BamHI/ acuC_FB_rev_EcoRI*, für das Gen *acoB* die Primer *acoB_FA_fwd_BamHI/ acoB_FB_rev_EcoRI* und für das Gen *acoR* mit den Primern *acoR_FA_fwd_BamHI/ acoR_FB_rev_EcoRI* (siehe Tab. III-4) durchgeführt. Dadurch entstand für das Gen *acsA* ein Deletionskonstrukt von 1672 bp, für das Gen *acuA* eines von 1515 bp, für das Gen *acuC* eines von 1879 bp, für das Gen *acoB* eines von 1476 bp und für das Gen *acoR* eines von 1668 bp. Das jeweilige Deletionskonstrukt und das Mutageneseplasmid pKVM1 wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI/ EcoRI* geschnitten und anschließend ‚ligiert‘. Das jeweilige Deletionsplasmid wurde in *E. coli* transformiert und anschließend in *B. licheniformis* MW3 konjugiert. Danach erfolgten die Anzuchten, wie im Methodenteil beschrieben (siehe III.2.6) auf die erste und zweite Rekombination. Zur Überprüfung auf Erhalt der jeweiligen Deletion wurde eine PCR Reaktion mit spezifischen Primern durchgeführt. Für *acsA* wurden die Primer *acsA_check_fwd/ acsA_check_rev*, für *acuA* *acuA_check_fwd/ acuA_check_rev*, für *acuC* die Primer *acuC_check_fwd/ acuC_check_rev*, für *acoB* die Primer *acoB_check_fwd/ acoB_check_rev* und für *acoR* die Primer *acoR_check_fwd/ acoR_check_rev* (siehe Tab. III-4) verwendet. Aus dem Gen *acsA* wurden 1233 bp, aus dem Gen *acuA* 333 bp, aus dem Gen *acuC* 975 bp, aus dem Gen *acoB* 480 bp und aus dem Gen *acoR* 480 bp deletiert. Das erhaltene PCR-Produkt war jeweils um die oben genannte Deletion kleiner als der Wildtyp, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Deletion in allen konstruierten Stämmen (*B. licheniformis* MW3del*acsA*, del*acuA*, del*acuC*, del*acoB* und del*acoR*) vorhanden war (Abb. IV-31). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden jeweils mit einem der entsprechenden PCR_check_Primer zum Sequenzieren zu MWG-Eurofins gegeben. Die erhaltenen Sequenzen wurden über BLAST Analysen mit der Sequenz von *B. licheniformis* DSM13 verglichen und es stellte sich heraus, dass alle erzeugten Deletions-Mutanten die korrekte Deletion erhalten haben (siehe Anhang).

Ergebnisse

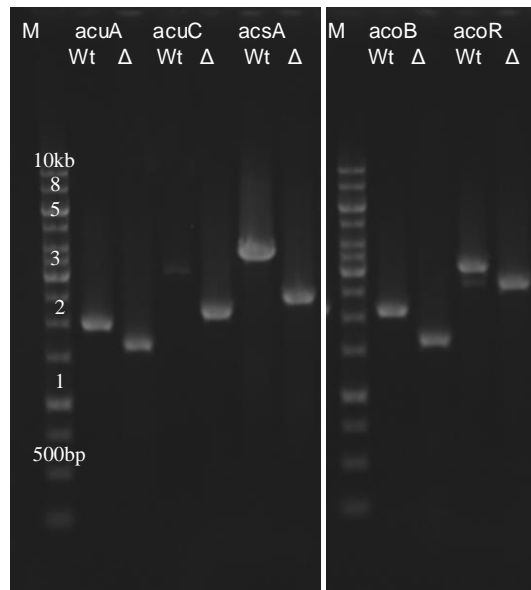


Abbildung IV-31 Darstellung der Ergebnisse der PCR zur Überprüfung der Deletions-Mutanten des *acu*- und *aco*-Operons. Es wurden jeweils die PCR-Produkte mit den entsprechenden Kontroll-Primern für jedes Gen (siehe Material und Methoden, Tabelle III-4) für den Wildtyp *B. licheniformis* MW3 und die jeweilige Deletions-Mutante dargestellt.

Um zu überprüfen, ob das Plasmid auch tatsächlich nicht mehr in dem jeweiligen Deletionsstamm vorhanden ist, wurden, wie oben bereits beschrieben, ‚Southern Blot‘ Analysen mit einer Sonde auf die Erythromycin-Resistenz des Plasmids (siehe Tab. IV-2) durchgeführt. Für die Analysen wurde die DNA der jeweiligen Deletions-Mutanten aus LB-Kulturen isoliert und davon wurde jeweils 1 µg als ‚Template‘ für die ‚Southern Blot‘ Analysen eingesetzt. Für die Deletions-Mutanten konnten keine Signale für diese Sonde detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten 1 µg isoliertes Plasmid pKVM1, welche ein Signal zeigte (Abb. IV-32). Die Ergebnisse bestätigten, dass auch bei diesen Deletions-Mutanten das Plasmid nicht mehr vorhanden ist.

Ergebnisse

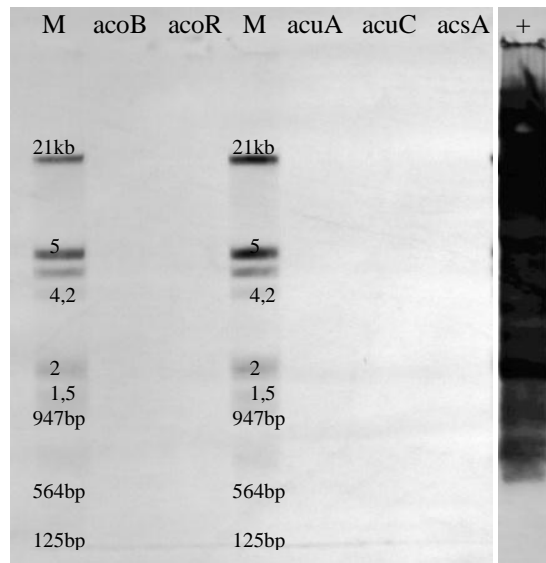


Abbildung IV-32 Darstellung der Ergebnisse der Southern Blot Analysen auf Verlust des Plasmids der Deletions-Mutanten des *acu*- und *aco*-Operons. Die Sonde wurde auf die Erythromycin-Resistenz des Plasmids gelegt (Ergebnisse IV.1.3, Tabelle IV-2). Es wurden jeweils 1 µg der isolierten DNA der jeweiligen Deletions-Mutanten für die Southern Blot Analysen eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) diente 1 µg isoliertes pKVM1. Mit M ist jeweils der ‚DNA Molecular Weight Marker III‘ aufgetragen, *acoB* steht für die Deletions-Mutante von *acoB*, *acoR* für die Deletions-Mutante von *acoR*, *acuA* für die Deletions-Mutante von *acuA*, *acuC* für die Deletions-Mutante von *acuC*, *acsA* für die Deletions-Mutante von *acsA* und + für die Positivkontrolle mit dem Plasmid pKVM1. Keine Deletions-Mutante zeigte ein Signal für das Plasmid.

IV.1.8.2 Charakterisierung der Deletions-Mutanten des *acu*- und *aco*-Operons

Wie oben bereits erwähnt, ist in *B. subtilis* das *acu*- und das *aco*-Operon an dem Abbau von Acetoin beteiligt (Grundy *et al.*, 1993/4; Ali *et al.*, 2001). *B. licheniformis* DSM13 ist ebenso in der Lage 2,3-Butandiol als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen, welches vermutlich zu Acetoin abgebaut wird und anschließend als Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus bzw. Glyoxylat-Zyklus einfließt. In *B. subtilis* ist für den Abbau von 2,3-Butandiol zu Acetoin die 2,3-Butandiol-Dehydrogenase *ydjL* (*bdhA*) zuständig (Nicholson, 2008). Ein Homolog zu diesem Gen wurde in *B. licheniformis* aber bisher nicht identifiziert und deshalb wurden die beiden Operons auch auf eine mögliche Zuständigkeit im 2,3-Butandiolabbau überprüft.

Die erzeugten Deletions-Mutanten wurden für die phänotypischen Untersuchungen zunächst in einer LB-Vorkultur über Nacht bei 37°C und 180 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ der Vorkultur im Photometer bestimmt und anschließend die erste

Ergebnisse

Passage in Minimalmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle angeimpft. Die Kultur wurde mit einer OD_{600} von 0,05 angeimpft und über Nacht bei 42°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde die OD_{600} gemessen und graphisch aufgetragen. Zur Bestimmung eines Phänotyps für die Deletions-Mutanten wurde deren Wachstum mit dem des Ausgangsstammes MW3 verglichen. Eine Beteiligung der beiden Operons am C2-Metabolismus wurde durch die Zugabe von Acetat, Acetoin und 2,3-Butandiol als einzige Kohlenstoffquelle in ein definiertes Minimalmedium untersucht.

Die Deletions-Mutanten von *acoB* (MW3del*acoB*) und *acoR* (MW3del*acoR*) zeigten im Vergleich zum Ausgangsstamm MW3 in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als einzige C-Quelle keinen signifikanten Wachstumsunterschied (Abb. IV-33). Für die Deletions-Mutante von *acuA* (MW3del*acuA*) konnte zu Beginn ein schnelleres Wachstum gezeigt werden, am Ende wurde aber eine geringere OD erreicht als bei dem Ausgangsstamm. Für die Deletions-Mutanten des *acuC* Gens und des *acsA* Gens konnte ein totaler Verlust der Wachstumsfähigkeit mit Acetat als Kohlenstoffquelle detektiert werden.

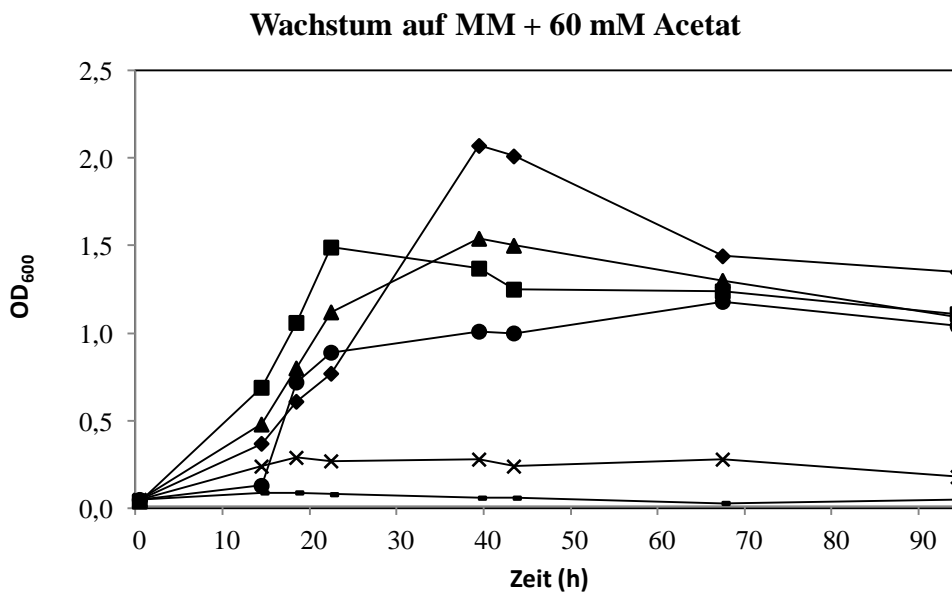


Abbildung IV-33 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps *B. licheniformis* DSM13 in MM + 60 mM Acetat. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm zu den Messpunkten in Stunden. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (◆), der Deletionsstamm des *acoB* Gens (▲), der Deletionsstamm des *acoR* Gens (●), der Deletionsstamm des *acuA* Gens (■), der Deletionsstamm des *acuC*-Gens (x) und der Deletionsstamm des *acsA*-Gens (-).

Ergebnisse

Wachstumsexperimente in Minimalmedium mit 23 mM Acetoin als einziger Kohlenstoffquelle zeigten, verglichen mit dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 lediglich minimale, nicht signifikante Nachteile im Wachstum für die Deletions-Mutanten von *acuA*, *acuC* und *acsA*. Die Deletions-Mutanten von *acoB* und *acoR* waren nicht mehr in der Lage Acetoin zu verwerten. Somit scheint das *aco*-Operon essentiell für den Abbau von Acetoin zu sein (Abb. IV-34).

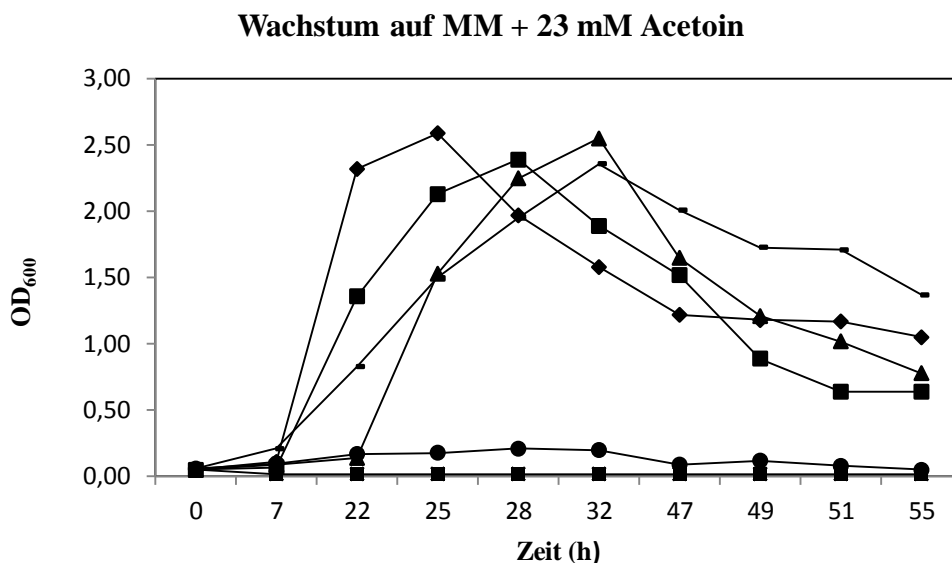


Abbildung IV-34 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps *B. licheniformis* DSM13 in MM + 23 mM Acetoin. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm zu den Messpunkten in Stunden. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (◆), der Deletionsstamm des *acoB* Gens (▲), der Deletionsstamm des *acoR* Gens (●), der Deletionsstamm des *acuA* Gens (■), der Deletionsstamm des *acuC*-Gens (x) und der Deletionsstamm des *acsA*-Gens (-).

Als weitere C2-Quelle für die Wachstumsexperimente dienten 30 mM 2,3-Butandiol. Es wird vermutet, dass 2,3-Butandiol zu Acetoin und anschließend zu Acetyl-CoA abgebaut wird, um dann in den TCA- bzw. Glyoxylatzyklus zu fließen.

Es konnte ebenfalls kein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen dem Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 und den Deletions-Mutanten von *acuA*, *acuC* und *acsA* detektiert werden. Für die Deletions-Mutanten von *acoB* und *acoR* konnte aber gezeigt werden, dass sie auch auf 2,3-Butandiol nicht mehr fähig sind zu wachsen. Das zeigt, dass das 2,3-Butandiol tatsächlich über Acetoin zu Acetyl-CoA abgebaut wird (Abb. IV-35).

Ergebnisse

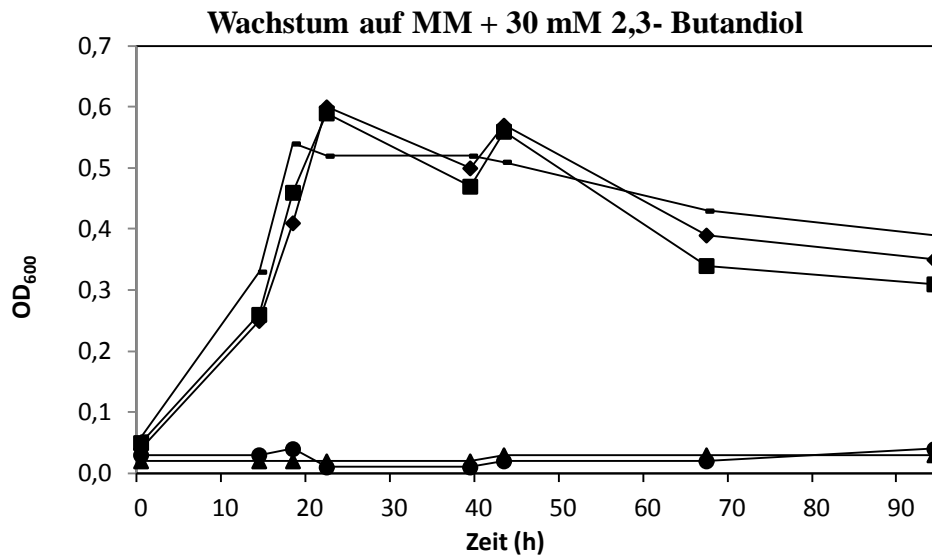


Abbildung IV-35 Graphische Darstellung des Wachstums der Deletions-Mutanten im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps *B. licheniformis* DSM13 in MM + 30 mM 2,3-Butandiol. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte bei 600 nm zu den Messpunkten in Stunden. Aufgetragen sind der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 (◇), der Deletionsstamm des *acoB* Gens (▲), der Deletionsstamm des *acoR* Gens (●), der Deletionsstamm des *acuA* Gens (■), der Deletionsstamm des *acuC*-Gens (x) und der Deletionsstamm des *acsA*-Gens (-).

Die Ergebnisse für das *acuC*-Gen zeigen, dass dieses vermutlich an der Regulation der *acsA* Expression beteiligt ist. Für die Deletions-Mutante von *acuA* konnte ein leicht besseres Wachstum auf Minimalmedium mit 60 mM Acetat beobachtet werden, was dafür sprechen könnte, dass es an der Verminderung der Aktivität durch Acetylierung von *acsA* beteiligt ist. Deshalb wurden zu weiteren Untersuchungen weitere Wachstumsexperimente mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Aus Microarray-Analysen von Marco Schwarzer (Doktorarbeit, 2010) war eine Induktion des *acuA* Gens in einem Aminosäure-haltigen Medium im Vergleich zu Glukose zu erkennen. Deshalb wurden Wachstumsexperimente in Aminosäure-haltigen Medien durchgeführt, die allerdings ebenfalls keinen signifikanten Phänotyp zeigten (nicht dargestellt). Auch in anderen getesteten Medien konnte kein signifikanter Phänotyp ermittelt werden. Aus *B. subtilis* ist aber bekannt, dass *acuA* dort eine Beteiligung an der Sporulation aufweisen konnte, weshalb diese im Folgenden in zwei verschiedenen Medien untersucht worden ist. Für diese Experimente wurden die Deletions-Mutante von *acuA* und der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 in Minimalmedium mit 23 mM Acetoin und in Schaeffer's Sporulationsmedium angezogen. Zur Detektion der vegetativen Zellen wurden regelmäßig Proben entnommen und diese ohne weitere

Ergebnisse

Behandlung auf LB-Agar-Platten verteilt oder 2 ml Kultur wurden für 30 min bei 85°C aufgeköcht, um die vegetativen Zellen abzutöten und auf diese Weise die Sporensuspension zu erhalten. Diese wurde ebenfalls auf LB-Agar-Platten verteilt. Dann folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Morgen konnte die Anzahl an vegetativen Zellen und die Anzahl an Sporen durch Auszählen der erhaltenen Kolonien ermittelt werden. Die Ergebnisse wurden dann in einem Diagramm dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Sporulation in Minimalmedium mit 23 mM Acetoin als Kohlenstoffquelle bei der Deletions-Mutante von *acuA* schlechter ist, als bei dem Ausgangsstamm (Abb. IV-36). Es wurden in diesem Zusammenhang ebenfalls Sporulationsexperimente in Minimalmedium mit 60 mM Acetat und mit 30 mM 2,3-Butandiol als C-Quelle durchgeführt. Diese zeigten aber keinen deutlichen Phänotyp (nicht dargestellt).

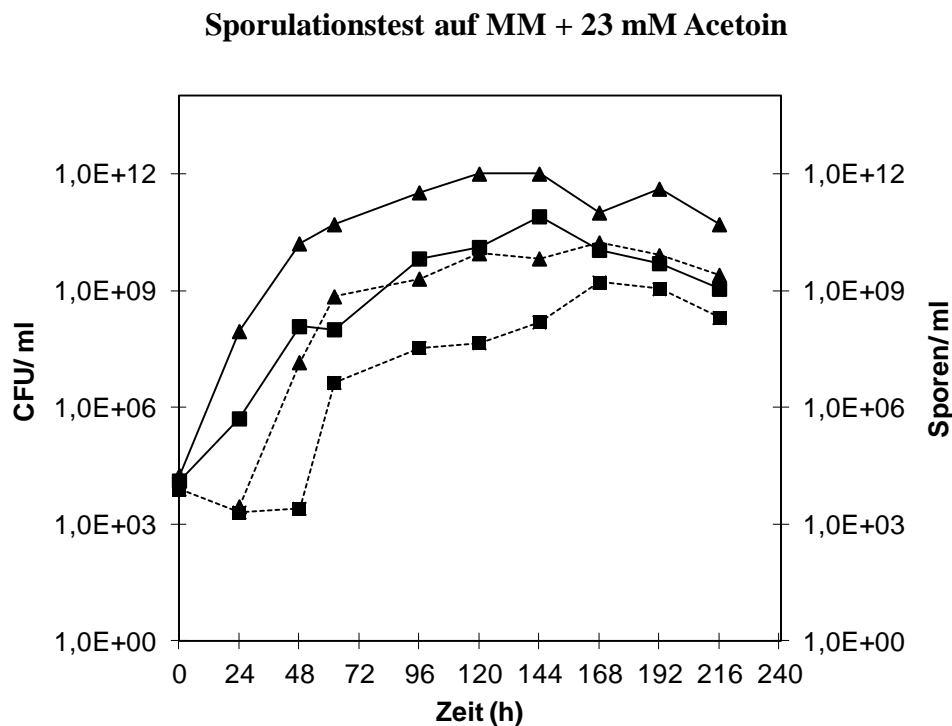


Abbildung IV-36 Darstellung der Ergebnisse des Sporulationstests in Minimalmedium mit 23 mM Acetoin. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis. In ▲ dargestellt ist der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 und in ■ die Deletions-Mutante von *acuA*. Mit durchgezogenen Linien sind die vegetativen Zellen (CFU/ml) (1. Y-Achse) und mit den gestrichelten Linien die Sporen/ml (2. Y-Achse) aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Messpunkte in Stunden dargestellt.

Ergebnisse

In dem Sporulationstest in Schaeffer's Sporulationsmedium konnte eine bessere Sporulation des Deletionsstammes *B. licheniformis* MW3delacuA verglichen mit der Sporulation des Ausgangsstammes *B. licheniformis* MW3 detektiert werden (Abb. IV-37).

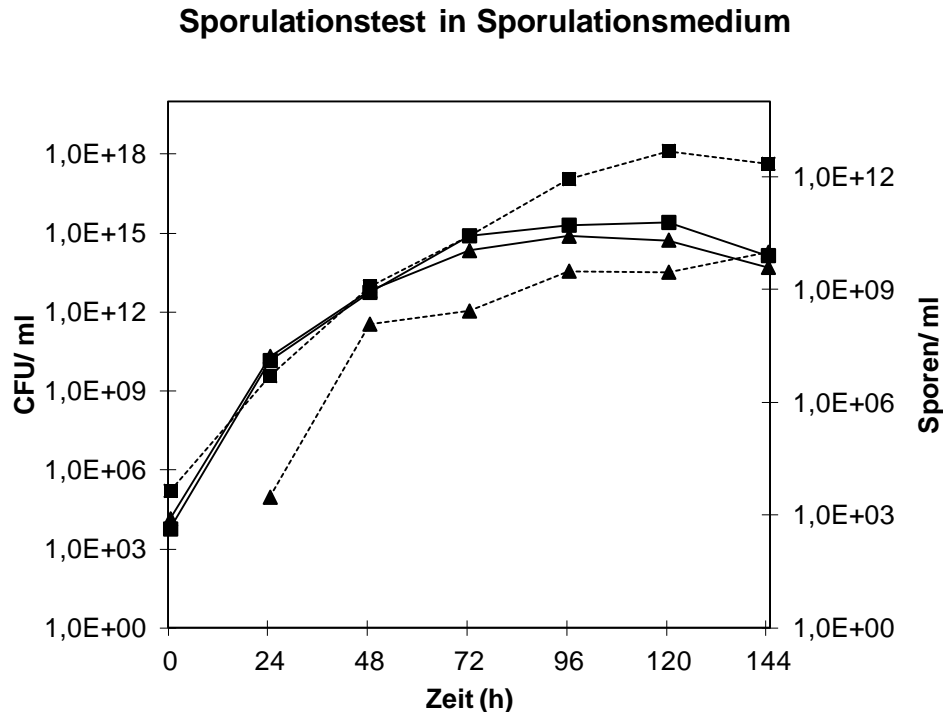


Abbildung IV-37 Darstellung der Ergebnisse des Sporulationstests in Schaeffer's Sporulationsmedium. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis. In ▲ dargestellt ist der Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 und in ■ die Deletions-Mutante von *acuA*. Mit durchgezogenen Linien sind die vegetativen Zellen (CFU/ml) (1. Y-Achse) und mit den gestrichelten Linien die Sporen/ml (2. Y-Achse) aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Messpunkte in Stunden dargestellt.

IV.2 Entwicklung einer Transposonmutagenese für die Identifizierung weiterer Gene des C2-Metabolismus

Die Entwicklung einer Transposonmutagenese für *B. licheniformis* DSM13 wäre eine wichtige alternative Methode für die Untersuchung des Acetat-Stoffwechsels. Dadurch könnten weitere, bisher unbekannte Gene dieses Metabolismus identifiziert werden.

Eine essentielle Transposonmutagenese könnte z.B. auch für die Identifikation von produktionsrelevanten Genen von *B. licheniformis* verwendet werden und wäre somit industriell bedeutsam. Die nicht-essentiellen Gene, könnten identifiziert und ausgeschaltet werden um so möglicherweise die Exoenzym-Produktion zu steigern. Eine weitere Anwendung dieser Methode könnte die Erstellung einer Transposonmutanten-Bibliothek sein,

Ergebnisse

mit Hilfe derer viele Gene mit unbekannter Funktion untersucht und so weitere Erkenntnisse über den Metabolismus von *B. licheniformis* DSM13 erhalten werden könnten.

IV.2.1 Experimente zur Bestimmung der Integrationseigenschaften

Wichtig für eine zufällige Transposonmutagenese ist es ein Transposon zu verwenden, welches möglichst gleichmäßig verteilt in das Bakterien-Chromosom inserieren kann. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *B. licheniformis* DSM13 zu *B. subtilis* (Veith *et al.*, 2004), wurden in dieser Arbeit Transposons getestet, welche in dieser Spezies bereits erfolgreich verwendet worden sind. Der Fokus fiel dabei besonders auf das *Tn10* Transposon und das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1*. Diese beiden Transposons wiesen in *B. subtilis* eine große Zufälligkeit in dem Integrationsverhalten auf (Steinmetz *et al.*, 1994; Le Breton *et al.*, 2006), wodurch sie besonders Interessant für die Anwendung in *B. licheniformis* DSM13 wurden.

Um zu testen, ob die beiden gewählten Transposons für die Methodenentwicklung geeignet sein könnten, beschäftigten sich die ersten Experimente mit der Identifikation des Integrationsverhaltens in *B. licheniformis* DSM13. Dafür wurden die im Folgenden dargestellten Plasmide verwendet, welche bereits für *B. subtilis* beschrieben worden sind.

Für die Mutagenese mit dem *Tn10*-Transposon wurde das ‚Shuttle-Plasmid‘ pIC333 verwendet, welches von Steinmetz *et al.* (1994) für eine zufällige Transposonmutagenese in *B. subtilis* konstruiert wurde. Das Plasmid kann von *E. coli* auf *Bacillus* über Transformation übertragen werden, da es sowohl einen ‚pUC19-Origin‘ für *E. coli* als auch einen ‚temperatursensitiven Origin‘ aus pE194 für Gram-positive Bakterien enthält. Der ‚Origin‘ aus pUC19 ist innerhalb des *Tn10*-Transposons lokalisiert, welches außerdem noch ein Spectinomycin-Resistenz-Gen besitzt. Die dazugehörige Transposase und ein Erythromycin-Resistenz-Gen für die Selektion in *Bacillus* sind ebenfalls auf dem Plasmid vorhanden (Abb. IV-38). Die Lokalisation des ‚Origin`s‘ für *E. coli* innerhalb des Transposons dient der Identifizierung des Integrationsortes in dem Chromosom des jeweiligen Zielbakteriums. Die eigentliche Bestimmung des Integrationsortes soll dann auf folgende Weise erfolgen: bei Integration des Transposons ins Chromosom wird aus den erhaltenen Transposon-Mutanten die DNA isoliert, diese mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend ‚ligiert‘. Die entstandenen DNA-Ringe werden anschließend in *E. coli* transformiert. Die Transformanten enthalten die chromosomale DNA vom Zielbakterium und das in *E. coli* zur

Ergebnisse

Replikation fähige *Tn10*-Transposon. Aus dem Transposon heraus kann dann abschließend in die unbekannte DNA-Sequenz des Zielbakteriums hinein sequenziert und der Integrationsort durch anschließende Sequenzvergleiche mit dem *B. licheniformis* DSM13 Genom bestimmt werden (Steinmetz *et al.*, 1994).

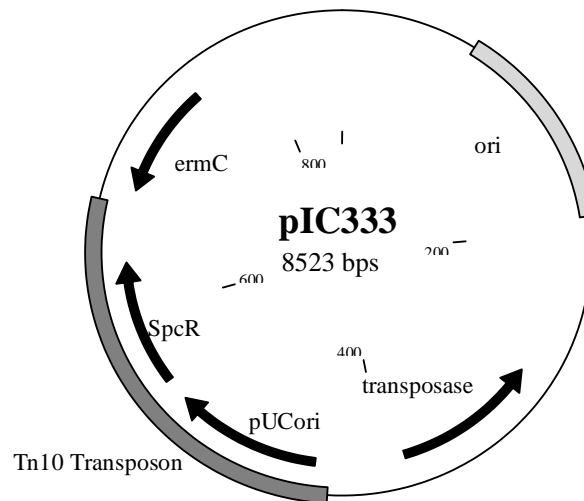


Abbildung IV-38 Plasmidkarte des verwendeten Transposon-Vektors pIC333 (konstruiert nach den Angaben von Steinmetz *et al.*, 1994; Informationen zum Vektor stammen aus einer Email von Steinmetz). Der Vektor enthält einen ‚temperaturesensitiven Origin‘ für Gram-positive Bakterien, eine *Erm*-Resistenz-Kassette, ein *Tn10*-Transposon mit einem ‚pUC-Origin‘ für *E. coli* und einer *Spc*-Resistenz und die dazugehörige *Transposase*.

Für eine Transposonmutagenese in *B. subtilis* mit dem ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* wurden von der Arbeitsgruppe um Le Breton *et al.* (2006) folgende drei Shuttle-Transposon-Vektoren entwickelt.

Die Vektoren pMarA und pMarB enthalten das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1*, welches wiederum ein *Kanamycin*-Resistenz-Gen trägt und die dazugehörige *Transposase Himar1* mit einem Sigma-induzierten Promotor. Des Weiteren besitzen beide Plasmide zwei Antibiotika-Kassetten für die Selektion in *Bacillus* und *E. coli* (*Erythromycin*- und *Ampicillin*-Resistenz). Für die Replikation in *E. coli* ist ein ‚Origin‘ aus dem *E. coli* Plasmid pUC19 vorhanden und für die Replikation in *Bacillus* ein temperaturesensitiver ‚Origin‘ aus dem Plasmid pE194. Die beiden Vektoren, pMarA und pMarB, unterscheiden sich in zwei Aspekten: Zum Einen enthalten sie unterschiedliche Promotoren für die *Transposase*, welche von den Sigma-Faktoren A bzw. B erkannt werden. Des Weiteren unterscheiden sie sich in der Richtung, in der das Transposon auf dem Plasmid lokalisiert ist (Abb. IV-39 und IV-40).

Ergebnisse

Als Kontroll-Plasmid wurde außerdem pMarC konstruiert, welches dem Vektor pMarA entspricht, nur dass ihm die Transposase fehlt, wodurch das Transposon nicht in der Lage ist ins Chromosom zu integrieren (Abb. IV-41).

Die Identifikation der Integrationsorte erfolgt anders als bei dem *Tn10*-Vektor, pIC333, da bei den ‚mariner‘ Transposon-Vektoren der ‚Origin‘ für *E. coli* auf dem Plasmid und nicht im Transposon selbst liegt. Zunächst wird die DNA aus den entsprechenden Transposon-Mutanten ebenfalls isoliert, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anschließend ‚ligiert‘. Die erhaltenen ringförmigen DNA-Moleküle werden anschließend für eine ‚inverse PCR-Methode‘ (siehe III.2.7.1) eingesetzt. Bei dieser Methode werden die Primer so konstruiert, dass sie aus dem Transposon heraus in die flankierende, genomische Sequenz des Bakteriums amplifizieren. Das erhaltene PCR-Produkt besteht aus dem Transposon und den flankierenden kurzen DNA-Sequenzen von *B. licheniformis*. Eine anschließende Sequenzierung dieses PCR-Produktes erfolgt mit einem Primer, der aus dem Transposon heraus in die unbekannte DNA-Sequenz amplifiziert (Le Breton *et al.*, 2006). Anschließend erfolgen Sequenzvergleiche mit dem *B. licheniformis* DSM13 Genom, um den exakten Integrationsort bestimmen zu können.

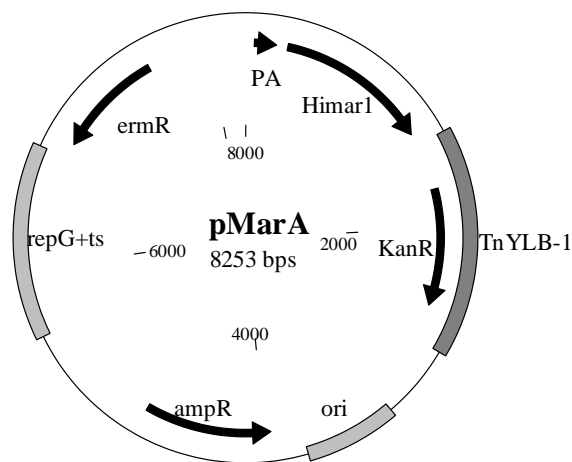


Abbildung IV-39 Plasmidkarte des verwendeten Transposon-Vektors pMarA (Le Breton *et al.*, 2006). Der Vektor trägt den temperatursensitiven ‚Origin‘ für Gram-positive Bakterien (*repG+ts*), eine Erm- und Amp-Resistenz-Kassette, einen ‚Origin‘ für *E. coli*, das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* mit einer Kan-Resistenz, die Transposase *Himar1* und der entsprechende Promotor PA. PA wird von dem Sigmafaktor A erkannt.

Ergebnisse

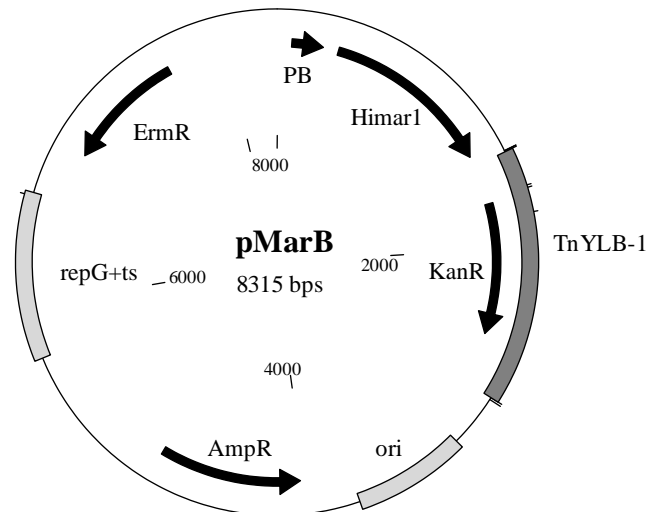


Abbildung IV-40 Plasmidkarte des verwendeten Transposon-Vektors **pMarB** (nach Sequenzierung von Michael Rachinger). Der Vektor trägt den temperatursensitiven ‚Origin‘ für Gram-positive Bakterien (*repG+ts*), eine Erm- und Amp-Resistenz-Kassette, einen ‚Origin‘ für *E. coli*, das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* mit einer Kan-Resistenz, die Transposase *Himar1* und den entsprechenden Promotor PB. PB wird von dem Sigma-Faktor B erkannt.

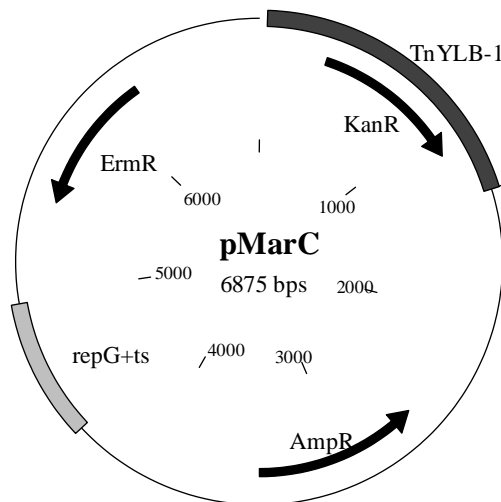


Abbildung IV-41 Plasmidkarte des verwendeten Transposon-Vektors **pMarC** (Le Breton *et al.*, 2006). Der Vektor trägt den temperatursensitiven ‚Origin‘ für Gram-positive Bakterien (*repG+ts*), eine Erm- und Amp-Resistenz, einen ‚Origin‘ für *E. coli* und das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* mit einer Kan-Resistenz. Dieser Vektor besitzt allerdings keine Transposase.

Die zufällige Integration des Transposons in das Chromosom ist für die Entwicklung der ungerichteten Mutagenese-Methode essentiell. Deshalb wurde in den ersten Experimenten die Häufigkeit und Spezifität der Integration des jeweiligen Transposons in das Chromosom

Ergebnisse

von *B. licheniformis* MW3 untersucht, um das geeignete Transposon für die Methoden-Entwicklung identifizieren zu können.

Die Plasmide, pIC333, pMarA, pMarB und pMarC wurden über Protoplasten-transformation (siehe III.2.7.2.1) in *B. licheniformis* MW3 eingebracht. Für diese Art der DNA-Übertragung wurden die *B. licheniformis* Zellen vor Beginn der Transformation durch die Zugabe von Lysozym protoplastiert, d.h. die Zellwand wurde abgedaut. Mikroskopische Beobachtungen zeigten, dass die Bakterien in Folge dessen rund erschienen. Es ist daher eine besondere Vorsicht im Umgang mit den Protoplasten nötig, d.h. es darf nicht ‚gevortext‘ werden und auch die Geschwindigkeit des Schüttlers sollte während der Protoplastierung lediglich maximal 100 rpm betragen. Bei einem Protoplastierungsgrad von 85-90%, welcher unter dem Mikroskop kontrolliert worden ist, wurden die Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben (siehe III.2.7.1), transformiert.

Die Ergebnisse der Transformationen zeigten, dass die Effizienz pro μg eingesetzter DNA nicht sehr gut war (Tab. IV-5). Für den Vektor pMarA wurden die meisten Transformanten erhalten (40 Transformanten/ μg DNA), für die Vektoren pIC333 und pMarB die gleiche Anzahl an Transformanten (12 Transformanten/ μg DNA) und für den Vektor pMarC wurden lediglich 2 Transformanten pro μg DNA erhalten. Als Negativ-Kontrolle wurde der unbehandelte *B. licheniformis* MW3 auf Selektivplatten mit 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Erythromycin aufgebracht. Das Ergebnis zeigte, dass der verwendete *B. licheniformis* Stamm MW3 von Natur aus keine Resistenz gegen Erythromycin aufwies. Bei mehreren Reproduktionen der Protoplastentransformation zeigte sich, dass der Erhalt von Transformanten nicht bei jeder Durchführung die Regel war.

Tabelle IV-5 Darstellung der Ergebnisse der Protoplasten-PEG-Transformation. Gezeigt sind der verwendete Stamm, das jeweilige Plasmid und die Anzahl der Transformanten pro μg DNA.

Verwendeter Stamm mit Plasmid	Anzahl an Transformanten/ μg DNA
<i>B. licheniformis</i> MW3 + pMarA	Ca. 40
<i>B. licheniformis</i> MW3 + pMarB	12
<i>B. licheniformis</i> MW3 + pMarC	2
<i>B. licheniformis</i> MW3 + pIC333	12
<i>B. licheniformis</i> MW3 (neg. Kontr.)	0

Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden die Transformanten auf den Erhalt des korrekten Plasmids überprüft. Die Plasmidisolierung aus den Transformanten wurde nach dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll durchgeführt (siehe III.2.3.5), wodurch das Vorliegen der Plasmide in *B. licheniformis* MW3 bestätigt werden konnte. Zum Nachweis des Erhaltes der korrekten Plasmide schloss sich ein Restriktionsverdau an. Dieser erfolgte für die Plasmide pMarA, pMarB und pMarC mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, wodurch für pMarA und pMarB, wie erwartet, jeweils ein Restriktionsmuster von 2,8 und 5,4 kb erhalten wurde. Für das Plasmid pMarC konnte das erwartete Restriktionsmuster von 2,8 und 4 kb nachgewiesen werden. Der Vektor pIC333 wurde mit dem Restriktionsenzym *BamHI* verdaut, wodurch, wie erwartet, ein Bandenmuster von ca. 2,2 und 6 kb entstanden ist.

Nach Bestätigung des Vorhandenseins des korrekten Plasmids wurden von den erhaltenen Transformanten von pMarB und pIC333 (schlechte Transformationsrate) ‚Southern-Blot‘ Analysen (Abb. IV-43) durchgeführt, um das Integrationsverhalten des jeweiligen Transposons analysieren zu können. Das Plasmid pMarB wurde gewählt, da es laut LeBreton (2006) aufgrund der Erkennungsstelle für Sigma B am Promotor der Transposase *HimarI* für *Bacillen* am besten geeignet sein soll. Für die ‚Southern Blot‘ Analysen wurden jeweils Transformanten verwendet, welche noch das replizierende Plasmid enthielten. Das bedeutet, dass das Transposon in mehreren Kopien pro Bakterienzelle enthalten sein und mehrfach in das Chromosom inseriert haben könnte. Durch die Verwendung dieser Transposon-Integrianten konnte festgestellt werden, ob die getesteten Transposons zufällig in das Chromosom integrieren oder ob sie spezifische Orte im Genom bevorzugen. Dafür wurde die DNA der entsprechenden Transformanten isoliert, mit *EcoRI* vollständig verdaut und anschließend für den ‚Southern Blot‘ (siehe III.2.14) in einer Konzentration von 1 µg/ ml eingesetzt. Für die Erstellung der Sonde wurden spezifische Primer für das entsprechende Transposon (Tn10_fwd/ Tn10_rev bzw. TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev, Tab.III-3) gewählt und für eine PCR-Reaktion mit 100 ng Plasmid-DNA und DIG dNTP`s verwendet. Zur Hybridisierung wurden 100 nmol der jeweiligen Sonde eingesetzt (Tab. IV-6).

Ergebnisse

Tabelle IV-6 Sequenz der verwendeten Sonden für die Southern Blot Analysen.

Name	Sequenz
Sonde_ <i>Tn10</i>	5'-AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACG CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT CAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC TTCACCTAGATCCTTTTGACTCTAGAGGATCGATCTGTATAATAAAGAATAATTATTA ATCTGTAGACAAAATTGTGAAAGGATGTACTTAAACGCTAACGGTCAGCTTTATTGAA CAGTAATTTAAGTATATGTCCAATCTAGGGTAAGTAAATTGAGTATCAATATAAACT TTATATGAACATAATCAACGAGGTGAAATCATGAGCAATTTGATTAACGGAAAAATA CCAAATCAAGCGATTCAAACATTAATAAATCGTAAAAGATTTATTTGGAAGTTCAATA GTTGGAGTATATCTATTTGGTTCAGCAGTAAATGGTGGTTTACGCATTAACAGCGAT GTAGATGTTCTAGTCGTCGTGAATCATAGTTTACCTCAATTAACGAAAAAACTA ACAGAAAGACTAATGACTATATCAGGAAAGATTGAAAATACGGATTCTGTTAGACC ACTTGAAGTTACGGTTATAAATAGGAGTGAAGTTGTCCCTTGGCAA-3'
Sonde_ <i>TnYLB1</i>	5'-CTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTG TGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAAGTGGTGGCCTAA CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC CTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG TGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAG TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGG GATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATA ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTGGTCTGACAGTTACCA ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTT GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG-3'

Die Ergebnisse der ‚Southern-Blot‘ Analysen einiger Transformanten, die den replizierenden *Tn10*-Vektor pIC333 enthielten, zeigten bei einer von 12 getesteten Transformanten ein einzelnes Signal für die Integration des Transposons in das Chromosom von *B. licheniformis* MW3, bei den restlichen 11 Proben konnte keine Insertion nachgewiesen werden. Die positiv Kontrolle auf das Plasmid pIC333 zeigte das gewünschte Signal (nicht dargestellt). Es scheint als habe das Transposon unter den getesteten Bedingungen nicht ins Chromosom integriert.

Die ‚Southern-Blot‘ Analysen der Transformanten, die den replizierenden Vektor pMarB enthielten, zeigten dagegen bei jeder einzelnen der 12 getesteten Proben mehrfache Signale von unterschiedlichen Größen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Integration des Transposons an unterschiedlichen Stellen im Chromosom von *B. licheniformis* MW3 erfolgt ist (Abb. IV-42).

Ergebnisse

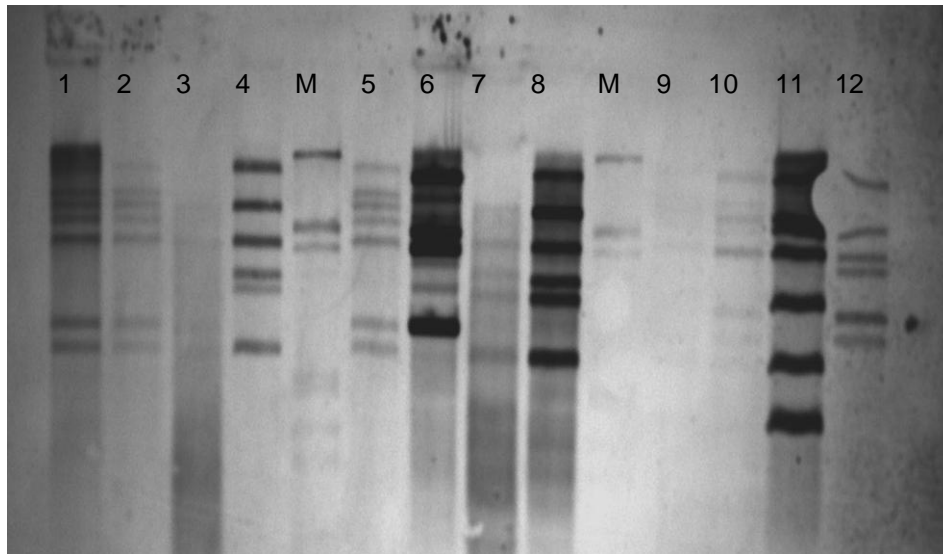


Abbildung IV-42 Darstellung des Ergebnisses der Southern-Blot-Analysen von *B. licheniformis* MW3 pMarB-Transformanten. In den Spuren 1-4, 6-9, 11-14 ist das Ergebnis für die Transformanten 1-12 dargestellt, in den Spuren 5 und 10 sind jeweils die Marker aufgetragen.

Diese ersten Ergebnisse identifizierten das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* als das geeignetere Transposon für die Mutagenese-Methode in dem Bakterium *B. licheniformis* DSM13. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* verwendet.

Um die Integration des Transposons und den Verlust des Plasmids zu fördern, wurden die pMarA, und -B Transposon-Integrianten aus weiteren Ansätzen in NB-Flüssigmedium ü.N. bei der restriktiven Temperatur von 37°C angezogen, bei der das Plasmid, aufgrund des temperatursensitiven ‚Origin`s‘, nicht mehr in der Lage ist zu replizieren. Um das Überleben des Bakteriums auf den Antibiotika-Platten zu sichern ist das Bakterium unter den gegebenen Bedingungen gezwungen das Transposon zu integrieren. Die Bakterienzellen, welche das Transposon integriert haben, sind in der Lage auf dem Kanamycin-haltigen Nährmedium zu wachsen und wurden am folgenden Tag auf NB und NB+Kan-Platten ausplattiert und über Nacht bei 50°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine parallele Übertragung der erhaltenen Kolonien auf NB-Agar-Platten mit 50 µg/ ml Kanamycin und NB-Agar-Platten mit 5 µg/ ml Erythromycin. Diese wurden anschließend erneut über Nacht bei 50°C inkubiert, um auf den Verlust des Plasmids zu selektieren. Ausschließlich Kolonien, welche nur auf Kan-Platten wuchsen, haben das Plasmid verloren und das Transposon integriert. Zur Überprüfung auf den Verlust des Plasmids und den Erhalt

Ergebnisse

des Transposons wurde im Anschluss eine Kolonie-PCR mit den Primern pMarB_fwd/rev und TnYLB1_fwd/rev durchgeführt (Abb. IV-43/ 44). Auf den NB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin wurden keine Kolonien mit dem pMarC Vektor erhalten, da das Transposon ohne Transposase nicht ‚springen‘ konnte und das Bakterium somit keine Resistenz gegen dieses Antibiotikum erhalten konnte.

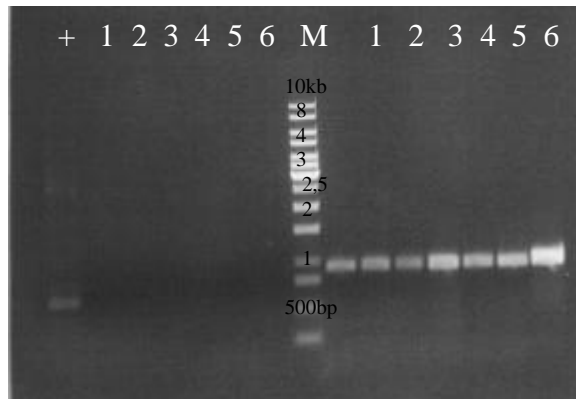


Abbildung IV-43 Darstellung der PCR auf den Verlust des Plasmids und die Integration des Transposons für die Mutagenese mit pMarA. Links des 1 kb Markers sind die Ergebnisse der Kolonie-PCR für verschiedenen Transposon-Mutanten mit den Primern Erm_fwd/ rev für den Nachweis der Erm-Resistenz dargestellt, rechts die Ergebnisse der Kolonie-PCR mit den Primern TnYLB1_fwd/ rev für den Nachweis des Transposons.

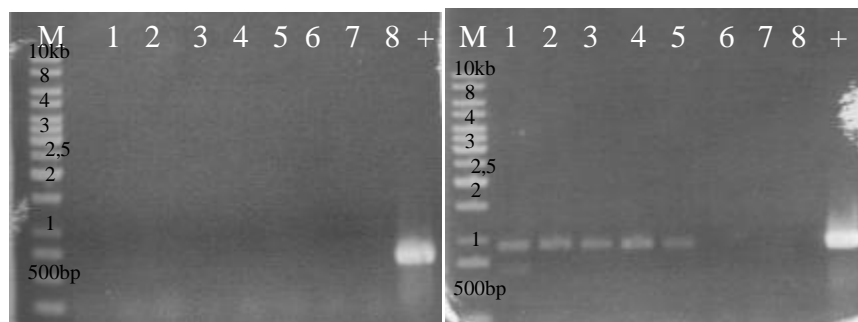


Abbildung IV-44 Darstellung der PCR auf den Verlust des Plasmids und die Integration des Transposons für die Mutagenese mit pMarB. Links des 1 kb Markers sind die Ergebnisse der Kolonie-PCR für verschiedenen Transposon-Mutanten mit den Primern Erm_fwd/ rev für den Nachweis der Erm-Resistenz dargestellt, rechts die Ergebnisse der Kolonie-PCR mit den Primern TnYLB1_fwd/ rev für den Nachweis des Transposons.

Die Ergebnisse der PCR Reaktionen zeigten, dass bei den getesteten Kolonien die PCR auf die Erythromycinresistenz des Plasmids (Erm_fwd/ ERm_rev) keine Produkte

Ergebnisse

lieferte und diese demnach nicht mehr vorhanden war. Für die PCR mit Transposon-spezifischen Primern (TnYLB1_fwd/ rev) wurden aber Produkte erhalten, wodurch gezeigt werden konnte, dass das Transposon ins Chromosom von *B. licheniformis* MW3 integriert haben und das Plasmid verloren gegangen sein muss.

Um den Integrationsort im Chromosom zu bestimmen, wurde aus den Transposon-Integrierten die DNA isoliert, diese mit *EcoRI* verdaut und mit einer T4-*Ligase* zu kleinen DNA-Ringen ‚ligiert‘. Diese dienen dann in einer darauffolgenden ‚inversen PCR-Reaktion‘ (siehe III.2.7.1) als ‚Template‘. Als Primer wurden Oligonukleotide (pMarA_1/ pMarA_2) ausgewählt, die aus dem Transposon heraus in die unbekannte DNA-Sequenz amplifizieren. Bei 5 getesteten Transposon-Integrierten wurden drei verschiedene Größen von PCR-Produkten erhalten (Abb. IV-45).



Abbildung IV-45 Darstellung der Ergebnisse der ‚inversen PCR‘ von fünf verschiedenen ‚mariner‘ Transposon-Integrierten. M zeigt den 1 kb Marker, und die folgenden Spuren die unterschiedlichen PCR-Produkte der Transposon-Mutanten mit den Primern pMarA_1/ pMarA_2.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits aufgereinigt und mit einem Primer, der aus dem Transposon heraus in die unbekannte DNA-Sequenz amplifiziert (pMarA_1 bzw. pMarA_2) zum Sequenzieren zu der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten eine bevorzugte Integration in 16S- oder 23S rRNA-Bereiche (Tab. IV-7). Es könnte aber auch sein, dass die getesteten Transposon-Mutanten zufällig Integrationen in die 16S bzw. 23SrRNA zeigten, da diese in sehr vielen Kopien in *B. licheniformis* DSM13 vorliegt.

Ergebnisse

Tabelle IV-7 Ergebnisse der Sequenzierung der ‘mariner’ Transposon-Integranen.
Dargestellt sind die Transposon-Mutante benannt nach dem Plasmid, mit der die Konstruktion erfolgte und der Ort der Integration.

Name	Integrationsort
pMarA_1	rRNA 16S
pMarA_2	Intergenische Region zwischen ybaN (plysaccharid deacetylase) und rRNA 16S
pMarA_31	rRNA 23S
pMarA_32	rRNA 23S

Es konnten lediglich fünf Integranen mit der PCR-Methode untersucht werden, da die ‚inverse PCR‘ oder die Sequenzierung nicht zuverlässig Ergebnisse lieferte und insgesamt nur wenige Transposon-Integranen erhalten wurden. Der Grund dafür lag unter anderem an der schlechten Transformationseffizienz der Transposon-Vektoren über die Protoplastentransformation. Deshalb wurden unterschiedliche Transformationsmethoden getestet, wie z.B. eine Modifikation der Protoplastentransformation (nicht dargestellt, diese Arbeit), die Protoplasten-Elektroporation (nicht dargestellt, diese Arbeit), die Elektroporation (Dissertation, Michael Rachinger, 2010), eine Modifikation der Hitzetransformation (nicht dargestellt, diese Arbeit) und letztendlich noch die Konjugation (Michael Rachinger *et al.*, 2011). Mit allen Methoden wurden Transformanten erhalten, die Ergebnisse waren aber selten reproduzierbar. Lediglich die Elektroporations- und die Konjugationsergebnisse konnten erfolgreich reproduziert werden, wobei die besten Ergebnisse mit der Konjugation erzielt worden sind (Dissertation, Michael Rachinger, 2010). Deshalb wurde mit der Konjugation als Übertragungsmethode fortgefahren und es wurden konjugative *TnYLB1* Vektoren erstellt, pMB1 und pMB2.

IV.2.2 Konstruktion der konjugativen Transposon-Vektoren pMB1 und pMB2

Als Ausgangsvektoren für die Konstruktion des ‚mariner‘ Transposon-Vektors pMB1 dienten zum einen der Mutagenesevektor pKVM1 (Rachinger *et al.*, 2011) und zum anderen der Transposon-Vektor pMarB (Le Breton *et al.*, 2006).

Ergebnisse

Für die Erstellung des konjugativen Transposon-Vektors wurde das Plasmid pKVM1 mit *EcoRI* und *BamHI* in einem Doppelverdau linearisiert und anschließend für die weitere Konstruktion verwendet. Aus dem Plasmid pMarB wurde parallel mit den Primern TnYLB1Himar1_fwd_ *EcoRI* und TnYLB1Himar1_rev_ *BamHI* die Transposase *Himar1* mit dem Promotor *PB* und das Transposon *TnYLB1* per PCR amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde anschließend mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* verdaut und anschließend mit dem linearisierten Vektor pKVM1 ‚ligiert‘. Es folgte eine Transformation des ‚Ligationsproduktes‘ in *E. coli* und eine Überprüfung des konstruierten Vektors durch Plasmidisolation und einen sich anschließenden Testverdau über *EcoRI/ BamHI*. Es resultierte der konjugative ‚mariner‘ Transposon-Vektor pMB1 (Abb.IV-46).

Als weitere Alternative wurde zusätzlich ein Vektor konstruiert, der den ‚Origin‘ für die Replikation in *Bacillus* nicht mehr enthält, wodurch z.B. mögliche mehrfache Insertionen des Transposons vermieden werden können. Die Konstruktion erfolgte aus dem neu konstruierten Plasmid pMB1, welches mit dem Enzym *PacI* verdaut wurde, um den temperatursensitiven ‚Origin‘ herauszuschneiden. Das größere Fragment des Vektors wurde aus einem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit sich selbst ‚ligiert‘. Auf diese Weise entstand das Suizid-Transposon-Plasmid, pMB2. Mit Hilfe dieses Plasmids sollten potentielle mehrfache Insertionen vermieden werden, da der erhaltene Vektor, pMB2, in *Bacillus* nicht replizieren kann und das Transposon somit voraussichtlich weniger häufig in das Chromosom integriert.

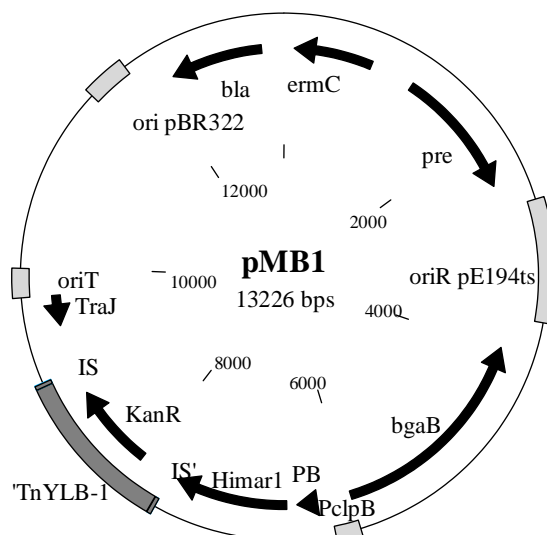


Abbildung IV-46 Darstellung des Transposon-Vektors pMB1. Die Transposase samt Promotor und das Transposon wurden per PCR aus pMarB amplifiziert und in den Mutagenese-Vektor pKVM1 in die MCS eingebracht.

Ergebnisse

Die ‚Ligations-Produkte‘ der konstruierten Plasmide pMB1 und pMB2 wurden in den *E. coli* Stamm S17-1 transformiert und aus den erhaltenen Transformanten anschließend das Plasmid isoliert. Der Erhalt des korrekten Plasmids pMB1 wurde dann mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/ BamHI* auf den Erhalt der Transposase und des Transposons in einem Doppelverdau überprüft. Es wurde das erwartete Restriktionsmuster von 10,3 und 2,9 kb erhalten und somit den Erhalt des korrekten Plasmids bestätigt (Abb. IV-47).

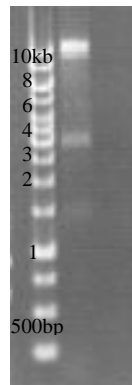


Abbildung IV-47 Darstellung der Ergebnisse des Restriktionsverdaus des isolierten Plasmids pMB1 mit den Restriktions-Enzymen *EcoRI/ BamHI*. Die Ergebnisse zeigten den Erhalt des erwarteten Restriktionsmusters von 10,3 und 2,9 kbp und bestätigten damit den Erhalt des korrekten Plasmids.

Das Plasmid pMB2 wurde über einen Testverdau mit dem Restriktionsenzym *PstI* überprüft. Das Plasmid 6 zeigte das erwartete Restriktionsmuster von 996 bp, 1.3 kb, 2.4 kb, 2.7 kb und 4.7 kb (Abb.IV-48).

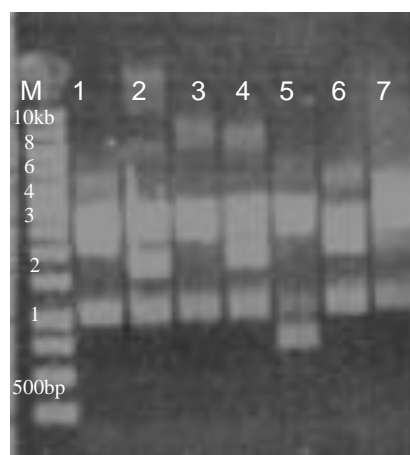


Abbildung IV-48 Darstellung der Ergebnisse des Restriktionsverdaus des erstellten Plasmids pMB2 mit dem Restriktionsenzym *PstI*. Das Plasmid 6 zeigte das korrekte Restriktionsmuster von 996 bp, 1.3 kb, 2.4 kb, 2.7 kb und 4.7 kb und enthielt somit das Plasmid pMB2.

IV.2.3 Entwicklung eines Protokolls zur Mutagenese

IV.2.3.1 Mutagenese-Prozedur 1

Die erfolgreich konstruierten ‚mariner‘ Transposon-Vektoren pMB1 und pMB2 wurden in einer ersten Prozedur der Mutagenese über Konjugation in *B. licheniformis* MW3 eingebracht. Die Konjugation erfolgte entsprechend dem im Material- und Methodenteil beschriebenen Protokoll (siehe III.2.8.2.2) bei 30°C. Die Selektion auf Erhalt des Plasmides erfolgte parallel auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/ ml Kanamycin und NB-Agar-Platten mit 5 µg/ ml Erythromycin. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei der permissiven Temperatur von 30°C, bei der das Plasmid replizieren kann. Der Erhalt des Plasmids und des Transposons konnte durch das Wachstum der erhaltenen Konjuganten auf beiden Selektivplatten bestätigt werden. Für die Selektion auf die Integration des Transposons und den Verlust des Plasmids wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit 50 µg/ ml Kanamycin aufgetragen und über Nacht bei der ‚restriktiven‘ Temperatur von 50°C inkubiert. Bei dieser Temperatur kann das Plasmid aufgrund seines temperatursensitiven ‚Origin`s‘ nicht mehr replizieren, wodurch das Transposon ‚springen‘ muss, um das Überleben des Bakteriums zu gewährleisten. Die potentiellen Transposon-Mutanten wurden erfolgreich auf den Verlust des Plasmids und den Erhalt des Transposons per PCR mit transposon- (TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev) und plasmid-spezifischen (Erm_fwd/ Erm_rev) Primern getestet. Bei Verlust des Plasmids wurde aus den entsprechenden Kolonien DNA isoliert und anschließend 5 µg dieser mit dem Restriktionsenzym *HincII* verdaut. 2 µg der vollständig geschnittenen DNA wurden ‚Southern-Blot‘-Analysen mit 100 nmol einer Sonde (siehe Tab. IV-6) auf die Kanamycin-Resistenz des Transposons (verwendete Primer für die Sondenherstellung: TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev; siehe III-2.14) durchgeführt, um die Häufigkeit und die Zufälligkeit der Integration des Transposons bestimmen zu können (Abb. IV-49).

Ergebnisse

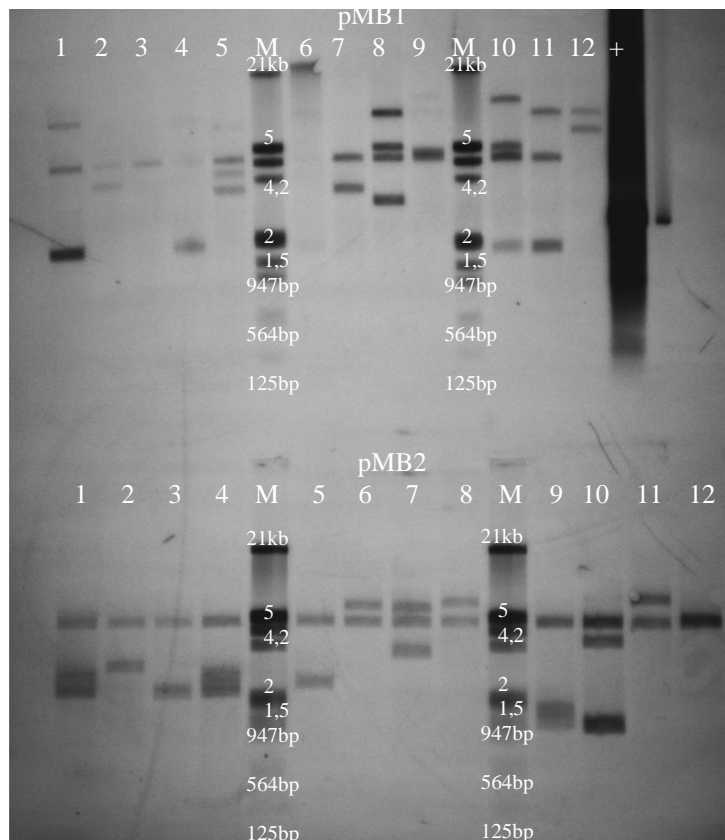


Abbildung IV-49 Darstellung der Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen der pMB1 bzw. pMB2-Transformanten von *B. licheniformis* MW3. Zur Detektion diente das DIG-PCR Produkt der Kanamycin-Resistenz des Transposons. Die DNA der Transposon-Integrierten wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym *HincII* vollständig geschnitten und 2 µg als ‚Template‘ für den Southern Blot eingesetzt. Der obere Teil des Blots zeigt in den Spuren 1-12 die Ergebnisse für einzelne mit pMB1 erhaltenen Transposon-Mutanten und als positiv Kontrolle den Vektor pMB1. Der untere Teil zeigt die Ergebnisse für einzelne mit pMB2 erhaltenene Transposon-Mutanten 1-12. In den Spuren, die mit M gekennzeichnet sind, sind jeweils die Marker (‚DIG-labeled Marker III‘, Roche) aufgetragen. Die Klone 3, 6, 9 und 12 weisen ausschließlich eine einzelne Insertionsstelle aufweisen.

Für den Vektor pMB1 (oberer Teil des Bildes, Abb. IV-49) konnten häufig mehrfache Insertionen des Transposons an verschiedenen Orten im Chromosom von *B. licheniformis* detektiert werden. Es konnten aber auch drei vermeintliche Transposon-Mutanten mit einzelnen Transposon-Insertionen an verschiedenen Orten identifiziert werden. Der Vergleich mit der positiv Kontrolle zeigte, dass die erhaltenen Signale für die Integration nicht auf derselben Höhe lagen wie für das Plasmid selbst und das Transposon somit ins Chromosom integriert haben muss (Abb. IV-49, oben).

Für den Vektor pMB2 konnten ebenfalls mehrfache Integrationen nachgewiesen werden, allerdings war die Häufigkeit der Integration geringer und auch weniger zufällig als

Ergebnisse

mit dem pMB1-Vektor. Es war sehr häufig ein Signal in derselben Höhe, wie bei der positiv Kontrolle zu erkennen, die für eine Integration des gesamten Plasmids in das Chromosom sprechen könnte. Unter Verwendung dieses Vektors konnte lediglich eine Einzel-Integration des Transposons in das Chromosom identifiziert werden.

Für die Identifizierung der Integrationsorte des Transposons wurde eine ‚Inverse-PCR‘ durchgeführt (siehe III.2.7.1), deren Produkt zur Sequenzierung gegeben werden sollte, um eine Sequenz der DNA zu erhalten, welche dem Transposon benachbart ist und somit den Integrationsort darstellt. Die bereits isolierte Transposon-Mutanten-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *HincII* verdaut, welches mehr als 1000 Schnittstellen im Chromosom von *B. licheniformis* aufweist. Dadurch entstanden kleine lineare DNA-Fragmente, welche in einer sich anschließenden ‚Ligation‘ zu kleinen DNA-Ringen fusioniert wurden, wovon einer oder mehrere, je nach Häufigkeit der Transposon-Integration, das Transposon trugen. Diese DNA-Ringe dienten in einer sich anschließenden PCR-Reaktion mit den Primern pMarA_1/pMarA_2, welche vom Transposon aus in die unbekannte genomische DNA-Sequenz amplifizieren, als ‚Template‘. Die Ergebnisse dieser PCR-Reaktion bestätigten die Ergebnisse der Southern Blot Analysen. Für jede getestete potentielle Transposon-Mutante waren mehrere PCR-Produkte zu erkennen, welche die mehrfachen Integrationen des Transposons bestätigten (Abb. IV-50). Die Ergebnisse könnten aber auch dafür sprechen, dass nicht nur die einzelnen DNA-Moleküle mit sich selbst ‚ligiert‘ haben, sondern dass auch die einzelnen Fragmente miteinander ‚ligiert‘ haben könnten. Eine Identifizierung der Integrationsorte über eine Sequenzierung konnte aufgrund der mehrfachen Produkte je PCR-Reaktion nicht durchgeführt werden. Deshalb wurde das Protokoll für die Mutagenese verändert, um mehrfache Insertionen und eine mögliche Integration des Plasmids zu vermeiden.

Ergebnisse

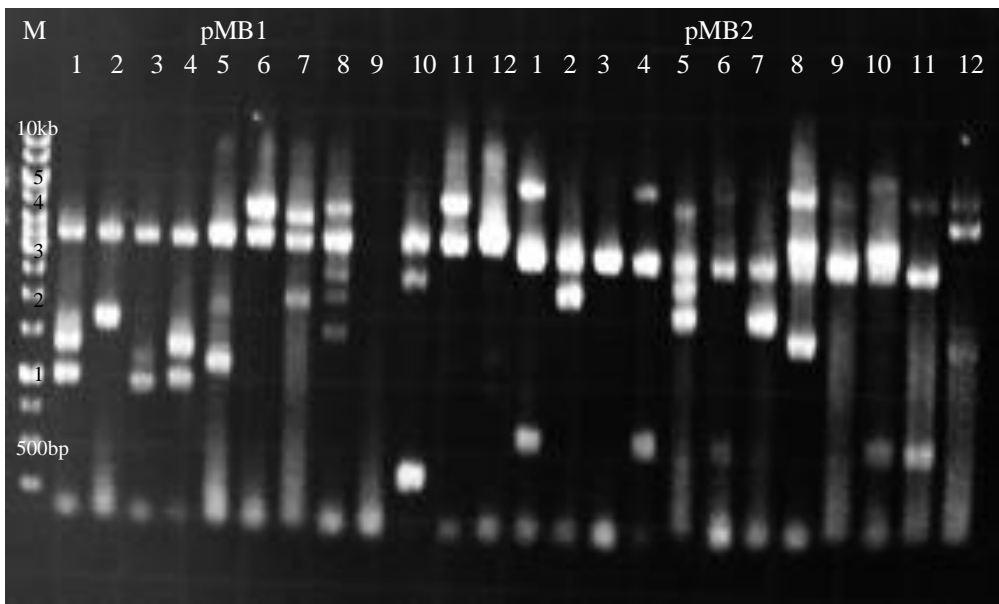


Abbildung IV-50 Darstellung der Gelelektrophorese der Ergebnisse der ‚Inverse-PCR‘ mit 100 ng ‚Ligationsprodukt‘ des DNA-Verdaus mit den Primern pMarA_1/ pMarA_2. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Klone 1-12 der pMB1-Transposon-Mutanten und die für die Klone 1-12 der pMB2-Transposon-Mutanten. In der ersten Spur in der 1 kb-DNA-Marker aufgetragen.

IV.2.3.2 Mutagenese-Prozedur 2

Bei der Prozedur 2 wurden die Plasmide, wie in Prozedur 1, über Konjugation bei 30°C in *B. licheniformis* MW3 eingebracht (siehe III-2.8.2.2). Bei Erhalt des korrekten Plasmids erfolgte eine Selektion auf den Verlust des Plasmids und die Integration des Transposons bei den verschiedenen Temperaturen 37°C, 42°C bzw. 50°C in Flüssig-LB-Medium ohne Selektionsdruck, um die optimale Temperatur zu definieren, bei der einfache Transposon-Integrationen erfolgen. 100 µl der Bakterienkultur wurden anschließend auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und bei 37°C/42°C bzw. 50°C inkubiert. Diese wurden auf den Verlust des Plasmids und den Erhalt des Transposons mit einer PCR mit transposon- (TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev) und plasmid-spezifischen (Erm_fwd/ Erm_rev) Primern getestet. Bei Verlust des Plasmids wurde aus den entsprechenden Kolonien DNA isoliert, 5 µg dieser mit *EcoRI* geschnitten und damit parallel eine ‚Vectorette-(Bubble-) PCR‘ (siehe III.2.5.2) und eine Subklonierung durchgeführt, um die Integrationsorte des Transposons zu bestimmen.

Die Produkte der ‚Vectorette-(Bubble-) PCR‘ wurden anschließend zum Sequenzieren an die Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt und anschließend

Ergebnisse

mit BLAST ausgewertet. Die Ergebnisse der ‚Vectorette-(Bubble-)-PCR‘ zeigten eine Integration des Transposons an drei verschiedenen Orten im Chromosom (Tab. IV-7).

Die Identifizierung über eine ‚Subklonierung‘ wurde als Alternative durchgeführt, da sowohl die ‚Inverse-PCR‘ (IPCR) als auch die ‚Vectorette-PCR‘ keine zuverlässigen Ergebnisse lieferten. Für diese ‚Subklonierung‘ wurde der *E. coli* Vektor pUC19 und die DNA der erhaltenen Transposon-Mutanten mit *EcoRI* verdaut und anschließend ‚ligiert‘. So entstand ein Vektor, der das Transposon und die angrenzende unbekannte DNA-Sequenz von *B. licheniformis* enthielt, in die das Transposon integriert hat. Dieses Plasmid wurde anschließend in *E. coli* transformiert, wobei die Selektion auf LB-Patten mit 100 µg/ ml Ampicillin und 50 µg/ ml Kanamycin erfolgte. Durch diese Selektion konnten die *E. coli* Transformanten identifiziert werden, welche sowohl das pUC19 Plasmid als auch das Transposon enthielten. Für die Identifizierung des Integrationsortes des Transposons in das *B. licheniformis* Genom wurde aus den erhaltenen Transformanten das Plasmid isoliert und dieses mit einem Transposon-Primer (pMarA-1), der aus dem Transposon heraus in den unbekanntem DNA-Bereich liest, zum Sequenzieren zu der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) gegeben. Über BLAST-Vergleiche der erhaltenen Sequenz mit dem Genom von *B. licheniformis* DSM13 konnten die Orte der Integration identifiziert werden.

Die Ergebnisse der Subklonierung zeigten bereits nach der Plasmidisolierung aus *E. coli* verschiedene Größen der in den Transformanten enthaltenen Plasmide (Abb. IV-51) und ließ auf das Vorhandensein unterschiedlicher Genomabschnitte in unterschiedlichen Größen in das Plasmid vermuten.



Abbildung IV-51 Darstellung der Agorosegelelektrophorese der Plasmidisolierung der Subklonierung der Transposon-Integrierten. In den Spuren 1-11 sind verschiedene Plasmide der Subklonierung von unterschiedlichen Transposon-Integrierten dargestellt.

Ergebnisse

Die erhaltenen isolierten Plasmide wurden dann unter Verwendung des oben genannten Primers (pMarA_1), bei der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche der erhaltenen Sequenz mit der Sequenz von *B. licheniformis* zeigten bei den getesteten Transposon-Mutanten eine Integration an drei verschiedenen Orten im Chromosom von *B. licheniformis* MW3 (Tab. IV-8).

Tabelle IV-8 Darstellung der Ergebnisse zur Bestimmung des Integrationsortes der Transposon-Integrianten der Prozedur 2. Bei sechs Transposon-Integrianten wurden sechs verschiedene Integrationsorte im Chromosom von *B. licheniformis* MW3 identifiziert.

Klone	Methode	Ort der Integration	Genname
pMB1_1.1.1	Blasen PCR	Hyp. Protein	BLi03217
pMB1_3.4	Blasen PCR	Int. Region	OpuAA – gcvPB
pMB1_1.1.4	Blasen PCR	<i>ribD</i>	BLi02475
pMB1_1.4	Subklonierung	<i>ctc</i>	generelles Stress Protein <i>ctc</i>
pMB1_2.13	Subklonierung	Hyp. Protein	Potentielles MurF
pMB1_2.4	Subklonierung	tRNA	Modifikations GTPase TrmE

Die Resultate zeigten, dass das Transposon keine spezifischen Integrationsorte bevorzugte, sondern zufällig in das Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 integriert hat und somit für eine effiziente Mutagenese-Methode verwendet werden kann. In weiteren Arbeiten müsste darauf aufbauend ein effizienteres Protokoll entwickelt werden.

IV.2.4 Untersuchung der Funktion der Plasmide, pMB1 und pMB2, im *B. licheniformis* Stamm E

Die Anwendung des ‚mariner‘ Transposons wurde auch bei *B. licheniformis* E, einem anderem *B. licheniformis* Stamm untersucht. Deshalb wurden die in dieser Arbeit erzeugten Transposon-Plasmide pMB1 und pMB2 (siehe IV.1.2.2) ebenfalls für diesen Stamm angewendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in dem folgenden Abschnitt zusammengefasst.

Ergebnisse

IV.2.4.1 Untersuchungen zum Integrationsverhalten des Transposons *TnYLB1* im *B. licheniformis* Stamm E

IV.2.4.1.1 Experimente mit dem Transposon-Vektor pMB1

Der ‚mariner‘ Transposon-Vektor pMB1 wurde für eine Transposonmutagenese in dem *B. licheniformis* Stamm E getestet. Dafür wurde dieser Vektor bei einer Temperatur von 30°C in *B. licheniformis* E konjugiert (siehe III.2.8.2.2). Die Konjugation lieferte auf NB-Agar-Platten mit 50 mM Glukose und 5 µg/ml Erythromycin eine hohe Anzahl an Konjuganten, welche am folgenden Tag auf neue Platten mit demselben Medium übertragen und erneut über Nacht bei 30°C inkubiert worden sind. Zur Überprüfung auf Erhalt des Plasmids wurden die Konjuganten mit Hilfe einer PCR-Reaktion mit plasmid-spezifisch (Erm_fwd/rev) und transposon-spezifischen Primern (TnYLB1_fwd/rev) überprüft. Die Ergebnisse zeigten bei nur einigen Konjuganten den Erhalt des korrekten Plasmids. Diese wurden zur Selektion auf den Verlust des Plasmids und die Integration des Transposons über Nacht in 5 ml NB-Medium ohne Antibiotika bei der restriktiven Temperatur von 37°C im Reagenzglas inkubiert. Die erhaltenen Kanamycin-resistenten Kolonien wurden auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml XGal übertragen und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden am nächsten Tag dann auf eine mögliche Blaufärbung überprüft und ausschließlich diejenigen ausgewählt, die keine Blaufärbung aufwiesen. Diese Blaufärbung tritt immer dann auf, wenn das Plasmid noch in der Bakterienzelle enthalten ist. Es wurden aber nur die Kolonien benötigt, welche das Plasmid verloren haben. Bei diesen Kolonien müsste das Transposon in das Chromosom integriert haben, da ansonsten keine Kanamycin-Resistenz vorhanden gewesen wäre. Diese Kolonien wurden zur weiteren Überprüfung auf den Verlust des Plasmids erneut mit einer PCR-Reaktion mit plasmid- und transposon-spezifischen Primern (s.o.) getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die potentiellen Transposon-Mutanten außer Kolonie Nummer 1 keine Banden mehr für das Plasmid aufzeigten (Abb. IV-52).

Ergebnisse

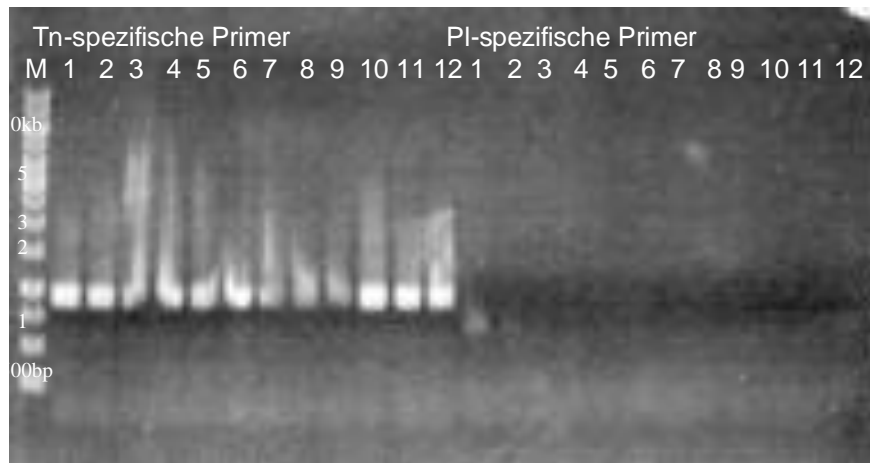


Abbildung IV-52 Darstellung der PCR zur Überprüfung auf Verlust des Plasmids und Integration des Transposons. Als Template für die PCR dienten 100 ng der isolierten DNA der Transposon-Integranen. Die Ergebnisse zeigten bei der Verwendung von transposon-spezifischen Primern (TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev) ein PCR-Produkt, bei der Anwendung von plasmid-spezifischen Primern (Erm_fwd/ Erm_rev) lediglich bei der Spur 1 ein PCR-Produkt. Dieses Ergebnis zeigt bei den getesteten Integranen 2-12 den Verlust des Plasmids.

Aus den Transposon-Mutanten (Klone 2-12), die bei der PCR den Verlust des Plasmids zeigten, wurde die chromosomale DNA isoliert (siehe III.2.3.1). Es folgte ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *HincII* (siehe III.2.4.1), von dem 2 µg für ‚Southern-Blot‘-Analysen (siehe III.2.14) eingesetzt wurden. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG markierten Sonde, welche mit den Primern TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev (siehe Tab. III-3) auf die Kanamycin-Resistenz des Transposons *TnYLB1* erstellt worden ist. Die Ergebnisse zeigten eine Integration des Transposons an z.T. verschiedenen Stellen in das Chromosom des *B. licheniformis* Stamm E (Abb. IV-53).

Ergebnisse

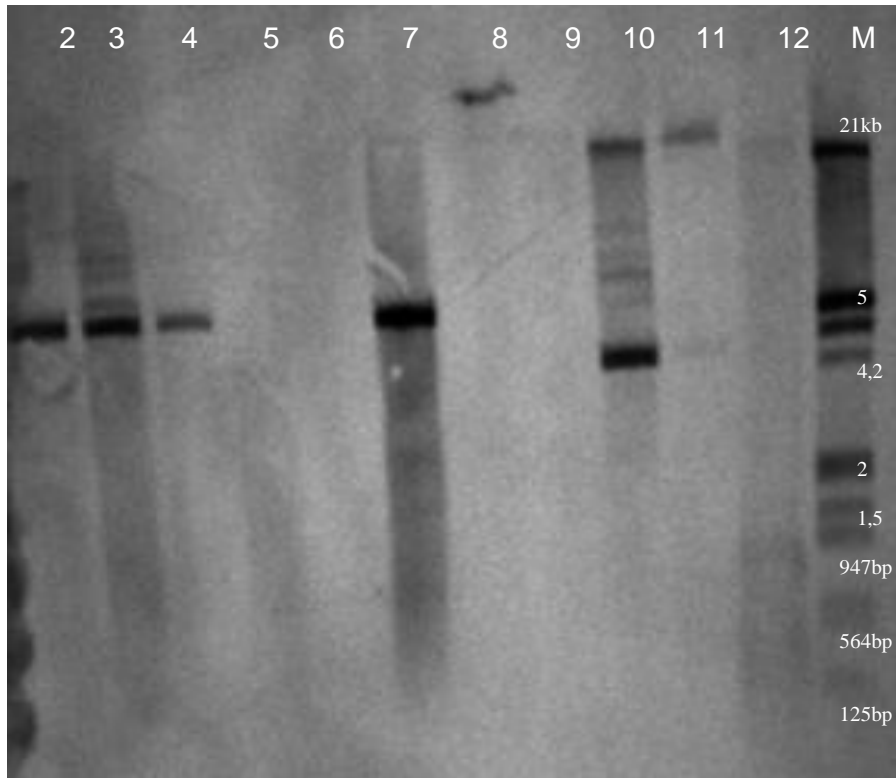


Abbildung IV-53 Darstellung der Ergebnisse der Southern Blot Analysen der Transposon-Mutanten des Produktionsstammes *B. licheniformis* E. Die DNA der Transposon-Mutanten 1-12 wurde isoliert und mit *HincII* vollständig geschnitten. Es wurden 2 µg DNA für die Analysen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG markierten Sonde, welche mit den Primern TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev erstellt worden ist. Es konnten einzelne und mehrfache Integrationen des Transposons an z.T. unterschiedlichen Stellen im Chromosom nachgewiesen werden.

Mit den Transposon-Mutanten, welche eine einzelne Transposon-Insertion aufwiesen, wurde im Anschluss eine ‚Inverse PCR‘ durchgeführt (siehe III.2.5.1), um ein PCR-Produkt für die anschließende Sequenzierung zu erhalten und auf diese Weise, den Integrationsort bestimmen zu können. Wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist, lieferte diese Methode allerdings nur bei wenigen Mutanten für die Sequenzierung verwendbare Produkte (Abb. IV-54).

Ergebnisse

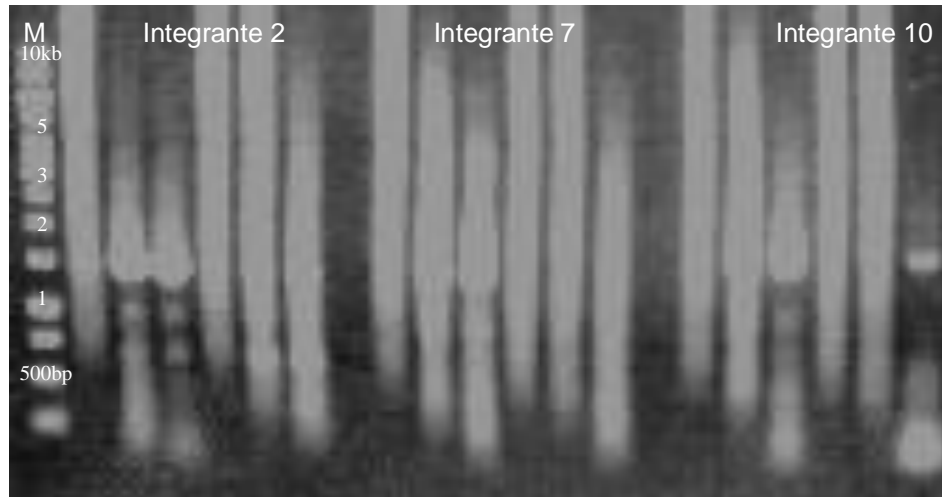


Abbildung IV-54 Darstellung der Ergebnisse der Inverse-PCR der Transposon-Mutanten des Produktionsstammes *B. licheniformis* E. Die DNA der Transposon-Mutanten wurde isoliert, mit *HincII* vollständig geschnitten. Es sind für drei verschiedene Transposon-Mutanten jeweils verschiedene DNA Konzentrationen (0.5 – 10µg) als Template getestet worden, die für die PCR-Reaktion mit den Primern pMarA_1/ PmarA_2 eingesetzt wurden.

Die Produkte wurden aufgereinigt (siehe III.2.5.4) und anschließend zu der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) zum Sequenzieren gegeben. Die Sequenzvergleiche zeigten eindeutig, dass in den potentiellen Transposon-Mutanten das Plasmid als Ganzes unspezifisch in das Chromosom integriert hat. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das verwendete Plasmid pMB1 aus dem Plasmid pE194 besteht, welches dafür bekannt ist, dass es unspezifisch in das Chromosom integrieren kann (Dempsey *et al.*, 1989) oder dass das Plasmid instabil ist und das ‚Springen‘ des Transposons nicht immer erfolgt. Die Mutagenese-Prozedur mit dem Vektor pMB1 wurde deshalb nicht weiter optimiert, sondern der Vektor pMB2 wurde getestet. Bei diesem Plasmid wurde der ‚temperatursensitive Origin‘ entfernt, wodurch eine von drei unspezifischen Integrationsstellen nicht mehr vorhanden war und die Wahrscheinlichkeit der Integration sinken sollte.

IV.2.4.1.2 Experimente mit dem Transposon-Vektor pMB2

Ziel der Verwendung des pMB2 Vektors für die Mutagenese war ein schnelles ‚Springen‘ des Transposons, um eine Integration des Plasmids und mehrfache Integrationen des Transposons ins Chromosom von *B. licheniformis* zu vermeiden. Der pMB2 Vektor

Ergebnisse

wurde über Konjugation von *E. coli* S17-1 in *B. licheniformis* E übertragen. Die Konjugation konnte bei 37°C durchgeführt werden, da der temperatursensitive ‚Origin‘ nicht mehr vorhanden ist und das Transposon sofort in das Chromosom integrieren muss, damit das Bakterium überleben kann. Die Konjugation war reproduzierbar sehr effizient. Allerdings war das Plasmid mit den Primern Erm_fwd/ Erm_rev nicht mehr nachweisbar, das Transposon dagegen konnte aber mit den Primern TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev nachgewiesen werden. Das ließ vermuten, dass das Plasmid bereits nach der Konjugation verloren gegangen ist und das Transposon inseriert hat.

Die DNA dieser potentiellen Transposon-Mutanten wurde isoliert (siehe III.2.3.1), mit *HincII* verdaut (siehe III.2.4.1) und 2 µg der DNA anschließend für ‚Southern Blot‘ Analysen (siehe III.2.14) verwendet. Hybridisiert wurde auch hier mit einer DIG markierten Sonde auf die Kanamycin-Resistenz des ‚mariner‘ Transposons TnYLB1. Die Ergebnisse der ‚Southern Blots‘ zeigten allerdings zweifach Integrationen mit ähnlichen Signalen (Abb. IV-55).

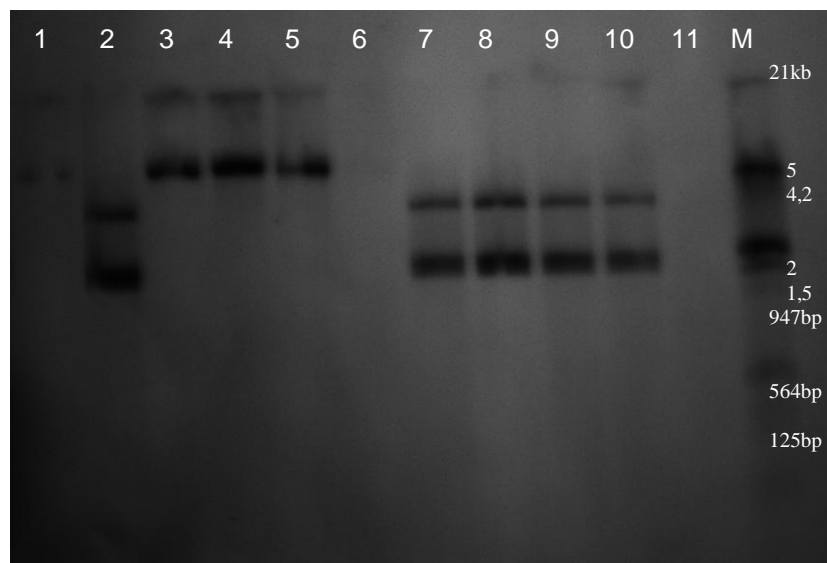


Abbildung IV-55 Darstellung der Ergebnisse des Southern Blots zur Identifizierung des Integrationsverhaltens des Transposons unter Verwendung des Transposon-Vektors pMB2. Die DNA der Transposon-Mutanten 1-12 wurde isoliert und mit *HincII* vollständig geschnitten. Es wurden 2 µg DNA für die Analysen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG markierten Sonde, welche mit den Primern TnYLB1_fwd/ TnYLB1_rev erstellt worden ist. Es wurden Signale mit zweifachen Integrationen des Transposons meist an denselben Orten im Chromosom von *B. licheniformis* E erhalten. Mit M ist der Marker (‚DNA Molecular Weight Marker III‘, Roche) aufgetragen

Ergebnisse

Aufgrund der mehrfachen Integrationen des Transposons an scheinbar denselben Stellen im Chromosom von *B. licheniformis*, schlossen sich keine weiteren Experimente zur Identifizierung des Integrationsortes an. Nach mehreren Reproduktionen der Ergebnisse wurden die Experimente mit dem Vektor pMB2 nicht weiter fortgeführt.

IV.3 Erstellen eines sporulations-defizienten *B. licheniformis* MW3

Mit Hilfe der Transposonmutagenese-Methode sollte es ermöglicht werden weitere Gene des Acetat-Metabolismus zu identifizieren. Die Methode könnte aber auch für die Definition eines ‚Core-Genoms‘ für *B. licheniformis* verwendet werden. Besonders interessant wäre dabei, zu untersuchen, welche Gene für den Produktionsprozess essentiell sind, wofür Modellfermentationen durchgeführt werden müssten. Da *Bacillus* hitzeresistente Sporen ausbildet, welche das Öffnen ein Autoklavieren des Fermenters überleben können, wurde ein Stamm konstruiert, welcher keine hitzeresistenten Sporen mehr ausbilden kann. Im Anschluss wurden seine Sporulationseigenschaften untersucht.

IV.3.1 Deletion des SpoIV-Homologs *yqfD* in *B. licheniformis* MW3

Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass das *yqfC-yqfD-phoH*-Operon an der Sporulation beteiligt ist (Wittchen *et al.*, 1998). Deshalb wurde in *B. licheniformis* DSM13 nach einem Homolog zu diesem Operon gesucht und identifiziert (Veith *et al.*, 2004; Nahrstedt *et al.*, 2005). Eines der Gene dieses Operons, das *yqfD*, wurde als ein SpoIV Homolog beschrieben und es ist bekannt, dass Deletionen von Genen dieser Sporulationsphase meist in einem totalen Verlust der Hitzeresistenz der Sporen resultieren, da kein Cortex mehr gebildet werden kann (Nahrstedt *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das *yqfD* Gen deletiert (Abb. IV-56).

Ergebnisse

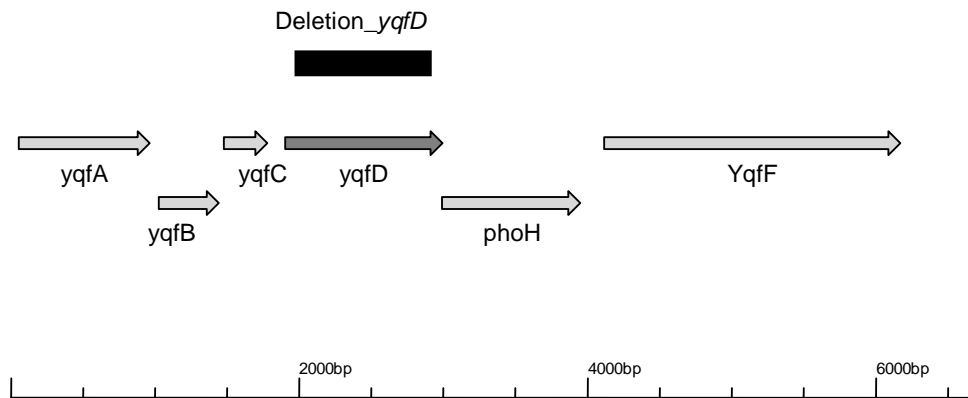


Abbildung IV-56 Physikalische Karte der Region des *yqfD*-Operons von *B. licheniformis* DSM13. FA stellt die Flanke A dar, welche mit den Primern *yqfD_FA_fwd/ yqfD_FA_rev* konstruiert worden ist. FB stellt die Flanke B dar, welche mit den Primern *yqfD_FB_fwd/ yqfD_FB_rev* erstellt worden ist. Die Deletion beträgt 900 bp. Die umliegenden Gene sind entsprechend beschriftet.

Für die Erstellung der Deletions-Mutante wurde über die Methode des ‚GeneSOEing‘ (siehe III.2.6) zunächst ein Deletions-Konstrukt erzeugt. Dabei wurden über zwei PCR-Reaktionen mit den Primern *yqfD_FA_fwd/yqfD_FA_rev* bzw. *yqfD_FB_fwd/ yqfD_FB_rev* die Flanken A (784 bp) und B (692 bp) erzeugt, welche an den zu deletierenden Bereich grenzten. In einer sich anschließenden PCR-Reaktion mit den Primern *yqfD_FA_fwd/ yqfD_FB_rev* wurden die Flanken fusioniert und dadurch ein Deletionskonstrukt von 1476 bp erstellt. Dieses wurde anschließend über die Schnittstellen *EcoRI/ BamHI* in das Mutagenese-Plasmid pKVM1 (Rachinger, Dissertation, 2010) kloniert und in *E. coli* S17-1 transformiert. Eine Überprüfung auf die Korrektheit des Plasmids erfolgte mit Hilfe eines Restriktionsverdau der, aus den Transformanten, isolierten Plasmide mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI*, wodurch das Deletionskonstrukt wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten wurde. Das korrekte Plasmid wurde anschließend erfolgreich in den *B. licheniformis* Stamm MW3 konjugiert. Die erhaltenen Konjuganten wurden anschließend für eine Integration des Plasmids angezogen und die erhaltenen Integrianten dann in LB-Medium ohne Selektionsdruck zu einem zweiten Rekombinationsereignis gezwungen, wobei das Plasmid verloren geht. Die erhaltenen Kolonien wurden auf den Erhalt der Deletion per PCR mit 100 ng isolierter DNA und chromosomalen Primern (*yqfD_check_fwd/ yqfD_check_rev*), welche weit außerhalb der Flanken lokalisiert sind, getestet. Bei einer erfolgreichen Deletion des *yqfD* Gens, wurde für den Deletionsstamm ein

Ergebnisse

900 bp kleineres Produkt als für den Ausgangsstamm erwartet. Wie in Abbildung IV-57 dargestellt ist, konnten die Ergebnisse dieser PCR den Erhalt der Deletion bestätigen.

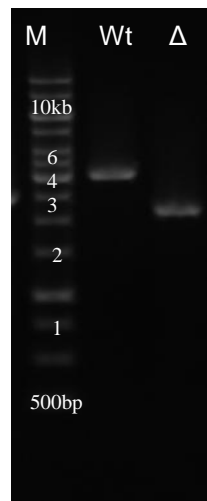


Abbildung IV-57 Darstellung der Ergebnisse einer Agarose Gelelektrophorese zur Überprüfung der Deletion. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, welche außerhalb der erzeugten Deletion lokalisiert sind (yqfD_check_fwd/ yqfD_check_rev; siehe Material und Methoden, Tabelle III-4). Als Template für die PCR dienten 100 ng chromosomale DNA. Aufgetragen wurden 500 ng PCR-Produkt. M stellt den 1 kb Marker dar, Wt stellt das PCR-Produkt für den Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 dar und Δ stellt das PCR-Produkt für den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delyqfD.

Zur weiteren Überprüfung der Deletions-Mutante wurde das erhaltene PCR-Produkt anschließend sequenziert und die erhaltene Sequenz mit Hilfe von BLAST Analysen mit der Sequenz des Ausgangsstammes *B. licheniformis* DSM13 verglichen. Die Ergebnisse konnten den Erhalt der korrekten Deletion bestätigen (Siehe Anhang).

Das verwendete Plasmid besteht zum großen Teil aus dem Vektor pE194, welcher die Eigenschaft besitzt, gelegentlich unspezifisch in das Chromosom von *Bacillus* zu integrieren. Für den Nachweis des Plasmidverlustes wurden ‚Southern Blot‘ Analysen (siehe III.2.14) mit einer DIG markierten Sonde auf die Erythromycin-Resistenz (siehe IV-2) des Plasmids durchgeführt, welche mit Hilfe einer PCR mit den Primern Erm_fwd/ Erm_rev erstellt worden ist. Es konnte kein Signal für die Erythromycin-Resistenz des Plasmids in der Deletionsmutante detektiert werden. Bei der die Positivkontrolle aber schon (Abb. IV-58). Das bedeutet, dass das Plasmid in der erzeugten Deletions-Mutante nicht mehr vorhanden war und eine ‚clean deletion‘ von dem Gen *yqfD* erzeugt werden konnte.

Ergebnisse

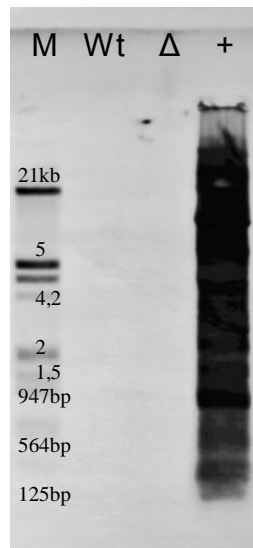


Abbildung IV-58 Darstellung der Ergebnisse der Southern Blot Analysen der Deletion von *yqfD*. Die Detektion erfolgte mit einer Sonde auf die Erythromycin-Resistenz (Primer für die nötige PCR: Erm_fwd/ Erm_rev) des verwendeten Plasmids durchgeführt, um dessen Verlust nachzuweisen. Je Spur wurden 2 µg mit *EcoRI* vollständig verdaute DNA aufgetragen. M stellt den 1 kb Marker dar, Wt stellt das PCR-Produkt für den Ausgangsstamm *B. licheniformis* MW3 dar und Δ stellt das PCR-Produkt für den Deletionsstamm *B. licheniformis* MW3delyqfD.

IV.3.2 Phänotypische Untersuchungen zur Deletions-Mutante von *yqfD*

Da das Ziel der Konstruktion dieser Deletions-Mutante die Erzeugung eines sporulations-defizienten *B. licheniformis* MW3 Stammes war, wurde in sich anschließenden phänotypischen Untersuchungen die Fähigkeit zur Sporulation der erzeugten Deletions-Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm untersucht (siehe III.2.10.2). Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung IV-59 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die erzeugte Deletions-Mutante in Schaeffer's Sporulationsmedium nicht mehr in der Lage war hitzeresistente Sporen zu produzieren. Dieses Verhalten zeigte, dass dieser Stamm zukünftig unbedenklich für Modellfermentationen eingesetzt werden kann.

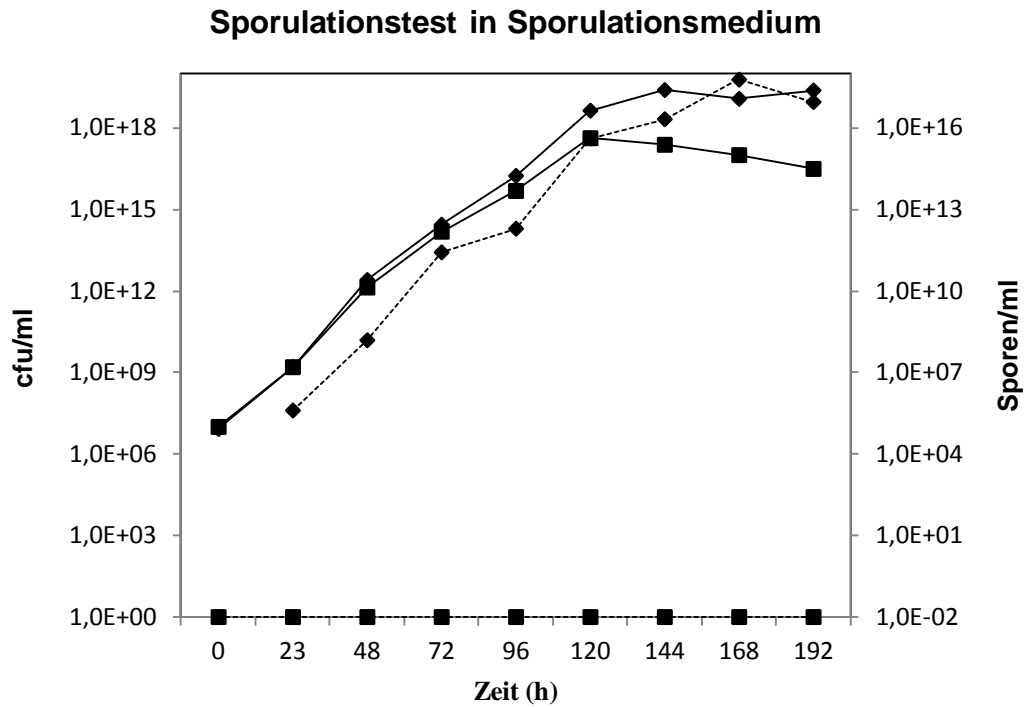


Abbildung IV-59 Darstellung der Ergebnisse des Sporulationstests. Es wurde mit je drei Replikaten gearbeitet. Aufgetragen ist ein repräsentatives Ergebnis. In \blacklozenge dargestellt sind die Ergebnisse für *B. licheniformis* MW3 und in \blacksquare dargestellt die Ergebnisse des Deletionsstammes *B. licheniformis* MW3delyqfD. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anzahl an koloniebildenden Einheiten an, die gestrichelten Linien die Anzahl der Sporen.

V. Diskussion

Thema dieser Arbeit waren Untersuchungen des C2-Metabolismus von *B. licheniformis* DSM13. Der Modellorganismus und nahe Verwandte *B. subtilis* ist nicht zu Wachstum auf Substraten wie Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol fähig. Dadurch unterscheidet er sich erheblich von *B. licheniformis*. Dieser Umstand macht letzteren zu einem geeigneten Modellsystem für die Untersuchung der am C2-Metabolismus von Bacillen beteiligten Stoffwechselwege. Die dazu durchgeführten Untersuchungen erfolgten in erster Linie mit Hilfe einer in unserem Labor entwickelten gerichteten Mutagenese-Methode. Außerdem wurden erste Experimente für die Entwicklung einer ungerichteten Transposonmutagenese zur Identifizierung unbekannter Gene dieses Stoffwechsels durchgeführt. Diese Methode könnte auch für viele weitere Fragestellungen an dem biotechnologisch sehr relevanten *B. licheniformis* eingesetzt werden.

V.1 Glyoxylatzyklus von *B. licheniformis* DSM13

Die Fähigkeit von *B. licheniformis* DSM13 auf Substraten, welche über C2-Metabolite abgebaut werden, als einzige Kohlenstoffquelle wachsen zu können erlaubt detaillierte experimentelle Untersuchungen dieses Stoffwechsels. Sie stellt einen signifikanten Unterschied zum Metabolismus von *B. subtilis* dar, welcher einen Modellorganismus für *Bacillen* darstellt. Über die Regulation des C2-Metabolismus von *B. licheniformis* DSM13 ist noch nicht viel bekannt, da er bis zu der Annotation des Genoms im Jahre 2004 (Veith *et al.*) mikrobiologisch kaum zugänglich war. Deshalb wurde auch erst im Jahre 2008 ein Protokoll zur Deletion von Genen entwickelt (Waschkau *et al.*), welches in unserem Labor durch Eilika Wülfing und Michael Rachinger so optimiert werden konnte, dass effizient gezielte Deletionen gesetzt werden konnten.

Während der Annotation im Jahre 2004 (Veith *et al.*, 2004) fiel das Vorhandensein von Homologen zu einer Malat-Synthase und einer Isocitrat-Lyase auf, welche für die Anwesenheit eines Glyoxylatzyklus sprachen. Dieser ist in Pflanzen vorhanden, wurde aber auch in einigen Bakterienarten, wie dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* und dem Gram-positiven GC-reichen Bakterium *C. glutamicum* gefunden (Kornberg *et al.*, 1957; Wendisch

Diskussion

et al., 1997). Es gibt aber noch keinerlei Untersuchungen in niedrigen GC Organismen wie *Bacillen*, weshalb diese Arbeit sich intensiv mit diesem Zyklus beschäftigte.

Erste Wachstumsversuche vorangegangener Arbeiten zeigten, dass *B. licheniformis* DSM13 in der Lage ist über C2-Metabolite abbaubare Substrate, wie Acetat, Acetoin oder 2,3-Butandiol, als einzige Kohlenstoffquellen zu nutzen (Veith *et al.*, 2004; diese Arbeit). Dieses Wachstumsverhalten konnte in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden (Abb. IV-10, IV-11 und IV-12) und sprach für das Vorhandensein eines funktionellen Glyoxylatzyklus.

Deshalb wurde in einem ersten Experiment mit Hilfe von ‚RLM-RACE‘ Analysen der Startpunkt des potentiellen Glyoxylat-Operons auf 230 bp ‚upstream‘ der Malat-Synthase und 51 bp ‚upstream‘ eines 45AS kleinen hypothetischen ORF`s bestimmt (siehe IV.1.1). Weitere Untersuchungen mit Hilfe von ‚RT-PCR-‘ und ‚Northern Blot Analysen‘ konnten bestätigen, dass das potentielle Glyoxylat-Operon von *B. licheniformis* DSM13 aus der Isocitrat-Lyase, der Malat-Synthase und einem 45 Aminosäure ‚hypothetical small protein‘ ‚upstream‘ der Malat-Synthase besteht (siehe IV.1.2.1). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Gene auf einem Transkript liegen und somit als Operon organisiert sind (siehe IV.1.2.2). Das Vorhandensein des HSP`s innerhalb des Glyoxylat-Operons stellt eine Besonderheit in der Struktur dar, da in keinem bisher untersuchten Glyoxylat-Operon anderer Bakterien ein Homolog zu diesem kleinen ORF identifiziert werden konnte. Demnach könnte es sich um eine vollkommen neue Art der Regulation handeln. Für nähere Untersuchungen der Glyoxylat-Gene und die Bestimmung ihrer Funktion wurden alle Gene des Operons deletiert und phänotypisch untersucht (siehe IV.1.3 und IV.1.4). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten für alle erzeugten Deletions-Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm einen totalen Verlust der Wachstums-Fähigkeit auf Substraten, wie Acetat (Abb. IV-10), Acetoin (Abb. IV-11) oder 2,3-Butandiol (Abb. IV-12), als einziger Kohlenstoffquelle. Dass die Deletions-Mutante des HSP`s ebenfalls diese Fähigkeit verloren hat zeigt, dass sein Vorhandensein essentiell für die Funktion des Glyoxylatzyklus ist, sofern bei der Deletion nicht etwaige *cis*-ständige Sequenzmotive beschädigt wurden. In Medien (LB und MM + 50 mM Glukose), deren Substrate nicht über den Glyoxylatzyklus abgebaut werden konnte kein signifikanter Phänotyp detektiert werden (Abb. IV-13 und IV-14). Aufgrund der Neuheit eines potentiellen kleinen regulatorischen Proteins wurden in dieser Arbeit erste Hinweise auf die Funktion des HSP`s innerhalb des Glyoxylatzyklus untersucht. Detaillierte Studien dazu könnten in nachfolgenden Arbeiten folgen. Es könnten z.B. unter anderem Proteom-Analysen durchgeführt werden, um zu klären, ob es sich bei dem HSP

Diskussion

tatsächlich um ein kleines Protein handelt und es könnte der molekulare Mechanismus der Regulation untersucht werden.

Um ein wenig mehr über diesen kleinen ORF zu erfahren, wurde die Verbreitung von Homologen des HSP's in allen Bakterianarten mit Hilfe von genomweiten Sequenzvergleichen untersucht (siehe IV.1.5). Ein besonders interessantes Ergebnis war das Vorhandensein einer Homologie zu einem hypothetischen Protein ‚upstream‘ der Isocitrat-Lyase in *B. subtilis*. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten auch, dass Homologe dieses kleinen hypothetischen ORF's hauptsächlich in *Bacillen* vorkommen (siehe IV.1.5, Tab. IV-3). Dies könnte für eine Besonderheit in der Regulation durch diese Art von potentiellen kleinen Proteinen innerhalb dieser Organismengruppe sprechen. In den meisten *Bacillen* stehen die Homologen des kleinen hypothetischen Proteins aber in unterschiedlichem genomischen Kontext (siehe IV.1.5, Tab. IV-3). Das könnte dafür sprechen, dass es sich nicht nur um eine Besonderheit in der Regulation des Glyoxylatzyklus von *Bacillen* handelt, sondern um eine vollkommen neue Art der Regulation. Auffällig war auch das Vorhandensein von jeweils vier Cystein-Resten in den Sequenzen der Orthologen aller *Bacillen*. Diese könnten eine wichtige Rolle für die Funktion des potentiellen Proteins spielen, auf die später noch näher eingegangen wird.

Die erhaltenen Ergebnisse zu dem kleinen hypothetischen Protein in *B. licheniformis* ließen Vermutungen über dessen Funktion zu, welche aber in sich anschließenden Arbeiten untersucht und bestätigt werden müssten. Im Folgenden sind mögliche Funktionen des kleinen hypothetischen Proteins dargestellt. Eine erste Vermutung war, dass es sich eventuell um eine Art ‚small RNA‘ handeln könnte. Deshalb wurden bioinformatische Vergleiche durchgeführt, durch welche Strukturen einer ‚small RNA‘ erkannt werden sollten. Die Ergebnisse zeigten aber keinerlei Ähnlichkeiten zu bereits bekannten ‚small RNAs‘ oder vorhersagbare Möglichkeiten von RNA Sekundärstrukturen (persönliche Mitteilung von Heiko Liesegang, Universität Göttingen). Eine zweite Vermutung ist, dass es sich um eine Art ‚Mikroprotein‘ handeln könnte, welche in Pflanzen bekannt und bereits untersucht worden sind (Staudt *et al.*, 2010, Yun *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich um kleine Proteine, welche zwar Protein-Interaktions-Domänen beinhalten, aber keine funktionellen Domänen besitzen, die für die Aktivierung der Transkription oder die DNA-Bindung notwendig sind. ‚Mikroproteine‘ verhalten sich meist wie transkriptionelle Regulatoren, da sie an transkriptionelle Regulatoren binden können. Dadurch werden diese bei der Bindung an die

Diskussion

DNA behindert (Abb. V-1). Dadurch verhalten sie sich wie eine Art negativer Regulator, ähnlich wie die ‚Mikro-RNAs‘ bei mRNAs agieren (Staudt *et al.*, 2010, Yun *et al.*, 2008).

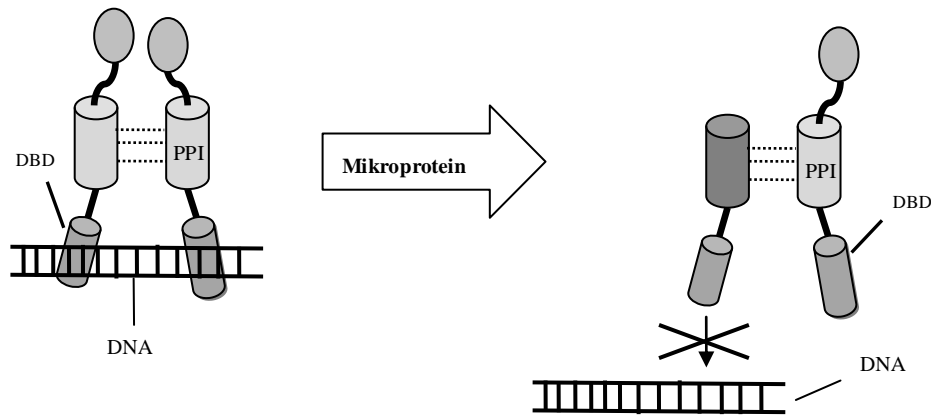


Abbildung V-1 Darstellung der Funktion von Mikroproteinen in Pflanzen. Ziele der Mikroproteine sind häufig transkriptionelle Regulatoren, welche als aktive Homodimere an DNA binden können. Mikroproteine behindern durch die Bildung von nicht-funktionellen heterodimeren Komplexen die Bindung an DNA. DBD: DNA-bindende Domäne; PPI: Protein-Protein Interaktions-Domäne (Nach Staudt *et al.*, 2010).

Über ‚Mikroproteine‘ in Prokaryonten ist bisher nur wenig bekannt (Hobbs *et al.*, 2011). Diese können aber durch eine rekombinante bakterielle Produktion hergestellt werden und dienen häufig therapeutischen Zwecken (Kolmar *et al.*, 2009/ 2010; Craik *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass Bakterien diese Art von Proteinen produzieren können, könnte eventuell dafür sprechen, dass diese ebenfalls regulatorische Funktionen innerhalb dieses Organismus übernehmen könnten. Es wäre also für fortführende Arbeiten interessant diese mögliche Funktion zu untersuchen. Es müsste aber zunächst geklärt werden, ob es sich bei dem kleinen hypothetischen Protein tatsächlich um ein ‚Mikroprotein‘ handelt. Das kleine hypothetische Protein könnte als eine Art Metallchelator agieren. Wie oben bereits erwähnt, war in allen potentiellen Homologen das Vorhandensein von vier konservierten Cystein-Resten auffällig (siehe IV.1.5, Tab. IV-3), welche ein Metallion binden und darüber z.B. den Metallgehalt im Cytoplasma regulieren könnten. Das bedeutet, durch das Binden von Metallen in den aktiven Zentren bestimmter Enzyme, etwa der Isocitrat Dehydrogenase könnte z.B. deren Aktivität vermindert oder unterbunden werden. In dem Bakterium *Helicobacter pylori* wurde z.B. bereits ein kleines Hitzeschock-Protein untersucht, welches eine Histidin- und Cystinreiche Domäne besitzt, mit Hilfe derer Metalle gebunden werden können (Cun *et al.*, 2008). Die

Diskussion

Cysteinreste könnten aber auch eine strukturelle Bedeutung für das HSP haben: Nur durch Komplexierung eines Metalls könnte es eine für seine Funktion bedeutende räumliche Struktur annehmen. Diese Funktion könnte dann etwa in der Bindung an die RNA-Polymerase bestehen, so dass diese spezifisch an der Transkription des Glyoxylat-Operons gehindert wird und abfällt. Eine Regulation könnte aber auch die Aktivität der Isocitrat Lyase betreffen. Die Ergebnisse einer Diplomarbeit zu dem Thema Glyoxylatzyklus in *B. licheniformis* DSM13 konnte eine Zunahme der Aktivität der Isocitrat-Lyase in Medium mit Acetat zeigen, aber lediglich eine geringfügige Abnahme der Aktivität der Isocitratdehydrogenase (Abb. V-2, aus der Diplomarbeit von Verena Schmidt, 2005). Dies zeigt, dass die Regulation vermutlich eher an der Isocitrat-Lyase erfolgt, als an der Isocitratdehydrogenase. Mit den Cystein-Resten könnte das kleine hypothetische Protein auch direkt an das aktive Zentrum der Isocitratdehydrogenase oder die Isocitrat-Lyase binden und dadurch dessen Aktivität hemmen. Die Steigerung der Aktivität der Isocitrat-Lyase (Abb. V-2 aus der Diplomarbeit, Verena Schmidt, 2005), lassen die Vermutung zu, dass die Cystein-Reste eine direkte Bindung an die Isocitrat-Lyase ermöglichen könnten. Dadurch würde diese aktiviert und das Isocitrat würde durch den Glyoxylatzyklus fließen.

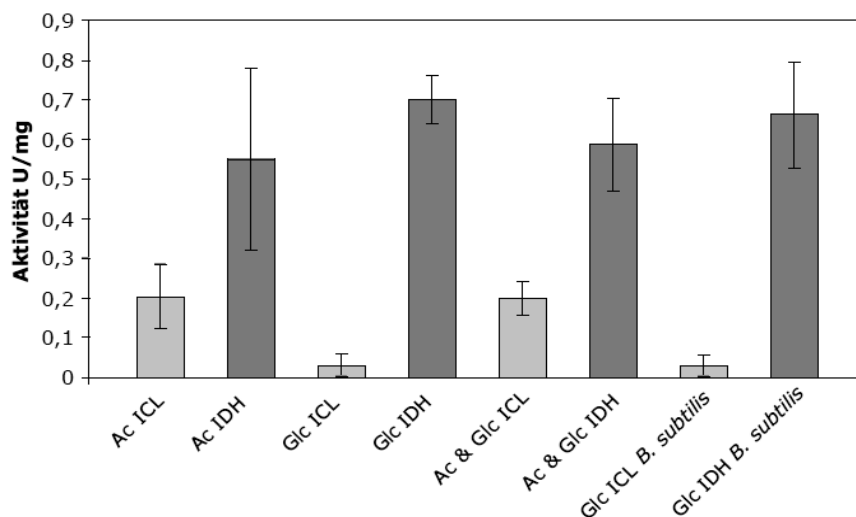


Abbildung V-2 Darstellung der Aktivitäten der Isocitrat-Lyase und Isocitratdehydrogenase in unterschiedlichen Medien. Ac: Minimalmedium mit 60 mM Acetat; Glc: Minimalmedium mit 50 mM Glucose; ICL: Isocitrat-Lyase; IDH: Isocitratdehydrogenase (Diplomarbeit, Verena Schmidt, 2005). In Anwesenheit von Acetat ist die Aktivität der IDH nur geringfügig vermindert, wogegen die Aktivität der ICL signifikant ansteigt.

Diskussion

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Aufklärung der Funktion des kleinen hypothetischen Proteins innerhalb der möglichen Regulation des Glyoxylatzyklus ein besonders interessantes Thema für nachfolgende Arbeiten ist, da es sich um eine vollkommen neue Art der Regulation handeln könnte. Interessante Ergebnisse dazu lieferten auch die, in dieser Arbeit durchgeführten Komplementations-Experimente. Eine Komplementation oder Überexpression des HSP's des Glyoxylat-Operons war mit Hilfe eines Expressions-Plasmids nicht möglich (siehe Abb. IV-19 und IV-21). Entweder ist der kleine Orf direkt in das Chromosom des Deletionsstammes MW3delHSP integriert (siehe Abb. IV-19) und zeigte ein wiedererlangtes Wachstum in Minimalmedium mit Acetat (siehe Abb. IV-19) oder es fand keine Integration statt und es konnte kein Wachstum nachgewiesen werden (siehe Abb. IV-19). Deshalb ist es für folgende Arbeiten wichtig zunächst zu untersuchen, ob es sich bei dem kleinen hypothetischen Protein tatsächlich um ein Protein handelt oder lediglich um eine funktionelle Einheit der Malat-Synthase. Dagegen spricht aber, dass die Malat-Synthase von *B. licheniformis* in der Anfangsregion homolog zu den Malat-Synthasen anderer Organismen ist. Nichts weist auf eine zusätzliche Domäne hin (Abb. V-3).

```

E.coli          1  MTEQATTTDELAFTRPYGEQEQILTAEAVEFLTELVTHTFPQRNKLLAARIQQQQIDIN
D. discoedium  1  MLRGIEIRGKVDKNVKSILTEECLTFLGELERRFGGIRKNLLQKRLDRQIDINN
B. anthracis   1  MSTQTSRVTLVGEMLPAYNEILTPEALSFLKELHENFNERRIELLQKRMKKQQKIDA
B. licheniformis 1  MKTEEKRIHITGSINPHYEEILTKEAMEFIGRLERHFGGRRRELLHLRTIRQAEIDQ
                *          *** **  ** **  *  *  ** *  *  **
                T          ILT EA  FL EL  F  R  LL  R  Q  ID

E.coli          61  GTLPDFISETASIRDADWKIRGIPADLEDRRVEITGPVERKMVINALNANVKVFMADFED
D. discoedium  61  GILPSFLKDS DCKRATDKNWCSSVPLEIQDRRVEITGPTDRKMVINALNSGAKVFMADF
B. anthracis   61  GEFPKFLEETKRIREADWTIAKLPKDLEDRRVEITGPVDRKMVINALNSGAHLFMADFED
B. licheniformis 61  GKNPCFLAETHIREADWTVAPLPRDLEDRRVEITGPVDRKMVINALNSGAKVFMADFED
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                G  P  FL  ET  IR  ADW  P  DLEDRRVEITGPVDRKMVINALNANVKVFMADFED

E.coli          121  SLAPDWNKVIDGQINLRDAVNGTISYTNAGKIYQLKPNPAVLICRVRLHLPEKHVWTW
D. discoedium  121  EDANCPNWENSIHGQQNMIDANNRTISFTSAEGRKYELNKQVAVLFRPRGWHLNEDHL
B. anthracis   121  SNSPTWENAIIEGQINLRDAVKGITISHKNENGKEYRLNSKTAVLIVRPRGWHLLEEKHMVQ
B. licheniformis 121  ANSPTWKNCIEGQVNLRDVARGTISFTNEQGKRYELKENPAVIMVRPRGWHLLEEKHVLI
                *  *          **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                P  W          GQ  NLRDAV  GTIS  NE  GK  Y  L  N  AV  R  RG  H  EK

```

Abbildung V-3 Multiples Alignment der Anfänge der Malat-Synthasen von *E. coli*, *Dictyostelium discoedium*, *B. anthracis* und *B. licheniformis* DSM13. Es besteht eine hohe Homologie der Anfänge der Malatsynthasen von *E. coli* und den Malat-Synthasen der *Bacillus* Stämme.

Desweiteren spricht gegen diese Theorie, dass ein Homolog des HSP's bei *B. subtilis* vor der Isocitrat-Lyase und nicht vor der Malat-Synthase lokalisiert ist (siehe Abb. IV-15B).

Diskussion

Es könnte aber auch sein, dass die Deletion die Shine-Dalgarno Sequenz der nachfolgenden Malat-Synthase beschädigt hat, so dass deren Translation verhindert wurde. Dies muss mit weiteren Deletionen in der Region des kleinen hypothetischen Proteins geprüft werden. Zuletzt muss auch noch die Möglichkeit geprüft werden, dass es sich doch nicht um ein kleines Protein handelt, sondern um eine völlig neuartige und damit auch nicht vorhersagbare ‚small RNA‘. Dagegen spricht allerdings die hohe Konserviertheit des Motivs aus 4 Cysteinen auf Aminosäureebene, während auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz keine Homologien zu beobachten waren.

Besonders interessant bei den Ergebnissen der Komplementation-Versuche war die toxische Wirkung des Glyoxylat-Operons aus *B. licheniformis* auf unterschiedliche *E. coli* Stämme. In der hier vorliegenden Arbeit wurde näher untersucht, welche Gene des Glyoxylat-Operons aus *B. licheniformis* die Toxizität für *E. coli* bewirken. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Kombination des hypothetischen Proteins mit der Malat-Synthase für *E. coli* toxisch ist (siehe Abb. IV-28). Dies ließ erneut den Schluß zu, dass es sich um eine neue Art der Regulation handeln könnte. Das HSP könnte z.B. in der Lage sein an sehr wichtige Proteine in *E. coli* zu binden und so das Zellwachstum zu verlangsamen oder sogar die Zellen absterben zu lassen. Insgesamt zeigten die Komplementations-Versuche, dass eine intensive Untersuchung des kleinen hypothetischen Proteins sehr interessant sein wird.

V.2 Das *acu*-Operon in *B. licheniformis* DSM13

Der Acetoin-Metabolismus wurde in *B. subtilis* bereits untersucht, obwohl dieser im Gegensatz zu *B. licheniformis* DSM13 Acetoin lediglich verwerten kann, wenn ihm zusätzliche Kohlenstoffquellen wie z.B. Glukose zur Verfügung stehen. Grundy *et al.* (1994) legten dabei ihren Focus vorwiegend auf die Regulation des Acetoinabbaus durch das *acu*-Operon. Die Gene *acsA*, welches für die Acetyl-Coenzym-A-Synthetase kodiert, und die Gene *acuABC* downstream von *ccpA*, einem globalen Regulator für die Glukose-reprimierte *amyE* Expression konnten identifiziert werden (Grundy *et al.*, 1993). Während der Annotation von *B. licheniformis* DSM13 konnten Homologe dieser Gene identifiziert werden (Veith, Dissertation, 2004), welche innerhalb dieser Arbeit auf ihre Funktion hin untersucht worden sind. Für *B. subtilis* ist bekannt, dass die Aktivität von AcsA durch die Gene *acuA* und *acuC* *in vitro* reguliert wird. Untersuchungen mit aufgereinigten Proteinen zeigten, dass AcuA Acetyl-CoA für die Acetylierung von AcsA verwendet, wodurch dieses inaktiviert wird. Das

Diskussion

AcuC Protein dagegen hat eine NAD⁺-unabhängige Deacetylase Aktivität auf AcsA, wodurch das Enzym aktiviert wird (Gardner *et al.*, 2006).

Diese Acetylierung war auch Ziel der Untersuchungen des Acetyl-CoA-Metabolismus in *B. licheniformis* DSM13, deshalb wurden in dieser Arbeit u.a. genau diese Gene erfolgreich deletiert. Bei einer Anzucht von *B. subtilis* in Medium mit Glukose und Acetat führte die Inaktivierung von *acsA* zu einem verminderten Wachstum, wodurch gezeigt werden konnte, dass es, wie in *B. subtilis*, für den Abbau von Acetat zu Acetyl-CoA zuständig ist (Grundy *et al.*, 1993). In *B. licheniformis* DSM13 zeigte die konstruierte Deletions-Mutante von *acsA* einen totalen Verlust seiner Wachstumsfähigkeit in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle (siehe Abb. IV-33). In Minimalmedium mit 23 mM Acetoin oder in 30 mM 2,3-Butandiol als alleinige Kohlenstoffquelle war im Vergleich zum Ausgangsstamm allerdings keine signifikante Veränderung des Wachstumsverhaltens zu erkennen (siehe Abb. IV-34, IV-35). Das zeigte eindeutig, dass AcsA auch in *B. licheniformis* DSM13, für den Abbau von Acetat zu Acetyl-CoA zuständig ist.

Für die Untersuchungen zur Acetylierung von AcsA durch das *acu*-Operon wurden in dieser Arbeit die Gene *acuA* und *acuC* von *B. licheniformis* DSM13 deletiert. Für *B. subtilis* ist bekannt, dass das *acu*-Operon durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert wird (Grundy *et al.*, 1994). Auch in *B. licheniformis* DSM13 konnte eine Repression des *acu*-Operons in Glukose gezeigt werden (Veith, Dissertation, 2004). Die Gene des *acuABC*-Operons zeigten sowohl in *B. subtilis* als auch in *B. licheniformis* DSM13 keine Ähnlichkeiten zu den oben erwähnten Genen des Acetoin-Dehydrogenase-Enzym-Systems, welches in anderen Bakterien als das Enzym-System für den Acetoin-Abbau bekannt ist (siehe II.4). Damit war eine Beteiligung am Acetoin-Metabolismus weitgehend auszuschließen, wie die phänotypischen Untersuchungen dieser Arbeit auch bestätigen konnten (siehe Abb. IV-34, IV-35). Deshalb konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Funktion dieses Operons als Acetylierungssystem für AcsA in *B. licheniformis* DSM13. Für die Deletionsmutante von *acuA* konnte in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als einzige Kohlenstoffquelle ein schnelleres Wachstum mit einer geringeren End-OD im Vergleich zum Ausgangsstamm festgestellt werden (siehe Abb. IV-33). Dies könnte für eine Beteiligung an der Repression der Expression von AcsA sprechen. Die geringere End-OD ist mit einer Limitation durch das Acetat zu erklären, welches durch das schnellere Wachstum früher verbraucht wird und damit in einer geringeren OD resultiert. In Medium mit 23 mM Acetoin konnte ein minimal schlechteres Wachstum detektiert werden, welches aber

Diskussion

nicht signifikant war (siehe Abb. IV-34). In Minimalmedium mit 30 mM 2,3-Butandiol oder einem 10 mM 7 AS-Mix konnte kein signifikanter Phänotyp definiert werden (siehe Abb. IV-35 und nicht dargestellt). In Schaeffer's Sporulationsmedium zeigte der Deletionsstamm MW3delacuA eine bessere Sporulationsrate als der Ausgangsstamm, in Acetoin eine schlechtere (siehe Abb. IV-36 und IV-37). Dieses Verhalten ließ die Vermutung zu, dass AcuA an dem Sporulationsprozeß in *B. licheniformis* DSM13 beteiligt ist. Dies stimmt mit den Untersuchungen zum *acu*-Operons in *B. subtilis* überein (Grundy *et al.*, 1993). Die Deletions-Mutante des *acuC* Gens zeigte ausschließlich einen signifikanten Phänotyp in Minimalmedium mit 60 mM Acetat als einzige Kohlenstoffquelle (siehe Abb. IV-33). Auf diesem Medium konnte ein totaler Wachstumsverlust beobachtet werden, welcher vermuten ließ, dass dieses Gen an der Aktivierung von *AcsA* beteiligt ist. Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass dieses Operon für ein putatives posttranslationales Acetylierungs/Deacetylierungs-Modifikations-System kodiert. Dieses hilft der Zelle, die CoA Homöostase während des Wachstums auf Acetat oder Acetoin aufrecht zu erhalten (Gardner *et al.*, 2006; Starai *et al.*, 2002/2003). Durch die Regulation der Transkription von *acsA* durch das *acu*-Operon wird in *B. licheniformis* die CoA Homöostase vermutlich ebenfalls aufrecht erhalten.

V.3 Das *aco*-Operon in *B. licheniformis* DSM13

Da das *acu*-Operon keinerlei Ähnlichkeiten zum Acetoin-Dehydrogenase-Enzym-System aufwies, wurde in *B. subtilis* nach einem Operon gesucht, welches diese Homologie aufweisen konnte. Dabei wurde das *aco*-Operon identifiziert, welches die nötigen Homologien aufweisen konnte (Huang *et al.*, 1999). In *B. licheniformis* konnte ebenfalls ein Homolog zu diesem Operon identifiziert werden (Veith, Dissertation, 2004), welches in dieser Arbeit als potentiell Operon des Acetoin-Metabolismus untersucht worden ist. In *B. subtilis* wird das Operon in Anwesenheit von Glukose reprimiert und in Anwesenheit von Acetoin und 2,3-Butandiol induziert (Ali *et al.*, 2001). In einer vorangegangenen Dissertation konnte dieses Verhalten auch für *B. licheniformis* DSM13 bestätigt werden (Veith, Dissertation, 2004).

Für nähere Untersuchungen der Funktion dieses Operons wurden in dieser Arbeit das *acoB* Gen und das potentielle Gen für den Regulator dieses Operons, *acoR*, deletiert und phänotypisch untersucht (siehe IV.1.8). Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletions-Mutante von *acoB* dieses Operons ihre Wachstumsfähigkeit in Minimalmedium mit 23 mM Acetoin

Diskussion

und in 30 mM 2,3-Butandiol verloren hat (siehe Abb. IV-35, IV-36). Das zeigt, dass dieses Operon eindeutig an dem Acetoin-Metabolismus beteiligt ist. Anhand dieser Ergebnisse konnte man auch erkennen, dass 2,3-Butandiol in *B. licheniformis* über Acetoin zu Acetyl-CoA abgebaut wird. In *B. subtilis* erfolgt die Regulation des Operons sowohl über Sigma L als auch über den Aktivator AcoR, dessen kodierendes Gen ‚downstream‘ der *acoABCL*-Region liegt. In diesem Bakterium wird AcoR in Anwesenheit von Glukose durch CcpA reprimiert und demnach ausschließlich in Abwesenheit von Glukose exprimiert (Ali *et al.*, 2001). Für *B. licheniformis* konnte durch die phänotypischen Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch hier AcoR als Regulator für dieses Operon fungiert, da die Deletions-Mutante ebenfalls einen Verlust der Wachstumsfähigkeit auf Medien mit Acetoin oder 2,3-Butandiol aufwies (siehe Abb. IV-35, IV-36). Eine Regulation durch CcpA konnte innerhalb dieser Arbeit leider nicht nachgewiesen werden, da die Deletionsmutante von *ccpA* nicht konstruiert werden konnte. Es war nicht möglich das zweite Rekombinationsereignis herbeizuführen. Die entstandenen Probleme könnten eventuell dadurch entstanden sein, dass dieses Gen essentiell für *B. licheniformis* ist und vermutlich als globaler Regulator fungieren könnte. Für fortführende Arbeiten wäre es interessant, ob diese Vermutung bestätigt werden kann. Dies könnte z.B. durch eine Überexpressionen dieses Gens und anschließende Transkriptionsanalysen erfolgen.

V.4 Entwicklung einer Methode zur zufälligen Transposonmutagenese

In dieser Arbeit wurde an einer Methode zur ungerichteten Transposonmutagenese gearbeitet, um zunächst relevante Gene des C2-Metabolismus zu identifizieren. Eine solche Methode wäre auch für viele andere Fragestellungen in *B. licheniformis* wertvoll. Dazu zählen auch angewandte Aspekte wie etwa die Definition produktionsrelevanter Gene für die Exoenzymproduktion.

Wichtig für eine zufällige Mutagenese-Methode ist ein Transposon, welches unspezifisch in das Chromosom des Zielbakteriums integrieren kann. Deshalb wurden in dieser Arbeit zwei Transposons getestet, welche diese Eigenschaft in dem nahen Verwandten *B. subtilis* aufzeigen konnten. Es wurden das *Tn10*-Transposon und das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* identifiziert, welche eine zufällige Mutagenese in *B. subtilis* ermöglichten (Steinmetz *et al.*, 1994; Le Breton *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden diese beiden Transposons auf

Diskussion

ihre Integrationseigenschaften hin getestet (siehe IV.2.1). Für die Experimente wurde der Original-Transposon-Vektor pMarB (LeBreton *et al.*, 2006) und der *Tn10*-Vektor pIC333 (Steinmetz *et al.*, 1994) verwendet, welche bereits für Transposonmutagenesen in *B. subtilis* verwendet worden sind. Mit Hilfe dieser Plasmide konnte durch die Anwendung von ‚Southern Blot‘ Analysen gezeigt werden, dass das ‚mariner‘ Transposon *TnYLB1* zufällig in das Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 integrieren kann, solange das Plasmid in replizierender Form in der Zelle vorhanden ist (siehe Abb. IV-43). Das *Tn10*-Transposon dagegen nicht. Die entwickelte Methode für den Vektor pMarB zeigte aber eine schlechte Effizienz bei der Erstellung der Transposon-Mutanten (siehe Tab. IV-7), welche mit der geringen Transferrate des Plasmids durch die Protoplastentransformation zu erklären war. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die Transferrate verbessert, indem die Vektoren, pMB1 und pMB2, konstruiert wurden. Diese zeigten eine effektivere Übertragung der Plasmide in *B. licheniformis* durch Konjugation. Es konnten einzelne Transposon-Mutanten identifiziert werden (siehe IV.2.3).

Die Ergebnisse für den *B. licheniformis* Stamm E zeigten eine hohe Anzahl von Plasmidintegrationen in das Chromosom. Die Ursache dafür konnte innerhalb dieser Arbeit nicht mehr identifiziert werden, aber eine sich anschließende Bachelor-Arbeit konnte zeigen, dass das erzeugte Plasmid pMB1 nicht stabil war. Die Sequenzierung des Plasmids pMB1 zeigte, dass die Transposase aus dem Plasmid herausgeschnitten wurde (Mühltaler, 2011). Damit waren die häufigen Integrationen des Plasmids in das Chromosom von *B. licheniformis* DSM13 zu erklären. Mit dem Verlust der Transposase ging einher, dass das Transposon nicht ins Chromosom ‚springen‘ konnte, wodurch die Zelle gezwungen war das gesamte Plasmid zu integrieren, um ihr Überleben unter den verwendeten Selektionsbedingungen zu sichern.

In der erwähnten Bachelor-Arbeit wurde aber unter der Verwendung des pMarB Vektors ein effizientes Transposon-Mutagenese-Protokoll entwickelt. Dafür mußte die Transferrate des Plasmids in *B. licheniformis* aber zunächst erhöht werden, um eine effiziente Methode erhalten zu können. Deshalb wurde ein optimiertes Protokoll zur Elektroporation angewendet (Dissertation, Rachinger, 2010; Bachelorarbeit, Mühltaler, 2011). Dieses war sehr effizient und deshalb war es, mit Hilfe der Vorkenntnisse aus dieser Arbeit, innerhalb dieser erwähnten Bachelorarbeit möglich, eine effiziente zufällige Transposonmutagenese für *B. licheniformis* DSM13 zu entwickeln (Bachelorarbeit, Mühltaler, 2011).

In den, in unserem Labor, momentan durchgeführten Arbeiten, konnte ein stabiler pMB1 erstellt werden und es ist bereits gelungen einige Transposon-Mutanten zu

Diskussion

identifizieren (durchgeführt von Michael Rachinger). Eine effiziente Methode könnte in sich anschließenden Arbeiten auf verschiedenen Stämme angewendet werden. Die nun entwickelte effiziente Methode könnte zum Anlegen einer Transposon-Mutanten Bibliothek verwendet werden.

V.5 Sporulations-defizienter *B. licheniformis* MW3

Mutanten, die durch gerichtete oder ungerichtete Methoden erzeugt werden, sollen oft durch gut kontrollierte Fermentationen in Laborfermentern charakterisiert werden. Dabei sind aber die sehr hitzeresistenten Endosporen von *B. licheniformis* ein großes praktisches Problem. So lassen sich dessen Sporen durch einmaliges autoklavieren des Fermenters nicht zuverlässig inaktivieren. In der Praxis führt lediglich eine Tyndallisierung zum Erfolg. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde für zukünftige Experimente ein sporulationsdefizienter Stamm von *B. licheniformis* erzeugt. So können verschiedene Stämme nacheinander im selben Laborfermenter fermentiert werden, ohne dass gegenseitige Kontaminationen befürchtet werden müssen.

Daher war es wünschenswert in dieser Arbeit einen sporulations-defizienten *B. licheniformis* MW3 Stamm zu konstruieren (siehe IV.3). Da die Sporulation in dem *B. licheniformis* Stamm E durch die Deletion des *yqfD* Gens, welches Homologien zu SpoIV Genen aufweist, ausgeschaltet werden konnte (Nahrstedt *et al.*, 2005), wurde dieses Gen in dieser Arbeit ebenfalls in dem *B. licheniformis* MW3 Stamm deletiert. Die erstellte Deletions-Mutante zeigte in den phänotypischen Untersuchungen keine Ausbildung von hitzeresistenten Sporen mehr (siehe IV.1.3.2). Das bedeutet, dass dieser Stamm unbedenklich für die Laborfermentationen eingesetzt werden kann. Dieser Stamm ist zudem molekularbiologisch leicht zugänglich, da zwei Restriktionssysteme deletiert worden sind (Waschkau *et al.*, 2008).

VI. Literaturverzeichnis

- Ali**, N.O., Bignon, J., Rapoport, G., Debarboille, M. (2001). Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183: 2497- 2504.
- Altschul**, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Alwine**, J.C., Kemp, DJ, Stark, GR (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74(12): 5350-4.
- Andersen**, PS., Smith, JM., Mygind, B. (1992). Characterization of the upp gene encoding uracil phosphoribosyltransferase of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 204(1): 51-6
- Arnaud**, M., Chastment, A., Déberbouillé, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(11): 6887-91.
- Ash**, C. Farrows, JAE., Wallbanks, S. & Collins, MD. (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit – ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 202-206.
- Ash**, C., Priest, Fergus. G., Collins, M. David (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64 253-260.
- Bender**, J., Kleckner, N. (1986). Genetic evidence that Tn10 transposes a nonreplicative mechanism. *Cell.* 45(6): 801-15.
- Burbulys**, D., Trach, K.A., und Hoch, J.A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phoshorelay. *Cell* 64: 545-552.
- Burkholder**, W.F., und Grossman, A.D. (2000). Regulation of initiation of endospore formation in *B. subtilis*. In Y.V. Brun and L.J. Shimkets (ed.), prokaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 151-166
- Cartman**, ST., Minton, NP. (2010). A ‘mariner’-based transposon system for in vivo random mutagenesis of *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* 76(4):1103-9. Epub 2009 Dec 18.
- Chang**, S., Cohen, S.N. (1979). High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol Gen Genet.* 168(1): 111-5.
- Chomczynski**, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. 201(1): 134-139 *Anal. Biochem.*
- Chung**,T, Klumpp, DJ., LaPorte, DC.(1988). Glyoxylate bypass operon of *Escherichia coli*: cloning and determination of the functional map. *J Bacteriol.* 170(1): 386-92.
- Cortay**, JC., Négre, D., Galinier, A., Duclos, B., Perrière, G., Cozzone, AJ. (1991). Regulation of acetate operon in *Escherichia coli*: purification and functional characterization of the iclR repressor. *EMBO* 10(3): 675-9.
- Craik**, DJ., Clark, RJ., Daly, NL. (2007). Potential therapeutic applications of the cyclotides and related cystine knot mini-proteins. *Expert opinion on investigational Drugs* 16(5): 595-604.
- Cramer**, A., Gerstmeier, R., Schaffer, S., Bott, M. Eickmanns, B.J. (2006). Identification of RamA, a novel LuxR-type transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. of Bacteriology* 188(7): 2554-2567.

Literaturverzeichnis

- Cun, S., Li, H., Ge, R., Lin, MC., Sun, H. (2008).** A histidine-rich and cysteine-rich metal-binding domain at the C terminus of heat shock protein A from *Helicobacter pylori*: implication for nickel homeostasis and bismuth susceptibility. *J Biol Chem* 283(22): 15142-51.
- Dempsey, L.A., Dubnau, D.A. (1989).** Identification of plasmid and *Bacillus subtilis* chromosomal recombination sites used for pE194 integration. *J. of Bacteriology* 171 (5): 2856-2865.
- Deng, W.-L., Chang, H.-Y. And Peng, H.L. (1994).** Acetoin catabolic system of *Klebsiella pneumoniae* CG 43: sequence, expression, and organization of the *aco* operon. *J. Bacteriol.* 176: 3527-3535.
- Errington, J. (2003).** Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* Vol. 1: 117-126.
- Gardner, J.G., Grundy, F.J., Henkin, T.M. and Escalante-Semerena, J.C. (2006).** Control of acetyl-coenzyme A synthetase (AcsA) activity by acetylation/deacetylation without NAD⁺ involvement in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188: 5460-5468.
- Garrity, G.M. & Holt, J.G. 2001.** Phylum BVI. *Chloroflexi* phy. nov. In D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.), Vol. 1: The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. In G.M. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.: 427-446.
- Gerstmeir, R., Cramer, A., Dangel, P., Schaffer, S., Eikmanns, B.J. (2004).** RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186(9): 2798-809.
- Gibson, T., und Gordon, R.E. (1975).** Endospore-forming rods and cocci, p. 529-575. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 5th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4645-4649.
- Greener, A., Callahan, M., Jerpseth, B. (1997).** An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol. Biotechnol.* 7(2): 189-95.
- Grundy, FJ, Turinski, AJ, Henkin, TM. (1994).** Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by *ccpA*. *J Bacteriol* 176 (15): 4527-33.
- Grundy, FJ, Waters, DA, Takova, TY, Henkin, TM. (1993).** Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 10(2): 259-71.
- Gui, L., Sunnarborg, A., Pan, B., LaPorte, DC. (1996).** Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon. *J Bacteriol.* 178(1): 321-4.
- Gui, L., Sunnarborg, A., LaPorte, DC. (1996).** Regulated expression of repressor protein: FadR activates *iclR*. *J Bacteriol.* 178(15): 4704-9.
- Guzman, LM. , Belin, D., Carson, MJ. ,Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* 177(14): 4121-30..
- Halling, S.M., and Kleckner, N. (1982).** A symmetrical six-base-pair target site sequence determines Tn10 insertion specificity. *Cell* 28: 155-163.
- Han, S.O., Inui, M., Yukawa, H. (2008).** Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic cycle and glyoxylate bypass. *Microbiology* 154(Pt 10): 3073-83.
- Han, S.O., Inui, M., Yukawa, H. (2008).** Transcription of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in tricarboxylic acid cycle and glyoxylate cycle. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15(4): 264-76.

- Hilbert**, D.W. and Piggot, P.J. (2004). Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and molecular biology reviews*. 68 (2): 234-262.
- Hobbs**, E.C., Fontaine, F., Yin, X. und Stolz, G. (2011) An expanding universe of small proteins. *Current opinion in Microbiology*. 14: 167-173.
- Horton**, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N., Pease, L.R. (1990). Gene splicing by overlap extensions: trailer-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8: 528-535.
- Hoyt**, J.C., Johnson, K.E. and Reeves, H.C. (1991). Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* isocitrate lyase. *Journal of Bacteriology* 173(21): 6844-6848.
- Huang**, M., Oppermann-Sanio, F.B., and Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J. Of Bacteriol.* 181: 3837-3841.
- Hynes**, M.F., Simon, R., Pühler, A. (1985). The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate Patc58. *Plasmid* 13: 99-105.
- Iordanescu**, S. (1976). Temperature-sensitive mutant of a tetracycline resistance staphylococcal plasmid. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol.* 35 (3): 257-64.
- Ivanova**, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., *et al.* (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87-91.
- Jiang**, M., Grau, R., und Perego, M. (2000). Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 303-310.
- Joseph**, P., Fantino, J.-R., Herbad, M.-L., Denizot, F. (2001). Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *B. subtilis*. *FEMS Microbiol. Letts.* 205: 91-97.
- Kim**, H.J., Kim, T.H., Kim Y., Lee, H.S. (2004). Identification and characterization of GlxR, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186(11): 3453-60.
- Kinoshita**, S. (1972). Amino acid production by the fermentation process. *Nature* 240 (5378): 211.
- Kleckner**, N., Morisato, D., Roberts, D., Bender, J. (1984). Mechanism and regulation of Tn10 transposition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 49: 235-44.
- Klinke**, S., Dauner, M., Scott, G., Kessler, B., Witholt, B. (2000). Inactivation of isocitrate lyase leads to increased production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3): 909-13.
- Konz** D, Doekel S, Marahiel MA.(1999). Molecular and biochemical characterization of the protein `Template` controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J Bacteriol.* 181(1):133-40.
- Kolmar**, H. (2008). Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. *FEBS* 275(11): 2684-2690.
- Kolmar**, H. (2010). Engineered cystine-knot miniproteins for diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn.* 10(3): 361-8.
- Kornberg**, H.L., Krebs, H.A. (1957). Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* 179(4568): 988-9.
- Kornberg**, H.L., Madsen, N.B. (1957). Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a glyoxylate bypass of the tricarboxylic acid cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 24(3): 651-3.
- Kornberg**, HL. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J.* 99(1): 1-11.
- Krebs**, H.A. and Johnson, W.A. (1980). The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4: 148.

- Kretzschmar**, U., Khodaverdi, V., Jeoung, J.-H., Görisch, H. (2008). Function and transcriptional regulation of the isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* 190(2): 151-8.
- Kristich**, C.J., Nguyen, Vy.T., Thing Le, Barens, A. M.T., Grindle S., and Dunny, G.M. (2008). Development and use of an efficient system for random ‘mariner’ transposon mutagenesis to identify novel genetic determinants of biofilm formation in the core *Enterococcus faecalis* genome. *Appl. And Envir. Microbiol.*, 74(11): 3377-3386.
- Krüger**, N., Oppermann, F.B., Lorenz; H. And Steinbüchel, A. (1994). Biochemical and molecular characterization of the *Clostridium magnum* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J Bacteriol.* 176: 3614-3630.
- Kunst**, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Lampe**, D.J., Churchill, M.E., and Robertson H.M. (1996). A purified ‘mariner’ transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO J.* 15: 5470-5479.
- LaPorte**, DC., Koshland, DE Jr. (1983). Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase as a demonstration of enhanced sensitivity in a covalent regulation. *Nature* 305 (5932): 286-90.
- LaPorte**, DC, Thorsness PE., Koshland, DE Jr. (1985). Compensatory phosphorylation of isocitrate dehydrogenase. A mechanism for adaption to the intracellular environment. *J Biol Chem* 260 (19): 10563-8
- LeBreton**, Y., Mohapatra, N.P., and Haldenwang, W.G. (2006). In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a ‘mariner’-based transposon. *Appl. And Env. Microb.* 72: 327-333.
- Liebl**, W. (1991). The genus *Corynebacterium*-nonmedical, p. 1157-1171. *In* A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. II. Springer-Verlag, New York.
- Loken**, J. P., and F. C. Stormer. (1970). Acetolactate decarboxylase from *Aerobacter aerogenes*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 14:133-137.
- Lopez**, J.M., and Thoms, B. (1976). Beziehungen zwischen katabolischer Repression und Sporulation bei *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* 109: 181-186.
- Maloy**, SR., Bohlander, M., Nunn, WD. (1980). Elevated levels of glyoxylate shunt enzymes in *Escherichia coli* strains constitutive for fatty acid degradation. *J Bacteriol.* 143(2): 720-5.
- Maloy**, SR., Nunn, WD. (1982). Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol.* 149(1): 173-80.
- Martinussen**, J., Glaser, P., Andersen, PS. Saxild, HH. (1995). Two genes encoding uracil phosphoribosyltransferase are present in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 177(1): 271-4.
- Maguin**, E., P. Duwat, T. Hege, S. D. Ehrlich, A. Gruss. (1992). New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 5633-5638.
- Munk**, K. (2001). *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg: Berlin.
- Mühlthaler**, B. (2011) Etablierung der Transposonmutagenese in *Bacillus licheniformis*. Bachelorarbeit an der Technischen Universität München.
- Nakano**, M.M. and Zuber, P. (1990). *Molecular Biology of Antibiotic Production in Bacillus*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10 (3): 223-240
- Nakano**, M.M., Dailly, Y:P:, Zuber, P. And Clark, D.P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* 179: 6749-6755.
- Nahrstedt** H, Waldeck J, Gröne M, Eichstädt R, Feesche J, Meinhardt F. (2005). Strain development in *Bacillus licheniformis*: construction of biologically contained mutants deficient in sporulation and DNA repair. *J Biotechnol.* 119(3): 245-54.

- Nimmo**, GA., Borthwick, AC., Holms, WH., Nimmo, HG. (1984). Partial purification and properties of isocitrate dehydrogenase kinase/ phosphatase from *Escherichia coli* ML308. *Eur J Biochem.* 141 (2): 401-8
- Nishimura**, T., Vertés, AA, Shinoda, Y., Inuc M., Yukawa H. (2007). Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl. Microbial Biotechnol.* 75(4): 889-97.
- Nunn**, WD. (1986). A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 50(2): 179-92.
- Ochman**, H., Gerber, A.S., Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.
- Oppermann**, F.B. and Steinbüchel, A. (1994). Identification and molecular characterization of the *aco* genes encoding the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.* 176: 469-485.
- Oppermann**, F.B., Schmidt, B. and Steinbüchel, A. (1991). Purification and characterization of acetoin: 2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase, dihydrolipoamide dehydrogenase, and dihydrolipoamide acetyltransferase of the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.* 173: 757-767.
- Perego**, M. (1997). A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8612-8617.
- Perego**, M. und Hoch, J.A. (2002). Two-component systems, phosphorelays, and regulation of their activities by phosphatases. In A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick (ed.), *B. subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. American Society for Microbiology, Washington D.C. p. 473-782.
- Perkins**, JB., Youngman, PJ. (1984). A physical and functional analysis of Tn917, a streptococcus transposon in the Tn3 family that functions in *Bacillus*. *Plasmid* 12(2):119-38.
- Petit**, M.A., Brund, C., Janniere, L., and Ehrlich, S.D. (1990). Tn10-derived transposons active in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 6736-6740.
- Polard**, P., Chandler, M. (1995). Bacterial transposases and retroviral integrases. *Mol. Microbiol* 15:13-23.
- Priest**, F. G. (1993). Systematics and Ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria, J. A. SonensHoch, and R. h. Losick, A.L., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 3-15.
- Priest**, FG. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.* 1977 Sep;41(3):711–753
- Priest**, F. G., Barker, M., Baillie, Les W. J., Holmes, Edward C., and Maiden, M. C. J. (2004). Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. *Journal of bacteriology*, p. 7959–7970
- Rachinger**, M. (2010). Stammdesign in *Bacillus licheniformis*. Dissertation an der Georg-August Universität Göttingen.
- Ramos** HC, Hoffmann T, Marino M, Nedjari H, Presecan-Siedel E, Dreesen O, Glaser P, Jahn D (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* 182:3072–3080
- Rao**, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Micribiol Mol Biol Rev* 62, 597-635.
- Read**, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N., Baillie, L. W., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Tettelin, H., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., *et al.* (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423, 81-86.
- Reinscheid**, D.J., Eikmanns, B.J. and Sahm, H. (1994a). Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 176 (12): 3474-3483.

- Reinscheid**, D.J., Eikmanns, B.J. and Sahm, H. (1994b). Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* 140: 3099-3108.
- Renna**, M.C., Najimudin, N., Wink, L.R. and Zahler, S.A. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J. Bacteriol.* 175: 3863-3875.
- Roberts**, R.B., Abelson, P.H., Cowie, D.B., Bolton, E.T., Britten, R.J.: (1951). Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Washington: Carnegie Institution of Washington.
- Robertson**, H.M. (1995). The Tc1-'mariner' superfamily of transposons in animals. *J. Insect Physiol.* 41: 99-105.
- Sandman**, K., Losick, R., Youngman, P. (1987). Genetic analysis of *Bacillus subtilis* spo mutations generated by Tn917-mediated insertional mutagenesis. *Genetics* 117(4): 603-17.
- Sasseti**, C.M., Boyd, D.H., Rubi E.J. (2001) Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12712-12717.
- Saz**, H.J. (1954). The enzymic formation of glyoxylate and succinate from tricarboxylic acids. *Biochem. J.* 58(3331st Meeting).
- Schaeffer**, P., Millet, J., Aubert, J.P., 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 704–711.
- Schallmeyer**, M., Singh, A., and Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50, 1-17.
- Schlegel**, H.G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. 7.Auflage Stuttgart;New York: Thieme Verlag.
- Silbersack**, J, Jürgen, B, Hecker, M, Schneidinger, B, Schmuck, R, Schweder, T (2006). An acetoin-regulated expression system of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(4): 895-903. Epub 2006 Aug 31.
- Simon**, M.J., Priefer, U.B., Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnol.* 1: 784-791.
- Smith**, C.V., Huang, C.C., Miczak, A., Russel, D.G., Sacchettini, J.C., Höner zu Bentrup, K. (2003). Biochemical and structural studies of malaete synthase from *Mycobacterium Behältnisrculosis*. *J. Biol. Chem.*
- Sneath**, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (1986). *Bergey 's manual of sytematic bacteriology*, Vol 2 (Baltimore, Williams & Wilkins).
- Southern**, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stackebrandt**, E., Ludwig, W., Weizenegger, M., Dorn, S., McGill, T.J., Fox, G.E., Woese, C.R., Schubert, W., Schleifer, K.H. (1987). Comparative 16S rRNA oligonucleotide analysis and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. *Journal Genetic Microbiology* 133(9): 2523-9.
- Starai**, V.J., Celic, I. Cole, R.N., Boeke, J.D. and Escalente-Semerena (2002). Sn2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* 298: 2390-2392.
- Starai**, V.J., Takahashi, H., Boeks, J.D. and Escalete-Semerena, J.C. (2003). Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2 protein function in *Salmonella enterica* and *Sacharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163: 545-555.
- Staudt**, A.C., Wenkel, S. (2010). Regulation of protein function by 'microproteins'. *12(1):35-42*. Epub 2010 Dec 10. *EMBO Rep*.
- Steinmetz**, M. & Richter, R. (1994). Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J Bacteriol* 176, 1761–1763.

Literaturverzeichnis

- Takami H.**, Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., *et al.* (2000). Complete genome sequence of the alkaphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 28, 4317-4331.
- Trach, K.A.**, und Hoch, J.A. (1993). Multisensory activation of the phosphorely initiating sporulation in *B. subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. *Mol. Microbiol.* 8:69-79.
- Tschech, A.**, and Pfennig, N. (1984). Growth yield increase linked to caffeine reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch Microbiol* 137, 163-167.
- Turinski, AJ**, Moir-Blais, TR, Grundy, FJ, Henkin, TM (2000). *Bacillus subtilis ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *J Bacteriol.* 182 (19): 5611-4.
- Vandeyar, MA.**, Zahler, SA. (1986). Chromosomal insertions of Tn917-mediated insertional mutagenesis. *J Bacteriol* 167(2): 530-4
- Veith, B.**, Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne A., Liesegang, H., Merkl, R., *et al.* (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbial Biotechnol* 7, 204-211.
- Wall, D.M.**, Duffy, P.S., DuPont, C., Prescott, J.F. Meijer, W.G. (2005). Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Inf. And Immunity* 73(10): 6736-41.
- Warner, HR.**, Rockstroh, PA. (1980). Incorporation and excision of 5-fluorouracil from deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 141(2): 680-6.
- Waschkau, B.**, Waldeck, J., Wieland, S., Eichstädt, R., Meinhardt, F. (2008). Generation of readily transformable mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78(1): 181-8.
- Wendisch, V.F.**, Spies, M., Reinscheid, D.J., Schnicke, S., Sahn, H., Eikmanns, B.J. (1997). Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch. Microbiol.* 168: 262-269.
- Williams, O.B.** and Morrow, M.B. (1928). The bacterial destruction of acetyl-methylcarbinol. *J Bacteriol.* 16:43-48.
- Wilson, A.C.**, Perego M., and Hoch J.A. (2007). New transposon delivery plasmids for insertional mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *J. Microbiol. Meth.*, 71(3): 332-335.
- Wittchen, K.D.**, Strey, J., Bültmann, A., Reichenberg, S., Meinhardt, F. (1998). Molecular characterization of the operon comprising the *spoIV* gene of *Bacillus megaterium* DSM319 and generation of a deletion mutant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 317-326.
- Wong, DT.**, Aji, S.J. (1955). Isocitrate in *Escherichia coli*. *Nature.* 176(4490): 970-1.
- Youngman, P.J.**, Perkins, J.B., and Losick R. (1983). Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80: 2305-2309.
- Youngman, P.J.**, Perkins, J.B., and Sandman, K. (1985). Use of Tn917-mediated transcriptional gene fusions to *lacZ* and *cat-86* for the identification and study of *spo* genes in *Bacillus subtilis*. Pp. 47-54. In J.A. Hoch and P. Setlow (ed.), *Molecularbiology and microbial differentiation*. ASM Press, Washington, D.C.
- Yun, J.**, Kim, S.G., Hong, S., Park, C.M. (2008). Small interfering peptides as a novel way of transcriptional control. *Plant Signal Behav.* 3(9): 615-7.
- Zahler, S. A.**, L. G. Benjamin, B. S. Glatz, P. F. Winter, and B. J. Goldstein. (1976). Genetic mapping of *alsA*, *alsR*, *thyA*, *kauA*, and *citD* markers in *Bacillus subtilis*, p. 35-43. In D. Schlessinger (ed.), *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Zukowski, M.** (1989). Production of commercially valuable products. In *Biotechnology handbook*, C. R. Harwood, ed. (New York, Plenum Publishing Corporation), pp. 311-337.

Anhang

Im Folgenden sind die Lokalisationen der Deletionen der erstellten Deletionsmutanten dargestellt. → stellt den Start eines Gens, einer Flanke oder der Deletion dar; ← kennzeichnet das Ende eines Genbereiches, Flankenbereiches oder Deletionsbereiches. Die Deletion der jeweiligen Gene sind in grau hervorgehoben

Lokalisation der Deletionen des *aco*-Operons

Deletion von *acoB*:

```
→ acoA
1   tatggaagag gcaactgacaa aggaaaaaacg agtgtggatg tatcaaaaaa tgctggaaat cgcgtatttc gaagatcagg ttcacagct gtttgctaaa
    M E E   A L T   K E K   A A V W   M Y Q   K L E   I R Y F   E D Q   V H Q   L F A K
    1           10           20           30

101  ggaatactgc cgggttttgt ccatctttac gccggagaag aagcggctgc tcgggcgctc tgcgctcatc tgaatgatga agacaccatc acgagcacac
    G I L   P G F   V H L Y   A G E   E A V   A A G V   C A H   L N D   E D T I   T S T
           40           50           60

201  atcgcggcca tgggcactgc attgcaaaaag ggtgcgactt gaaaggcatg atggccgaga tatacggaaa atctgcagga ctttgtaaag gaaaaggcgg
    H R G   H G H C   I A K   G C D   L K G M   M A E   I Y G   K S A G   L C K   G K G
           70           80           90
                                     → FA

301  atcgatgcat attgcagact ttgacaaaagg gatgctaggc gcaaacggaa tcgctcggcg gggatttctt ttggcctgcg gagcagctct cactgcaaag
    G S M H   I A D   F D K   G M L G   A N G   I V G   G G F P   L A C   G A A   L T A K
100           110           120           130

401  tataaaaaaga ctaaaaatgt aagcgtttgc tttttggcg acggcgccaa caaccagggg acatttcacg aagggatcaa cttgcccgcc atctggaagc
    Y K K   T K N   V S V C   F F G   D G A   N N Q G   T F H   E G I   N L A A   I W K
           140           150           160

501  tccctgtcat atttgcgcc gaaaacaacg ggtatggcga agcgactccg ttttcctatg cgtaagctg cgagtcgac gcagatcgtg cggcccgtta
    L P V   I F V A   E N N   G Y G   E A T P   F S Y   A S S   C E S I   A D R   A A A
170           180           190           200

601  tgggattccg ggcgttcgcg ttgatggaaa agatgcggcc gcggtcttcc aggtcgcggg cggggcgata gagcgtgcca aaaacggaga aggaccgacg
    Y G I P   G V R   V D G   K D A A   A V F   Q A A   G R A I   E R A   K N G   E G P T
           210           220           230

701  ctcattgagt gtatgacata ccggaactac ggccattttg aaggagatgc ccagcgctac aaaacaaatg aagaaaaagc ggtgcatcag gaagaaaaag
    L I E   C M T   Y R N Y   G H F   E G D   A Q R Y   K T N   E E K   A V H Q   E E K
           240           250           260

801  atgccattgc cgtgttcaaa agcgaactgc tggcaaaaag gctgatgagt gaagaagagc agtcgcggat tgaaaaagaa gttgaagaag cgtcggagga
    D A I   A V F K   S E L   L A K   G L M S   E E E   Q S R   I E K E   V E E   A V E
1270           1280           1290           1300
```

Anhang

acoA ← → acoB

901 agcggtcgca ttcagcgaaa aaagcgctta tccggaagaa accgaaactgc tgacggatgt atatgtatcc tattaattca tgaaggggga aggaaacatg
E A V A F S E K S A Y P E E T E L L T D V Y V S Y - F M K G E G N M
310 320 1

FA ↔ Deletion acoB

1001 acgagggaaa tcagcatgtc agccgcattg aatgaagcga tcaaacttgc gatgagaagg gacgatcacg tcattttaat gggggaagat gtcgcaggag
T R E I S M S A A L N E A I K L A M R R D D H V I L M G E D V A G
10 20 30 40

1101 gagcgaatgt cgatcatctg caggatgatg aagcatgggg cgggtgtgctc ggcgtcacga aagggattgt tcaggaattt ggacggggagc gcgtccttga
G A N V D H L Q D D E A W G G V L G V T K G I V Q E F G R E R V L
50 60 70

1201 tacgccgatc agtgaagcgg ggtacatcgg cgcagccatg gctgctgctt caaccggttt aaggccgatc gcggaattga tgtttaacga tttatcggga
D T P I S E A G Y I G A A M A A A S T G L R P I A E L M F N D F I G
80 90 100

1301 acatgtttgg accaggtgct gaaccagggga gcgaaattcc gctacatggt tggcggcaaa gcggaagttc cgattacgat ccggacgacc cacggcgccg
T C L D Q V L N Q G A K F R Y M F G G K A E V P I T I R T T H G A
110 120 130

1401 gctttagggc ggccgcccag cattcgcaaa gcttgtatgc cctatttaca agcattcccg gactgaaagt gattgtgccg tcgaccccgt acgacgcaaa
G F R A A A Q H S Q S L Y A L F T S I P G L K V I V P S T P Y D A
140 150 160 170

↔ FB

1501 aggattattg ctcgctgcga ttgaagatca ggaccgggtt atcttttttg aagacaaaac gctgtacaac atgacaggcg atgtgccgga agaataattac
K G L L L A A I E D Q D P V I F F E D K T L Y N M T G D V P E E Y Y
180 190 200

1601 acgcttccaa tcgaaaaagc agatatcaag cggaaaggcg ccgatgtaac gattggttga atcgggcaaac aggttcatac ggcgcttcaa gcggcggaac
T L P I G K A D I K R K G A D V T I V A I G K Q V H T A L Q A A E
210 220 230

1701 agctctcagc gcggggaatc gaagccgaaa tccttcatcc gcgaagcctt tcgcccgttg atgaagaggc cgtccttga tccgtagaaa aaacaacag
Q L S A R G I E A E I L D P R S L S P L D E E A V L A S V E K T N
240 250 260 270

1801 gcttgtgacg gtcgatgagg ccaatccgag atgcagcadc gccgaggata tcgcatcatt gccggcagat aaaggatttg attcgcttga cgcaccggtt
R L V I V D E A N P R C S I A A D I A S L A A D K G F D S L D A P V
280 290 300

1901 aaaaaggatg cggctccgca tacgccggtg ccattttcac cgcctcttga agacctgat ttgccgagc cgaaaaagt cgtgaacacc gtgcttgaga
K K V T A P H T P V P F S P P L E D L Y L P T P E K V V N T V L E
310 320 330

Anhang

```

    acoB ←                                     → acoC
2001  tgctcggaga aacatcaaca catacgggtg aaagattgga aaggagagga gaacatggct gtcgaagtgg tcatgccgaa attggggatg tcgatgaaag
      M L G   E T S T   H T V   - R L   E R R G   E H G   C R S   G H A E   I G D   V D E
      340                                         350                   1                         10

2101  aaggtacggt ttccgtctgg aataaaaaag tccgggaagc cgttgaaaaa ggagaaaagca ttgccagcat caattccgaa aaaatcgaaa tggaaatcga
      R R Y G   F R L   E - K   S R G S   R - K   R R K   H C Q H   Q F R   K N R   N G N R
                        20                                30                                40

2201  atctccggca aacggaaccg tgttggacat ccaagtatct gaaggagagg gagtgcccgc gggaaccgtc atctgccgca tccgaaatga aaacgaacaa
      I S G   K R N   R V G H   P S I   - R R   G S A A   G N R   H L P   H R K   - K R T
      60                                70                                80                                90
                                     FB ←

```

Deletion von *acoR* :

```

→ acoL
1  ccgaaagccg aggactgatg atctgaagct tgaccatatac ggagtccaat atgacaggaa agggattcat gtcaaccagc atatgcagac aaacatcccg
   P K A   E D - - S E A   - P Y R S P I   - Q E   R D S   C Q P   A Y A D   K H P

101  catatztatg cgtgcgggga tatcacaggc ggggttcagc tggcgcatgc cgcttttcac gaaggaaccg tcgccgcatc ccatgcctca ggcagagaca
    A Y L   C V R G   Y H R   R G S   A G A C   R F S   R R N   R R R I   P C L   R Q R

201  tgaaggtcaa cagtgacatt attccgcgct gcatctatac ttcgcctgaa atcgcaagcg tcggcttaaa tgaaaaaaag gcgagggagc gctacaggsa
    H E G Q   Q - H   Y S A   L H L Y   F A -   N R K   R R L K   - K K   G E G   A L Q G
                                → FB

301  tgttcgtatc ggagagtttc cgttttcttc aaacggaaaa gcgcttatth tgaatgaaac tgccggcaag gtcaaaatca tcatagagcc ggagtatcag
    C S Y   R R V   S V F F   K R K   S A Y   F E - N   C R Q   G Q N   H H R A   G V S

401  gaaattgtcg gggtttcgat cgtgggtccg ggagcaaccg aactgatcgg ccaggcagcc gtaatgttgc atgcagagct gacggcagac gcaatggagc
    G N C   R G F D   R G S   G S N   R T D R   P G S   R N V   A C R A   D G R   R N G

501  acttcatcgc ggcccccccg actcttttcgg aaacgattca cgaagctttg ctgcaagccg caggctcgggc cattcactgc tgaataaggg agaacttcgc
    A L H R   G P S   D S F   G N D S   R S F   A A S   R R S G   H S L   L N K   G E L R
                                                acoL ←

601  acagcgtgag agtgccggagt tttttttatc gatattgaaa gcgcttttat aatataatga ggaaaaagca tgaggagagg atggaatgaa tccgacgccc
    T A -   E C G   V F F I   D I E   S A F   I I - -   G K S   M R R   G W N E   S D A
                                                → acoR
                                                1

701  tgctatntaa atacgtggaa acgctttggt caggaagggc ttcttgatca ggcccgtttg aacaaaagag tcatggaatc atggtaccgc tgcaaaaaatc
    L L F   K Y V E   T L C   S G R   A S - S   G P L   E Q K   S H G I   M V P   L Q K
    10                                20                                30                                40

```

Anhang

801 gaaatgtcaa tccgtattta gataaaggac agtcaatttt aaaaaaggat ttattcgacg ctcaaaaaaa gaaacactcg ttattcctcg atatcgccct
S K C Q S V F R - R T V N F K K G F I R R S K K E T L V I P R Y R P
50 60 70
FB → Deletion

901 gccttatcta cacaatatca gccgtgaatt aaaagagtcg gaaatgatgg cgctcctgat cgatgccgac gggtagctat taagcttggc cggctgccgg
A L S T Q Y Q P - I K R V G N D G A P D R C R R V R I K L G R L P
80 90 100

1001 aggacgcttg aagaggcga aaaaatcaat tttgtcgagg gcgtgcgctg gacggaaaca gaagtcggca cgaacgccat cggaaccgca cttgaaatcg
E D A - R G E K N Q F C R G R A L D G N R S R H E R H R N R T - N
110 120 130 140

1101 gcgaagctgt caccattcac gggaccgagc atttttcggg cgcttcccac cattggagct gttctgctgc accgattcgc gatgaagacg gcaccgttat
R R S C H H S R D R A F F G R F P P L E L F C C T D S R - R R H R Y
150 160 170

1201 gggtttaatc gatatttctt gcctcacgga tagaaggcat ccttttatgc ttgggatggc tgccactgcc gcacacgcca tcgaacgcca gatcagcgca
G F N R Y F L P H G - K A S L Y A W D G C H C R T R H R T R D Q R
180 190 200

1301 catacgaaaa aaaacgaagc cgagctcatc agccattgtc ttgaaaaaat cgattcggat cagccgttta tcgtctgcaa tgaaaaagac aaaatcgtag
T Y E K K R S R A H Q P L S - K N R F G S A V Y R L Q - K R Q N R
210 220 230 240

1401 ccgcgagcag accggtgcgg gaacgttttt ccgactggag gagaatggat gtcaatgatc tgtatgagcg cgggtttgcc ggggggcaca agcagacaat
S R E Q T G A G T F F R L E E N G C Q - S V - A R V C R G A Q A D N
250 260 270

1501 tttctccgcc aaagacggga ggcccctcgg taagtcgatt gcaactggctg aagtgtcccg caataaaaaca gctccatcac tcgtatcccg tttcatctat
F L R Q R R E A P R - V D C T G - S V P Q - N S S I T R I P F H L
280 290 300

1601 ccgggtgaaa caggaacaag ccgggcgttt cagcaggcgc ttcaccacat gaggcttgcg gctaagacgg atgcgaatgt atacatatgg ggggaaacag
S G - N R N K P G V S A G A S P H E A C G - D G C E C I H M G G N
310 320 330 340

1701 gctccggaaa ggaacttgcc gcgagggcca tttatcaggc gagcgcacgg agaaacggcc cttttatcgc cgtcaactgc ggcgccattc ctgaaagctt
R L R K G T C R E G H S S G E R T E K R P F Y R R Q L R R H S - K L
350 360 370

Lokalisation der Deletionen des acu-Operons**Deletion von *acsA* :**

```

          tyrS ←
1  attttcaccg gccatcagct ctctaagaca gggaaggatg cgttctactg atctcagtct tcaccttttg aatattcgac taaatctttt ttaacataat
  - F S P A I S S L R Q G R M R S T D L S L H L L N I R L N L F - H N

          → acsA
101 atttttgcat tgtcaatgag acatcagtct tccatcgatg agagatcgcc tgccggaagg ttcagctccc atgctttcag gacgcgtctc atgatctttc
    I F A L S M R H Q S S I D E R S P A G R F S S H A F R T L T M I F
        1                                10                                20

201 cgcttcttgt cttcggcagt ttatctttaa attcgatttc ccttggcgcg gcatgtgchg ccaagccttg tttcacgaac tgcttgattt cttcttttaa
    P L L V F G S L S L N S I S L G A A C A A K P C F T N C L I S S F
        30                                40                                50

          FB acsA ↔ Deletion acsA
301 cgcatctgac gggtcataac cgtcccctcaa ggcgatgaac gctttaataa tttcaccocg gacgggatcc ggtttgccga tgacgcctgc ttcagcgaoc
    N A S D G S - P S L K A M N A L I I S P R T G S G L P M T P A S A T
    60                                70                                80                                90

401 gcctgatgct caacaagctt gctctcgact tcaaacgggc cgacgcgctc gcccgatgtc atgatgacat cgtcgatccg tccctggaac cagaagtacc
    A - C S T S L L S T S N G P T R S P D V M M T S S I R P W N Q K Y
        100                                110                                120

501 cgtcttcacg catgtaggcg gaatctcctg acacatacca atcgcccggc ataaaatagg agctatatatt ttcaggattg ttccagatcg aatgcatcat
    P S S S M - A E S P D T Y Q S P G I K - E L Y F S G L F Q I E C I
        130                                140                                150

601 cgacggccag ccttttttaa tggcgagatt tcccattctg taaggaggca gttcatttcc ctggttgtcg acgattgcag cctctacacc gggaatcggc
    I D G Q P F L M A R F P I L - G G S S F P W L S T I A A S T P G I G
    160                                170                                180                                190

701 ttgcccatg atcccggttt aatttccatg cacgggtaat tgcagatgag ctgcgatcct gtttcagtea tccaccaagt atcatgaatc cgggtgccga
    L P I D P G L I S M H G - L Q M S C D P V S V I H Q V S - I R L P
        200                                210                                220

801 agactttatg cccccactg atgacttcgg gatttaacgg ctcccctacg cttaaaatat gccgcaagga gcttagatta tatttattca caagatcgct
    K T L C P H L M T S G F N G S P T L K I C R K E L R L Y L F T R S
        230                                240                                250

```

Anhang

901 gcctgcaccc atcagcatcc gaaagccgt tggcgcgctg taccataccg tcacttccat tttttcaatc gtttcgtacc atgcctcagg actgaatctg
S P A P I S I R K A V G A L Y H T V T S I F S I V S Y H A S G L N L
260 270 280 290

1001 ccgctacga caacattcgt agctccattc agccaaggac cgaaaatccc gtaaaccggt ccggtgaccc agccgggatc agcgggtgac caatagatgt
P P T T T F V A P F S H G P K I P - T V P V T Q P G S A V H Q - M
300 310 320

1101 catcgtcatg cagatcaaga acccatttgg ctgtttgata atgctggatc attgctttat ggacgtggag aaccctttt ggcgcgccgg tcgaaccgga
S S S C R S R T H L A V - - C W I I A L W T W R T P F G A P V E P
330 340 350

1201 cgtatagtga agcagcatcc cgtcttctcg atccacccat tcaatctcaa gatcagtgcc tgcttccgcc gctttcgcgt aataatcaat gacaggtcct
D V - - S S I P S S - S T H S I S R S V P A S A A F A - - S M T G P
360 370 380 390
→ FA *acuA*

1301 tcttccttta cgccttctcc aacgacaatg attgattcaa gatccggaag ttcacatggcc ggcaccggtt caagcaattc cggcgtcgtc acgatgacct
S S F T P S P T T M I D S R S G S S S A G T R S S N S G V V T M T
400 410 420

1401 tcgctccgct gtttgcaagc ctgtctttga cggcaccttc cataaacgct tcaataaacg gcccgacgat cgctcccaat ttgatggcgc cgagaagaat
F A P L F A S L S L T A P S I N A S N N G P T I A P N L M A P R R
430 440 450

1501 Deletion *acsA* ← → FA *acsA*
aaaataaagc tcgggcgatc tcggcataaa aacaacaca cggctctcct ttcccacatc ggcattgctgc ttttaagacat tcccggcttt gttggtttca
I K - S S G D L G I K T N T R S P F P T S A C C F K T F P A L L V S
460 470 480 490

1601 tttttcatct ctctgaaagt gtacttttct tcgcgaccg gatcttttga gtaaaatgcc actttgtttt tcaaatttga ctcagcgtgg cggtcgatag
F F I S L K V Y F S S R T G S L - - N A T L F F K F D S A W R S I
500 510 520

1701 cttcataagc tgcattgatt tttcccgttt tgtgccatga aaaatgcttt tcggcatcct tccagtcaaa tgtccggtat gtttcatcat agtctttcaa
A S - A A L I F P V L C H E K C F S A S F Q S N V R Y V S S - S F
530 540 550

1801 gttgtaattt cccttttctg ctggcagcgc tttcaatttc atgcccaccc ccctttgttc gatcatcaaa atatattata gtatagattt tttattttct
K L - F P F S A G S A F N F M P I P L C S I I K I Y Y S I D F L F S
560 570 580

Anhang

Deletion von *acuA* :

```

1      caatTTTTaa aaaatactct tctctcctat gaaaacgctt aatattttgg tatgttatgt ataaaagact tcaactaaga tgtaaggcgg tggatacgtg
      Q F L K N T L L S Y E N A - Y F G M L C I K D F N - D V R R W I R
                                     1
101    gagcatcaca aaacttatca tgccaaagaa ttgcagaccg agaaaggctc tgtgctgata gagggcccta tcagtcgccga aaaactcgca gaatatgaat
      G A S Q N L S C Q R I A D R E R L C A D R G P Y Q S R K T R R I -
      10                20                30                40
201    ttcacgacga gtttacagcc ttctgcccac cacaaaaaca acatgaagca ttaatcgaaa tcgcagggct tcccgaagga cgaatcatca tcgcccgttt
      I S R R A Y S L S P I T K T T - S I N R N R R A S R R T N H H R P F
      50                60                70
301    ccggcaaaacc attgtcggct atgtgacata tgtttatcca gaccogcttg aaagatggtc tgaaggaaac atggaaaatt taatcgagct tggagccatc
      P A N H C R L C D I C L S R P A - K M V - R K H G K F N R A W S H
      80                90                100
401    gaagtcattc cggcgttcag aggtcactct gtcggaaga cgctgcttgc ggtcagcatg atggatccgc agatggaaaa atatattatc atcagcactg
      R S H S G V Q R S L C R E D A A C G Q H D G S A D G K I Y Y H H D
      110                120                130                140
501    aatattactg gcattgggat ctaaagggga ctaacaaaga tgtttgggaa tacagaaaga tgatggagaa gatgatgaat gccggaggac ttgtctggtt
      - I L L A L G S K G D - Q R C L G I Q K D D G E D D E C R R T C L V
      150                160                170
601    tgcgacagac gatccggaaa tcagctccca tcccgccaac tgtttaatgg cacgcatcgg aaaagaggtc agtcaggaat cgatcgagcg ttttgacaga
      C D R R S G N Q L P S R Q L F N G T H R K R G Q S G I D R A F - Q
      180                190                200
701    ctcatattcc acaatcggtt tatgtattaa gggagcaaa gggacctgaa tatgattggt gaaaaaatca tgaacggga tgttgtgaca ctatccagaa
      T Q I P Q S F Y V L R E Q R G P E Y D C - K N H E T G C C D T I Q
      210
801    ccgatacgat tgaagaagcg atcaaacgca tgcgaacatt ccacataaag caccttcccg tcatcaatga acggggaacg gtcataggca ttgtcacgga
      N R Y D - R S D Q T H A N I P H K A P S R H Q - T G N G H R H C H G
```

Anhang

Deletion von *acuC* :

FB *acuC* ← → *acuC*

1 cctcgtgat atcagcgcca tcttcagcag gcgccaatc gccatattga gcgtgctcgt atatccccgt gatgaagatg attcgaaaat actcgtgttt
P R - Y Q R H L Q Q A P N R H I E R A R I S R - - R - F E N T R V
1

101 cgcgttcaaa cgatgaatcc cgcctctatc atcaaagacg taaaatccaa agggatcag gttctttggc cggtgttca aagggtttg ccatgaagga
S R S N D E S R L Y H Q R R K I Q R V S G S L A G C S K G F A M K
10 20 30 40

201 cagcgtattt attttttctc cctcatatca aacstatcaa tttcatcaag accaccggtt taatcagctg cgagtctatg taacatacga tcttttgaac
D S V F I F S P S Y Q T Y Q F H Q D H P F N Q L R V Y V T Y D L L N
50 60 70

FB *acuC* ⇐ Deletion *acuC*

301 acggctcggcg catttgaacc gggagaaaacg attgccccgc gcgcagcgac agaaaaccgag ctcgagcttg ttcacacggg cgattatatac agggccgctcc
T V G A F E P G E T I A P R A A T E T E L E L V H T G D Y I R A V
80 90 100

401 agcttgacagg ggcgggaaag ctccccgcag ccgaaagcga aaactacggg cttggaacgg aggatacccc tgtttttggc gggatgcatg aagccgcctc
Q L A G A G K L P A A E S E N Y G L G T E D T P V F A G M H E A A
110 120 130 140

501 ccttttggta ggcggaacgc tgacggctgc agactatgtc atgacgggca aagctagaca cgccctcaat cttggaggcg ggcttcacca cgggttcaga
S L L V G G T L T A A D Y V M T G K A R H A L N L G G G L H H G F R
150 160 170

601 ggaagggtt caggcttttg cgtctataat gacagttcag ttgtgatacg ttacttgcag aaaaaatatac atgcgaaagt tttatatatt gatacagacg
G R A S G F C V Y N D S S V V I R Y L Q K K Y H A K V L Y I D T D
180 190 200

701 cccatcacgg cgacgggggtg cagttttacgt tctatgatga tccttccgtc tgcaccgtct cgatacatga aacaggccgc tacctattcc cgggaacggg
A H H G D G V Q F T F Y D D P S V C T V S I H E T G R Y L F P G T
210 220 230 240

801 gcaggttcag gaaagaggtc atggcgaagg ctacggctat gcttttaata tcccgtcga tgccttcaca gaagatgagt cttttcttga ttcctaccgg
G Q V Q E R G H G E G Y G Y A F N I P L D A F T E D E S F L D S Y R
250 260 270

901 acggctgttt ctgaaatagc cgagtttttc aaaccggatg tcattttgtc gcaaaaacgga gctgacgcac attactacga tccgctgaca cacttgtgca
T A V S E I A E F F K P D V I L S Q N G A D A H Y Y D P L T H L C
280 290 300

Anhang

```
1001   cgacgatgaa gatttacgaa gagattccaa agctcgctca cgaacttgca cacacctatt gcagcgggaag atggatcgct gtcggcggag gcggtactga
      T T M K I Y E E I P K L A H E L A H T Y C S G R W I A V G G G G Y
      310                               320                               330                               340

1101   catttggcgc gtcgtaccga gggcatgggc aagaatctgg cttgaaatga aagggatgga accagaggag aaaatgcctg aaaaatggct gaaaaaatgg
      D I W R V V P R A W A R I W L E M K G M E P E E K M P E K W L K K W
      350                               360                               370

1201   gggaaacagg catctgtccg gcttcctgcc aactggtcgg acccggaaga tttgtatcct ccaattccaa gaaaaaccga aataacggaa aaaaacgcac
      G K Q A S V R L P A N W S D P E D L Y P P I P R K T E I T E K N A
      380                               390                               400

Del ⇐ FA acuC
1301   aaacggttgc caaagccctt tatccgattc gctctgcccc gcggtaccact taatatgaaa attgctggcag acagaaaagg ccttgctttt gtgcaagacc
      Q T V A K A L Y P I R S A Q R T T - Y E N C G T Q K R P C F C A R
      410                               420                               430                               440

1401   ttgctttcct ctcattattg ttttgcgatg acaatctcga cgcgcctggt ttccttcata tggctctcag tgcggttgct cctgaccggg tttgtatccg
      P C F L L I I V L R - Q S R R A C F P S Y G S Q C G C P - P V L Y P
      450                               460                               470

1501   cataaccgat ggcaagaaaa cgcgacgagt cgagcttttc cttcgacgta aagtagccga tcacagtgtc cgccttgct gcagaaagct cccaattgga
      H N R W Q E N A T S R A F P S T - S S R S Q C L Q K A P N W M E N
      480                               490                               500
```

Lokalisation der Deletionen des Glyoxylat-Operons

Deletion des gesamten Glyoxylat-Operons:

```
1   atcggaaata tttgtagaaa aaataaaatt ttctgaaacc ttttccgggc ttgttcgtct tatatagtga agacaaaaaa tttggagggg atatttatga
      N R K Y L - K N I N F L K P F P G L F V L Y S E D K K F G G D I Y
      10                               20                               30                               40                               50                               60                               70                               80                               90
      → BLi04206

101  tgatgtttat cttgattttg acaatggccg tgtatttgtt ctattctttc agcaaagaca accggcccgc caaaacaac aacaggaatc atcagacact
      D D V Y L D F D N G R V F V L F F Q Q R Q P A G Q N K Q Q E S S D T
      10                               20                               30

201  gactgttatt agggaaaact cttttaccgc cccttccaat gatgtcaatt gctaacttga tagacaacaa gcaagccgcc caatgacggg cggctttttc
      D C Y - G K L F Y R P F Q - C Q L L T - - T T S K P P N D G R L F
      40                               50                               60
      → Iscitrat Lyase

301  acgtttttat gattgaaact gttccgcttc agtcgatccc ttcagtgcag tggttgatga agtcccgcct gtcacaacct gggcgacttc atcaaagtag
      H V F M I E T V P L Q S I P S V Q W L M K S R L S Q P G R L H Q S
      70                               80                               90                               100
```

Anhang

401 ctcggtccga cttcgcgctg atgccttgtc gccgtatagc cgtggacttc gctggcaaac tcggcctgct gcagatcaga gtacgccgcc attccgcggt
S S F R L R A D A L S P Y S R G L R W Q T R P A A D Q S T P P F R G
110 120 130

501 gcttatattg gcgggccaat tcaaacatgc cgtgatttaa ggcggtgaag cccgccagtg tgacaaattg aaatttatag cccatttcac tgagctgttt
A Y I G G P I Q T C R D L R R G S P P V - Q I E I Y S P F H - A V
140 150 160

601 ctggaagttc aagatcgtgt tgtcatccag tttggccttc cagttgaacg aaggggaaca gttgtaggcg agcagtttgc ccgggaattt ttcattggatc
S G S S R S C C H P V W P S S - T K G N S C R R A V C P G I F H G
170 180 190 200

701 gcctgtgcaa accggcgggc ttcttcaata ttcggctcag acgtttcaca ccagatcaaaa tcggcatacg gcgcatacgc caagcctctg gcaatcgcct
S P V Q T G G L L Q Y S A Q T F H T R S N R H T A H T P S L W Q S P
210 220 230

801 gatcaaggcc aggcctttgtt ttgaagaacc cttccgctgt tcgctctccc gtcaaaaacg gtgcatcata tgaatcgacg tcgcttgtga tcaggtctgc
D Q G Q A L F - R T L P L F A L P S K T V H H M N R R R L - S G L
240 250 260

901 cgcattcgcg tccgtgcggg caataagaat ggtcgggact cccatcacgt ctgcgcgag ggcgcggca atcaaattac gtaccgctgt ttgcgtcgga
P H S R P C G Q - E W S G L P S R L R R G A R Q S N Y V P L F A S
270 280 290 300

1001 agcagcactt ttccgcccaa atgccgcac tttttctcag acgacagctg gtcttcaaag tgaactcccg cggcgccggc ttcaatcata cttttcatca
E A A L F R P N A R T F S Q T T A G L Q S E L P R R R L Q S Y F S S
310 320 330

1101 gctcgaacac attcagctgc ccgcogaagc ccgcttcagc gtccggccaca atcggagcaa accaatcgat gtcttccttt ccttccatat ggtggatttg
A R T H S A A R R S P L Q R R P Q S E Q T N R C L P F L P Y G G F
340 350 360

1201 atcggcgcgc tgcagcgtgc ggttgatttt tttgacgact tccgggacgc tgtttgccgg ataaaggctt tggtcaggat acatgctccc tgacatattt
D R R A A A C G - F F - R L P G R C L P D K G F G Q D T C S L T Y
370 380 390 400

1301 gcacgcgcag ccacctgcca gccgcttaaa taaatcgctt tcaatccgce ctttacttgc tgcattgctt ggtttccggt caaagcgcgc agcgcgggga
L H R Q P P A S R L N K S L S I R P L L A A W L G F R S K R P A P G
410 420 430

1401 cgaaatcctc tgtatggaga agcttccaca gcttttcggc gccgcgcctt gcaatcgtgt attcaatctc gagcgtgccc ctcagccgaa tgacgtctgc
R N P L Y G E A S T A F R R R A L Q S C I Q S R A C P S A E - R L
440 450 460

1501 cgccctcaac ggccttgtga tccctttcca gcgttcatca tgctcccagc tttctgagag ttgtttttct ttcagcatcg cacattcccc cattatatat
P P H T A L - S L S S V H H A P S F L R V V F L S A S H I P P L Y
470 480 1

Isocitratlyase ← → Malats.

Anhang

1601 tttcataagc cggatcgtt agaaactccg cgaattcatc atccaaaatc agctgttcaa ataactgtcc ggcctcttca aaccggccgc tccgaaaatg
I F I S R Y R - K L R E F I I Q N Q L F K - L S G L F K P A A P K M
10 20 30

1701 ttccacgcct gcttcatcga tgattttctg cattttcttc tctttcatca tcttgaccat ttccgcggtg actttccggc catcgtcaag aactcctttc
F H A C F I D D F L H F F L F H H L D H F R G D F P A I V K N S F
40 50 60 70

1801 ggatggcga tccattgcca cagctgggct ctggaaatct ccgcccgttc agcgtcctcc attaagtggc cgatcggagc ggcgcctctg cccgacagcc
R M A N P L P Q L G S G N L R R C S V L H - V V D R S G A S A R Q
80 90 100

1901 atgaagctaa atagcggatg ccggcgcgctga tattggtagc gacgcctgct tctgtaattc tgcctttcgg tacttccagc aagtcttttt cctcgacctt
P - S - I A D A G A D I G T D A C F C N S A F R Y F Q Q V F F L D L
110 120 130

2001 tacgtctttc cgctttctat gaatctgggt ccgacgagcc atagtctgat tgaatacatc gagcgcggtt tgaatcatgc cgggatgcgc gatccatggt
Y V F P L S M N L V R R R H M L I E Y I E R R L N H A G M R D P C
140 150 170 180

2101 ccgtcatggc cgtcttttac ttcaagttcc ttatcttcgc ggattttggc aaatgcccgtc tcattgatct caggtttgtc tttagcggga atttgccgcc
S V M A V F Y F T F L I F A D F G K C G F I D L R F V F S G N L R
190 200 210

2201 ccattccccc aatcgcgatg acgttgcggt tatgacacgt ttgaatcgcc aagaggaggt aggcctctcat gttgggaact gtcacgtca cggctgagcg
R H S P N R M D V A F M T R L N R Q E G V G S H V G N C H R H G - A
220 230 240

2301 atctggaaga atgacttcat ccctgttctt gaattttcta ataaagtga aaatataatc ccactgccc cagttaagcc cggctgaatg ttccttcaat
I W K N D F I P V P E F L N K A E N I I P P A A V K P G - M F L Q
250 260 270 280

2401 tcgtagagga tttcatccat ttcaaaggcc gccaggatcg tttcaacgag aaccgtcgct ttaatcgtgc cctgcggaat gcgcaagtcg ttttgccgat
F V E D F I H F K G R Q D R F N E N R R F N R A L R N A Q V V L R
290 300 310

2501 aaacaaatac gtcgttccac agccttgctt ccagggtggt ttcgattttt ggaaggtaga aataagggcc gcttcctttt ttgatcagct cttttgcggt
I N K Y V V P Q P C F Q V V F D F W K V E I R A A S F F D Q L F C V
320 330 340

2601 atggaaaaaa taaagaccaa aatcgaacag gcttgctgac acgggctcgc gcgccatcag cacatgcttt tcttccaagt gccatcccct cggcctgacc
M E K I K T K I E Q A C - H G P A A D Q H M L F F Q V P S P R P D
350 360 370 380

2701 atgataacgg cggggttctc tttcagctca tagcgtttgc cctgttcatt cgtaaaagaa atcgtcccgc ggaccgcatc ccgcaaatta acctggcctt
H D N G G V L F Q L I A F A L F I R K R N R P A D R I P Q I N L A
390 400 410

Anhang

2801 caatgcagtt tttccacgtc ggcgagttcg catcttcaaa gtcggccata aagactttcg ctctgaatt taaagcgttg atgaccattt ttctgtcgac
F N A V F P R R R V R I F K V G H K D F R S - I - S V D D H F S V D
420 430 440

2901 cgggccagtg atttcaacc tgcggctctc caaatccggg gggagcggcg cgactgtcca gtccgcctcg cggatgtgct tegtttccgc caaaaaacaa
R A S D F N P A V L Q I P G E R R D C P V R L A D V L R F R Q K T
450 460 470 480

3001 gggttcttcc cttgatcaat ttcagcctgc ctgatcgtcc gcaaatgcag caattcccgt cttcttcccc cgaatggcg ttcaagacgt ccgataaact
R V L P L I N F S L P D R P Q M Q Q F P S S S P E M A F K T S D K
490 500 510

3101 ccatcgcttc tttgtcaaa atctcttcat aatgcggatt tatcgatcgg gttatatgaa ttctcttctc ctctgttttc atgtctccct acccctttac
L H R F F C Q N L F I M R I Y R S G Y M N S L L L C F H V S L P L Y
520 530 540
Malat Synthase ← →SD ←

3201 atgcctttgtt ataaaacagt ttgcctactc gccttttttg gcaagacagc gctcgcattc catgaagtaa gattcagcct gctcctccat cttttcgccg
M L C Y K T V C L L A F F G K T A L A F H E V R F S L L L H L F A
1 10 20
→ HSP

3301 cattcagggc acgttttttt cggaagcgtt ctgaaaaatt ccatcggact tttcaagctc atttgtataa cctccttttt atagaacagt tttatgtttt
A F R A R F F R K R S E K F H R T F Q A H L Y N L L F I E Q F Y V
30 40
HSP ← →SD ←

3401 atatttctgt tgtagtacag tatacagcgc aaaaatgaaa atgtacacac ctttttccaa aaaatattta tttttttcca ttcaaacaaa aatagattgt
L Y F C C S T V Y S A K M K M Y T P F S K K Y L F F S I Q T K I D C
Tr. Start ← →-10 ←

3501 tctcttttta ttcatagctt gttcatattt ttcttctaga atagggaaca taaagaggty aaagtgatga tgaaaataaa aaacaaacaa cttgatgtca
S L F I H S L F I F F F - N R E H K E V K V M M K I K N K Q L D V
Deletion Glyox_ges ←

3601 ttctggttct aattttgttg gcagctctta ttctgaatac atataacatt tggctggacg atgccgcaa ccagtattac ttggcagcag tcaaaagcat
I L V L I L L A A L I L N T Y N I W L D D A A N Q Y Y L A A V K S

Anhang

Deletion der Isocitrat-Lyase:

BLi04206 ←

1 gactgttatt agggaaaact cttttaccgc cccattccaat gatgtcaatt gctaacttga tagacaacaa gcaagccgcc caatgacggg cggttttttc
D C Y - G K L F Y R P F Q - C Q L L T - - T T S K P P N D G R L F
40 50 60

→ Isocitrat Lyase

101 acgtttttat gattgaaact gttccgcttc agtcgatccc ttcagtgcaag tggttgatga agtcccgcct gtcacaacct gggcgacttc atcaaagtag
H V F M I E T V P L Q S I P S V Q W L M K S R L S Q P G R L H Q S
70 80 90 100

201 ctcggtccga cttcgcgctg atgccttctc gccgtatagc cgtggacttc gctggcaaac tcggcctgct gcagatcaga gtacgcccgc attcccgggt
S S F R L R A D A L S P Y S R G L R W Q T R P A A D Q S T P P F R G
110 120 130

301 gcttatattg gcgggccaat tcaaacatgc cgtgatataa ggctggaag cccgccagtg tgacaaattg aaatttatag cccatttcac tgagctgttt
A Y I G G P I Q T C R D L R R G S P P V - Q I E I Y S P F H - A V
140 150 160

→ Deletion Isocitrat Lyase

401 ctggaagtcc aagatcgtgt tgtcatccag tttggccttc cagttgaacg aaggggaaca gttgtaggcg agcagtttgc ccgggaattt ttcattggatc
S G S S R S C C H P V W P S S - T K G N S C R R A V C P G I F H G
170 180 190 200

501 gcctgtgcaa accggcgggc ttcttcaata ttcggctcag acgttttcaca ccagatcaaa tcggcatacg gcgcatacgc caagcctctg gcaatcgcct
S P V Q T G G L L Q Y S A Q T F H T R S N R H T A H T P S L W Q S P
210 220 230

601 gatcaaggcc aggcctttgtt ttgaagaacc cttccgctgt tcgctctccc gtcaaaaacg gtgcatcata tgaatcgacg tcgcttgtga tcaggtctgc
D Q G Q A L F - R T L P L F A L P S K T V H H M N R R R L - S G L
240 250 260

701 cgcattcgcg tccgtgcggg caataagaat ggtcgggact cccatcacgt ctgcgcgag ggcgcggca atcaaattac gtaccgctgt ttgcgtcgga
P H S R P C G Q - E W S G L P S R L R R G A R Q S N Y V P L F A S
270 280 290 300

801 agcagcactt ttccgcccac atgcccgcac tttttctcag acgacagctg gtcttcaaag tgaactcccg cggcgccggc ttcaatcata cttttcatca
E A A L F R P N A R T F S Q T T A G L Q S E L P R R R L Q S Y F S S
310 320 330

Deletion Isocitrat Lyase ←

901 gctcgaacac attcagctgc ccgcccgaagc ccgcttcagc gtcggccaca atcggagcaa accaatcgat gtcttccttt ccttccatat ggtggatttg
A R T H S A A R R S P L Q R R P Q S E Q T N R C L P F L P Y G G F
340 350 360

1001 atcggcgcgc tgcagcgtgc ggttgatatt tttgacgact tccgggacgc tggttgcggg ataaaggctt tggtcaggat acatgctccc tgacatattt
D R R A A A C G - F F - R L P G R C L P D K G F G Q D T C S L T Y
370 380 390 400

Anhang

1101 gcacgagcag ccacctgcca gccgctaaa taaatcgctt tcaatccggc ctttacttgc tgcatggctt ggtttccggt caaagcgccc agcgccggga
L H R Q P P A S R L N K S L S I R P L L A A W L G F R S K R P A P G
410 420 430

1201 cgaaatcctc tgtatggaga agcttccaca gcttttcggc gccgcgctt gcaatcgtgt attcaatctc gagcgtgccc ctcagccgaa tgacgtctgc
R N P L Y G E A S T A F R R R A L Q S C I Q S R A C P S A E - R L
440 450 460

1301 cgccatcac ggccttgta tccctttcca gcgttcatca tgctcccagc tttctgagag ttgtttttct ttcagcatcg cacattcccc cattatata
P P H T A L - S L S S V H H A P S F L R V V F L S A S H I P P L Y
470 480 1

Isocitratlyase ← → Malats.

Deletion der Malat-Synthase:

1 cgccatcac ggccttgta tccctttcca gcgttcatca tgctcccagc tttctgagag ttgtttttct ttcagcatcg cacattcccc cattatata
P P H T A L - S L S S V H H A P S F L R V V F L S A S H I P P L Y
470 480 1

→ Deletion Malat Synthase

101 tttcataagc cggtatcgtt agaaactccg cgaattcatc atccaaaatc agctgttcaa ataactgtcc ggctcttca aaccggccgc tccgaaaatg
I F I S R Y R - K L R E F I I Q N Q L F K - L S G L F K P A A P K M
10 20 30

201 ttccacgcct gcttcatcga tgattttctg cattttcttc tctttcatca tcttgaccat ttccgcggtg actttccggc catcgtcaag aactcctttc
F H A C F I D D F L H F F L F H H L D H F R G D F P A I V K N S F
40 50 60 70

301 ggatggcga tccattgcca cagctgggct ctggaaatct ccgccgttgc agcgtcctcc attaagtggg cgatcggagc ggcgccctctg cccgacagcc
R M A N P L P Q L G S G N L R R C S V L H - V V D R S G A S A R Q
80 90 100

401 atgaagctaa atagcggatg ccggcgctga tattggatcg gacgcctgct tctgtaattc tgcctttcgg tacttccagc aagtcttttt cctcgacctt
P - S - I A D A G A D I G T D A C F C N S A F R Y F Q Q V F F L D L
110 120 130

501 tacgtctttc cgctttctat gaatctgggt ccgacgagcc atatgctgat tgaatacatc gagcgcctgt tgaatcatgc cgggatgcgc gatccatggt
Y V F P L S M N L V R R R H M L I E Y I E R R L N H A G M R D P C
140 150 170 180

601 ccgtcatggc cgtcttttac ttcacgttcc ttatcttctc ggattttggc aaatgcggct tcattgatct caggtttctc tttagcggga atttgcgccc
S V M A V F Y F T F L I F A D F G K C G F I D L R F V F S G N L R
190 210

Anhang

Deletion Malat Synthase ←

701 ccattccccc aatcgcattg acgttgcggt tatgacacgt ttgaatcgcc aagagggagt aggctctcat gttgggaact gtcacgtca cggctgagcg
R H S P N R M D V A F M T R L N R Q E G V G S H V G N C H R H G - A
220 230 240

801 atctggaaga atgacttcat ccctgttctt gaatttctta ataaagtga aaatataatc ccactgccc cagttaagcc cggctgaatg ttccttcaat
I W K N D F I P V P E F L N K A E N I I P P A A V K P G - M F L Q
250 260 270 280

901 tcgtagagga tttcatccat ttcaaaggcc gccaggatcg tttcaacgag aaccgtcgtt ttaatcgtgc cctgcggaat gcgcaagtgc ttttgcgcat
F V E D F I H F K G R Q D R F N E N R R F N R A L R N A Q V V L R
290 300 310

1001 aaacaaatac gtcgttccac agccttgctt ccagggtggt ttcgattttt ggaaggtaga aataagggcc gcttcctttt ttgatcagct cttttgcggt
I N K Y V V P Q P C F Q V V F D F W K V E I R A A S F F D Q L F C V
320 330 340

1101 atggaaaaaa taaagaccaa aatcgaacag gcttgctgac acgggctcgc cgccgatcag cacatgcttt tcttccaagt gccatcccct cggcctgacc
M E K I K T K I E Q A C - H G P A A D Q H M L F F Q V P S P R P D
350 360 370 380

1201 atgataacgg cggggttctc tttcagctca tagcgtttgc cctgttcatt cgtaaagaa atcgtcccgc ggaccgcatc ccgcaaatta acctggcctt
H D N G G V L F Q L I A F A L F I R K R N R P A D R I P Q I N L A
390 400 410

1301 caatgcagtt tttccacgtc ggcgagttcg catcttcaaa gtcggccata aagactttcg ctcctgaatt taaagcgttg atgaccattt ttctgtcgac
F N A V F P R R R V R I F K V G H K D F R S - I - S V D D H F S V D
420 430 440

1401 cgggccagtg atttcaacc tgccgtcttc caaatcccgg gggagcggcg cgactgtcca gtccgcctcg cggatgtgct tcgtttccgc caaaaaaa
R A S D F N P A V L Q I P G E R R D C P V R L A D V L R F R Q K T
450 460 470 480

1501 gggttcttcc cttgatcaat ttcagcctgc ctgatcgtcc gcaaatgcag caattcccgt cttcttcccc cgaatggcg ttcaagacgt ccgataaact
R V L P L I N F S L P D R P Q M Q Q F P S S S P E M A F K T S D K
490 500 510

Malat Synthase ← →SD ←

1601 ccacgccttc ttttgtcaaa atctcttcat aatgctgatt tatcgatcgg gttatatgaa ttctcttctc ctctgttttc atgtctcctt acccctttac
L H R F F C Q N L F I M R I Y R S G Y M N S L L L C F H V S L P L Y
520 530 540

Anhang

Deletion von dem ‚hypothetical small protein‘ (HSP):

```

                                                    Malat Synthase ←          → Del. HSP
                                                    -SD ←
1      ccacgccttc ttttgtcaaa atctcttcat aatgcggatt tatcgatccg gttatatgaa ttctcttctc ctctgttttc atgtctccct acccctttac
      L H R F F C Q N L F I M R I Y R S G Y M N S L L L C F H V S L P L Y
                    520                                530                                540

      → HSP
101    atgccttggt ataaaacagt ttgcctactc gccttttttg gcaagacagc gctcgcattc catgaagtaa gattcagcct gctcctccat cttttcgccg
      M L C Y K T V C L L A F F G K T A L A F H E V R F S L L L H L F A
                    1                                10                                20

      Deletion HSP ← HSP ←          → SD ←
201    cattcagggc acgttttttt cggaagcgtt ctgaaaaatt ccacgcggact tttcaagctc atttgtataa cctccttttt atagaacagt tttatgtttt
      A F R A R F F R K R S E K F H R T F Q A H L Y N L L F I E Q F Y V
                    30                                40

      Tr. Start ←          →-10 ←
301    atatttctgt tgtagtacag tatacagcgc aaaaatgaaa atgtacacac ctttttccaa aaaatattta tttttttcca ttcaaacaaa aatagattgt
      L Y F C C S T V Y S A K M K M Y T P F S K K Y L F F S I Q T K I D C

401    tctcttttta ttcatagctt gttcatattt ttcttctaga ataggaaca taaagaggty aaagtgatga tgaaaataaa aaacaaacaa cttgatgtca
      S L F I H S L F I F F F - N R E H K E V K V M M K I K N K Q L D V
```

Lokalisation der Deletion yqfD

```

1      ccgcgcgtga caattgaaat gttcagctct tcttccatca acttcaaatg ggaatcctgg ttcccaaaca gcgcttgagc ctcattcggg ctttccagtt
      S A R D N - N V Q L F L H Q L Q M G I L V P K Q R L S L I R T F Q

      → yqfD
101    gctgatgaat cgcaagtaag tggttctgtca ttcttttagtc tcttgaacaa ttgggtgtgt ttgaacaatg ttttcaataa cctggtaaag gatgatcaat
      L L M N R K - V F C H S L V S - T I G V V - T M F S I T W - R M I N
                    1                                10                                20

      FA ↔ Deletion yqfD
201    ttaactttac cattctcgtc cgtttcgtgc aaaacttttt cactgataat gttcccgtct ctgccgattt ttttctgat gtctcttttt cccatttcga
      L T L P F S L V S C K T F S L I M F P S L P I F F L M S L F P I S
                    30                                40                                50

301    ttccttcaag aactgcttct tttttcagat acaccctttt gatttgctcg ctctccctca tatgctcctt ttcataagcg acaggaagct taaaattcat
      I P S R T A S F F E Y T L L I C S L S L I C S F S - A T G S L K F
                    60                                70                                80                                90
```


LEBENS LAUF

Name: Melanie Pfaffenhäuser geb. Bauch
Nationalität: deutsch
Kontaktadresse: Justus-Liebig-Straße 11
33378 Rheda-Wiedenbrück
Deutschland
Tel.: +49 5242 4043105
Handy: 01602842125
Email: mpfaffenhaeuser@gmx.de

SCHULISCHER WERDEGANG

1986 - 1990 Grundschule Nordhorn, 33330 Gütersloh
1990 - 2000 Städtisches Gymnasium, 33330 Gütersloh
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Gesamturteil 2,7)

AKADEMISCHER WERDEGANG

Okt. 2000 - Okt. 2006: Studiengang Diplom- Biologie an der Universität Bielefeld
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Mikro- und Zellbiologie
Nichtbiol. Nebenfach: organische Chemie
Diplomarbeit: "Molekulargenetische Charakterisierung von potentiellen RirA-abhängigen Eisen-Regulatoren in *Sinorhizobium meliloti* RM1021" Universität Bielefeld, AG Stefen Weidner
Abschluss: Diplom (Gesamturteil 2,2)
Mai. 2007 – März 2008 Doktorandin am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen, AG Ehrenreich
April 2008- Oktober 2012 Promotion am Institut für Mikrobiologie, TU München, AG Ehrenreich

SONSTIGES

Fremdsprachen: Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Latein
EDV-Kenntnisse: Windows Word, Excel, PowerPoint, EMMA
(Microarrayauswertung), Adobe Illustrator, Clone Manager, Corel Draw

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Verwendung von gerichteten und ungerichteten Mutagenese-Methoden zur Untersuchung des Acetyl-CoA Stoffwechsels von *Bacillus licheniformis* DSM13“ in dem Institut für Mikrobiologie unter der Anleitung und Betreuung durch Dr. Armin Ehrenreich und Prof. Dr. Wolfgang Liebl ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.